

· 基础研究 ·

云苓在色素沉着性皮肤病中的应用研究

石成方, 刘畅, 杨蓉娅*

(陆军总医院 全军皮肤损伤修复研究所, 北京 100125)

[摘要] **目的:** 探讨中药茯苓在皮肤科中的应用价值。**方法:** 通过黑色素生成反应过程中的酶活抑制实验, 以氢醌和维生素 C 为阳性对照, 研究茯苓三萜粗提物、萃取物、纯化组分对黑色素合成关键酶的影响。**结果:** 茯苓三萜粗提物对酪氨酸酶的最高抑制率仅为 90.3%, 氢醌和 Vc 阳性对照品在任何样品浓度范围内的抑制率均高于茯苓三萜粗提物; 茯苓三萜三氯甲烷萃取物对酪氨酸酶的抑制率高达 188.3%, 高于正丁醇萃取物(85.3%)及乙酸乙酯萃取物(83.7%), 氢醌和 Vc 对酪氨酸酶的抑制率分别在样品浓度 $\geq 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $\geq 3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时均低于茯苓三萜三氯甲烷萃取物; 茯苓三萜纯化组分③对酪氨酸酶的抑制率高达 223.5%, 高于纯化组分①(81.5%)及纯化组分②(201.8%), 氢醌和 Vc 对酪氨酸酶的抑制率在样品浓度 $> 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时低于茯苓三萜纯化组分③。**结论:** 茯苓三萜三氯甲烷萃取物及其纯化组分具有强劲的酪氨酸酶抑制作用, 能有效调控黑色素生成, 适宜开发治疗黄褐斑、雀斑等色素沉着性皮肤病的祛斑美白产品。

[关键词] 茯苓; 黑色素; 酪氨酸酶; 祛斑; 美白

Study on Application of *Poria cocos* for Treatment of Patients with Dark Skin Pigmentation

SHI Chengfang, LIU Chang, YANG Rongya*

(Institute of Skin Injury and Repair, People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100125, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical value of *Poria cocos* in dermatology. **Methods:** The tyrosinase activity inhibition rate of *P. cocos* triterpene crude extract, extract and purified fraction were measured by tyrosinase activity inhibition experiments in the process of melanin formation reaction, and the hydroquinone and Vc were selected as the positive controls. **Results:** The highest tyrosinase activity inhibition rate was 90.3% in *P. cocos* triterpene crude extract group, its tyrosinase activity inhibition rate was significantly lower than that of hydroquinone and Vc positive control group. The highest tyrosinase activity inhibition rate was 188.3% in chloroform extracts group, it was significantly higher than that of the n-butanol extracts group (85.3%) and the ethyl acetate extracts group (83.7%), the tyrosinase activity inhibition rate in the hydroquinone and Vc positive control group were significantly lower than that the chloroform extracts group until the sample concentration was increased to $\geq 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $\geq 3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ individually, the highest tyrosinase activity inhibition rate was 223.5% in the group of purified fraction ③, it was significantly higher than that of the purified fraction ① group (81.5%) and the purified fraction group ② (201.8%), the tyrosinase activity inhibition rates in the hydroquinone and Vc positive control group were significantly lower than that of the purified fraction ③ group until the sample concentration was increased to $> 2 \text{ mg/mL}$. **Conclusion:** The chloroform extracts and its purified fraction of *Poria cocos* triterpene have a better inhibiting tyrosinase activity, it can effectively regulate melanin formation reaction, and is suitable to develop the products for skin-whitening and treating freckles, moles, as well as other skin diseases.

