

甲氧基黄酮促斑马鱼黑色素生成的药效学评价及机制研究

于 兰^{1,2}, 唐 辉^{1,2}, 陈韩英^{1,2}, 王晓琴^{1,2}, 张 波^{1,2*}

1. 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002

2. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002

摘 要: **目的** 基于药性理论, 通过对临床医保目录中抗白癜风中成药方药活性成分的筛选, 对其有效成分进行初步药效学评价及机制探讨。**方法** 收集抗白癜风中成药组方、药性和物质基础以筛选主药。通过 TCMSP 和 TCMIP 数据库得到主要化合物类型。使用 admetSAR 分析成药性得出关键化合物。通过成年斑马鱼和斑马鱼幼鱼的形态学、黑色素含量测定观察体内药效学。通过斑马鱼幼鱼存活率进行安全性评价。通过 RT-PCR 显示化合物在转录水平中的作用机制。使用分子对接预测化合物与蛋白晶体结构的结合能力。**结果** 使用频次最高的主药为红花、紫草、蒺藜、龙胆、补骨脂和驱虫斑鸠菊。通过 TCMSP 和 TCMIP 数据库得到主要化合物类型为黄酮类, 共有 81 个。根据成药性和稳定性筛选出甲氧基黄酮类化合物山柰素和异鼠李素。32 $\mu\text{mol/L}$ 山柰素、32 $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素和 25 $\mu\text{mol/L}$ 甲氧沙林均能促进斑马鱼黑色素再生。基于斑马鱼胚胎模型, 3 个化合物均能加速胚胎黑色素生成, 且其有效浓度下斑马鱼幼鱼的存活率在 90% 以上。RT-PCR 结果显示山柰素与异鼠李素上调黑色素生成关键基因黑素皮质素 1 受体 (MC1R) 和小眼畸形相关转录因子 (MITF) mRNA 水平。分子对接结果显示山柰素、异鼠李素与底物酶结合分数高于甲氧沙林。**结论** 临床抗白癜风中成药组方中活性成分山柰素与异鼠李素促进斑马鱼模型黑色素生成且通过上调 MC1R/MITF 信号通路作用。

关键词: 白癜风; 药性; 山柰素; 异鼠李素; 斑马鱼; 黑素皮质素 1 受体; 小眼畸形相关转录因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)23-6023-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.015

Pharmacodynamic evaluation and mechanism of methoxyflavone to promote melanin production in zebrafish

YU Lan^{1,2}, TANG Hui^{1,2}, CHEN Han-ying^{1,2}, WANG Xiao-qin^{1,2}, ZHANG Bo^{1,2}

1. Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resources and Utilization, Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832002, China

2. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China

Abstract: **Objective** Based on the Chinese herbal property, the pharmacodynamic evaluation and mechanism discussion of active components were carried out through screening the active components of Chinese patent medicine in the clinical medical insurance catalog. **Methods** The most frequently used main herbs were screened through the collection of anti-vitiligo Chinese patent medicine prescriptions, drug properties and material basis. The main compound types were acquired through TCMSP and TCMIP databases. The drug properties were analyzed by admetSAR method to obtain key compounds. The pharmacodynamics were observed by measuring the morphology and melanin content of adult zebrafish and larvae. The safety evaluation was indicated by the survival rate of larvae. RT-PCR was used to reveal the mechanism of the compounds at the transcriptional level. The binding ability of compounds to protein crystal structure was predicted by molecular docking. **Results** The most frequently used main herbs were *Carthamus tinctorius*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Tribulus terrestris*, *Gentianae Radix et Rhizoma*, *Psoraleae Fructus*, and *Vernonia anthelmintica*. The main compound types through TCMSP and TCMIP database were flavonoids with a total of 81. Based on the druggability and stability, the methoxyflavones kaempferide and isorhamnetin were screened out. Kaempferide (32 $\mu\text{mol/L}$), isorhamnetin (32 $\mu\text{mol/L}$) and methoxsalen (25 $\mu\text{mol/L}$) could promote the regeneration of melanin in zebrafish. Based on the zebrafish

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1603122); 兵团科技创新领域中青年领军人才资助项目 (2018CB019); 2019 年二批次兵团英才项目

作者简介: 于 兰, 女, 研究方向中药药理学及系统药理学。E-mail: 1729892950@qq.com

*通信作者 张 波, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药理与系统生物学。E-mail: bozhang_lzu@126.com

embryo model, kaempferide, isorhamnetin and methoxsalen all could accelerate melanogenesis in larvae, and the survival rates of larvae were more than 90% under effective concentration. RT-PCR showed that kaempferide and isorhamnetin upregulated the mRNA levels of MC1R and MITF genes related to melanogenesis. The results of molecular docking between the structures of proteins (MITF, TYR, TYRP1) and kaempferide, isorhamnetin, methoxsalen showed that the binding score of kaempferide or isorhamnetin was higher than that of methoxsalen. **Conclusion** Kaempferide and isorhamnetin, the active ingredients in the clinical anti-vitiligo traditional Chinese medicine prescriptions, can promote the melanogenesis in zebrafish by up-regulating the MC1R/MITF signal pathway.

Key words: vitiligo; Chinese herbal property; kaempferide; isorhamnetin; zebrafish; MC1R; MITF

白癜风是一种慢性色素脱失性疾病，直接病因是黑色素细胞酪氨酸酶活性的降低或消失^[1]。中医治疗白癜风有着悠久的历史，中医理论中白癜风是由于肝气郁结，气机不畅，复受风湿相搏于皮肤，致气血阴阳不和，日久而伤脾。肝亏肾虚，加之肝脾不和，致皮毛腠理失养^[2-3]。维吾尔医学认为白癜风是由于黏液质的异常所致，其在性质上含有过度湿和过度寒，损害胃肠等脏器的正常生理功能，导

致异常体液生成，由此形成恶性循环^[4]。中医治疗白癜风多采用扶正祛邪的治疗原则，多用性温平，味甘、苦、辛的药材^[5]；而维医治疗白癜风主张清除异常的黏液质，多用性温热，味辛、苦的药材^[6]，临床抗白癜风医保目录方药信息见表 1。本文基于临床一线抗白癜风中成药的指导，从药性阴阳理论出发，寻找方药中促进黑色素生成的活性成分并探讨其机制。

表 1 临床抗白癜风医保目录方药信息

Table 1 Information of prescription drugs in clinical anti-vitiligo medical insurance catalogue

序号	药材	方剂名称	药性	味	质量标准
1	红花	外搽白灵酊 桃红清血丸 白灵片 白癜风丸 白癜风胶囊 白蚀丸	温	辛	含羟基红花黄色素 A ($C_{27}H_{32}O_{16}$) 不得少于 1.0%；含山柰素 ($C_{15}H_{10}O_6$) 不得少于 0.050%
2	白芷	外搽白灵酊 白灵片	温	辛	含芍药苷 ($C_{23}H_{28}O_{11}$) 不得少于 1.2%
3	紫草	桃红清血丸 白癜风丸 白癜风胶囊 白蚀丸	寒	甘、咸	含羟基萘醌总色素以左旋紫草素 ($C_{16}H_{16}O_5$) 计，不得少于 0.80%
4	降香	桃红清血丸 白蚀丸	温	辛	含挥发油不得少于 1.0%
5	制何首乌	桃红清血丸 白蚀丸	温	苦、甘、涩	含游离蒽醌以大黄素 ($C_{15}H_{10}O_5$) 和大黄素甲醚 ($C_{16}H_{12}O_5$) 的总量计，不得少于 0.10%
6	甘草	桃红清血丸 白蚀丸	平	甘	含甘草苷 ($C_{21}H_{22}O_9$) 不得少于 0.50%，甘草酸 ($C_{12}H_{22}O_{16}$) 不得少于 2.0%
7	龙胆	桃红清血丸 白癜风丸 白癜风胶囊 白蚀丸	寒	苦	龙胆含龙胆苦苷 ($C_{16}H_{20}O_9$) 不得少于 3.0%

