

基于 CREB/MITF 信号通路探讨川芎总生物碱与益母草总生物碱配伍改善黄褐斑的作用

孙露瑶¹, 王代波¹, 余倩¹, 田云才², 曹小玉¹, 熊亮¹, 周勤梅^{1*}, 彭成^{1*}
(1. 成都中医药大学, 四川 成都 611137; 2. 上海致臻志臣科技有限公司, 上海 201415)

摘要: **目的** 研究川芎总生物碱与益母草总生物碱的最佳配伍比例, 并阐明川芎总生物碱与益母草总生物碱配伍改善实验性黄褐斑模型的作用。**方法** 体外实验观察川芎总生物碱与益母草总生物碱不同配伍比例 (5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5) 对小鼠黑色素瘤 B16 细胞增殖的影响, 同时结合 Chou-Talalay 技术计算联合指数 (CI) 并筛选最佳配伍比例, 并探讨最佳配伍比例对 B16 细胞酪氨酸酶活性和黑色素水平的影响。体内实验采用黄体酮注射联合中波紫外线照射的方法对 C57BL/6 小鼠耳廓进行造模, 检测小鼠耳廓组织 SOD 活性和 MDA 水平, Masson-Fontana 染色观察耳廓组织黑色素分布情况, Western blot 法检测耳廓组织 CREB、p-CREB、TRP1、TRP2、MITF、TYR 蛋白表达。**结果** 在体外实验中, 川芎总生物碱与益母草总生物碱配伍可以有效抑制 B16 细胞增殖, 其中川芎总生物碱-益母草总生物碱比例为 1:2 时 IC₅₀ 和 CI 值最低, 具有最优协同效应, 为最佳配伍比例。与对照组比较, 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍可有效抑制 B16 细胞酪氨酸酶活性和黑色素水平 ($P<0.05$, $P<0.01$)。在体内实验中, 与正常组比较, 模型组小鼠耳廓组织中黑色素分布增多 ($P<0.01$), SOD 活性降低 ($P<0.01$), MDA 水平升高 ($P<0.01$), 耳廓组织 p-CREB、TRP1、TRP2、MITF、TYR 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与模型组比较, 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍可减少小鼠耳廓组织中黑色素分布 ($P<0.01$), 升高 SOD 活性 ($P<0.01$), 降低 MDA 水平 ($P<0.05$), 降低耳廓组织 p-CREB、TRP1、TRP2、MITF、TYR 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 川芎总生物碱与益母草总生物碱配伍可以抑制 B16 细胞增殖, 有效改善小鼠黄褐斑, 其机制可能与调控 CREB/MITF 信号通路抑制黑色素生成有关。

关键词: 川芎; 益母草; 配伍; 黄褐斑; 黑色素瘤细胞; CREB/MITF 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)04-1311-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.04.035

黄褐斑是一种常见的获得性皮肤病, 其特征是皮肤黑色素沉着过度, 主要表现为日光暴露皮肤区域出现边界不清晰且形状不规则的黄褐色或黑色斑片, 对患者的外貌、心理和情绪产生不良影响^[1-2]。目前已有多种关于黄褐斑的治疗策略, 包括药物治疗、化学换肤和激光治疗等, 但效果往往达不到期望, 且因各种不良反应 (如皮肤刺激和皮炎) 而受到限制^[3-4]。近年来, 植物提取物因其独特的生物活性被广泛应用于化妆品配方中, 这些天然化合物具有良好的抗紫外线、抗氧化、抗炎、抗衰老等作用, 且不良反应较少, 因此被认为具有很强的开发和应用潜力^[5-6]。

中医学将黄褐斑归属于“面尘”“黧黑斑”