[Keywords] *Poria cocos*; melanin; tyrosinase; dispel freckle; whitening

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.1.012

随着人们生活品质的提高, 现代女性越来越追求水嫩透白的如雪肌肤。然而, 人表皮基底层分布的黑色素过量表达时^[1], 可使肤色变黝黑, 或可能导致黄

褐斑、雀斑等人体色素沉着性皮肤病。目前, 市场上流行千白氢醌乳膏、维生素 C(Vc)美白霜和熊果苷祛斑霜等利用抑制酪氨酸酶活性原理研制的化妆品, 其

* [通信作者] 杨蓉娅, 主任医师, 教授, 研究方向: 皮肤病理学; Tel: (010)65383718

主要通过产品内含的中草药提取物干扰黑色素合成^[2]、缓解色素沉着而发挥美白作用。茯苓是一味记载于《神农本草经》的上品中药^[3]，有利水消肿、宁心养神、健脾养胃等功效，强调内服用药有诸多益处。然而，目前关于茯苓外用的研究较少，尤其是对茯苓皮提取物的临床应用方面鲜有报道。本研究通过黑色素生成反应过程中的酶活抑制实验，探讨茯苓皮相关成分在皮肤科应用中的潜在价值，为进一步研究和开发治疗色素沉着性皮肤病的药妆品提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

实验用中药为产于云南榕丰县的茯苓干燥外皮，购于河北安国药材交易市场，并且经本院中医科李伯教授鉴定为茯苓的干燥外皮。

蘑菇酪氨酸酶(批号: T3824-25KU)、L-多巴胺(批号: 333786-250MG)均购于美国 Sigma 化学公司; 氢醌、Vc(山东省德州市富凯化工有限责任公司); 其他试剂均为市售国产分析纯, 甲醇、正丁醇和乙酸乙酯(北京瑞福伟达化工有限公司), 三氯甲烷、二甲亚砷、磷酸二氢钾和氢氧化钠(天津化学试剂三厂)。

1.2 主要试剂及仪器

FA2004B 分析天平(上海平轩科学仪器有限公司); DS-1 电动高速组织捣碎机(上海精科实业有限公司); HH-6 恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); SP-756P 紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

2 方法

2.1 药材的提取、分离和纯化

茯苓三萜粗提物: 干燥的茯苓皮药材用组织捣碎机粉碎, 研磨成粉末, 过 60 目筛, 精确称取茯苓皮粉末 10 g。在 70 ℃ 的条件下采用 200 mL 甲醇水浴回流提取 6 h, 重复提取 2 次, 合并滤液, 再经过旋转蒸发减压浓缩, 低温烘干, 收集茯苓三萜粗提物, 备用。

茯苓三萜萃取物: 将茯苓三萜粗提物混散于水中, 然后用正丁醇、乙酸乙酯和三氯甲烷萃取, 旋干萃取液, 收集茯苓三萜萃取物备用。

茯苓三萜纯化组分: 3 种茯苓三萜萃取物经硅胶柱色谱分离和液相检测, 得到洗脱液 3 份, 并将其旋转浓缩蒸干, 最终收集 3 种纯化组分①、②、

③备用。

2.2 样品液的制备

茯苓三萜粗提物用二甲亚砷溶解, 配制质量浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8 mg·mL⁻¹ 的样品液, 备用; 茯苓三萜正丁醇萃取物、乙酸乙酯萃取物及三氯甲烷萃取物依次用二甲亚砷溶解, 配制质量浓度为 1、2、3、4 mg·mL⁻¹ 的样品液, 备用; 茯苓三萜纯化组分①、②、③分别用二甲亚砷溶解, 依次配制质量浓度为 1、2、3、4 mg·mL⁻¹ 的样品液, 备用。

酪氨酸酶溶液的配制: 先分别取浓度为 0.2 mol·L⁻¹ 的磷酸二氢钾及氢氧化钠溶液 250、118 mL, 加水稀释, 配制成 pH 6.8 的磷酸缓冲液, 再用磷酸缓冲液配制酪氨酸酶溶液(10 kU·L⁻¹)。阳性对照品的氢醌用二甲亚砷配制, Vc 则用纯净水配制。

2.3 实验设计方法

选用 L-多巴胺作底物, 酪氨酸酶作催化剂进行黑色素生成反应, 反应中加入不同浓度的样品溶液, 采用紫外分光光度计(475 nm)测定吸光度(A), 按公式(1)计算抑制率, 评估其对酪氨酸酶的抑制作用, 若未添加用(-)表示, 添加用(+)表示。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{[(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)]}{(A_1 - A_2)} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A₁ 为中药样品(-)、酪氨酸酶溶液(+)
的吸光度;

