

高良姜素对氢醌诱导的白癜风小鼠模型的影响

高莉¹, 霍仕霞^{2*}, 彭晓明², 赵萍萍², 何燕², 闫明^{2*}

1. 新疆大学生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046

2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 新疆维吾尔医方剂学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830049

摘要: **目的** 研究不同质量分数高良姜素对氢醌诱导白癜风小鼠模型的影响。**方法** 采用 2.5%氢醌涂抹小鼠背部剃毛后的区域以诱导白癜风动物模型, 分光光度法测定血清中的酪氨酸酶 (TYR)、丙二醛 (MDA) 水平及胆碱酯酶 (CHE) 活性, 分别采用 HE 染色法、多巴特殊染色法、Lillie 染色法观察不同质量分数高良姜素对小鼠皮肤含黑色素毛囊数、基底层黑素细胞数和含黑素细胞表皮细胞数的影响; 采用免疫组化法检测小鼠皮肤中 TYR 蛋白表达。**结果** 模型组小鼠背部毛发颜色明显较对照组小鼠白, 2.5%氢醌诱导后, 模型小鼠含黑色素的毛囊数、基底层黑素细胞和含黑素颗粒表皮细胞数量明显较对照组低。经过高良姜素治疗后, 小鼠背部毛发颜色由白变黑; 与模型组相比, 高良姜素治疗组的小鼠皮肤含黑色素毛囊数量明显上升 ($P<0.01$); 4.250 mg/kg 90%高良姜素组基底层黑素细胞数和含黑素颗粒表皮细胞数显著上升 ($P<0.05$ 、 0.01), 皮肤 TYR 蛋白表达也显著升高 ($P<0.05$); 0.425、4.250 mg/kg 90%高良姜素能够显著升高小鼠血清 TYR 水平, 降低 MDA 水平及 CHE 活性 ($P<0.05$ 、 0.01); 4.250、42.500 mg/kg 99%高良姜素显著提高基底层黑素细胞数 ($P<0.01$); 4.250 mg/kg 99%高良姜素能够显著提高含黑素颗粒表皮细胞数 ($P<0.05$), 降低血清 CHE 活性 ($P<0.01$)。99%高良姜素 3 个剂量均能够升高血清 TYR 水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 0.425、4.250 mg/kg 99%高良姜素降低血清 MDA 水平 ($P<0.01$)。**结论** 不同质量分数的高良姜素均能够改善氢醌诱导的小鼠白癜风症状, 其作用机制可能是提高 TYR 活性, 降低机体的 MDA 和 CHE 水平, 但二者的治疗效果及作用机制存在一定的差异。

关键词: 高良姜素; 白癜风; 氢醌; 黑色素; 基底层黑素细胞; 酪氨酸酶

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)16-2358-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.015

Effects of galangin with different purity on vitiligo mouse model induced by hydroquinone

GAO Li¹, HUO Shi-xia², PENG Xiao-ming², ZHAO Ping-ping², HE Yan², YAN Ming²

1. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

2. Xinjiang Laboratory of Uighur Medical Prescription, Xinjiang Institute of Traditional Uighur Medicine, Urumqi 830049, China

Abstract: **Objective** To study the effects of galangin with different purity on vitiligo mouse model induced by hydroquinone. **Methods** The vitiligo mouse model was induced by smearing 2.5% hydroquinone at shaving areas on dorsal skin for each mouse. The concentration of tyrosinase (TYR), the content of malondialdehyde (MDA), and the activity of cholinesterase (CHE) in serum were measured spectrophotometrically. The melanin-containing hair follicles, basal melanocytes, and melanin-containing epidermal cells were measured by histological analysis. The expression of the TYR protein in skin of mice was detected by immunohistochemical methods. **Results** Experimental results showed that the hair color of mice in model group was whiter than that of mice in control group, and the numbers of melanin-containing follicle, the numbers of basal melanocyte, and melanin-containing epidermal cell in dorsal skin of mice induced by hydroquinone (2.5%) (model group) were significantly decreased compared with the control group. The color of hair in dorsal skin of mice turned black from white after treatment of galangin with different purity. Histological analysis showed that the numbers of melanin-containing hair follicle in shaving areas were found to be increased at all dosages of the galangin

