

# 祛白片正丁醇部位对脱黑色素细胞模型的药效学研究<sup>△</sup>

段松冷<sup>1,2\*</sup>, 顾红燕<sup>1,2</sup>, 年宏蕾<sup>1,2</sup>, 邢 若<sup>1,2</sup>, 曾蔚欣<sup>1,2#</sup> (1.首都医科大学附属北京世纪坛医院药剂科, 北京 100038; 2.临床合理用药评价北京市重点实验室, 北京 100038)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)09-1049-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.09.05



**摘要** **目的** 研究祛白片正丁醇部位的化学成分, 以及其对脱黑色素细胞模型的药效作用。**方法** 制备祛白片正丁醇部位。采用超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)技术分析其化学成分。以小鼠B16黑色素瘤细胞为研究对象, 建立脱黑色素细胞模型后分为模型组、阳性对照不同浓度组(8-甲氧补骨脂素10、50、100、150、200  $\mu\text{mol/L}$ )、溶媒组(以DMSO稀释而得)和祛白片正丁醇部位不同浓度组(10、50、100、150、200  $\mu\text{g/mL}$ ), 采用倒置显微镜观察细胞数量变化, 并检测细胞增殖率、促黑色素生成率、酪氨酸酶活性促进率。**结果** 在正、负离子模式下初步确定了祛白片正丁醇部位的53个化合物(正离子模式下29个, 负离子模式下33个, 重合9个), 其中香豆素类化合物所占比例最大, 其次是黄酮类化合物。祛白片正丁醇部位可使细胞数明显增加, 且与作用时间和给药浓度呈正相关; 其可显著升高细胞的增殖率、促黑色素生成率、酪氨酸酶活性促进率( $P<0.01$ )。**结论** 香豆素类和黄酮类化合物可能是祛白片正丁醇部位发挥抗白癜风作用的物质基础; 祛白片正丁醇部位的抗白癜风作用可能是通过促进酪氨酸酶活性实现的。

**关键词** 祛白片; 正丁醇部位; 白癜风; 超高效液相色谱-质谱联用; 黑色素; 酪氨酸酶

## *n*-butanol part from Qubai tablet and study on its pharmacodynamics to de melanocyte model

DUAN Songleng<sup>1,2</sup>, GU Hongyan<sup>1,2</sup>, NIAN Honglei<sup>1,2</sup>, XING Ru<sup>1,2</sup>, ZENG Weixin<sup>1,2</sup> (1. Dept. of Pharmacy, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. Beijing Key Laboratory of Evaluation of Rational Drug Use, Beijing 100038, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the chemical constituents of *n*-butanol part of Qubai tablet and its pharmacodynamic effect on the model of de melanocyte. **METHODS** The *n*-butanol part of Qubai tablet was prepared. The chemical constituents were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). Taking mice B16 melanoma cells as the research object, the de melanocyte model was established and divided into model group, positive control different concentration groups (8-methoxypsoralen 10, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{mol/L}$ ), solvent group (diluted with DMSO) and Qubai tablet *n*-butanol part different concentration groups (10, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{mol/L}$ ). The number of cells were observed by inverted microscope, and the cell proliferation rate, the rate of melanin production and promotion rate of tyrosinase activity were also detected. **RESULTS** In the positive and negative ion mode, 53 compounds in the *n*-butanol part of Qubai tablet were preliminarily determined (29 in the positive ion mode, 33 in the negative ion mode, overlapping 9), of which coumarins accounted for the largest proportion, followed by flavonoids. The *n*-butanol part of Qubai tablet could significantly increase the number of cells, which was positively correlated with the action time and administration concentration. It could significantly increase the proliferation rate of cells, the rate of melanin production and promotion rate of tyrosinase activity ( $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS** Coumarins and flavonoids may be the material basis for the anti-vitiligo effect of *n*-butanol part from Qubai tablet; anti-vitiligo effect of *n*-butanol part of Qubai tablet may be realized by promoting tyrosinase activity.

**KEYWORDS** Qubai tablet; *n*-butanol part; vitiligo; UPLC-MS; melanin; tyrosinase

<sup>△</sup> 基金项目: 国家科技重大专项-“重大新药创制”项目 (No.2017ZX09301-040); 北京市属医院科研培育计划项目 (No. PZ2017020)

\* 主管药师, 硕士。研究方向: 医院制剂化学成分及生物活性。电话: 010-63926342。E-mail: duansongleng@126.com

# 通信作者: 副主任药师。研究方向: 中药学、中药制剂。电话: 010-63926360。E-mail: cindy\_zwx@sina.com

医院制剂祛白片(京药制字Z20063383)因疗效好、患者需求大, 一直是首都医科大学附属北京世纪坛医院药学研发团队研究的重点<sup>[1-2]</sup>。为使更多的白癜风患者受益, 医院拟将祛白片进行成果转化。本课题组前期研究了祛白片全方、挥发油和乙酸乙酯部位的初步药效学, 证实了这些部位均具有较好的抗白癜风作用, 且重

点分析了挥发油和乙酸乙酯部位的化学成分<sup>[3-5]</sup>。为更全面地解决患者提出的该药服药剂量大的问题(说明书中规定:每次5片,每日3次),本课题组又富集了祛白片正丁醇部位,在前期研究的基础上,采用超高效液相色谱-质谱联用(ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometer, UPLC-MS)技术初步确定其化学成分,并从细胞数量、促细胞活力、促黑色素生成3个方面研究祛白片正丁醇部位对脱黑色素细胞模型的药理学,以期为该制剂的进一步药理机制研究和制备工艺优化提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Q Exactive™型四极杆轨道离子阱质谱、Dionex™ UltiMate™ 3000型UPLC仪、Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),COIC XDS-1B型显微镜(重庆重光实业有限公司),RT-TDL-40B型离心机(无锡市瑞江分析仪器有限公司),YT-CJ-1ND型无菌操作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司),MCO-15AC型CO<sub>2</sub>培养箱(日本Panasonic公司)。