A₂ 为中药样品(-)、酪氨酸酶溶液(-)的吸光度;

A₃ 为中药样品(+)、酪氨酸酶溶液(+)
的吸光度;

A₄ 为中药样品(+)、酪氨酸酶溶液(-)的吸光度。

3 结果

3.1 茯苓三萜的粗提物对酪氨酸酶的抑制作用

随着样品浓度的增大, 茯苓三萜粗提物对酪氨酸酶的抑制作用逐渐增强, 其抑制率不断攀升; 当样品浓度增加至 6 mg·mL⁻¹ 时出现拐点, 其抑制率随样品浓度的增大而急骤下降。茯苓三萜粗提物对酪氨酸酶的抑制率最高达 90.3%, 低于氢醌(131.5%)和 Vc(124.8%), 两种阳性对照品在任何样品质量浓度范围内的抑制率均高于茯苓三萜粗提物, 见图 1。

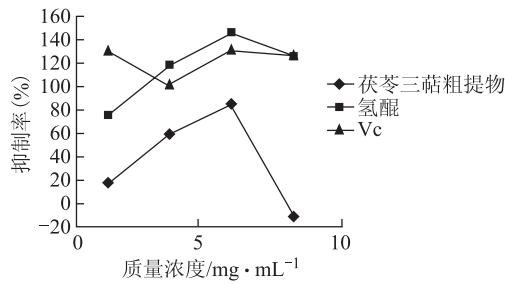


图1 茯苓三萜粗提物、氢醌与Vc对酪氨酸酶的抑制作用比较

3.2 茯苓三萜的萃取物对酪氨酸酶的抑制作用

当样品浓度范围在1~2 mg·mL⁻¹时, 氢醌、正丁醇及乙酸乙酯萃取物对酪氨酸酶的抑制率不断降低, Vc、三氯甲烷萃取物对酪氨酸酶的抑制率逐渐升高; 当样品浓度范围在2~3 mg·mL⁻¹时, 氢醌及3种萃取物对酪氨酸酶的抑制率均升高, 仅Vc对酪氨酸酶的抑制率下降; 当样品浓度范围3~4 mg·mL⁻¹时, 氢醌对酪氨酸酶的抑制率继续升高, Vc对酪氨酸酶的抑制率则继续下降, 3种萃取物对酪氨酸酶的抑制率反转下降。三氯甲烷萃取物对酪氨酸酶的抑制率最高可达188.3%, 而且能在较高的样品浓度范围内仍维持较高水平(>100%), 其抑制率均高于氢醌、Vc、正丁醇及乙酸乙酯萃取物。见图2和图3。

