

·基础研究·

岭南火针通过调控 Hippo-YAP 信号通路抑制白癜风模型小鼠黑素细胞凋亡

李晶晶¹, 曾婧纯², 梁雪松³, 张瑜¹, 阎路达¹, 林诗雨², 林国华², 周鹏¹

(1. 广州中医药大学附属宝安中医院//广州中医药大学第七临床医学院, 广东 深圳 518133; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 3. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】基于 Hippo-YAP 信号通路探讨岭南火针对氢醌诱导的氧化应激后白癜风模型的影响。【方法】将 C57BL/6 小鼠随机分为空白对照组 (Control)、模型对照组 (HQ)、HQ+卤米松组 (Halometasone)、HQ+岭南火针组 (FA), 每组 8 只。采用氢醌 (HQ) 建立白癜风模型。通过脱色评分、HE 染色、Masson-Fontana 法观察皮肤病理学改变; ELISA 法检测各组血浆酪氨酸酶 (TYR)、丙二醛 (MDA) 含量及血清单胺氧化酶 (MAO) 活性; Western-blot 检测皮肤组织 YAP1、TP73 蛋白表达量; PCR 法检测 *Yap1*、*Tp73* 表达水平。【结果】与 Control 组相比, 造模后, 小鼠表皮层和真皮层明显增厚, 含黑素细胞毛囊数、基底层黑素细胞数、含黑素颗粒表皮细胞数明显减少, 脱色评分明显提高, TYR 水平下降, MDA、MAO 水平上升, *Yap1*、*Tp73* 低表达 ($P < 0.01$)。经过 4 周治疗后, Halometasone 组、FA 组真皮层变薄, 皮肤脱色评分下降, 黑素细胞毛囊数、基底层黑素细胞数、含黑素颗粒表皮细胞数增加 ($P < 0.05$), 两个治疗组 TYR 水平与 HQ 组相比显著升高 ($P < 0.01$), MDA 含量与 HQ 组相比显著下降 ($P < 0.01$), FA 组 MAO 活性值与 HQ 组相比下调 ($P < 0.05$)。FA 组 *Yap1* 和 *Tp73* 表达与 HQ 组相比明显上调 ($P < 0.01$), 且趋势强于 Halometasone 组 ($P < 0.05$)。【结论】岭南火针可能通过激活 Hippo-YAP 通路保护黑素细胞免受氢醌诱导的氧化应激损伤, 降低氧化应激产物含量及其活性, 提升黑素细胞的合成及功能, 从而起到促进白斑复色的作用。

关键词: 岭南火针; Hippo-YAP 信号通路; 氧化应激; 白癜风; 黑素细胞

中图分类号: R249 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2023)02-0244-10

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0208

Lingnan Fire-needle on Inhibiting Melanocyte Apoptosis in Vitiligo Model Mice by Regulating Hippo-YAP Signaling Pathway

LI Jing-jing¹, ZENG Jing-chun², LIANG Xue-song³, ZHANG Yu¹,
YAN Lu-da¹, LIN Shi-yu², LIN Guo-hua², ZHOU Peng¹

(1. Bao'an Traditional Chinese Medicine Hospital//The Seventh Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518133, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

Correspondence to: ZHOU Peng, E-mail: zhoupeng80@gzucm.edu.cn; ZENG Jing-chun, E-mail: tcm_zjc@126.com

Abstract: 【Objective】To observe the effects of fire-needle of Lingnan on the vitiligo model after hydroquinone-induced oxidative stress based on the Hippo-YAP signaling pathway. 【Methods】C57BL/6 mice were randomly divided into

收稿日期: 2022-08-01

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金(2019A1515110371); 广东省中管局项目(20211340); 宝安区医疗卫生基础研究项目(2018JD002); 广州市科技创新局项目(202201011206); 广州中医药大学第一附属医院青年科研基金(2019QN23)

作者简介: 李晶晶, 博士, 副主任医师, 研究方向: 针灸对损容性皮肤病的机制研究, E-mail: lijingjing85@gzucm.edu.cn; 周鹏, 通信作者, 教授, 博士生导师, 研究方向: 针灸的临床应用研究, E-mail: zhoupeng80@gzucm.edu.cn; 曾婧纯, 共同通信作者, 研究方向: 针灸对损容性皮肤病的机制研究, E-mail: tcm_zjc@126.com

normal group (Control), model group (HQ), HQ+fire-needle group (FA), and positive control group (Halometasone), with 8 mice in each group. The vitiligo model was prepared by hydroquinone (HQ). The skin pathological changes were observed by depigmentation score, HE staining and Masson-Fontana. Elisa was used to detect the levels of tyrosinase (TYR), malondialdehyde (MDA) and monoamine oxidase (MAO). Western-blot and PCR were used to detect the expression of *Yap1* and *Tp73* among the groups. [Results] Compared with the control group, the epidermis and dermis were significantly thicker. The number of melanocyte hair follicles, basal melanocytes, epidermal cells containing melanin granules were significantly decreased, and the depigmentation score was significantly reduced ($P < 0.01$). The level of TYR decreased, and the levels of MDA and MAO increased after modeling ($P < 0.01$). The expression of *Yap1* and *Tp73* were significantly reduced ($P < 0.01$). The dermis became thinner in the halometasone and FA group after treatment of 4 weeks. The number of melanocyte hair follicles, basal melanocytes, epidermal cells containing melanin granules increased ($P < 0.05$). Compared with that of the HQ group, the level of TYR in the halometasone group and FA group was significantly increased ($P < 0.01$). The levels of MDA and MAO in the FA group were decreased ($P < 0.05$). The expressions of *Yap1* and *Tp73* in the FA group were significantly increased ($P < 0.01$), and their effects were better than those in the Halometasone group ($P < 0.05$). [Conclusions] Fire-needle of Lingnan protects melanocytes from oxidative stress by activating the Hippo-YAP pathway. It enhances the synthesis and function of melanocytes and promotes repigmentation by reducing the content and activity of oxidative stress products.