1.2 主要药品与试剂

炒蒺藜、补骨脂、黑芝麻等15味中药饮片均购自北京金崇光药业有限公司,经我院药检室检验符合2020年版《中国药典》(一部)要求<sup>[6]</sup>;8-甲氧补骨脂素(8-methoxypsoralen, 8-MOP, 批号M3501-1G)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号D2650)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 批号H1009-100)和左旋多巴(L-DOPA, 货号72816)均购自美国Sigma公司,DMEM培养基(批号C11965500BT)购自美国Invitrogen公司;其余试剂为实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 细胞

小鼠B16黑色素瘤细胞(编号3111C0001CCC000324)购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

2 方法与结果

2.1 祛白片正丁醇部位成分的UPLC-MS分析

2.1.1 样品的制备 取炒蒺藜、补骨脂、黑芝麻等15味中药饮片,加水煎煮3次,每次1 h,滤过;合并煎液,浓缩,即得祛白片干浸膏。参考文献[7]方法,取祛白片干浸膏适量,充分溶解于热水,用等体积正丁醇分3次萃取,合并萃取液,浓缩,即得祛白片正丁醇部位干浸膏。取适量祛白片正丁醇部位干浸膏用甲醇充分溶解,待测。

2.1.2 UPLC-MS条件 (1)色谱条件:色谱柱为Waters UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为A相

(水,含有0.05%乙酸和1 mmol/L乙酸铵)-B相[异丙醇-乙腈混合液(1:1, V/V)],梯度洗脱(0~3 min, 10% B→35% B; 3~6 min, 35% B→85% B; 6~8 min, 85% B→100% B; 8~11 min, 100% B; 11~11.1 min, 100% B→10% B; 11.1~13 min, 10% B);流速为0.3 mL/min,柱温为50 ℃。(2)质谱条件:正、负离子源电压分别为3.7、3.5 kV;碰撞气为氮气,压力为1.5 mTorr;鞘气和辅助气均为氮气,鞘气压力为30 psi,辅助气压力为10 psi;毛细管加热温度为320 ℃;容积加热蒸发温度为300 ℃。一级全扫描参数:分辨率为7×10<sup>5</sup>,自动增益控制目标为3×10<sup>6</sup>,最大隔离时间为100 ms,质荷比(*m/z*)扫描范围为50~1 500。本研究进行正、负离子模式下的全扫描检测。

2.1.3 UPLC-MS分析及结果 取“2.1.1”项下祛白片正丁醇部位待测样品,按“2.1.2”项下色谱与质谱条件进样分析,得正、负离子模式下祛白片正丁醇部位的总离子流图,结果见图1。将采集好的数据用Progenesis QI软件处理,依次进行原始数据导入、峰对齐、峰提取、归一化处理,最后通过*m/z*、保留时间、峰强度等信息,在正、负离子模式下初步确定了祛白片正丁醇部位的53个化合物(正离子模式下29个,负离子模式下33个,重合9个),结果见表1、表2。

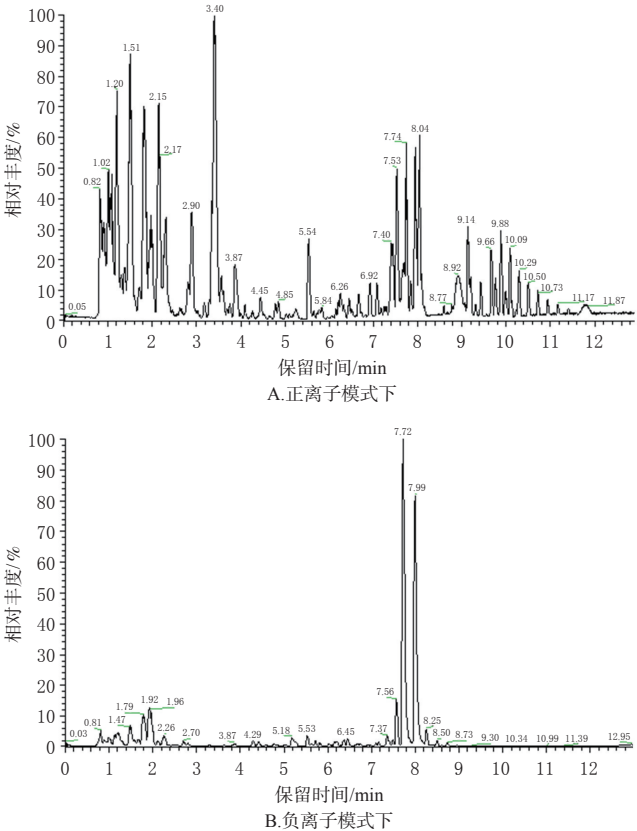


图1 正、负离子模式下祛白片正丁醇部位的总离子流图

表1 祛白片正丁醇部位的化学成分分析结果(正离子模式)

