

• 论 著 •

不同中药复方治疗豚鼠白癜风模型疗效比较^{*}

江 雪,钱思宇,郑文豪[△]
(重庆市中医院皮肤科,重庆 400011)

摘 要:目的 研究两种中药复方对实验豚鼠白癜风模型的治疗作用。方法 用涂抹氢醌乳膏制备豚鼠白癜风模型,包括分别用白癜风颗粒 1 号、2 号方剂和纯水进行灌胃的 1 号组、2 号组和实验对照组;同时用涂抹生理盐水的豚鼠作为空白组。肉眼观察 1、2 号组治疗的效果,进行复色评分。选取白癜风豚鼠造模部位皮肤组织和正常部位皮肤组织进行苏木精-伊红(HE)染色、硫酸亚铁染色和脱氧染色,观察黑色素细胞变化情况。结果 用氢醌能成功获得实验白癜风动物模型;白癜风颗粒 1 号和 2 号治疗后,与实验对照组比较造模部位的黑色素细胞计数增加($P<0.05$),与自身未造模部位比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 白癜风颗粒 1 号和 2 号两种中药复方均对白癜风治疗有效,并且对正常皮肤组织部位的黑色素细胞没有明显影响。

关键词:中药复方; 白癜风; 黑色素细胞; 疗效

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)18-2672-03

Comparative study on curative effects of two traditional Chinese medicine compounds in guinea pigs models of vitiligo^{*}

Jiang Xue, Qian Siyu, Zheng Wenhao[△]

(Department of dermatology, the Traditional Chinese Medicine Hospital of Chongqing, Chongqing 400011, China)

Abstract: **Objective** To observe the curative effects of two traditional Chinese medicine compounds in guinea pigs models of vitiligo. **Methods** The dark skin of guinea pigs, which were intragastrically administrated with vitiligo granules No. 1 (No. 1 group), vitiligo granules No. 2 (No. 2 group) and pure water (control group) respectively, were selected to establish vitiligo models induced by p-dihydroxy-benzene (hydroquinone). Taking physiological saline as a control (model group). Curative effects were observed by visual inspection, and the effects of repigmentation after intragastric administration were scored. The melanocyte count of normal part of skin was compared with that of vitiligo skin by using hematoxylin-eosin (HE) staining, ferrous sulfate staining and Deoxy-dyeing. **Results** The guinea pigs models of vitiligo were successfully induced by hydroquinone. After treatment by using vitiligo granules No. 1 and No. 2, the melanocyte counts of vitiligo skin in No. 1 group and No. 2 group were increased when compared with that in the control group ($P<0.05$), while no significant differences were observed between the vitiligo skin and the normal part of skin in the guinea pigs models of vitiligo ($P>0.05$). **Conclusion** The two Chinese medicine compounds, vitiligo granules No. 1 and vitiligo granules No. 2, both are effective for the treatment of vitiligo and without obvious effects on normal parts of skin, which could provide experimental data for clinical treatment.

Key words: traditional Chinese medicine compound; vitiligo; melanocyte; curative effect

白癜风是一种常见的后天性局限性或泛发性皮肤色素脱失病,其原因复杂且发病机制不明,受遗传、免疫、环境、压力、自由基等多方面因素影响。主要皮损表现为色素脱失斑,由皮肤黑色素细胞的功能减退或消失所致^[1]。白癜风常常影响患者的学习、就业和生活,造成患者生理和心理上的双重伤害。古代医家认为白癜风涉及肺、心、脾、肝等脏器,与外风、内热、外湿、气、血有关,病位于皮肤与腠理,病机主要有风邪外袭,气血不和或气滞血瘀。本课题旨在研究两个经验复方中药(白癜风颗粒 1 号和白癜风颗粒 2 号)对实验豚鼠白癜风模型的治疗作用。通过治疗后皮损复色评分,皮损组织病理学检测黑色素合成情况,了解两个复方治疗实验豚鼠白癜风模型的疗效,探讨中药复方对实验豚鼠白癜风的治疗作用及可能的作用机制,寻找效优、安全的中药方剂,为中医药临床治疗白癜风提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级豚鼠(黑色或黑花色),平均体质量(200 ± 20)g,雌雄对半,共 60 只,由重庆大坪医院动物中心提

供,雌雄分笼饲养。

1.2 中药复方 (1)白癜风颗粒 1 号处方共 280 g:黄芪 20 g,白术 15 g,川芎 10 g,合欢皮 20 g,蒺藜 15 g,钩藤 10 g,萍 15 g,防风 10 g,白芷 10 g,桑枝 15 g,参 30 g,郁金 15 g,补骨脂 15 g,鸡血藤 15 g,首乌 20 g,女贞子 30 g,旱莲草 15 g。(2)白癜风颗粒 2 号处方共 110 g:紫草 10 g,丹参 10 g,僵蚕 10 g,制首乌 10 g,补骨脂 10 g,旱莲草 10 g,白芷 10 g,当归 10 g,川芎 6 g,蜂房 5 g,刺蒺藜 10 g,鸡血藤 10 g。方剂均由本科实验室提供。

