

基于谱效-构效关系筛选大黄中酪氨酸酶活性抑制成分的方法研究

刘艳杰¹, 王倩², 姜民^{3*}, 李红艳⁴, 邹敏杰⁴, 白钢³

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 河南广播电视大学, 河南 郑州 450008

3. 南开大学药学院, 天津 300071

4. 天津嘉氏堂科技有限公司, 天津 300457

摘要: 目的 建立一种基于谱效-构效结合的高效天然化合物活性筛选体系, 并采用该体系筛选大黄中酪氨酸酶抑制剂。方法 根据酪氨酸酶催化底物发生反应的原理, 以大黄为例依次经过不同极性溶剂提取, 分别检测各极性提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用; 针对活性组分通过 UPLC-Q/TOF 鉴定活性成分, 采用计算机辅助药物设计评价构效关系, 进一步筛选抑制剂分子, 并结合酶学检测验证药效成分。结果 通过建立的谱效-构效结合筛选体系获得大黄中大黄素、芦荟酚-4'-O-β-D-葡萄糖苷等 9 种具有间二羟基苯酚、邻三羟基苯酚结构的化合物可能具有酪氨酸酶活性抑制作用。结论 大黄中大黄素和芦荟酚衍生物对酪氨酸酶活性具有明显的抑制作用; 谱效-构效相结合的筛选模式为天然化合物活性筛选提供了便捷方法。

关键词: 谱效关系; 构效关系; UPLC-Q/TOF; 大黄; 酪氨酸酶抑制剂

中图分类号: R284.1; R285.51 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)11-2120-07

Screening of effective components for inhibition of tyrosinase activity in rhubarb based on spectrum-efficiency-structure-activity relationship

LIU Yan-jie¹, WANG Qian², JIANG Min³, LI Hong-yan⁴, ZOU Min-jie⁴, BAI Gang³

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Henan Radio & Television University, Zhengzhou 450008, China

3. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China

4. Tianjin Jiashitang Technology Co., Ltd., Tianjin 300457, China

Abstract: Objective To establish a new efficient screening system based on spectrum-efficiency-structure-activity relationship of natural compounds and to screen tyrosinase inhibitor from *Rheum officinale* (rhubarb). **Methods** Based on the catalyzing reaction of tyrosinase to its substrate, Soxhlet extraction system was used and *R. officinale* was extracted by solvents of different polars. The inhibitory activities on tyrosinase in different polar extract fractions were detected. UPLC-Q/TOF and computer-aided drug design were used to analyze and identify their active ingredients. Enzymological method was used to validate the active constituents. **Results** Through spectrum-efficiency-structure-activity relationship, nine kinds of compounds including emodin and verapenol-4'-O-β-D-glycoside were confirmed. The structures contained functional groups of both resorcin and adjacent trihydroxyphenol which might have the inhibitory activity on tyrosinase. **Conclusion** The emodin and verapenol derivatives extracted from rhubarb show the obvious inhibitory activity against tyrosinase. The spectrum-efficiency-structure-activity relationship provides a new convenient method for the researches on natural compounds.

Key words: spectrum-efficiency relationship; structure-activity relationship; UPLC-Q/TOF; *Rheum officinale* Baill.; tyrosinase inhibitor

在新药开发研究中, 基于对中药活性成分的研究一直是先导化合物的主要来源之一^[1], 建立一种高效快速的中药活性成分的筛选及鉴定体系是当前

亟待解决的关键问题。中药谱效关系研究是近年来兴起的将中药指纹图谱与药效综合研究的一种研究方法, 常用于中药活性成分靶向性筛选^[2-3]。生物色

收稿日期: 2012-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173638, 81102835)

作者简介: 刘艳杰 (1985—), 女, 硕士, 研究方向为中药现代化及相关研究。Tel: (022)23504933 E-mail: mynameisyanjie@163.com

*通讯作者 姜民 Tel: (022)23506930 E-mail: minjiang@nankai.edu.cn

谱技术是研究谱效关系的常用方法之一,但一般的生物色谱法对于分离困难、量较少的化合物则难以评价其活性;且多数生物色谱的固定相目前还未实现商品化,需要自行制备,寿命通常也比较短,这些因素严重限制了生物色谱技术的推广与应用^[4-5]。构效关系分析可以通过分析化合物结构预测其与特定靶蛋白的作用能力^[6-7]。建立一种结合谱效-构效关系分析的筛选方法则有望解决上述问题。

