

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research蛇床子素调节 Wnt/ β -catenin 信号通路对
白癜风小鼠黑素细胞丢失的研究Research of osthol on melanocyte loss in vitiligo mice by regulating
the Wnt/ β -catenin signaling pathway

许丛丛, 刘 莎, 李 君

(南阳市第一人民医院 皮肤科, 河南 南阳
473400)XU Cong-cong, LIU Sha,
LI Jun(Department of Dermatology, Nanyang
First People's Hospital, Nanyang
473400, Henan Province, China)

摘要:目的 探讨蛇床子素(Ost)调节 Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路对白癜风小鼠黑素细胞丢失的作用。方法 通过涂抹氢醌乳膏建立白癜风小鼠模型,将建模成功的小鼠分为模型组(仅建模)、低剂量实验组($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ost)、高剂量实验组($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ost)、阳性对照组($50.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 白癜风胶囊)和抑制剂组($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ost + $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XAV939),对照组给等体积生理盐水,每组 10 只。干预结束后,对治疗区域皮肤脱色程度进行评分;收集眼眶血液,用酶联免疫吸附试验法检测血清中丙二醛(MDA)、 α -黑色素细胞刺激素(α -MSH)、酪氨酸酶(TYR)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平;收集皮损组织,用苏木精伊红(HE)及马松染色法评估黑色素毛囊数和基底层黑素细胞数;用免疫组化法检测皮损组织中酪氨酸酶相关蛋白(TRP)1 和 TRP2 阳性表达水平;用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测皮损组织中的酪氨酸酶(TYR)和小眼症相关转录调节因子(MITF)mRNA 表达水平;用蛋白质印迹法检测 β -catenin 和磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (p-GSK-3 β)/GSK-3 β 蛋白表达。结果 对照组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、阳性对照组和抑制剂组的脱色评分分别为(0 ± 0)、(4.11 ± 0.52)、(2.41 ± 0.28)、(0.77 ± 0.09)、(0.55 ± 0.07)和(2.55 ± 0.28)分; α -MSH 水平分别为(26.53 ± 2.84)、(7.56 ± 0.84)、(12.62 ± 1.36)、(22.91 ± 2.44)、(23.51 ± 2.48)和(13.05 ± 1.38) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;MDA 水平分别为(2.05 ± 0.24)、(7.94 ± 0.85)、(4.31 ± 0.49)、(2.27 ± 0.25)、(2.19 ± 0.24)和(4.28 ± 0.45) $\text{nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1}$;TNF- α 水平分别为(38.52 ± 4.02)、(105.65 ± 10.94)、(68.84 ± 7.05)、(42.84 ± 4.45)、(41.85 ± 4.37)和(70.05 ± 7.21) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;TYR 水平分别为(105.62 ± 11.14)、(45.22 ± 4.67)、(65.41 ± 6.77)、(98.62 ± 9.98)、(97.65 ± 9.89)和(66.08 ± 6.81) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;基底层黑素细胞数量分别为(148.62 ± 15.08)、(52.11 ± 5.34)、(68.84 ± 6.91)、(108.64 ± 11.14)、(112.08 ± 11.44)和(70.54 ± 7.21)个;黑色素毛囊数分别为(98.64 ± 9.98)、(41.52 ± 4.31)、(62.05 ± 6.37)、(95.62 ± 9.74)、(96.05 ± 9.78)和(61.08 ± 6.29)个;TRP1 阳性表达水平分别为 17.05 ± 1.94 、 4.62 ± 0.77 、 8.05 ± 0.85 、 14.98 ± 1.58 、 15.22 ± 1.64 和 8.11 ± 0.88 ;TRP2 阳性表达水平分别为 14.32 ± 1.55 、 3.05 ± 0.33 、 5.74 ± 0.66 、 10.42 ± 1.15 、 11.05 ± 1.17 和 6.05 ± 0.62 ;TYR mRNA 相对表达水平分别为 1.09 ± 0.12 、 0.19 ± 0.02 、 0.49 ± 0.05 、 0.79 ± 0.08 、 0.88 ± 0.09 和 0.55 ± 0.07 ;MITF mRNA 相对表达水平分别为 0.98 ± 0.11 、 0.24 ± 0.03 、 0.44 ± 0.05 、 0.81 ± 0.09 、 0.85 ± 0.10 和 0.51 ± 0.06 ; β -catenin 相对表达水平分别为 1.25 ± 0.13 、 0.34 ± 0.05 、 0.68 ± 0.08 、 1.07 ± 0.11 、 1.11 ± 0.12 和 0.71 ± 0.09 ;p-GSK-3 β /GSK-3 β 相对表达水平分别为 0.85 ± 0.09 、 0.22 ± 0.03 、 0.44 ± 0.06 、 0.71 ± 0.08 、 0.79 ± 0.09 和 0.42 ± 0.05 ,模型组和对照组比较,低、高剂量实验组和模型组比较,抑制剂组与高剂量实验组比较,上述指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 Ost 通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路减少