收稿日期: 2014-03-17

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2012211B59)

作者简介: 高莉, 女, 副研究员, 主要从事药物分析及中药药理学研究。Tel: 13999801029 E-mail: gaoli_535@163.com

*通信作者 闫明, 男, 硕士, 研究员, 主要从事药物分析与新药研发。Tel: (0991)2574309 E-mail: yanming21cn@sohu.com

霍仕霞, 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事药物代谢动力学研究。Tel: (0991)5161210 E-mail: huoshixia1983@163.com

groups ($P < 0.01$, compared with the model group). While the numbers of skin basal layer melanocyte and melanin-containing epidermal cell were significantly increased at the dosage of 4.25 mg/kg of the 90% galangin ($P < 0.05, 0.01$), and the expression of skin TYR protein was also increased; The concentration of TYR in serum was increased, the content of MDA and the activity of CHE were decreased at 0.425 and 4.250 mg/kg doses of 90% galangin groups ($P < 0.05$, compared with the model group). The numbers of skin basal layer melanocyte were increased at 4.250 and 42.500 mg/kg doses of 99% galangin groups; the numbers of melanin-containing epidermal cell were increased ($P < 0.05$), and the activity of CHE was decreased ($P < 0.01$) at 4.250 mg/kg dose of 99% galangin group; The concentration of TYR in serum was increased at all dosages of 99% galangin groups; The content of MDA was decreased at 0.425 and 4.250 mg/kg doses of 99% galangin groups ($P < 0.01$). **Conclusion** The result shows that galangin with different purity could improve vitiligo syndrome induced by hydroquinone in mice. The mechanism might be related to the concentration of TYR, the expression of TYR protein, the activity of MDA, and the content of CHE. But there are some differences between 90% galangin and 99% galangin in effects of treatment and mechanism. Galangin might become the one of potential candidate drugs for treating vitiligo diseases after more experiments have been carried out.

Key words: galangin; vitiligo; hydroquinone; melanin; basal melanocytes; tyrosinase

白癜风是一种获得性色素脱失的皮肤病,全球发病率在2%左右,发病人群以年轻人偏多,通常会影响到面部中央和生殖器,往往定位于手和脚^[1],虽然白癜风患者没有任何身体及生理上的病痛,但仍遭受严重的心理和压力。据统计66%的白癜风患者因外表而感到尴尬,不愿与他人交流,导致严重的抑郁症,部分患者甚至自杀^[2]。目前对白癜风的治疗方法主要有准分子激光、手术疗法和激素治疗^[3],但均难以得到广泛的应用,激光和手术治疗给患者带来身体上的痛苦和昂贵的费用,激素治疗又导致患者身体免疫力下降^[4],因此迫切需要安全有效的治疗方法。

高良姜是一种常用的中药材,在传统的维吾尔医药复方制剂中被用于治疗白癜风^[5],本课题组前期研究结果表明高良姜具有治疗白癜风的作用,并通过体外谱效结合方法确认高良姜治疗白癜风的有效物质基础之一是高良姜素^[6]。本研究重点研究不同质量分数的高良姜素对氢醌诱导的白癜风小鼠模型的治疗作用,并阐明其可能的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

BIO—RAD550 型酶标仪(美国伯乐公司); LDZX—75KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); BECKMAN 高速低温离心机(美国PE公司); BS224S Sartorius 精密电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

1.2 实验动物

C57BL/6 小鼠 90 只,雄性,体质量(20±2) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动

