

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.01.007

环黄芪醇治疗白癜风的作用及机制*

吴惠林¹ 汪 炜² 张少君³ 葛 睿³ 俞文娟¹ 金 蝉¹ 周 芳¹ 邢倩倩¹ 梁 艳^{3Δ}

(1 西安医学院第二附属医院皮肤科 陕西 西安 710038; 2 西安交通大学第二附属医院 皮肤病院 陕西 西安 710014;

3 西安交通大学第一附属医院皮肤性病科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探索环黄芪醇(Cycloastragenol, CAG)对白癜风的治疗作用及机制。**方法:**将正常人皮肤黑色素细胞 PIG1 分组如下:对照组、H₂O₂ 组、10CAG 组、50CAG 组和 100CAG 组,分别使用不同浓度(10、50、100 μM)的环黄芪醇和 250 μM 的 H₂O₂ 与 PIG1 细胞共培养。通过 CCK-8 法测定细胞增殖,Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡,并测定细胞中的黑色素、SOD、CAT 和 MDA 含量。将 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组和 CAG 组。通过每天涂抹 50 mg 40%的莫诺苯宗乳膏建立白癜风小鼠模型,然后使用 50 mg/kg 的环黄芪醇治疗小鼠。通过 HE 染色和 Masson-Fontana 染色检测皮肤组织中的毛囊和黑色素含量。通过 Western blotting 检测 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2、Bax、Bcl-2、p-p38/p38 的蛋白表达。**结果:**与 H₂O₂ 组相比,50CAG 组和 100CAG 组的细胞活力和黑色素含量均升高,凋亡率均降低,Bax 蛋白表达水平均降低,而 Bcl-2 均升高,SOD 和 CAT 水平均升高,而 MDA 水平均降低($P<0.05$)。10CAG 组、50CAG 组和 100CAG 组的毛囊和黑色素含量均较 H₂O₂ 组增多。与 H₂O₂ 组相比,50CAG 组和 100CAG 组的 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2 和 p-p38/p38 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与模型组相比,CAG 组的 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2 和 p-p38/p38 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。**结论:**环黄芪醇在细胞水平和动物水平上均能促进黑色素合成,对白癜风具有较好的治疗作用,其机制可能与 p38 信号通路的激活有关。

关键词:环黄芪醇;白癜风;黑色素细胞;黑色素;p38 信号通路

中图分类号:R-33;R758.41 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)01-35-06

The Effect and Mechanism of Cycloastragenol in the Treatment of Vitiligo*

WU Hui-lin¹, WANG Wei², ZHANG Shao-jun³, GE Rui³, YU Wen-juan¹, JIN Chan¹, ZHOU Fang¹,XING Qian-qian¹, LIANG Yan^{3Δ}

(1 Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China; 2 Skin Hospital, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710014, China; 3 Department of Dermatology and Venereology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: The purpose of this study was to explore the therapeutic effect and mechanism of cycloastragenol (CAG) on vitiligo. **Methods:** The normal human skin melanocytes PIG1 were divided into the following groups: control group, H₂O₂ group, 10CAG group, 50CAG group, 100CAG group. PIG1 cells were cultured with different concentrations (10, 50, 100 μM) of cycloastragenol and 250 μM of H₂O₂, respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8 method, apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI method, and the contents of melanin, SOD, CAT and MDA in cells were determined. C57BL/6 mice were randomly divided into control group, Model group and CAG group. The vitiligo mouse model was established by applying 50 mg of 40% monobenzone cream daily, and then the mice were treated with 50 mg/kg cycloastragenol. Hair follicles and melanin content in skin tissue were detected by HE staining and Masson-Fontana staining. The protein expressions of MITF, TYR, TRP-1, TRP-2, Bax, Bcl-2, p-p38/p38 were detected by Western blotting. **Results:** Compared with the H₂O₂ group, the 50CAG group and 100CAG groups had increased cell viability and melanin content, decreased apoptosis rate, decreased Bax protein expression, and increased Bcl-2 protein expression, increased SOD and CAT levels, and decreased MDA levels ($P<0.05$). The content of hair follicles and melanin in 10CAG group, 50CAG group and 100CAG group were higher than those in H₂O₂ group. Compared with the H₂O₂ group, the protein expression levels of MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 and p-p38/p38 in the 50CAG group and 100CAG group were all increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the protein expression levels of MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 and p-p38/p38 in the CAG group were all increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Cycloastragenol can promote melanin synthesis at both cellular and animal levels, and has a good therapeutic effect on vitiligo. The mechanism may be related to the activation of p38 signaling pathway.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81802727)

作者简介:吴惠林,女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:白癜风及分子机制,E-mail: 790272640@qq.com

Δ 通讯作者:梁艳,女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:白癜风及分子机制以及黑素瘤的发病机制,E-mail: lyliliann@126.com

(收稿日期:2022-04-28 接受日期:2022-05-24)

Key words: Cycloastragenol; Vitiligo; Melanocytes; Melanin; p38 signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R758.41 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)01-35-06