1.3 仪器与试剂 试剂主要包括 5% 氢醌乳膏,由重庆市中医院药剂科提供;硫化钠;染色剂。仪器主要为显微镜。

1.4 方法

1.4.1 分组及造模 将实验豚鼠随机分为 4 组各 15 只:空白组、实验对照组、1 号组、2 号组,1、2 号组均为治疗组。对实验对照组、1 号组、2 号组豚鼠制备白癜风模型,取豚鼠颈背部黑色部位 $4\text{ cm}\times 4\text{ cm}$ 造模,用 6% 硫化钠脱毛,在脱毛区涂抹 5% 氢醌乳膏,用量为每天每只 2 g,每天 2 次。造模持续 60 d,

^{*} 基金项目:重庆市中医院院内培育项目(2014-2-14)。 作者简介:江雪,女,病理技师,主要从事皮肤科相关疾病研究。 [△] 通讯作者, E-mail:yanji1984@126.com。

每 3 d 脱毛 1 次^[2]。空白组在脱毛区涂抹生理盐水,每天每只 2 mL,每天 2 次。

1.4.2 给药 造模第 11 天开始分组灌胃。空白组和实验对照组每天灌胃 2 mL 纯净水,1 号组和 2 号组分别用白癜风颗粒 1 号、2 号方剂进行灌胃,按照豚鼠体重质量计算每日服药量,1 号方剂为 10.8 g/kg,2 号方剂为 8.6 g/kg,每天灌胃相应体积药液,持续 50 d。

1.4.3 脱色与复色观察 造模第 10 天对豚鼠实验区皮肤进行拍摄,记录其色素脱失情况,并对皮肤色素脱失情况进行评分,评分标准:皮肤颜色较脱色前色素减退不明显记为 0 分;皮肤颜色较脱色前出现轻微色素减退记为 1 分;皮肤颜色较脱色前出现明显色素减退或出现实验区皮肤上少量毛发变白记为 2 分;皮肤颜色苍白或出现明显的毛发变白记为 3 分^[3]。实验动物开始灌胃给药后,每 2 周对实验动物进行拍摄评估,观察造模部位色素沉着情况,评分标准:造模区呈深褐色或黑色,色素基本恢复正常记为 3 分;造模区为中褐色或浅灰色、色素恢复面积大于 50%记为 2 分;造模区为淡褐色、色素恢复面积小于 50%记为 1 分;造模区皮肤呈白斑状或苍白记为 0 分^[4]。

1.4.4 病理切片 实验结束后,取造模部位中心 1 cm×1 cm,用中性甲醛固定,石蜡包埋。每个部位制成 3 张连续切片,分别进行苏木精-伊红(HE)、硫酸亚铁染色和脱氧后的硫酸亚铁染色。在显微镜下观察皮肤基底层和棘层黑色素颗粒、黑色素细胞个数变化情况。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理与统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 皮肤反应 豚鼠造模部位可明显观察到色素脱落,部分皮肤苍白;治疗组豚鼠造模部位在灌胃 2 周后可见部分色素沉着的改变,有明显的复色效果。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 脱色和复色评价 在造模第 10 天对白癜风模型豚鼠进行脱色评分,在给药第 50 天对治疗组豚鼠进行复色评分。可见造模第 10 天,实验对照组、1 号组和 2 号组皮肤颜色较造模前均有明显的色素减退。在给药第 50 天,实验对照组基本没有复色表现,皮肤多呈白斑状或有白色毛发存在。1 号组和 2 号组背部造模皮肤色素有较大面积恢复,并呈现浅灰色或褐色。1 号组复色评分略高于 2 号组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 白癜风模型豚鼠脱色和复色评分($\bar{x} \pm s$,分)			
组别	<i>n</i>	脱色评分	复色评分
实验对照组	15	2.86±0.24	0.17±0.41
1 号组	15	2.56±0.75	2.83±0.29
2 号组	15	2.78±0.60	2.33±0.41

2.3 HE 染色 进行灌胃给药后治疗组角质层、表皮层明显增厚,棘层细胞增大、变多,黑色素细胞进入表皮层或者真皮层数量增多,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.4 黑色素细胞计数 标本连续切片进行硫酸亚铁和脱色染色,在 20×0.10 倍显微镜视野下,计数基底层黑色素细胞,每 3 个视野取平均值。实验对照组、1 号组、2 号组的未造模部位与空白组比较,黑色素细胞计数差异均无统计学意义($P <$