Key words: fire-needle of lingnan; Hippo-YAP signaling pathway; oxidative stress; vitiligo; melanocytes

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(2): 244-253]

白癜风是临床常见的获得性色素脱失性疾病,易发生于头面部等暴露部位。在全世界的发病率约为1%,性别、种族、区域间没有统计学差异^[1],给人们的生活造成一定的影响,严重影响患者心理健康^[2]。目前,白癜风的一线治疗方法主要是外用糖皮质激素和物理光疗法,但二者具有一定的局限性和不良反应(如皮肤萎缩、皮疹等),不少患者因药物不良反应而难以坚持治疗^[3]。无论是光疗法、还是外用药物,仍有60%~70%的患者重新着色的区域在1年内恢复了色素脱失^[4]。因此,探寻安全的、有效的治疗方案具有重要的临床和社会价值。祖国医学对白癜风病积累了丰富的知识和治疗经验,中医非药物疗法治疗白癜风疗效显著^[5]。岭南火针为广东省非物质文化遗产,是具有岭南特色的针灸方法之一,在治疗皮肤科疑难疾患方面具有良好的疗效。前期我们研究发现,岭南火针点刺外周病变组织能够调节Th1/Th2平衡、外周腺苷及其代谢产物的含量^[6],促进白斑复色,但其治疗白癜风的机制并未完全明确。氧化应激是黑素细胞凋亡与功能缺损的关键因素之一,是白癜风发生和发展的关键节点^[7]。*Yap1*与*Tp73*是Hippo信号通路的关键作用因子,两者呈现出同向趋势。低表达时能够启动Hippo信号通路下游靶基因的转录和蛋白翻译产生氧化应激的病理表征,最终导致黑素细胞凋

亡^[8]。结合前期研究结果,我们提出假设:岭南火针是否能够通过调控Hippo-YAP信号通路抑制黑素细胞凋亡,最终阻断白癜风的发生和发展。本项目以Hippo信号通路作为切入点,开展岭南火针治疗白癜风的抗氧化机制研究,以期对中医非药物疗法治疗白癜风提供有力的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康C57BL/6小鼠32只(体质量18~24g,雌雄兼用),申购于申报单位实验动物中心(广东省实验动物质量合格证明编号:44824700000844;质量检测单位:广东省实验动物监测所)。于实验前1周购进,饲养于申报单位实验动物中心,按照体质量将32只小鼠随机分为4组,即空白对照组(Control)、模型对照组(HQ)、HQ+岭南火针组(FA)、HQ+卤米松组(Halometasone),每组8只。饲养温度(20~22)°C,自然光照,湿度40%~60%,自由进食和饮水。本研究经单位动物实验伦理委员会批准。

1.2 主要仪器和试剂

JJ-12J脱水机(武汉俊杰电子有限公司),JB-P5包埋机(武汉俊杰电子有限公司),RM2016病理切片机(上海徠卡仪器有限公司),JB-L5冷冻台

(武汉俊杰电子有限公司),正置光学显微镜(日本尼康),DS-U3成像系统(日本尼康),EPS-300电泳仪(上海天能科技有限公司),G1067黑色素染液套装(Servicebio),小鼠酪氨酸酶(TYR)测定试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,CSB-EL025394MO),单胺氧化酶(MAO)测定试剂盒(紫外比色法)(A034-1-1),丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA法)(A003-1-2),YAP1单克隆抗体(Proteintech Group,66900-1-IG),GAPDH单克隆抗体(Proteintech Group,60004-1-IG),TP73单克隆抗体(博士德生物,pb9235),核酸提取试剂(MRC,TR118-500),M-MLV逆转录酶(美国Promega,M1705);引物混合物(诺唯赞,Q341-03),卤米松软膏(澳美制药厂,HC20181019)。

1.3 白癜风模型制备

在小鼠颈背部黑色皮肤区用脱毛膏脱去2 cm×2 cm区域,采用外涂氢醌制作白癜风模型^[9]。Control组在去毛区涂以空白基质(羧甲基纤维素钠1 g溶于100 mL去离子水),0.5 mL/d剂量,2次。其余组在去毛区外涂2.5%氢醌软膏(羧甲基纤维素钠1 g与氢醌2.5 g溶于去离子水100 mL中,电磁搅拌1 h),剂量为100 mg/(kg·d),一天2次,连续21 d。造模过程中每3~4 d用脱毛膏在各组小鼠受试区脱毛1次,并使用柔软的涂抹工具在小鼠脱毛区应用2.5%氢醌软膏脱色,反复涂抹以促进药物的渗透,保证皮肤脱色效果,直至小鼠脱毛区皮肤苍白,出现白色毛发,提示成功建立白癜风动物模型。造模每10 d对造模区域进行摄像,记录皮肤脱色情况,并对造模情况进行评分。

1.4 分组及干预方法

①Control组:去毛区继续涂以空白基质,0.5 mL/d剂量,一天2次,连续4周,不做干预处理。②HQ组:造模成功后,不做干预处理。③Halometasone组:造模成功后,操作者用棉签沾取卤米松乳膏均匀涂抹小鼠去毛皮肤区域,每日1次,并采用间歇疗法,即:外用2周后停用1周,再继续治疗1周,总共4周。④FA组:造模成功后,局部皮肤常规消毒,操作者使用订制细岭南火针在酒精灯上充分燃烧至白亮,迅速刺入白斑处,深度约1 mm,速进速出,针孔密度约2 mm,每周1次,连续4周。