前言

白癜风是一种获得性皮肤色素脱失性疾病,发病机制尚不明确^[1]。有学者认为,白癜风皮损中的黑素细胞缺失是白癜风发病机制中的关键事件^[2],而氧化应激是黑素细胞缺失的可能原因之一^[3]。众所周知,黑素细胞是通过产生黑色素来引起皮肤色素沉着^[4]。黑色素通过黑素小体分布到周围的角质形成细胞。黑素小体含有黑色素合成所必需的酪氨酸酶(Tyrosinase, TYR)、酪氨酸酶相关蛋白1(Tyrosinase Related Protein 1, TRP-1)和2(Tyrosinase Related Protein 2, TRP-2)^[5]。小眼畸形相关转录因子(Microphthalmia-associated Transcription Factor, MITF)是黑素合成过程中的重要转录因子,可上调TYR和TRP-1蛋白的表达,从而促进黑色素的形成^[6]。丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated Protein Kinase, MAPKs)是与黑素合成调控相关的关键信号分子^[7],包括ERK、JNK和p38信号通路。以前的文献表明,p38的磷酸化可以诱导MITF的激活^[8,9]。此外,p38已被证明通过激活MITF和增加TYR的表达参与紫外线辐射诱导的黑素生成^[6]。

目前,白癜风的治疗方法包括口服皮质类固醇、局部外用免疫调节剂、激光疗法、手术等^[10],但均未能广泛应用,因此仍需要开发新的疗法。近年来,从中药中提取的许多有效成分在治疗皮肤病方面显示出良好的效果^[11,12]。黄芪作为一种传统中药,已经被广泛应用于白癜风治疗的中药配伍中。环黄芪醇(Cycloastragenol, CAG)是从黄芪中分离得到的一种活性三萜皂甙成分,由黄芪甲苷的水解得到,比黄芪甲苷更容易使机体吸收,具有抗病毒、抗菌、抗衰老、抗炎、抗肿瘤等多种药理作用^[13-16]。据报道,环黄芪醇通过激活Nrf2/Keap1/ARE通路抑制破骨细胞形成和骨丢失^[17]。环黄芪醇可抑制阿尔茨海默病小鼠模型神经炎症和氧化应激,并抑制脑组织中ERK、JNK和p38MAPK的激活^[13]。目前,还没有关于环黄芪醇对白癜风的治疗研究。因此,本研究旨在探讨环黄芪醇是否通过p38信号通路调节MITF、TYR和TRP-1的表达,从而影响黑素细胞中黑色素的生物合成,以及环黄芪醇对小鼠白癜风模型的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂 环黄芪醇(HPLC>98%)购自上海吉至生化科技有限公司;正常人皮肤黑素细胞PIG1购自美国ATCC;黑素细胞生长添加剂、M254培养基购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒购自日本同仁化学;H₂O₂溶液、Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒、苏木精伊红(HE)染色试剂盒、RIPA裂解液、总SOD活性检测试剂盒、购自碧云天生物技术研究所;莫诺苯宗、二甲亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司;超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)检测试剂盒购自南京建成南京建成生物工程研究所;Masson-Fontana染色试剂盒、SDS-PAGE购自北京索莱宝科技有限公司;聚偏氟乙烯

(PVDF)膜购自美国Millipore公司;MITF、TYR、TRP-1、TRP-2、Bax、Bcl-2、p-p38、p38和GAPDH一抗及辣根过氧化物酶标记的IgG二抗购自英国Abcam公司。

1.1.2 实验动物 30只4周龄雄性SPF级C57BL/6小鼠(16~18 g)由西安交通大学实验动物中心提供,使用许可证号:SYXK(陕)2020-005。小鼠饲养于25±2℃、相对湿度50±10%、12 h的光/暗循环的实验室内,自由进食。

1.2 实验方法

1.2.1 黑素细胞的培养 将PIG1细胞以1×10⁵个/mL的密度接种于组织培养瓶中,培养基为添加了1%黑素细胞生长添加剂的M254培养基,细胞在37℃、5%CO₂、95%湿度环境中培养,每隔2~3 d更换培养基。

1.2.2 环黄芪醇的细胞毒性测定 通过CCK-8法测定环黄芪醇的细胞毒性。环黄芪醇用0.1%的DMSO溶解。将PIG1细胞以每孔10⁴个细胞的密度接种在96孔板中,在37℃、5%CO₂条件下孵育24 h。加入不同浓度(0、1、10、50、100、200 μM)的环黄芪醇溶液,继续培养24 h。将CCK-8试剂(10 μL)加入含有100 μL培养基的96孔板中,在37℃、5%CO₂的条件下再孵育4 h。用酶标仪在450 nm处重复测量吸光度。

1.2.3 CCK-8法测定细胞增殖 通过CCK-8法测定环黄芪醇对H₂O₂诱导到细胞增殖的影响。将PIG1细胞做如下分组:对照组、H₂O₂组、10CAG组、50CAG组、100CAG组。将各组PIG1细胞以每孔10⁴个细胞的密度接种在96孔板中,在37℃、5%CO₂条件下孵育24 h。10CAG组、50CAG组、100CAG组细胞分别加入不同浓度(10、50、100 μM)的环黄芪醇溶液培养24 h。Control组和H₂O₂组细胞正常培养。24 h后H₂O₂组、10CAG组、50CAG组和100CAG组加入250 μM的H₂O₂培养4 h。对照组正常培养。然后将10 μL的CCK-8试剂加入各组96孔板中,在37℃、5%CO₂条件下再孵育4 h。用酶标仪在450 nm处重复测量吸光度。