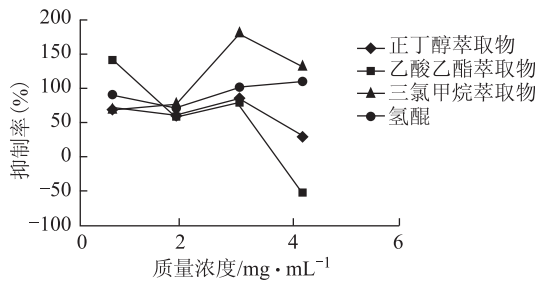


图2 茯苓三萜萃取物与氢醌对酪氨酸酶的抑制作用比较

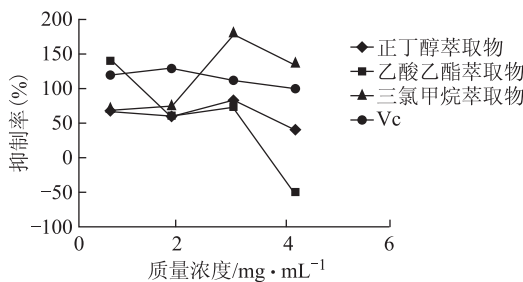


图3 茯苓三萜萃取物与Vc对酪氨酸酶的抑制作用比较

3.3 茯苓三萜的纯化组分对酪氨酸酶的抑制作用

随着样品浓度的增大, 茯苓三萜的纯化组分①、②对酪氨酸酶的抑制率逐渐降低, 尤其是纯化组分②对酪氨酸酶的抑制率在样品质量浓度为2~3 mg·mL⁻¹时迅速下降; 氢醌、Vc以及纯化组分③在任何样品浓度范围内均维持较高水平(>100%), 氢醌、Vc对酪氨酸酶的抑制作用较平稳, 纯化组分③对酪氨酸酶的抑制率在样品浓度为2~3 mg·mL⁻¹时逐渐升高, 最高达223.5%, 其抑制率均高于氢醌、Vc、纯化组分①和②。见图4和图5。

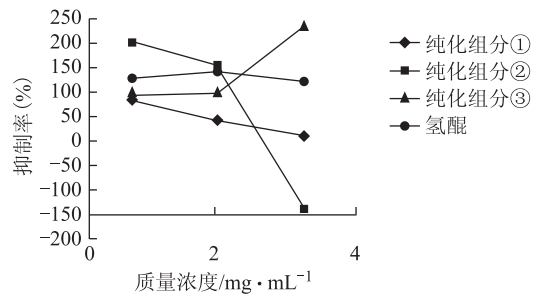


图4 茯苓三萜纯化组分与氢醌对酪氨酸酶的抑制作用比较

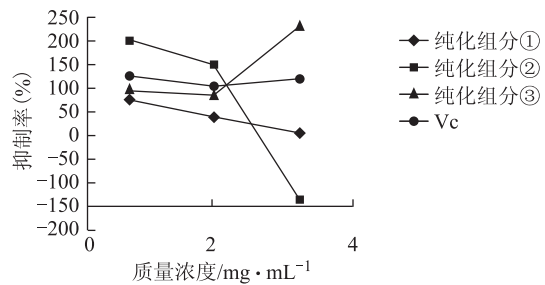


图5 茯苓三萜纯化组分与Vc对酪氨酸酶的抑制作用比较

4 讨论

黑色素细胞是分布于人体表皮基层的特殊细胞, 其产生的黑色素通过减轻日光辐射发挥对细胞染色体的保护作用。如果黑色素生成不足, 可能会引起白癜风、白化病等色素障碍性皮肤病; 如果黑色素过量沉积, 易导致黄褐斑、雀斑和老人斑等色素沉着性皮肤病^[4]。由于黑色素细胞以酪氨酸为原料, 通过酪氨酸酶的催化作用, 逐步氧化成黑色素。因此, 黑色素生成多少很大程度上取决于合成关键酶——酪氨酸酶的活性。目前, 市面上人工合成的氢醌和汞盐等皮肤美白剂都是通过干扰黑色素生成, 以达到快速亮肤美白的效果。但是, 长期使用会对皮肤产生较大的毒副作用, 可能会造成永久性脱色^[5]。随着中医药学的研究进展, 人们回归自然、

崇尚中草药的思想不断深化,从植物中提取活性成分研制的化妆品应用于皮肤保养越来越受到大家的欢迎和喜爱,例如从人参、熊果或厚叶岩白菜等提取的熊果苷对酪氨酸酶有抑制作用^[6],通过阻断黑色素合成通路减少黑素形成,还可通过新陈代谢作用协同Vc等物质参与色素代谢,淡化黑色素沉着,于是催生了熊果苷祛斑霜、Vc美白霜等产品。在当今美容科学领域和药品、化妆品行业中,利用天然药物的开发技术探索中草药的美白护肤价值已成为一个新研究热点。