基金项目:河南省医学科技攻关计划基金资助
项目(2023ZY3055)作者简介:许丛丛(1990-),女,主治医师,
主要从事皮肤相关研究工作

通信作者:许丛丛

MP:15238125167

E-mail:nhbea9@163.com

白癜风小鼠黑素细胞丢失。

关键词:蛇床子素; Wnt/ β -连环蛋白信号通路; 白癜风; 黑素细胞

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.09.016

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A

文章编号:1001-6821(2026)09-1301-07

Abstract: Objective To discuss the effects of osthol (Ost) on melanocyte loss in vitiligo mice by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** A mouse model of vitiligo was established by applying hydroquinone cream. The successfully modeled mice were divided into model group (only modeling), low-dose experimental group ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ost), high-dose experimental group ($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ost), positive control group ($50.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ vitiligo capsules) and inhibitor group ($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ost + $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XAV939). The control group was given an equal volume of normal saline. Each group consisted of 10 mice. After the intervention, the degree of skin depigmentation in the treatment area was scored; orbital blood was collected, and the levels of malondialdehyde (MDA), α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), tyrosinase (TYR) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); skin lesion tissues were collected, and the number of melanin-containing hair follicles and melanocytes in the basal layer were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining; the positive expression levels of tyrosinase-related protein (TRP) 1 and TRP2 in the skin lesion tissues was detected by immunohistochemistry; the mRNA expression levels of tyrosinase (TYR) and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) mRNA in the skin lesion tissues were detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR); the protein expression levels of β -catenin and phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β (p-GSK-3 β)/GSK-3 β in the skin lesion tissues were detected by Western blotting. **Results** The depigmentation scores of control group, model group, low-dose experimental group, high-dose experimental group, positive control group and inhibitor group were (0 ± 0), (4.11 ± 0.52), (2.41 ± 0.28), (0.77 ± 0.09), (0.55 ± 0.07) and (2.55 ± 0.28) score, respectively; the levels of α -MSH were (26.53 ± 2.84), (7.56 ± 0.84), (12.62 ± 1.36), (22.91 ± 2.44), (23.51 ± 2.48) and (13.05 ± 1.38) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the levels of MDA were (2.05 ± 0.24), (7.94 ± 0.85), (4.31 ± 0.49), (2.27 ± 0.25), (2.19 ± 0.24) and (4.28 ± 0.45) $\text{nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1}$, respectively; the levels of TNF- α were (38.52 ± 4.02), (105.65 ± 10.94), (68.84 ± 7.05), (42.84 ± 4.45), (41.85 ± 4.37) and (70.05 ± 7.21) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the levels of TYR were (105.62 ± 11.14), (45.22 ± 4.67), (65.41 ± 6.77), (98.62 ± 9.98), (97.65 ± 9.89) and (66.08 ± 6.81) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the numbers of melanocytes in the basal layer were (148.62 ± 15.08), (52.11 ± 5.34), (68.84 ± 6.91), (108.64 ± 11.14), (112.08 ± 11.44) and (70.54 ± 7.21) cells, respectively; the numbers of melanin-containing hair follicles were (98.64 ± 9.98), (41.52 ± 4.31), (62.05 ± 6.37), (95.62 ± 9.74), (96.05 ± 9.78) and (61.08 ± 6.29) cells, respectively; the positive expression levels of TRP1 were 17.05 ± 1.94 , 4.62 ± 0.77 , 8.05 ± 0.85 , 14.98 ± 1.58 , 15.22 ± 1.64 and 8.11 ± 0.88 , respectively; the positive expressions levels of TRP2 were 14.32 ± 1.55 , 3.05 ± 0.33 , 5.74 ± 0.66 , 10.42 ± 1.15 , 11.05 ± 1.17 and 6.05 ± 0.62 , respectively; the relative expression levels of TYR mRNA were 1.09 ± 0.12 , 0.19 ± 0.02 , 0.49 ± 0.05 , 0.79 ± 0.08 , 0.88 ± 0.09 and 0.55 ± 0.07 , respectively; the relative expression levels of MITF mRNA were 0.98 ± 0.11 , 0.24 ± 0.03 , 0.44 ± 0.05 , 0.81 ± 0.09 , 0.85 ± 0.10 and 0.51 ± 0.06 , respectively; the relative expression levels of β -catenin were 1.25 ± 0.13 , 0.34 ± 0.05 , 0.68 ± 0.08 , 1.07 ± 0.11 , 1.11 ± 0.12 and 0.71 ± 0.09 , respectively; the relative expression levels of p-GSK-3 β /GSK-3 β were 0.85 ± 0.09 , 0.22 ± 0.03 , 0.44 ± 0.06 , 0.71 ± 0.08 , 0.79 ± 0.09 and 0.42 ± 0.05 , respectively. There were statistically significant differences between model group and control group, between low, high dose experimental group and model group, and between inhibitor group and high-dose experimental group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Ost reduces melanocyte loss in vitiligo mice by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: osthol; Wnt/ β -catenin signaling pathway; vitiligo; melanocyte

