

侧柏叶乌发活性部位的实验研究

李忠原,王悦,王彩霞,王轲,吕洁,张浩,朱立俏

(山东中医药大学,山东 济南,250355)

[摘要] 目的:筛选侧柏叶乌发的活性部位。方法:采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法测定侧柏叶不同极性部位及其不同浓度对酪氨酸酶活性的影响,评价侧柏叶不同极性部位及不同浓度的乌发效果。结果:4批侧柏叶中石油醚部位0.5g/ml的剂量有上调蘑菇酪氨酸酶活性的作用。结论:侧柏叶中具有乌发作用的可能是石油醚部位,且与其浓度有关,高浓度有上调蘑菇酪氨酸酶活性的作用。

[关键词] 侧柏叶;酪氨酸酶活性;极性部位;乌发;实验研究

[中图分类号] R282.710.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.01.060

An experimental study of the active part of *Cacumen biotae* with a hair-blackening effect

LI Zhongyuan, WANG Yue, WANG Caixia, WANG Ke, LYU Jie, ZHANG Hao, ZHU Liqiao

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong, China)

[Abstract] Objective: To investigate the active part of *Cacumen biotae* with a hair-blackening effect. Methods: The method of oxidation of L-dopa by mushroom tyrosinase was used to observe the influence of different polar parts of *Cacumen biotae* at different concentrations on the activity of tyrosinase, and the hair-blackening effect of different polar parts of *Cacumen biotae* at different concentrations was evaluated. Results: Among the 4 batches of *Cacumen biotae*, the petroleum ether extract with a dose of 0.5g/ml upregulated the activity of mushroom tyrosinase. Conclusion: The petroleum ether extract of *Cacumen biotae* may exert a hair-blackening effect in a dose-dependent manner, and a high concentration of this extract can upregulate the activity of mushroom tyrosinase.

[Key words] *Cacumen biotae*; tyrosinase activity; polar part; hair-blackening; experimental study

侧柏叶为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥枝梢和叶。气清香,味苦涩、微辛;归肺、肝、脾经;可凉血止血,化痰止咳,生发乌发;可用于治疗吐血、衄血、咯血、便血、崩漏下血,肺热咳嗽、血热脱发、须发早白^[1]。《本草纲目》中谓其“浸油,生发,绞汁,黑发,和猪脂,沐发长黑”。

现代社会生活节奏快、竞争压力大,须发早白的问题开始困扰越来越多的人群。据不完全统计,2015年的白发患者约占成年人群体的20%~30%,并呈不断增长的趋势^[2]。产生白发是因为黑色素的生成受阻,受阻的原因有酪氨酸酶活性降低、黑素细胞减少等^[3-4]。酪氨酸酶通过将L-酪氨酸羟化生成L-多巴(单酚酶活力),再将L-多巴氧化成多巴醌(二-酚酶活力),多巴醌通过一系列反应形成黑色素^[5]。

虽然无机染发剂和合成染发剂可使白发迅速变黑,但其存在许多毒副作用,植物性染发剂对人和环境基本无害,但尚处于研发阶段,使用范围不广。

本实验通过测定4批侧柏叶不同极性部位及其浓度对

酪氨酸酶活性的影响,探究侧柏叶乌发的有效部位,以期为进一步研究其乌发机制提供参考。

1 试药与仪器

1.1 药品 4批侧柏叶分别购自山东、安徽、山西,经山东中医药大学李峰教授鉴定为侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥枝梢和叶,其厂家及生产批号见表1。

表1 4批侧柏叶的来源

编号	产地	厂家	生产批号
1	安徽	安国市远光药业有限公司	160701
2	山东	安徽广印堂制药有限公司	131101
3	山西	安徽精诚本草中药饮片有限公司	161101
4	山东	天马中药饮片科技有限公司	140302

1.2 试剂 蘑菇酪氨酸酶(tyrosinase)购于worthington公司(批号:35P16228U),L-多巴(L-Dopa)购于RUIBIO公司(批号:C10100298);磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、乙醇、二甲亚砜、石油醚、乙酸乙酯均为分析纯。

1.3 仪器 岛津UV-2550紫外可见分光光度计(SHIMADZU CORPORATION);电子天平(上海卓精电子科技有

基金项目:山东中医药大学大学生研究训练计划项目(编号:2017013)

第一作者:李忠原,男,研究方向:中药学

通讯作者:朱立俏,女,博士,副教授,研究方向:中药药效物质基础及体内过程研究, E-mail: zliqiao@163.com

限公司);真空干燥机(巩义市予华仪器有限责任公司)。

2 方法与结果

2.1 磷酸缓冲溶液的配制 精密称取磷酸氢二钠 14.196g 定容至 1000ml,磷酸二氢钾 13.609g 定容至 1000ml。以磷酸氢二钠溶液:磷酸二氢钾溶液 = 51:49 的比例配置成 pH = 6.8 的磷酸缓冲溶液。

2.2 L-多巴溶液的配制 精密称取 L-多巴 150mg 用 PBS 溶液定容至 100ml,即为 0.15% L-多巴溶液,现配现用。

2.3 酪氨酸酶溶液的配制 精密称取 4.44mg(8KU)蘑菇酪氨酸酶(1800U/mg)用 PBS 定容至 100ml,即得酪氨酸酶溶液(80U/ml)现配现用。

2.4 样品的制备

2.4.1 侧柏叶提取物的制备 取侧柏叶,粉碎,过 20 目筛,称取侧柏叶粉末 20g,加 10 倍量 65% 乙醇^[6]回流提取 3 次,每次提取时间 1h。合并滤液。