| 序号 | 保留时间/min | 准分子离子峰 <i>m/z</i>       | 分子量 | 化合物名称                          | 相对百分含量/% | 来源中药   |
|----|----------|-------------------------|-----|--------------------------------|----------|--------|
| 1  | 2.88     | 287.1[M+H] <sup>+</sup> | 286 | 异氧化前胡素                         | 4.81     | 白芷     |
| 2  | 2.89     | 305.1[M+H] <sup>+</sup> | 304 | 决明子内酯                          | 0.95     | 决明子    |
| 3  | 2.90     | 261.1[M+H] <sup>+</sup> | 260 | 7- <i>O</i> -(3,3-二甲基烯丙基)-东莨菪素 | 34.37    | 北沙参    |
| 4  | 2.97     | 255.1[M+H] <sup>+</sup> | 254 | 大黄酮                            | 1.16     | 制何首乌   |
| 5  | 3.10     | 355.1[M+H] <sup>+</sup> | 354 | D-芝麻素                          | 0.13     | 黑芝麻    |
| 6  | 3.20     | 377.2[M+H] <sup>+</sup> | 376 | 当归醇 A                          | 0.18     | 独活     |
| 7  | 3.34     | 317.1[M+H] <sup>+</sup> | 316 | 比克白芷素                          | 18.12    | 白芷     |
| 8  | 3.39     | 299.1[M+H] <sup>+</sup> | 298 | 异新补骨脂查尔酮                       | 3.93     | 补骨脂    |
| 9  | 3.62     | 217.0[M+H] <sup>+</sup> | 216 | 佛手苷内酯                          | 0.58     | 独活、白芷  |
| 10 | 3.88     | 168.1[M+H] <sup>+</sup> | 167 | 辛弗林                            | 2.43     | 香橼     |
| 11 | 4.09     | 301.1[M+H] <sup>+</sup> | 300 | 珊瑚菜素                           | 0.74     | 白芷     |
| 12 | 4.19     | 321.1[M+H] <sup>+</sup> | 320 | 补骨脂异黄酮                         | 0.56     | 补骨脂    |
| 13 | 4.25     | 339.1[M+H] <sup>+</sup> | 338 | 补骨脂异黄酮醇                        | 2.46     | 补骨脂    |
| 14 | 4.29     | 331.1[M+H] <sup>+</sup> | 330 | 苜蓿素                            | 0.27     | 制何首乌   |
| 15 | 4.45     | 297.1[M+H] <sup>+</sup> | 296 | 丹参酮Ⅱ <sub>B</sub>              | 0.25     | 丹参     |
| 16 | 4.84     | 289.1[M+H] <sup>+</sup> | 288 | 二氢欧山芹醇乙酸酯                      | 0.57     | 独活     |
| 17 | 4.85     | 229.1[M+H] <sup>+</sup> | 228 | 川白芷素                           | 1.39     | 白芷     |
| 18 | 4.88     | 359.1[M+H] <sup>+</sup> | 358 | 黄决明素                           | 8.73     | 决明子    |
| 19 | 4.91     | 323.1[M+H] <sup>+</sup> | 322 | 补骨脂色烯查尔酮                       | 0.75     | 补骨脂    |
| 20 | 5.27     | 325.1[M+H] <sup>+</sup> | 324 | 补骨脂甲素                          | 2.50     | 补骨脂    |
| 21 | 5.38     | 337.1[M+H] <sup>+</sup> | 336 | 丹参新醌丁                          | 0.30     | 丹参     |
| 22 | 5.42     | 271.1[M+H] <sup>+</sup> | 270 | 异欧前胡内酯                         | 0.72     | 丹参     |
| 23 | 5.60     | 279.1[M+H] <sup>+</sup> | 278 | 次甲丹参醌                          | 0.54     | 丹参     |
| 24 | 5.84     | 245.1[M+H] <sup>+</sup> | 244 | 蛇床子素                           | 3.48     | 独活     |
| 25 | 5.99     | 277.1[M+H] <sup>+</sup> | 276 | 丹参酮Ⅰ                           | 0.27     | 丹参     |
| 26 | 6.04     | 329.1[M+H] <sup>+</sup> | 328 | Columbianadin                  | 0.37     | 香橼     |
| 27 | 6.22     | 339.2[M+H] <sup>+</sup> | 338 | 8-犊牛儿醇基补骨脂素                    | 7.78     | 北沙参    |
| 28 | 6.58     | 301.2[M+H] <sup>+</sup> | 300 | 柳杉醇                            | 0.39     | 丹参、北沙参 |
| 29 | 6.59     | 295.1[M+H] <sup>+</sup> | 294 | 异丹参酮Ⅱ <sub>A</sub>             | 1.27     | 丹参     |

2.2 脱黑色素细胞模型的药效学研究

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取 0.1 g 祛白片正丁醇部位干浸膏,加不含血清的 DMEM 培养基定容至 10 mL,再以 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得祛白片正丁醇部位母液,临用时稀释成所需浓度作为供试品溶液。

2.2.2 脱黑色素细胞模型的建立 参考文献[8]方法,将小鼠 B16 黑色素瘤细胞于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后,将培养基更换为含 0.1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 DMEM 培养基,继续培养 4 h 后,吸弃培养基,即得脱黑色素细胞模型。

2.2.3 细胞数量观察 取对数生长期小鼠 B16 黑色素瘤细胞,经胰酶消化后,制成单细胞悬液(1×10<sup>4</sup> 个/mL),接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL,按“2.2.2”项下方法建立脱黑色素细胞模型,然后分为模型组、阳性对照不同浓度组(8-MOP, 10、50、100、150、200 μmol/L,以 DMSO 溶解,浓度根据文献[5]设置,下同)、溶媒组(由于 8-MOP 以 DMSO 溶解,故本实验另设 DMSO 溶媒组,即以 DMSO 稀释 1×10<sup>4</sup> 倍)和祛白片正丁醇部位不同浓度组(10、50、100、150、200 μg/mL,质量浓度根据参考文献[5]设置)。模型组细胞加入 DMEM 培养基,其余各组加入相应药物或溶剂,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24、48 h 后,采用倒置显微镜观察各组细胞数量变化。