白癜风是一种慢性皮肤色素脱失疾病,因黑色素细胞功能异常或黑色素生成途径受干扰,导致皮肤色素沉着斑块丧失,严重影响患者社会心理状态,目前,治疗方法有限^[1]。研究表明,炎性反应及氧化应激可以导致黑色素细胞丢失,而该细胞丢失是白癜风发展的关键环节,因此减轻其丢失是治疗核心^[2]。蛇床子素(osthol, Ost)是传统中药蛇床子中的关键成分,药理作用广泛,如免疫调节、抗炎、抗氧化等, Ost 可以缓解皮肤损伤和慢性瘙痒^[3],但其在治疗白癜风中仍需进一步研究。Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)是调控细胞功能的关键通路,在皮肤发育、色素形成及白癜风发病中起重要作用,已有研究证实,该通路在白癜风中呈下调状态,激活其信号传导可以减少黑素细胞丢失、抑制疾病进展^[4]。本研究通过建立白癜风小鼠模型,旨在探索 Ost 对其影响及潜在作用,以期白癜风的临床治疗提供参考。

材料与方法

1 材料

动物 65 只雄性 C57BL/6 小鼠,6 周龄,体质量 20~22 g,均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2019-0009,使用许可证号:SYXK(京)2025-0074。所有小鼠均饲养在标准动物实验室中。本实验经南阳市第一人民医院动物伦理委员会批准,伦理批号:【2024】伦审研临第(089)号。

药品与试剂 Ost,规格:每支 20 mg,纯度:HPLC $\geq 98\%$,批号:YJ20240315,上海雅吉生物科技有限公司生产;氢醌,规格:每瓶 1 g,纯度: $>99.0\%$,批号:H0186202402,日本东京化成工业株式会社生产;白癜风胶囊,规格:每粒 0.45 g,批号:YNK20240122,批准文号:国药准字 Z20054024,长春银诺克药业有限公司生产;Wnt/ β -catenin 抑制剂-XAV939,规格:每支 10 mg,纯度: $\geq 98\%$,批号:XP20240408,上海逍鹏生物科技有限公司生产;酪氨酸酶相关蛋白(tyrosinase related protein, TRP)1、TRP2、 β -catenin、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、p-GSK-3 β 抗体,均由英国 Abcam 公司生产;酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒,均由上海酶研生物科技有限公司生产; α -黑色素细胞刺激素(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH)试剂盒,湖北武汉益普生物科技有限公司生产。

仪器 DS-11 紫外分光光度计,美国 DeNovix 公司产品;IX2-ILL30 光学显微镜,日本奥林巴斯公司产品;Multiskan FC 酶标仪,上海腾名生物科技有限公司产品。

2 实验方法

2.1 白癜风小鼠模型的制备^[5]

随机选取 10 只小鼠设为对照组,剩余 55 只构建白癜风模型,统一剔除小鼠背部 2 cm $\times$ 2 cm 区域毛发,模型区涂抹 100 mg $\cdot$ kg⁻¹ 的 2.5% 氢醌乳膏,对照组同部位涂抹蒸馏水,每日 2 次,连续干预 60 d,以皮肤发白、毛发变白为造模标准,造模成功率 91%。

2.2 动物分组与处理方法

将造模成功的小鼠随机分为模型组、低、高剂量实验组、抑制剂组和阳性对照组,每组 10 只,抑制剂组腹腔注射 45 mg $\cdot$ kg⁻¹ Ost,随后尾静脉注射 10 mg $\cdot$ kg⁻¹ XAV939^[6],每天 1 次,连续 3 周;低、高剂量实验组分别腹腔注射 15、45 mg $\cdot$ kg⁻¹ Ost^[7],每天 1 次,给药 3 周;阳性对照组灌胃 50.4 mg $\cdot$ mL⁻¹ 白癜风胶囊药液^[8],每天 1 次,给药 3 周;模型组和对照组分别以等体积生理盐水干预,每天 1 次,干预 3 周。