1.2.4 黑色素含量测定 将PIG1细胞以1×10⁵个细胞/瓶的密度接种于T-25培养瓶中。细胞接种24 h后用不同浓度(10、50、100 μM)的环黄芪醇孵育24 h,再250 μM的H₂O₂培养4 h,然后用胰蛋白酶分离细胞,以1000 rpm离心5 min,去除上清液。取内细胞团悬浮于PBS溶液中,进行细胞计数。然后,细胞悬液在同等条件下再次离心,将细胞放入微量离心管中,在80℃下用100 μL的NaOH(1 mmol/L)中溶解1 h,然后以12000 rpm离心20 min,分离上清液放入96孔板中,在405 nm处测量吸光度。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测 PIG1细胞用不同浓度(10、50、100 μM)的环黄芪醇孵育24 h,250 μM的H₂O₂培养4 h后,用Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。将PIG1细胞(1×10⁶个细胞/mL)用1×结合缓冲液悬浮,然后与10 μL Annexin V-FITC在黑暗中室温下染色15 min,检测前5 min加入10 μL PI。然后加入400 μL的1×结合缓冲液,用流式细胞仪分析细胞。

1.2.6 氧化应激指标检测 用预冷的 PBS 洗涤 PIG1 细胞,使用 RIPA 裂解液裂解细胞 20 min, PBS 洗涤 3 次, 低温离心处理后取上清待测。按照试剂盒说明检测 PIG1 细胞中 SOD、CAT 和的 MDA 含量。

1.2.7 白癜风小鼠模型的建立及给药处理 将小鼠随机分为对照组、模型组和环黄芪醇组(CAG 组)。在各组小鼠背部做 3×3 cm 的剃毛区域,剃毛 6 d 后对模型组和 CAG 组小鼠剃毛区域每天涂抹 50 mg 的 40% 莫诺苯宗乳膏,共涂抹 65 天。对照组小鼠涂抹 50 mg 乳膏基质。建模 26 天后,CAG 组小鼠每天灌胃 50 mg/kg 的环黄芪醇(0.2 mL),对照组和模型组小鼠灌胃 0.2 mL 的清水,共灌胃 40 天。

1.2.8 组织病理学分析 末次给药后,取小鼠剃毛区域皮肤组织,在 4% 多聚甲醛中固定 24 h,然后用梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,制作 $6 \mu\text{m}$ 厚的切片。按照试剂盒说明进行 HE 染色和 Masson-Fontana 染色。

1.2.9 Western blotting 分析蛋白质表达量 采用 RIPA 裂解液从 PIG1 细胞和组织中提取蛋白质,用 Bradford 法测定蛋白浓度。总蛋白经 10% 的 SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上。用

5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h 处理,并在 4°C 下与一抗(MITF、TYR、TRP-1、TRP-2、Bax、Bcl-2、p-p38、p38 和 GAPDH, 稀释度均为 1:3000)孵育过夜。然后将膜与辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗(稀释度为 1:3000)室温孵育 1 h。最后采用增强化学发光试剂盒显影。GAPDH 作为内参。

1.3 数据统计学分析

本研究中所有数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差。通过 SPSS 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,LSD 检验用于两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 环黄芪醇对 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞增殖的影响

不同浓度环黄芪醇处理的 PIG1 细胞后,与 $0 \mu\text{M}$ 相比, $200 \mu\text{M}$ 环黄芪醇处理后细胞活力降低($P < 0.05$),故在后续实验中选择 10、50 和 $100 \mu\text{M}$ 的环黄芪醇作为处理浓度。经环黄芪醇和 H_2O_2 处理后,与对照组相比, H_2O_2 组的细胞活力降低($P < 0.05$);与 H_2O_2 组相比,10CAG 组、50CAG 组和 100CAG 组的细胞活力均升高($P < 0.05$)。见图 1。

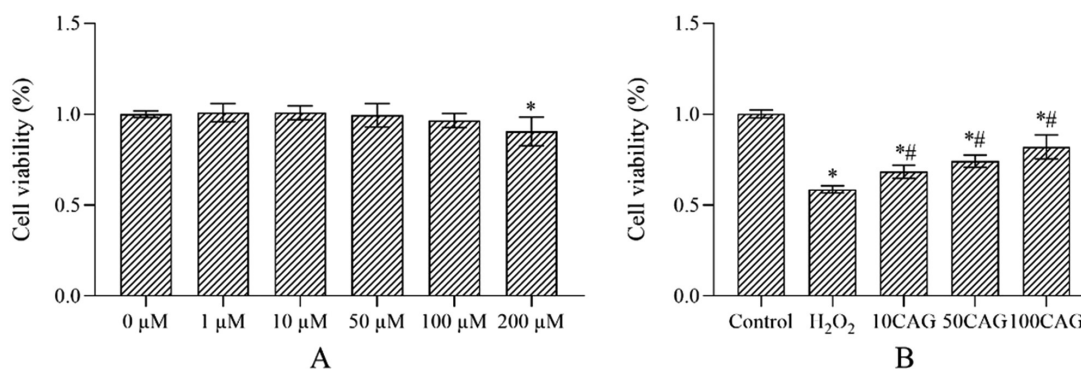


图 1 环黄芪醇对 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞增殖的影响

Fig. 1 effects of cycloastragenol on the proliferation of PIG1 cells treated with H_2O_2 . Note: A: Cytotoxicity of cycloastragenol on PIG1 cells; compared with $0 \mu\text{M}$, $*P < 0.05$; B: Effect of cycloastragenol on proliferation of PIG1 cells treated with H_2O_2 ; compared with Control group, $*P < 0.05$; compared with H_2O_2 group, $*P < 0.05$