1.5 取材与观察指标

①脱色评分:每日观察各组小鼠皮肤脱色情况,区域分值为5分。具体评分标准:0分为无脱色;脱色面积 $0 \leq 1$ 分 $\leq 10\%$ (0%~10%);脱色面积 $11 \leq 2$ 分 $\leq 25\%$ (11%~25%);脱色面积 $26 \leq 3$ 分 $\leq 50\%$ (26%~50%);脱色面积 $51 \leq 4$ 分 $\leq 75\%$ (51%~75%);脱色面积 $76 \leq 5$ 分 $\leq 100\%$ (76%~100%)。②组织形态学:各组小鼠处死后取局部皮肤组织经脱水、浸蜡、切片、染色、封片,HE染色观察皮肤病理学改变,Masson-Fontana法检测黑色素颗粒情况,观察并计数含黑色素毛囊的个数、底层黑色素细胞、含黑色素颗粒表皮细胞数量。③酶联免疫分析(ELISA法)检测血浆TYR、MDA含量及MAO活性:从小鼠眼球采集的血液经过加样、加酶标抗体、底物显色、终止反应后,将酶标板放在酶标仪上读数,根据标准曲线计算出各组TYR、MAO、MDA的对应数字值。④Western-blot检测皮肤组织YAP1、TP73蛋白表达情况:从氢醌造模区取(0.5×0.5) cm²皮肤组织,匀浆、离心得到细胞浆蛋白。提取细胞蛋白定量后,经SDS-PAGE电泳后转膜,封闭后将一抗4℃孵育过夜,TBST洗2次(7 min/次),加入稀释后的二抗孵育(1~2) h。TBST洗3次(7 min/次)后,进行化学发光显影。用Image J分析目标条带的光密度值。以GAPDH(Proteintech,#60004-1-IG,1:8 000)作为内参照,比较不同处理后上述YAP1、TP73表达的差异。⑤PCR检测皮肤组织 $Yap1$ 、 $Tp73$ 表达水平:从氢醌造模区取0.5 cm×0.5 cm皮肤组织研磨后,加入1 mL核酸提取试剂,离心15 min(12 000×g)取上清液;RNA沉淀晾干加入DEPC水溶解RNA,水浴10 min。采用Nano-100进行定量,根据定量结果进行逆转录。加入引物(表1)、DNA模板等进行PCR检测。反应程序具体如下:Stage 1 (1 Cycle):95℃×120 s;Stage 2 (40 Cycle):95℃×15 s;60℃×30 s。上机进行目标基因扩增,数据采用 $\Delta\Delta Ct$ 法进行分析(表1)。

1.6 统计方法

所得数据使用SPSS 22.0统计软件进行统计,数据值采用均数±标准差表示。多组数据正态分布且方差齐用单因素方差分析(One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。图像采用Motic Med 6.0病理图像分析系统。

表1 引物序列及产物长度
Table 1 Primer sequences and product lengths

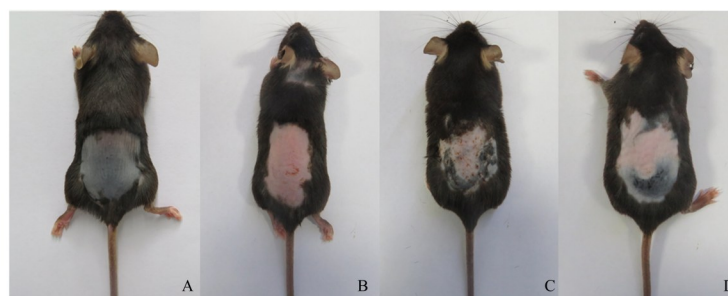
Primer	Sequences(5'-3')	Lengths/bp
MZ-GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	123
MZ-GAPDH-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
M-YAP1-F	ACCCTCGTTTTTGCCATGAAC	133
M-YAP1-R	AGCTGTATTTGCTGCTGCTG	
M-TP73-F	GCCCAGTTC AATTTGCTCAGC	148
M-TP73-R	CCGGAGACATGGTGTCCAA	

2 结果

2.1 各组 C57BL/6 小鼠干预后皮肤脱色变化情况对比

造模后局部皮肤客观表现(如脱色、角质层增厚等)为造模成功的直接证据。采用2.5%的氢醌造模后第21 d, C57BL/6 小鼠皮肤造模区出现白

斑,部分毛发变白、皮肤增厚,提示成功建立了白癜风模型。Control 组小鼠局部皮肤毛发颜色正常, HQ 组小鼠造模区皮肤白斑、角质层增厚。FA 组、Halometasone 组经过4周干预后,造模区皮肤开始接近正常肤色并长出黑色毛发(图1)。注:FA 组干预后局部皮色微红,结痂后脱落。除此之外,未见红肿、感染、疤痕结节等不良反应。



A: No.225 in control group; B: No.236 in HQ group; C: No.238 in FA group; D: No.248 in halometasone group.

图1 各组 C57BL/6 小鼠干预后皮肤脱色变化情况对比

Fig. 1 Changes of skin depigmentation in each group

2.2 脱色评分

造模后各组间脱色评分差异有统计学意义($F=88.245, P=0.000$)。各造模组(HQ 组、Halometasone 组、FA 组)与 Control 组相比,差异有显著统计学意义($P<0.01, P=0.000$)。造模后 HQ 组、Halometasone 组、FA 组脱色评分明显提高,提示造模成功。采用外涂卤米松、岭南火针治疗后,脱色评分较干预前明显下降($P<0.01, P=0.000$),与 HQ 组相比差异极具统计学意义($P<0.01, P=0.000$),FA 组脱色评分较 Halometasone 组下降更加明显,两组相比差异有统计学意义($P<0.05, P=0.020$),提示经过外涂卤米松、岭南火针后,白癜风模型小鼠局部皮肤脱色评分明显下降,岭南火

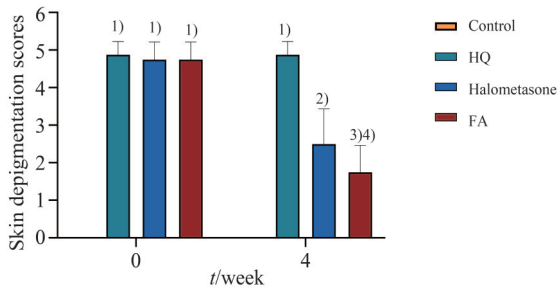
针在改善脱色方面优于 Halometasone 组(图2)。

2.3 各组 C57BL/6 小鼠的黑色素分布情况在皮肤组织形态

采用 HE 染色、Masson-Fontana 法观察各组小鼠皮肤病理学改变,评价真皮厚度、黑色素颗粒变化情况。结果显示:HE 和 Masson-Fontana 染色后, HQ 组皮肤组织中表皮层和真皮层明显增厚,黑色素颗粒数与 Control 组相比明显减少。经4周治疗后 Halometasone 组、FA 组皮肤组织内真皮层明显变薄(图3),含黑色素毛囊明显增多(图4)。

2.4 各组 C57BL/6 小鼠含黑色素细胞毛囊数、基底层黑色素细胞数、含黑色素颗粒表皮细胞数比较

造模后,数据经单因素方差分析显示,各组间



Compared with control group: ¹⁾ $P < 0.01$, $n = 8$; Compared with HQ group: ²⁾ $P < 0.05$; ³⁾ $P < 0.01$, $n = 8$; Compared with halometasone group: ⁴⁾ $P < 0.05$, $n = 8$. Data are compared between groups by Bonferoni after ANOVA.