2.3 脱色评分法评估皮损损伤程度^[5]

治疗结束后,对小鼠治疗区域皮肤脱色程度进行评分。0 分表示无脱色情况;1 分表示脱色区域小于 10%;2 分表示脱色区域 11%~25%,3 分表示脱色区域 26%~50%,4 分表示脱色区域 51%~75%,5 分表示色素脱失超过 75%。

2.4 酶联免疫吸附试验法检测血清中 α -MSH、MDA、TYR 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平^[2]

小鼠脱色评分完成后,固定小鼠体位,经眼眶取血并收集全血样本。严格按照对应试剂盒说明书操作步骤,逐步加样、温育与显色,用酶联免疫吸附试验法定量检测血清中 α -MSH、MDA、TNF- α 及 TYR 的水平。

2.5 苏木精伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法评估黑色素毛囊^[5]

分离小鼠脱色区域皮肤组织,立即置于 4% 缓冲多聚甲醛溶液中固定。固定完成后,依次经 75%、85%、95%、100% 梯度乙醇逐级脱水,二甲苯透明处理,随后浸入石蜡浸透并完成组织包埋。用石蜡切片机连续切片,厚度控制为 5 μ m,贴片烘干后常规脱蜡至水。严格按照标准流程进行 HE 染色、脱水透明及中性树胶封片,用光学显微镜观察组织病理形态,镜下随机选取视野,计数并统计含黑色素毛囊数量。

2.6 马松染色法评估基底层黑素细胞^[5]

制备石蜡切片,将组织切片常规脱蜡至水洗,滴加Fontana 氨银染液,室温避光孵育反应,弃去染液后蒸馏水轻柔漂洗;再加入海波溶液避光浸染,充分沉淀显色。用光学显微镜随机选取10个视野观察,镜下基底层棕褐色阳性着色即为黑素细胞,统一放大倍数拍照,计数并计算各组黑素细胞平均数量。

2.7 免疫组化法检测皮损组织中 TRP1 和 TRP2 阳性表达水平^[9]

从石蜡包埋的组织中切割出连续切片,随后在二甲苯和分级醇系列中进行脱蜡和再水化用3% Triton X-100 处理组织,增强抗原暴露。室温封闭非特异性位点,滴加 TRP1(1:100)和小眼症相关转录调节因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)(1:500)一抗,在4℃条件下避光孵育过夜。次日,充分洗涤后加入对应二抗室温孵育,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,复染后封片,其阳性表达水平用 Image J 软件测定。

2.8 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)法检测皮损组织中 TYR 和 MITF mRNA 表达^[9]

TRIzol 试剂分离总 RNA 并定量,取高质量总 RNA 2 μg,参照 SuperScript III cDNA 合成试剂盒说明书完成逆转录,合成互补 cDNA。以 β -actin 为内参基因,配置 SYBR Green 荧光定量反应体系,于 CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪中扩增,反应结束后分析熔解曲线,用相对定量法计算各组目标基因 mRNA 的相对表达水平。其中 TYR 正向引物 5'-CCTCATGGACAAAGACGACTAC-3',反向引物 5'-CCTTTCAGTCCCCTCTGTTT-3'; MITF 正向引物 5'-GAAACCTTGCTATGCTGGAAATG-3',反向引物 5'-GAGCTTGCTGTATGTGGTACTT-3'; β -actin 正向引物 5'-GAGGTATCCTGACCCTGAAGTA-3',反向引物 5'-CACACGCAGCTCATTGTAGA-3'。

2.9 蛋白质印迹法检测 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达^[5]

RIPA 裂解缓冲液裂解皮损组织,离心分离总蛋白并进行蛋白质定量。将总蛋白 25 μg 上样到 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶上,通过电泳分离蛋白质后进行转膜、封闭,免疫印迹使用以下抗体: β -catenin

(1:500)、p-GSK-3 β (1:500)、GSK-3 β (1:1 000),在4℃下孵育过夜,洗膜后,与二抗孵育1h。用化学发光法检测进行膜成像,并在化学发光凝胶成像系统中进行曝光,用 Image J 软件分析图像。

3 统计学处理

用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间用单因素方差分析比较,进一步比较用 *snk-q* 检验。

结 果

1 Ost 减轻各组小鼠脱色状况

对照组、模型组、低、高剂量实验组、阳性对照组和抑制剂组脱色评分分别为(0±0)、(4.11±0.52)、(2.41±0.28)、(0.77±0.09)、(0.55±0.07)和(2.55±0.28)分,模型组与对照组比较,低、高剂量实验组与模型组比较,抑制剂组与高剂量实验组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2 Ost 对各组小鼠血清中 α -MSH、MDA、TNF- α 和 TYR 水平的影响