续表 1

序号	药材	方剂名称	药性	味	质量标准
8	当归	白癜风丸 白癜风胶囊 白灵片	温	甘、辛	含挥发油不得少于 0.4%
9	牡丹皮	白灵片 白蚀丸	寒	甘、辛	含丹皮酚 (C ₉ H ₁₀ O ₃) 不得少于 1.2%
10	桃仁	桃红清血丸 白灵片 白癜风丸 白癜风胶囊	平	苦	含苦杏仁苷 (C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁) 不得少于 2.0%
11	苍术	桃红清血丸 白灵片 白蚀丸	温	甘、辛	含苍术素 (C ₁₃ H ₁₀ O) 不得少于 0.30%
12	补骨脂	驱白巴布期片 白蚀丸 补骨脂注射液	温	辛、苦	含补骨脂素 (C ₁₁ H ₆ O ₃) 和异补骨脂素 (C ₁₁ H ₆ O ₃) 的总量不得少于 0.70%
13	黄芪	白癜风丸 白癜风胶囊 白灵片	温	甘	含黄芪甲苷 (C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀) 不得少于 0.040%; 含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀) 不得少于 0.020%
14	川芎	白癜风丸 白癜风胶囊	温	辛	含阿魏酸 (C ₁₀ H ₁₀ O ₄) 不得少于 0.10%
15	香附	白癜风丸 白癜风胶囊	平	辛、苦、甘	含挥发油不得少于 1.0% (mL/g)
16	丹参	白癜风丸 白癜风胶囊 白蚀丸	微寒	甘	含丹参酮 II _A (C ₁₉ H ₁₈ O ₃) 不得少于 0.20%
17	干姜	白癜风丸 白癜风胶囊	热	辛	含挥发油不得少于 0.8%; 含 6-姜辣素 (C ₁₇ H ₂₆ O ₄) 不得少于 0.60%
18	蒺藜	桃红清血丸 白癜风丸 白癜风胶囊 白蚀丸	温	辛、苦	
19	白鲜皮	白癜风丸 白癜风胶囊	寒	苦	含梣酮 (C ₁₄ H ₁₆ O ₃) 不得少于 0.050%, 黄柏酮 (C ₂₆ H ₃₄ O ₇) 不得少于 0.15%
20	驱虫斑鸠菊	驱白巴布期片 复方驱虫斑鸠菊丸	热	苦	

1 材料

1.1 实验动物

TU 系斑马鱼 (成年斑马鱼及斑马鱼幼鱼各 200 条) 购自南京尧顺禹生物科技有限公司。饲养条件为光照 14 h 黑暗 10 h, 水温 (28.5±0.1) °C^[7]。

1.2 试剂

山柰素 (质量分数≥98%, 批号 R23N8F49014)、

异鼠李素 (质量分数≥98%, 批号 P09O8F45142)、甲氧沙林 (质量分数≥98%, 批号 P30J7M16998) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 西班牙琼脂糖 Agarose G-10 (批号 111860) 购自天津沃德生物科技有限公司; DMSO (质量分数≥99.9%, 批号 520C036) 购自北京索莱宝科技有限公司; 新铜试剂 (质量分数≥98%, 批号 BCBT4986) 购买自上海西

格玛奥德里奇贸易有限公司；甲苯胺蓝（批号 DB22BA0027）、UNI-Q-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒（批号 EA16KA9830）均购自上海生工生物工程股份有限公司；2×Taq PCR Mix（批号 R7018）购自北京天根生化科技有限公司；Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit（批号 00738278）购自 Thermo Fisher Scientific。引物购自上海生工生物工程股份有限公司，引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

基因	引物	长度/bp
MC1R	前: 5'-TCATCTTGGTGGTGTGGCTTGC-3'	274
	后: 5'-AAGAACGGTCCCCAGCAGAGG-3'	
MITF	前: 5'-TGTACAGCAATCATGCTCTTCC-3'	292
	后: 5'-GTCCCCAGCTCCTTAATTCTGTC-3'	
GAPDH	前: 5'-ACAGCAACACAGAAGACCGT-3'	359
	后: 5'-ATACCAGCACCAGCGTCAAA-3'	

2 方法

2.1 临床医保目录中抗白癜风中成药的收集

通过登录药智数据库 (<https://db.yaozh.com/>) 得到目前医保目录中抗白癜风的中成药共计 11 个, 其中维药 3 个。分别是外搽白灵酊[当归尾、红花、红花夹竹桃(叶)、苏木、没药、白芷、白矾、马齿苋]、桃红清血丸[蒺藜(炒)、紫草、降香、拳参、白薇、桃仁(炒)、红花、制何首乌、甘草、苍术(炒)、龙胆、白药子、海螵蛸]、润肌皮肤膏(大枫子仁、红粉、核桃仁、蓖麻子、樟脑、松香、蜂蜡)、白灵片(当归、三七、红花、牡丹皮、桃仁、防风、苍术、白芷、马齿苋、赤芍、黄芪)、白癜风丸(补骨脂、黄芪、红花、川芎、当归、香附、桃仁、丹参、乌梢蛇、紫草、白鲜皮、山药、干姜、龙胆、蒺藜)、白癜风胶囊(补骨脂、黄芪、红花、川芎、当归、香附、桃仁、丹参、乌梢蛇、紫草、白鲜皮、山药、干姜、龙胆、蒺藜)、白蚀丸[紫草、灵芝、降香、盐补骨脂、丹参、红花、制何首乌、海螵蛸、牡丹皮、黄药子、苍术(泡)、甘草、蒺藜、龙胆]、补骨脂注射液(补骨脂)、驱白巴布期片(补骨脂、驱虫斑鸠菊、高良姜、盒果藤、白花丹)、复方驱虫斑鸠菊丸(驱虫斑鸠菊、萆薢、王姜、阿纳其根、盒果藤根)、消白软膏(蛋黄、丁香、黑芝麻、黑种草子、芥子、阿育魏实、羊脂、硬脂酸、三乙醇胺、甘油、对羟基苯甲酸乙酯)。

2.2 成药性化合物分析及结构聚类

依托 TCMIP 数据库 (<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php>) 和 TCMSP 数据库 (<http://tcmsp.com>), 对出现频次最高的红花、龙胆、紫草、蒺藜、补骨脂和驱虫斑鸠菊中的黄酮类化合物进行挖掘。整合去重后, 通过 PubChem 数据库将化合物转化为 Canonical SMILES 格式, 利用 admetSAR 方法 (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR1/>) 对化合物进行成药性分析。公式 1 定义如下。

$$\text{score} = \sum_k(\text{result}) (Q) \quad (1)$$

其中 k 代表 CYP450 1A2、CYP450 2C9、CYP450 2D6、CYP450 2C19、CYP450 3A4 抑制剂。 Q 代表肝药酶总体预测精度。肝药酶抑制剂的总体预测精度为 CYP450 1A2 抑制剂 ($Q=0.8147$), CYP450 2C9 抑制剂 ($Q=0.8018$), CYP450 2D6 抑制剂 ($Q=0.8551$), CYP450 2C19 抑制剂 ($Q=0.8054$), CYP450 3A4 抑制剂 ($Q=0.6450$)^[8]。通过 OMIM 数据库 (<https://omim.org/>) 收集到 21 个临床抗白癜风药物, 运用 PubChem 数据库将化合物转化为 Canonical SMILES 格式, 并进行结构聚类分析^[9]。

