

杭白菊、当归、丹参提取液抑制黄褐斑形成及机制研究

应 军, 倪庆纯, 杨 威*, 黄远铿, 郭健敏, 肖百全, 张志妮

广州医药工业研究院 国家广州新药安全评价研究重点实验室, 广东 广州 510240

摘要: 目的 观察杭白菊、当归、丹参提取液对 im 黄体酮及紫外 (UV) 照射导致的黄褐斑小鼠模型的抗氧化与抗黄褐斑形成作用。方法 将小鼠随机分成对照组、模型组、维生素 C 组、杭白菊组、当归组、丹参组共 6 组。采用 im 黄体酮及辅助 UV 照射方法建立黄褐斑小鼠模型。测定各组肝脏及皮肤组织中的谷胱甘肽过氧化酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、酪氨酸酶 (TYR) 活性与总抗氧化能力 (T-AOC), 以及丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO)、肝脏脂褐质水平, 并测定血液流变学指标, 进行皮肤病理学检查。结果 杭白菊、当归、丹参提取液显著增强黄褐斑小鼠肝脏和皮肤中 GSH-Px、SOD 活性, 降低 MDA 水平, 抑制 TYR 增加, 使黑素细胞 (MC) 生成减少, 抑制黑色素合成, 从而减轻皮肤色素沉着。结论 杭白菊、当归、丹参提取液有一定的防治黄褐斑的功效, 其作用与提高机体抗氧化能力, 抑制 TYR 活性, 减少黑色素的合成以及改善机体的血液流变学有关。

关键词: 杭白菊; 当归; 丹参; 黄褐斑; 抗氧化; 酪氨酸酶; 黑色素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0958-05

Inhibition of extracts from Hangzhou *Chrysanthemum Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* on formation of chloasma and their mechanism

YING Jun, NI Qing-chun, YANG Wei, HUANG Yuan-keng, GUO Jian-min, XIAO Bai-quan, ZHANG Zhi-ni

State Key Laboratory of New Drug Evaluation in Guangzhou, Guangzhou Institute of Pharmaceutical Industry, Guangzhou 510240, China

Abstract: Objective To investigate the oxidation resistance and removing chloasma function of the extract from Hangzhou *Chrysanthemum Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in chloasma model induced by progesterone and ultraviolet radiation. **Methods** The chloasma model was established with progesterone (20 mg/kg) by im injection or ultraviolet radiation in female mice. The effects of each group on GSH-Px, SOD, tyrosinase (TYR), MDA, NO, T-AOC, and lipofuscin in skin and liver were detected, and hemorheology and dermatopathology were observed. **Results** The result showed that the groups with the extract from Hangzhou *Chrysanthemum Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* could significantly increase the activity of GSH-Px and SOD and decrease the contents of MDA and TYR in skin and liver. Such effect conducted that a decrease of melanin production in the nude mice model was observed. **Conclusion** All the extracts from Hangzhou *Chrysanthemum Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* have the effect of removing chloasma to various degrees, and the mechanism may be related to enhancing oxidation resistance, decreasing TYR activity, inhibiting melanocyte proliferation, and improving hemorheology.

Key words: Hangzhou *Chrysanthemum Flos*; *Angelicae Sinensis Radix*; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; chloasma; anti-oxidation; tyrosinase; melanin

黄褐斑是一种面部皮肤出现局部性淡褐色或褐色的色素沉着皮肤病, 皮损部位以面颊部最多, 并且大多数患者伴有不同程度的月经失调、失眠、心烦

易怒等内分泌及植物神经系统功能紊乱, 给患者带来生活及精神方面诸多烦恼和痛苦。因此, 寻找高效、安全的中药祛斑、美白制剂, 一直是药学和化

收稿日期: 2010-12-06

基金项目: 粤港关键领域重点突破项目“华南创新中药研究开发与技术服务中心(平台)”(2006A35003001)

作者简介: 应 军(1973—), 男, 江西人, 副主任药师, 硕士, 主要从事中药新药研发及管理。Tel: (020)84435577 E-mail: 1868899894@163.com

*通讯作者 杨 威 Tel: (020)84241750 E-mail: yangwei0719@163.com

妆品领域的研究热点^[1-2]。本实验通过 im 黄体酮及紫外照射建立黄褐斑小鼠模型^[3-4], 考察杭白菊、当归、丹参提取液的抗氧化、抗黄褐斑作用及其机制, 为进一步发掘杭白菊、当归、丹参的功效提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级昆明种小鼠, 购自广州医学实验动物中心, 合格证号 0066091。实验期间动物饲养于广州医药工业研究院 SPF 级动物房。