酪氨酸酶是生物体内参与黑色素合成的关键酶,是广泛存在于自然界中的含铜多亚基氧化还原酶^[8],与黄褐斑、黑色素异常增多、白癜风等色素沉着性疾病密切相关^[9-11]。大黄是临床常用中药之一,有研究报道大黄对人酪氨酸酶活性具有双向调节作用^[12]。本实验采用谱效-构效相结合的筛选模式,根据酪氨酸酶催化底物发生反应的原理,以大黄为研究对象,首先评价不同极性部位提取物的抑制活性,进一步引入谱效关系分析手段采用 HPLC 分段评价抑制活性与 UPLC-Q/TOF 分子鉴定相结合的分析方法鉴定其可能具有酪氨酸酶抑制活性的组分,并结合计算机辅助药物评价分析其构效关系,选择阳性成分进行验证,探寻谱效与构效关系相结合的筛选分析方法。

1 仪器与材料

酶标仪 (Bio-Rad, 美国); 岛津 20A 高效液相色谱仪 (岛津, 日本); UPLC-Q/TOF 串联质谱仪、Masslynx 工作站 (Waters, 美国); JFSD100 粉碎机 (上海嘉定粮油仪器有限公司); R201D II 旋转蒸发器 (上海申顺生物科技有限公司); Mettler Toledo 十万分之一电子分析天平 (Mettler Toledo, 瑞士)。

大黄 (*Rheum officinale* Baill., 广州致信中药饮片有限公司) 经南开大学谢春峰老师鉴定为蓼科植物大黄; L-多巴 (上海斯高勒生物技术有限公司); 酪氨酸酶 (Sigma, 美国); 曲酸 (Sigma, 美国)。

2 方法

2.1 试剂配制

2.1.1 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 的配制 将磷酸氢二钠与磷酸二氢钠分别配成 0.1 mol/L 的溶液,取磷酸氢二钠溶液 231.5 mL,加入磷酸二氢钠溶液 268.5 mL,用水稀释至 750 mL,摇匀,即得。

2.1.2 酪氨酸酶的配制 取活力单位为 1 881 U/mg 的酪氨酸酶,用上述 PBS (pH 6.8) 配成 0.8 mg/mL 的溶液,即得。

2.1.3 L-多巴溶液的配制 用上述 PBS (pH 6.8)

配制成 0.8 mg/mL 的溶液,待用。

2.2 供试品溶液的制备

大黄晒干后,粉碎,过 20 目筛。准确称取大黄粗粉 50 g 置索氏提取器中,依次分别用 300 mL 石油醚、三氯甲烷、醋酸乙酯、水饱和正丁醇和水 5 种溶剂 70 °C 回流提取 3 h,分别收集各层提取液,浓缩后真空干燥,得石油醚部位 0.61 g、三氯甲烷部位 0.86 g、醋酸乙酯部位 2.41 g、正丁醇部位 1.20 g 以及水提取部位 1.95 g。将各部位提取物分别溶解于 5% DMSO 助溶的 PBS (pH 6.8) 中,配制成 10 μg/mL 的样品溶液,于 4 °C 冰箱中保存,备用。

2.3 大黄提取物对酪氨酸酶抑制活性的测定

测定前,用微量移液器准确配制 C₁ 测试样: 100 μL PBS 加入 50 μL 酪氨酸酶溶液; C₂ 测试样: 150 μL PBS; T₁ 测试样: 100 μL 样品溶液加入 50 μL 酪氨酸酶溶液; T₂ 测试样: 50 μL PBS 加入 100 μL 样品溶液,分别加入 96 孔板中,25 °C 水浴恒温反应 10 min 后,加入 50 μL L-多巴溶液,在 25 °C 水浴继续恒温反应 1 h,反应结束后立即于 490 nm 处分别测定 C₁、C₂、T₁、T₂ 的吸光度 (A_{C1}、A_{C2}、A_{T1}、A_{T2}) 值,选用曲酸作为阳性对照检测对酪氨酸酶的抑制作用。以酪氨酸酶的抑制率表示对酪氨酸酶的抑制作用^[13-14]。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{T1} - A_{T2}) / (A_{C1} - A_{C2})$$