2.3 网络构建及其分析

通过 Cytoscape 软件中 Network Analyzer 插件分析抗白癜风组方的接近向量中心度, 该值整体考量了每个结点到其他结点的最短路的平均长度, 反映了网络中某一结点与其他结点之间的接近程度。通过 Cytoscape 3.4.0 软件建立临床医保目录中成药-药材-药性-物质基础网络模型, 分析化合物药性^[10]。

2.4 建立成年斑马鱼脱色素模型

根据白癜风的直接病因, 使用铜离子螯合剂新铜试剂 (550 nmol/L) 作用于成年斑马鱼 20 d, 使其尾部黑色素脱失, 模拟临床白癜风色素脱失表征^[11]。

2.5 成年斑马鱼黑色素生成定性实验

取 4~12 月龄成年斑马鱼 100 条, 随机分为 4 组, 每组 25 条。分别为对照组: 550 nmol/L 新铜试剂处理 20 d, 自然恢复黑色素再生 3 d; 阳性对照组: 550 nmol/L 新铜试剂处理 20 d, 25 nmol/L 甲氧沙林处理 3 d; 异鼠李素组: 550 nmol/L 新铜试剂处理 20 d, 32 μmol/L 异鼠李素处理 3 d; 山柰素组: 550 nmol/L 新铜试剂处理 20 d, 32 μmol/L 山柰素处理 3 d。使用体式解剖镜 (8×) 进行皮肤黑色素再生观察^[12]。取斑马鱼尾部组织进行冰冻组织切片, 采用甲苯胺蓝染液染色, 光学显微镜 (200×) 观察斑马鱼尾部皮肤横截面成熟黑素体及黑色素带的

变化^[13]。

2.6 成年斑马鱼黑色素生成定量实验

取每组 6 条斑马鱼皮肤，组织匀浆后使用含 10% DMSO 的 NaOH (2 mol/L) 溶液于 80 ℃ 水浴 2 h。离心吸取上清，于 350 nm 处获取吸光度 (A) 值^[14]。与对照组相比，计算每 25 mg 皮肤中的 A 值。

$$A = (A_{\text{治疗}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{对照}} \times 25 \text{ mg}) \quad (2)$$

2.7 成年斑马鱼尾鳍再生实验

取 4~12 月龄斑马鱼，将其尾鳍截断 2/3，治疗 1~2 d。再生第 1 阶段（断鳍后 24 h）与第 2 阶段（断鳍后 36~48 h）新生基质中黑色素细胞分化量分别代表黑色素细胞分化早期分化标志物小眼相关转录因子 (MITF) 和晚期分化标志物受体酪氨酸激酶 (Kira) 和多巴色素异构酶 (DCT) 的表达^[15]。对照组：断鳍后于纯水中自然生长尾鳍；阳性对照组：断鳍后于 25 $\mu\text{mol/L}$ 甲氧沙林中生长尾鳍；治疗组：断鳍后分别于 32 $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素与 32 $\mu\text{mol/L}$ 山柰素中生长尾鳍。

2.8 成年斑马鱼尾鳍再生实验中新生原基的冰冻组织切片

取 4~12 个月龄斑马鱼，将其尾鳍斜切截断，使用 32 $\mu\text{mol/L}$ 山柰素、32 $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素和 25 $\mu\text{mol/L}$ 甲氧沙林处理 10 d，取斑马鱼尾部新生原基进行横向冰冻组织切片，使用苏木素染液进行染色^[15]。其中甲氧沙林处理组为阳性对照组，山柰素与异鼠李素处理组为治疗组。

2.9 斑马鱼幼鱼黑色素新生及胚胎存活率

斑马鱼胚胎每组 25~30 个，于受精后 6 h 给予 25 $\mu\text{mol/L}$ 甲氧沙林，32 $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素和 32 $\mu\text{mol/L}$ 山柰素，处理 72 h 后使用光学显微镜记录黑色素生成过程，并统计胚胎存活率^[16]。其中甲氧沙林处理组为阳性对照组，山柰素与异鼠李素处理组为治疗组。

$$\text{胚胎存活率} = \text{活胚胎数} / \text{总胚胎数} \quad (3)$$

2.10 RT-PCR 凝胶电泳

提取斑马鱼幼鱼 RNA，使用 Q5000 检测纯度与浓度；使用 cDNA 逆转试剂盒逆转成 cDNA；使用 2×Taq PCR Mix 扩增，扩增条件为 38 个循环，95 ℃、5 min；95 ℃、30 s；60 ℃、30 s；72 ℃、40 s；72 ℃、5 min。通过 RT-PCR 凝胶电泳，检测产物并进行灰度值分析^[17]。

2.11 分子对接

山柰素、异鼠李素与黑色素合成下游蛋白

MITF、酪氨酸酶 (TYR)、酪氨酸相关蛋白酶 1 (TYRP1)，一起进行虚拟分子对接，使用甲氧沙林作为阳性对照。在 SYBYL-X 2.0 中使用 Surflex-Dock 对山柰素、异鼠李素和甲氧沙林进行对接和评分。将化合物模型通过 Surflex-Dock (默认设置采样了统治弹性) 对接到晶体结构蛋白质模型中，然后通过 Surflex-Dock 评分功能评分^[18]。

2.12 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行统计学分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 基于临床医保目录抗白癜风中成药的网络整合

基于临床医保目录抗白癜风中成药的指导，将 11 个中成药组方收集，见表 3。通过对使用频次位于前 20 的药材进行药性和物质基础的分析，建立中成药-药材-药性-物质基础的网络拓扑图，见图 1。其中中药材出现频次最高的为红花 (6 次)。本文发现药性温热，味辛、苦、甘药材居多，且这些药材的物质基础中，黄酮类化合物占比最大。

表 3 关键药材中主要化合物类型

Table 3 Types of main compounds in key herbal medicines

中药名称	主要化合物
紫草	萘醌类、单贴苯酚及苯醌类、酚酸类、生物碱类、脂肪族及酯类
龙胆	萜类、黄酮类
蒺藜	皂苷类、黄酮类、生物碱类、多糖类
红花	黄酮类、多糖类、脂肪酸类、生物碱类
驱虫斑鸠菊	黄酮类、内酯类
白芷	香豆素类、黄酮类、生物碱类
降香	萜类、黄酮类、挥发油
制何首乌	蒽醌类、黄酮类、磷脂类、多糖类
甘草	萜类、黄酮类化合物、多糖类
当归	内酯类、香豆素类、黄酮类、多糖类
牡丹皮	酚类、萜类、黄酮类、有机酸类、香豆素类
桃仁	黄酮类、萜类、酚酸类、类胡萝卜素类、赤霉素类、多糖类
苍术	挥发油、黄酮类、苷类、多糖类
黄芪	黄酮类、皂苷类、多糖类、生物碱类
川芎	苯酚类、酚酸类、生物碱类、黄酮类
香附	挥发油类、黄酮类、生物碱类
丹参	酚酸类、黄酮类
干姜	酚类、黄酮类、多糖类、生物碱类
白鲜皮	黄酮类、苯丙素类、香豆素类、酚酸类
补骨脂	香豆素类、黄酮类、酚类

