

# 不同浓度的中药刺蒺藜对黑素细胞和酪氨酸酶的作用

邓燕 袁扬 柳袁胜利 渊第一军医大学<sup>1</sup> 中医系袁卫生统计学教研室袁广东 广州 510515 冤

摘要目的 观察中药刺蒺藜对酪氨酸酶和黑素细胞的影响遥方法 体外培养人正常黑素细胞袁以甲基偶氮唑蓝比色法渊MTT法冤测定不同浓度刺蒺藜作用下黑素细胞的增殖情况袁以蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法测定不同浓度刺蒺藜对酪氨酸酶活性的影响遥结果 渊1冤刺蒺藜对黑素细胞具有高浓度激活尧低浓度抑制作用袁在刺蒺藜浓度为 0.5~2.0mg/ml 时袁其最佳激活浓度为 1.5mg/ml 袁最佳抑制浓度为 0.5mg/ml 渊P<0.05冤遥渊2冤刺蒺藜对酪氨酸酶亦具有高浓度激活尧低浓度抑制作用袁在刺蒺藜浓度为 1~100mg/ml 时袁其最佳激活浓度为 100mg/ml 渊P<0.05冤 袁最佳抑制浓度为 10mg/ml 渊P<0.05冤遥结论 刺蒺藜对酪氨酸酶和黑素细胞均具有双向调节作用遥

关键词 黑素细胞 酪氨酸酶 剂量效应关系 药物 刺蒺藜 / 投药和剂量

中图分类号 渊R986 文献标识码 渊B 文章编号 渊院000-2588 渊2002 冤1-1017-03

## Effect of Tribulus terrestris L decoction of different concentrations on tyrosinase activity and the proliferation of melanocytes

DENGYan, YANG Liu, ANSheng-li

<sup>1</sup>Department of Traditional Chinese Medicine, <sup>2</sup>Department of Medical Statistics, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the effect of the decoction of Tribulus terrestris L on tyrosinase activity and melanogenesis. Methods MTT was employed to study the proliferation of human melanocytes cultured in vitro, and tyrosinase activity was estimated by measuring the rate of oxidation of DL-dopa, after the cells were treated with different concentrations of decoction of Tribulus terrestris L. Results The treatment with the decoction increased the amount of melanin at higher concentrations but acted to the reverse effect at lower concentrations, with the best concentrations for promoting and inhibiting the cell growth being 1.5mg/ml (P<0.05) and 0.5mg/ml (P<0.05) respectively. At a high concentration the decoction enhanced the tyrosinase activity that was inhibited at low concentrations. The best concentrations for enhancing and inhibiting tyrosinase activity were 100mg/ml (P<0.05) and 10mg/ml (P<0.05) respectively. Conclusion Tribulus terrestris L decoction exercises a two-way regulation on the activity of tyrosinase and the proliferation of melanocytes.

Key words: melanocytes; tyrosinase; dose-responder relationship; drug; Tribulus terrestris L/administration and dosage

黑素细胞渊MC冤生物学特性的改变可引起色素性皮肤病遥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遥酪氨酸酶不仅是黑素生成过程中的主要限速酶袁还是黑素细胞分化成熟的特征性标志之一遥

目前袁中医临床常用刺蒺藜治疗色素缺失性疾病白癫风和色素增多性疾病黄褐斑袁但其具体机制尚未阐明遥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袁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遥

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 仪器和试剂 745 分光光度计渊上海第三分析仪器厂冤 MEM 培养液 渊ibco冤 Ham's F-10 培养基

渊ibco冤 2-0-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate 渊PA冤 Sigma 冤 Isobutyl-1-Methylxanthis 渊BMX冤 Sigma 冤 霍乱毒素渊ibco冤 青霉素尧链霉素渊北京邦定公司冤 L- 谷氨酰胺渊上海生工公司冤 胰蛋白酶尧蘑菇酪氨酸酶渊igma冤 左旋多巴渊-Dopa冤 Sigma 冤 其他试剂均为国产分析纯遥

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袁经第一军医大学中医系中药炮制教研室鉴定遥

#### 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袁加相当于药材量 8 倍的蒸馏水浸泡 1 h 袁煮沸 40min 后过滤遥渣加 6 倍量水后继续煎煮袁煮沸 30min 袁过滤遥合并 2 次滤液袁浓缩成每 ml 相当于原生药 100 mg 的中药药液遥

1.2.2 MC 的制备 包皮环切的 MC 标本置于含青霉素 100U/ml 尧链霉素 100ug/ml 的 MEM 培养液中袁尽量剪除皮下组织并将标本剪成狭条状 渊mm伊mm冤 渊在 MEM 中清洗 3 次袁每次 15min 袁移入 0.25%