1.2 药品

丹参提取液(批号 090312B101, 相当于生药 0.56 g/mL); 当归提取液(批号 09063001, 相当于生药 0.417 g/mL); 杭白菊提取液(批号 090820, 相当于生药 0.93 g/mL), 均由无限极(中国)有限公司提供。维生素 C (100 mg/片, 批号 090304), 广东华南药业集团公司生产。

1.3 主要试剂

黄体酮注射液(批号 090705, 规格 20 mg/mL), 浙江仙琚制药股份有限公司生产, 谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)、总抗氧化能力(T-AOC)、脂褐质、组织蛋白测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。小鼠酪氨酸酶(TYR) ELISA 测定试剂盒。以上 ELISA 试剂盒均为 R&D 公司分装, 大连泛邦化工技术开发有限公司提供。

1.4 主要仪器

Emax 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司), TU-1221 可见-紫外分光光度计, 3-18K 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 生产), S10 型手提式高速分散器(宁波新芝公司生产), RF-5000 型荧光分光光度计(日本岛津制作所), UVB-313 紫外照射灯(北京北方利辉试验仪器设备有限公司), Image-Pro Plus 6.0 病理图像分析软件。

2 方法

2.1 模型建立、分组与给药^[5]

取雌性昆明种小鼠, 称质量, 随机分成对照组、模型组、维生素 C (0.2 g/kg) 组、杭白菊(生药 5.2 g/kg) 组、当归(生药 5.2 g/kg) 组、丹参(生药 7.7 g/kg) 组, 每组 12 只。对照组小鼠 im 灭菌药用级植物油 2 mL/kg; 其余 5 组于小鼠后腿 im 黄体酮注射液 2 mL/kg, 剂量为 20 mg/kg (相当于人临床等效剂量的 8 倍), 每天上午给药 1 次, 两腿交替注射, 连续 30 d。在给药期间, 每天上午于动物背部

脱毛部位(约 3 cm×5 cm) 照射紫外线, 照射时间为 30 min。紫外光的波长集中在 315 nm, 照射前灯管预热 15 min 左右, 将小鼠放置于垂直距光源 25 cm 左右, 每次照射轮换每笼小鼠照射位置, 以保证每笼小鼠接受的光照强度一致。造模期间, 每天下午各组 ig 相应药物 2 mL/kg, 连续 30 d。

2.2 指标与病理学检测

末次给药 1 h 后, 各组小鼠腹主动脉采血, 用全自动自清洗血液流变仪测定动物全血黏度。取经紫外线照射的脱毛部位皮肤以及肝脏适量, 在冰浴中制成 10% 匀浆。测定皮肤及肝脏的 GSH-Px、MDA、SOD、NO、T-AOC、TYR 以及肝脏脂褐质水平; 取背部皮肤, 进行 HE 染色, 进行病理形态学检查。

2.3 统计学方法

所有数据用 SPSS 11.5 软件进行处理, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 一般观察

实验前所有小鼠状态均良好。在造模 2~3 周后, 模型组大部分动物背部脱毛的皮肤微微发红; 造模后 4~9 周, 模型组部分动物背部脱毛皮肤有增厚、结痂、晒伤的症状, 但均无水泡、糜烂等发生。各给药组上述症状均有一定程度的减轻。

3.2 对小鼠体质量的影响

与对照组相比, 模型组小鼠在造模 16、25、30 d 后, 体质量明显增加 ($P < 0.05$)。在给药 31 d 后, 当归组小鼠体质量比模型组明显减轻 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.3 对小鼠肝生化指标的影响

与对照组比较, 模型组小鼠肝脏中 GSH-Px、SOD 活性、NO 水平明显降低 ($P < 0.05$); 脂褐质、TYR 明显增加。与模型组比较, 丹参、当归、杭白菊组小鼠肝脏 GSH-Px、SOD 活性均明显升高 ($P < 0.05$), TYR 显著降低 ($P < 0.05$); 杭白菊组小鼠 T-AOC 明显增加 ($P < 0.05$), 见表 2。