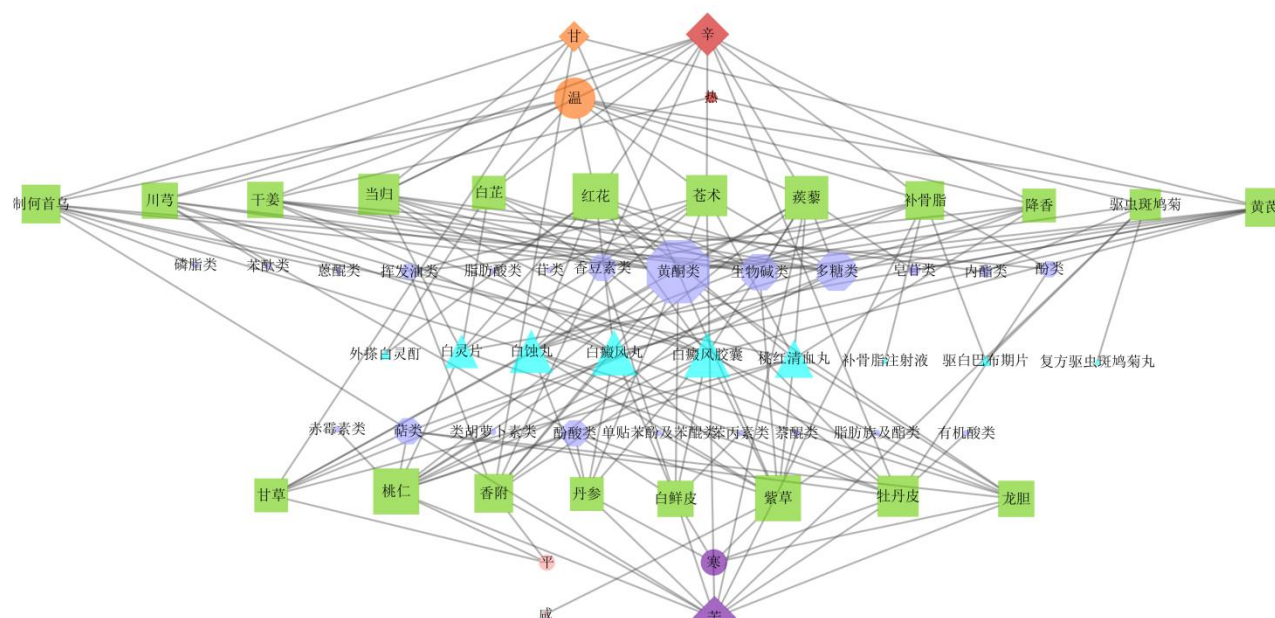


图 1 临床医保目录中成药-药材-药性-物质基础网络拓扑图

Fig. 1 Topological relationship of network of Chinese patent medicine-herbal medicine-Chinese herbal property-substance basis in clinical medical insurance catalogue

3.2 黄酮类活性化合物中药动力学预测参数

通过数据库与文献的挖掘,收集到龙胆中黄酮类化合物 10 个,蒺藜中黄酮类化合物 3 个,红花中黄酮类化合物 49 个,驱虫斑鸠菊和补骨脂中黄酮类化合物 49 个,整合去重转化为 Canonical SMILES 格式后共计 81 个。基于 admetSAR 方法,根据化合物吸收、代谢、分布、排泄等药动力学参数筛选出 41 个成药性分子(评分>0)。其中根据稳定性原理将

目标锁定在甲氧基黄酮类化合物山柰素和异鼠李素。见表 4。

3.3 山柰素、异鼠李素与临床抗白癜风药物的结构聚类

通过 PubChem 数据库获得 21 个临床抗白癜风药物,与山柰素、异鼠李素一同转化为 Canonical SMILES 格式,进行结构聚类分析。结果显示,山柰素、异鼠李素结构相似度大于 0.9,而山柰素、异鼠李素与甲氧沙林结构相似度大于 0.7。见图 2。

表 4 成药性分子中药动力学预测参数

Table 4 ADME properties in active compounds via admetSAR prediction

编号	化合物	吸收		代谢(亚型抑制剂 CYP450)					评分
		HIA	Caco-2	CYP450 1A2	CYP450 2C9	CYP450 2D6	CYP450 2C19	CYP450 3A4	
1	trifolin	0.786	0.940	0.908	0.930	0.951	0.929	0.919	3.640
2	quercimeritrin (6CI, 7CI, 8CI)	0.786	0.940	0.908	0.930	0.951	0.929	0.919	3.640
3	neocarthamin	0.786	0.940	0.908	0.930	0.951	0.929	0.919	3.640
4	tagetiin	0.786	0.940	0.908	0.930	0.951	0.929	0.919	3.640
5	astragalin	0.786	0.940	0.908	0.930	0.951	0.929	0.919	3.640
6	isosaponarin	0.701	0.932	0.918	0.932	0.946	0.905	0.939	3.638
7	saponarin	0.701	0.932	0.918	0.932	0.946	0.905	0.939	3.638
8	sophoraflavonolloside	0.701	0.932	0.918	0.932	0.946	0.905	0.939	3.638
9	quercetin-3,7-di-O-β-D-glucoside	0.701	0.932	0.918	0.932	0.946	0.905	0.939	3.638
10	nicotiflorin	0.804	0.917	0.867	0.907	0.955	0.903	0.925	3.574

续表 4

编号	化合物	吸收		代谢 (亚型抑制剂 CYP450)					评分
		HIA	Caco-2	CYP450 1A2	CYP450 2C9	CYP450 2D6	CYP450 2C19	CYP450 3A4	
11	rutin	0.804	0.917	0.867	0.907	0.955	0.903	0.925	3.574
12	isovitexin	0.944	0.916	0.836	0.907	0.948	0.924	0.831	3.498
13	chinoinin	0.944	0.916	0.836	0.907	0.948	0.924	0.831	3.498
14	isoorientin	0.944	0.916	0.836	0.907	0.948	0.924	0.831	3.498
15	safflomin-A	0.816	0.792	0.903	0.811	0.918	0.822	0.891	3.407
16	carthamone	0.653	0.817	0.905	0.772	0.914	0.820	0.913	3.387
17	hydroxysafflor-yellow-A	0.780	0.777	0.886	0.758	0.931	0.795	0.898	3.345
18	carthamin	0.780	0.777	0.886	0.758	0.931	0.795	0.898	3.345
19	syrigin	0.770	0.752	0.855	0.875	0.882	0.803	0.837	3.338
20	sesquiterpene	0.843	0.615	0.898	0.907	0.931	0.881	0.517	3.298
21	sitogluside	0.879	0.834	0.805	0.768	0.919	0.839	0.794	3.245
22	swertianin	0.921	0.785	0.980	0.890	0.859	0.582	0.768	3.210
23	myricetin	0.965	0.896	0.911	0.582	0.929	0.903	0.695	3.178
24	6-hydroxykaempferol	0.965	0.896	0.911	0.582	0.929	0.903	0.695	3.178
25	baicalein	0.965	0.896	0.911	0.582	0.929	0.903	0.695	3.178
26	quercetagenin	0.965	0.896	0.911	0.582	0.929	0.903	0.695	3.178
27	quercetin	0.965	0.896	0.911	0.582	0.929	0.903	0.695	3.178
28	baicalin	0.737	0.896	0.770	0.721	0.963	0.833	0.735	3.173
29	lignan	1.000	0.786	0.806	0.807	0.957	0.564	0.869	3.137
30	gentisein	0.963	0.885	0.955	0.510	0.890	0.582	0.924	3.013
31	gentisin	0.974	0.937	0.977	0.661	0.781	0.760	0.597	2.991
32	tricin	0.972	0.890	0.867	0.626	0.625	0.819	0.782	2.906
33	6-hydroxynaringenin	0.922	0.858	0.819	0.579	0.793	0.793	0.701	2.899
34	isorhamnetin	0.978	0.887	0.922	0.756	-0.699	0.865	0.735	1.930
35	kaempferide	0.978	0.887	0.922	0.756	-0.699	0.865	0.735	1.930
36	isoliquiritigenin	0.989	0.887	0.935	0.895	-0.923	0.899	0.796	1.928
37	apigenin	0.989	0.854	0.922	0.775	-0.923	0.704	0.958	1.768
38	liquiritigenin	0.992	0.714	0.874	0.935	-0.885	0.846	0.521	1.722
39	kaempferol	0.986	-0.745	0.911	0.895	-0.908	0.643	0.724	1.668
40	eriodictyol	0.922	-0.858	0.819	0.579	-0.793	-0.793	0.701	0.267
41	butein	0.970	0.608	0.893	0.511	-0.926	-0.877	0.679	0.077