图2 各组 C57BL/6 小鼠脱色评分比较

Fig. 2 Comparison of skin depigmentation scores among the groups

含黑素细胞毛囊数、基底层黑素细胞数、含黑素颗粒表皮细胞差异有统计学意义 ($F=33.628$, $P=0.000$; $F=50.011$, $P=0.000$; $F=31.839$, $P=0.000$)。采用 Bonferoni 法进行统计假设检验多重比较, HQ 组含黑素细胞毛囊数、基底层黑素细胞数、含黑素颗粒表皮细胞数较 Control 组明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P=0.000$)。经过岭南火针、卤米松治疗后, 黑素细胞毛囊数、基底层黑素细胞数、含黑素颗粒表皮细胞数增加。与 HQ 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P=0.000$)。FA 组基底层黑素细胞增加数量与 Halometasone 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P=0.012$), 含黑素颗粒表皮细胞数量上升趋势更加明显 ($P < 0.01$, $P=0.002$; 表 2)。

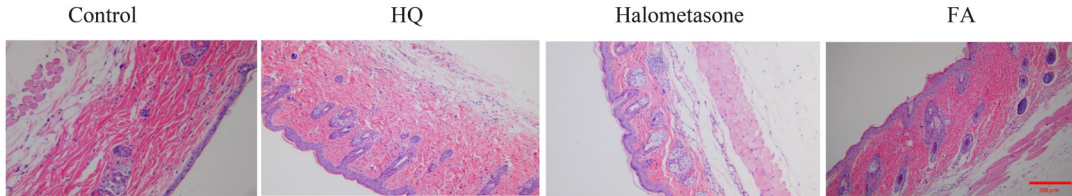


图3 HE 染色观察各组 C57BL/6 小鼠的皮肤病理学改变

Fig. 3 Skin pathological changes among the groups by HE staining

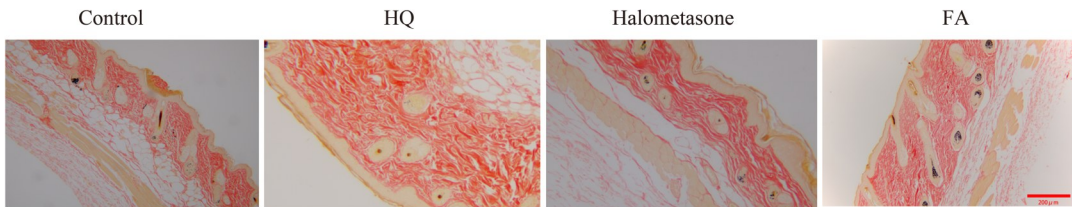


图4 Masson-Fontana 法观察各组 C57BL/6 小鼠的黑素颗粒情况

Fig. 4 Melanin granules among the groups by Masson-Fontana

表2 各组合黑素细胞毛囊数、基底层黑素细胞数、含黑素颗粒表皮细胞数

Table 2 The number of melanocyte hair follicles, basal melanocytes, and epidermal cells containing melanin granules among the groups

Group	n	Melanocyte hair follicles	Basal melanocytes	Epidermal cells containing melanin granules
Control	8	18.28±2.10	17.20±1.90	22.98±2.60
HQ	8	10.36±1.57 ¹⁾	7.39±1.08 ¹⁾	12.30±1.57 ¹⁾
Halometasone	8	15.95±1.83 ²⁾	12.06±1.64 ²⁾	17.34±1.75 ²⁾
FA	8	16.59±1.18 ²⁾	14.34±1.87 ²⁾⁴⁾	20.88±2.42 ²⁾³⁾

Compared with control group: ¹⁾ $P < 0.01$; Compared with HQ group: ²⁾ $P < 0.01$; Compared with halometasone group: ³⁾ $P < 0.01$; ⁴⁾ $P < 0.05$. Data are compared between groups by Bonferoni after ANOVA.

2.5 各组C57BL/6小鼠血浆酪氨酸酶(TYR)、丙二醛(MDA)含量及血清单胺氧化酶(MAO)活性

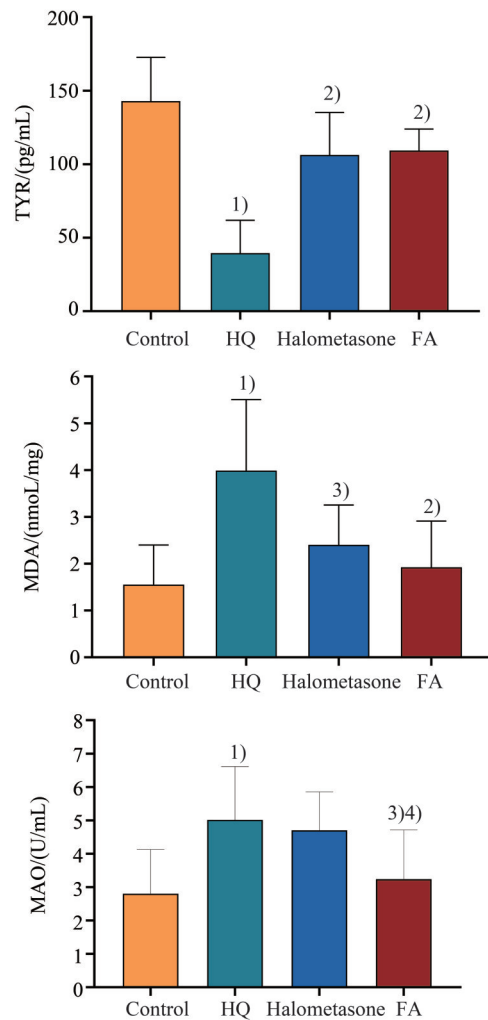
各组间TYR、MDA、MAO水平经单因素方差分析显示,差异具有统计学意义($F=25.163, P=0.000$; $F=7.915, P=0.001$; $F=4.876, P=0.007$)。采用 Bonferroni 法进行统计假设检验多重比较, HQ 组与 Control 组相比, TYR 显著下调($P<0.01, P=0.000$), MDA、MAO 与 Control 组相比, 显著上调($P<0.01, P=0.000$)。FA 组、Halometasone 组 TYR 明显高于 HQ 组($P<0.01, P=0.000$), 两个治疗组之间差异无统计学意义($P>0.05, P=1.000$)。FA 组 MDA 明显低于 HQ 组($P<0.01, P=0.004$)。与 HQ 组相比, Halometasone 组 MDA 有所下调($P<0.05, P=0.039$), 两个治疗组之间差异无统计学意义($P>0.05, P=1.000$)。FA 组 MAO 值与 HQ 组相比有所下调($P<0.05, P=0.016$), Halometasone 组与 HQ 组相比差异无统计学意义($P>0.05, P=0.990$)。FA 组与 Halometasone 组相比, 差异有统计学意义($P<0.05, P=0.044$; 图5)。

