

中药对黑素生物合成影响研究

I. 82 味中药乙醇提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用[△]

南京医科大学第一附属医院皮肤科(210029) 雷铁池* 朱文元** 夏明玉** 张美华 范卫新

摘 要 对中医治疗色素增加性皮肤病方剂 69 首进行计算机拆方排序,选出高频次出现中药 82 味,观察这些中药乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶和无细胞系统多巴色素自动氧化生成黑素量的影响。结果显示 11 味中药乙醇提取物在 3 个不同浓度对酪氨酸酶活性和黑素生成量呈剂量依赖性抑制,其中白术、白僵蚕、藁本、白芨、白附子、沙苑子、六月雪、柿叶对酪氨酸酶活性抑制率与单体化合物熊果苷无统计学差异($P>0.05$)。进一步研究这些中药的皮肤脱色机制与评估其临床应用价值是必要的。

关键词 中药 酪氨酸酶 抑制剂 黑素 生物合成

酪氨酸酶(EC1.14.18.1)是黑素生物合成途径中的主要限速酶^[1,2]。大多数能使皮肤脱色的物质都通过抑制该酶活性来阻滞皮肤黑素生成,属酪氨酸酶抑制型皮肤脱色剂(depigmenting agent)^[2,3]。近十年来,从微生物^[4]和植物药^[5~7]中分离天然的酪氨酸酶抑制剂已得到人们的普遍关注。它不但用于色素增加性皮肤病(黄褐斑、雀斑等)的临床治疗,而且可用于化妆品使肤色增白。本研究从古今中医治疗色素增加性皮肤病方剂中精选 69 首^[8]进行拆方并将组药输入计算机排序,筛选出高频次使用中药 82 味,观察这些中药乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶和无细胞系统多巴色素自动氧化生成黑素量的影响。

1 材料

1.1 药材:实验用中药生药 82 味,按中药在 69 首方剂中出现频次由高至低依次为:白芷(40.6%)、白附子(36.3%)、当归(34.8%)、白茯苓(23.3%)、白僵蚕(20.3%)、甘草

(18.8%)、红花(17.4%)、白芍(17.4%)、白芨(17.4%)、川芎(15.9%)、赤芍(15.9%)、白蒺藜(15.9%)、白术(14.5%)、柴胡(14.5%)、香附(13.0%)、生地(10.1%)、薄荷(8.7%)、丹参(8.7%)、牡丹皮(8.7%)、藁本(8.7%)、女贞子、熟地、紫草、泽泻、细辛、旱莲草、何首乌、桃仁、鸡血藤、生山栀、荆芥、龙胆草、枸杞子、陈皮、菟丝子、郁金、白鲜皮、生大黄、炙大黄、茵陈、黄精、益母草、合欢花、广木香、独活、月季花、珍珠母、莪术、北沙参、防风、夏枯草、黄芩、浮萍、六月雪、白蒺藜、苍术、苦参、骨碎补、川乌、沙苑子、蛇床子、生商陆、炙商陆、苍耳草、透骨草、白薇、降香、乳香、羌活、覆盆子、重楼、羌蔚子、桂枝、萆薢、地肤子、土茯苓、桑椹子、八月扎、炙草乌、桔梗、柿叶(鲜)、马齿苋(鲜)。以上中药除鲜品为本地自采外,其余均为生品,由南京中医药大学中药学院王春根教授鉴定并提供。

1.2 试剂和仪器:L-多巴,蘑菇酪氨酸酶

* Address: Lei Tiechi, The First Affiliated Hospital, Nanjing University of Medical Sciences, Nanjing

雷铁池 男,36岁,博士研究生。主要研究方向“表皮黑素细胞生物学与皮肤黑素生成的调节机制”。在导师朱文元教授指导下,课题“酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白-1基因表达调控与色素障碍性皮肤病关系的研究”与“部分中药对皮肤黑素细胞黑素生成影响及分子机制研究”分别获1998年度国家自然科学基金与江苏省教委自然科学基金资助。同年12月,以论文“8-甲氧补骨脂素对小鼠黑素瘤细胞黑素生成的调节及相关信号转导研究”赴日本神户参加《第13届日本色素细胞研究会(JSPCR)年会》交流。

** 指导者

△本课题为国家自然科学基金资助项目(基金编号39570658)

(Sigma 产品);熊果苷(上海奥利精细化工厂提供);其它试剂均为市售分析纯。分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