结果见图 2。

由图 2 可知,与模型组比较,祛白片正丁醇部位各浓度组细胞数均明显增加,且与作用时间和给药浓度呈正相关。其中,200 μg/mL 的祛白片正丁醇部位(作用 48 h 后)使黑色素细胞数量增加最明显。与溶媒组比较,8-MOP 各浓度组细胞数也明显增加,也与作用时间和给药浓度呈正相关。

2.2.4 细胞活性检测 采用 CCK-8 法检测细胞的活性。取对数生长期小鼠 B16 黑色素瘤细胞,按“2.2.3”项下方法接种、造模、分组与给药,另设只加培养基、不加细胞的本底对照组,每组设 5 个复孔。各组细胞培养 24、48 h 后,吸去上清液,加入 CCK-8 溶液,继续培养 4 h 后,采用酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔光密度值(OD),并取平均值,再计算细胞增殖率[细胞增殖率=(OD<sub>给药组</sub> - OD<sub>本底对照组</sub>)/(OD<sub>模型组或溶媒组</sub> - OD<sub>本底对照组</sub>)×100%<sup>[9]</sup>]。采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。结果显示,与模型组比较,祛白片正丁醇部位各浓度组细胞增殖率均显著升高( $P<0.01$ );与溶媒组比较,8-MOP 各浓度组细胞增殖率均显著升高( $P<0.01$ )。结果见图 3。

表2 祛白片正丁醇部位的化学成分分析结果(负离子模式)

| 序号 | 保留时间/min | 准分子离子峰 $m/z$            | 分子量 | 化合物名称                               | 相对百分含量/% | 来源中药   |
|----|----------|-------------------------|-----|-------------------------------------|----------|--------|
| 1  | 1.92     | 579.2[M-H] <sup>-</sup> | 580 | 柚皮苷                                 | 24.12    | 香橼     |
| 2  | 2.43     | 551.2[M-H] <sup>-</sup> | 552 | 可来灵素 C                              | 0.11     | 北沙参    |
| 3  | 2.49     | 491.1[M-H] <sup>-</sup> | 492 | 丹酚酸 C                               | 0.63     | 丹参     |
| 4  | 2.75     | 521.2[M-H] <sup>-</sup> | 522 | 乙酰芍药苷                               | 0.62     | 赤芍     |
| 5  | 2.88     | 463.1[M-H] <sup>-</sup> | 464 | 槲皮素-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷   | 0.12     | 炒蒺藜    |
| 6  | 3.47     | 301.0[M-H] <sup>-</sup> | 302 | 槲皮素                                 | 0.16     | 炒蒺藜    |
| 7  | 3.61     | 431.1[M-H] <sup>-</sup> | 432 | 大黄素甲醚-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷 | 0.12     | 何首乌    |
| 8  | 3.64     | 271.1[M-H] <sup>-</sup> | 272 | 红镰霉素                                | 0.16     | 决明子    |
| 9  | 4.29     | 329.1[M-H] <sup>-</sup> | 330 | 苜蓿素                                 | 0.75     | 制何首乌   |
| 10 | 4.41     | 315.1[M-H] <sup>-</sup> | 316 | 比克白芷素                               | 0.71     | 白芷     |
| 11 | 4.58     | 285.0[M-H] <sup>-</sup> | 286 | 山柰黄素                                | 0.27     | 赤芍     |
| 12 | 4.85     | 357.1[M-H] <sup>-</sup> | 358 | 黄决明素                                | 0.22     | 决明子    |
| 13 | 5.01     | 343.1[M-H] <sup>-</sup> | 344 | 决明素                                 | 0.31     | 决明子    |
| 14 | 5.24     | 283.1[M-H] <sup>-</sup> | 284 | 大黄素甲醚                               | 0.62     | 炒蒺藜    |
| 15 | 5.53     | 321.1[M-H] <sup>-</sup> | 322 | 补骨脂色烯查尔酮                            | 1.36     | 补骨脂    |
| 16 | 5.64     | 269.1[M-H] <sup>-</sup> | 270 | 异欧前胡内酯                              | 0.31     | 丹参     |
| 17 | 5.72     | 269.0[M-H] <sup>-</sup> | 270 | 大黄素                                 | 0.48     | 制何首乌   |
| 18 | 5.77     | 319.1[M-H] <sup>-</sup> | 320 | 补骨脂异黄酮                              | 0.14     | 补骨脂    |
| 19 | 5.93     | 335.1[M-H] <sup>-</sup> | 336 | 异补骨脂定                               | 0.14     | 补骨脂    |
| 20 | 6.15     | 323.1[M-H] <sup>-</sup> | 324 | 补骨脂甲素                               | 0.59     | 补骨脂    |
| 21 | 6.45     | 337.1[M-H] <sup>-</sup> | 338 | 8-牻牛儿醇基补骨脂素                         | 0.94     | 北沙参    |
| 22 | 7.09     | 513.4[M-H] <sup>-</sup> | 514 | 19 $\alpha$ -羟基-3-乙酰乌索酸             | 0.10     | 女贞子    |
| 23 | 7.10     | 255.2[M-H] <sup>-</sup> | 256 | 补骨脂酚                                | 0.30     | 补骨脂    |
| 24 | 7.16     | 299.2[M-H] <sup>-</sup> | 300 | 柳杉醇                                 | 0.43     | 丹参、北沙参 |
| 25 | 7.32     | 455.4[M-H] <sup>-</sup> | 456 | 熊果酸                                 | 0.38     | 女贞子    |
| 26 | 7.37     | 277.2[M-H] <sup>-</sup> | 278 | 亚麻酸                                 | 0.98     | 黑芝麻    |
| 27 | 7.40     | 227.2[M-H] <sup>-</sup> | 228 | 肉豆蔻酸                                | 0.35     | 红花     |
| 28 | 7.56     | 279.2[M-H] <sup>-</sup> | 280 | 鞣酸                                  | 4.28     | 红花、女贞子 |
| 29 | 7.58     | 241.2[M-H] <sup>-</sup> | 242 | 13-甲基十四碳酸                           | 0.34     | 赤芍     |
| 30 | 7.72     | 255.2[M-H] <sup>-</sup> | 256 | 十六(烷)酸                              | 28.35    | 补骨脂、香橼 |
| 31 | 7.79     | 281.2[M-H] <sup>-</sup> | 282 | 反油酸                                 | 3.42     | 香橼     |
| 32 | 7.99     | 283.3[M-H] <sup>-</sup> | 284 | 十八碳酸                                | 27.51    | 补骨脂    |
| 33 | 8.50     | 339.3[M-H] <sup>-</sup> | 340 | 山芋酸                                 | 0.68     | 补骨脂    |