2.6 各组小鼠皮肤组织 YAP1、TP73 蛋白表达情况

利用 Western Blot 检测各组小鼠皮肤组织 YAP1、TP73 的表达情况。经过单因素方差分析, 结果显示, 各组间 YAP1、TP73 蛋白表达差异具有统计学意义($F=8.979, P=0.002$; $F=5.955, P=0.010$)。与 Control 组相比, HQ 组 YAP1、TP73 蛋白表达水平明显降低($P<0.01, P=0.001, P=0.002$)。经过岭南火针、卤米松干预后, YAP1 表达水平明显升高($P<0.01, P=0.001, P=0.006$)。FA 组 TP73 蛋白表达量与 HQ 组相比, 差异有统计学意义($P<0.05, P=0.015$; 图6)。

2.7 各组小鼠皮肤组织 Yap1、Tp73 表达情况

经单因素方差分析, 结果显示, 各组间 *Yap1*、*Tp73* 表达差异具有统计学意义($F=9.390, P=0.000$; $F=9.398, P=0.000$)。HQ 组的 *Yap1*、*Tp73* 表达均显著降低($P<0.01, P=0.000$)。采用 Bonferroni 法进行统计假设检验多重比较, FA、Halometasone 组 *Yap1* 表达水平恢复上调。其中, FA 组与 Control 组相比, 差异无统计学意义($P>0.05, P=1.000$); 与 HQ 组相比, 差异有统计学意义($P<0.01, P=0.002$); FA 组与 Halometasone 组相比, 差异有统计学意义($P<0.05, P=0.026$)。 *Tp73* 表达水平经过岭南火针、卤米松治疗后恢复上调。其中, FA 组与 Control 组相比, 差异无统计学意义($P>0.05, P=$



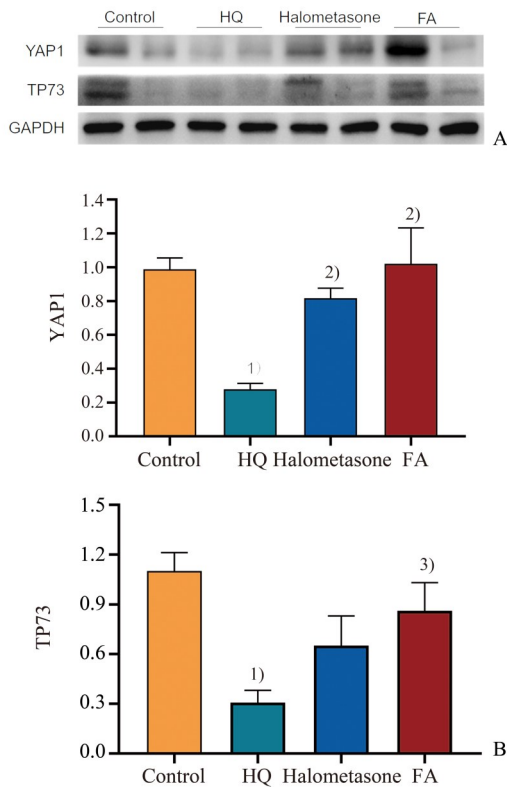
Compared with control group: ¹⁾ $P<0.01, n=8$; Compared with HQ group: ²⁾ $P<0.01$; ³⁾ $P<0.05, n=8$; Compared with halometasone group: ⁴⁾ $P<0.05, n=8$. Data are compared between groups by Bonferroni after ANOVA.

图5 各组C57BL/6小鼠TYR、MDA含量及MAO活性比较
Fig. 5 Levels of TYR, MDA and MAO among the groups

0.441); 与 HQ 组相比, 差异有统计学意义($P<0.01, P=0.001$), FA 组与 Halometasone 组相比, 差异有统计学意义($P<0.05, P=0.020$; 图7)。

3 讨论

白癜风是一种皮肤色素沉着障碍性疾病, 可发生于任何年龄^[10]。普遍认为与自身免疫、氧化应激、黑素细胞自毁学说、精神与神经化学学说等有关^[11]。光疗、糖皮质激素和钙调神经磷酸酶抑制剂为白癜风的一线治疗^[12]。但光疗的时效、频次、剂量缺乏量化标准^[13]。传统外用药存在不良反应



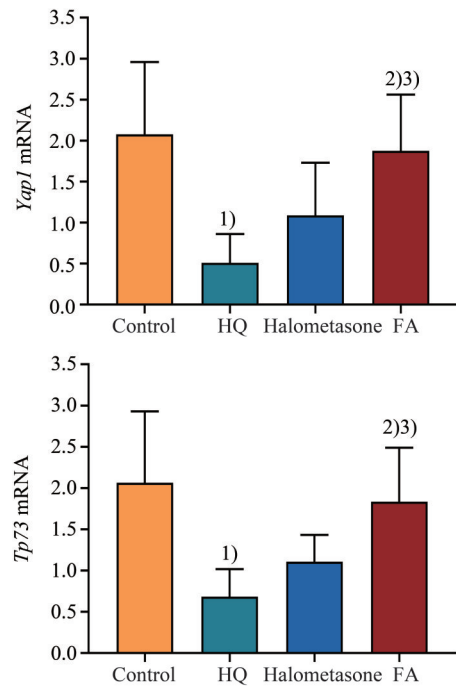
A: Representative picture of Western Blotting results of YAP1、TP73 in the skin tissues. B: Expression levels of YAP1、TP73 among the groups($n=4$). Compared with control group: ¹⁾ $P < 0.01$; Compared with HQ group: ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$. Data are compared between groups by bonferroni after ANOVA.