3.4 对小鼠皮肤生化指标的影响

与对照组比较, 模型组小鼠皮肤 GSH-Px、NO、T-AOC 明显减少 ($P < 0.05$ 、 0.01); TYR 明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 丹参、当归、杭白菊组小鼠皮肤 MDA 明显减少 ($P < 0.05$), 丹参组 NO 明显增加 ($P < 0.05$), 当归、杭白菊组小鼠皮肤 TYR 明显减少 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 1 杭白菊、丹参、当归提取物对黄褐斑模型小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Effect of extracts from Hangzhou *Chrysanthemum Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* on body weight in cholasma model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/只	体质量/g				
			1 d	7 d	16 d	25 d	31 d
对照	—	12	28.4±1.8	31.4±2.1	31.7±2.1*	34.2±2.2*	35.2±3.2*
模型	—	12	28.4±1.7	31.3±1.8	34.1±2.5	36.3±2.6	37.7±2.5
杭白菊	5.2	12	28.5±1.7	31.1±2.1	33.3±2.2	36.0±2.7	38.3±2.4
丹参	7.7	11	28.5±1.5	30.3±1.6	32.6±1.6	35.0±2.3	37.0±2.9
当归	5.2	12	28.3±1.4	30.6±1.6	32.6±2.3	34.8±2.6	35.3±2.6*
维生素 C	0.2	12	28.4±1.6	30.9±2.7	33.0±3.0	37.1±3.4	36.4±3.4

与模型组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs model group

表 2 杭白菊、丹参、当归提取物对黄褐斑模型小鼠肝脏生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of extracts from Hangzhou *Chrysanthemum Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* on liver biochemical indexes in cholasma model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	GSH-Px	SOD/ (U·mg ⁻¹)	T-AOC/ (U·mg ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg ⁻¹)	脂褐质/ (μg·g ⁻¹)	TYR/ (nmol·g ⁻¹)
对照	—	12	870.4±404.8*	385.2±121.3**	1.673±0.605*	266.0±104.5*	1.053±0.346**	487.2±185.4*
模型	—	12	583.6±205.4	188.1±62.1	0.739±0.266	617.7±240.3	2.998±0.962	694.4±205.5
杭白菊	5.2	12	915.8±320.4*	335.6±145.5*	1.477±0.502*	253.7±101.6*	2.637±0.923	504.0±206.2
丹参	7.7	11	812.2±246.2*	297.3±98.4*	1.368±0.476	214.0±88.2**	2.380±0.686	510.8±106.3*
当归	5.2	12	931.5±326.2*	275.0±110.4*	0.827±0.297	302.9±128.9*	2.749±0.816	476.4±176.2*
维生素 C	0.2	12	883.4±309.2*	388.9±128.9**	1.605±0.581*	424.5±157.1	2.155±0.684*	541.1±123.2*

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

表 3 杭白菊、丹参、当归提取物对黄褐斑模型小鼠皮肤生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of extracts from Hangzhou *Chrysanthemum Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* on skin biochemical indexes in cholasma model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	GSH-Px	SOD/ (U·mg ⁻¹)	NO/ (μmol·g ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg ⁻¹)	T-AOC/ (U·mg ⁻¹)	TYR/ (nmol·g ⁻¹)
对照	—	12	504.8±194.9*	73.3±39.0	13.817±3.132*	4.486±1.376	7.362±2.610*	662.3±282.6*
模型	—	12	253.2±96.8	76.5±19.8	21.322±7.436	7.934±3.133	4.356±1.736	963.1±297.7
杭白菊	5.2	12	274.9±102.2	82.2±19.7	14.221±10.374	4.734±2.014	5.564±2.044	556.9±205.7*
丹参	7.7	11	278.2±76.6	89.9±36.2	27.832±15.070*	4.658±1.340*	6.687±2.420	763.2±139.3
当归	5.2	12	307.0±107.6	82.7±31.6	17.101±9.959	3.878±1.782*	6.130±1.766	707.0±178.6*
维生素 C	0.2	12	441.1±170.9*	96.9±49.3	19.576±9.815	3.973±1.382*	7.646±3.757*	761.2±272.6

与模型组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs model group

3.5 对小鼠血液流变学的影响

与对照组比较,模型组小鼠低切、中切、高切全血黏度值均明显增加($P<0.05$)。与模型组比较,当归、丹参组小鼠全血黏度低切、中切值明显降低($P<0.05$),见表 4。

3.6 对小鼠皮肤组织病理学的影响

对照组小鼠皮肤结构正常,表皮层未见增厚或变薄,与真皮层界线清晰;真皮层可见波浪状纤维组织,排列有序,分布均匀,与皮下组织分界清楚;毛囊、皮脂腺结构完整,未见炎细胞浸润。模型组可见皮肤表皮层增厚,与真皮层界线尚清晰;真皮层内纤维组织排列紊乱、局部轮廓模糊,与皮下组