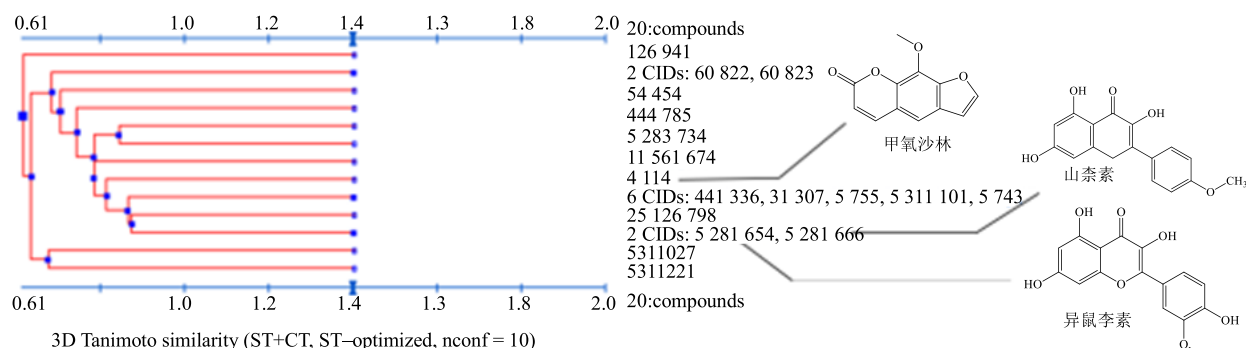


图 2 山柰素、异鼠李素与临床抗白癜风药物的结构聚类

Fig. 2 Structural clustering of kaempferide, isorhamnetin and clinical anti-vitiligo drugs

3.4 山柰素和异鼠李素对成年斑马鱼脱色素模型中黑色素的影响

550 nmol/L 新铜试剂处理成年斑马鱼 20 d 致使斑马鱼尾部皮肤横条纹黑色素完全脱失。建立好的成年斑马鱼脱色素模型给予甲氧沙林、异鼠李素、山柰素处理 3 d。结果显示甲氧沙林、异鼠李素和山柰素均能够促进成年斑马鱼脱色素模型的黑色素再

生, 异鼠李素和山柰素效果优于甲氧沙林, 见图 3-A。斑马鱼皮肤冰冻组织切片结果显示甲氧沙林、异鼠李素和山柰素能够使斑马鱼皮肤横截面黑色素带延长, 且成熟黑色素体数量增加, 见图 3-B。通过斑马鱼皮肤黑色素含量测定结果显示, 与对照组比较, 山柰素、异鼠李素和甲氧沙林均能显著增加斑马鱼尾部皮肤中的黑色素含量 ($P < 0.05$), 见图 4。

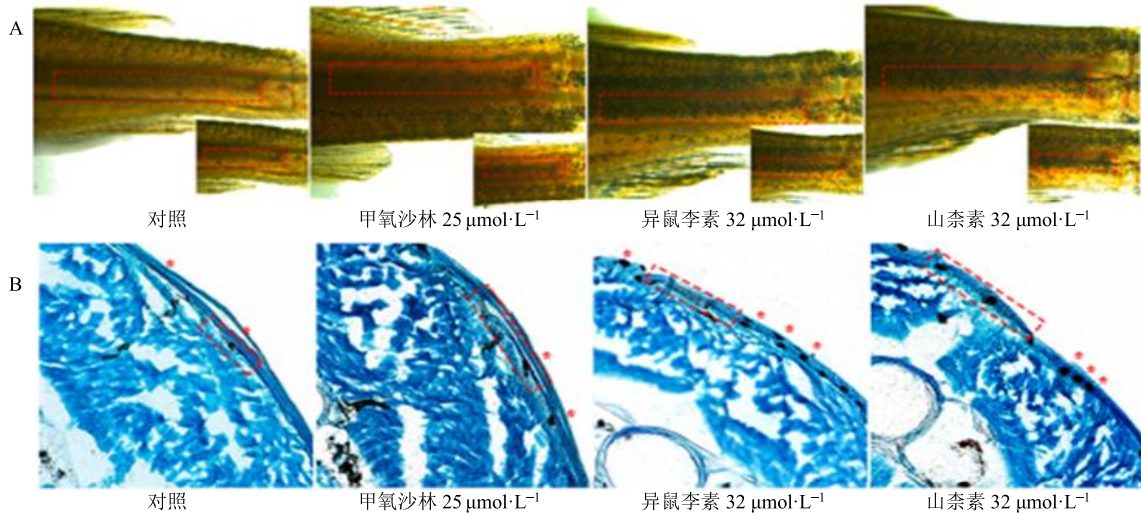
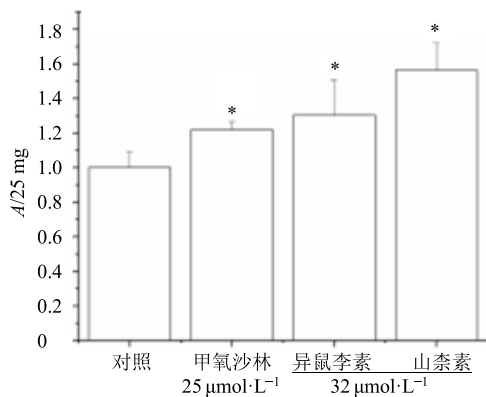


图 3 山柰素和异鼠李素对成年斑马鱼脱色素模型中黑色素的影响

Fig. 3 Effects of kaempferide and isorhamnetin on melanin in adult zebrafish depigmentation model



与对照组比较: * $P < 0.05$, 下图同

* $P < 0.05$ vs control group, same as below graphs

图 4 山柰素和异鼠李素对成年斑马鱼脱色素模型中黑色素的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Effects of kaempferide and isorhamnetin on melanin in adult zebrafish depigmentation model ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.5 山柰素与异鼠李素对尾鳍再生实验中 MITF、Kita 和 DCT 表达的影响

斑马鱼断鳍再生后, 给予甲氧沙林、异鼠李素、山柰素处理, 见图 5-A。结果显示第 1 阶段和第 2

阶段中甲氧沙林、异鼠李素和山柰素均能够促进斑马鱼尾鳍新生基质中的黑色素分化, 这暗示了甲氧沙林、异鼠李素和山柰素均能促进鳍再生实验中黑色素细胞的早期分化标志物 MITF、晚期分化标志物 Kita 和 DCT 的表达, 见图 5-B。

3.6 山柰素与异鼠李素对尾鳍再生实验中新生原基中黑色素的影响

斑马鱼断鳍再生后, 给予甲氧沙林、异鼠李素、山柰素处理 10 d, 对新生原基进行冰冻组织切片, 见图 6-A。结果显示药物处理后新生原基中成熟黑色素体增加, 这暗示了甲氧沙林、异鼠李素和山柰素均能使尾鳍新生原基中的成熟黑色素体增加, 见图 6-B。