2.2 环黄芪醇对 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞黑色素含量的影响

与对照组相比, H_2O_2 组的黑色素含量降低 ($P < 0.05$);与 H_2O_2 组相比,50CAG 组和 100CAG 组细胞的黑色素含量均升高($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 环黄芪醇对 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞凋亡的影响

与对照组相比, H_2O_2 组的细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$);与 H_2O_2 组相比,10CAG 组、50CAG 组和 100CAG 组的细胞凋亡率均降低($P < 0.05$)。各组 PIG1 细胞的 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平比较显示,与对照组相比, H_2O_2 组细胞的 Bax 蛋白表达水平升高,Bcl-2 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。与 H_2O_2 组相比,10CAG 组、50CAG 组和 100CAG 组细胞的 Bax 蛋白表达水平均降低,Bcl-2 蛋白表达水平均升高($P < 0.05$)。见图 3 和图 4。

2.4 环黄芪醇对 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞氧化应激的影响

各组 PIG1 细胞的 SOD、CAT 和 MDA 水平差异显著,与对照组相比, H_2O_2 组细胞的 SOD 和 CAT 水平均降低,MDA 升高 ($P < 0.05$)。与 H_2O_2 组相比,10CAG 组、50CAG 组和

100CAG 组细胞的 SOD 和 CAT 水平均升高,MDA 均降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

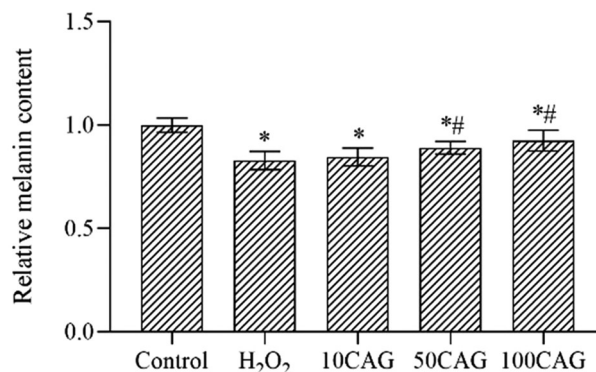


图 2 环黄芪醇对 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞黑色素含量的影响

Fig.2 The effect of cycloastragenol on the content of melanin in PIG1 cells treated with H_2O_2 . Note: compared with Control group, $*P < 0.05$; compared with H_2O_2 group, $*P < 0.05$.

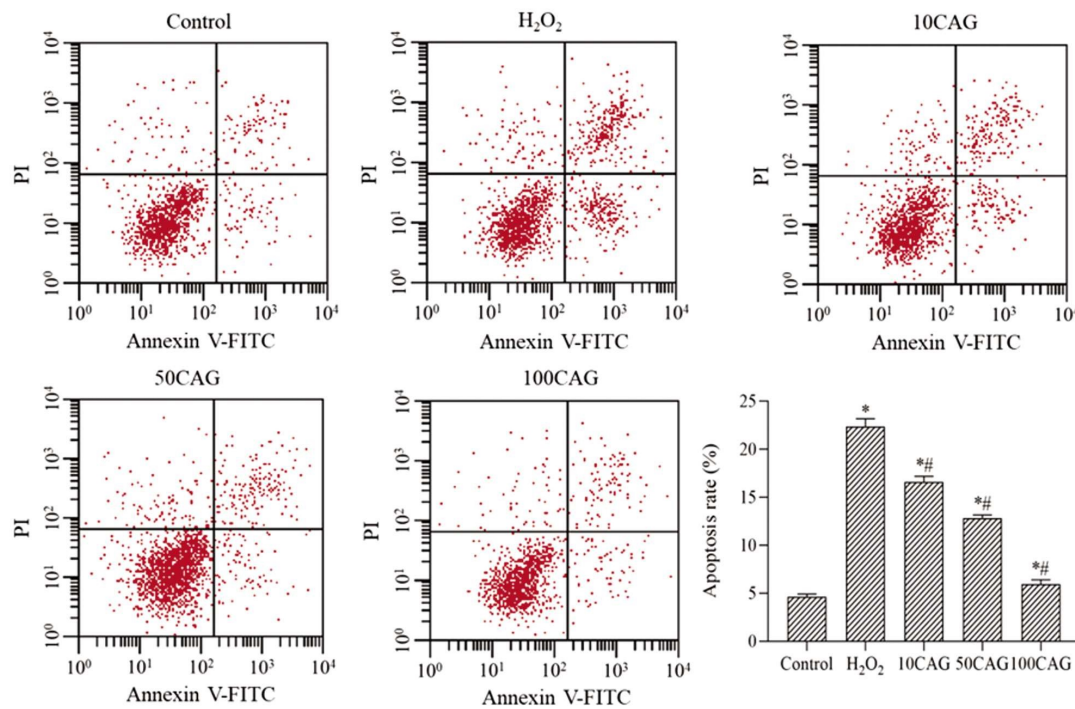


图3 环黄芪醇对 H₂O₂ 处理的 PIG1 细胞凋亡的影响

Fig.3 The effect of cycloastragenol on the apoptosis of PIG1 cells treated with H₂O₂

Note: compared with Control group, **P*<0.05; compared with H₂O₂ group, #*P*<0.05.

