

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.11.004

文章编号: 1005-8982 (2020) 11-0016-06

果酸联合调 q 激光治疗中波紫外线诱导黄褐斑鼠模型的实验研究

贾晓敏¹, 陈伟², 谭文³, 蒋甜甜⁴, 廖阳英⁴, 唐桦⁴, 冯浩⁴

[1. 西藏自治区拉萨市人民医院 病理科, 西藏 拉萨 850000; 2. 西藏自治区卫生健康委员会, 西藏 拉萨 850000; 3. 长沙市中医医院 病理科, 湖南 长沙 410111; 4. 湖南师范大学附属第一医院 (湖南省人民医院) 皮肤科, 湖南 长沙 410005]

摘要: **目的** 研究果酸联合调 q 激光治疗中波紫外线诱导的黄褐斑鼠模型的疗效及可能机制。**方法** 选取健康雌性豚鼠 30 只, 分为正常组 (6 只) 和实验组 (24 只)。实验组予中波紫外线联合黄体酮注射液复制黄褐斑鼠模型, 从中随机选取 6 只与正常组豚鼠一起处死, 观察血清超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 的表达水平, 局部皮损行 HE 及免疫组织化学染色。实验组余 18 只分为模型组, 随机分为 A、B、C 组, 每组 6 只。A 组予以果酸联合调 q 激光治疗, B 组予以氢醌治疗, C 组不做任何处理。4 个月后分别检测各组豚鼠血清、肝脏、皮肤 SOD 活力、MDA 表达水平及皮肤组织病理改变。**结果** 模型组黄褐斑鼠模型复制区可见深褐色斑形成; 模型组与正常组比较, 血清 SOD 水平下降, MDA 水平上升 ($P < 0.05$); 模型组皮损 HE 及免疫组织化学染色显示病理表现符合黄褐斑病理改变; A、B 组与 C 组比较, A 组、B 组皮损肉眼观及组织病理表现明显改善; 治疗后血清、肝脏、皮肤中 SOD 水平上升, MDA 水平下降 ($P < 0.05$), A 组与 B 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 果酸联合调 q 激光治疗黄褐斑鼠疗效显著, 可能与果酸的剥脱作用、抗氧化作用, 以及调 q 激光选择性破坏黑色素细胞、减少黑色素生成有关。

关键词: 黄褐斑; 果酸; 调 q 激光; 模型

中图分类号: R758.42

文献标识码: A

Pathological experimental study of alpha hydroxy acid combined with Q-switched laser in the treatment of chloasma mouse model induced by UVB

Xiao-min Jia¹, Wei Chen², Wen Tan³, Tian-tian Jiang⁴, Yang-ying Liao⁴, Hua Tang⁴, Hao Feng⁴
(1. Department of Pathology, Lhasa People's Hospital, Lhasa, Tibet 850000, China; 2. Tibet Autonomous Region Health and Family Planning Commission, Lhasa, Tibet 850000, China; 3. Department of Pathology, Changsha Traditional Chinese Medicine Hospital, Changsha, Hunan 410111, China; 4. Department of Dermatology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect and the possible mechanism of alpha hydroxy acid combined with Q-switched laser in the treatment of melasma mouse model induced by UVB. **Methods** Totally 30 healthy female guinea pigs were selected and were randomly divided into normal group (6 guinea pigs) and model group (24 guinea pigs). The model group was given UVB combined with progesterone to induced chloasma mode. 6 model mice were randomly selected to observe the levels of both serum superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) and the pathology of skin tissues by HE staining and immunohistochemistry. The normal group was handled as the

收稿日期: 2019-12-10

[通信作者] 冯浩, E-mail: doctorfenghao@126.com

same. The rest of the 18 mice in the model group were randomly divided into group A, group B and group C. Group A was treated with a combination of alpha hydroxy acid combined with Q-switched laser, group B was treated with hydroquinone, group C was done with nothing. After 4 months, the levels of SOD and MDA in serum, liver and skin lesions and the pathology of skin tissue were detected. **Results** Dark brown spot formed in the molding bay of model group; the expression levels of serum SOD in the model group was clearly lower, and the expression levels of serum MDA was higher than those of the normal group ($P < 0.05$). The pathology of skin tissues observed by HE staining and immunohistochemistry in the model group were consistent with the melasma. The group A and the group B were compared with the group C respectively. The manifestations and pathology were obviously improved, and the expression levels of SOD in serum, liver and skin lesions were clearly higher, and the expression levels of MDA were clearly lower ($P < 0.05$). There was no significant difference between the A group and the B group ($P > 0.05$). **Conclusion** The curative effect of alpha hydroxy acid combined with Q-switched laser in melasma mouse model was significantly, which may be related to the exfoliation and antioxidation of alpha hydroxy acid and the selective destruction of Q-switched Laser for melanocyte.