2 方法

2.1 中药乙醇提取物的制备:中药生药粉碎,称取细粉 5 g,用 90%的乙醇 50~100 mL 室温下密闭浸泡 2 周,并不时振荡。滤过除渣收集乙醇提取液置沸水浴中,挥尽乙醇浓缩至稠膏状。用 1 mL 二甲基亚砷溶解后置 4℃冰箱冻存备用。临用时用磷酸缓冲液稀释至设定浓度。

2.2 酪氨酸酶活性测定^[5,9]:将中药提取物用 0.2 mol/L pH6.8 磷酸缓冲液 1 mL 稀释后与蘑菇酪氨酸酶 1 mL(100 单位)混合,25℃孵育 10 min。加入 0.15% L-多巴反应液 1 mL,继续孵育 2 min,立即于分光光度计 475 nm 处测光吸收值 A_{475} 。中药生药终浓度设定为:高(100 mg/mL)、中(50 mg/mL)、低(10 mg/mL)3 个不同浓度。酪氨酸酶活性抑制率按下列公式计算:

抑制率(%) = $[(A-B)-(C-D)]/[A-B] \times 100$

式中 $A=A_{475-药+酶}$; $B=A_{475-药-酶}$; $C=A_{475+药+酶}$;

$D=A_{475+药-酶}$

此外另取 4 个浓度(50、100、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$)的熊果苷水溶液为药物组阳性对照。

2.3 多巴色素自动氧化生成黑素量的测定:参照 Matsuda 等报道方法并稍加改良^[9]。先将蘑菇酪氨酸酶 1 mL(100 单位)与 0.15% L-多巴反应液 1 mL 混合,25℃孵育 5 min。再加入不同浓度中药 1 mL,置 25℃继续孵育 60 min。最后用 1 mol/L 盐酸 0.2 mL 终止反应。将反应混合物离心 3 000 r/min 15 min,弃上清液,沉淀物用 6 mol/L 盐酸洗 1 次,双蒸水洗 2 次,最后用 1 mol/L 氢氧化钠 3 mL 充分溶解,离心团块,置 400 nm 处测光吸收值 A_{400} 。黑素生成抑制率用加药组 A_{400} 占空白对照组 A_{400} 的百分率表示,即

抑制率(%) = $[1-(A_{400\text{加药组}}/A_{400\text{空白对照组}})] \times 100$

2.4 数据处理和统计方法:上述每一实验均

重复 3 次。所测实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对计量资料 t 检验进行统计学分析。

3 结果

82 味中药,仅有 11 味在高、中、低 3 个浓度均对酪氨酸酶活性和黑色素生成量呈剂量依赖性抑制,其中白术、白僵蚕、藁本、白芨、白附子、沙苑子、六月雪、柿叶乙醇提取物对酪氨酸酶活性的抑制率与熊果苷无统计学差异($P>0.05$)。详见表 1。对酶活性高浓度抑制低浓度激活的有 10 味:白茯苓、甘草、白芍、细辛、苍术、生商陆、桂枝、北沙参、防风、葶苈。高浓度激活低浓度抑制的有 4 味:白芷、生地、骨碎补、乳香。其余作用不明显。4 种浓度的熊果苷均对酶活性呈抑制作用,且 100 $\mu\text{mol/L}$ 时最高,抑制率达 67.86%;即使提高熊果苷浓度也不能增加其对酪氨酸酶的抑制。

4 讨论

人们最早认识的皮肤脱色剂是分子结构与酪氨酸酶的底物类似的单酚类化合物氢醌^[11]。通常一种酶的底物类似物常能抑制该酶活性^[12],按照这个思路又有许多能抑制酪氨酸酶活性的单酚或多酚化合物相继被发现^[11]。但氢醌及其它酚类化合物的外用制剂化学性质不稳定易氧化变色,尚有引起皮肤永久性白斑的报告^[11],限制了这类药物的开发和临床应用。1988 年日本学者 Akiu 等从杜鹃花科植物熊果 *Arctostaphylos uva-ursi* 的叶中分离到一种具有脱色作用的单体物质熊果苷(arbutin),自此从微生物和植物药中分离天然酪氨酸酶抑制剂引起人们的兴趣^[11]。熊果苷是氢醌的一种天然存在形式,氢醌- β -D-葡萄糖吡喃糖苷(hydroquinone- β -D-glucopyranoside)其脱色作用推测仍可能与分子结构中存在的氢醌基团有关^[1,3]。