图6 各组小鼠皮肤组织 YAP1、TP73 蛋白表达情况

Fig. 6 Expression of YAP1 and TP73 in the skin tissues among the groups

多、复色不全、稳定性差、透皮率低等问题^[14]。白癜风又称“白癩”“白驳风”“紫白癜风”等。首见于隋代巢元方的《诸病源候论·白癩候》：“白癩者，面及颈项身体皮肤肉色变白，…谓之白癩。”《景岳全书·血证》言：“润颜色，充营卫…无非血之用也”，提示因后天不足，脾虚失运，肌肤失养则发病。结合发作期风邪相搏、气血失和；稳定期脏腑亏虚，久病入络^[15]等特点，课题组运用岭南火针在治疗白癜风取得了很好的效果，已广泛应用于临床。

岭南火针为广东省非物质文化遗产，是极具岭南特色的针灸疗法之一。广州中医药大学第一附属医院林国华教授总结并拓展了岭南火针的理论体系，制定了广东省针灸学会团体标准《岭南特色针灸技术操作规范：岭南火针技术》(T/GDZJ 4005-2002)。“温”“通”“补”“清”“消”是岭南火针的治疗特点^[16]。白癜风、银屑病、神经性皮炎、天疱疮等皮



Compared with control group: ¹⁾ $P < 0.01$, $n = 8$; Compared with HQ group: ²⁾ $P < 0.01$, $n = 8$; Compared with halometasone group: ³⁾ $P < 0.05$, $n = 8$. Data are compared between groups by Bonferroni after ANOVA.

图7 各组 C57BL/6 小鼠 *Yap1*、*Tp73* 表达水平

Fig.7 Expression of *Yap1* and *Tp73* among the groups

肤科顽疾是岭南火针的优势病种。其治疗白癜风的中医机理可从三个方面论述：首先，“借火助阳、温经散寒”，根据《黄帝内经》所云：“多白则寒。”《证治准绳·察色要略》：“白色属肺金，主气血不足也，乃手太阴肺经之色”，表明白癜风在表发病多为肺气虚损、风邪内侵。岭南火针属于温热疗法，对于阴寒内守之白斑具有借火助阳以消阴翳之功。其次，“祛风散邪、行气化痰”，风邪泛发是白斑泛发全身的起因，病久留瘀是白斑稳定不退的根结。岭南火针点刺于体肤，具有开门祛邪、行气发散之功，如《针灸聚英》所言：“盖火针大开其孔穴，不塞其门。”火针能外散闭塞腠理之风邪，内消壅阻脉络之瘀滞^[17]，驱散风邪由孔道而出；最后，“调理五脏、扶正祛邪”，《针灸聚英》记载：“针假火力，无邪则温补，火不虚人，以壮人为法也。”火针集点灸与针刺于一体^[18]，温热效应通过火针点刺腧穴透达经络，既无纯补无泻、格拒之弊^[19]，又可调整脏腑之经气以助“正气内存、阴平阳秘”^[20]，使白斑复色保持稳态。课题组前期研究表明，火针可抑制体内炎症因子发生趋化作用，促进 Th1/Th2 达到平衡状态^[21]，阻断

炎症因子介导的免疫反应^[22],调节外周神经递质水平^[23]。其热刺激可改善局部血液供应,促进代谢与细胞修复^[24]。

白癜风皮损与自由基的氧化性损伤密切相关,细胞内活性氧族(reactive oxygen species, ROS)水平对维持内环境稳态至关重要。在低、中浓度时,ROS可作为信号分子维持细胞增殖和分化、生物活性过程和凋亡,并参与细胞应激反应^[25]。相反,过量氧化应激产物是黑素细胞凋亡与丧失功能的主要原因之一^[26]。减少氧化应激反应可以抑制免疫反应和黑素细胞凋亡^[27]。因此,寻找能够降低黑素细胞氧化应激的治疗方法已经成为近年重要的研究热点^[28]。白癜风患者表皮内过量的H₂O₂来源于TYR、MAO、MDA活性升高等途径^[29],三者是现有已知的氧化应激标志物。抑制TYR、MAO、MDA活性可拮抗免疫和细胞凋亡,刺激黑素细胞增殖和干细胞定向分化为成熟^[30]。Yap1是Hippo信号通路的下游关键效应因子之一,能够启动通路下游靶基因的转录、蛋白翻译进而促进细胞的增殖和抑制细胞凋亡^[31]。过表达Yap1可下调Caspase-3蛋白表达水平,抑制氧化应激诱导的皮肤成纤维细胞凋亡^[32]。Hippo-YAP信号通路的促凋亡功能通常由Tp73介导^[33]。Tp73功能对于复杂微环境的组织稳态和DNA损伤反应方面起着至关重要的作用^[34]。在对基因敲除小鼠的研究中发现了Tp73与氧化应激相关的病理表征^[35]。通常Tp73与Yap1的趋势呈