3.7 山柰素与异鼠李素对斑马鱼幼鱼黑色素新生及胚胎存活率的影响

斑马鱼幼鱼给予甲氧沙林、异鼠李素、山柰素处理 72 h, 结果显示甲氧沙林、异鼠李素和山柰素均能够加速斑马鱼幼鱼眼部、背脊及腹部黑色素的新生, 见图 7-A。在给药处理 72 h 后, 山柰素与异鼠李素对幼鱼的致死率小于 5%, 而甲氧沙林对斑马鱼幼鱼的致死率大于 5%, 小于 10%, 见图 7-B。

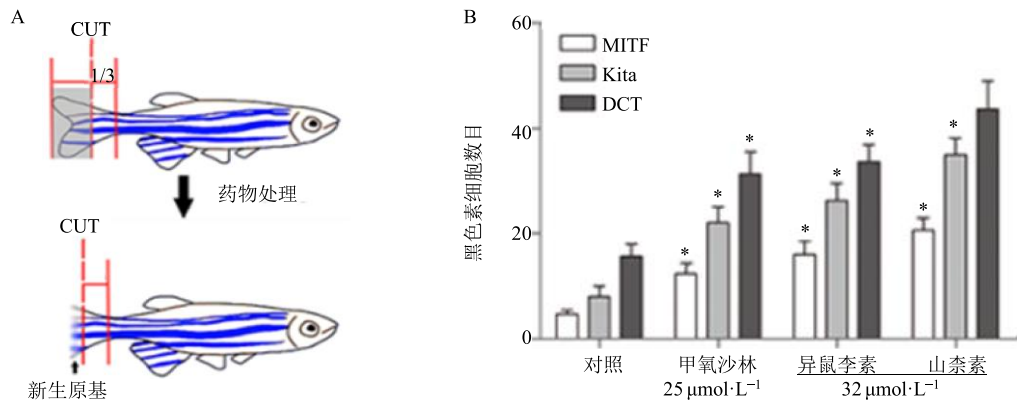


图 5 山柰素与异鼠李素对尾鳍再生实验中 MITF、Kita 和 DCT 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effects of kaempferide and isorhamnetin on expression of MITF, Kita and DCT in fin regeneration experiment in zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

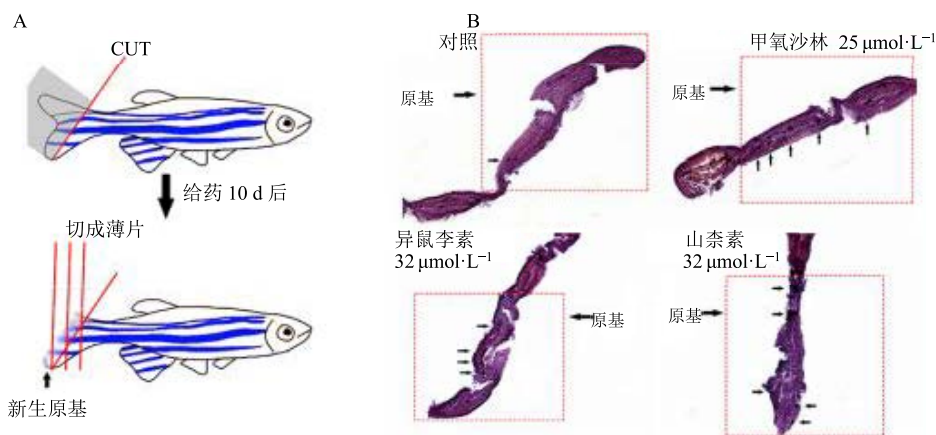


图 6 山柰素与异鼠李素对尾鳍再生实验中新生原基中黑色素的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effects of kaempferide and isorhamnetin on melanin of blastemata in fin regeneration experiment ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

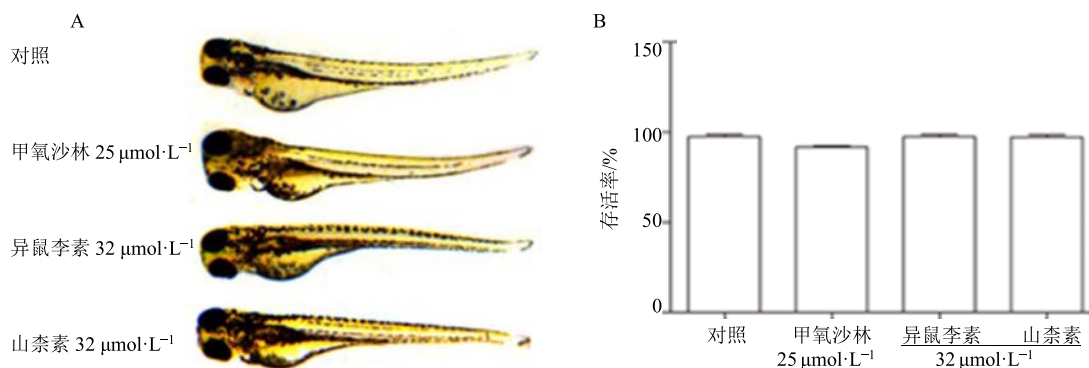


图 7 山柰素与异鼠李素对斑马鱼幼鱼黑色素新生及胚胎存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Fig. 7 Effects of kaempferide and isorhamnetin on melanin regeneration and embryo survival rate in zebrafish larvae ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

3.8 山柰素与异鼠李素对斑马鱼幼鱼黑色素合成关键基因 MC1R 和 MITF mRNA 水平的影响

山柰素、异鼠李素与甲氧沙林处理斑马鱼幼鱼 72 h 后, 检测其 mRNA 水平的变化。RT-PCR 凝胶

电泳结果显示山柰素、异鼠李素和甲氧沙林能够显著上调 MC1R、MITF mRNA 水平的表达 ($P < 0.05$), 从而促进斑马鱼皮肤黑色素的新生和再生, 见图 8。

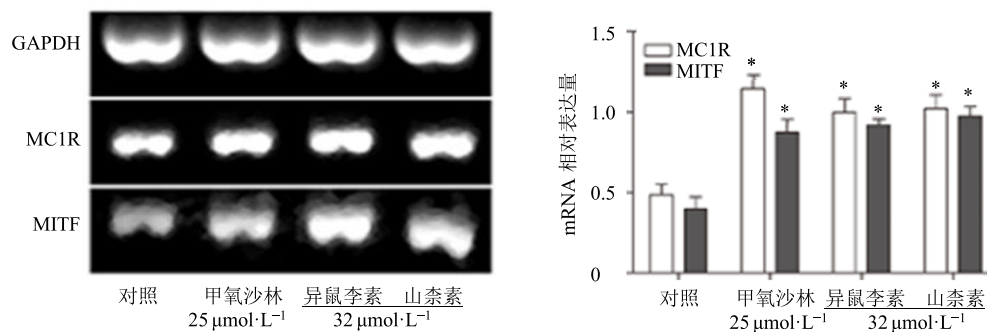


图 8 山柰素与异鼠李素对斑马鱼幼鱼 MC1R 和 MITF mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