织界线欠清晰；毛囊、皮脂腺轮廓稍大，未见炎细胞浸润。丹参组、当归组、杭白菊组动物皮肤结构接近正常：动物的表皮厚薄未见明显变化，

与真皮层界线可分；真皮层尚规则，与皮下组织分界可见；毛囊、皮脂腺结构完整，未见炎细胞浸润。见图 1。

表 4 杭白菊、丹参、当归提物液对黄褐斑模型小鼠血液流变学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of extracts from Hangzhou *Chrysanthemum Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* on hemorheology in cholasma model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	全血黏度/(mPa·s ⁻¹)		
			低切	中切	高切
对照	—	12	7.740±1.106**	4.270±0.780*	3.624±0.671*
模型	—	12	9.657±1.516	5.172±0.743	4.147±0.493
杭白菊	5.2	12	9.132±1.868	4.775±0.715	3.983±0.510
丹参	7.7	11	8.475±1.082*	4.810±0.485	3.963±0.270
当归	5.2	12	8.573±0.903*	4.696±0.529	3.945±0.322
维生素 C	0.2	12	8.298±1.608*	4.935±0.697	3.973±0.416

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

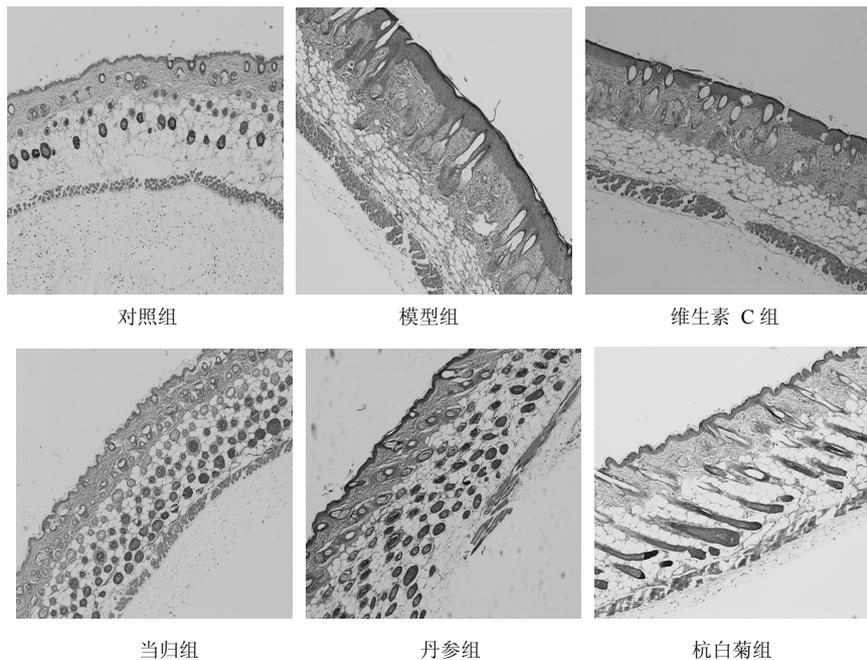


图 1 当归、丹参、杭白菊提物液对黄褐斑模型小鼠皮肤组织病理学的影响

Fig. 1 Effect of extracts from Hangzhou *Chrysanthemum Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* on skin histopathology of cholasma model in mice

4 讨论

黄褐斑的确切病因及发病机制目前尚不清楚，一般认为其主要与内分泌失调、紫外线照射等因素有关^[6-7]。在正常情况下，机体内自由基的产生与消除处于动态平衡。黄褐斑患者因系统调节障碍，血中 SOD 活性显著降低，MDA 水平明显升高，提示体内氧化与抗氧化之间的平衡被打破，这可能是黄

褐斑发病的重要因素之一^[8]。本实验通过 im 黄体酮及 UVB 照射建立黄褐斑小鼠模型，通过检测动物皮肤、肝脏中的 SOD、MDA、T-AOC、脂褐质及 GSH-Px 来评价受试药对机体的抗氧化能力的影响^[9-10]。结果表明，与对照组比较，模型组肝脏 GSH-Px、SOD 活性与 T-AOC 明显减弱，而 MDA、脂褐质水平明显增加；皮肤 GSH-Px 活性、T-AOC 明显降低，MDA

有增加的趋势。维生素 C、丹参与当归均能显著升高肝脏 GSH-Px、SOD 活性及 T-AOC，显著降低皮肤 MDA 水平，提示它们均有一定的提高机体抗氧化能力的作用。

