

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.05.012

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

吴云莎¹, 张星星², 王海丹², 吴玲², 张瑞娟¹, 金玉²✉

1. 南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市秦淮区汉中路155号, 210029; 2. 江苏省中医院



[摘要] **目的** 探讨如意黑白散治疗白癜风的可能作用机制。**方法** 将24只C57BL/6小鼠随机分为空白组、模型组及如意黑白散大、小剂量组,每组6只。除空白组外其余各组采用氢醌外涂构建白癜风动物模型。造模后如意黑白散大、小剂量组灌胃如意黑白散7.02、2.34 g/kg,空白组与模型组予10 ml/kg生理盐水灌胃,每日1次,各组均给药36天。给药结束后肉眼观察皮损情况,HE染色观察皮损组织黑色素含量,免疫组化测定皮损组织中CD3⁺、CD8⁺T细胞表达;免疫荧光染色测皮损组织中程序性死亡受体1(PD-1)表达;RT-PCR法检测皮损组织中细胞程序性死亡配体1(PD-L1)mRNA表达;ELISA法检测血清超氧化物歧化酶(SOD)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、酪氨酸酶(TYR)含量。**结果** 与空白组比较,模型组小鼠皮肤苍白,皮损组织HE染色后镜下可见黑色素含量明显减少,皮损优良率降低,表皮和毛囊周围细胞黑色素颗粒明显减少,皮肤组织中CD3⁺、CD8⁺T细胞表达显著增加,PD-L1 mRNA、PD-1表达下降,TYR含量下降,SOD、TNF- α 含量增加($P<0.05$)。与模型组相比,如意黑白散大、小剂量组皮肤颜色加深,黑色素含量增加,皮损优良率升高,棘细胞层、基底细胞及毛囊黑色素颗粒增多,皮损处CD3⁺、CD8⁺T细胞表达减少,PD-L1 mRNA、PD-1表达增加,TYR含量上升,SOD、TNF- α 含量下降($P<0.05$)。与如意黑白散小剂量组比较,如意黑白散大剂量组造模区域皮损色素恢复面积更大,皮损优良率升高,棘细胞层及基底细胞以及毛囊黑色素颗粒增多,皮损处CD3⁺、CD8⁺T细胞表达减少,PD-L1 mRNA、PD-1表达增加,TYR含量上升,SOD、TNF- α 含量下降($P<0.05$)。**结论** 如意黑白散可以使白癜风模型小鼠皮肤黑色素含量增多,其作用机制可能为激活皮损组织PD-1/PD-L1信号通路,从而抑制T细胞介导的自身免疫对黑色素细胞的破坏。

[关键词] 白癜风;黑色素;如意黑白散;程序性死亡受体1;程序性死亡配体1;T细胞

白癜风(vitiligo)是一种获得性色素脱失性疾病,由于黑色素细胞的结构和功能损伤,导致其累及区域的毛发、皮肤、黏膜呈渐进性、斑片状、多灶性色素丧失,好发于人体各个部位,常见于面部、手臂及腿部^[1]。白癜风时常伴发多种自身免疫系统相关性疾病,并可给患者带来诸多心理方面的疾患,对患者的生活质量产生极大影响^[2-3]。研究证明,程序性死亡受体1/细胞程序性死亡配体1(PD-1/PD-L1)信号通路在白癜风的发病中起重要作用,其机制可能为该通路的抑制导致CD8⁺T细胞活化,导致白癜风皮损的产生^[4-5]。如意黑白散是

云南省名中医来春茂治疗白癜风的祖传名方,具有祛风活血、除湿清热、补益肝肾之功。前期研究表明,如意黑白散治疗白癜风可显著缩小皮损面积,使皮损部位的黑色素增加,临床治疗效果显著^[6]。本研究从PD-1/PD-L1信号通路角度探讨如意黑白散治疗白癜风的可能作用机制,为临床应用提供实验依据。本研究经南京中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准(批号2021DW-08-02)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级C57BL/6小鼠24只,体质量(20 $\pm$ 2)g,8周龄,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,

基金项目:江苏省中医院科技项目(Y2020CX19)

✉ 通讯作者:190629408@qq.com, (025)86603877

实验动物质量合格证号: 110324211101246547。养于江苏省中医院动物实验中心, 饲养温度 18~22℃, 干燥、通风, 光照 12 h 明暗交替, 湿度 45%~65%。

1.2 药物

如意黑白散组成: 墨旱莲 90 g, 白芷 60 g, 沙蒺藜 60 g, 刺蒺藜 60 g, 紫草 45 g, 重楼 30 g, 丹参 30 g, 苦参 30 g, 苍术 24 g。由南京中医药大学附属医院制剂部提供。将药物用 1500 ml 双蒸水浸泡 30 min 后, 武火烧开, 文火煎煮 5~8 min, 倒出药液后, 再次重复上述煎煮步骤, 混合 2 次提取药液, 入煎药锅继续浓缩至生药含量为 1 g/ml, 4℃ 保存备用。