2.4.2 各极性部位样品制备 取滤液浓缩至 0.5g/ml,加入等量石油醚,振摇,静置待溶液完全分层后,倒出上层溶液,下层溶液按上述方法萃取 5 次至上层溶液接近于无色,合并 5 次石油醚萃取液 50℃ 减压回收、真空干燥后得到侧柏叶的石油醚部位冷藏以备用;将剩余下层溶液按照上述方法用乙酸乙酯萃取 5 次至接近无色,将乙酸乙酯萃取液合并,50℃ 减压回收、真空干燥后得到侧柏叶的乙酸乙酯部位冷藏以备用。

2.5 侧柏叶不同极性部位的检测 检测侧柏叶不同极性部位对酪氨酸酶活性的影响^[7-8]。将上述侧柏叶石油醚部位和乙酸乙酯部位样品加入适量二甲亚砜溶解,然后用 PBS 定容,配制成 0.3、0.4、0.5 g/ml 3 种不同浓度备用。反应物 2ml,37℃ 孵育 10min 后,加入 0.15% L-多巴再孵育 3min,立即用紫外可见分光光度计于 475nm 下测定吸光度值。计算各部位对酪氨酸酶的激活率。酪氨酸酶激活率(%) = [(C - D) - (A - B)] / (A - B) × 100%。反应物共 4 组,其中:A = A₄₇₅(酪氨酸酶:0.1ml、PBS:1.9ml);B = A₄₇₅(PBS:2.0ml);C = A₄₇₅(酪氨酸酶:0.1ml、PBS:1.8ml、样品:0.1ml);D = A₄₇₅(PBS:1.9ml、样品:0.1ml)。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 对数据进行分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,不同浓度间的数据比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结 果

1、2、3、4 号药品石油醚部位 0.3g/ml 的剂量与 0.4g、0.5g/ml 的剂量比较,0.4g/ml 与 0.5g/ml 的剂量比较,差异均具有统计学意义。1、3、4 号药品乙酸乙酯部位 0.3g/ml 的剂量与 0.4g/ml、0.5g/ml 的剂量比较,0.4g/ml 与 0.5g/ml 的剂量比较,差异具有统计学意义。2 号药品仅乙酸乙酯部位 0.3g/ml 的剂量与 0.4g/ml、0.5g/ml 的剂量比较,差异具有统计学意义;而 0.4g/ml 与 0.5g/ml 的剂量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。(见表 2)

表 2 4 批侧柏叶石油醚和乙酸乙酯对酪氨酸酶活性的影响($\bar{x} \pm s$)

编号	剂量(g/ml)	激活率(%)	
		石油醚	乙酸乙酯
1	0.3	-32.52 ± 1.17 ^a	-29.60 ± 0.25 ^a
	0.4	-75.46 ± 2.18 ^b	-60.52 ± 1.14 ^b
	0.5	9.20 ± 1.04	-13.81 ± 0.76
2	0.3	-24.54 ± 1.02 ^a	-36.18 ± 0.72 ^a
	0.4	-58.28 ± 0.93 ^b	-52.63 ± 0.55
	0.5	120.86 ± 0.61	-50.00 ± 3.03
3	0.3	-22.70 ± 1.68 ^a	-87.23 ± 1.00 ^a
	0.4	-33.74 ± 1.36 ^b	-119.15 ± 1.46 ^b
	0.5	26.38 ± 1.46	-59.57 ± 1.08
4	0.3	-56.44 ± 2.46 ^a	-23.40 ± 0.62 ^a
	0.4	-9.61 ± 0.71 ^b	-114.89 ± 1.24 ^b
	0.5	18.40 ± 1.27	-31.91 ± 1.00

注:与本编号 0.4、0.5g/ml 的剂量相比,^a $P < 0.05$;与本编号 0.5g/ml 的剂量相比,^b $P < 0.05$ 。

4 讨 论

由于 4 批药材的产地、采收时间不同,其石油醚部位、乙酸乙酯部位颜色均有一定差异。通过研究结果可见侧柏叶的石油醚部位对酪氨酸酶的活性有一定促进作用,且与其浓度有密切关系,高浓度对酪氨酸酶活性的促进有着较强的作用,低浓度则表现为抑制作用;乙酸乙酯部位表现为抑制作用。陈兴芬的报道中,侧柏叶的乙酸乙酯部位对酪氨酸酶有抑制作用^[9],与本实验结论相同。石油醚部位高浓度对酪氨酸酶活性的影响具有促进作用,但其活性单体成分有待进一步探究。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2015:215-216.

[2] 李星彩. 染发剂、烫发剂中的化学成分及其对人体的危害[J]. 微量元素与健康研究,2006,23(1):47-48.

[3] 郭云集,宋康康,李智聪,等. 甘醇酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2008,47(3):383-386.

[4] Mallick S, Singh SK, Sarkar C, et al. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins in vitro[J]. Pigm Cell Res, 2005, 18(1):25-33.

[5] Vance KW, Goding CR. The transcription net work regulating melanocyte development and melanoma[J]. Pigm Cell Res, 2004, 17(4):318-325.

[6] 高旦,刘叶,惠小维,等. 侧柏叶乌发活性成分探究[J]. 中国现代中药,2016,18(3):318-320.

[7] 雷铁池,朱文元,夏明玉,等. 中药对黑素生物合成影响研究 I. 82 味中药乙醇提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用[J]. 中草药,1999,30(5):336-339.

[8] 傅国强,马鹏程,吴勤学,等. 196 味中药乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 中华皮肤科杂志,2003,36(2):48-51.

[9] 陈兴芬. 侧柏叶化学成分提取及活性功能研究[D]. 南京:南京师范大学,2011. (收稿日期:2018-04-11)