2.4 大黄醋酸乙酯部位谱效关系分析

取大黄醋酸乙酯提取物溶于甲醇配制成 3 mg/mL 待测溶液,采用 HPLC 分离活性成分。HPLC 条件: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水 (A) - 甲醇 (B); 二元梯度洗脱: 0~10 min, 40%~50% B; 10~20 min, 50%~75% B; 20~30 min, 75%~100% B; 30~35 min, 100% B; 35~36 min, 100%~40% B; 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 254 nm; 柱温 35 °C; 进样量为 100 μL。分别以每分钟为一个时间段按段收集分离样品,减压真空干燥后,将样品溶解于 1 mL PBS 中,按照“2.3”项方法检测 HPLC 分离的各时间段样品对酪氨酸酶的抑制活性。收集合并检测结果中与空白实验组比较具有统计学差异的组分进行 UPLC-Q/TOF 成分鉴定。UPLC 液相色谱条件: Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈 (A) - 0.2% 乙酸水溶液 (B); 梯度洗脱程序: 0~4 min, 1.5%~20% A; 4~8 min, 20%~75% A; 8~10 min, 75%~100% A;

10~12 min 维持 100% A; 12~14 min, 100%~1.5% A; 14~15 min 维持 1.5% A; 进样量 6 μ L; 体积流量为 0.4 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C; DAD 扫描波长范围 190~400 nm; 分析时间 15 min。质谱条件: ESI 源, 负离子检测模式, 扫描范围为 m/z 50~2 000, 毛细管电压为 3 kV (负模式), 锥孔电压为 30 V, 脱溶剂气为氮气, 350 $^{\circ}$ C, 600 L/h, 源温 100 $^{\circ}$ C; 二级质谱能量为 30 V。数据采集工作站为 MassLynx 4.0。

2.5 计算机辅助药物分子模拟筛选

采用分子对接软件 Autodock 4.2 对“2.4”项鉴定的化合物分别与酪氨酸酶进行分子对接, 以评估其结合能力。分子对接所使用的蛋白晶体结构为双孢菇酪氨酸酶 2y9x (*Agaricus bisporus* Mushroom Tyrosinase 的晶体结构)^[8]。格点计算参数如下: grid center = -9.96, -28.676, -43.432; grid spacing = 0.375; npts = 50, 50, 50。对接参数如下: ga_run = 200; qstep = 30; dstep = 30。

2.6 数据统计

采用 SPSS 13.0 软件进行数据统计, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 大黄各提取部位对酪氨酸酶抑制作用

不同极性溶剂大黄提取物对酪氨酸酶抑制作用的结果显示, 大黄醋酸乙酯部位提取物对酪氨酸酶具有显著抑制作用, 其他各部位抑制作用不显著, 无统计学差异 (图 1)。

3.2 具酪氨酸酶抑制活性大黄部位的谱效关系分析

取大黄醋酸乙酯部位提取物经 HPLC 分离后进行谱效关系分析, 结果见图 2。14~25 min 收集的样品对酪氨酸酶活性具有显著的抑制作用 ($P < 0.01$)。