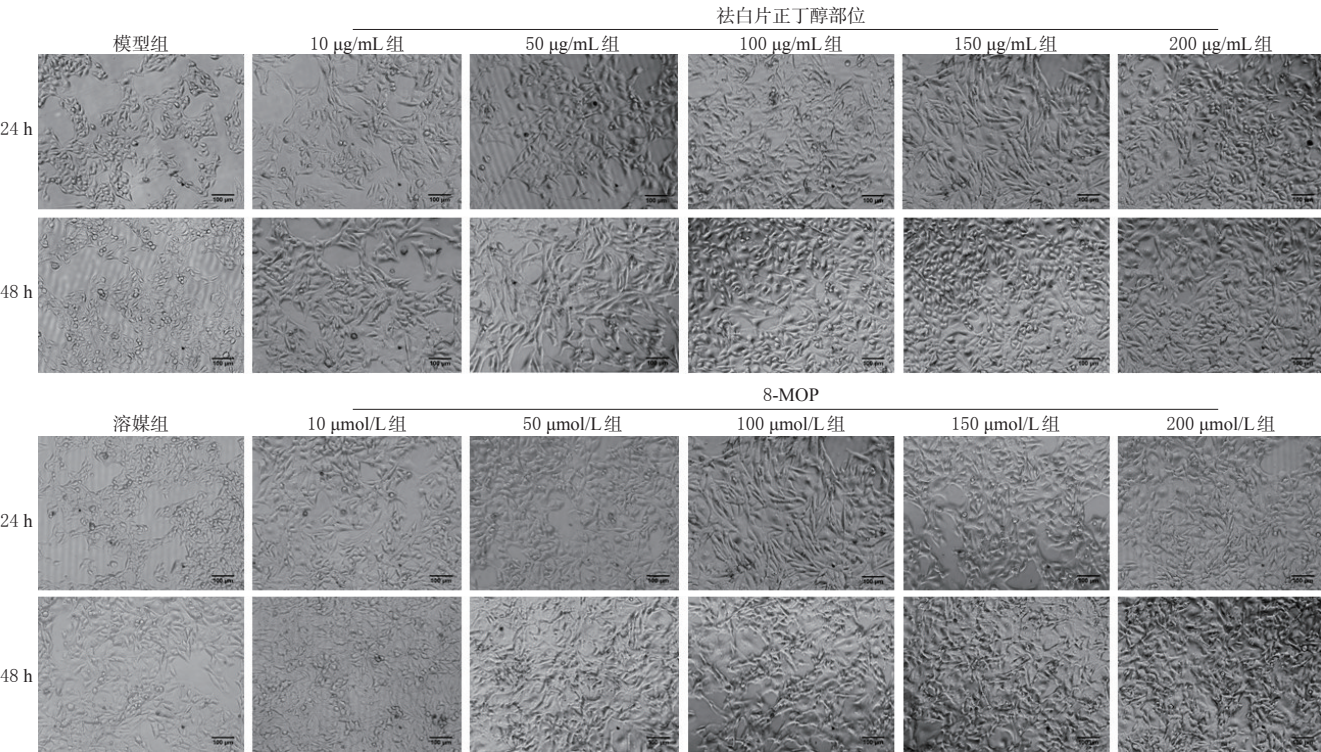
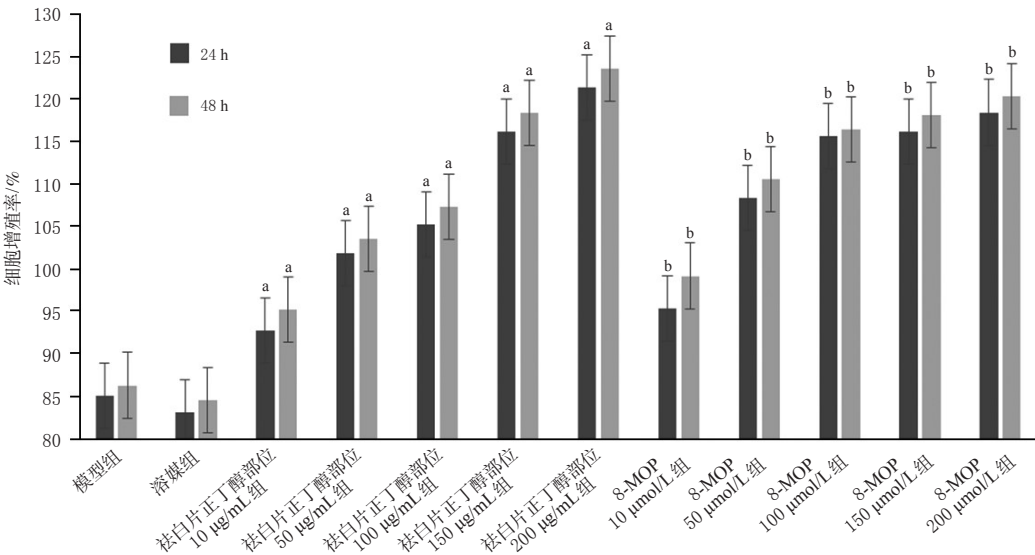