Keyword: chloasma; fruit acid; Q-switched laser; models

黄褐斑是一种常见的后天色素沉着性皮肤病,常表现为对称网状色素沉着,颜色深浅不一,易复发,好发于女性。临床上 50% ~ 80% 患者易发于面中部^[1],主要影响美观,增加患者心理压力,降低患者生活质量。黄褐斑病因尚未明确,研究认为可能与遗传易感性、日晒、内分泌因素、长期摄入某些药物、微量元素缺乏、精神因素等相关^[2]。目前治疗方法多样,各种外用药物(如:氢醌、果酸)、系统用药(如:氨甲环酸、维生素C)、光学治疗(如:强脉激光、调q激光)均取得一定的疗效,但仍有限^[3],且目前相关治疗主要以临床研究为主,缺少相关机制研究。本研究主要通过动物实验,研究果酸联合调q激光治疗中波紫外线诱导的黄褐斑鼠模型的疗效,并初步探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级雌性豚鼠 30 只,6 ~ 8 周龄,体重 250 ~ 300 g,由湖南太平洋生物科技有限公司提供,黄体酮注射液(规格 1 ml: 20 mg)购自广州白云山明兴制药有限公司,戊巴比妥钠注射液购自广东邦民制药有限公司,果酸、果酸无菌刷、果酸中和液(1% 碳酸氢钠溶液)购自薇诺娜公司,3% 氢醌乳膏购自广东人人康药业有限公司,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,HMB45 鼠单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。

1.2 动物分组及模型复制、治疗

随机将 30 只豚鼠分为正常组(6 只)和实验

组(24 只),选取背部约 3 cm × 3 cm 皮肤剃毛备用。正常组不予以特殊处理;实验组参照文献[4-5]模型复制的方法,于豚鼠后腿根部屈侧肌内注射黄体酮与 0.9% 氯化钠注射液混合液(1:1),20 mg/kg,1 次/d,左右腿交替,连续注射 30 d,同时每日予以波长 280 ~ 320 nm 的中波紫外线(上海季光特种照明电器有限公司紫外线灯)照射背部裸露的皮肤(紫外灯距离豚鼠背部约 20 cm),1 次/d,60 min/次,共 30 d,复制黄褐斑鼠模型。随机挑选实验组及正常组豚鼠各 6 只,抽取心脏血行 SOD 和 MDA 检测,取背部约 1.0 cm × 1.0 cm 皮损处全层皮肤组织,行 HE 和免疫组织化学染色。实验组余 18 只为模型组,随机分为 A、B、C 组,每组 6 只。A 组予以果酸联合调q激光治疗,初始选用 20% 的果酸^[6],均匀涂抹于皮损处,停留 3 ~ 5 min 并密切观察皮肤反应后,使用 1% 碳酸氢钠中和液中和,再冷喷 20 min,2 周后采用调q激光治疗,波长 1 064 nm,能量 1.3 ~ 2.4 J/cm²,光斑半径为 5 mm,治疗头垂直皮肤表面,平行均匀扫描患处 3 或 4 次,1 个月为 1 个疗程,共 4 个疗程,果酸浓度依次为 20%、35%、50%、70%^[7];B 组于黄褐斑鼠背部病灶皮损处涂抹 3% 氢醌软膏,1 次/d;C 组不做任何特殊处理。4 个月后进行检测。

1.3 血清及皮肤、肝脏组织匀浆的制备

于心脏处抽取血液 5 ml,离心,获取血清。随后分离出皮损组织及肝脏组织,用预冷 4℃ 的 0.9% 氯化钠 NaCl 溶液漂洗,滤纸拭干,称重,皮肤和肝脏组织各约 0.5 g,将组织剪碎,置于匀浆器中加入 0.9% NaCl 溶液约 4.5 g,将其研磨制备成 10% 的组织匀浆,随后