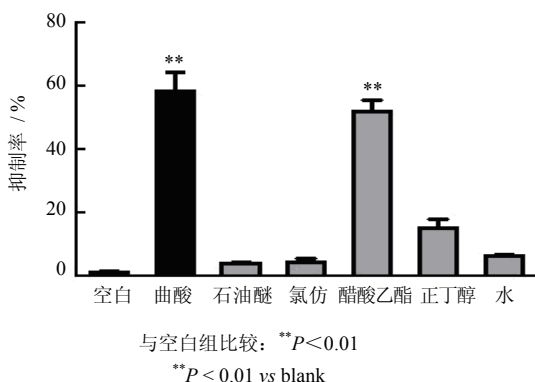


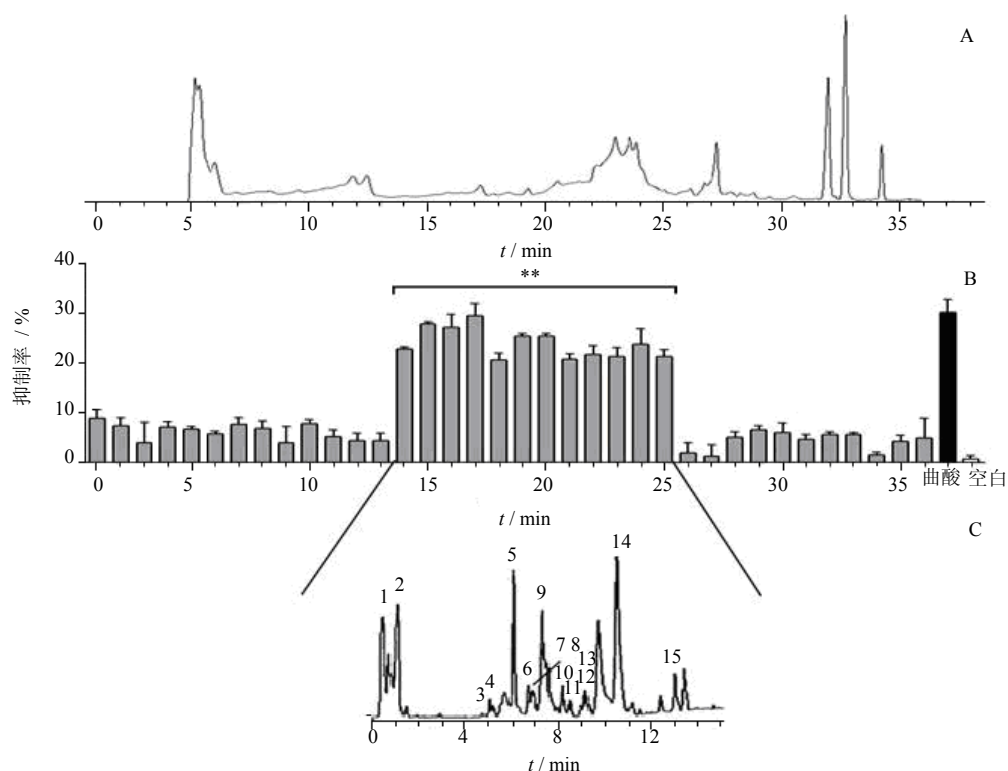
图 1 大黄各提取部位对酪氨酸酶抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Inhibitory rates against tyrosinase in various extracted fractions of rhubarb ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

收集具有活性部分的样品进行 UPLC-Q/TOF 成分鉴定, 依据精确相对分子质量、离子碎片信息以及文献报道^[15], 共鉴定了 15 个主要成分, 其分别属于蒽醌、蒽酮、双苯吡酮、色烯、苯丙素以及芪等类化合物, 结果见图 3 和表 1。

3.3 酪氨酸酶抑制剂的分子对接与评价

采用计算机辅助药物分子评价, 根据化合物与酪氨酸酶的计算机分子模拟对接所得的结合能大小将其分为 3 类, 结果见表 1。分析结果可以看出, 其中褐色为 Cu^{2+} 离子, 浅绿色的为 2 个疏水性残基 Phe264 和 Val283, 大黄素 6 位羟基与 Cu^{2+} 反应中心产生络合, 8 位羟基与 Met280 主链上的羰基形成氢键。藜芦酚-4'-O- β -D-葡萄糖苷, 同样含有间二羟基结构, 同样可以形成氢键和络合两种相互作用加之与间二羟基相连的长链使得其的分子构象更易于进入酶结合腔因此显示出具有更强的结合效果; 2-O-桂皮酰基-没食子酰葡萄糖具有邻三羟基结构, 同时可以形成氢键与络合的双重结合作用, 但由于其间位具有羟基结构, 可能产生空间位阻, 使得其进入结合腔的几率相对变小, 因而作用次之; 1, 2, 6-三羟基-5-甲氧基-7-(3-甲基丁-2-烯基) 咕吨酮的对接显示, 邻二羟基的结构结合能力不如间二羟基, 无法与 Met-280 形成氢键 (氢键合理长度 2.8~3.3), 作用最弱; 大黄素甲醚, 相对大黄素虽羟基被甲氧基取代, 但可能使疏水性发生改变, 影响进入结合腔, 仍有可能形成抑制作用; 1, 4, 5, 6-四羟基-7, 8-二 (3-甲基丁-2-烯基) 咕吨酮, 具有对二羟基结构, 可能与间二羟基结构同样能形成络合与氢键的双重作用而起到抑制作用; ω -羟基芦荟大黄素同样有间二羟基结构, 可具活性; 1, 6-二没食子酰基-2-桂皮酰基葡萄糖具有邻三羟基的结构, 可具一定活性, 但其体积较大, 因空间位阻带来不利影响; 而芦荟苷由于其糖取代基的位置, 形成空间位阻, 使得络合相互作用无法形成, 没有产生合理的对接构象, 无抑制作用; 大黄酸和大黄酸-8-O- β -D-(6'-乙二酰基) 吡喃葡萄糖苷, 由于羧基的影响, 不利于进入结合腔内, 因此活性较差; 大黄酚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、芦荟大黄素- ω -O- β -D-吡喃葡萄糖苷和大黄酚均无合理对接构象; 7-羟基-2-(2-羟基) 丙基-5-甲基-苯并吡喃- γ -酮只有 1 个羟基与 Cu^{2+} 形成络合作用, 活性较低。此处列出阳性药曲酸、以及具有代表性的藜芦酚-4'-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素分子对接图 (图 4)。