现出一致性,两者相互结合促进。Yap1在皮肤黑色素瘤中高表达,在白癜风中呈现出低表达趋势。

本课题采用氢醌脱色法制作白癜风动物模型,氢醌可抑制TYR催化络氨酸转化为黑色素,造成类似白癜风的皮肤脱色。造模后小鼠皮肤明显脱色,组织中表皮层和真皮层明显增厚,毛囊数及黑素细胞明显减少。TYR水平明显降低,MAO、MDA水平升高,验证了采用氢醌脱色法成功制作的白癜风模型与氧化应激相关。经过岭南火针或外用卤米松干预后,造模区皮肤开始接近正常肤色并长出黑色毛发,皮肤组织内含黑色素毛囊明显增多,真皮层明显变薄。黑素细胞毛囊数、基底层黑素细胞数、含黑素颗粒表皮细胞数增加,TYR显著升高,MDA、MAO下降。课题组进一步研究结果显示:HQ组Yap1、Tp73较Control组显著下调,FA组、Halometasone组Yap1和Tp73相比HQ组有所升高,FA组作用强于Halometasone组。简而言之,氧化应激损伤在白癜风的发病过程中起到关键性作用。岭南火针可激活Hippo-YAP通路上调Yap1水平促进Tp73稳定化,前者能够影响Tp73在细胞中的积累和表达,从而降低氧化应激产物如MDA含量及MAO活性,保护黑素细胞免受氢醌诱导的氧化应激损伤;通过激发TYR活性,刺激黑素细胞增殖、分化及迁移,从而起到增加基底层黑素细胞数量,促进白斑复色的作用。

参考文献

- [1] Zhang Y, Cai Y, Shi M, et al. The prevalence of vitiligo: a meta-analysis [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0163806.
- [2] 邱洞仙, 边莉, 柴旭亚, 等. 火针疗法联合308nm准分子光治疗白癜风疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(3): 343-347.
- [3] Qiu DX, Bian L, Chai XY, et al. Observation on the curative effect of fire needling therapy combined with 308 nm excimer light in the treatment of vitiligo [J]. Mod J Int Tradit Chin Med, 2022, 31(3): 343-347.
- [4] Handjani F, Aghaei S, Moezzi I, et al. Topical mycophenolate mofetil in the treatment of vitiligo: a pilot study [J]. Dermatol Pract Concep, 2017, 7(2): 31-33.
- [5] Bishnoi A, Parsad D. Clinical and molecular aspects of vitiligo treatments [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): 1509.
- [6] 赵雪琪, 高雪雯, 符海燕, 等. 针灸治疗白癜风研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 4163-4165.
- [7] Zhao XQ, Gao XW, Fu HY, et al. Research progress of acupuncture and moxibustion treatment of vitiligo [J]. J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(7): 4163-4165.
- [8] 邓诗清, 李茜, 简雪仪, 等. 岭南火针治疗带状疱疹的临床疗效及对免疫的影响[J]. 数理医药学杂志, 2019, 32(5): 698-700.
- [9] Deng SQ, Li Q, Jian XY, et al. Clinical efficacy of Lingnan fire-needle in the treatment of herpes zoster

- and its effect on immunity[J]. *J Math Med*, 2019, 32(5): 698-700.
- [7] Tang S, Yang L, Kuroda Y, et al. Herb sanqi-derived compound k alleviates oxidative stress in cultured human melanocytes and improves oxidative-stress-related leukoderma in guinea pigs[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2057.
- [8] 尚智伟. miR-202-3p 靶向调控 YAP1 对黑素细胞的生物学影响及分子机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2017: 89-90.
- Shang ZW. Biological effects and molecular mechanisms of miR-202-3p-targeted regulation of YAP1 on melanocytes[D]. Zhengzhou University, 2017: 89-90.
- [9] 苗明三, 闫晓丽, 乔靖怡, 等. 白癜风动物模型制备规范(草案)[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(24): 1-5.
- Miao MS, Yan XL, Qiao JY, et al. Specifications for preparation of vitiligo models (draft) [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formul*, 2017, 23(24): 1-5.
- [10] 郭萧, 黄宁, 王之曜, 等. 火针对白癜风模型 C57BL/6 小鼠 Nrf2-ARE/HO-1 信号通路的影响[J]. *山西中医*, 2021, 37(5): 51-54.
- Guo X, Huang N, Wang ZY, et al. Effect of fire needle on Nrf2-ARE/HO-1 signaling pathway in C57BL/6 mice of vitiligo model [J]. *Shanxi Tradit Chin Med*, 2021, 37(5): 51-54.
- [11] Chen J, Li S, Li C. Mechanisms of melanocyte death in vitiligo [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(2): 1138-1166.
- [12] Karagaiah P, Valle Y, Sigova J, et al. Emerging drugs for the treatment of vitiligo [J]. *Expert Opin Emerg Dr*, 2020, 25(1): 7-24.
- [13] Mohammad TF, Al-Jamal M, Hamzavi IH, et al. The vitiligo working group recommendations for narrow-band ultraviolet B light phototherapy treatment of vitiligo [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 76(5): 879-888.
- [14] Eleftheriadou V, Atkar R, Batchelor J, et al. British association of dermatologists guidelines for the management of people with vitiligo 2021 [J]. *Bri J Dermatol*, 2022, 186(1): 18-29.
- [15] 王远红, 杨锐, 张思远, 等. 中医药治疗白癜风临床研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(4): 15-18.
- Wang YH, Yang Y, Zhang SY, et al. Clinical research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of vitiligo [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 40(4): 15-18.
- [16] 李晶晶, 周鹏, 秦焯, 等. 林国华教授基于“火郁发之”理论探讨岭南火针治疗带状疱疹及其后遗症神经痛机理[J]. *四川中医*, 2019, 37(2): 5-7.
- Li JJ, Zhou P, Qin Y, et al. Discussion on the treatment of herpes zoster with Lingnan fire-needle and its mechanism on subsequent neuralgia based on professor Lin Guo-hua's theory of excessive stagnation of fire [J]. *Sichuan Tradit Chin Med*, 2019, 37(2): 5-7.
- [17] 冯放, 王燕, 赵京霞, 等. 火针对咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠皮损及 STAT3 通路的影响[J]. *中国针灸*, 2022, 42(5): 541-548.
- Feng F, Wang Y, Zhao JX, et al. Effect of fire needling on imiquimod induced psoriasis-like lesion and STAT3 pathway in mice [J]. *Chin Acu-Mox*, 2019, 37(02): 5-7.
- [18] 曾婧纯, 肖青娥, 卢立宏, 等. 林国华运用岭南火针疗法经验撷菁[J]. *辽宁中医杂志*, 2022, 49(4): 31-33.
- Zeng JC, Xiao QE, Lu LH, et al. Clinical experience of Lin Guo-hua using Lingnan fire needle [J]. *Liaoning Tradit Chin Med*, 2022, 49(4): 31-33.
- [19] 赵洛鹏, 刘璐, 王一战, 等. 火针疗法的“破”和“立”作用及临床应用初探[J]. *中医杂志*, 2019, 60(14): 1255-1257.
- Zhao LP, Liu L, Wang YZ, et al. Study on the breaking and establishing effects of fire needling therapy and its clinical application [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 60(14): 1255-1257.
- [20] 姜同菲, 胡俊霞, 王桂玲, 等. 应用火针调理五脏治疗失眠的思路探析[J]. *环球中医药*, 2022, 15(2): 325-327.
- Jiang TF, Hu JX, Wang GL, et al. Analysis on the idea of applying fire needle to regulate the five internal organs in the treatment of insomnia [J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2022, 15(2): 325-327.
- [21] 李晶晶, 张英, 眭明红, 等. 火针对类风湿关节炎大鼠痛阈及 IL-1、TNF- α 的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2016, 35(5): 583-587.
- Li JJ, Zhang Y, Sui MH, et al. Experimental study of the effect of fire needling on pain threshold, and IL-1 and TNF- α in rheumatoid arthritis rats [J]. *Shanghai J Acu-mox*, 2016, 35(5): 583-587.
- [22] 李茜, 林诗雨, 李晶晶, 等. 岭南火针治疗慢性湿疹的疗效观察及对患者免疫功能的影响[J]. 河北