“蝴蝶斑”范畴, 其主要病机是气血失和, 多为瘀结所致, 活血化瘀为主要治则^[7]。川芎和益母草均具有活血的功效, 在中医祛斑美白方中广泛应用。现代研究表明, 川芎和益母草具有抗炎、抗氧化、抗衰老等药理作用, 其提取物对酪氨酸酶有良好的抑制作用^[8-9]。因此, 川芎和益母草在美白祛斑产品开发上具有一定价值。基于此, 本研究拟探讨川芎-益母草提取物配伍在体外对黑色素瘤 B16 细胞的抑制作用和体内改善小鼠黄褐斑的作用, 期为天然药物的开发提供重要的依据。

1 材料

1.1 药物 川芎总生物碱 (批号 202201021)、益母草总生物碱 (批号 202201022) 均由成都中医药

收稿日期: 2025-07-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82374152); 国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点项目 (U24A20790); 国家中医药多学科交叉创新团队项目 (ZYXCXTD-D-202209); 四川省中医药科技产业创新团队 (2022C001)

作者简介: 孙露瑶 (1996—), 女, 博士在读, 研究方向为方剂学。E-mail: 1300062939@qq.com

* 通信作者: 周勤梅 (1988—), 女, 博士, 高级实验师, 研究方向为中药药效与物质基础。E-mail: zhqmyx@sina.cn

彭成 (1964—), 博士, 研究员, 研究方向为中药药效与毒理。E-mail: pengchengchengdu@126.com

大学化学实验室提供。氢醌乳膏购自广东人人康药业有限公司,批号 20230203,国药准字 H20040088;黄体酮注射液购自浙江仙琚制药股份有限公司,批号 FB2229。

1.2 细胞系和动物 小鼠黑色素瘤 B16 细胞,由武汉普赛诺生命科技有限公司提供,批号 Procell CL-0029。SPF 级 C57BL/6 小鼠 48 只,雌性,体质量 (20±2) g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[实验动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0010],饲养于成都中医药大学[实验动物使用许可证号 SYXK(川)2020-0124],以标准鼠饲料常规饲养,自由进食饮水。本实验经成都中医药大学伦理委员会批准(伦理批准号 2022-67)。

1.3 试剂 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成科技有限公司,批号 R0204、20230628); GAPDH、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)、磷酸化 CREB(p-CREB)、小眼畸形相关转录因子(MITF)、酪氨酸酶(TYR)、TYR 相关蛋白 1(TRP1)、TRP2 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号 3522122856、0003310201、6100002558、0065040301、5500016775、1163470101、0209680301)。

1.4 仪器 ME204E 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 纯水仪(四川优普超纯科技有限公司); Allegra X-30R 离心机(美国贝克曼库尔特有限公司); 紫外线光疗仪(上海希格玛高技术有限公司); 自动多功能微孔板检测系统(美国 Molecular Devices 公司); WIX-EP600 电泳仪[韦克斯科技(北京)有限公司]; Tanon-5200 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 药物配制 称取 50 mg 川芎总生物碱和 100 mg 益母草总生物碱,溶于 50% DMSO 配制成 100 mg/mL 的母液,微孔滤膜过滤,4 °C 保存。

2.1.2 细胞培养和传代 在无菌条件下,将 B16 细胞接种于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI-1640 培养基或 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞生长至 80%~90% 融合状态时,用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.05% EDTA)消化细胞,并传代培养至对数生长期。

2.1.3 细胞增殖检测 按照川芎总生物碱和益母草总生物碱比例 1:0、0:1、5:1、4:1、3:1、

2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5,配制成两药相加最终质量浓度为 0.25、0.5、1、1.5、2、4 mg/mL 的含药完全培养基。取对数生长期细胞,用新鲜培养基调整细胞密度为 5×10⁴个/mL,接种到 96 孔板中,每孔 100 μL,培养过夜后弃去上清,更换为含药完全培养基,同时设置不加药的对照组和 不加药也不加细胞的空白组,每组 3 个复孔。培养 48 h, PBS 清洗 3 次后更换含有 10% CCK-8 的新鲜培养基,避光孵育培养 3 h,于 450 nm 波长处检测各孔光密度(OD)值。使用 CompuSyn 软件计算联合作用指数(combination index, CI)值^[10-11],其中 CI>1 为拮抗作用,CI=1 为相加作用,CI<1 为协同作用。计算细胞抑制率,公式为细胞抑制率=[(对照孔 OD_{450 nm}-实验孔 OD_{450 nm})/(对照孔 OD_{450 nm}-空白孔 OD_{450 nm})]×100%。