物合格证号 SCXK(京)2012-0001。

1.3 试药

质量分数为90%、99%高良姜素,均为自制^[7]; 8-甲氧基补骨脂素(8-MOP, 东京化成工业株式会社); 氢醌(天津市登科化学试剂有限公司),参考文献方法^[8]制成2.5%氢醌软膏;胆碱酯酶(CHE)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成科技有限公司);小鼠酪氨酸酶(TYR)ELISA 试剂盒(上海生工生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组、模型制备与给药

C57BL/6 小鼠 90 只适应性饲养 3 d 后,以体质量为指标,随机分为对照组、模型组、8-MOP 组(4.250 mg/kg)和 90%、99%高良姜素低、中、高剂量(0.425、4.250、42.500 mg/kg)组,每组 10 只。采用松香/蜡混合物脱去各组小鼠背部毛发约 2 cm×2 cm,脱毛后第 6 天开始造模,于小鼠背部涂抹 2.5%氢醌软膏 0.5 g,对照组小鼠背部涂抹蒸馏水,连续涂抹 65 d;造模第 26 天各给药组开始 ig 给药,连续给药 40 d,每天进行皮肤拍照。实验期间观察小鼠皮肤颜色变化,末次给药 2 h 后,摘眼球采血,分离血清。

2.2 生化指标的测定^[8-9]

取小鼠血清,分别按 TYR、MDA、CHE 试剂盒说明书操作,分别于酶标仪 520、532、490 nm 处测定吸光度(A)值,分别计算 TYR、MDA 水平及 CHE 活性。

2.3 小鼠皮肤含黑色素毛囊计数

用手术刀沿 C57BL/6 小鼠脊椎线方向切取 0.5 cm×1 cm 的皮肤组织,并记录编号;固定于 10%

中性福尔马林中; HE 染色后, 进行皮肤组织学观察、毛囊计数, 用光镜观察 50 个毛囊, 记录含有黑色素的毛囊数。

2.4 基底层黑素细胞的测定^[10]

用手术刀沿 C57BL/6 小鼠脊椎线方向切取 0.5 cm×1 cm 的皮肤组织, 并记录编号; 固定于 10% 中性福尔马林中 24 h; 流水冲洗 3~4 min; 放入含 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)的 0.1%多巴中, 于 37 °C 静置 1 h; 换入新鲜的多巴试剂中, 37 °C 静置 12 h; 流水再冲洗 10 min; 用 Bouin 氏液固定 24 h 后, 将标本取出后流水冲洗 4 h 后脱水, 常规石蜡包埋切片; 脱蜡至水, 切制薄片, 附贴于载玻片上。将切片脱蜡移至水洗。用苏木素-伊红对比染色。脱水, 透明, 中性树胶封固。多巴氧化酶染色后, 黑素细胞阳性显示为棕黑色染色。分别于光镜下测定每个高倍镜视野内各组黑素细胞数量, 每个标本观察 10 个高倍镜视野, 计算每 100 个表皮基底细胞中黑素细胞的平均数量。

2.5 含黑素颗粒的表皮细胞的测定^[10]

将固定于 10%中性福尔马林的皮肤组织, 包埋、切片后, 用氯化铁和铁氰化钾混合液浸染 15~20 min; 以 1%醋酸水溶液分化 30 s, 自来水洗涤数次, 95%酒精及无水酒精迅速脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。Lillie 染色后, 黑色素呈暗绿色为阳性, 分别于光镜下测定各组含黑素颗粒的表皮细胞

数量, 每个标本观察 10 个高倍镜视野, 计算每 100 个表皮基底细胞中含黑素颗粒的基底细胞的平均数量。

2.6 TYR 蛋白表达的测定

将固定于 10%中性福尔马林的皮肤组织, 常规石蜡包埋、切片后, 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶常规染色, 一抗为 TYR 单克隆抗体, 二抗为生物素标记, DAB 显色。采用免疫组化方法进行 TYR 蛋白表达的测定, 各抗体在显微镜下细胞内出现黄色或棕黄色颗粒或团块状为阳性表达。采用二级计分法判定结果, 阳性细胞计数<5%为 0 分, 5%~25%为 1 分, 25%~50%为 2 分, 50%~75%为 3 分, >75%为 4 分。按染色强度分类: 淡黄色 1 分, 黄或深黄 2 分, 褐或棕黄色 3 分。两者相加小于 2 分为阴性(-), 2~3 分为阳性(+), 4~5 分为中等阳性(++), 6~7 分为强阳性(+++)。

2.7 数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 肉眼观察各组小鼠皮肤变化

末次给药后对各组小鼠皮肤肉眼观察并拍照记录, 图 1 可以看出模型组小鼠背部毛发明显较对照组变白, 给予不同质量分数的高良姜素后小鼠背部毛发明显变黑。

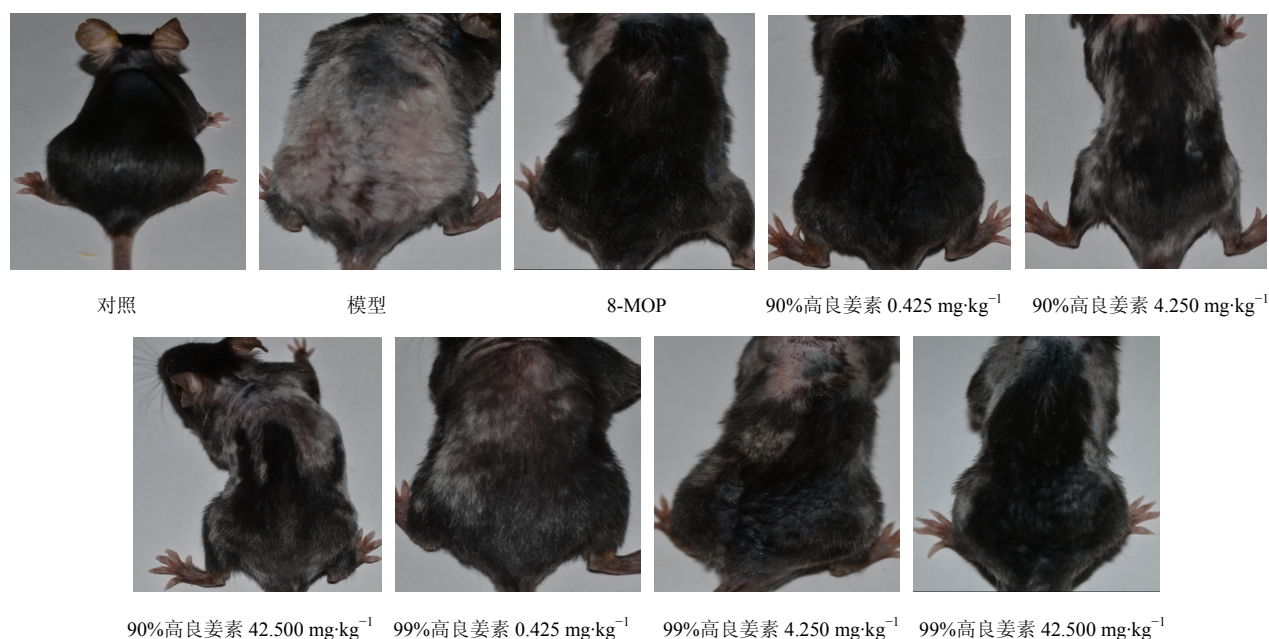


图 1 治疗后各组小鼠皮肤照片

Fig. 1 Photographs of mice in each group after treatment

3.2 对小鼠皮肤中含黑色素毛囊、基底层黑素细胞和含黑素颗粒表皮细胞数量的影响

表 1 结果表明,与对照组相比,模型组小鼠背部皮肤中含黑色素的毛囊数、基底层黑素细胞数和含黑素颗粒的表皮细胞数均显著下降 ($P<0.01$);给予高良姜素治疗后,各给药组小鼠背部皮肤中含黑色素的毛囊数均显著提高 ($P<0.01$);90%高良姜素给药剂量为 4.250 mg/kg 时,基底层黑素细胞数和含黑素颗粒的表皮细胞数显著上升 ($P<0.05$ 、 0.01);99%高良姜素给药剂量为 4.250、42.500 mg/kg 时,显著提高基底层黑素细胞数 ($P<0.01$);99%高良姜素剂量为 4.250 mg/kg 时,能够显著提高含黑素颗粒的表皮细胞数 ($P<0.05$)。

3.3 对小鼠血清中 TYR、MDA、CHE 的影响

由表 2 可知,模型组小鼠血清中 TYR 水平较

