

·研究生园地·

菟丝子、骨碎补提取物体外对酪氨酸酶活性的影响*

杜娟,夏佳楠,沈丽,王元元,王亚苹,张德芹

摘要:[目的] 考察菟丝子、骨碎补提取物体外对酪氨酸酶活性的影响。[方法] 采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法检测菟丝子、骨碎补对酪氨酸酶的激活率。[结果] 菟丝子、骨碎补提取物对酪氨酸酶活性具有激活作用。[结论] 菟丝子、骨碎补提取物能够激活酪氨酸酶活性,为其外用治疗白癜风提供了药理学依据。

关键词:菟丝子提取物;骨碎补提取物;酪氨酸酶活性

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1673-9043(2013)01-0052-03

酪氨酸酶(TYR)是皮肤黑色素生物合成的主要限速酶,其化学结构为铜结合糖蛋白。在皮肤黑色素生物合成过程中,酪氨酸羟化生成多巴,多巴氧化生成多巴醌,二羟基吲哚转化生成吲哚醌,这些反应步骤均需 TYR 参与, TYR 活性与黑色素合成量呈正相关^[1], TYR 活性改变可引起色素障碍性皮肤病如白癜风。白癜风好发于暴露部位而影响美观,机体酪氨酸酶活性是影响白癜风的主要因素。2005年版《中国药典》记载,骨碎补、菟丝子外用消风祛斑^[2]。本实验采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法检测菟丝子、骨碎补提取物对酪氨酸酶活性的影响,为菟丝子、骨碎补外用治疗白癜风提供药理学依据。

1 材料

1.1 实验仪器 TD-10001 电子天平(天津市天马仪器有限公司);Infinite M200 微量多功能读板机 TECAN。

1.2 药物及试剂 菟丝子药材:购于安徽亳州药材市场,产地:内蒙,批号 201004-1,由天津中医药大学药教研室李天祥老师鉴定为旋花科植物菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.)的干燥成熟种子。骨碎补药材:购于安徽亳州药材市场,产地:江西,批号 201103-2。由天津中医药大学药教研室李天祥老师鉴定为水龙骨科植物槲蕨(*Drynaria fortunei* Kunze

J.Sm.)的干燥根茎。Tyrosinase(批号 #120M700,美国 Sigma 公司);柚皮苷标准品(批号 110422-200610);L-DOPA(批号 #080M1712V,美国 Sigma 公司);磷酸缓冲液(批号 P1010,北京索莱宝科技有限公司);甲氧沙林(1 g/L,批号 2010004,重庆华邦制药股份有限公司产品)。

2 方法

2.1 试剂及药物的配制 菟丝子提取物的制备^[3]:菟丝子药材粉碎过 100 目筛,称取药材粉末 8 g 按照 1:14 的比例置于 112 mL 55%的乙醇中,60 ℃水浴振荡提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,浓缩,药渣溶于 4 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中,配成 2 g/mL 的药液,实验时稀释至 2、1、0.5、0.25 g/mL 不同浓度。

骨碎补提取物的制备^[4]:60%乙醇回流提取 3 次,浓缩烘干后保存备用。配制:实验时称取骨碎补浸膏 200 mg,溶于 1 mL 的二甲基砒(DMSO)中,配成 200 mg/mL 的药液,用 PBS 稀释至 100、50、25 g/L 不同浓度。

柚皮苷标准品:批号 110422-200610。配制:精密称取柚皮苷标准品 2 mg,溶于 0.2 mL 的 DMSO 中,配成 10 g/L 的溶液。实验时用 PBS 释至 400、200、100、50 μg/mL 不同浓度。

L-多巴溶液(10 mmol/L):称取 197.19 mg,用 PBS 定容至 100 mL,现用现配(MW:197.19 g/mol)。

酪氨酸酶溶液(143 U):称取 13.28 mg(25 KU)蘑菇酪氨酸酶(1 881 U/mg),用 PBS 定容至 25 mL,即 1 KU/mL。分装-20 ℃保存,临用时室温平衡,稀释至实验所需浓度 143 U/mL。

* 基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2008BA153B09)。

作者单位:300193 天津中医药大学

作者简介:杜娟(1987—),女,硕士研究生,主要研究方向为中药基本理论及临床应用。

通讯作者:张德芹,E-mail:deqin123@163.com。

2.2 酪氨酸酶活性的测定 参照文献[5]方法。以蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法测定酪氨酸酶活性,反应混合物(20 μL 的样品+70 μL 143 U/mL 的蘑菇酪氨酸酶)37 °C温育 10 min,加入 70 μL 10 mmol/L 的 L-多巴溶液,2 min 后立即于 475 nm 处测其吸光度,模型组以 PBS 代替样品的反应混合物作为模型对照组。每个样品均设置一个空白对照组,以 70 μL PBS 代替蘑菇酪氨酸酶。

菟丝子的提取物取 2、1、0.5、0.25 g/mL 4 种不同浓度;骨碎补提取物取 100、50、25 g/L 不同浓度;柚皮苷标准品取 400、200、100、50 μg/mL 4 种不同浓度。每一个实验重复 3 次。

按以下公式计算酶激活率^[6]:酪氨酸酶激活率(%)=[(C-D)-(A-B)]/(A-B)×100。其中:A:未加样品的加酶混合液所测的吸收度;B:未加样品也未加酶的混合液所测的吸收度;C:加样品和酶的混合液所测的吸光度;D:加中药样品而未加酶的混合液所测的吸光度。

2.3 统计 采用 SPSS 18.0 软件包进行统计学处理。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, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

见表 1、表 2。

表 1 菟丝子提取物对蘑菇酪氨酸酶的激活作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度(g/mL)	激活率(%)
甲氧沙林组	0.001	5.07±0.17
菟丝子提取物	2.000	13.14±3.06**
	1.000	56.07±0.72**
	0.500	68.22±0.37**
	0.250	50.09±1.96**

注:与甲氧沙林组相比,** $P<0.01$ 。

由表 1 可见,菟丝子提取物的不同浓度对酪氨酸酶活性具有不同浓度的激活作用,且相比于阳性药甲氧沙林,各浓度菟丝子提取物对酪氨酸酶的激活率均差异有统计学意义,表明,菟丝子提取物具有激活酪氨酸酶活性的作用且优于甲氧沙林。

由表 2 可见,骨碎补提取物和其成分柚皮苷均对酪氨酸酶活性具有激活作用,相比于阳性药甲氧沙林,浓度为 200、100 g/L 骨碎补的提取物和浓度为 400、200 μg/mL 的柚皮苷标准品差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结果表明,骨碎补提取物和柚皮苷标准品具有激活酪氨酸酶活性的作用且优于甲氧沙林。

表 2 骨碎补对蘑菇酪氨酸酶的激活作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度(g/L)	激活率(%)
甲氧沙林组	1.00	5.07± 0.17
骨碎补提取物	200.00	67.44±17.23**
	100.00	35.41± 6.42**
	50.00	16.03± 1.68
	25.00	9.58± 3.60
柚皮苷标准品	0.40	28.63± 0.83*
	0.20	20.83± 2.74*
	0.10	7.88± 1.80
	0.05	7.07± 1.08

注:与甲氧沙林组相比,* $P<0.05$;** $P<0.01$ 。

4 讨论

作为黑色素合成的关键酶,酪氨酸酶活性的异常可能导致皮肤色素生成的异常。白癜风是由多种原因引起的色素代谢障碍性疾病,主要原因是由于皮肤黑色素合成减少,其临床上以皮肤色素脱失斑为特征。由于酪氨酸酶是各种生物体内黑色素形成的关键酶,所以能够激活酪氨酸酶、增强其活性的药物,可促进黑色素的合成,有助于白癜风病损区色素的恢复^[7]。本实验选用的阳性药甲氧沙林的主要成分补骨脂素^[8],补骨脂素已被证实是酪氨酸酶的激活剂,长期用作治疗白癜风的药物治疗^[9]。本实验证明菟丝子、骨碎补提取物体外对蘑菇酪氨酸酶的激活作用明显强于补骨脂素,提示菟丝子、骨碎补提取物中含有比补骨脂素更强的、作用机制不同的某些化学成分,在此基础上发展的新制剂可望有助于白癜风的治疗。有关菟丝子、骨碎补等对黑色素生成影响以及治疗白癜风的作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Iwata M, Corn Tiwata S. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins[J]. J Invest Dermatol, 1990, 95(1): 9-15.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:化学工业出版社,2005:249-250.
- [3] 陈林林,吴春,蒋意桥.菟丝子总黄酮提取工艺的研究[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2004,20(6): 644-647.
- [4] 韦英杰,陈宁,王静,等.正交实验法优选骨碎补提取工艺的研究[J].时珍国医国药,2004,15(11):750-751.
- [5] Takayuli Hanamura, Eriko Uchina, Hitoshi Aoki. Skin - Lightening effect of a polyphenol extract from acerola (malpighia emarginata DC.) fruit on UV-Induced pigmen-

tion[J]. Biosci biochem, 2008, 72(12):3211-3218.

[6] 杨 柳,邓 艳.紫河车体外对黑素细胞增殖及酪氨酸酶活性的影响[J].第一军医大学学报, 2004, 24(9): 1040-1044.

[7] 沈 丽,张德芹,黄云英,等.骨碎补外用对实验性豚鼠白癜风的影响[J].天津中医药大学学报, 2012, 31(2): 92-94.

[8] Marwan M M, Jiang J W, Castrucci A M, et al. Psoralens stimulate mouse melanocyte and melanoma tyrosinase activity in the absence of ultraviolet light [J]. Pigment Cell Res, 1990, 3(4):214-221.

[9] 黄云英,张德芹.菟丝子外用治疗研究进展[J].天津中医药大学学报, 2012, 31(3): 190-192.

(收稿日期:2012-12-18)

External effect of extract of Cuscutae semen and Drynaria fortunei on activity of tyrosinase

DU Juan, XIA Jia-nan, SHEN Li, WANG Yuan-yuan, WANG Ya-ping, ZHANG De-qin
(Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the external effect of the extract of Cuscutae Semen and Drynaria fortunei on the activity of tyrosinase. [Methods] Experiments *in vitro* were performed to evaluate the effects of the extracts from the Cuscutae Semen and Drynaria fortunei on the activity of tyrosinase. [Results] The results showed that the extract of Cuscutae Semen and Drynaria fortunei could activate tyrosinase. [Conclusion] The effectiveness of the extract of Cuscutae Semen and Drynaria fortunei for the activity of tyrosinase provide basis of pharmacodynamics for treating vitiligo.

Key words: Cuscutae Semen extract; Drynaria fortunei; the activity of tyrosinase

.....

· 消 息 ·

《天津中医药》被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版 A-)”

2012 年 12 月 16 日,编辑部接到武汉大学中国科学评价研究中心通知,《天津中医药》杂志在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版 A-)”,在 2013—2014 年学术期刊分学科排行榜(中医学与中药学),《天津中医药》杂志排名进入中医学与中药学类期刊的前 30%,排名第 26 位,比上次排名前进了 5 个位次。中国学术期刊排行榜是对我国所有学术期刊质量、水平和学术影响力的全面、系统的评价,对选刊投稿、期刊订购、学术评价、科研管理、人事管理等工作来说,都有着非常重要的应用价值和实际指导作用。

据了解,武汉大学中国科学评价研究中心是中国高等院校中第一个综合性的科学评价研究中心,是集科学研究、人才培养和评价咨询服务于一体的多功能中介性实体机构。中心由武汉大学信息管理学院、教育科学学院、图书馆、计算机中心、图书情报研究所、数学与统计学院等单位有关学科的研究人员组建而成,是一个文理交叉的跨学科重点研究基地。

据悉,在第三届中国学术期刊评价中既按照各期刊的各指标综合得分排名,又将排序期刊分为 A+、A、A-、B+、B、C 6 个等级,以增加评价结果表示的合理性和充分性。本次共有 6 448 种中文学术期刊参与评价,经过综合评价后得到期刊相应的等级,在分学科评价中共计 1 939 种学术期刊进入核心期刊区,其中权威期刊(A+)327 种,核心期刊(A)964 种,扩展核心期刊(A-)648 种。另外,准核心期刊(B+)1 298 种,一般期刊(B)1 922 种,较差期刊(C)1 289 种。