A-大黄醋酸乙酯部位液相展开图 B-酪氨酸酶活性抑制率结果 与空白组比较** $P < 0.01$ C-大黄具有酪氨酸酶抑制活性部位负离子模式离子流图
A-LC of ethyl acetate fraction of rhubarb B-inhibitory capability against tyrosinase activity ** $P < 0.01$ vs blank group C-total negative ion current of active parts with tyrosinase inhibitory activity

图2 大黄醋酸乙酯部位谱效关系分析结果

Fig. 2 Spectrum-activity relationship in EtOAc fraction of rhubarb

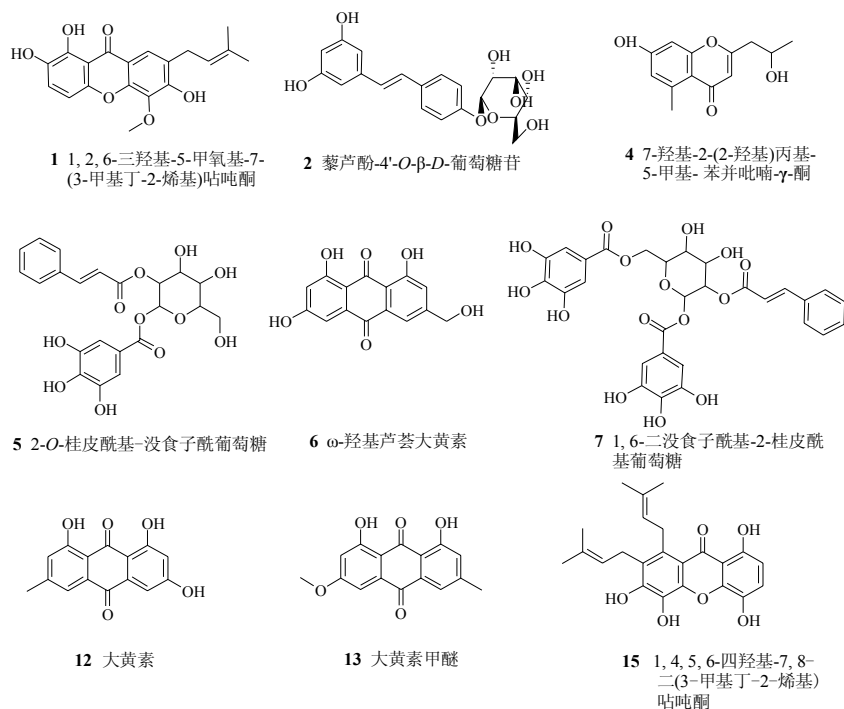


图3 具有抑制酪氨酸酶活性的大黄成分结构

Fig. 3 Structures of components in rhubarb with inhibitory activity on tyrosinase

表 1 大黄醋酸乙酯部位中主要成分的 UPLC/MS/MS 数据分析及分子对接预测活性结果

Table 1 UPLC/MS/MS data of main constituents in EtOAc fraction of rhubarb and activity prediction using molecular docking