与对照组相比,模型组的 MDA 和 TNF- α 水平均显著增加(均 $P < 0.05$), α -MSH 和 TYR 水平均显著降低(均 $P < 0.05$);与模型组相比,低、高剂量实验组和阳性对照组的 MDA 和 TNF- α 水平均显著降低(均 $P < 0.05$), α -MSH 和 TYR 水平均显著升高(均 $P < 0.05$);与高剂量实验组相比,抑制剂组的 MDA 和 TNF- α 水平均显著增加(均 $P < 0.05$), α -MSH 和 TYR 水平均显著降低(均 $P < 0.05$),见表1。

3 Ost 对各组小鼠皮损组织中黑色素毛囊数、基底层黑素细胞数量及 TRP1 和 TRP2 表达的影响

与对照组相比,模型组的黑色素毛囊数、基底层黑素细胞数、TRP1 和 TRP2 阳性表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$),与模型组相比,低、高剂量实验组和阳性对照组的黑色素毛囊数、基底层黑素细胞数、TRP1 和 TRP2 阳性表达水平均显著增加(均 $P < 0.05$);与高剂量实验组相比,抑制剂组的黑色素毛囊数、基底层黑素细胞数、TRP1 和 TRP2 阳性表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$),见图1、图2和表2。

4 Ost 对各组小鼠皮损组织中 TYR、MITF mRNA 和 β -catenin、p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组的 TYR mRNA、MITF mRNA、 β -catenin 和 p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$);与模型组相

比,低、高剂量实验组和阳性对照组的 *TYR* mRNA、*MITF* mRNA、 β -catenin 和 p-GSK-3 β /GSK-3 β 相对表达水平均显著增加(均 $P < 0.05$);与高剂量实

验组相比,抑制剂组的 *TYR* mRNA、*MITF* mRNA、 β -catenin 和 p-GSK-3 β /GSK-3 β 相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$),见表3和图3。

表1 各组小鼠 α -黑色素细胞刺激素(α -MSH)、丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和酪氨酸酶(TYR)水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the levels of α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH), malondialdehyde(MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and tyrosinase(TYR) in each group of mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	α -MSH($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	MDA($\text{nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	TNF- α ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TYR($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
Control	10	26.53 $\pm$ 2.84	2.05 $\pm$ 0.24	38.52 $\pm$ 4.02	105.62 $\pm$ 11.14
Model	10	7.56 $\pm$ 0.84 *	7.94 $\pm$ 0.85 *	105.65 $\pm$ 10.94 *	45.22 $\pm$ 4.67 *
Experimental-L	10	12.62 $\pm$ 1.36 [#]	4.31 $\pm$ 0.49 [#]	68.84 $\pm$ 7.05 [#]	65.41 $\pm$ 6.77 [#]
Experimental-H	10	22.91 $\pm$ 2.44 ^{#Δ}	2.27 $\pm$ 0.25 ^{#Δ}	42.84 $\pm$ 4.45 ^{#Δ}	98.62 $\pm$ 9.98 ^{#Δ}
Positive control	10	23.51 $\pm$ 2.48 ^{#Δ}	2.19 $\pm$ 0.24 ^{#Δ}	41.85 $\pm$ 4.37 ^{#Δ}	97.65 $\pm$ 9.89 ^{#Δ}
Inhibitor	10	13.05 $\pm$ 1.38 [▲]	4.28 $\pm$ 0.45 [▲]	70.05 $\pm$ 7.21 [▲]	66.08 $\pm$ 6.81 [▲]

Control group: Saline; Model group: Modeling + saline; Experimental-L group: 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ost; Experimental-H group: 45 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ost; Positive control group: 50.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ vitiligo capsule; Inhibitor group: 45 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ost + 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XAV939; Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$; Compared with experimental-L group group, ^{Δ} $P < 0.05$; Compared with experimental-H group, [▲] $P < 0.05$.