- 中医, 2018, 40(4): 600-603.
- Li Q, Lin SY, Li JJ, et al. Observation on the curative effect of Lingnan fireneedle in the treatment of chronic eczema and its effect on the immune function of patients [J]. Hebei Tradit Chin Med, 2018, 40(4): 600-603.
- [23] 李晶晶, 周鹏, 曾婧纯, 等. 实时、同体监测岭南火针对带状疱疹后遗神经痛模型大鼠外周神经递质的影响及其时效性[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2019, 40(1): 37-44.
- Li JJ, Zhou P, Zeng JC, et al. Evaluation of the effects of fireneedle on level of peripheral adenosine in postherpetic neuralgia rats by microdialysis [J]. J Jinnan U (Nat Sci Med Ed), 2019, 40(1): 37-44.
- [24] 陈晓峰, 李茜, 李浩, 等. 补肾活血方结合岭南火针治疗神经根型颈椎病的疗效及对血液流变学的影响[J]. 环球中医药, 2021, 14(6): 1151-1154.
- Chen XF, Li Q, Li H, et al. Effect of Bushen huoxue recipe combined with fire needle of Lingnan in the treatment of cervical spondylotic adiculopathy and its effect on hemorheology [J]. Glob Tradit Chin Med, 2021, 14(6): 1151-1154.
- [25] Kobiakov VA. The mechanisms of regulation of aerobic glycolysis (Warburg Effect) by oncoproteins in carcinogenesis [J]. Biochemistry, 2019, 84(10): 1117-1128.
- [26] An R, Li D, Dong Y, et al. Methylcobalamin protects melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress by activating the nrf2/ho-1 pathway [J]. Drug Des Dev Ther, 2021, 15(1): 4837-4848.
- [27] Abdel-Malek ZA, Jordan C, Ho T, et al. The enigma and challenges of vitiligo pathophysiology and treatment [J]. Pigm Cell Melanoma Res, 2020, 33(6): 778-787.
- [28] Abuduaini A, Lu X, Zang D, et al. Effects of a traditional caraway formulation on experimental models of vitiligo and mechanisms of melanogenesis [J]. Evid based Compl Alt Med, 2021, 19(4): 1-17.
- [29] Yi X, Guo W, Shi Q, et al. Sirt3-dependent mitochondrial dynamics remodeling contributes to oxidative stress-induced melanocyte degeneration in vitiligo [J]. Theranostics, 2019, 9(6): 1614-1633.
- [30] 张瑾, 李铁男, 刘文力, 等. 抗酪氨酸酶抗体和抗酪氨酸酶相关蛋白-1抗体检测与快速进展期白癜风疗效的相关性分析[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期杂志, 2018, 17(6): 493-496;+505.
- Zhang J, Li TN, Liu WL, et al. Correlation analysis between the detection of TYG-IgG, TRP-1 IgG and the therapeutic effect of patients with rapid progressive stage vitiligo [J]. Chin J Dermat Int Tradit Western Med, 2018, 17(6): 493-496;+505.
- [31] Ibar C, Irvine K D. Integration of Hippo-yap signaling with metabolism [J]. Dev Cell, 2020, 54(2): 256-267.
- [32] 王露, 张政, 高丽, 等. 过表达 YAP 对过氧化氢诱导皮肤成纤维细胞氧化损伤的影响[J]. 中国皮肤性病学期杂志, 2019, 33(5): 501-506.
- Wang L, Zhang Z, Gao L, et al. Effects of overexpression of YAP on hydrogen peroxide induced oxidative damage in human dermal fibroblasts [J]. Int J Biomed Eng, 2019, 33(5): 501-506.
- [33] 杨正慧, 林乃余, 刘丽诗, 等. Hippo 通路下游信号分子 YAP 在皮肤疾病中的研究进展[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2017, 24(6): 419-422.
- Yang ZH, Lin NY, Liu LS, et al. Research progress of YAP downstream signaling molecule of Hippo pathway in skin diseases [J]. Diagn Ther J Dermatol-Venerol, 2017, 24(6): 419-422.
- [34] Melino G. Molecular mechanisms and function of the p53 protein family member - p73 [J]. Biochemistry (Moscow), 2020, 85(10): 1202-1209.
- [35] Kalinina EV, Ivanova-Radkevich VI, Chernov NN. Role of micrnas in the regulation of redox-dependent processes [J]. Biochemistry (Moscow), 2019, 84(11): 1233-1246.

(编辑 祁方昉, 孙慧兰)