2.1.4 细胞 TYR 活性检测 取对数生长期细胞(5×10⁴个/mL)接种到 96 孔板中,每孔 100 μL,培养过夜后弃去上清,更换为川芎总生物碱和益母草总生物碱比例 1:2 最终质量浓度为 50、100、200、300 μg/mL 的含药培养基,同时设置不加药的对照组和 不加药也不加细胞的空白组,每组 3 个复孔,给药 48 h 后弃上清液,用 PBS 清洗 3 次,每孔加入 90 μL 含 1% Triton X-100 的 PBS 以及 10 μL 1 mg/mL 左旋多巴(L-DOPA),37 °C 孵育 60 min 后,于 475 nm 波长处测定各孔 OD 值。TYR 活性=(试验孔 OD_{475 nm}-空白孔 OD_{475 nm})/(对照孔 OD_{475 nm}-空白孔 OD_{475 nm})×100%。

2.1.5 细胞黑色素生成检测 取对数生长期细胞(1×10⁵个/mL)接种到 6 孔培养板中,每孔 2 mL,培养过夜后弃去上清,按“2.1.4”项下分组给药,48 h 后收集细胞,加入 1 mL 含 10% DMSO 的 1 mol/L NaOH,80 °C 水浴加热 1 h,分别移入 96 孔培养板中,用酶标仪测定 405 nm 波长处各孔 OD 值,计算黑色素水平,公式为黑色素水平=[(实验孔 OD_{405 nm}-空白孔 OD_{405 nm})/(对照孔 OD_{405 nm}-空白孔 OD_{405 nm})]×100%。

2.2 体内实验

2.2.1 药物配制 参考临床用药,成人(60 kg)每日所需川芎(9 g)与益母草(18 g)的总生药量为 27 g,根据提取得率折算人每天所需总生物碱量并换算成小鼠用药剂量,将川芎总生物碱和益母草总生物碱按照 1:2 溶于 5% PEG-400 配制成质量浓度为 81、162、324 mg/mL 的溶液,再将药物

溶于3%羧甲基纤维素钠配制成20 mL的药液，最终给药质量浓度为4.05、8.1、16.2 mg/mL，给药低、中、高剂量分别为0.41、0.81、1.62 mg/cm²。

2.2.2 分组、造模及给药 将小鼠随机分为正常组、模型组、氢醌乳膏组和川芎总生物碱-益母草总生物碱1:2配伍低、中、高剂量组，每组8只。采用紫外线照射配合黄体酮注射的方法对小鼠耳廓进行造模^[12]。除正常组外，其余各组均以波长为280~320 nm的中波紫外线照射小鼠耳廓皮肤30 min，光源距离小鼠20 cm，每天1次，连续照射30 d。同时，正常组小鼠肌肉注射灭菌注射用水2 mL/kg，其余各组小鼠均肌肉注射黄体酮注射液20 mg/kg，每天1次，两腿交替进行，连续30 d。造模结束后，正常组与模型组在耳廓涂抹空白基质，氢醌乳膏组涂抹氢醌乳膏，1:2配伍各剂量组均匀涂抹相应浓度药物。

2.2.3 标本采集 于末次给药后禁食不禁水24 h，处死后剪取各组小鼠耳廓造模组织，取部分耳廓组织于4%多聚甲醛中固定备用，其余耳廓组织于-80℃冰箱保存备用。

2.2.4 耳廓组织SOD活性和MDA水平检测 称取耳廓组织20 mg，加入200 μL RIPA裂解液，冷冻研磨后取上清液，根据试剂盒说明书检测小鼠耳廓组织SOD活性和MDA水平。