对照组显著下降 ($P<0.01$),MDA 水平和 CHE 活性显著升高 ($P<0.01$);给予高良姜素治疗后,90%高良姜素给药剂量为 0.425、4.250 mg/kg 时,能够显著上调 TYR 水平,降低 MDA 水平及 CHE 活性 ($P<0.05$ 、 0.01);99%高良姜素 3 个剂量均能够升高血清 TYR 水平 ($P<0.05$ 、 0.01),而剂量为 0.425、4.250 mg/kg 时,降低 MDA 水平 ($P<0.01$),剂量为 4.250 mg/kg 时,能够显著降低 CHE 活性 ($P<0.01$)。

3.4 对小鼠皮肤中 TYR 蛋白表达的影响

表 3 结果表明,与对照组相比,模型组小鼠背部皮肤中 TYR 蛋白表达显著下降 ($P<0.01$);给药治疗后,90%高良姜素剂量为 4.250 mg/kg 时,TYR 蛋白表达水平显著提高 ($P<0.05$);其他给药组均呈上升趋势,但无显著性差异。

表 1 不同质量分数高良姜素对小鼠皮肤中含黑色素毛囊数、基底层黑素细胞数和含黑素颗粒表皮细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of galangin with different purity on melanin-containing hair follicles, basal melanocytes, and melanin-containing epidermal cells in dorsal skin of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	含黑色素毛囊 / 个	基底层黑素细胞 / 个	含黑素颗粒表皮细胞 / 个
对照	—	29.0±1.7	21.9±2.9	21.3±1.8
模型	—	17.5±1.4**	8.4±1.1**	10.6±2.2**
8-MOP	4.250	35.6±2.3 ^{△△}	9.6±1.1	11.4±1.5
90%高良姜素	0.425	34.9±1.2 ^{△△}	9.4±1.3	11.8±1.3
	4.250	43.2±2.2 ^{△△}	10.9±1.1 ^{△△}	15.1±2.6 [△]
	42.500	42.7±3.6 ^{△△}	9.3±0.8	13.0±1.4
99%高良姜素	0.425	26.2±1.9 ^{△△}	9.2±0.8	11.8±0.8
	4.250	34.2±3.3 ^{△△}	12.0±0.9 ^{△△}	14.0±1.4 [△]
	42.500	35.3±3.0 ^{△△}	10.7±0.8 ^{△△}	12.4±1.0