1.3 试剂与仪器

BSA 试剂 (货号 G5001)、柠檬酸 (PH6.0) 抗原修复液 (货号 G1202)、中性树胶 (货号 G1403)、正常兔血清 (货号 G1209)、CD3 抗体 (货号 GB12014)、CD8 抗体 (货号 GB13429)、免疫组化 HRP 标记山羊抗兔二抗 (货号 GB23303)、DAB 显色剂 (货号 G1211), 武汉赛维尔生物科技有限公司; 苏木精-伊红染色液 (尚宝生物实验器材有限公司, 货号 ST2001); 一抗 PD-1/CD279 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 66220-1-Ig)、免疫荧光二抗 (美国 Proteintech 公司, 货号 SA00013-1); 超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (货号 JYM0390Mo)、酪氨酸酶 (TYR) 试剂盒 (货号 YM0629Mo)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 试剂盒 (货号 JYM0218 Mo), 武汉基因美生物科技有限公司; 氢醌 (东京化成工业株式会社, 货号 SSIPL-JS); SYBR Green (美国 ABI 公司, 批号 436759); Trizol (美国 Invitrogen 公司, 货号 15596018); 逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司, 货号 RR047A)。

组织匀浆器 (德国 IKA 公司, 型号 T10 basic S25); 实时定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司, 型号 7500fas); 染色封片机 (日本樱花公司, 型号 prisma-plus); 紫外光分光光度计 (美国 DeNovix 公司, 型号 DS-11); 掌上离心机 (武汉赛维尔生物技术有限公司, 型号 SMC-5000F); 脱水机 (型号 JT-12K)、包埋机 (型号 JB-L5), 武汉俊杰电子有限公司; 光学显微镜 (日本奥林巴斯公司, 型号 IX2-ILL30); 荧光显微镜 (德国蔡司公司, 型号 AXIO SCOPE A1)、病理切片机 (德国徕卡公司, 型号 2235); 高速冷冻离心机 (型号 Fresco21)、超纯水机 (型号 12UVUF), 美国 Thermo 公司。

1.4 分组及造模

用 Excel 2019 中的 Rand 函数将 24 只小鼠随机分为空白组, 模型组及如意黑白散大、小剂量组, 每组 6 只。各组小鼠适应性预养 3 天后小鼠背部皮肤约 2 cm×2 cm 刮去毛发。除空白组外, 其余各组小鼠背部去除毛发处涂抹 5% 氢醌溶液 0.5 ml 制备白癜风模型^[7], 每日 2 次, 连续 50 天。空白组背部涂抹生理盐水 0.5 ml, 每日 2 次, 连续 50 天。小鼠皮肤呈苍白或白斑状, 则判断造模成功^[8]。造模第 14 天, 肉眼可见局部出现明显脱色, 皮肤呈苍白或白斑状, 提示造模成功, 之后继续造模至 50 天。本研究小鼠均造模成功。

造模成功后次日即造模第 15 天进行药物干预。如意黑白散大、小剂量组分别给予如意黑白散 7.02、2.34 g/kg 灌胃。按照人和动物间体表面积折算^[9], 将临床人日用量的等效剂量 2.34 g/kg 作为如意黑白散小剂量, 等效剂量的 3 倍 7.02 g/kg 作为如意黑白散大剂量。空白组、模型组予 10 ml/kg 生理盐水灌胃。各组均每日 1 次, 连续灌胃 36 天 (即造模第 50 天)。

1.5 取材

末次给药结束, 禁食禁水 12 h 后眼眶取血处死, 4℃、3000 r/min 离心 10 min (离心半径 9.5 cm), 取血清分装后, -80℃ 保存, 用于 ELISA 法检测。肉眼观察所有小鼠皮损处皮肤情况, 拍照留存。采用随机数字表法各组选取 3 只小鼠, 取病灶皮损处皮肤 2 cm×2 cm 分为 2 份, 分别保存在甲醛及液氮中, 保存在甲醛中的皮肤组织用于 HE 染色、免疫组化的检测, 保存在液氮中的皮肤组织用于免疫荧光检测、实时定量 PCR 检测。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 肉眼观察小鼠皮损处皮肤情况 直接肉眼观察小鼠脱毛区皮肤情况, 并进行评价^[10]。优: 皮损造模区色素基本恢复至正常; 良: 皮损造模区色素部分恢复, 50%≤恢复面积占皮损面积<100%; 中: 皮损造模区色素小部分恢复, 恢复面积占皮损面积<50%; 差: 皮肤无色素再生或范围扩大。

1.6.2 HE 染色观察小鼠皮损组织黑色素颗粒分布情况 小鼠皮损组织切片脱蜡水化, 苏木精染液复染 10 min, 分化后入伊红染液 1 min, 放入乙醇中梯度脱水, 透明处理后中性树胶封片。光学显微镜观察黑色素颗粒分布变化并进行评分^[11]: 表皮基底细胞及棘层均有黑色素分布计 3 分, 表皮基底细

胞及棘层 1/2 以上有黑色素计 2 分, 表皮基底细胞及棘层 1/3~1/2 有黑色素计 1 分, 表皮基底细胞及棘层不足 1/3 黑色素计 0.5 分, 表皮基底细胞及棘层无黑色素计 0 分。

1.6.3 免疫组织化学法检测小鼠皮损组织中 CD3⁺、CD8⁺T 细胞表达 小鼠皮损组织切片脱蜡, 3% H₂O₂ 室温封闭, 蒸馏水冲洗, 抗原修复。加入一抗 (1:500) 4 ℃ 孵育过夜, PBS 冲洗。加入二抗 (1:300) 室温下孵育 1 h。PBS 冲洗, 10 min×3 次, DAB 溶液显色, 苏木素复染, 封片。每张切片取 3 个高倍视野, 用 Image J 2 图像分析软件测定平均光密度值即为 CD3⁺、CD8⁺T 细胞表达。

1.6.4 免疫荧光法检测小鼠皮损组织中 PD-1 表达 切片置于柠檬酸盐缓冲液中 (10 mmol/L 柠檬酸钠, 0.05% 吐温, pH 6.0), 110 ℃ 加热 5 min 进行抗原修复。PBS-T 洗涤 3 次后, 1% BSA 室温封闭 30 min。加一抗 PD-1 (1:200), 4 ℃ 孵育过夜。PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。加二抗 (1:200), 37 ℃ 孵育 30 min。PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。DAPI 复染细胞核后, 用抗荧光淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下观察、拍照。每张图片用 Image J 2 图像分析软件测定阳性区域值即为 PD-1 表达。

1.6.5 实时定量 PCR 检测小鼠皮损组织 PD-L1 mRNA 表达 以 Trizol 充分裂解小鼠皮肤组织, 常规方法提取皮肤组织总 RNA。紫外线分光光度计检测 RNA 样品浓度及纯度, 以 RNA 为模板逆转录合成 cDNA, 用 PCR 仪进行反应, 扩增条件: 预变性 95 ℃ 30 s, 循环 1 次; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 循环 40 次; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 15 s, 循环 1 次。采用 2^{-ΔΔCt} 法对 PCR 结果进行数据分析。引物序列由上海双简生物有限公司合成, β-Actin: 上游引物 (5'→3') 序列为 GGCTGTATTCCCCTC-CATCG, 下游引物 (5'→3') 序列为 CCAGTTGG-TAACAATGCCATGT, 引物长度为 149 bp; PD-L1: 上游引物 (5'→3') 序列为 GCTCCAAAGGACTTG-TACGTG, 下游引物 (5'→3') 序列为 TGATCT-GAAGGGCAGCATTTC, 引物长度为 238 bp。

1.6.6 ELISA 法检测各组小鼠血清中 SOD、TNF-α、TYR 含量 各组小鼠血清按 ELISA 试剂盒步骤进行操作, 检测小鼠血清中 SOD、TNF-α、TYR 的含量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 27.0 软件包进行数据处理, 符合正态分布的计量资料用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐者多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐者多组间比较用 Welch's

检验, 两两比较采用 Games-Howell 检验。偏态分布的计量资料用 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 使用 Kruskal Wallis 多样本秩和检验进行组间比较。计数资料使用 χ^2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肉眼皮损情况比较

空白组造模区域皮肤呈现均匀的灰黑色, 无明显白点、白斑, 模型组小鼠造模区域皮损明显变苍白无色素再生, 如意黑白散大剂量组造模区域皮损出现大面积色素再生, 如意黑白散小剂量组造模区域皮损出现小面积色素再生。各组小鼠皮损情况见附图 1 (请扫描本文二维码获取)。表 1 示, 与空白组比较, 模型组小鼠造模区域皮损明显变苍白, 皮损优良率降低 (P<0.05)。与模型组比较, 如意黑白散大剂量组造模区域皮损大部分恢复至正常, 如意黑白散小剂量组造模区域皮损小面积恢复至正常, 皮损优良率升高 (P<0.05)。与如意黑白散小剂量组比较, 如意黑白散大剂量组造模区域皮损恢复面积更大, 皮损优良率升高 (P<0.05)。

表 1 各组小鼠皮损情况比较

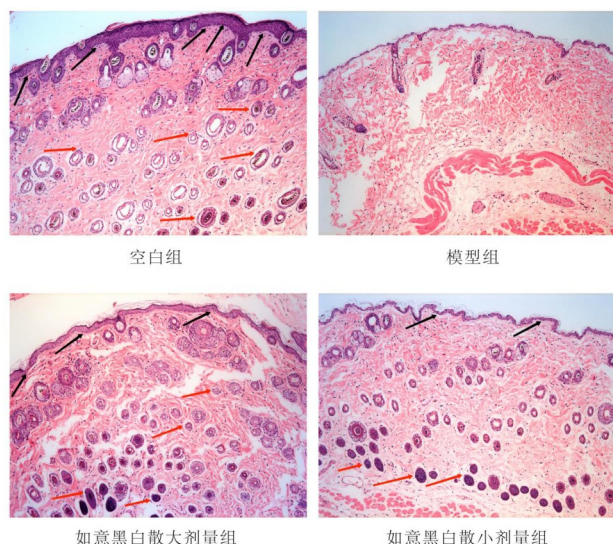
Table 1 Comparison of skin lesions among mice in each group

组别	鼠数	优 /只	良 /只	中 /只	差 /只	优良/只 (%)
空白组	6	6	0	0	0	6 (100)
模型组	6	0	1	1	4	1 (16.7)
如意黑白散大剂量组	6	4	1	1	0	5 (83.3)
如意黑白散小剂量组	6	2	2	1	0	4 (66.7)

2.2 各组小鼠皮损组织黑色素颗粒情况比较

图 1 示, 空白组小鼠皮肤基底细胞及棘层有较多黑色素颗粒, 真皮无炎细胞浸润, 皮肤附属器毛囊皮脂腺丰富。模型组小鼠皮肤表皮内黑色素颗粒明显缺失, 毛囊周围细胞黑色素颗粒也缺失明显, 真皮内有灶性炎细胞浸润, 附属器毛囊皮脂腺明显减少。如意黑白散大剂量组表皮内黑色素颗粒增加, 棘细胞层及基底细胞均出现较多的黑色素颗粒。毛囊周围细胞黑色素颗粒也可以看见, 真皮水肿基本消失, 毛囊皮脂腺数量接近正常。如意黑白散小剂量组表皮内黑色素颗粒开始有所恢复, 但仅仅在棘细胞层内与毛囊周围细胞出现少量黑色素颗粒, 但表皮仍萎缩, 角质层破坏, 真皮轻度水肿, 毛囊皮脂腺数量略有恢复。表 2 示, 与空白组比较, 模型组表皮和毛囊周围细胞黑色素颗粒明显减少 (P<0.05), 真皮内灶炎细胞浸润, 毛囊皮脂

腺明显减少。与模型组比较,如意黑白散大剂量组棘细胞层、基底细胞及毛囊黑色素颗粒增多 ($P < 0.05$),真皮水肿基本消失,毛囊皮脂腺数量接近正常;如意黑白散小剂量组棘细胞层内出现黑色素颗粒增多 ($P < 0.05$),毛囊皮脂腺数量较少。与如意黑白散小剂量组比较,如意黑白散大剂量组棘细胞层及基底细胞以及毛囊黑色素颗粒增多 ($P < 0.05$)。



注:图中黑色箭头指示为棘细胞层及基底细胞的黑色素颗粒;红色箭头指示为毛囊处的黑色素颗粒。

图1 各组小鼠皮损病理学形态 (HE染色, $\times 100$)

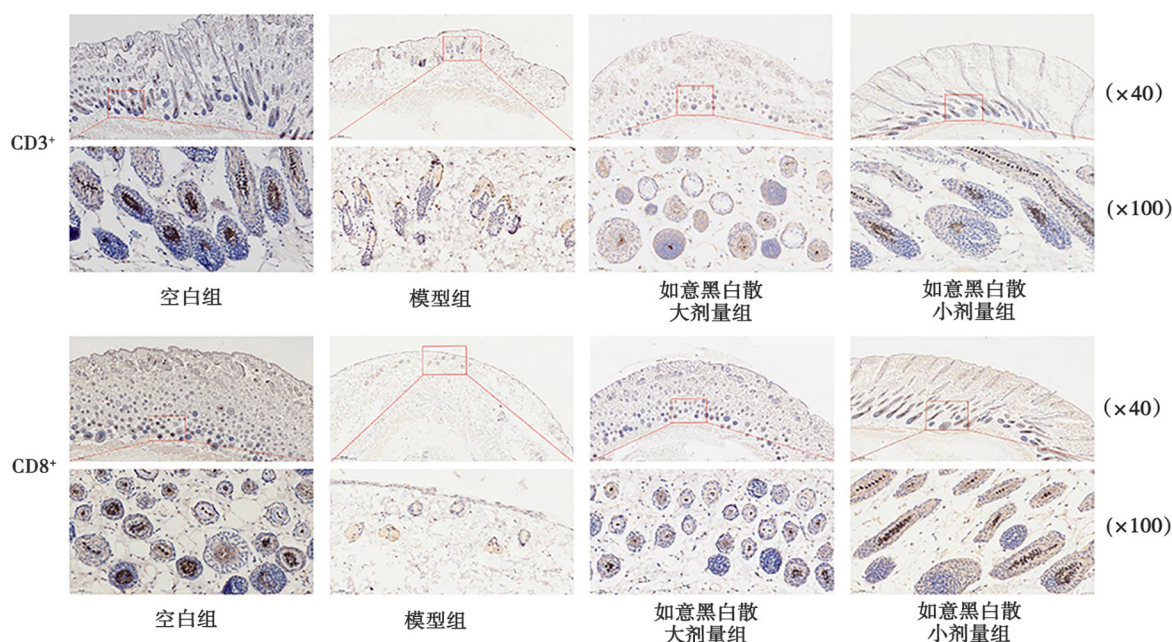
Figure 1 Pathological morphology of skin lesions in mice in each group (HE staining, $\times 100$)

2.3 各组小鼠皮损组织中 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表达比较

图2示,空白组小鼠皮肤组织基底细胞以及真皮间质中见少量棕染 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞浸润,模型组见大量棕染 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞浸润,如意黑白散大剂量组见较少量棕染 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞浸润,如意黑白散小剂量组见较大量棕染 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞浸润。表2示,与空白组比较,模型组小鼠皮损组织 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表达增多 ($P < 0.05$);与模型组比较,如意黑白散大、小剂量组皮损组织 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表达减少 ($P < 0.05$);与如意黑白散小剂量组比较,如意黑白散大剂量组皮损组织 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表达减少 ($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠皮损组织中 PD-1 表达比较

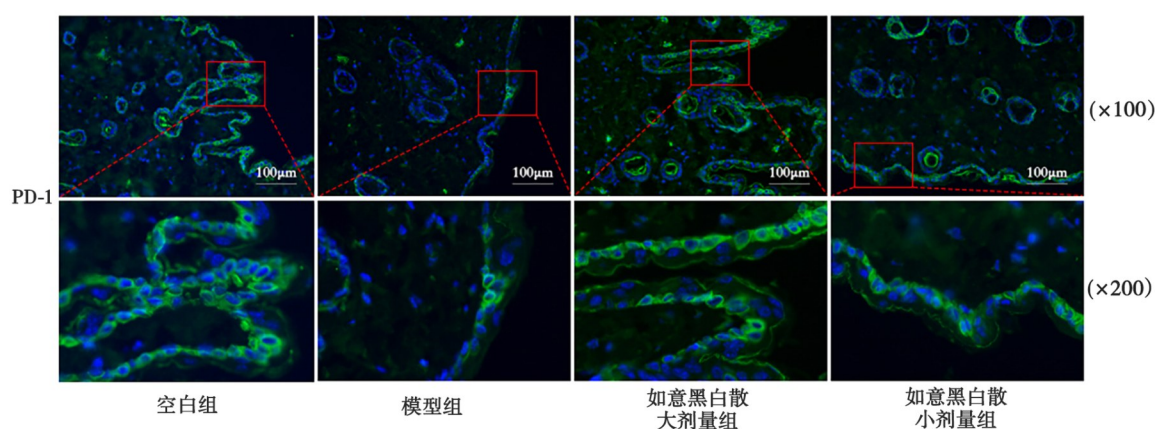
图3示,空白组小鼠皮肤组织中见大量绿色荧光 (PD-1) 表达,模型组见少量绿色荧光 (PD-1) 表达,如意黑白散大剂量组见较大量绿色荧光 (PD-1) 表达,如意黑白散小剂量组见较少量绿色荧光 (PD-1) 表达。表2示,与空白组比较,模型组小鼠皮损组织中 PD-1 表达减少 ($P < 0.05$);与模型组比较,如意黑白散大、小剂量组皮损组织中 PD-1 表达均增加 ($P < 0.05$);与如意黑白散小剂量组比较,如意黑白散大剂量组皮损组织中 PD-1 表达增加 ($P < 0.05$)。



注:图中指示为 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞在基底细胞与真皮间质中的表达

图2 各组小鼠皮损组织 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表达 (免疫组化法)

Figure 2 Expression of $CD3^+$ and $CD8^+$ T cells in skin lesion tissue of mice in each group (immunohistochemistry method)



注：PD-1，程序性死亡受体 1。

图 3 各组小鼠皮损组织中 PD-1 表达（免疫荧光法）

Figure 3 PD-1 expression in skin lesion tissues of mice in each group (immunofluorescence method)

2.5 各组小鼠皮损组织中 PD-L1 mRNA 表达比较

表 2 示，与空白组比较，模型组小鼠皮损组织中 PD-L1 mRNA 表达减少 ($P<0.05$)；与模型组比较，如意黑白散大、小剂量组 PD-L1 mRNA 表达增加 ($P<0.05$)；与如意黑白散小剂量组比较，如意黑白散大剂量组 PD-L1 表达增加 ($P<0.05$)。

2.6 各组小鼠血清 TYR、SOD、TNF- α 含量比较

表 3 示，与空白组比较，模型组小鼠血清 TYR 含量显著下降，SOD 和 TNF- α 含量显著升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，如意黑白散大、小剂量组 TYR 水平显著升高，SOD 和 TNF- α 含量显著下降 ($P<0.05$)；与如意黑白散小剂量组比较，如意黑

白散大剂量组 TYR 含量显著升高，SOD 和 TNF- α 含量显著下降 ($P<0.05$)。

3 讨论

白癜风是一种多因素疾病，目前现代医学主要治疗方法有物理治疗（窄谱中波紫外线、光化学疗法、单色外向光），局部治疗（皮质醇激素、钙素类抑制剂），全身治疗（皮质类固醇）、免疫调节剂、维生素 D 以及外科手术（自体表皮移植术）等。中医学很早即有对本病的认识，如《诸病源候论》指出其病机为：“风邪搏于皮肤，气血不和，脉络瘀阻”；《太平圣惠方》将本病归入“诸风门”类，曰“此皆风之与热伏留肌腠之间，气血不和，

表 2 各组小鼠皮损组织黑色素颗粒评分，CD3⁺、CD8⁺、PD-1 表达及 PD-L1 mRNA 表达比较

Table 2 Comparison of melanin granule scores, CD3⁺, CD8⁺, PD-1 expression and PD-L1 mRNA expression in skin lesion tissue of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	黑色素颗粒/分	CD3 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	PD-1/%	PD-L1 mRNA/2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}
空白组	3	3.00 $\pm$ 0.00	4.34 $\pm$ 0.57	4.06 $\pm$ 0.35	5.25 $\pm$ 0.72	1.00 $\pm$ 0.00
模型组	3	0.50 $\pm$ 0.45 ^{a)}	24.61 $\pm$ 1.03 ^{a)}	19.70 $\pm$ 0.64 ^{a)}	1.34 $\pm$ 0.29 ^{a)}	0.05 $\pm$ 0.02 ^{a)}
如意黑白散大剂量组	3	1.67 $\pm$ 0.52 ^{b) c)}	10.34 $\pm$ 0.72 ^{b) c)}	13.98 $\pm$ 0.61 ^{b) c)}	4.33 $\pm$ 0.82 ^{b) c)}	0.52 $\pm$ 0.09 ^{b) c)}
如意黑白散小剂量组	3	0.92 $\pm$ 0.67 ^{b)}	18.41 $\pm$ 0.70 ^{b)}	16.71 $\pm$ 0.99 ^{b)}	3.69 $\pm$ 1.03 ^{b)}	0.16 $\pm$ 0.04 ^{b)}

注：PD-1，程序性死亡受体 1；PD-L1，细胞程序性死亡配体 1。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与如意黑白散小剂量组比较， $P<0.05$ 。

表 3 各组小鼠血清 TYR、SOD、TNF- α 含量比较

Table 3 Comparison of serum TYR, SOD, and TNF- α contents of mice in each group ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	SOD	TYR	TNF- α
空白组	6	190.56 $\pm$ 14.93	30.83 $\pm$ 2.38	111.19 $\pm$ 1.92
模型组	6	242.42 $\pm$ 11.07 ^{a)}	21.98 $\pm$ 2.61 ^{a)}	133.64 $\pm$ 6.69 ^{a)}
如意黑白散大剂量组	6	210.39 $\pm$ 14.48 ^{b) c)}	26.60 $\pm$ 2.81 ^{b) c)}	119.15 $\pm$ 6.17 ^{b) c)}
如意黑白散小剂量组	6	222.56 $\pm$ 19.53 ^{b)}	24.72 $\pm$ 4.26 ^{b)}	126.92 $\pm$ 3.60 ^{b)}

注：SOD，超氧化物歧化酶；TYR，酪氨酸酶；TNF- α ，肿瘤坏死因子 α 。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与如意黑白散小剂量组比较， $P<0.05$ 。

乃生斯疾也”。可见风热之邪导致的气血不和为白癜风主要外在致病因素。《中医外科学》中进一步提出白癜风发病的内在因素为“肝肾不足，皮毛腠理失养而发斑”^[12]，也有文献报道补益肝肾治疗本病效佳^[13-14]。综上，白癜风治当祛风活血、除湿清热、补益肝肾。如意黑白散中墨旱莲能滋补肝肾之阴，白芷祛风活血，其呋喃香豆素类化合物为“光活性物质”，可以治疗白癜风^[15]；沙蒺藜补益肝肾，刺蒺藜疏散肝经之风热，又可活血祛风，刺蒺藜的主要成分蒺藜皂苷具有抗氧化的作用，可增加氧化应激下黑色素细胞的活力，减少其凋亡，通过抗氧化起到保护黑色素细胞的作用^[16]；丹参为活血化瘀要药，能减少皮损部位 CD8⁺T 淋巴细胞浸润，促进黑色素细胞黏附，改变迁移途径，从而对白癜风具有良好的治疗作用^[17]；紫草清热活血解毒，透疹消斑；苦参、重楼均具有清热解毒除湿之功，为诸多皮肤顽疾所常用；苍术具有祛风燥湿的功效。各药协同具有祛风活血、除湿清热、补益肝肾之功。本研究发现，如意黑白散大、小剂量组白斑皮损较模型组减轻，皮损黑色素颗粒增加，在光镜下棘细胞层及基底细胞以及毛囊周围细胞可见较多黑色素颗粒，其他部位皮肤未见明显改变，表明该方治疗白癜风有较好的疗效。

在白癜风白斑区，皮肤黑色素细胞丧失的同时，还常常伴随着 CD8⁺T 淋巴细胞的浸润^[18]。CD8⁺T 细胞功能亢进是诱发白癜风的重要原因^[19-20]，干预 CD8⁺T 细胞向皮肤迁移是白癜风治疗的新策略。本实验中，模型组小鼠皮损处皮肤变白，病理显示表皮和毛囊周围细胞黑色素颗粒缺失明显，皮损中 CD3⁺、CD8⁺T 细胞表达显著升高，同时伴有 CD8⁺T 细胞分泌的相关细胞因子 TNF- α 的含量增加，TYR 含量降低，SOD 含量增高，与文献^[21-22]中 CD8⁺T 细胞特异性识别黑色素细胞分化抗原 TYR，分泌炎症因子介导皮损处的黑色素细胞凋亡，诱发白癜风的机制一致，表明本实验模型造模成功。TNF- α 可以引发黑色素细胞凋亡，降低黑色素生成，导致白癜风患者色素脱失^[23-24]。TYR 在黑色素生成中起到了关键的作用，其活性降低导致黑色素生成功能障碍^[25]，同时，黑色素的减少与丧失会使得抗氧化活性降低，可以影响 SOD 活性^[26]。而如意黑白散大、小剂量组皮损黑色素颗粒增多，同时皮肤组织中的 CD3⁺、CD8⁺T 细胞表达量显著下降，血清中 TYR 含量显著升高，SOD 和 TNF- α 含量显著下降，表明本方可能是通过抑制

CD8⁺T 细胞在皮损处的浸润和激活，降低 CD3⁺、CD8⁺T 细胞表达量，减少识别黑色素细胞分化抗原 TYR，降低炎症因子 TNF- α 的分泌，从而减少皮损处的黑色素细胞凋亡，提高了抗氧化活性，降低应激性升高的 SOD，从而治疗白癜风。

CD8⁺T 的过度激活与免疫检查点 PD-1 的失活密切相关^[27]。研究^[28]表明，PD-1 作为活化 T 细胞表面的一种抑制性受体，通过与其配体 PD-L1 结合，所传递的免疫抑制信号可负向调节 T 细胞的增殖、细胞因子分泌及细胞毒功能。此外 PD-1 还被认为是衰竭 T 细胞的标志分子^[29]。有研究^[30]用 PD-1/PD-L1 信号传导作为白癜风的治疗靶点，PD-L1 融合蛋白通过显著增加皮肤调节性 T 细胞和减少 CD8⁺T 细胞来逆转白癜风小鼠的色素脱失。本实验中，模型组 PD-1、PD-L1 的表达量均较空白组显著下降，说明 PD-1/PD-L1 信号通路的失活，且其在白癜风皮损处 CD8⁺T 细胞的异常活化中可能起到负向调节的作用；用如意黑白散大、小剂量后可以增加白癜风小鼠皮损组织中的 PD-1 及 PD-L1 的表达，表明如意黑白散可能有效激活白癜风皮损处 PD-1/PD-L1 免疫检查点通路，从而减少 CD8⁺T 细胞的过度激活，且大剂量效果更佳。

综上所述，如意黑白散可有效恢复白癜风小鼠皮肤黑色素含量，其作用机制可能与激活白癜风皮损组织 PD-1/PD-L1 信号通路，抑制 CD8⁺T 细胞的浸润与活性，调节 SOD、TNF- α 、TYR 等因子的含量，从而减少 T 细胞介导的自身免疫对黑色素细胞的破坏有关。本实验还存在一些不足：观察的时间偏短，样本量偏少，通路的其他关键因子未研究，将在以后的研究中进一步深化。

参考文献

- [1] EZZEDINE K, ELEFThERiADOU V, WHITTON M, et al. Vitiligo[J]. Lancet, 2015, 386(9988): 74-84.
- [2] KRÜGER C, SCHALLREUTER KU. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults[J]. Int J Dermatol, 2012, 51(10): 1206-1212.
- [3] SCHILD M, MEURER M. Vitiligo: clinical presentation and pathogenesis [J]. Hautarzt, 2016, 67(2): 173-186.
- [4] MASSI D, BRUSA D, MERELLI B, et al. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics[J]. Ann Oncol, 2014, 25(12): 2433-2442.
- [5] 王莉. PD-1/PD-L1 信号通路对白癜风 CD8⁺杀伤性 T 细胞功能影响的机制研究[D]. 西安: 空军军医大学,

- 2018.
- [6]王德文. 如意黑白散治疗白癜风的临床观察[J]. 中国卫生产业, 2014, 11(7): 75-76.
- [7]LERNER AB, SHIOHARA T, BOISSY RE, et al. A mouse model for vitiligo [J]. J Invest Dermatol, 1986, 87 (3): 299-304.
- [8]中华中医药学会, 中药实验药理专业委员会. 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.
- [9]徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1535.
- [10]中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会色素病学组. 白癜风临床分型及疗效标准(草案)[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 37(7): 440.
- [11]龙子江, 白玫, 樊彦. 等. 化学脱色法制备白癜风动物模型[J]. 安徽中医学院学报, 1997, 16(6): 60-61.
- [12]朱仁康. 中医外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 341.
- [13]郭昕炜, 李萍, 陶毅等. 张志礼治疗白癜风经验[J]. 中医杂志, 2020, 61(5): 400-402.
- [14]王亚梅, 康永, 张锁. 温阳散寒、补益肝肾治疗白癜风[J]. 中医杂志, 2019, 60(5): 436-437.
- [15]田硕, 武晏屹, 白明, 等. 白芷治疗白癜风作用机制的网络药理学分析[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (8): 1147-1153.
- [16]刘国艳. 蒺藜首乌汤治疗白癜风及蒺藜皂苷对黑素细胞的影响机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
- [17]祝逸平, 尉晓冬, 金嵘, 等. 丹参对体内外CD8⁺T细胞抑制作用及白癜风小鼠的治疗作用[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(3): 541-543.
- [18]VAN DEN BOORN JG, KONIJNENBERG D, DELLEMIJN TA, et al. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients [J]. Invest Dermatol, 2009, 129(9): 2220-2223.
- [19]YE B, LIU X, LI X, et al. T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance[J]. Cell Death Dis, 2015, 6(3): e1694.
- [20]ZHANG BX, LIN M, QI XY, et al. Characterization of circulating CD8⁺ T cells expressing skin homing and cytotoxic molecules in active non-segmental vitiligo [J]. Eur J Dermatol, 2013, 23(3): 331-338.
- [21]吴美余. 瘦素对CD8⁺T细胞的调控作用及其在白癜风发病中的作用研究[D]. 长沙: 中南大学, 2022.
- [22]王樱翰. 衣康酸抑制白癜风DC及CD8⁺T细胞免疫应答的作用及机制研究[D]. 西安: 空军军医大学, 2022.
- [23]DWIVEDI M, LADDHA NC, BEGUM R. Correlation of increased MYG1 expression and its promote polymorphism with disease progression and higher susceptibility in vitiligo patients [J]. J Dermatol Sci, 2013, 71 (3): 195-202.
- [24]ALGHAMDI KM, KUMAR A, TAIEB A, et al. Assessment methods for the evaluation of vitiligo [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012, 26(12): 1463-1471.
- [25]QI F, LIU F, GAO L. Janus kinase inhibitors in the treatment of vitiligo. A review [J]. Front Immunol, 2021, 12: 790125. doi: 10.3389/fimmu.2021.790125.
- [26]CUSTURONE P, DI BARTOLOMEO L, IRRERA N, et al. Role of cytokines in vitiligo: pathogenesis and possible targets for old and new treatments [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11429.
- [27]MIGUEL FS, NIE XX, CHEN LP, et al. A burned-out CD8⁺ T-cell subset expands in the tumor microenvironment and curbs cancer immunotherapy [J]. Cancer Discov, 2021, 11(7): 1700-1715.
- [28]刘亭亭, 刘红, 张福仁. 免疫检查点在皮肤肿瘤中的研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2022, 38(10): 752-758.
- [29]TANG ZS, HAO YH, ZHANG EJ, et al. CD28 family of receptors on T cells in chronic HBV infection: Expression characteristics, clinical significance and correlations with PD-1 blockade [J]. Mol Med Reports, 2016, 14 (2): 1107-1116.
- [30]XIAO M, RONG X, BIN F, et al. PD-L1 reverses depigmentation in Pmel-1 vitiligo mice by increasing the abundance of Tregs in the skin [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1605.

Effect of *Ruyi Heibai Power* (如意黑白散) on PD-1/PD-L1 Signaling Pathway in Skin Lesion Tissue of Vitiligo Model Mice

WU Yunsha¹, ZHANG Xingxing², WANG Haidan², WU Ling², ZHANG Ruijuan¹, JIN Yu²

1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029; 2. Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Ruyi Heibai Power* (如意黑白散, RHP) in the treatment of vitiligo. **Methods** Twenty-four C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, model group, high-dose and low-dose RHP groups, with 6 mice in each group. Model group, high- and low-dose RHP groups were

all applied hydroquinone to establish vitiligo animal model. After modeling, High- and low-dose RHP groups were given 7.02 g/kg and 2.34 g/kg of RHP by gavage, respectively, while the blank group and model group were intragastrically given 10ml/kg of normal saline, once a day for 36 days. After administration, the skin lesions were observed with naked eye, and HE staining was used to observe the melanin content of the skin lesions. Immunohistochemistry was used to determine the expression of CD3⁺ and CD8⁺ T cells in skin tissue. Immunofluorescence staining was used to measure the expression of programmed death receptor 1 (PD-1) in the skin lesion tissue. RT-PCR was used to detect programmed cell death ligand 1 (PD-L1) mRNA expression. ELISA was used to detect serum superoxide dismutase (SOD), tumor necrosis factor (TNF- α), and tyrosinase (TYR) levels. **Results** Compared to those in the blank group, the skin of the mice in the model group was pale, and the melanin content was significantly reduced under the microscope after HE staining; the rate of excellent and good skin lesions decreased, and the melanin granules in the cells around the epidermis and hair follicles decreased significantly; the expression of CD3⁺ and CD8⁺ T cells in skin tissue increased significantly, and the expressions of PD-L1 mRNA and PD-1 decreased; the content of TYR decreased, while the content of SOD and TNF- α increased ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the skin color of high- and low-dose RHP groups were deepened, and the melanin content increased; the rate of excellent and good skin lesions increased, as well as the melanin granules in the spinous cell layer, basal cells and hair follicles; the expression of CD3⁺ and CD8⁺ T cells in the skin lesions decreased, while PD-L1 mRNA and PD-1 expression increased; the content of TYR increased, while the content of SOD and TNF- α decreased ($P < 0.05$). Compared to the low-dose RHP group, the high-dose group had a larger pigment recovery area in the modeling area, an increased rate of excellent and good skin lesions, an increase in spinous cell layer, basal cells, and hair follicle melanin granules, a decrease in CD3⁺ and CD8⁺ T cells expression, an increase in the expression of PD-L1 mRNA and PD-1, an elevated TYR content, and decreased SOD and TNF- α contents ($P < 0.05$). **Conclusion** RHP can increase skin melanin content of vitiligo mice. The mechanism of action may be related to activating the PD-1/PD-L1 signaling pathway, and then reducing the destruction of melanocytes by T cell-mediated autoimmunity.

Keywords vitiligo; melanin; *Ruyi Heibai Powder* (如意黑白散); programmed death receptor 1; programmed death ligand 1; T cells

(收稿日期: 2023-02-04; 修回日期: 2023-12-30)

[编辑: 王利芬]

广告

欢迎邮购《中医杂志》过刊

2000、2001 年合订本每本 100 元, 2002、2003 年合订本每本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本, 每本 140 元。2011(缺 5、6 期)—2013 年每册 9.80 元, 2014(缺 21 期)—2017 年(缺 3、5、15、18 期)每册 15 元, 2018 年(缺 5、7、9 期)每册 20 元, 2020 年(缺 7、8、9 期)每册 20 元, 2021 年每册 20 元。2022、2023 年每册 30 元。2011—2013 年合订本, 每年 4 本, 全年 280 元; 2014 年合订本, 共 4 本, 全年 400 元; 2018—2021 年合订本, 每年 4 本, 全年 600 元; 2022 年合订本, 共 4 本, 全年 800 元; 2023 年上半年合订本, 2 本, 400 元。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。

以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号, 收款人: 中医杂志社

或关注《中医杂志》官方微信 (zyzzgzh) 购买。邮编: 100700, 电话: (010)64089195。