2.2.5 Masson-Fontana染色观察耳廓组织黑色素分布 耳廓组织固定切片后加入Fontana氨银避光浸染，然后使用蒸馏水浸洗，硫代硫酸钠处理和自来水冲洗，随后进行无水乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封固。采用Image J软件测量黑色素积分光密度(IOD)，并计算黑色素相对分布水平，公式为黑色素相对分布水平 = 实验组 IOD/正常组 IOD。

2.2.6 Western blot法检测耳廓组织CREB通路相关蛋白表达 称取耳廓组织20 mg，加入200 μL蛋白裂解液(RIPA:磷酸酶抑制剂:PMSF = 100:1:1)，冷冻研磨，提取总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度，取等质量蛋白进行变性后冻存备用。根据说明书制备PAGE凝胶，上样，电泳，冰浴转膜，室温封闭，加入一抗(1:2 000稀释)4℃孵育过夜，次日TBST清洗3次后加入二抗(1:5 000稀释)室温孵育1 h。采用凝胶成像系统对显影液浸泡后的PVDF膜曝光、拍照，并使用Image J软件分析蛋白条带灰度值。

2.3 统计学分析 通过GraphPad Prism软件进行处理，计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 体外实验

3.1.1 川芎总生物碱和益母草总生物碱配伍对B16细胞增殖的影响 川芎总生物碱和益母草总生物碱可以有效抑制B16细胞增殖，半数抑制浓度(IC₅₀)分别为(2.30 ± 0.03)、(0.91 ± 0.02) mg/mL。川芎总生物碱-益母草总生物碱比例5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5均能有效抑制B16细胞增殖，使用CompuSyn软件计算其IC₅₀值分别为(1.83 ± 0.08)、(1.46 ± 0.04)、(1.34 ± 0.17)、(1.11 ± 0.08)、(0.90 ± 0.04)、(0.74 ± 0.02)、(0.83 ± 0.02)、(1.04 ± 0.07)、(1.03 ± 0.09) mg/mL; CI指数分别为1.00 ± 0.04、0.83 ± 0.01、0.81 ± 0.10、0.73 ± 0.05、0.69 ± 0.03、0.65 ± 0.02、0.78 ± 0.02、1.00 ± 0.08、1.03 ± 0.11。川芎总生物碱-益母草总生物碱比例1:2的IC₅₀和CI值均最低，此比例联合用药的协同效应最佳，故选择此比例进行后续实验。根据软件计算得到的CI值绘制各比例联合用药指数图，见图1。

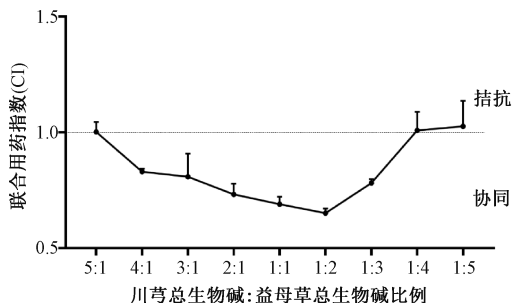


图1 川芎总生物碱和益母草总生物碱各配伍比例的联合指数(CI)

3.1.2 川芎总生物碱和益母草总生物碱1:2配伍对B16细胞TYR活性的影响 由表1可知，川芎总生物碱-益母草总生物碱1:2配伍对B16细胞内TYR的活性具有一定抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)，TYR的活性随药物质量浓度的升高而降低，呈现出一定剂量依赖关系。将对照组的TYR活性视为100%，当药物质量浓度为50、100、200、300 μg/mL时，细胞内TYR活性较对照组分别降低了22.48%、35.96%、50.17%、59.44%。由此推测，川芎总生物碱和益母草总生物碱配伍可