本研究应用计算机拆方排序对 69 首治疗色素增加性皮肤病的方剂组药进行分析,依出现频次筛选出中药 82 味,观察这些中药乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶和无细胞系统多巴色素自动氧化生成黑素量的影响。从表 1

可看出 11 味中药对酪氨酸酶呈抑制作用,其中白术、白僵蚕、藁本、白芨、白附子、沙苑子、六月雪、柿叶乙醇提取物对酪氨酸酶活性的抑制率与熊果苷无统计学差异($P>0.05$),

且黑素生成量减低与酪氨酸酶活性抑制相关。11 味中药有 7 味排序在前 20 位,占 63.64%。而排序居第一位的白芷则对酪氨酸酶呈高浓度激活低浓度抑制的双向作用。

表 1 中药乙醇提取物对酪氨酸酶活性和黑素生成的抑制作用

样 品	科 别	入药部位	试验浓度	酪氨酸酶抑制率(%)	黑素生成抑制率(%)
白术 <i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz	菊科	根茎	H	72.18±9.55*	42.80±17.52
			M	46.21±6.01	40.01±4.89
			L	36.07±9.53	43.33±3.22
白僵蚕 <i>Bombyx mori</i> L.	蚕蛾科	虫体	H	57.25±4.08*	39.39±3.77
			M	43.97±3.44	50.69±7.37
			L	41.01±9.53	32.70±2.80
藁本 <i>Ligusticum sinense</i> Oliv.	伞形科	根茎	H	48.48±3.57*	40.54±5.36
			M	34.09±6.30	48.79±7.59
			L	25.35±9.27	22.72±7.02
白芨 <i>Bletilla striata</i> Reichb. f.	兰科	块茎	H	41.64±5.99*	27.03±4.68
			M	34.58±9.43	47.70±8.70
			L	28.25±18.87	28.83±6.80
白附子 <i>Typhonium giganteum</i> Engl.	天南星科	块茎	H	54.62±10.69*	36.94±8.26
			M	52.24±8.33	44.69±5.44
			L	40.63±18.12	22.75±6.10
沙苑子 <i>Astragalus complanatus</i> R. Br.	豆科	种子	H	58.77±1.47*	42.07±7.59
			M	39.33±3.91	40.01±4.88
			L	12.22±10.72	22.16±10.0
苦参 <i>Sophora flavescens</i> Ait.	豆科	根	H	30.06±9.59	31.83±2.9
			M	28.19±5.99	29.13±1.29
			L	12.99±2.02	11.91±5.95
六月雪 <i>Serissa serissoides</i> Druce.	茜草科	全草	H	61.03±17.36*	32.44±15.05
			M	32.52±13.57	37.56±8.43
			L	12.47±6.65	30.41±2.65
柿叶 <i>Diospyros kaki</i> L. f.	柿科	叶	H	47.28±2.57	27.64±8.66
			M	29.92±5.08	27.76±8.47
			L	52.36±20.48*	23.92±6.65
柴胡 <i>Bupleurum chinense</i> D C.	伞形科	根	H	13.28±5.26	26.89±7.38
			M	19.61±8.6	42.73±9.27
			L	18.4±1.67	11.41±4.33
香附 <i>Cyperus rotundus</i> L.	莎草科	根茎	H	28.24±3.74	10.46±3.3
			M	39.49±7.41	37.56±8.43
			L	28.08±9.97	10.4±2.51
熊果苷 arbutin			1000 $\mu\text{mol/L}$	64.05±6.5	47.23±29.5
			500 $\mu\text{mol/L}$	66.74±8.31	55.56±24.69
			100 $\mu\text{mol/L}$	67.86±9.45*	59.25±21.82
			50 $\mu\text{mol/L}$	42.81±3.16	55.45±20.39

注:H=高浓度(100 mg/mL),M=中浓度(50 mg/mL),L=低浓度(10 mg/mL)。每一实验重复 3 次。

* 与 100 $\mu\text{mol/L}$ 熊果苷相比 $P>0.05$

日本人研究发现伞形科(川芎、柴胡、防风、独活、羌活、藁本、当归、前胡)^[5]、蓼科(大黄)^[10]、杜鹃花科(熊果)^[9]等植物有较高的酪氨酸酶抑制作用。本实验仅发现伞形科藁本、柴胡、北沙参、防风和白芷对酪氨酸酶有抑制,川芎、独活、羌活以及蓼科大黄则对酶呈激活作用,与日本学者报告不一致^[5,10],是否与药物使用浓度和产地来源不同有关?但从表中不能发现这些具有酪氨酸酶抑制作用的中药间存在有植物分类学上的关联。