《本草纲目》记载:“面黻雀斑。白茯苓末,蜜和,夜夜傅之,二七日愈”,诠释白茯苓外敷能够改善面部雀斑^[7]。本研究以氢醌和Vc为阳性对照,通过黑色素生成反应中的酶活抑制实验,分析茯苓的亮肤美白机制,为中西医结合治疗色素沉着性皮肤病提供理论依据。实验研究结果显示:茯苓三萜粗提物对酪氨酸酶的抑制作用在样品质量浓度为 $6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时最强,其抑制率呈一个倒V字型,太低浓度或过高浓度的酶活抑制作用均不明显,且均低于氢醌和Vc阳性对照品的酶活抑制率。茯苓三萜乙酸乙酯萃取物对酪氨酸酶的抑制作用在样品质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时最强,其抑制率高于正丁醇、三氯甲烷萃取物和氢醌、Vc阳性对照,但其抑制率随样品质量浓度的增加而不断下降;茯苓三萜三氯甲烷萃取物对酪氨酸酶的抑制作用在样品质量浓度为 $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时最强,其抑制率高于正丁醇、乙酸乙酯萃取物和氢醌、Vc阳性对照,且其抑制率在高样品浓度范围内维持较高水平;此外,茯苓三萜乙酸乙酯萃取物和三氯甲烷萃取物的纯化组分对酪氨酸酶的抑制作用也如以上规律变化,各种萃取物对应的纯化组分对酪氨酸酶的抑制率均高于萃取物本身,尤其是三氯甲烷萃取物的纯化组分表现出最强

的酶活抑制作用。

综上所述,中药茯苓内含丰富的药用化学成分^[8],除了有已报道的利尿渗湿、健胃养脾、抑菌、抗肿瘤、调节免疫力等活性外,还具有良好的美白护肤作用^[9],其三萜有效成分可通过抑制黑色素形成关键酶的活性,减少黑色素合成,从而达到美白效果。本研究实验数据表明,中药茯苓三萜的低浓度乙酸乙酯萃取物及其纯化组分和高浓度三氯甲烷萃取物及其纯化组分对黑色素生成反应过程中的酶活抑制作用突出,适宜深入研究和开发治疗色素沉着性皮肤病的化妆品,以此拓宽中药茯苓的美容应用途径,创造更高的药用附加值。

参考文献

- [1] 赵光. 黑色素细胞的研究近况[J]. 西南军医, 2013, 15(2):177-181.
- [2] 王玉林,何锦凤,王维民. 皮肤黑色素的产生及美白浅析[J]. 日用化学品科学, 2013, 36(2):33-49.
- [3] 沈玉萍,李军,贾晓斌. 中药茯苓化学成分的研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(3):297-300.
- [4] 李承新,王玲. 皮肤色素沉着发生机制研究进展[J]. 中国美容医学, 2009, 18(9):1372-1375.
- [5] 周意,陈祖辉,梁丰,等. 化妆品在我国的发展历史、研究现状和应用前景[J]. 中国药房, 2013, 24(27):2578-2580.
- [6] 李溯,丁劲松. 黑色素生物合成与酪氨酸酶抑制剂的进展[J]. 中南药学, 2013, 11(4):278-281.
- [7] 鹿繁修. 外用美白中药的应用研究近况[J]. 中国城乡企业卫生, 2014, 2(1):165-167.
- [8] 游昕,熊大国,郭志斌,等. 茯苓多种化学成分及药理作用的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(2):106-109.
- [9] 常富业. 茯苓抗衰、养生与美容作用浅析[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(5):1107-1110.

(收稿日期 2015-12-21)

(上接第50页)

- [24] Alatangimuge Y, Yang X W, Zheng Y, et al. LC analysis and pharmacokinetic study of pachymic acid after intravenous administration to rats [J]. Chromatographia, 2008, 67(9-10):807-811.
- [25] 阿拉腾其木格,杨秀伟. 去氢土莫酸在大鼠体外肝微粒体中的生物转化研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(15):

1303-1307, 1325.

- [26] 杨秀伟. 基于体内过程的中药有效成分和有效效应物质的发现策略[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5):365-370.
- [27] 王克勤,方红,苏玮,等. 茯苓药材规范化种植研究要点[J]. 中药研究与信息, 2001, 3(8):13-14.
- [28] 王克勤,尹旭仁,黄鹤,等. 湖北茯苓生产现状及产业化发展对策[J]. 中国现代中药, 2012, 14(12):24-27.

(收稿日期 2016-10-30)