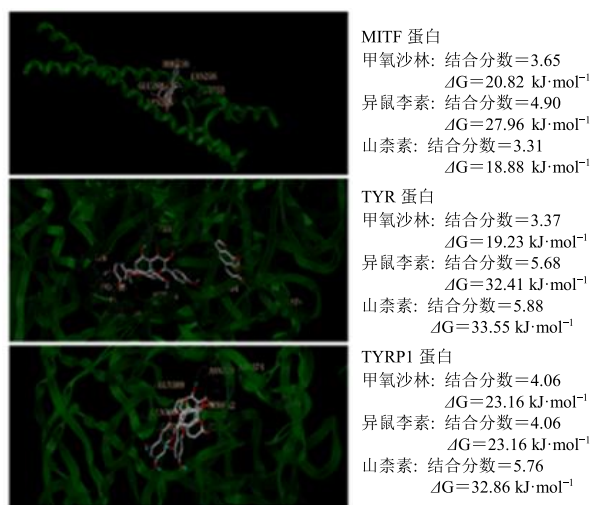
Fig. 8 Effects of kaempferide and isorhamnetin on levels of MC1R and MITF mRNA in zebrafish larvae ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.9 山柰素、异鼠李素与黑色素合成关键蛋白的分子对接

通过 SYBYL-X 2.0 软件将山柰素、异鼠李素与黑色素合成关键蛋白 (MITF、TYR 和 TYRP1) 进行分子对接, 评分结果显示山柰素、异鼠李素与 MITF 的结合分数分别是 3.31、4.90, 结合自由能 (ΔG) 分别为 -18.88、-27.96 kJ/mol, 而甲氧沙林结合分数为 3.65, ΔG 为 -20.82 kJ/mol; 山柰素、异鼠李素与 TYR 结合分数分别为 5.88、5.68, 结合自由能 ΔG 分别为 -33.55、-32.41 kJ/mol, 而甲氧沙林结合分数为 3.37, ΔG 为 -19.23 kJ/mol; 山柰素与 TYRP1 的结合分数为 5.76, ΔG 为 -32.86 kJ/mol, 而异鼠李素和甲氧沙林的结合分数为 4.06, ΔG 为 -23.16 kJ/mol。山柰素、异鼠李素、甲氧沙林与 MITF 蛋白晶体构象结合的氨基酸残基均包括 TYR253 与 LYS265; 与 TYRP1 蛋白晶体构象结合的氨基酸残基包括 HOH642 与 ARG374。另外, 山柰素、异鼠李素与 TYR 蛋白晶体构象结合的氨基酸残基包括 ASP354、THR344 和 ASN346, 与甲氧沙林结合的氨基酸残基 LYS379 不同, 见图 9。

4 讨论

白癜风是一种后天获得性皮肤病, 是世界 3 大顽固性皮肤病之一。其特征是局部色素脱失且边界划分清晰。白癜风的世界发病率为 1%, 我国发病率为 0.72%^[19]。目前临床上白癜风的药物治疗存在有效率与治愈率的限制且不良反应发生率高^[20]。西方医学研究提出白癜风的发病假说包括自身免疫学说、氧化应激学说、精神-神经学说等, 但其具体发病机制尚不清楚^[21]。中医理论中白癜风是由脏腑功能失调, 风湿相搏于皮肤, 气血失和所致^[22-23]。明代《医贯》中提到“阴阳者, 或指天地, 或指气血”^[24],



黄色虚线表示通过软件 SYBYL-X 2.0 模拟的山柰素、异鼠李素、甲氧沙林的氢键相互作用

Yellow dotted line represented possible hydrogen-bonding interactions of kaempferide, isorhamnetin, and methoxsalen by the software SYBYL-X 2.0

图 9 山柰素、异鼠李素与黑色素合成关键蛋白的分子对接
Fig. 9 Molecular docking among kaempferide, isorhamnetin, and key proteins of melanin synthesis

由此可知, 白癜风的发生发展是由于阴阳失衡所致。中药四性五味即分阴阳, 温热属阳, 凉寒属阴; 辛甘发散为阳, 酸苦涌泄为阴^[25-26]。维医气质学说中寒、热、湿、干等 8 种气质衍生于此^[27]。在维医理论中, 白癜风是由于黏液质的异常所致, 黏液质对应人体体液, 体液的调和包括了淋巴液、血液、脑脊液与胃肠道消化液^[28], 这与西医提出的发病假说相符。本研究基于药性阴阳理论, 对临床医保目录抗白癜风中成药中活性成分筛选并进行初步药效学评价及机制探讨。

临床纳入医保目录中的抗白癜风中成药共 11

个, 其中维药 3 个。本研究对其包含的药材进行药性、味与物质基础的整合, 建立网络拓扑图。研究发现药材大多性温, 寒次之; 大多药材味辛、苦, 甘次之; 维药以温热辛苦药材为主, 均以阴阳调和为原则。根据物质基础的分析, 不同药材中黄酮类化合物占比最大, 且黄酮类化合物大多出现在温热药材中。通过 TCMSP 和 TCMIP 数据库收集药材中黄酮类化合物, 去除重复项得到 81 个化合物。通过 PubChem 数据库将这 81 个化合物转化为 Canonical SMILES 格式, 用以 AdmetSAR 方法的分析。最终筛选出 41 个成药性分子。Wen 等^[28]表明带有甲氧基官能团的黄酮类化合物在代谢方面具有更高的稳定性, 筛选出山柰素与异鼠李素。通过 PubChem 数据库将临床现有抗白癜风治疗药物进行结构聚类, 得出山柰素与异鼠李素结构相似度在 0.9 以上。根据分子药性假说, 药材中主要活性成分可被认为与该药材药性相似, 且具有相近药理作用的分子或分子群的构效关系相近可认为该分子群药性相似^[29]。因此可认为异鼠李素、山柰素药性、味同红花, 性温, 味辛。因而本研究筛选出稳定性较高的甲氧基黄酮类化合物山柰素和异鼠李素作为研究对象。

白癜风的药物治疗主要集中在体外研究, 其中 B16F10 细胞运用最为广泛, 但黑色素瘤细胞的衰老、凋亡等造成的非特异性色素积累, 不可避免地对抗白癜风药物的筛选造成阻碍^[30-31]。斑马鱼模型是一种新型脊椎动物模型, 近年来被广泛应用于毒理学、肿瘤等多个领域的研究^[32-33]。其个体小, 占位空间小, 胚胎透明, 且因其皮肤色素条纹而为人所知^[34]。本研究使用铜螯合剂新铜试剂建立斑马鱼脱色素模型, 给予山柰素、异鼠李素以及阳性药甲氧沙林治疗, 发现三者均能促进斑马鱼皮肤黑色素的再生。鳍再生实验早在 1983 年就已经成为黑色素细胞分化的经典实验。通过尾鳍新生基质中黑色素量及迁移能够反映出黑色素细胞早期分化标志物 MITF 和晚期分化标志物 Kita 和 DCT 的表达^[35]。通过尾鳍再生实验, 本研究得出山柰素、异鼠李素和甲氧沙林能都提升这三者的表达, 加速原基中成熟黑素体的形成, 同时也提示了 MITF 与 DCT 在山柰素、异鼠李素及甲氧沙林促进斑马鱼尾鳍新生基质中黑色素的再生过程中起到关键作用。斑马鱼幼鱼的结果显示山柰素和异鼠李素能够加速黑色素的再生, 且有效浓度对斑马鱼胚胎的存活率超过 90%。该模型避免了 B16F10 细胞非特异性色素积累的结

果, 同时也满足了体外模型所不能达到的药物在体过程^[36]。RT-PCR 凝胶电泳提示了山柰素、异鼠李素及甲氧沙林促进斑马鱼皮肤黑色素生成是通过作用于 MC1R/MITF 信号通路, 这与多数体外研究结果一致^[8,10,37]。通过计算机模拟分子对接也进一步验证了相较于甲氧沙林, 山柰素或异鼠李素与黑色素合成底物酶的结合分数更高。