能在一定程度上通过抑制细胞 TYR 活性来发挥美白的功效。

表 1 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍对 B16 细胞 TYR 活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	TYR 酶活性/%
对照组	—	100.00±14.48
1:2 配伍组	50	77.52±5.49*
1:2 配伍组	100	64.04±8.19**
1:2 配伍组	200	49.83±5.70**
1:2 配伍组	300	40.56±6.15**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.1.3 川芎总生物碱和益母草总生物碱 1:2 配伍对 B16 细胞黑色素生成的影响 由表 2 可知,川芎总生物碱和益母草总生物 1:2 碱配伍能有效抑制细胞内黑色素的生成 ($P<0.05, P<0.01$),且呈现一定的剂量依赖关系。当药物质量浓度为 50、100、200、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其细胞内黑色素水平较对照组分别降低了 11.69%、30.62%、45.68%、55.28%。由此推测,川芎总生物碱和益母草总生物碱配伍可能通过抑制细胞内黑色素的生成来达到

美白祛斑的效果。

表 2 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍对 B16 细胞黑色素相对水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	黑色素相对水平/%
对照组	—	100.00±1.88
1:2 配伍组	50	88.31±5.62*
1:2 配伍组	100	69.38±3.82**
1:2 配伍组	200	54.32±3.11**
1:2 配伍组	300	44.72±3.87**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.2 体内实验

3.2.1 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍对黄褐斑小鼠耳廓组织黑色素分布的影响 通过 Masson-Fontana 染色发现,正常组小鼠耳廓组织仅有少量黑色素分布;与正常组比较,模型组小鼠耳廓组织黑色素分布增多 ($P<0.01$);与模型组比较,氢醌乳膏组和 1:2 配伍中、高剂量组小鼠耳廓组织黑色素分布减少 ($P<0.01$),1:2 配伍低剂量组小鼠耳廓黑色素分布有减少趋势,但差异无统计学意义 ($P>0.05$),见图 2、表 3。

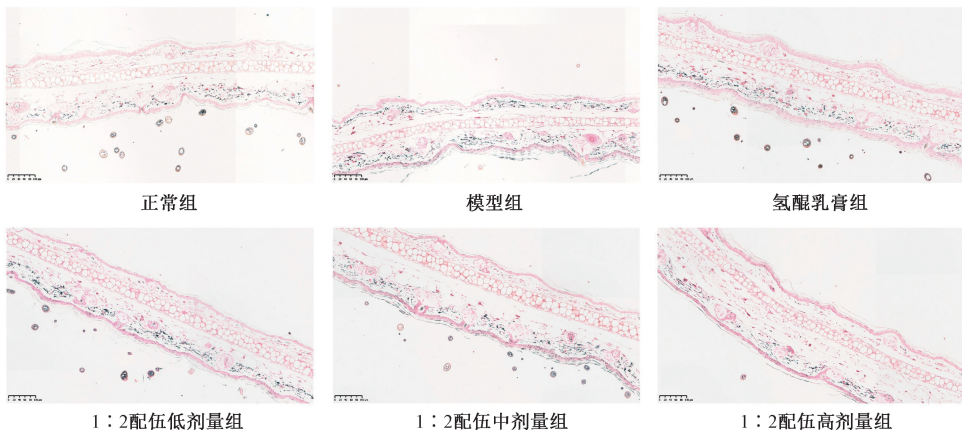


图 2 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍对黄褐斑小鼠耳廓组织黑色素分布的影响 ($\times 20$)

表 3 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍对黄褐斑小鼠耳廓组织黑色素相对分布水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	黑色素相对分布水平
正常组	1.00±0.35
模型组	7.67±2.00 ^{##}
氢醌乳膏组	1.62±0.67**
1:2 配伍低剂量组	5.11±2.89
1:2 配伍中剂量组	2.75±1.23**
1:2 配伍高剂量组	1.89±0.68**

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

3.2.2 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍对黄褐斑小鼠耳廓组织 SOD 活性和 MDA 水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠耳廓组织 SOD 活性降低 ($P<0.01$),MDA 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,氢醌乳膏组和 1:2 配伍各剂量组