收稿日期 院002-08-29

作者简介 邓燕 渊975-冤女 湖南益阳人 第一军医大学在读硕士生 袁副教授 电话 院20-61648252

胰酶 益冷消化 12~18h 再于 37 益热消化 30min 遥以眼科镊分离标本的表皮和真皮遥表皮置于 0.25% 胰酶中 37 益消化 30min 袁接管反复吹打成单细胞袁此时加入与胰酶等量的 MC 培养液渊渊含 20% Ham'sF-10 的 MEM 混合培养液配制袁内含 10% 胎牛血清尧PA 0.01pmol/L 尧霍乱毒素 1nmol/L 尧BMX25pmol/L 尧精霉素 100U/ml 尧链霉素 100ug/ml 及 L- 谷氨酰胺 6mol/L 尧终止胰酶作用袁用 2~3 层消毒纱布过滤袁滤液以 1500r/min 离心 5 min 袁弃去上清液袁细胞团加入适量 MC 培养液袁吹打成单细胞悬液袁调节细胞浓度为 5伊0<sup>5</sup> 个/ml 遥将上述制备的细胞悬液接种于 12 孔培养板袁每孔接种 2.5ml 细胞悬液袁然后将培养板置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 益孵育箱中培养袁 8h 后换液袁以后每周换液 2~3 次遥当原代培养的 MC 在培养板底铺满时渊通常是 10d 后冤即可进行传代遥弃去培养液加入 0.25% 胰酶袁 7 益消化 5~10min 袁然后加入与胰酶等量的 MC 培养液袁吹打成单细胞悬液袁 500 r/min 离心 5min 袁弃去上清液遥细胞团用 MC 培养液制成 5伊0<sup>4</sup> 个细胞/ml 的悬液袁接种于新的培养板袁置 5% CO<sub>2</sub> 的 37 益孵育箱中培养遥

1.2.3 细胞增殖的测定 采用甲基偶氮唑蓝比色法渊MTT 法冤测定 MC 细胞增殖情况袁具体步骤如下院将配制的细胞悬液调整至细胞浓度为 5伊0<sup>4</sup>/ml 后加入 96 孔培养板袁每孔 100 滋袁再分别加入不同浓度的刺蒺藜渊渊终浓度为 0.5尧0尧5尧10尧50尧100mg/ml 冤袁每一浓度设 3 个复孔遥以 MC 培养液作为对照组 1 遥将培养板置于 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 56~72h 袁于结束前加入 MTT 液 渊渊mg/ml 冤 0 滋/ 孔袁继续培养 4 h 袁以 0.04 mol/L 盐酸异丙醇渊渊0 滋/ 孔冤溶液终止反应袁震荡 10min 袁置酶标仪于波长 570nm 处测 D(姿值)遥

1.2.4 蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法<sup>[9]</sup> 反应混合物 2ml[0.01mol/LPBS1.8ml(pH6.8)+ 中药提取物 0.1ml+ 蘑菇酪氨酸酶 0.1ml(40U)]37 益孵育 10min 袁加入 0.15% 左旋多巴反应液 1ml 袁min 后立即于波长 475nm 处测定吸光度 D<sub>475</sub> 遥以不加中药的反应混合物作为对照组 2 遥中药取 100尧50尧10尧5mg/ml 4 种浓度进行反应遥上述每一实验重复 3 次遥

按以下公式计算酶激活率 酪氨酸酶激活率渊冤 = [(渊-D 冤渊渊-B 冤)/ (A-B)]伊 100 遥

其中 袁院未加中药样品的加酶混合液所测的吸光度 院院未加中药样品也未加酶的混合液所测的吸光度 院院加中药样品和酶的混合液所测的吸光度 院院加中药样品而未加酶的混合液所测的吸光度 遥

1.3 统计分析

所测数据采用 Dunnett 分析袁使用 SPSS10.0 作数据处理及分析袁渊渊依 冤表示遥

2 结果

2.1 刺蒺藜对 MC 增殖的影响

经 MTT 法测定袁发现刺蒺藜对 MC 呈高浓度激活尧低浓度抑制袁与对照组相比有显著差异遥在刺蒺藜浓度为 0.5~2.0 mg/ml 时袁其最佳激活浓度为 1.5 mg/ml 袁最佳抑制浓度为 0.5mg/ml 渊渊表 1 冤遥

表 1 在不同浓度刺蒺藜作用下 MC 的吸光度值 渊渊依 冤  
Tab.1 The absorbances of melanocyte treated with Tribulus terrestris L decoction at different concentrations (Mean 依 D)

Group		D <sub>570</sub>
Control		0.31 依 0.02
Test (mg/ml)	0.5	0.21 依 0.03*
	1.0	0.36 依 0.06
	1.5	0.48 依 0.04*
	2.0	0.46 依 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袁低浓度抑制袁与对照组相比均有显著性差异遥在刺蒺藜浓度为 1~100mg/ml 时袁其最佳激活浓度为 100 mg/ml 袁最佳抑制浓度为 10mg/ml 渊渊表 2 冤遥

表 2 不同浓度刺蒺藜作用下酪氨酸酶的激活率 渊渊依 冤  
Tab.2 The activation rate of tyrosinase by Tribulus terrestris L decoction at different concentrations (Mean 依 D)

Group	Activation rate of tyrosinase (%)
Control	14.4 依 4.4
Tribulus terrestris L (mg/ml)	
100	412.2 依 5.3*
50	194.7 依 3.1*
10	-333.6 依 0.2*
1	-74.3 依 8.8*

\*P<0.05 vs control

3 讨论

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

白癜风和黄褐斑都是色素障碍性疾病袁祖国医学认为白癜风属野野驳风尧冷疔袁野野邪搏于皮肤袁气血不和所生也尧黄褐斑属于野野黑斑尧冷疔袁野野情内伤袁肝郁气滞尧精亏虚均可致病遥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袁而使患者肤色自荣遥

中药刺蒺藜散风行血袁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遥

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... 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... 还需要我们进一步的药物研究结合临床观察

参考文献

咱暂 Kubo I, Yokokawa Y, Kinst-Hori I. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants. 咱暂 Nat Prod, 1995, 58(5):739-43.
咱暂 Smith B, Selby P, Southgate J, et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. 咱暂 Lancet, 1991, 338(8777):1227-9.
咱暂 Eisinger M, Marko O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. 咱暂

Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79:2018.
咱暂 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. 咱暂 临床及实验研究, 1991, (5):226-8.
咱暂 Mosman T. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. 咱暂 J Immunol Methods, 1983, 65:55.
咱暂 Matsuda H, Higashino M, Nakai Y, et al. Studies of cuticle drugs from natural sources. 咱暂 Inhibitory effects of some Arctostaphylos plants on melanin biosynthesis. 咱暂 Biol Pharm Bull, 1996, 19(1):153-6.
咱暂 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. 咱暂 临床皮肤科杂志, 2002, 29(3):133-5.
咱暂 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. 咱暂 中国药理学杂志, 2000, 35(11):653-5.
Shang J, Ao BC, Liv WL, et al. The effects of seven white-making traditional Chinese medicine on tyrosinase. 咱暂 Chin Pharm J, 2000, 35(11):653-5.

在 SPSS10.0 软件上进行概率单位分析

安胜利 袁一心 袁春泉 第一军医大学卫生统计学教研室 广东 广州 510515 宛

摘要 利用实例和 SPSS10.0 软件上的 Probit 过程介绍如何进行概率单位分析并对主要输出结果进行了解释
关键词 概率单位回归分析 半数致死量 SPSS 统计软件
中图分类号 R821.3 文献标识码 B 文章编号 1000-2588(2002)10-1019-03

Probit analysis with SPSS 10.0 software

AN Sheng-li, MO Yi-xin, OU Chun-quan

Department of Medical Statistics, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: The Probit analysis is illustrated with an example using Probit procedure of SPSS 10.0 software, with interpretation of the major outputs.

Key words: Probit analysis; median lethal dose; SPSS software

医学科研中常用动物实验来研究毒物... 细菌及理化刺激对机体的作用以鉴定其毒性或效果... 在这类实验中常以导致 50% 的实验动物出现死亡... 产生某种症状引起某种效果... 毒物剂量... 半数致死量... 半数效量... 说明毒性的大小... 应用 SPSS 软件中的 Probit 模块... 概率单位回归... 可以很容易地求出半数致死量... 并对不同毒物的毒性大小进行比较... 下面结合实例介绍如何在 SPSS10.0 上进行概率单位分析

例院两种毒物对小鼠的致死结果如表 1 所示... 求半数致死量并比较两种毒物的效果

Tab.1 Lethal effects of the 2 kinds of toxic drugs in mice

Table with 4 columns: Poison, Dose(mg/ml), n, Number died. It lists data for two poisons (A and B) at various doses, showing the number of mice and the number that died.

1 数据格式

在 SPSS 软件中将上表数据输成图 1 的格式... 10 行 4 列表... 每一剂量所作用的实验动物数和死亡数占一行

收稿日期 2002-06-14

作者简介 安胜利 男 1969- 宛 袁可南 新乡人 袁硕士 袁讲师 电话 020-61648319