峰 号	<i>t</i> / min	$\lambda_{\max}$ / nm	相对分子质量	质谱信息	化合物名称	活性预测
1	0.766	192	342.103 5	341 [M-H] ⁻ , 323 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 292 [M-H-H ₂ O-OCH ₃] ⁻	1, 2, 6-三羟基-5-甲氧基-7-(3-甲基丁-2-烯基)咕吨酮	+
2	1.336	195	390.125 5	389 [M-H] ⁻ , 225 [M-H-Glu] ⁻ , 208 [M-H-Glu-OH] ⁻	藜芦酚-4'-O-β-D-葡萄糖苷	++
3	5.111	270	418.117 5	417 [M-H] ⁻ , 253 [M-H-Glu] ⁻ , 236 [M-H-Glu-OH] ⁻	芦荟苷	-
4	5.301	250, 284	234.082 4	233 [M-H] ⁻ , 205 [M-H-CO] ⁻ , 188 [M-H-CO-OH] ⁻	7-羟基-2-(2-羟基)丙基-5-甲基-苯并吡喃-γ-酮	+
5	6.296	282	462.109 9	461 [M-H] ⁻ , 313 [M-H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁻ , 161 [M-H-C ₉ H ₈ O ₂ -C ₈ H ₈ O ₃] ⁻	2-O-桂皮酰基-没食子酰葡萄糖	++
6	6.977	260, 286	286.038 6	285 [M-H] ⁻ , 267 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 254 [M-H-CH ₂ OH] ⁻	ω-羟基芦荟大黄素	++
7	7.217	278	614.120 9	613 [M-H] ⁻ , 461 [M-H-C ₈ H ₈ O ₃] ⁻ , 313 [M-H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁻	1, 6-二没食子酰基-2-桂皮酰基葡萄糖	+
8	7.493	260	416.103 1	415 [M-H] ⁻ , 253 [M-H-Glu] ⁻ , 225 [M-H-Glu-CO] ⁻	大黄酚-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	-
9	7.567	258	432.095 9	431 [M-H] ⁻ , 285 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁻ , 270 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₄ -CH ₃] ⁻	芦荟大黄素-ω-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	-
10	7.784	260	254.048 9	253 [M-H] ⁻ , 225 [M-H-CO] ⁻ , 210 [M-H-CO-CH ₃] ⁻	大黄酚	-
11	8.224	282	518.059 8	517 [M-H] ⁻ , 473 [M-H-COOH] ⁻ , 283 [M-H-Glu-CH ₂ -2CO] ⁻	大黄酸-8-O-β-D-(6'-乙二酰基)吡喃葡萄糖苷	-
12	9.249	279	270.043 9	269 [M-H] ⁻ , 241 [M-H-CO] ⁻ , 225 [M-H-CO ₂] ⁻	大黄素	++
13	9.805	279	284.061 8	283 [M-H] ⁻ , 269 [M-H-CH ₂] ⁻ , 257 [M-H-2CH ₂] ⁻	大黄素甲醚	+
14	10.758	232, 258	284.024 7	283 [M-H] ⁻ , 239 [M-H-CO ₂] ⁻ , 211 [M-H-CO ₂ -CO] ⁻	大黄酸	-
15	12.604	254	396.147 8	395 [M-H] ⁻ , 377 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 341 [M-H-3H ₂ O] ⁻	1, 4, 5, 6-四羟基-7, 8-二(3-甲基丁-2-烯基)咕吨酮	+