综上所述, 本研究基于中药药性阴阳理论, 对临床医保目录中抗白癜风中成药进行药性与物质基础分析, 筛选出关键成药性分子山柰素和异鼠李素, 作用于斑马鱼模型。评价山柰素、异鼠李素及阳性药甲氧沙林对斑马鱼皮肤黑色素的新生和再生的促进作用, 并发现 3 者均能够上调 MC1R 和 MITF mRNA 水平从而导致黑色素的积累。本研究的意义在于基于临床一线处方, 结合药性理论, 分析活性化合物与药性的潜在关系, 为寻找新的临床抗白癜风活性化合物提供线索。

志谢: 华东理工大学唐赞教授课题组对本研究在分子对接方面的支持。石河子大学药学院新疆植物药资源利用重点实验室对本研究的支持。

参考文献

- [1] 刘铜华. 维药驱虫斑鸠菊治疗白癜风的研究与应用 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 2004, 26(2): 103-104.
- [2] 中华中医药学会皮肤科分会. 白癜风中医治疗专家共识 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2017, 16(2): 191-192.
- [3] (清) 吴 谦. 医宗金鉴 [M]. 刘国正校注. 北京: 中医古籍出版社, 1995.
- [4] 斯拉甫·艾白, 玉苏甫·麦提努尔, 吐尔逊·乌甫尔. 白癜风的维医诊断与治疗 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 2012.
- [5] 田 军, 周进科, 李 强. 白癜风免疫发病机制研究新进展 [J]. 医学综述, 2016, 22(18): 3541-3545.
- [6] 吐尔逊·乌甫尔, 斯拉甫·艾白, 热甫哈提·赛买提, 等. 白癜风患者 1 051 例维吾尔医辨证分析 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(11): 1056-1057.
- [7] 彭蕴茹, 韦英杰, 丁永芳, 等. 基于斑马鱼模型的药物毒性研究进展与中药毒性研究新策略 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 17-30.
- [8] Wang J Y, Chen H, Wang Y Y, et al. Network pharmacological mechanisms of *Vernonia anthelmintica* (L.) in the treatment of vitiligo: Isorhamnetin induction of melanogenesis via up-regulation of melanin-biosynthetic genes [J]. *BMC Syst Biol*, 2017, 11(1): 103.
- [9] Cheng F X, Li W H, Zhou Y D, et al. admetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties [J]. *J Chem Inf Model*, 2012,

- 52(11): 3099-3105.
- [10] 王吉烨, 王晓琴, 唐 赟, 等. 基于黏液质理论 4 种抗白癜风维吾尔族药材的网络药理学机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(9): 1780-1788.
- [11] Higdon C W, Mitra R D, Johnson S L. Gene expression analysis of zebrafish melanocytes, iridophores, and retinal pigmented epithelium reveals indicators of biological function and developmental origin [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67801.
- [12] Kelsh R. Mutations in C10orf11, encoding a melanocyte differentiation gene, cause autosomal recessive albinism [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013, 26(5): E25.
- [13] Ng A, Uribe R A, Yieh L, et al. Zebrafish mutations in gart and paics identify crucial roles for de novo purine synthesis in vertebrate pigmentation and ocular development [J]. *Development*, 2009, 136(15): 2601-2611.
- [14] Maldonado E, Hernandez F, Lozano C, et al. The zebrafish mutant vps18 as a model for vesicle-traffic related hypopigmentation diseases [J]. *Pigment Cell Res*, 2006, 19(4): 315-326.
- [15] Lee Y, Nachtrab G, Klinsawat P W, et al. Ras controls melanocyte expansion during zebrafish fin stripe regeneration [J]. *Dis Model Mech*, 2010, 3(7/8): 496-503.
- [16] Baek S H, Lee S H. Omeprazole inhibits melanin biosynthesis in melan-a cells and zebrafish [J]. *Exp Dermatol*, 2016, 25(3): 239-241.
- [17] Ramos-Balderas J L, Carrillo-Rosas S, Guzman A, et al. The zebrafish mutants for the V-ATPase subunits d, ac45, E, H and c and their variable pigment dilution phenotype [J]. *BMC Res Notes*, 2013, 6(1): 39.
- [18] Zimmermann M C, Tilghman S L, Boué S M, et al. Glyceollin I, a novel antiestrogenic phytoalexin isolated from activated soy [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 332(1): 35-45.
- [19] Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, et al. Vitiligo [J]. *Lancet*, 2015, 386(9988): 74-84.
- [20] Zhou W, Wang Y H, Lu A P, et al. Systems pharmacology in small molecular drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 246.
- [21] Iannella G, Greco A, Didona D, et al. Vitiligo: Pathogenesis, clinical variants and treatment approaches [J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15(4): 335-343.
- [22] 刘徐雪纯, 杨碧莲. 白癜风辨治法探究 [J]. 环球中医药, 2019, 12(5): 734-736.
- [23] 李 跃, 孙丽蕴. 中医古代文献对紫白癜风(花斑癣)的病名释义及治疗述要 [J]. 中医文献杂志, 2019, 37(2): 33-36.
- [24] (明)赵献可. 医贯 [M]. 刘志龙, 宋含平整理. 海口: 海南国际新闻出版中心, 1995.
- [25] (明)杜文燮编. 药鉴 [M]. 焦耿芳校. 北京: 商务印书馆, 1976.
- [26] 郭文鹤, 李晓宇, 黄娜娜, 等. 基于中药性味理论的补骨脂配伍规律研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2017, 14(12): 737-741.
- [27] 汤晓东. 维医体质学说浅谈 [A] // 第十次全国中医养生康复学术会议论文集 [C]. 兰州: 中华中医药学会, 2012.
- [28] Wen X, Walle T. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(10): 1786-1792.
- [29] 李石生, 谭宁华. 中药现代化研究的关键在于建立科学的现代中药理论体系: 分子药性假说的提出 [J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(2): 83-84.
- [30] Zaidi K U, Ali S A, Ali A S. Purified mushroom tyrosinase induced melanogenic protein expression in B16F10 melanocytes: A quantitative densitometric analysis [J]. *Open Med Chem J*, 2018, 12: 36-47.
- [31] Zhong H, An X H, Li Y, et al. Sodium tanshinone II_A silicate increases melanin synthesis by activating the MAPK and PKA pathways and protects melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(33): 18747-18757.
- [32] Zou J, Beermann F, Wang J X, et al. The Fugu tyrp1 promoter directs specific GFP expression in zebrafish: tools to study the RPE and the neural crest-derived melanophores [J]. *Pigment Cell Res*, 2006, 19(6): 615-627.
- [33] Akimenko M A, Mari-Beffa M, Becerra J, et al. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration [J]. *Dev Dyn*, 2003, 226(2): 190-201.
- [34] Yamanaka H, Kondo S. *In vitro* analysis suggests that difference in cell movement during direct interaction can generate various pigment patterns *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(5): 1867-1872.
- [35] Rawls J F, Johnson S L. Zebrafish kit mutation reveals primary and secondary regulation of melanocyte development during fin stripe regeneration [J]. *Development*, 2000, 127(17): 3715-3724.
- [36] Oh S W, Park S H, Lee H S, et al. Melanogenic mechanism of ethanolic extract of *Dalbergia odorifera* [J]. *Mol Cell Toxicol*, 2017, 13(4): 453-459.
- [37] Niu C, Aisa H A. Upregulation of melanogenesis and tyrosinase activity: Potential agents for vitiligo [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1303.