用蘑菇酪氨酸酶和无细胞多巴色素自动氧化生成黑素体系大规模筛选皮肤脱色剂,方法简单可靠。但蘑菇酪氨酸酶与哺乳动物细胞来源的酪氨酸酶毕竟存有差异^[7]。用体外培养的人黑素细胞或 B16F10 鼠黑素瘤细胞进一步确认这些中药对黑素生成影响是有必要的。

致谢:实验用中药生药由南京中医药大学中药学院王春根教授鉴定。

参 考 文 献

1 Maeda K, et al. J Pharm Exp Therapeutics, 1996, 276

- (2):765
- 2 Shiota S, *et al.* Biol Pharm Bull, 1994, 17(2):266
- 3 Nakajima M, *et al.* Pigment Cell Res, 1998, 11:12
- 4 郑榕, 等. 中国抗生素杂志, 1997, 22(1):8
- 5 Masamoto Y, *et al.* Planta Med, 1980, 40:362
- 6 Kubo I, *et al.* J Nat Prod, 1994, 57(4):545
- 7 Kubo I, *et al.* J Nat Prod, 1995, 58(5):739
- 8 徐泽编. 古今美容奇方妙法. 北京:中国中医药出版社, 1993:418
- 9 Matsuda H, *et al.* Bio Pharm Bull, 1996, 19(1):153
- 10 Iida K, *et al.* Planta Med, 1995, 61:425
- 11 Grimes P. Arch Dermatol, 1995, 131:1453
- 12 Funayama M, *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1995, 59(1):143

(1998-10-08 收稿)

Studies on the Effect of TCM on Melanin Biosynthesis I. Inhibitory Actions of Ethanolic Extracts of 82 Different Chinese Crude Drugs on Tyrosinase Activity

Lei Tiechi, Zhu Wenyuan, Xia Mingyu, *et al.* (the First Hospital Affiliated to Nanjing University of Medical Sciences, Nanjing 210029)

Abstract 82 Chinese crude drugs were selected according to their frequencies appearing in 69 TCM prescriptions for the treatment of hyperpigmentary disorders. Their ethanolic extracts were tested separately for their respective activity to inhibit mushroom tyrosinase and melanin biosynthesis in cell free systems. Among them, 11 were found to be active in the inhibition of tyrosinase and the production of melanin from dopachrome by autoxidation in dose dependent manners. The inhibitory effects of *Atractylodes macrocephala*, *Bombyx mori*, *Ligusticum sinense*, *Bletilla striata*, *Typhonium giganteum*, *Astragalus complanatus*, *Serissa serissoides* and *Diospyros kaki* were either superior or similar to arbutin, though statistically nonsignificant ($P > 0.05$). These results suggested that some of the crude drugs could be considered as candidates to whiten the skin, but their mechanisms of action and clinical evaluation need further extensive studies.

Key words tyrosinase inhibitor melanin biosynthesis inhibitor

HPLC 法测定胃脘舒冲剂中甘草酸的含量

上海医药工业研究院(200040) 朱 兰* 孔德云
上海宝龙药业公司 吴晓明

摘 要 用高效液相色谱法测定胃脘舒冲剂中甘草酸的含量, 采用 μ Bondapak C_{18} 柱, $3.9\text{ mm} \times 300\text{ mm}$, 流动相甲醇-1.5 mol/L 冰醋酸水溶液(68:32), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 测定结果平均回收率为 97.41%, $RSD=1.2\%$ 。

关键词 胃脘舒冲剂 甘草酸 HPLC 含量测定

胃脘舒冲剂为上海宝龙药业公司生产, 主治萎缩性胃炎的新药。主要有党参、甘草、白芍、延胡索等药材组成, 具有补中益气、理气增酸、保护胃粘膜、消炎和解痉止痛等功效。该药的含量测定原采用薄层层析-紫外分光光度测定产品中甘草酸的方法[金山丛, 等. 中药新药与临床药理, 1996, 7(4):

40], 但其操作步骤较为繁杂, 现用 HPLC 法进行甘草酸的含量测定, 结果显示该法简便、准确、重现性好, 可达到控制本产品质量的目的。

1 仪器与试剂

仪器: 美国 Waters 高效液相色谱仪, 配有 Model 510 泵, U6K 进样器, Waters 484

* Address: Zhu Lan, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai