



## 不同浓度的中药刺蒺藜对黑素细胞和酪氨酸酶的作用

黑素细胞(MC)生物学特性的改变可引起色素性皮肤病。一般认为在黑素的生物合成过程中,酪氨酸酶起着关键性的调节作用。酪氨酸酶不仅是黑素生成过程中的主要限速酶[1],还是黑素细胞分化成熟的特征性标志之一[2]。

目前,中医临床常用刺蒺藜治疗色素缺失性疾病白癜风和色素增多性疾病黄褐斑,但其具体机制尚未阐明。本研究观察了治疗色素性皮肤病的常用中药刺蒺藜对酪氨酸酶和体外培养黑素细胞的影响,旨在为刺蒺藜治疗色素性皮肤病的理论研究提供实验依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 仪器和试剂 745分光光度计(上海第三分析仪器厂);MEM培养液(Gibco)、Ham's F-10培养基(Gibco)、12-0-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate(TPA, Sigma)、3-Isobutyl-1-Methylxanthis (IBMX, Sigma)、霍乱毒素(Gibco)、青霉素、链霉素(北京邦定公司)、L-谷氨酰胺(上海生工公司)、胰蛋白酶、蘑菇酪氨酸酶(Sigma)、左旋多巴(L-Dopa, Sigma),其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 药物 中药刺蒺藜购自第一军医大学南方医院中药房,经第一军医大学中医系中药炮制教研室鉴定。

#### 1.2 方法

1.2.1 中药的提取 取中药刺蒺藜置于不锈钢罐内,加相当于药材量8倍的蒸馏水浸泡1 h,煮沸40 min后过滤。药渣加6倍量水后继续煎煮,煮沸30 min,过滤。合并2次滤液,浓缩成每ml相当于原生药100 mg的中药药液。

1.2.2 MC的制备[3][4] 包皮环切的MC标本置于含青霉素100 U/ml、链霉素100 ug/ml的MEM培养液中,尽量剪除皮下组织并将标本剪成狭条状(2 mm×5 mm)。在MEM中清洗3次,每次15 min,移入0.25%胰酶,4℃冷消化12~18 h,再于37℃热消化30 min。以眼科镊分离标本的表皮和真皮。表皮置于0.25%胰酶中37℃消化30 min,吸管反复吹打成单细胞,此时加入与胰酶等量的MC培养液(以含20% Ham's F-10的MEM混合培养液配制,内含10%胎牛血清、TPA 0.01 pmol/L、霍乱毒素 1 nmol/L、IBMX 25 pmol/L、青霉素 100 U/ml、链霉素100 ug/ml及L-谷氨酰胺6 mol/L)。终止胰酶作用,用2~3层消毒纱布过滤,滤液以1 500 r/min离心5 min,弃去上清液,细胞团加入适量MC培养液,吹打成单细胞悬液,调节细胞浓度为 $5 \times 10^5$ 个/ml。将上述制备的细胞悬液接种于12孔培养板,每孔接种2.5 ml细胞悬液,然后将培养板置于含5%CO<sub>2</sub>的37℃孵育箱中培养,48 h后换液,以后每周换液2~3次。当原代培养的MC在培养板底铺满时(通常是10 d后)即可进行传代。弃去培养液,加入0.25%胰酶,37℃消化5~10 min,然后加入与胰酶等量的MC培养液,吹打成单细胞悬液,1 500 r/min离心5 min,弃去上清液。细胞团用MC培养液制成 $5 \times 10^4$ 个细胞/ml的悬液,接种于新的培养板,置5% CO<sub>2</sub>的37℃孵育箱中培养。

1.2.3 细胞增殖的测定 采用甲基偶氮唑蓝比色法(MTT法)[5] 测定MC细胞增殖情况, 具体步骤如

下: 将配制的细胞悬液调整至细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 后加入96孔培养板, 每孔 $100 \mu\text{l}$ , 再分别加入不同浓度的刺蒺藜(终浓度为0.5、1.0、1.5、2.0 mg/ml), 每一浓度设3个复孔。以MC培养液作为对照组1。将培养板置于 $\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养56~72 h, 于结束前加入MTT液(5 mg/ml) $10 \mu\text{l}/\text{孔}$ , 继续培养4 h, 以 $0.04 \text{ mol/L}$ 盐酸异丙醇( $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ )溶液终止反应, 震荡10 min, 置酶标仪于波长570 nm处测 $D(\lambda)$ 值。

1.2.4 蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法[6] 反应混合物2 ml [ $0.01 \text{ mol/L}$  PBS 1.8 ml (pH6.8)+中药提取物0.1 ml+蘑菇酪氨酸酶0.1 ml (40 U)] $37^\circ\text{C}$ 孵育10 min, 加入0.15%左旋多巴反应液1 ml, 2 min后立即于波长475 nm处测定吸光度 $D_{475}$ 。以不加中药的反应混合物作为对照组2。中药取100、50、10、1 mg/ml 4种浓度进行反应。上述每一实验重复3次。

按以下公式计算酶激活率: 酪氨酸酶激活率(%) =  $[(C-D)-(A-B)]/[A-B] \times 100$ 。

其中, A: 未加中药样品的加酶混合液所测的吸收度; B: 未加中药样品也未加酶的混合液所测的吸收度; C: 加中药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。

### 1.3 统计分析

所测数据采用Dunnett分析, 使用SPSS10.0作数据处理及分析, 以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。

## 2 结果

### 2.1 刺蒺藜对MC增殖的影响

经MTT法测定, 发现刺蒺藜对MC呈高浓度激活、低浓度抑制, 与对照组相比有显著差异。在刺蒺藜浓度为 $0.5 \sim 2.0 \text{ mg/ml}$ 时, 其最佳激活浓度为 $1.5 \text{ mg/ml}$ , 最佳抑制浓度为 $0.5 \text{ mg/ml}$ (表1)。

表 1 在不同浓度刺蒺藜作用下 MC 的吸光度值 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 The absorbances of melanocyte treated with *Tribulus terrestris* L decoction at different concentrations (*Mean* $\pm$ *SD*)

Group		$D_{570}$
Control		$0.31 \pm 0.02$
Test (mg/ml)	0.5	$0.21 \pm 0.03^*$
	1.0	$0.36 \pm 0.06$
	1.5	$0.48 \pm 0.04^*$
	2.0	$0.46 \pm 0.02^*$

\* $P < 0.05$  vs control

### 2.3 刺蒺藜对酪氨酸酶活性的影响

结果显示刺蒺藜对酪氨酸酶活性呈高浓度激活, 低浓度抑制, 与对照组相比均有显著性差异。在刺蒺藜浓度为 $1 \sim 100 \text{ mg/ml}$ 时, 其最佳激活浓度为 $100 \text{ mg/ml}$ , 最佳抑制浓度为 $10 \text{ mg/ml}$ (表2)。

表 2 不同浓度刺蒺藜作用下酪氨酸酶的激活率 ( $\bar{x}\pm s$ )Tab.2 The activation rate of tyrosinase by *Tribulus terrestris*L decoction at different concentrations (*Mean* $\pm$ *SD*)

Group	Activation rate of tyrosinase (%)
Control	14.4 $\pm$ 3.4
<i>Tribulus terrestris</i> L (mg/ml)	
100	412.2 $\pm$ 55.3*
50	194.7 $\pm$ 13.1*
10	-333.6 $\pm$ 20.2*
1	-74.3 $\pm$ 4.8*

\* $P < 0.05$  vs control

### 3 讨论

皮肤黑素化过程包括MC增殖、酪氨酸酶合成和活化以及黑素体的转运和降解。酪氨酸酶是皮肤黑素生物合成的主要限速酶，抑制酪氨酸酶活性可减少黑素生成并抑制MC的增殖，激活酪氨酸酶可是MC增殖。

白癜风和黄褐斑都是色素障碍性疾病，祖国医学认为白癜风属“白驳风”范畴，是“风邪搏于皮肤，气血不和所生也”；黄褐斑属于“黎黑斑”范畴，七情内伤，肝郁气滞，肾精亏虚均可致病。中医认为治疗色素缺失性疾病白癜风和色素增多性疾病黄褐斑的有效原则都在于调和气血，而使患者肤色自荣。

中药刺蒺藜散风行血，常用来治疗色素缺失性疾病白癜风和色素增加性疾病黄褐斑。

文献报道刺蒺藜对酪氨酸酶活性的作用呈现出抑制和激活两种截然相反的结果[7][8]。本实验结果显示，刺蒺藜对体外黑素细胞和酪氨酸酶的活性均具有高浓度激活、低浓度抑制的双向调节作用，与文献报道一致。如何把握刺蒺藜的临界浓度从而指导临床用药，还需要我们进一步的药物研究结合临床观察。

参考文献：

- [1] Kubo I, Yokokawa Y, Kinst-Hori I. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants[J]. J Nat Prod, 1995, 58(5): 739-43.
- [2] Smith B, Selby P, Southgate J, et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction[J]. Lancet, 1991, 338(8777): 1227-9.
- [3] Eisinger M, Marko O. Selective proliferation of normal human melano- cytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 2018.
- [4] 赵 辨, 黄秋玲, 毕志刚, 等. 人正常黑素细胞体外纯培养及其细胞生物学鉴定[J]. 临床及实验研究, 1991, (5): 226-8.
- [5] Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55.
- [6] Matsuda H, Higashino M, Nakai Y, et al. Studies of cuticle drugs from natural sources. IV. Inhibitory effects of some Arctostaphylos plants on melanin biosynthesis[J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(1): 153-6.
- [7] 李洪武, 朱文远. 治疗白癜风复方中药体外对蘑菇酪氨酸酶活性的作用[J]. 临床皮肤科杂志,

2002, 29(3): 133-5.

[8] 尚靖, 敖秉臣, 刘文丽, 等. 七种增白中药在体外对酪氨酸酶的影响[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(11): 653-5.

Shang J, Ao BC, Liv WL, et al. The effects of seven white-making traditional chinese medicine on tyrosinase[J]. Chin Pharm J, 2000, 35(11): 653-5.

#### 参考文献:

[1] Kubo I, Yokokawa Y, Kinst-Hori I. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants[J]. J Nat Prod, 1995, 58(5): 739-43.

[2] Smith B, Selby P, Southgate J, et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction[J]. Lancet, 1991, 338(8777): 1227-9.

[3] Eisinger M, Marko O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 2018.

[4] 赵辨, 黄秋玲, 毕志刚, 等. 人正常黑素细胞体外纯培养及其细胞生物学鉴定[J]. 临床及实验研究, 1991, (5): 226-8.

[5] Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55.

[6] Matsuda H, Higashino M, Nakai Y, et al. Studies of cuticle drugs from natural sources. IV. Inhibitory effects of some Arctostaphylos plants on melanin biosynthesis[J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(1): 153-6.

[7] 李洪武, 朱文远. 治疗白癜风复方中药体外对蘑菇酪氨酸酶活性的作用[J]. 临床皮肤科杂志, 2002, 29(3): 133-5.

[8] 尚靖, 敖秉臣, 刘文丽, 等. 七种增白中药在体外对酪氨酸酶的影响[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(11): 653-5.

Shang J, Ao BC, Liv WL, et al. The effects of seven white-making traditional chinese medicine on tyrosinase[J]. Chin Pharm J, 2000, 35(11): 653-5.