小鼠耳廓组织 SOD 活性升高 ($P<0.01$),MDA 水平降低 ($P<0.05, P<0.01$),见表 4。

表 4 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍对黄褐斑小鼠耳廓组织 SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	SOD 活性/ ($\text{U}\cdot\text{mg}\text{prot}^{-1}$)	MDA 水平/ ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)
正常组	5.77±1.32	1.76±0.15
模型组	3.78±1.01 ^{##}	2.39±0.34 ^{##}
氢醌乳膏组	5.93±0.81**	1.25±0.47**
1:2 配伍低剂量组	5.74±1.28**	1.92±0.46*
1:2 配伍中剂量组	5.46±0.84**	2.00±0.18*
1:2 配伍高剂量组	5.85±0.82**	1.98±0.27*

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.2.3 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍对黄褐斑小鼠耳廓组织 CREB/MITF 信号通路相关蛋白表达的影响 如图 3、表 5 所示,与正常组比较,模型组小鼠耳廓组织 p-CREB、TRP1、TRP2、MITF、TYR 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,氢醌乳膏组小鼠耳廓组织 TRP1、TRP2、MITF、TYR 蛋白表达降低 ($P < 0.05$),1:2 配伍各剂量组小鼠耳廓组织 p-CREB、TRP1、TRP2、MITF、TYR 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);各组小鼠耳廓组织 CREB 蛋白表达比较无显著差异 ($P > 0.05$)。

4 讨论

中医素有“有斑必有瘀,无瘀不成斑”之说,认为在黄褐斑的发生发展中“瘀”是主要致病因素,即瘀血阻滞经络,肌肤失养从而导致黄褐斑,

表 5 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍对黄褐斑小鼠耳廓组织 CREB 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

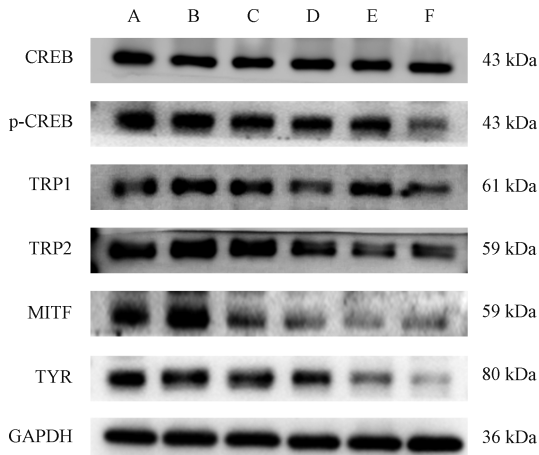
组别	CREB/GAPDH	p-CREB/GAPDH	TRP1/GAPDH	TRP2/GAPDH	MITF/GAPDH	TYR/GAPDH
正常组	0.87±0.02	1.01±0.01	0.86±0.02	0.82±0.07	0.68±0.08	0.78±0.06
模型组	0.81±0.06	1.22±0.04 [#]	1.08±0.13 [#]	1.21±0.14 ^{##}	1.09±0.14 [#]	1.26±0.14 [#]
氢醌乳膏组	0.76±0.04	1.06±0.07	0.86±0.04 [*]	0.92±0.07 [*]	0.63±0.16 [*]	0.71±0.06 [*]
1:2 配伍低剂量组	0.76±0.12	0.98±0.07 ^{**}	0.86±0.05 [*]	0.76±0.11 ^{**}	0.50±0.07 ^{**}	0.66±0.21 [*]
1:2 配伍中剂量组	0.71±0.09	0.96±0.09 ^{**}	0.86±0.04 [*]	0.79±0.08 ^{**}	0.56±0.19 ^{**}	0.57±0.26 ^{**}
1:2 配伍高剂量组	0.79±0.07	0.47±0.04 ^{**}	0.85±0.03 [*]	0.72±0.12 ^{**}	0.45±0.15 ^{**}	0.35±0.19 ^{**}