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$, 下同

** $P<0.01$ vs control group; [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ vs model group, same as below

表 2 不同质量分数高良姜素对小鼠血清 TYR、MDA 水平和 CHE 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of galangin with different purity on levels of TYR and MDA, activity of CHE in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	TYR / (pg·mL ⁻¹)	MDA / (nmol·mL ⁻¹)	CHE / (U·mL ⁻¹)
对照	—	90.28±4.64	10.48±0.84	55.81±5.97
模型	—	61.27±4.01**	18.22±1.40**	80.76±6.70**
8-MOP	4.250	66.83±3.68 [△]	16.38±1.74	71.34±1.26 [△]
90%高良姜素	0.425	72.23±3.72 ^{△△}	15.56±1.37 [△]	70.64±4.36 [△]
	4.250	67.54±3.60 [△]	15.33±1.29 ^{△△}	68.09±4.88 ^{△△}
	42.500	64.48±4.51	16.60±1.24	78.63±2.21
99%高良姜素	0.425	67.95±5.41 [△]	13.56±1.96 ^{△△}	76.63±3.68
	4.250	69.82±5.50 [△]	14.43±1.89 ^{△△}	66.61±4.66 ^{△△}
	42.500	89.82±6.26 ^{△△}	16.72±1.46	74.15±4.29

表3 不同质量分数高良姜素对小鼠皮肤中 TYR 蛋白表达的影响

Table 3 Effects of galangin with different purity on TYR protein expression in skin of mice

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	阳性细胞率 / %	颜色	总分	强度
对照	—	63.0± 7.6	棕黄色	6.0	+++
模型	—	30.1± 7.9**	淡黄色	2.6	+
8-MOP	4.250	67.0± 4.5 ^{△△}	棕黄色	6.0	+++
90%高良姜素	0.425	43.0± 9.1	棕黄色	4.1	++
	4.250	55.4± 10.5 [△]	棕黄色	5.1	++
	42.500	31.0± 9.6	深黄色	4.3	++
99%高良姜素	0.425	43.2± 4.7	深黄色	4.0	++
	4.250	46.5± 7.8	深黄色	4.4	++
	42.500	48.7± 8.2	深黄色	4.6	++

4 讨论

长期以来,小鼠被作为研究白癜风的动物模型,现已建立了 C57BL/6 小鼠模型^[11-12],主要观察小鼠背部黑色毛发数量、黑素颗粒及黑色素等指标^[13]。皮肤黑色素的形成过程是一系列复杂的生理生化过程,其中包括黑素细胞的迁移、分化,成熟的黑色素细胞、黑色素形成体、黑色素颗粒的运输以及黑色素的排泄。表皮色素细胞和黑色素的消失常常导致皮肤颜色的损失^[14];而氢醌是一种已知的 TYR 抑制剂,也是治疗色素沉着性疾病的有效外用制剂,其机制是抑制 TYR 催化酪氨酸转化为黑色素, TYR 是黑色素合成的限速酶^[15]。有研究表明 2%的氢醌软膏运用于 93 例色素沉着患者,63.5%的患者色素减退,无不良反应^[16]。本研究制备 2.5%氢醌软膏,复制 C57BL/6 小鼠白癜风模型,结果显示,模型组小鼠背部脱毛区明显长出白色的毛发,组织病理学分析发现模型组小鼠背部皮肤含黑色素毛囊数、基底层黑素细胞以及含黑素颗粒的表皮细胞数均明显较对照组小鼠低,表明白癜风小鼠模型复制成功。

负责毛发色素沉着的黑素细胞主要位于将黑色素向毛干皮质角质细胞转移的毛囊中^[17],本研究中,模型组小鼠毛发明显比对照组白,同时含黑色素的毛囊数量也明显比对照组小鼠毛囊数减少,表明含黑色素毛囊的数量直接决定了小鼠毛发的颜色。本研究发现高良姜素治疗组的小鼠背部毛发颜色比模型组明显变黑,并且在所有剂量下,小鼠背部区域含黑色素毛囊的数量显著增加。虽然白癜风是一种获得性色素脱失疾病,皮损病灶部位,黑素生成异常,并且许多研究表明在白癜风病变部位很少或几乎不存在基底层黑素细胞、含黑素颗粒的表

皮细胞以及 TYR^[18]。多巴氧化酶染色试验结果显示,与模型组比较,高良姜素治疗组小鼠背部皮肤基底层黑素细胞数量明显增多,此外含黑素颗粒的表皮细胞数也显著增加,表明高良姜素能够改善氢醌诱导的小鼠白癜风症状。