图2 各组细胞数量的观察结果

2.2.5 促黑色素生成率的检测 参考文献[10]方法进行检测。取对数生长期小鼠B16黑色素瘤细胞,按“2.2.3”项下方法接种、造模、分组与给药,每组设5个复孔。各组细胞培养24、48 h后,弃去上清液,以磷酸盐缓冲液(pH=7.4)清洗2次后,加入1 mol/L NaOH溶液(不含DMSO)200 μL,于80 ℃条件下恒温水浴2 h,待细胞充分裂解、黑色素颗粒充分溶解后,采用酶标仪于490 nm波长处测定各孔OD,并取平均值,再计算促黑色素生成率[促黑色素生成率=(OD<sub>给药组</sub> - OD<sub>模型组或溶媒组</sub>)/OD<sub>模型组或溶媒组</sub>×100%]。结果显示,与模型组比较,祛白片正丁醇部位各浓度组细胞促黑色素生成率均显著升高( $P<0.01$ );与溶媒组比较,8-MOP各浓度组细胞促黑色素生成率也显著升高( $P<0.01$ )。结果见图4。

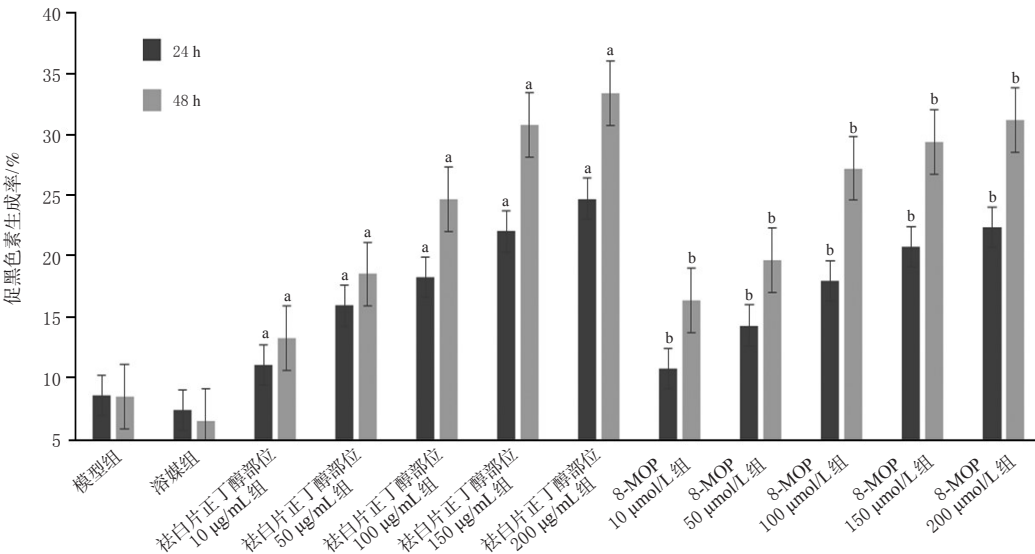
2.2.6 酪氨酸酶活性促进率的检测 参考文献[11]方法

进行检测。取对数生长期小鼠B16黑色素瘤细胞,按“2.2.3”项下方法接种、造模、分组与给药,每组设5个复孔。各组细胞培养24、48 h后,弃去培养基,以磷酸盐缓冲液(pH=7.4)洗涤2次,每孔加入TritonX-100溶液(1%)90 μL,立即放入-80 ℃冰箱冷冻30 min,取出后室温融化至细胞完全破裂,37 ℃预温后加入L-DOPA溶液(10 g/L)100 μL,于37 ℃条件下孵育30 min后,采用酶标仪于490 nm波长处检测各孔OD,并取平均值,再计算酪氨酸酶活性促进率[酪氨酸酶活性促进率=(OD<sub>给药组</sub> - OD<sub>模型组或溶媒组</sub>)/OD<sub>模型组/溶媒组</sub>×100%]。结果显示,与模型组比较,祛白片正丁醇部位各浓度组细胞酪氨酸酶活性促进率均显著升高( $P<0.01$ );与溶媒组比较,8-MOP各浓度组细胞酪氨酸酶活性促进率也显著升高( $P<0.01$ )。结果见图5。



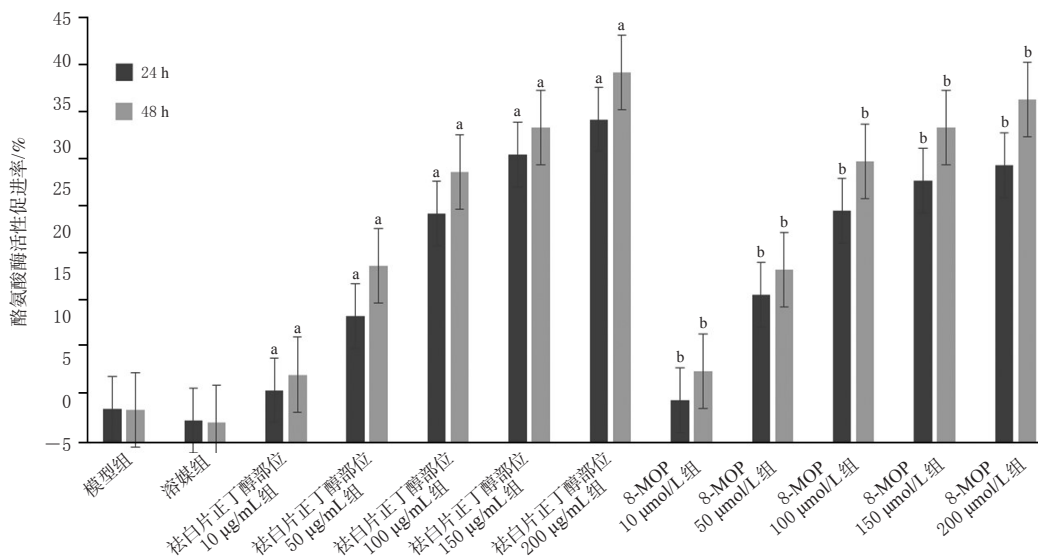
a: 与模型组比较,  $P<0.01$ ; b: 与溶媒组比较,  $P<0.01$

图3 各组细胞增殖率的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )



a: 与模型组比较,  $P<0.01$ ; b: 与溶媒组比较,  $P<0.01$

图4 各组细胞促黑色素生成率的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )



a: 与模型组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与溶媒组比较,  $P < 0.01$

图5 各组细胞酪氨酸酶活性促进率的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

### 3 讨论

#### 3.1 中药有效部位筛选

中药有效部位指从中药中提取出的一类或几类化学成分的混合物,是发挥疗效的物质基础,也是质量控制的关键。通过分离纯化除去无效、低效或有毒的成分,来降低服用剂量和毒副作用,是中药创新药物发现的重要途径<sup>[12-13]</sup>。中药有效部位的研究内容为对中药或其制剂进行系统提取分离,根据功效采用相应药理学指标建立药理模型,确定具有活性的部位,同时采用现代分析手段确定该部位所含化学成分的类型。中药有效部位的确定是中药新药研究开发的基础<sup>[14]</sup>。近年来,多项国内外研究表明,中药有效部位的提取与筛选,对揭示中药多组分、多靶点、多途径的特点及中药复方配伍内在规律具有重要意义<sup>[15-17]</sup>。本文遵循中药有效部位研究方法,旨在确定祛白片的活性部位,为进一步研发抗白癜风药物奠定基础。

#### 3.2 祛白片正丁醇部位化学成分分析

中药正丁醇部位化学成分和生物活性一直是近年来中药化学研究的热点<sup>[18-20]</sup>。本研究利用UPLC-MS技术,初步确定了祛白片正丁醇部位所含的53个化合物(正离子模式下29个,负离子模式下33个,重合9个),并计算了相对百分含量。正离子模式下相对百分含量排名前3位的化合物分别为7-*O*-(3,3-二甲基烯丙基)-东莨菪素(34.37%)、比克白芷素(18.12%)和黄决明素(8.73%);负离子模式下相对百分含量排名前3位的化合物分别为十六(烷)酸(28.35%)、十八碳酸(27.51%)和柚皮苷(24.12%)。另外,在正、负离子模式下均检出的9种化合物分别为苜蓿素、比克白芷素、黄决明素、补骨脂色烯查尔酮、异欧前胡内酯、补骨脂异黄酮、补骨脂

甲素、8-牻牛儿醇基补骨脂素、柳杉醇。在这些成分中,香豆素类化合物所占比例最大,黄酮类化合物次之,这与本课题组前期对祛白片乙酸乙酯部位化学成分研究结果类似<sup>[4]</sup>。但祛白片正丁醇部位中有7种成分在乙酸乙酯部位中未检出,分别为辛弗林、苜蓿素、柚皮苷、丹酚酸C、槲皮素-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、苜蓿素和十六(烷)酸。经查阅文献发现,香豆素类和黄酮类化合物均具有潜在的抗白癜风作用<sup>[21-23]</sup>,值得进一步深入研究。

#### 3.3 脱黑色素模型的药效学结果分析

小鼠B16黑色素瘤细胞目前在药理学研究中被广泛应用<sup>[24-25]</sup>。本实验利用小鼠B16黑色素瘤细胞建立脱黑色素细胞模型,从细胞数量、促细胞活力、促黑色素生成3个方面,研究了祛白片正丁醇部位的药效学。首先,采用倒置显微镜观察细胞的数量变化,结果发现,祛白片正丁醇部位可使细胞数明显增加,且增加趋势与作用时间和给药浓度呈正相关。其次,研究了祛白片正丁醇部位对细胞活性的影响,结果发现,祛白片正丁醇部位可显著提高细胞的增殖率( $P < 0.01$ )。为进一步探索祛白片正丁醇部位的作用机制,本研究检测其对酪氨酸酶活性的影响,结果发现,祛白片正丁醇部位可显著升高酪氨酸酶活性促进率,由此推测,该部位具有潜在的抗白癜风作用,且可能是通过提高酪氨酸酶活性实现的。结合本课题组前期研究发现,祛白片乙酸乙酯部位也具有良好的抗白癜风作用,这提示在后续研究中可优化祛白片原有制备工艺,将祛白片水煎液用乙酸乙酯和正丁醇分别萃取后,合并两部位制备成制剂,以达到既保留原有药效、又减小服用剂量的效果,从而更好地提高患者的依从性。

综上所述,香豆素类和黄酮类化合物可能是祛白片正丁醇部位发挥抗白癜风作用的物质基础;祛白片正丁醇部位的抗白癜风作用可能是通过促进酪氨酸酶活性实现的。

## 参考文献

[1] 屠善庆.中药白癜风片治疗白癜风349例疗效观察[J].北京医学,1991,13(3):182-183.

[2] 屠善庆.中药白癜风片与部分外用氮芥酒精治疗白癜风112例疗效观察[J].铁道医学,1983,11(4):232-233.

[3] 顾红燕,韦元元,金锐,等.祛白片对实验性白癜风模型的疗效学及其作用机制探讨[J].中国医院药学杂志,2015,35(19):1741-1746.

[4] 段松冷,顾红燕,年宏蕾,等.祛白片乙酸乙酯部位成分分析及其对小鼠脱黑色素细胞模型的药效学研究[J].中国药房,2022,33(7):43-50.

[5] 顾红燕,韦元元,卢文超,等.祛白片对小鼠B16脱黑色素细胞模型促黑色素生成的影响[J].中成药,2020,42(7):1910-1914.

[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:121.

[7] 高靖.中药有效部位提取物制备研究[J].亚太传统医药,2010,6(2):113-114.

[8] GUAN C P, XU W, HONG W S, et al. Quercetin attenuates the effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on endoplasmic Reticulum morphology and tyrosinase export from the endoplasmic Reticulum in melanocytes[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(6):4285-4290.

[9] 李敏,周明伟,刘翔宇,等.复方倍他米松注射液对小鼠B16黑素瘤细胞增殖及黑素生成的影响[J].中国实验诊断学,2018,22(7):1253-1254.

[10] ULLAH S, KANG D W, LEE S, et al. Synthesis of cin-namic amide derivatives and their anti-melanogenic effect in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells[J]. Eur J Med Chem, 2019, 161:78-92.

[11] YE Y, CHOU G X, WANG H, et al. Flavonoids, apigenin and icariin exert potent melanogenic activities in murine B16 melanoma cells[J]. Phytomedicine, 2010, 18(1):32-35.

[12] 姜勇,李军,屠鹏飞.再议新形势下中药创新药物的发现与研发思路[J].世界科学技术-中医药现代化,2017,19(6):892-899.

[13] 屠鹏飞,姜勇,郭晓宇.新形势下中药创新药物的发现与

研发[J].中国中药杂志,2015,40(17):3423-3428.

[14] 邵璟,狄留庆,刘产明,等.中药有效部位新药研发中关键问题分析[J].中国新药杂志,2010,19(2):98-101.

[15] 张王宁,李爱平,李科,等.中药药效物质基础研究方法进展[J].中国药学杂志,2018,53(10):761-764.

[16] 王长福,徐嘉智,王思宇,等.六神曲抗菌有效部位化学成分研究[J].时珍国医国药,2020,31(10):2350-2353.

[17] HEIDARI-BENI M, MORAVEJOLAHKAMI A R, GORGIAN P, et al. Herbal formulation “turmeric extract, black pepper, and ginger” versus Naproxen for chronic knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, controlled clinical trial[J]. Phytother Res, 2020, 34(8):2067-2073.

[18] 赵青群,付辉政,林凯鹏,等.鲜竹沥正丁醇部位化学成分研究[J].中草药,2021,52(7):1891-1897.

[19] 曹海娟,方洋,饶志粒,等.基于网络药理学和分子对接探讨荆防药对正丁醇部位分离物A的抗氧化作用机制[J].中药药理与临床,2021,37(2):111-118.

[20] 纪雅菲,芮翊馨,方洋,等.逍遥散正丁醇部位基于IGF-1R $\beta$ /PI3K/Akt信号通路的抗抑郁作用[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(14):1-11.

[21] 雷杰豪,许爱娥.中草药黄酮类提取物对白癜风抗氧化应激作用机制的研究进展[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志,2018,17(3):281-284.

[22] 韩宝龙.中药祛白消斑汤加减配合光疗治疗白癜风临床观察[J/OL].临床医药文献电子杂志,2018,5(31):165 [2022-02-14]. [https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFDLAST2018&filename=LC-WX201831137&uniplatform=NZKPT&v=ZAJyCfMFs6d-VFO80Jv60dAkYrPXjAuSeKluPx12EEuyDyEvcPdS3fJlk\\_3\\_snRb9](https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFDLAST2018&filename=LC-WX201831137&uniplatform=NZKPT&v=ZAJyCfMFs6d-VFO80Jv60dAkYrPXjAuSeKluPx12EEuyDyEvcPdS3fJlk_3_snRb9). DOI:10.16281/j.cnki.jocml.2018.63.137.

[23] 韩春雷,陈海燕,吴洁贞,等.复方槐花补骨脂酊联合NB-UVB治疗稳定期散发型白癜风疗效观察[J].皮肤性病诊疗学杂志,2019,26(5):276-279.

[24] 吴森林,罗颖颖,严新,等.白头翁皂苷对B16-F10黑色素瘤荷瘤小鼠炎症因子的影响及机制初步研究[J].中成药,2020,42(6):1609-1614.

[25] 孟星君,李孝东,刘俊,等.C57BL/6 J小鼠黑色素瘤肺转移模型的构建[J].中国实验动物学报,2018,26(2):139-144.

(收稿日期:2021-12-29 修回日期:2022-03-29)

(编辑:唐晓莲)