表2 各组小鼠黑色素毛囊数、基底层黑色素细胞数量、酪氨酸酶相关蛋白(TRP)1和TRP2阳性表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the number of melanin-containing hair follicles, the number of melanocytes in the basal layer and the positive expression levels of tyrosinase related protein(TRP1) and TRP2 in each group of mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Number of melanin-containing hair follicles	Number of melanocytes in the lower layer	TRP1	TRP2
Control	10	148.62 $\pm$ 15.08	98.64 $\pm$ 9.98	17.05 $\pm$ 1.94	14.32 $\pm$ 1.55
Model	10	52.11 $\pm$ 5.34 *	41.52 $\pm$ 4.31 *	4.62 $\pm$ 4.77 *	3.05 $\pm$ 0.33 *
Experimental-L	10	68.84 $\pm$ 6.91 [#]	62.05 $\pm$ 6.37 [#]	8.05 $\pm$ 0.85 [#]	5.74 $\pm$ 0.66 [#]
Experimental-H	10	108.64 $\pm$ 11.14 ^{#Δ^c}	95.62 $\pm$ 9.74 ^{#Δ}	14.98 $\pm$ 1.58 ^{#Δ}	10.42 $\pm$ 1.15 ^{#Δ}
Positive control	10	112.08 $\pm$ 11.44 ^{#Δ^c}	96.05 $\pm$ 9.78 ^{#Δ}	15.22 $\pm$ 1.64 ^{#Δ}	11.05 $\pm$ 1.17 ^{#Δ}
Inhibitor	10	70.54 $\pm$ 7.21 [▲]	61.08 $\pm$ 6.29 [▲]	8.11 $\pm$ 0.88 [▲]	6.05 $\pm$ 0.62 [▲]

Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$; Compared with experimental-L group group, ^{Δ} $P < 0.05$; Compared with experimental-H group, [▲] $P < 0.05$.

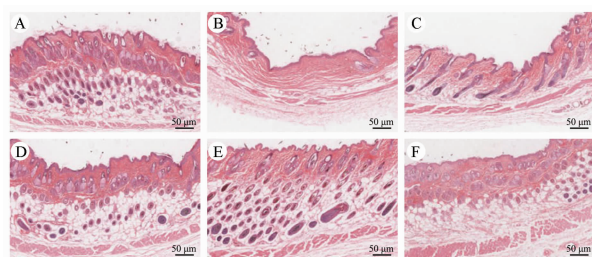


图1 用苏木精伊红(HE)染色法观察皮损组织中黑色素毛囊数变化($\times 200$)

Figure 1 Changes in the number of melanin-containing hair follicles in the lesion tissue observed by hematoxylin-eosin(HE) staining ($\times 200$)

A: Control group; B: Model group; C: Experimental-L group; D: Experimental-H group; E: Positive control group; F: Inhibitor group.

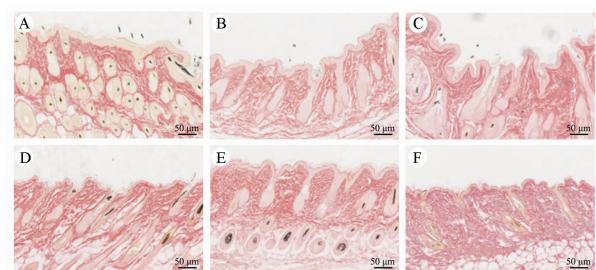


图2 用马松染色法观察皮损组织中底层黑色素细胞数变化($\times 200$)

Figure 2 Changes in the number of melanocytes in the lower layer of the lesion tissue observed by Masson staining ($\times 200$)

A: Control group; B: Model group; C: Experimental-L group; D: Experimental-H group; E: Positive control group; F: Inhibitor group.

表3 各组小鼠酪氨酸酶(*TYR*) mRNA、小眼症相关转录调节因子(*MITF*) mRNA、 β -连环蛋白(β -catenin)和磷酸化(p-)糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)/GSK-3 β 相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the relative expression levels of tyrosinase (*TYR*) mRNA, microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*) mRNA, β -catenin and phosphorylation(p-) glycogen synthase kinase(GSK-3 β)/GSK-3 β ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	<i>TYR</i> mRNA	<i>MITF</i> mRNA	β -catenin/ β -actin	GSK-3 β / β -actin
Control	10	1.09 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.11	1.25 $\pm$ 0.13	0.85 $\pm$ 0.09
Model	10	0.19 $\pm$ 0.02 *	0.24 $\pm$ 0.03 *	0.34 $\pm$ 0.05 *	0.22 $\pm$ 0.03 *
Experimental-L	10	0.49 $\pm$ 0.05 #	0.44 $\pm$ 0.05 #	0.68 $\pm$ 0.08 #	0.44 $\pm$ 0.06 #
Experimental-H	10	0.79 $\pm$ 0.08 # Δ	0.81 $\pm$ 0.09 # Δ	1.07 $\pm$ 0.11 # Δ	0.71 $\pm$ 0.08 # Δ
Positive control	10	0.88 $\pm$ 0.09 # Δ	0.85 $\pm$ 0.10 # Δ	1.11 $\pm$ 0.12 # Δ	0.79 $\pm$ 0.09 # Δ
Inhibitor	10	0.55 $\pm$ 0.07 $\blacktriangle$	0.51 $\pm$ 0.06 $\blacktriangle$	0.71 $\pm$ 0.09 $\blacktriangle$	0.42 $\pm$ 0.05 $\blacktriangle$

Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with experimental-L group group, $\Delta P < 0.05$; Compared with experimental-H group, $\blacktriangle P < 0.05$.