黑色素生成过多是黄褐斑形成的根本原因。TYR 是皮肤黑色素生物合成的关键酶、限速酶^[6]。紫外线照射促进面部皮肤发生一系列过氧化反应，GSH 减少，TYR 活性增强，促进皮肤黑色素形成^[11]。因此测定 TYR 对了解黄褐斑的形成机制及治疗有重要的意义。本实验结果显示，与对照组比较，模型组动物的肝脏、皮肤中 TYR 活性明显增加；与模型组比较，当归、杭白菊能显著降低皮肤 TYR，提示这 2 味中药可能通过抑制 TYR 活性而减少黑色素的合成。

血液流变学异常可引起皮肤末梢组织缺血、缺氧，导致局部自由基产生；紫外线照射促进面部皮肤 TYR 活性增强，促进皮肤黑色素的形成^[12]。本实验血液流变学全血黏度检测结果显示，与对照组比较，模型组全血黏度低切、中切、高切值均明显增加，表明模型动物血液流变学发生一定程度的改变。与模型组相比，当归组全血黏度低切值明显减小，推测当归可能通过活血化瘀的作用减少黄褐斑的形成。

一般观察可见，模型组动物背部皮肤出现增厚、结痂、晒伤的症状；病理组织学检查发现其表皮组织增厚，真皮层内纤维组织排列紊乱、局部轮廓模糊，与皮下结缔组织界线欠清晰等病理改变。这些症状与模型动物内分泌失调、紫外线照射引起的皮肤病理损伤和色素沉着有关，一定程度上模拟了临床上黄褐斑形成时皮肤结构的改变^[8]。丹参、当归、杭白菊组皮肤的病理变化较轻，皮肤结构接近正常。

有文献报道，NO 可能是黑色素合成的强效激活因子，能促进 MC 的 TYR 活性和黑色素合成的增加^[13-14]。本实验结果表明，各给药组皮肤中 NO 未见明显变化，提示各给药组不能通过 NO 介导的途径起到抑制黄褐斑的作用。在本实验中还发现，与模型组比较，丹参组小鼠体质量有所减轻，推测丹参对黄体酮导致的内分泌紊乱可能有一定的改善作用。

综上所述，丹参、当归、杭白菊提取液对 im

黄体酮及 UVB 照射 30 d 造成的黄褐斑小鼠模型具有良好的调节作用，其作用可能通过增强机体抗氧化能力、减少皮肤 TYR、改善机体血流动力学而恢复受损的皮肤。丹参、当归、杭白菊单方的作用是否还与免疫功能和抗菌、消炎等作用有关，尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 肖艳, 刘祯, 邓燕. 复方中药治疗黄褐斑的实验研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(9): 1056-1058.
- [2] 陈红, 郭渝南, 吴元胜. 祛斑胶囊治疗黄褐斑的临床观察及抗氧化作用研究 [J]. 中草药, 2003, 34(2): 160-162.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [4] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [5] 过伟峰, 徐立. 建立小鼠黄褐斑实验动物模型的初步研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001(7): 49-51.
- [6] 张宁, 陈巧云, 任燕冬, 等. 中药治疗黄褐斑实验研究进展 [J]. 中国美容医学, 2008, 17(6): 940-943.
- [7] 冯安吉, 海春旭. 黄褐斑的病因及发病机理 [J]. 第一军医大学学报, 2000(20): 183-184.
- [8] 苑光军, 姜醒. 当归芍药散对黄褐斑模型 SOD、MDA 及病理形态学影响的研究 [J]. 中医药信息, 2008, 25(6): 49.
- [9] 金到山, 梅世昌, 王锦传. 大豆异黄酮软胶囊治疗黄褐斑与抗氧化能力的实验研究 [J]. 中国美容医学, 2006, 15(7): 834-835.
- [10] 邓红娟, 郭延生, 曲亚玲, 等. 生当归、酒当归和油当归体外清除自由基活性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 784-787.
- [11] Smith B, Selby P, Southgate J, et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction [J]. *Lancet*, 1991, 338(8777): 1227-1229.
- [12] 张卫华, 王向义. 不同波长紫外线照射对小鼠皮肤的损害 [J]. 中华医学美容美容杂志, 2007, 13(1): 30-35.
- [13] 董秒珠, 肖萍, 洪新宇, 等. 不同染色法检测豚鼠皮肤黑色素的比较研究 [J]. 环境与职业医学, 2006, 13(5): 423-425.
- [14] 吴艳华, 李其林, 杨秀文. 中药配合氩氦激光治疗黄褐斑的疗效评价及对一氧化氮影响 [J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2007, 14(4): 253-256.