将匀浆液离心,取上清液进行检测^[8]。

1.4 血清及皮肤、肝脏组织 SOD、MDA 检测

血清及皮肤、肝脏组织 SOD、MDA 的测定按试剂盒操作要求进行,采用分光光度法测定样品管的吸光度值,检测 SOD、MDA 水平^[9]。

1.5 皮肤组织病理学检测

HE 染色病理标本切片制备:取各组豚鼠皮损部位全层皮肤,约 $1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm}$,随即放入 10% 中性甲醛进行固定、石蜡包埋、切片、HE 染色,观察皮肤的组织病理学变化。免疫组织化学染色:选用 SP 法标记黑色素细胞,一抗选用鼠抗人单克隆抗体 HMB45,己二酸二丁酯(DAB)显色,苏木精复染。用磷酸盐缓冲液代替一抗做阴性对照。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较采用 t 检验或方差分析,进一步两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常组与模型组皮损表现

正常组豚鼠背部皮肤呈均匀的浅棕色;模型组黄褐斑鼠背部模型复制区域皮肤呈均一稳定、边界清晰的深褐色色斑。见图 1。

2.2 正常组与模型组皮损病理组织学形态变化

正常组豚鼠皮肤的鳞状上皮层细胞排列整齐,较菲薄,由排列整齐的基底细胞和棘细胞组成,2 或 3 层,真皮层内未见微小血管扩张,炎症细胞少见;模型组黄褐斑鼠皮肤的鳞状上皮层细胞明显增生,核大且排列紊乱,真皮层内可见小血管增生扩张,炎症细胞多见,基底层可见连续分布的黑素颗粒。见图 2。

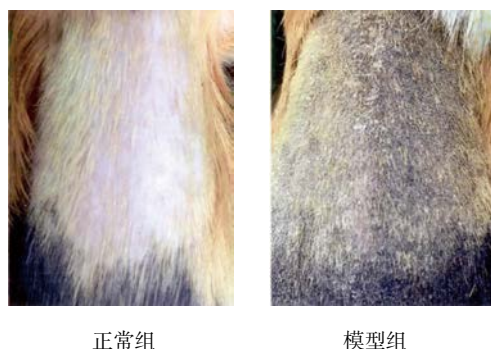


图 1 皮损表现

2.3 正常组与模型组上皮层内黑色素细胞的分布

正常组豚鼠上皮层内可见少许黑色素细胞,主要分布于基底层,胞浆着色棕褐色;模型组黄褐斑鼠上皮层内可见大量黑色素细胞,成簇分布于基底层和棘层,胞浆着色深褐色,伴细胞核增大及核上移,表皮细胞数增多。见图 3。

2.4 正常组与模型组血清 MDA、SOD 水平比较

两组 MDA 和 SOD 水平的比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),模型组血清 MDA 水平上升, SOD 水平下降。见表 1。

2.5 模型组治疗前后皮损比较

模型组治疗前皮损处均可见均一稳定、边界清晰的深褐色斑。A 组治疗后可见皮肤稍淡红,无明显色素沉着;B 组治疗后可见皮肤颜色变浅,仅有局部小片色素沉着,治疗过程中皮肤偶有干燥、脱屑;C 组治疗后可见皮肤色素稍减退,但仍明显区别于正常皮肤。见图 4。

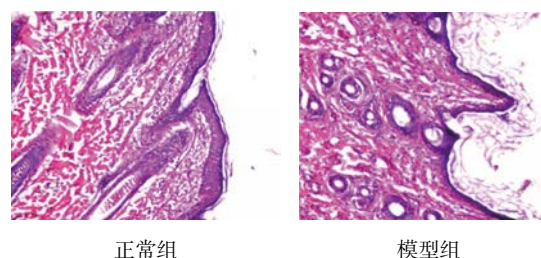


图 2 皮肤病理改变 (HE 染色 $\times 100$)

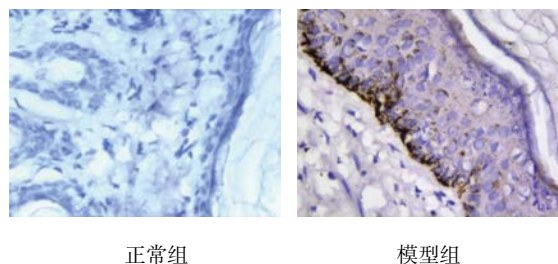


图 3 上皮层内黑色素细胞的分布改变 (SP 法 $\times 400$)