注:与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

故而其基本治则为活血化瘀、行气通络^[13]。川芎具有活血行气的功效,在《医方类聚》的祛斑美白的外用方中,作为活血化瘀药被广泛使用^[14]。现代研究发现,川芎具有抗氧化能力、美白、抗衰老等药理活性^[15]。益母草具有活血调经的功效,常作化妆品添加剂,在抗衰老方面有显著的功效^[16]。由此可见,益母草和川芎联合应用治疗黄褐斑具有巨大的潜力。

本研究结果显示,川芎总生物碱-益母草总生物碱不同配伍比例均能有效抑制 B16 细胞增殖并具有一定的协同作用,且 1:2 配伍具有最优联合效应,该配伍比例对 B16 细胞 TYR 活性以及黑色素生成均有一定的抑制作用,表明川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍可能通过抑制 TYR 活性及降低黑色素生成等途径发挥美白功效。

研究表明,黄褐斑患者体内的氧化和抗氧化水平处于失衡状态,氧自由基生成增加,抗氧化酶活性减弱,这将导致生物膜的脂质过氧化,损坏生物膜的结构和功能^[17]。MDA、SOD 作为氧化应激指标,在机体氧化-抗氧化的平衡中发挥重要作用,对减轻色素沉着,治疗和预防黄褐斑具有重要作



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为氢醌乳膏组, D~F 分别为 1:2 配伍低、中、高剂量组。

图 3 各组小鼠耳廓组织 CREB、p-CREB、TRP1、TRP2、MITF、TYR 蛋白条带图

用^[18]。本研究发现,模型组小鼠耳廓组织黑色素分布增多,SOD 活性降低,MDA 水平升高,提示氧化应激水平提高。川芎总生物碱-益母草总生物碱 1:2 配伍给药可减少小鼠耳廓组织黑色素分布,升高 SOD 活性,降低 MDA 水平,表明其能够改善黄褐斑小鼠耳廓皮肤组织的氧化应激水平,从而缓解黄褐斑症状。

黑色素的生物合成过程涉及许多酶和化学催化反应, TYR 及其相关蛋白 TRP1、TRP2 等是黑色素合成过程的关键^[19]。黑色素生成过程始于 TYR 催化 L-酪氨酸羟基化形成 L-DOPA,随后 L-DOPA 氧化形成多巴醌 (DQ), DQ 作为底物在 TRP1 和 TRP2 的催化下进行一系列反应,合成 2 种类型的黑色素 (褐黑素和真黑素)^[16,20]。由 TYR、TRP1 和 TRP2 介导的催化反应是黑色素合成中的限速步骤,因此,抑制 TYR 或其相关蛋白 TRP1 和 TRP2 是阻断黑色素产生的关键策略。MITF 是已知对黑色素细胞发育至关重要的小眼症转录因子家族中的唯一成员,也是控制 TYR、TRP1、TRP2 等酶表达的关键转录因子^[21-22]。CREB 转录因子家族成员的磷酸化是转录激活 MITF 表达的主要信号,可调节

MITF 表达^[23]。因此, CREB/MITF 通路的下调是有效抑制黑色素生成的实用策略。本研究结果显示, 模型组小鼠耳廓组织 p-CREB、TRP1、TRP2、MITF、TYR 蛋白表达升高; 川芎总生物碱-益母草总生物碱 1 : 2 配伍给药后 p-CREB、TRP1、TRP2、MITF、TYR 蛋白表达降低, 表明其可通过抑制 CREB/MITF 信号通路活化来改善黄褐斑。

综上所述, 川芎总生物碱和益母草总生物碱配伍可通过抑制 CREB/MITF 信号通路减少黑色素生成, 从而发挥阻碍黄褐斑进展的作用。本研究为川芎和益母草的临床应用提供了新的科学依据, 但黄褐斑的病理机制错综复杂, 仍需进一步深入探索, 以期为该配伍的制剂研发提供更为坚实的理论支撑。

参考文献:

[1] Guo L, Liu X, Liu Q, *et al.* Treatment of melasma with tranexamic acid essence combined with iontophoresis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 3659-3666.