++ <-10 kJ/mol; -10 kJ/mol < + < -5 kJ/mol; -5 kJ/mol < -

3.4 大黄中酪氨酸酶抑制剂的验证

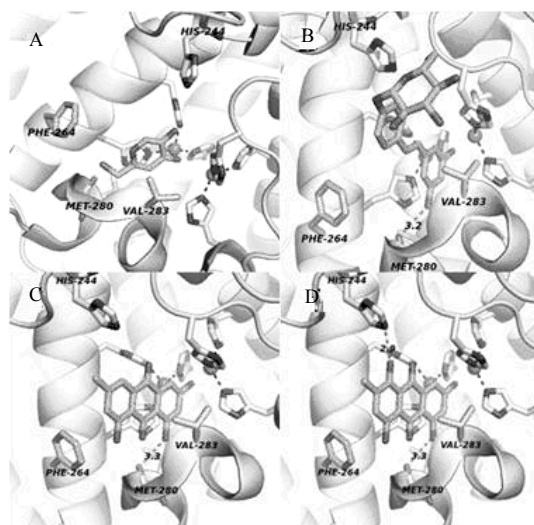
根据计算机辅助评价结果,选取代表性的大黄素、大黄酸、与藜芦酚-4'-O-β-D-葡萄糖苷母核一致的白藜芦醇单体分子,以及阳性药物曲酸 4 种单体,采用“2.3 项”方法分别检测其对酪氨酸酶的抑制作用。结果显示白藜芦醇、大黄素对酪氨酸酶具有明显的抑制效果,且白藜芦醇的抑制效果强于阳性药物曲酸,大黄酸无抑制作用。曲酸、白藜芦醇、大黄素的 IC₅₀ 分别为 106、38、300 μg/mL。图 5 所示酪氨酸酶抑制活性的分析结果与药物分子对接预测结果一致,提示该方法有较好的可信性。

4 讨论

以往研究结果表明苯环上有单羟基取代的化合物对蘑菇酪氨酸酶均表现为竞争性抑制类型,且对

位取代的化合物抑制强度明显高于邻位或间位的取代化合物^[16-17],而芪类结构中的间苯二酚发挥着重要作用^[18-20]。同时构效分析显示酪氨酸酶结合腔的 His244 是潜在的氢键结合位点,因此推测若在大黄素的 4 位引入羟基可以使该分子与酪氨酸酶的结合更加牢固,可能会进一步提高对酪氨酸酶活性的抑制活性。

本实验建立了谱效-构效结合的酪氨酸酶活性抑制剂的筛选模式可以较好地解决以往中药活性成分筛选中需要药材量大、操作繁琐的问题。对于难以分离和量较少的化合物实现高效筛选和鉴定。通过构效关系还可以更有目的地筛选中药有效成分,节省时间与人力,为新型酪氨酸酶活性抑制剂的研发提供理论依据。同时在本研究中开发的基于



A-曲酸 B-藜芦酚-4'-O-β-D-葡萄糖苷 C-大黄素 D-预测潜在结合位点示意图

A-kojic acid B-verapfenol-4'-O-β-D-glycoside C-emodin
D-predicting underlying binding sites

图4 大黄成分与酪氨酸酶结合模拟图

Fig. 4 Mimic diagram of combination of rhubarb components and tyrosinase

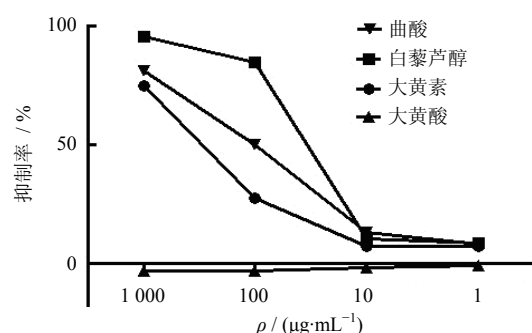


图5 大黄成分的酪氨酸酶抑制率

Fig. 5 Inhibitory rates of rhubarb components against tyrosinase

谱效-构效结合的酪氨酸酶活性抑制剂的筛选模式,也可推广应用到其他中药有效成分的筛选中,通过对化合物谱效-构效关系结合的分析手段,可以迅速确定活性目标天然产物,从而更有效地进行先导化合物的筛选。

参考文献

[1] 杜冠华, 刘艾林, 张莉, 等. 天然产物中先导化合物的快速发现技术 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(6): 328-331.
[2] 崔秋兵, 张艺. 系统化学生物学在中药谱效关系研究中的应用展望 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 833-836.