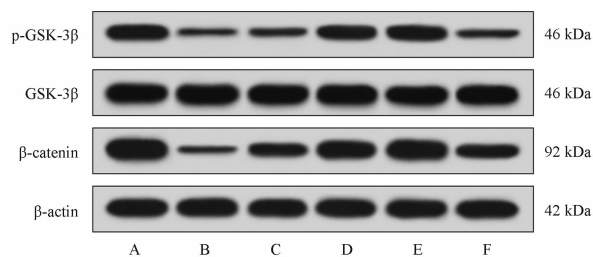


图3 用蛋白质印迹法检测组织中 β -catenin、p-GSK-3 β 和GSK-3 β 蛋白相对表达水平

Figure 3 The relative expression levels of β -catenin, p-GSK-3 β and GSK-3 β proteins in the tissue detected by Western blot

A: Control group; B: Model group; C: Experimental-L group; D: Experimental-H group; E: Positive control group; F: Inhibitor group.

讨 论

白癜风全球发病率约为0.5%~1%,是易诊断但难治疗的皮肤病之一,其特点为缓解期短、耐药性高、复发迅速,最常用的药物可能会引起较大的药物不良反应^[10],因此仍需探究其治疗方法。

白癜风涉及多种致病机制,包括遗传变化、氧化应激、环境诱因、炎症以及异常的免疫反应,这些都会导致黑素细胞破坏,而黑素细胞将含有黑色素的黑色素体转移到周围的角质形成细胞,实现黑色素在表皮层的沉积,这一过程对维持正常皮肤色素沉着至关重要,色素沉着异常通常由黑素细胞数量丢失所致^[11-12]。已有研究表明,白癜风中黑素细胞损伤与炎症反应及氧化应激息息相关,过高的氧化应激标志物如MDA可以导致患者表皮中过氧化氢水平增加,参与黑素细胞凋亡;过高的炎症因子水平导致细胞损

伤,加速病情发展^[2,9]。本研究同样表明,炎症反应及氧化应激可能影响黑素细胞丢失,促进白癜风发展。黑色素生成是极其复杂的过程,受TYR、TRP1和TRP2控制,3者受MITF调节,介导黑色素细胞增殖和黑色素生成; α -MSH可以促进黑色素生成,反映黑素细胞功能^[7,13]。本研究发现,白癜风小鼠血清 α -MSH和TYR水平均显著降低,皮损组织中TRP1、TRP2和MITF表达均显著下调,与上述研究结论一致。Ost是一种香豆素衍生物,存在于多种药用植物中,常用于改善皮肤损伤^[14],由于其广泛的药理作用^[15],推测其可能通过抗炎、抗氧化应激减少黑素细胞丢失,缓解白癜风发展。本研究显示,Ost治疗后,显著降低了血清中MDA和TNF- α 水平,减少了黑素细胞丢失,减轻黑素细胞功能受损,改善了白癜风症状,且各种指标与阳性药白癜风胶囊达到同一水平,提示其可能用于治疗白癜风,进一步说明Ost具备治疗白癜风的潜在价值。

作为组织稳态、发育和再生的重要调节因子,Wnt/ β -catenin信号通路起关键作用, β -catenin和GSK-3 β 是胞内信号分子,GSK-3 β 的活性变化可能导致 β -catenin降解复合物解离,进而影响 β -catenin的胞内稳定性与核转位,该通路的失调与许多健康状况密切相关,包括皮肤相关疾病,恢复该信号通路可能为相关疾病提供潜在治疗策略^[16-17],其中,该通路与白癜风的关联已得到国内外学者的广泛关注,ZOU等^[18]研究明确提出,激活Wnt/ β -catenin信号转导可以促进 β -catenin胞内积累,进而上调MITF基因表达,通过调控其下游TYR、TRP1和TRP2表达,参与黑色素合成全过程,最终改善白癜风病情,这一结论为白癜风的机制研究及治疗靶点筛选提供了重要依据。本研究同样发现,Wnt/ β -catenin失调

可能导致 *MITF* 及其下游基因表达不足,黑素细胞功能减退,但经 Ost 治疗后, p -GSK-3 β /GSK-3 β 、 β -catenin表达均显著上调,黑素细胞功能得到改善,推测 Ost 在白癜风中的治疗机制可能与激活 Wnt/ β -catenin通路有关。随后通过 Wnt/ β -catenin通路抑制剂-XAV939 验证,发现 XAV939 逆转了 Ost 在白癜风中的治疗作用,表明 Ost 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 通路减少黑素细胞丢失,恢复其功能作用。

本研究提示,Ost 可以减少白癜风小鼠中的炎症及氧化应激引发的黑素细胞丢失,恢复黑素细胞功能,改善白癜风症状,其机制可能与激活 Wnt/ β -catenin通路有关,后续研究中将针对性补充 β -catenin 核质分布、核内蛋白表达及下游靶基因检测,完善上下游调控关系与核转录激活机制,进一步系统阐明蛇床子素作用于白癜风的分子靶点与完整信号调控网络。

参考文献:

- [1] XIE Y, CHEN Z, WU Z. Four-octyl itaconate attenuates UVB-induced melanocytes and keratinocytes apoptosis by Nrf2 activation-dependent ROS inhibition[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022(1):9897442—9897454.
- [2] 王佳新,刘娟,王雅慧,等. 复方菝葜丹参擦剂调控 JAK-STAT信号通路对白癜风症状的影响[J]. 贵州医学大学学报, 2025, 50(4):555—563.
- [3] HU X, ZHOU Y, SHI J, et al. Osthole relieves skin damage and inhibits chronic itch through modulation of Akt/ZO-3 pathway in atopic dermatitis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 947(1):175649—175658.
- [4] LIN X, MENG X, LIN J. The possible role of Wnt/ β -catenin signalling in vitiligo treatment[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2023, 37(11):2208—2221.
- [5] 叶峻宏,韩宪伟,吕雯,等. 苦参碱调控 Sirt1/AMPK 自噬通路减少白癜风小鼠黑素细胞丢失的机制研究[J]. 中药材, 2022, 45(11):2749—2754.
- [6] 张璟璐,吴一平,周文字,等. 鸢尾素通过上调Wnt/ β -catenin通路对肌少症小鼠的保护作用[J]. 中南医学科学杂志, 2024, 52(4):529—533.
- [7] 陈姣蓉,洪小平,段妍君,等. 蛇床子素对特异性皮炎小鼠皮肤屏障及慢性瘙痒的作用[J]. 中成药, 2021, 43(12):3489—3492.
- [8] 王解,彭子辉,王润和,等. 紫草素对白癜风小鼠黑素细胞功能的影响[J]. 中成药, 2023, 45(10):3452—3456.
- [9] 吴云莎,张星星,王海丹,等. 如意黑白散对白癜风模型小鼠皮损组织 PD-1/PD-L1 信号通路的影响[J]. 中医杂志, 2024, 65(5):512—519.
- [10] PENG L, LU Y, GU Y, et al. Mechanisms of action of lycium barbarum polysaccharide in protecting against vitiligo mice through modulation of the STAT3-Hsp70-CXCL9/CXCL10 pathway[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1):281—287.
- [11] MOON S Y, AKTER K M, AHN M J, et al. Fraxinol stimulates melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells through CREB/MITF signaling[J]. *Molecules*, 2022, 27(5):1549—1561.
- [12] LUO S, MENG X, AI J, et al. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation alleviates monobenzone-induced vitiligo in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6):3411—3425.
- [13] ZANG D, NIU C, LU X, et al. A novel furocoumarin derivative, 5-((diethylamino)me-13-thyl)-3-phenyl-7H-furo[3,2-g].chromen-7-one upregulates melanin synthesis via the activation of cAMP/PKA and MAPKs signal pathway: *In vitro* and *in vivo* study[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22):14190—14207.
- [14] HE S, LIANG X, CHEN W, et al. Osthole ameliorates chronic pruritus in 2,4-dichloronitrobenzene-induced atopic dermatitis by inhibiting IL-31 production[J]. *Chin Herb Med*, 2024, 17(2):368—379.
- [15] 高海运,申立静,刘海容,等. 蛇床子素对急性胰腺炎模型大鼠的治疗作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(3):403—407.
- [16] SHIN J Y, KIM J, CHOI Y H, et al. Escin activates canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway by facilitating the proteasomal degradation of glycogen synthase kinase-3 β in cultured human dermal papilla cells[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45(7):5902—5913.
- [17] KURIAKOSE B B. Beyond skin deep: Exploring the complex molecular mechanisms and holistic management strategies of vitiligo[J]. *Arch Dermatol Res*, 2025, 317(1):685—694.
- [18] ZOU D P, CHEN Y M, ZHANG L Z, et al. SFRP5 inhibits melanin synthesis of melanocytes in vitiligo by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Genes Dis*, 2020, 8(5):677—688.

(本文编辑:马凌云 投稿日期 2025-08-27)