TYR 是黑色素合成的限速酶,并在黑色素合成的整个生理过程中起着重要的作用。研究表明,白癜风患者皮损部位存在许多抗酪氨酸酶抗体^[19]。在本研究中,模型组小鼠血清中 TYR 水平及皮肤中 TYR 蛋白表达明显比对照组低,给予高良姜素治疗后,血清 TYR 水平及皮肤 TYR 蛋白表达显著增加,表明促进 TYR 及 TYR 蛋白表达可能是高良姜素治疗白癜风的作用机制之一。

氧化应激已被作为诱发黑素细胞减少导致白癜风的因素之一^[20]。MDA 是脂质过氧化反应的终产物和作为氧化应激的具体指标。许多临床研究表明,白癜风患者血清中 MDA 水平较高,并且白癜风患者的总抗氧化活性较正常人低,正是氧化应激在白癜风发病中起着重要的作用,并导致黑素细胞受损引发白癜风^[21]。而 CHE 增加时,白癜风患者的植物神经功能也常常是紊乱的, CHE 能够增强乙酰胆碱和交感神经活性的代谢,降低副交感神经的兴奋性。MDA 水平和 CHE 活性的异常变化将减少黑素合成,诱发白癜风的发生^[22-23]。本研究中模型组小鼠血清中 MDA 量及 CHE 活性明显较对照组高,与临床检测趋势相同,经高良姜素治疗后,血清 MDA 及 CHE 水平显著下降。因此调节 MDA 水平及 CHE 活性可能是高良姜素治疗白癜风的另一个作用机制。

以上研究结果表明 90%和 99%高良姜素对氢醌诱导的白癜风小鼠模型有一定的治疗作用,能够改

善白癜风症状。但两种质量分数的高良姜素在剂量与治疗效果上存在一定的差异,两种质量分数高良姜素的3个剂量均能促进小鼠皮肤含黑色素的毛囊数升高,但是两种质量分数的高良姜素给药剂量为4.250 mg/kg时,基底层黑素细胞数和含黑素颗粒的表皮细胞数显著上升;而99%高良姜素给药剂量为42.500 mg/kg时,也能显著提高基底层黑素细胞数;90%高良姜素其他剂量却没有治疗效果。在调节TYR水平上,99%高良姜素3个剂量均能够上调TYR浓度,而90%高良姜素给药剂量为0.425、4.250 mg/kg时,能够显著上调TYR水平;二者在治疗剂量上存在差异,此外TYR蛋白表达,只有90%高良姜素有促进作用,表明二者的作用机制也存在着差异。研究中也对小鼠皮肤中TRP-1及TRP-2蛋白表达进行检测,结果两种质量分数的高良姜素对这两种蛋白的表达无促进作用(数据未列出),这与体外药效及机制评价结果一致^[24]。同时也提示在进行候选化合物研究时,不同质量分数的化合物在治疗效果和作用机制均存在一定的差异,并不是化合物的纯度越高药效越好。本课题组将进一步深入研究,高良姜素可能成为治疗白癜风的潜在候选药物。