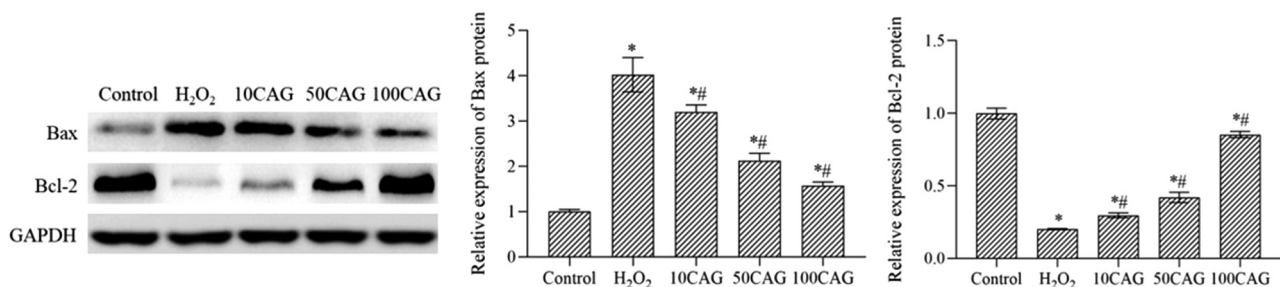


图4 环黄芪醇对 H₂O₂ 处理的 PIG1 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of cycloastragalus on the expression of apoptosis-related proteins of PIG1 cells treated with H₂O₂

Note: compared with Control group, **P*<0.05; compared with H₂O₂ group, #*P*<0.05.

表1 各组细胞中的 SOD、CAT 和 MDA 水平

Table 1 SOD, CAT and MDA levels in cells of each group

Parameter	SOD(U/mg protein)	CAT(U/mg protein)	MDA(nmol/mg protein)
Control	12.45± 0.50	60.35± 2.41	17.43± 0.70
H ₂ O ₂	0.23± 0.01*	17.54± 1.05*	28.86± 1.73*
10CAG	7.54± 0.45*#	37.86± 2.27*#	25.64± 1.54*#
50CAG	8.77± 0.53*#	44.86± 2.69*#	22.73± 1.36*#
100CAG	9.43± 0.57*#	47.85± 2.87*#	21.07± 1.26*#
F	584.790	270.754	61.366
P	<0.001	<0.001	<0.001

Note: compared with Control group, **P*<0.05; compared with H₂O₂ group, #*P*<0.05.

2.5 环黄芪醇对白癜风小鼠的治疗作用

HE 染色与 Masson-Fontana 染色(黑色素的特殊染料)结果一致,对照组小鼠皮肤组织形态正常,毛囊和黑色素分布密集。

H₂O₂ 组小鼠的毛囊和黑色素较少,而 10CAG 组、50CAG 组和 100CAG 组小鼠的毛囊和黑色素含量均较 H₂O₂ 组均增多。见图 5。

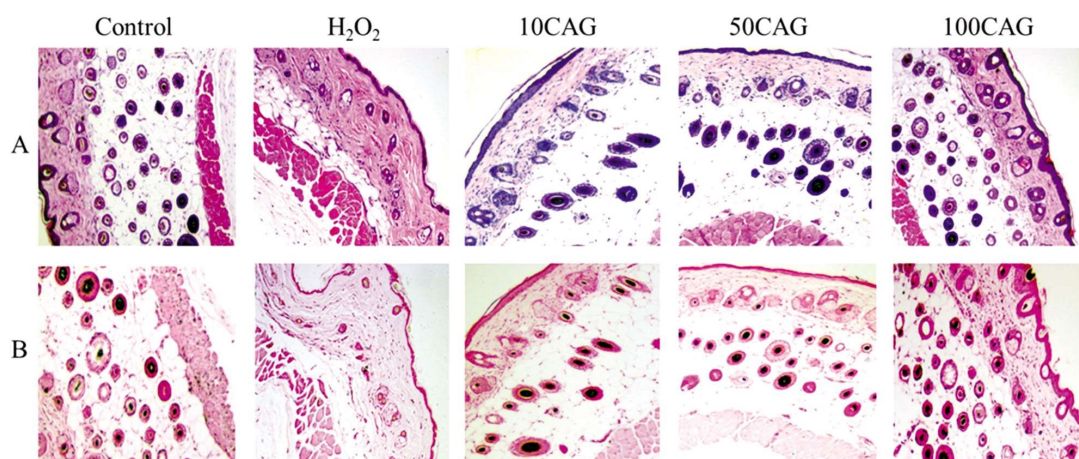


图5 各组小鼠白癜风皮肤组织的 HE 染色和 Masson-Fontana 染色

Fig. 5 HE staining and Masson-Fontana staining of vitiligo skin tissue of mice in each group

Note: A: HE staining; B: Masson-Fontana staining; Magnification: $\times 200$.

2.6 环黄芪醇对 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞和白癜风小鼠中 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2 和 p-p38/p38 蛋白表达的影响

各组 PIG1 细胞的 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2 和 p38 蛋白表达水平差异显著,与对照组相比, H_2O_2 组细胞的 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2 和 p38 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与 H_2O_2 组相比,50CAG 组和 100CAG 组细胞的 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2 和 p-p38/p38 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与

PIG1 细胞一致,各组小鼠皮肤组织中 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2 和 p38 蛋白表达水平差异显著,与对照组相比,模型组小鼠皮肤组织中 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2 和 p38 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与模型组相比,CAG 组小鼠皮肤组织中 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2 和 p-p38/p38 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。见图 6。