0.05);1 号和 2 号组造模部位分别与实验对照组造模部位比较,黑色素细胞计数增加($P < 0.05$),与自身未造模部位比较差异无统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组皮肤病理切片染色后黑色素细胞计数($\bar{x} \pm s$)		
组别	<i>n</i>	黑色素细胞计数
空白组	15	4.91±0.66
实验对照组	15	
造模部位		1.31±0.55
未造模部位		5.03±0.68
1 号组	15	
造模部位		4.94±0.61 *
未造模部位		4.64±0.67
2 号组	15	
造模部位		4.42±0.57 *
未造模部位		4.87±0.60

* : $P < 0.05$,与实验对照组造模部位比较。

3 讨 论

白癜风是一种以黑色素脱失为基本特征的常见皮肤病,其发病机制相关假说多围绕自身免疫攻击,以及由代谢或神经功能缺陷引起的自身细胞毒性效应^[5]。传统医学治疗白癜风已有几千年历史,从病因、病机内、外方药均有较多记载,疗效确切,使用安全。但其辩证纷繁复杂而混乱,缺乏较统一和公认的辩病、辩证依据,其中治法又多选用补益肝肾、活血化瘀法^[6-7]。《素问》云:“邪之所凑,其气必虚”,白癜风的发病存在正气不足,属于本虚标实,古代医家已采用补虚药物治疗本病,扶正祛邪^[8]。本科室根据文献总结及历代医家治疗白癜风的经验,认为白癜风病程长,难以治愈,不是单一的病因、病机,常虚实夹杂为患,总结主要的证型有气血不和、卫外不固、肝肾不足,拟定白癜风复方 1 号及 2 号^[9-11]。白癜风复方 1 号主要功效为益卫固表、祛风活血、补益肝肾。白癜风复方 2 号主要功效为养血活血、补益肝肾。近 3 年多来,临床将上述中药复方运用于治疗进展期及稳定期白癜风患者,发现其对控制白斑进展及促进色素恢复具有较好疗效。本实验研究上述两种中药复方对实验豚鼠白癜风模型的治疗作用,进一步为临床使用提供了理论依据。

本研究中通过经验方白癜风颗粒 1 号方剂和白癜风颗粒 2 号方剂给予灌胃治疗,模型豚鼠白癜风局部症状得到明显改善。并且在自身正常皮肤中,并未检测到因用药而引起的黑色素颗粒的增加。提示其调控的机制可能跟黑色素颗粒的生成负反馈和黑色素受体相关^[12]。在接下来的研究中,笔者将进一步检测用药前、后的黑色素受体,试图找出中药方剂治疗白癜风的途径和白癜风可能的发病机制,为中医治疗白癜风与该治疗方法的可发展性提供有效的理论依据。

参考文献

[1] 张学军. 皮肤性病学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2004:184-186.
[2] 艾瑛,喻国华. 抗白汤对实验性白癜风豚鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(13):152-156.
[3] 陈亚非,王嵘,周国华. 白癜风病因的研究进展[J]. 中国医师杂志,2010,12(4):572-574.
[4] 赵进,李伟,李世远,等. 白癜风患者血清过氧化氢、过氧化氢酶和谷胱甘肽氧化物酶的检测[J]. 中国皮肤性病学杂志,2011,25(10):739-740.
(下转第 2676 页)

光定量 PCR 阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 92.89%，总符合率为 94.11%；PCR 酶切法阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 96.65%，总符合率 97.22%。

表 1 不同检测方法检出各年龄段临床痰液标本军团菌阳性率[n(%)]

年龄组别	n	PCR 酶切	实时荧光定量 PCR	16S rRNA 基因测序
成人组				
20~60 岁	147	32(21.8)	35(23.8)	31(21.1)
>60 岁	193	25(13.0)	29(15.0)	23(11.9)
儿童组				
<30 d	2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
30 d 至小于 3 岁	134	33(24.6)	39(29.1)	25(18.6)
3~<7 岁	71	17(23.9)	21(29.6)	14(19.7)
7~14 岁	30	8(26.7)	9(30.0)	6(20.0)
合计	577	115(19.9)	133(23.1)	99(17.2)