表 1 模型组与正常组血清 MDA 及 SOD 比较
($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	MDA/nmol	SOD/u
正常组	2.922 ± 0.514	268.935 ± 4.845
模型组	7.758 ± 1.168	196.687 ± 7.062
t 值	9.283	20.671
P 值	0.000	0.000

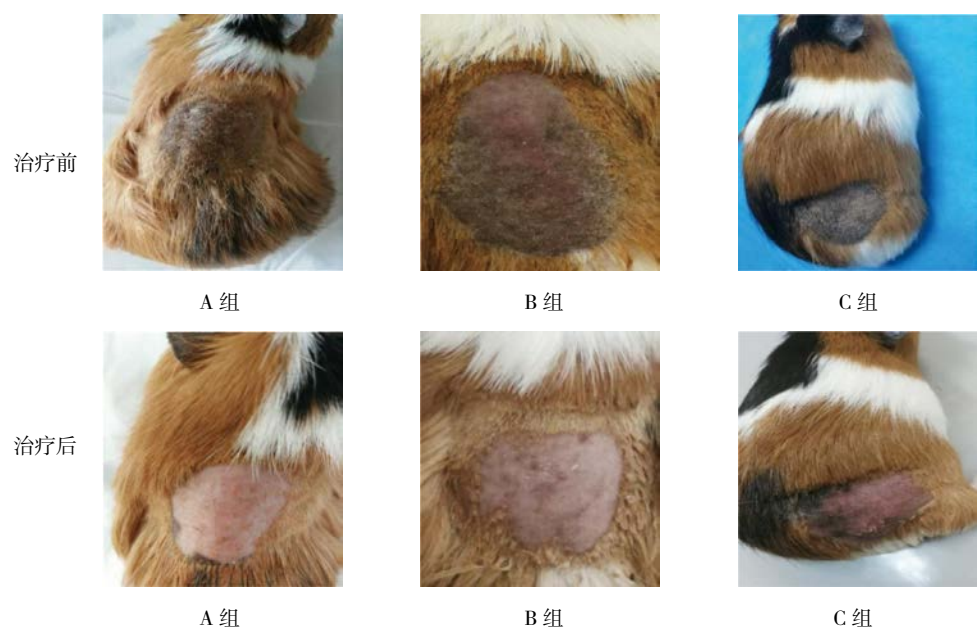


图 4 模型组治疗前后皮损比较

2.6 模型组治疗后皮损 HE 染色结果

A 组和 B 组豚鼠表皮的上皮层细胞增生有所减轻,排列整齐,真皮层内微小血管扩张减轻,炎症细胞浸润少见,黑色素细胞分辨不清晰;C 组豚鼠表皮的上皮层细胞明显增生,核大且排列紊乱,真皮层内仍可见微小血管扩张增生,炎症细胞浸润多见,基底层可见黑色素细胞连续分布。见图 5。

2.7 模型组治疗后皮损免疫组织化学结果

A 组和 B 组黄褐斑鼠上皮基底层可见胞浆着色为深褐色的黑色素细胞,棘层及角质层未见黑色素细胞,黑色素细胞呈线状或散在分布;C 组豚鼠上皮基底层和棘层仍可见大量黑色素细胞,胞浆着色深褐色,

黑色素细胞堆积,呈层状分布。见图 5。

2.8 模型组治疗后 SOD、MDA 水平比较

治疗干预后,A、B、C 组血清 SOD 和 MDA,肝脏 SOD 和 MDA,皮肤 SOD 和 MDA 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗后 A、B 组与 C 组比较,血清 SOD 活力上升($t=10.419$ 和 11.824 , 均 $P=0.000$);A、B 两组差异无统计学意义($t=0.323$, $P=0.753$)。A、B 组血清 MDA 水平均较 C 组下降($t=6.014$ 和 4.153 , 均 $P=0.002$);A、B 两组差异无统计学意义($t=4.304$, $P=0.155$)。A、B 两组肝脏 SOD 活性较 C 组上升($t=8.760$ 和 11.082 , 均 $P=0.000$);A、B 两组差异无统计学意义($t=0.756$, $P=0.467$)。A、B 两组

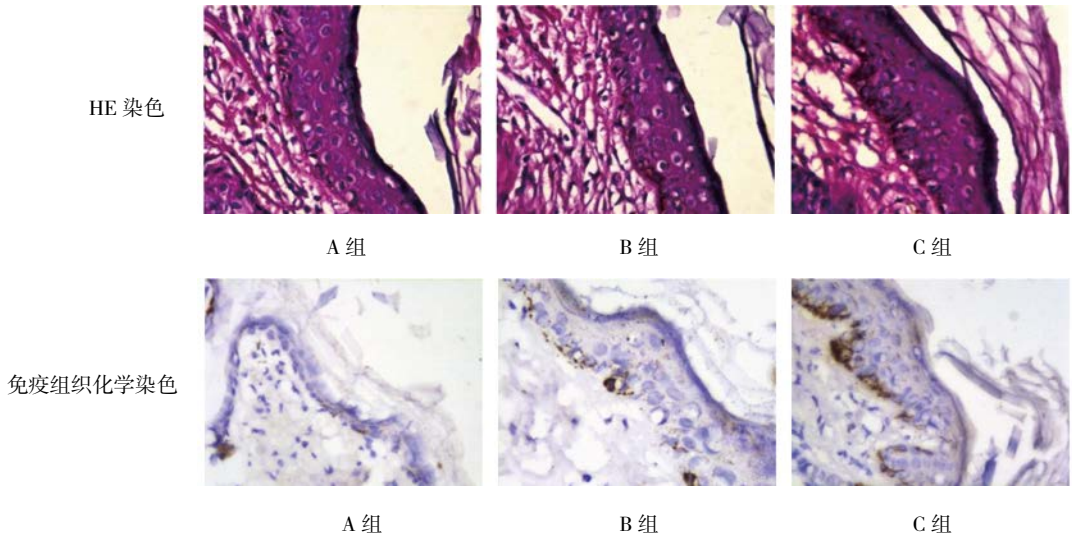


图 5 模型组治疗后皮损染色结果 (×400)

肝脏 MDA 水平较 C 组下降 ($t=0.782$ 和 0.429 , $P=0.042$ 和 0.003); A、B 两组差异无统计学意义 ($t=1.592$, $P=0.142$)。A、B 两组皮肤 SOD 活性较 C 组升高 ($t=3.028$ 和 4.385 , $P=0.013$ 和 0.001); A、B 两组

差异无统计学意义 ($t=0.197$, $P=0.847$)。皮肤 MDA 水平 A、B 组低于 C 组 ($t=5.719$ 和 4.825 , 均 $P=0.000$); A、B 两组差异无统计学意义 ($t=1.359$, $P=0.204$)。见表 2。

表 2 各组治疗后血清、肝脏和皮肤组织中 SOD 及 MDA 的水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血清		肝脏		皮肤	
	SOD/u	MDA/nmol	SOD/u	MDA/nmol	SOD/u	MDA/nmol
A 组	236.13 ± 4.52^{①②}	5.21 ± 0.23^{①②}	100.53 ± 3.81^{①②}	0.44 ± 0.12^{①②}	28.51 ± 6.54^{①②}	0.06 ± 0.02^{①②}
B 组	235.35 ± 3.81^{①}	5.82 ± 0.26^{①}	99.28 ± 1.38^{①}	0.57 ± 0.16^{①}	27.96 ± 1.94^{①}	0.08 ± 0.03^{①}
C 组	216.74 ± 0.59	7.23 ± 0.79	81.71 ± 3.63	0.73 ± 0.90	18.31 ± 5.03	0.23 ± 0.07
F 值	161.120	42.620	108.150	25.210	194.160	107.920
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与 C 组比较, $P<0.05$; ②与 B 组比较, $P>0.05$ 。

3 讨论

黄褐斑是一种以面部色素沉着为主的损容性疾病,多发于育龄期女性,对患者的容貌、心理造成一定影响,治疗起来难度较大,复发率很高。黄褐斑的发病机制复杂,一般认为是由多种因素导致黑色素细胞中黑色素过量表达及代谢障碍所致^[10]。黑色素的形成与脂质过氧化和酪氨酸酶密切相关。人体在应激状态下或紫外线刺激时,可使体内氧自由基增多, SOD 相对不足,导致过多的氧自由基与真皮层细胞产生氧化反应,形成大量的脂褐素,形成黄褐斑^[11]。目前黄褐斑的治疗方式多种多样,果酸及调 q 激光在临床上的应用均取得一定疗效,但两者联合应用的报道相对较少。