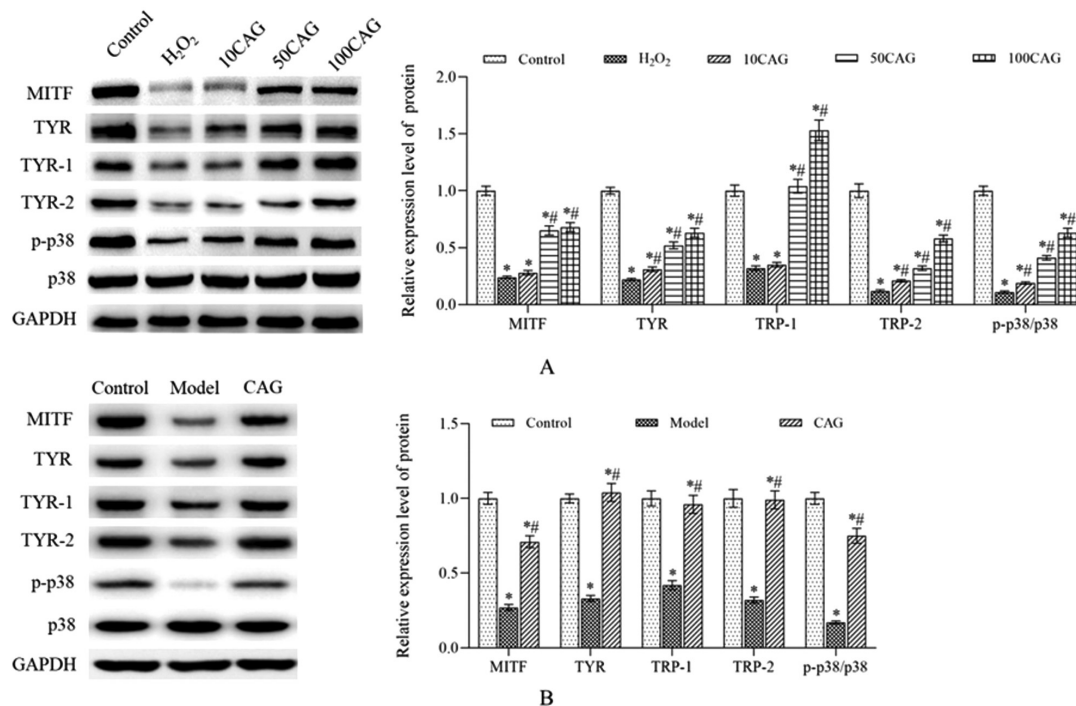
图6 环黄芪醇对 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞和白癜风小鼠中 MITF、TYR、TRP-1、TRP-2 和 p-p38/p38 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of cycloastragenol on the protein expressions of MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 and p-p38/p38 in H_2O_2 -treated PIG1 cells and vitiligo mice. Note: A: Protein expression in PIG1 cells; B: Protein expression in vitiligo skin tissue; compared with Control group, $*P<0.05$; compared with H_2O_2 group or Model group, $^{*}P<0.05$.

3 讨论

中药治疗白癜风在我国已经拥有悠久的历史,其中,黄芪是一种重要的配伍药物^[18]。虽然白癜风的致病机制尚未完全阐

明,但学者普遍认为过度的氧化应激是白癜风发病的关键因素^[19-21]。环黄芪醇是黄芪中的一种主要活性三萜皂甙成分,由黄芪甲苷的水解得到,目前已经在多个领域中表现出了良好的抗氧化性^[14,22]。基于上述背景,本研究推测环黄芪醇可能是黄芪治

疗白癜风的主要药效成分之一。

黑素细胞的破坏和随后皮损中的色素脱失是白癜风形成的关键事件^[23]。本研究以正常人皮肤黑素细胞 PIG1 为研究对象,首先考察了环黄芪醇的细胞毒性,结果显示环黄芪醇浓度达到 200 μM 时对 PIG1 细胞增殖有抑制作用。因此,选择了 10、50 和 100 μM 的使用浓度。使用 H_2O_2 处理 PIG1 细胞来建立体外白癜风模型,结果表明,10、50 和 100 μM 的环黄芪醇均可减轻 H_2O_2 对 PIG1 细胞增殖的抑制作用,并且减缓了 H_2O_2 诱导的细胞凋亡,表现为促凋亡蛋白 Bax 表达水平的降低以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的升高。此外,环黄芪醇升高了 H_2O_2 诱导的 PIG1 细胞中抗氧化酶 SOD 和 CAT 的水平,而降低了氧化产物 MDA 的水平。这些结果说明,环黄芪醇处理可减轻过度氧化应激对黑素细胞的损伤。

皮肤黑色素合成在色素减退治疗中起着重要作用。如何促进黑素细胞中的黑色素合成是治疗白癜风的主要方向之一。本研究结果显示,环黄芪醇以剂量依赖性方式提高了 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞中的黑色素含量。目前,白癜风小鼠的体内实验研究很少。为了进一步验证环黄芪醇对白癜风的治疗作用,本研究用莫诺苯宗乳膏制作了白癜风小鼠模型。HE 染色和 Masson-Fontana 染色结果发现,环黄芪醇治疗提高了白癜风小鼠皮肤组织中的毛囊和黑色素数量。这些结果充分证明了环黄芪醇治疗白癜风的潜在价值。