3 讨 论

军团菌肺炎的临床症状不典型,很难明确地与其他病原菌所致肺炎相区分,而检测军团菌的传统方法主要依靠培养和血清型鉴定,受到了检测时间和范围的限制,这都给临床诊断造成极大困难[1-2]。本试验根据军团菌 16S rRNA 基因序列设计引物和探针[5-6],建立实时荧光定量 PCR 试验方法,并摸索试验条件,优化试验程序,改进试验方法,采用磁珠法提取样品中 DNA,提高了试验的灵敏度,可用于检测临床患者痰液标本中军团菌。共收集儿童和成人肺部感染患者 577 例,实时荧光定量 PCR 法检出军团菌阳性 133 例(23.1%),PCR 酶切法检出阳性 115 例(19.9%),16S rRNA 基因测序验证阳性 99 例(17.2%)。其中儿童组 237 例,实时荧光定量 PCR 检出军团菌阳性 69 例(29.1%),PCR 酶切法检出阳性 58 例(24.5%),16S rRNA 基因测序验证阳性 45 例(19.0%),说明小儿呼吸道感染患者中,确实存在军团菌感染性肺炎。成人组 340 例,实时荧光定量 PCR 检出军团菌阳性 64 例(18.8%),16S rRNA 基因测序验证阳性 54 例(15.9%),其中 10 例测序结果阴性,视其为假阳性病例。对实时荧光定量 PCR 法、PCR 酶切法和 16S rRNA 基因测序检测军团菌的总阳性率进行比较,

差异无统计学意义($P>0.05$)。说明实时荧光定量 PCR 和 PCR 酶切法是一种高效、快速、简单的方法,具有较高的灵敏度和特异度,通过活菌计数法检测其灵敏度可检测到 10^2 个细菌 DNA 浓度,可作为儿童和成人军团菌感染的一种辅助诊断试验。

嗜肺军团菌是一种细胞内致病菌,3 岁以下儿童、60 岁以上老年人对军团菌易感,其感染高于其他年龄段;此外,其他免疫功能低下者也是军团菌病的易感人群。军团菌感染患者最小年龄 45 d,最大年龄 84 岁。60 岁以上老年人和 3 岁以下小儿患病率较高,说明老年人和小儿等免疫力低下人群是军团菌肺炎的易感人群。

综上所述,实时荧光定量 PCR 法检测患者痰液标本中军团菌,具有快速、简便的特点,且特异性、灵敏性、重复性好,可作为临床军团菌感染患者的一种辅助诊断试验。

参考文献

[1] Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and legionnaires' disease: 25 years of investigation[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(3):506-526.

[2] Abad Sanz I, Velasco Rodriguez MJ, Marín Riaño ME, et al. Outbreak of legionnaires' disease in a restaurant in the community of Madrid, Spain[J]. Revista española de salud pública, 2014, 88(5): 661-669.

[3] Reischl U, Linde HJ, Lehn N, et al. Direct detection and differentiation of Legionella spp. and Legionella pneumophila in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3814-3817.

[4] Graham RM, Doyle CJ, Jennison AV. Real-time investigation of a Legionella pneumophila outbreak using whole genome sequencing[J]. Epidemiol Infect, 2014, 142(11): 2347-2351.

[5] Zhan XY, Li LQ, Hu CH, et al. Two-step scheme for rapid identification and differentiation of Legionella pneumophila and non-Legionella pneumophila species[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 433-439.

[6] Stolthaus A, Bergh K. Identification and differentiation of Legionella pneumophila and Legionella spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(9): 6394-6398.

(收稿日期:2015-06-28)

(上接第 2673 页)

[5] 叶伊琳,唐洁,刘琴,等.复方补骨脂擦剂对豚鼠白癜风模型作用的实验研究[J].北京中医药大学学报,2014,37(4):252-254.

[6] 黄波,欧阳书云,黄小容,等.2 味治疗白癜风中药的有效单体成分鉴定[J].中国药房,2011,26(3):238-240.

[7] 张春艳,许爱娥.治疗白癜风的中药外用制剂总结分析[J].中华中医药学刊,2012,31(9):2074-2077.

[8] 陈惠英,许爱娥.白癜风表皮微环境研究进展[J].中国皮肤性病杂志,2008,22(2):113-115.

[9] 沈丽,黄云英,王雪妮,等.菟丝子外用对实验性豚鼠白癜风的药效[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(16):199-202.

[10] 祝逸平,王遂泉,卢良君,等.卤米松、黄芩提取物联合用

药对白癜风小鼠模型的影响[J].中国药理学通报,2014,30(4):554-558.

[11] 李雪,周梅华,吴迪,等.白癜风皮损边缘黑素细胞线粒体超微结构的电镜观察[J].中华皮肤科杂志,2013,46(9): 19-22.

[12] 李伟,李世远,陆健群,等.白癜风患者皮肤组织液氧化-抗氧化物水平比较分析[J].中国皮肤性病杂志,2012,26(4):303-305.

(收稿日期:2015-03-18)