果酸化学名称为乙醇酸,是目前突出的化学剥脱试剂的主要成分,在治疗色素沉着性皮肤问题方面受到越来越多的关注^[12]。果酸治疗黄褐斑见效较慢,且对深层的色素疗效欠佳。就其作用机制而言,较多的关注在于其化学剥脱作用,其他可能机制有待进一步研究。调 q 激光可以调节波长控制治疗深度,在不影响周围组织的情况下,选择性地破坏黑素体。但调 q 激光的缺点是靶组织吸收少,爆破不够,单一提高能量,对周边皮肤组织及基膜会造成损害,有增加色素沉着的风险^[13-14]。故单一使用果酸或调 q 激光均有一定局限性。

因此,本研究联合 2 种治疗方法治疗黄褐斑鼠。结果显示不同浓度的果酸联合调 q 激光周期性干预治疗黄褐斑鼠后,肉眼观色素沉着基本消退。HE 染色

可见表皮的上皮层细胞增生、排列紊乱及真皮层内微血管扩张明显减轻,炎症细胞浸润减少,免疫组织化学染色结果示表皮黑色素细胞呈线状或散在分布,相对于自然恢复对照组,黑色素细胞及黑色素颗粒明显减少。均提示黄褐斑明显改善。果酸联合调 q 激光治疗后血清、肝脏、皮肤组织的 MDA 水平降低, SOD 水平升高,提示治疗的同时又明显有抗氧化作用。故结合果酸及调 q 激光的治疗特点,考虑果酸还有一定的抗氧化性,能促使 SOD 水平升高,MDA 水平降低,抑制机体内过氧化程度,从而使黑色素细胞的生成减少,减少皮肤的色素沉着。

综上所述,果酸联合调 q 激光治疗黄褐斑效果显著,其机制可能与果酸的剥脱作用、抗氧化作用,以及调 q 激光选择性破坏黑色素细胞、减少黑色素生成有关。

参考文献:

- [1] TAMEGA A A, MIOT L D, BONFIETTI C, et al. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in brazilian women[J]. Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology, 2013, 27(2): 151-156.
- [2] AZZAM O A, LEHETA T M, NAGUI N A, et al. Different therapeutic modalities for treatment of melasma[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2009, 8(4):275-281.
- [3] SHETH V M, PANDYA A G. Melasma: a comprehensive update[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2011, 65(4): 689-697.
- [4] 杨鹏, 杨慧兰, 麦跃, 等. 慢性应激抑郁型黄褐斑动物模型建立与现有模型的比较研究 [J]. 中国美容医学, 2013, 22(3): 349-354.

- [5] 过伟峰, 徐立, 项晓人, 等. 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(2): 49-51.
- [6] LANDAU M. Chemical peels[J]. Clinics in Dermatology, 2008, 26(2): 200-208.
- [7] LEE A. Recent progress in melasma pathogenesis[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2015, 28(6): 648-660.
- [8] 何施逸, 邓志博, 王乾力, 等. 低强度超声辐照联合氢醌乳膏对 SD 大鼠黄褐斑模型的疗效观察 [J]. 临床超声医学杂志, 2017, 19(9): 584-588.
- [9] PARKER J, KLEIN S L, MCCLINTOCK M K, et al. Oral extract decreases ultraviolet-induced damage of human skin[J]. Retour Au Numéro, 2004, 51(6): 910-918.
- [10] 刘冬梅, 高进, 朱林学, 等. 400 例黄褐斑患者发病因素分析 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(4): 303-304.
- [11] 苑光军, 姜醒, 刘斌, 等. 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): 81-82.
- [12] HURLEY M E, GUEVARA I L, GONZALES R M, et al. Efficacy of glycolic acid peels in the treatment of melasma[J]. Archives of Dermatology, 2002, 138(12): 1578-1582.
- [13] 黄惠真, 李伟, 胡丽, 等. Q 开关 1064 nm 激光联合氨甲环酸治疗黄褐斑临床观察 [J]. 中国美容医学, 2015(11): 52-56.
- [14] KIM J Y, CHOI M, CHAN H N, et al. Treatment of melasma with the photoacoustic twin pulse mode of low-fluence 1064 nm Q-Switched Nd: YAG Laser[J]. Annals of Dermatology, 2016, 28(3): 290-294.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 贾晓敏, 陈伟, 谭文, 等. 果酸联合调 q 激光治疗中波紫外线诱导黄褐斑鼠模型的实验研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(11): 16-21.