[3] Hou Y Y, Cao X L, Dong L Y, *et al.* Bioactivity-based liquid chromatography-coupled electrospray ionization tandem ion trap/time of flight mass spectrometry for β2AR agonist identification in alkaloidal extract of *Alstonia scholaris* [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1227: 203-209.
[4] Wang H, Zou H, Kong L, *et al.* Analysis of bioactive compounds in traditional Chinese medicines by molecular biochromatography alphas-acid glycoprotein as stationary phases [J]. *Basic Chin Physiol Pharmacol*, 2000, 11(2): 155-172.
[5] Ascoli G A, Domenici E, Bertucci C. Drug binding to human serum albumin: abridged review of results obtained with high performance liquid chromatography and circular dichroism [J]. *Chirality*, 2006, 18(9): 667-679.
[6] Fan Y F, Cheng S L, Zhang J Y. Structure-activity relationship model for predicting the hallucinogenic activity of phenylalkylamines [J]. *Struct Chem*, 2010, 29(8): 1201-1208.
[7] Liu M, Liu X L, Wan P. Determination of structure-activity relationships between fentanyl analogs and human u-opioid receptors based on active binding site models [J]. *Neural Regen Res* 2011, 6(4): 267-276.
[8] Ismaya W T, Rozeboom H J, Weijn A, *et al.* Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone [J]. *Biochemistry*, 2011, 50(24): 5477-5486.
[9] Scherer D, Kumar R. Genetics of pigmentation in skin cancer—a review [J]. *Mutat Res*, 2010, 705(2): 141-153.
[10] Sehgal V N, Verma P, Srivastava G, *et al.* Melasma: treatment strategy [J]. *J Cosmet Laser Ther*, 2011, 13(6): 265-279.
[11] Parvez S, Kang M, Chung H S, *et al.* Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries [J]. *Phytother Res*, 2007, 21(9): 805-816.
[12] 许振毅, 张庆红. 大黄对人表皮黑色素细胞的增殖及对酪氨酸酶的双向调节作用 [J]. 中华皮肤科杂志, 1997, 30(6): 404-405.
[13] Huang X H, Chen Q X, Wang Q, *et al.* Inhibition of the activity of mushroom tyrosinase by alkylbenzoic acids [J]. *Food Chem*, 2006, 94(1): 1-6.
[14] Han P, Chen C Q, Zhang C L, *et al.* Inhibitory effects of 4-chlorosalicylic acid on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities [J]. *Food Chem*, 2008, 107(2): 797-803.
[15] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. 中药原植物化学成分集 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
[16] Chen Q X, Song K K, Qiu L, *et al.* Inhibitory effects on

- mushroom tyrosinase by *p*-alkoxybenzoic acids [J]. *Food Chem*, 2005, 91(2): 269-274.
- [17] 黄 磺, 刘晓丹, 陈清西. 苯甲醛族化合物抑制蘑菇酪氨酸酶活力的研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42(1): 97-101.
- [18] Shin N H, Ryu S Y, Choi E J, *et al.* Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 243(3): 801-803.
- [19] Kim Y M, Yun J, Lee C K, *et al.* Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action [J]. *Biol Chem*, 2002, 277(18): 16340-16344.
- [20] Shimizu K, Yasutake S, Kondo R. A new stilbene with tyrosinase inhibitory activity form *Chlorophora excelsa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(3): 318-319.

《中草药》杂志最新佳绩

《中草药》杂志 2011 年荣获**第二届中国出版政府奖**, 中国出版政府奖是国家新闻出版行业的最高奖, 第二届中国出版政府奖首次设立期刊奖, 《中草药》等 10 种科技期刊获此殊荣。2011 年 3 月 18 日于北京举行了盛大的颁奖典礼。

《中国科技期刊引证报告》2011 年 12 月 2 日发布: 《中草药》杂志 2010 年总被引频次 6 178, 名列我国科技期刊第 14 名, 中医学与中药类期刊**第 1 名**; **影响因子 0.904**, 基金论文比 0.680, 权威因子 2 269.200; 综合评价总分 76.6, 位列中医学与中药学类期刊第 1 名。连续 7 年 (2005—2011 年) 荣获“百种中国杰出生学术期刊”, 再次荣获“中国精品科技期刊”(2008 年首次设立, 每 3 年一届), 荣获天津市第十届优秀期刊评选特别奖。

中国知网 (CNKI) 《中国学术期刊影响因子年报》2011 年 12 月 22 日发布: 《中草药》杂志总被引频次 16 359, 影响因子 1.453, 位列中医学与中药学期刊第 1 名, 基金论文比 0.74, WEB 下载量 39.1 万次。

注册商标“**中草药**”2011 年被评为天津市著名商标。