[2] Platsidaki E, Markantoni V, Nicolaidou E, *et al.* Melasma: a clinical and epidemiological single-group observational study in the greek population[J]. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 2024, 14(11): 3183-3192.

[3] Gan C, Rodrigues M. An update on new and existing treatments for the management of melasma[J]. *Am J Clin Dermatol*, 2024, 25(5): 717-733.

[4] Mckesey J, Tovar-Garza A, Pandya A G. Melasma treatment: an evidence-based review[J]. *Am J Clin Dermatol*, 2020, 21(2): 173-225.

[5] 王代波, 孙露瑶, 余 倩, 等. 川芎、益母草有效成分配伍对酪氨酸酶活性、黑色素生成的抑制效应研究[J]. *中药与临床*, 2024, 15(1): 40-44.

[6] 张向娜, 林 勇, 黄建安, 等. 茶叶提取物 EGCG 和 GCG 及 ECG 对 B16 细胞内黑色素生成的抑制作用[J]. *湖南农业大学学报 (自然科学版)*, 2017, 43(4): 405-410.

[7] 郑 琪, 周 汛, 曹文富. 黄褐斑病因及中医外治研究概述[J]. *实用中医药杂志*, 2023, 39(4): 836-838.

[8] Liu J, Lei Z, Wang Z, *et al.* Ethnobotanical usages, phytochemistry, pharmacology, and quality control of chuanxiong rhizoma: a review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 3): 118902.

[9] Zhang L, Khoo C S, Xia H Z, *et al.* Antioxidant and anti-melanogenesis activities of extracts from *Leonurus japonicus* Houtt[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2024, 40 (3):

2888-2909.

[10] 王士群, 朱宇珍, 郑学宝. Chou-Talalay 在抗肿瘤联合用药中的研究应用概况[J]. *中国现代应用药理学*, 2013, 30(4): 449-453.

[11] Chou T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446.

[12] Sun X, Wang W, Yang H, *et al.* A comparative study on the sensitivity of establishing melasma-like models in different strains of mice[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2025, 24(4): e70155.

[13] 武晏屹, 白 明, 田 硕, 等. 黄褐斑发病机制与中医药调控[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(17): 219-224.

[14] 武梦园, 彭 成, 蒙春旺, 等. 基于指纹图谱和含量测定结合化学计量学发现川芎道地性标志物[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(1): 152-171.

[15] Kong Q, Niu Y, Feng H, *et al.* *Ligusticum chuanxiong* Hort.: a review of its phytochemistry, pharmacology, and toxicology[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(11): 1404-1430.

[16] Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017, 32(1): 403-425.

[17] Katiyar S, Yadav D, Singh S K. Markers of oxidative stress and tyrosinase activity in melasma patients: a biochemical investigation[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2024, 25 (2) : 183-188.

[18] Novaes J F, Filgueiras M S, Suhett L G, *et al.* Associations of adiposity and adipokine concentrations with anti- and oxidative markers in Brazilian children[J]. *Nutrition*, 2023, 109: 111993.

[19] Lai X L, Wichers H J, Soler-Lopez M, *et al.* Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins[J]. *Chemistry*, 2018, 24(1): 47-55.

[20] D' mello S A, Finlay G J, Baguley B C, *et al.* Signaling pathways in melanogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1144.

[21] Ko H H, Chang Y T, Kou Y H, *et al.* *Oenothera laciniata* hill extracts exhibits antioxidant effects and attenuates melanogenesis in B16-F10 cells *via* downregulating CREB/MITF/Tyrosinase and upregulating p-ERK and p-JNK [J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10(4): 727.

[22] Levy C, Khaled M, Fisher D E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene[J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(9): 406-414.

[23] Guo L, Yin Z, Wen L, *et al.* Flower extracts from *Paeonia decomposita* and *Paeonia ostii* inhibit melanin synthesis *via* cAMP-CREB-associated melanogenesis signaling pathways in murine B16 melanoma cells[J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(4): e12777.