参考文献

- [1] Agrawal D, Shajil E, Marfatia Y, *et al.* Study on the antioxidant status of vitiligo patients of different age groups in Baroda [J]. *Pig Cell Res*, 2004, 17(3): 289-294.
- [2] Akrem J, Mrabet Y, Mohamed H. Oxidative stress in experimental vitiligo C57Bl/6 mice [J]. *Indian J Dermatol*, 2012, 57(4): 221-224.
- [3] Arican O, Kurutas E B. Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo [J]. *Acta Dermatovenereol Alpina Panonica Adriatica*, 2008, 17(1): 12-16.
- [4] Baharav E, Merimski O, Shoenfeld Y, *et al.* Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo [J]. *Clin Exp Immunol*, 1996, 105(1): 84-88.
- [5] 中华人民共和国卫生部标准维吾尔药分册 [S]. 1999.
- [6] 霍仕霞, 康雨彤, 彭晓明, 等. 高良姜提取物指纹图谱与其促进黑素生成的谱效关系分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(8): 995-1002.
- [7] 康爱荣, 闫明, 彭英, 等. 高良姜中高良姜素的醇提和纯化工艺研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2011, 5(18): 44-46.
- [8] 何文, 韩瑞玲, 罗顺德. 8-甲氧补骨脂素脂质体凝胶对白癜风模型豚鼠的治疗作用研究 [J]. *中国药房*, 2005, 16(2): 92-94.
- [9] Kale B. Correlation of oxidative stress and antioxidant status with cholinesterases in different grades of organophosphorus toxicity [J]. *Int J Sci Res Environ Sci*, 2013, 5(8): 85-91.
- [10] Birbeck M S, Breathnach A S, Everall J D. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo [J]. *J Invest Dermatol*, 1961, 37(6): 51-64.
- [11] Lerner A B, Shiohara T, Boissy R E, *et al.* A mouse model for vitiligo [J]. *J Invest Dermatol*, 1986, 87(3): 299-304.
- [12] 张兰兰, 闫明, 刘晓东, 等. 两种化学脱色剂对两种动物模拟白癜风作用比较 [J]. *医药导报*, 2009, 28(6): 690-692.
- [13] van den Boorn J G, Konijnenberg D, Dellemijn T A, *et al.* Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients [J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(9): 2220-2232.
- [14] Mishima Y, Kawasaki H, Pinkus H. Dendritic cell dynamics in progressive depigmentations. Distinctive cytokinetics of dendritic cells revealed by electron microscopy [J]. *Arch Dermatol Forsch*, 1972, 243(12): 67-87.
- [15] Denton C R, Lerner A B, Fitzpatrick T B. Inhibition of melanin formation by chemical agents [J]. *J Invest Dermatol*, 1952, 18(2): 119-135.
- [16] Fitzpatrick T, Arndt K, Moftly A E, *et al.* Hydroquinone and psoralens in the therapy of hypermelanosis and vitiligo [J]. *Arch Dermatol*, 1966, 93(5): 589.
- [17] Commo S, Gaillard O, Bernard B A. Human hair greying is linked to a specific depletion of hair follicle melanocytes affecting both the bulb and the outer root sheath [J]. *Br J Dermatol*, 2004, 150(3): 435-443.
- [18] Jarrett A, Szabo G. The pathological varieties of vitiligo and their response to treatment with meladinine [J]. *Br J Dermatol*, 1956, 68(10): 313-326.
- [19] Baharav E, Merimski O, Shoenfeld Y, *et al.* Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo [J]. *Clin Exp Immunol*, 1996, 105(1): 84-88.
- [20] Agrawal D, Shajil E, Marfatia Y, *et al.* Study on the antioxidant status of vitiligo patients of different age groups in Baroda [J]. *Pigment Cell Res*, 2004, 17(3): 289-294.
- [21] Arican O, Kurutas E B. Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo [J]. *Acta Dermatovenereol Alpina Panonica Adriatica*, 2008, 17(1): 12-16.
- [22] Akrem J, Mrabet Y, Mohamed H. Oxidative stress in experimental vitiligo C57Bl/6 mice [J]. *Indian J Dermatol*, 2009, 54(4): 221-224.
- [23] 盛国荣. 退白汤对实验性白癜风动物模型的治疗作用 [J]. *中药药理与临床*, 2011, 27(6): 88-90.
- [24] 霍仕霞, 彭晓明, 高莉, 等. 不同纯度高良姜素对人A375黑色素瘤细胞黑素合成及TYR、TRP-1、-2 mRNA和蛋白的表达影响 [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 244-249.