黑色素的生物合成由 3 种黑素细胞特异性酶催化:TYR、TRP-1 和 TRP-2^[24]。TYR 是黑素合成的限速酶^[25],催化酪氨酸羟甲基化生成 DOPA,并催化 DOPA 氧化成 DOPA 醌。TRP-1 和 TRP-2 在 TYR 下游黑色素的生物合成中起作用^[24]。MITF 与 TYR 启动子中高度保守的 M-box 基序结合,调节黑素生成基因的转录^[26,27]。因此,MITF 在增加黑素生成方面起着重要作用^[28]。本研究结果显示,环黄芪醇均上调了 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞和白癜风小鼠皮肤组织中 MITF、TYR、TRP-1 和 TRP-2 的蛋白表达,从而促进了黑色素的合成。

一些研究表明,MAPK 通路(ERK、JNK 和 p38)参与了 MITF 活性的调节^[29]。MAPK 的磷酸化已被报道为色素沉积的信号过程之一^[30,31]。研究表明,p38 通过 cAMP 反应元件结合的磷酸化激活 MITF,进而上调 TYR、TRP-1 和 TRP-2 的表达,导致黑色素的产生^[32]。本研究结果发现,环黄芪醇也促进了 H_2O_2 处理的 PIG1 细胞和白癜风小鼠皮肤组织中 p38 的磷酸化,这可能也是环黄芪醇促进黑色素合成的一种途径。

综上所述,本研究表明环黄芪醇在细胞水平和动物水平上均能促进黑色素合成,对白癜风具有较好的治疗作用,其机制可能与 p38 信号通路的激活有关。因此,环黄芪醇有可能成为临床治疗白癜风的候选药物。

参考文献(References)

- [1] Frisoli ML, Essien K, Harris JE. Vitiligo:mechanisms of pathogenesis and treatment[J]. Annu Rev Immunol, 2020, 38: 621-648
- [2] Faria AR, Tarlé RG, Dellatorre G, et al. Vitiligo--Part 2--classification, histopathology and treatment [J]. An Bras Dermatol, 2014, 89(5): 784-790
- [3] Laddha NC, Dwivedi M, Mansuri MS, et al. Vitiligo:interplay between oxidative stress and immune system [J]. Exp Dermatol, 2013, 22(4): 245-250
- [4] Maddodi N, Jayanthi A, Setaluri V. Shining light on skin pigmentation:the darker and the brighter side of effects of UV radiation [J]. Photochem Photobiol, 2012, 88(5): 1075-1082
- [5] Hearing VJ. Biogenesis of pigment granules:a sensitive way to regulate melanocyte function[J]. J Dermatol Sci, 2005, 37(1): 3-14
- [6] Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF:master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(9): 406-414
- [7] Zhou J, Shang J, Ping F, et al. Alcohol extract from Vernonia anthelmintica (L.) willd seed enhances melanin synthesis through activation of the p38 MAPK signaling pathway in B16F10 cells and primary melanocytes[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143(2): 639-647
- [8] Su TR, Lin JJ, Tsai CC, et al. Inhibition of melanogenesis by gallic acid:possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ β -catenin signaling pathways in B16F10 cells [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(10): 20443-20458
- [9] 张乐其. 墨早莲对黑素细胞 p38 和 ERK1/2 信号通路的影响[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018
- [10] Speckaert R, van Geel N. Vitiligo:an update on pathophysiology and treatment options[J]. Am J Clin Dermatol, 2017, 18(6): 733-744
- [11] Ding X, Mei E, Hu M, et al. Effect of puerarin on melanogenesis in human melanocytes and vitiligo mouse models and the underlying mechanism[J]. Phytother Res, 2019, 33(1): 205-213
- [12] 鹿广宪, 牛超. 一种新型补骨脂素衍生物 BSP-1 诱导 B16 细胞中黑色素合成的作用机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(4): 395-403
- [13] Ikram M, Jo MH, Choe K, et al. Cycloastragenol, a triterpenoid saponin, regulates oxidative stress, neurotrophic dysfunctions, neuroinflammation and apoptotic cell death in neurodegenerative conditions[J]. Cells, 2021, 10(10): 2719
- [14] Li M, Li SC, Dou BK, et al. Cycloastragenol upregulates SIRT1 expression, attenuates apoptosis and suppresses neuroinflammation after brain ischemia[J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(8): 1025-1032
- [15] Wu J, Zeng Z, Li Y, et al. Cycloastragenol protects against glucocorticoid-induced osteogenic differentiation inhibition by activating telomerase[J]. Phytother Res, 2021, 35(4): 2034-2044
- [16] Zhu X, Cao Y, Su M, et al. Cycloastragenol alleviates airway inflammation in asthmatic mice by inhibiting autophagy [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(5): 805
- [17] Wang G, Ma C, Chen K, et al. Cycloastragenol attenuates osteoclastogenesis and bone loss by targeting rankl-induced Nrf2/Keap1/ARE, NF- κ B, calcium, and NFATc1 pathways [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 810322
- [18] 钱同, 蒋旭宏, 章正祥, 等. 裘昌林教授治疗重症肌无力合并白癜风思路探析[J]. 浙江中医药大学学报, 2020, 44(4): 339-342
- [19] He S, Xu J, Wu J. The promising role of chemokines in vitiligo:from oxidative stress to the autoimmune response [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8796735
- [20] Wang Y, Li S, Li C. Perspectives of new advances in the pathogenesis of vitiligo:from oxidative stress to autoimmunity [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 1017-1023
- [21] Xie H, Zhou F, Liu L, et al. Vitiligo:How do oxidative stress-induced autoantigens trigger autoimmunity?[J]. J Dermatol Sci, 2016, 81(1): 3-9

(下转第 46 页)

- 压新生大鼠肺血管重塑的影响及其机制研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2021, 23(01): 103-110
- [16] Zhang Y, Yuan RX, Bao D. TGF- β 1 promotes pulmonary arterial hypertension in rats via activating RhoA/ROCK signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(9): 4988-4996
- [17] 于秀石, 朱佳, 魏丽丽, 等. IGF-1 上调 miR-155 表达对新生大鼠缺氧性肺动脉高压肺组织损伤的影响及其作用机制[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 31-38
- [18] Yao J, Fang X, Zhang C, et al. Astragaloside IV attenuates hypoxia induced pulmonary vascular remodeling via the Notch signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(1): 89
- [19] Zhang X, Jing S, Lin H, et al. Anti-fatigue effect of anwulignan via the NRF2 and PGC-1 α signaling pathway in mice [J]. Food Funct, 2019, 10(12): 7755-7766
- [20] Cui Y, Chang R, Zhang T, et al. Chinese Herbal Formula (CHF03) Attenuates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Through Inhibiting Lipogenesis and Anti-Oxidation Mechanisms[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1190
- [21] Sun X, Chen L, He Z. PI3K/Akt-Nrf2 and Anti-Inflammation Effect of Macrolides in Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. Curr Drug Metab. 2019, 20(4): 301-304
- [22] 《关于加快中医药特色发展的若干政策措施》印发[J]. 中医药管理杂志, 2021, 29(3): 23-25
- [23] Muhammad BA, Taher, M, Mutalabisin, MF, et al. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major* [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 96: 348-360
- [24] Li Y, Wang X. Chrysin Attenuates High Glucose-Induced BMSC Dysfunction via the Activation of the PI3K/AKT/Nrf2 Signaling Pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 165-182
- [25] Barkaoui T, Hamimed S, Bellamine H, et al. Alleviated Actions of *Plantago albicans* Extract on Lead Acetate-Produced Hepatic Damage in Rats Through Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities [J]. J Med Food, 2020, 23(11): 1201-1215
- [26] Han N, Wang L, Song Z, et al. Optimization and antioxidant activity of polysaccharides from *Plantago depressas* [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 93(Pt A): 644-654
- [27] 钟士杰, 邓堂, 林开文, 等. 车前草提取物对缺氧性肺动脉高压 SD 大鼠模型肺动脉压力、肺功能及炎症因子的影响[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(11): 2035-2039
- [28] Potočnjak I, Marinić J, Batičič L, et al. Aucubin administered by either oral or parenteral route protects against cisplatin-induced acute kidney injury in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2020, 142: 111472
- [29] Wu QQ, Xiao Y, Duan MX, et al. Aucubin protects against pressure overload-induced cardiac remodelling via the β 3 -adrenoceptor-neuronal NOS cascades[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(9): 1548-1566
- [30] Huang TL, Yang SH, Chen YR, et al. The therapeutic effect of aucubin-supplemented hyaluronic acid on interleukin-1 β -stimulated human articular chondrocytes[J]. Phytomedicine, 2019, 53: 1-8
- [31] Xue HY, Gao GZ, Lin QY, et al. Protective effects of aucubin on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Phytother Res, 2012, 26(3): 369-374
- [32] Wang H, Zhou XM, Wu LY, et al. Aucubin alleviates oxidative stress and inflammation via Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 188
- (上接第 40 页)
- [22] Chen C, Ni Y, Jiang B, et al. Anti-aging derivatives of cycloastragenol produced by biotransformation [J]. Nat Prod Res, 2021, 35(16): 2685-2690
- [23] Ghafourian A, Ghafourian S, Sadeghifard N, et al. Vitiligo: symptoms, pathogenesis and treatment [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2014, 27(4): 485-489
- [24] Nakagawa H. Comparison of the efficacy and safety of 0.1% tacrolimus ointment with topical corticosteroids in adult patients with atopic dermatitis: review of randomised, double-blind clinical studies conducted in Japan[J]. Clin Drug Invest, 2006, 26(5): 235-246
- [25] Park SH, Kim DS, Kim WG, et al. Terrein: a new melanogenesis inhibitor and its mechanism [J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(22): 2878-2885
- [26] Yu F, Lu Y, Zhong Z, et al. Mitf involved in innate immunity by activating tyrosinase-mediated melanin synthesis in *Pteropus pteropus* [J]. Front Immunol, 2021, 12: 626493
- [27] Zhou S, Zeng H, Huang J, et al. Epigenetic regulation of melanogenesis[J]. Ageing Res Rev, 2021, 69: 101349
- [28] Wong PM, Yang L, Yang L, et al. New insight into the role of exosomes in vitiligo[J]. Autoimmun Rev, 2020, 19(11): 102664
- [29] Kim ES, Park SJ, Goh MJ, et al. Mitochondrial dynamics regulate melanogenesis through proteasomal degradation of MITF via ROS-ERK activation [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2014, 27(6): 1051-1062
- [30] Hu S, Huang J, Pei S, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide inhibits UVB-induced melanogenesis by antagonizing cAMP/PKA and ROS/MAPK signaling pathways [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7330-7340
- [31] Sun L, Guo C, Yan L, et al. Syntenin regulates melanogenesis via the p38 MAPK pathway[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(2): 733-738
- [32] Bellei B, Maresca V, Flori E, et al. p38 regulates pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase [J]. J Biol Chem, 2010, 285(10): 7288-7299