

# 甘草桔梗皂苷对酪氨酸酶抑制的合并效应研究

宋 杨, 齐 云\*, 刘 彬, 蔡润兰, 谢 忱, 罗秀珍

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

[摘要] 目的: 考察不同比例桔梗和甘草皂苷合用对酪氨酸酶的抑制作用。方法: 改进传统的分光光度法, 在微孔板上测定甘草、桔梗皂苷及二者的不同配比对酪氨酸酶的抑制活性, 并采用国外常用的等高线和改良的等高线法对甘草桔梗不同配比的合用作用进行评价。结果: 随着配比中甘草皂苷含量的增多, 药物对酪氨酸酶的抑制活性从拮抗、相加到协同。结论: 配比直接影响两药合用的效果。

[关键词] 桔梗皂苷; 甘草皂苷; 酪氨酸酶; 合用

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)03-0007-04

## Evaluating the Combinative Effects of the Inhibition on Tyrosinase by Two Chinese Traditional Herbs: *Platycodon Grandiflorum* A. DC and *Glycyrrhiza Uralensis* Fisch

SONG Yang, QI Yun\*, LIU Bin, CAI Run-lan, XIE Chen, Luo Xiu-zhen

(Research Center for Pharmacology and Toxicology, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the inhibitive effects on tyrosinase by the combinations of Chinese traditional herbs: *Platycodon grandiflorum* A. DC and *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, mainly focusing on the differences of the dose-effect curves when changing the combination ratio of the two herbs. **Methods:** With isobolographic plot and the method developed by Tallarida RJ and the 96-well assay method on tyrosinase, the inhibitive effects of tyrosinase by the saponins of *Platycodon grandiflorum* A. DC and *Glycyrrhiza uralensis* Fisch were investigated. In the same time, fixed combinations of *Platycodon grandiflorum* saponins (PS) and *Glycyrrhiza uralensis* saponins (GS) were also studied to give our a detailed picture of the combinative effects of the two herbs. **Results:** With increasing of GS, the combination ratio has a great influence on the inhibitive effects of tyrosinase by the two herbs.

[Key words] *Platycodon grandiflorum* Saponins; *Glycyrrhiza uralensis* saponins; tyrosinase, combination

酪氨酸酶(Tyrosinase, TYR)是合成黑色素的关键酶,在色素障碍性皮肤病的治疗中, TYR抑制剂具有举足轻重的作用<sup>[1]</sup>。近年来,从微生物和植物药中分离天然TYR抑制剂引起了人们的广泛关注。

桔梗和甘草在中医治疗色素障碍性皮肤病中的运用非常活跃<sup>[2]</sup>,而早在东汉《伤寒论》中已推崇甘草与桔梗的合用(名桔梗汤),并成为后世常用且有名的“药对”。那么,甘桔“药对”单用与合用在体外对TYR的作用如何?本文采用近年国外最常用的药物相互作用评价方法<sup>[3,4]</sup>,对甘草皂苷、桔梗皂苷及不同配比甘桔皂苷抑制TYR作用特点进行了研究。

### 1 仪器与材料

Multiskan Ascent 酶标仪(美国 Thermo Electron 公

[收稿日期] 2006-04-07

[基金项目] 北京市自然科学基金资助课题(7042039); 国家中医药管理局资助课题(04-05ZL04)

[通讯作者] \* 齐云, Tel: (010) 62829207, E-mail: yunqichai@sohu.com

司), 雷磁 PHS-3B 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。桔梗总皂苷(Platycodon grandiflorus saponins, PS) 和甘草总皂苷(Glycyrrhiza uralensis saponins, GS) 均为本所化学室提供, 皂苷含量分别为 66% 和 60%, 在本文中所有用药比例均指粗品含量而非纯皂苷比例, 用 PBS 缓冲液超声溶解; 酪氨酸酶(Tyrosinase, Sigma); 左旋酪氨酸(L-tyrosine, 北京奥博星生物技术有限责任公司); 所有药品均用 PBS (PH6.5) 缓冲液溶解。

## 2 实验方法

**2.1 实验设计** 选取单药的不同剂量, 以期绘制桔梗、甘草的量效曲线, 最高浓度分别为 1.33 和 0.041 mg/mL。同时设计桔梗比甘草 1: 80, 1: 40, 1: 20, 1: 10, 1: 1, 10: 1, 20: 1, 40: 1 八个配比, 最高浓度分别为 0.056, 0.057, 0.058, 0.061, 0.1, 0.55, 0.525, 0.51 mg/mL, 分别做量效曲线。

**2.2 酪氨酸酶活性测定<sup>[5,6]</sup>** 将国内普遍采用的分光光度测定 TYR 活性的方法转移到 96 孔板上进行, 每个剂量均设置含药反应孔与含药对照孔, 同时设置空白反应孔和空白对照孔。TYR 浓度为 55.5 U·mL<sup>-1</sup> (用 PBS 缓冲液溶解)。含药反应孔由 20 μL 药液和 30 μL TYR 组成, 同时加入 50 μL PBS。含药对照孔加入煮沸灭活的酶, 其余同反应孔。空白反应孔不含药, 但含有与含药反应孔相同的 TYR。37 °C 孵育 10 min。然后每孔均加入 100 μL 底物左旋酪氨酸(2 mmol/L, 用 PBS 缓冲液溶解), 振摇, 于 37 °C 烘箱孵育 40 min。在酶标仪 492 nm 处测定, 随机确定配比或单药的实验顺序。TYR 抑制率(Inhibition rate, %) = [1 - (含药反应孔 - 含药对照孔) / (空白反应孔 - 空白对照孔)] × 100%

**2.3 数据处理** (本文所有图表均用绘图软件 Sigmaplot 绘制)

**2.3.1 经典的等高线法(Isobologram)<sup>[7]</sup>** 等高平面(图 1)是一个等效面, 面上的点均产生相同强度的效应。X 轴和 Y 轴分别表示合并用药中两个药各自的剂量(此处用 A 药、B 药表示)。如图所示, 相加线上的点表示二药作用相加(即既不协同也不拮抗), 相加线与 X、Y 轴的截距分别为 A、B 二药单用达到该等高面效应的剂量。Q 点在相加线下方, 说明产生相同效应所需的药量比相加的药量小, 这种情况定义为协同。反之, R 点在相加线上方, 定义为拮抗。P 点在相加线置信区间内, 表示二药相加。

在本实验中, 根据药物的量效关系, 用加权线形回归法计算得出单药和配比混合物的 ED<sub>30</sub>, 并计算其置信区间。选取 30% 的抑制率为等效面绘制等高图, 连接桔梗、甘草单药的 ED<sub>30</sub> 及其置信区间得到桔梗甘草的相加线。将各个组成比例的 ED<sub>30</sub> 点绘制在图上, 判断药物的相互作用类型及趋势。

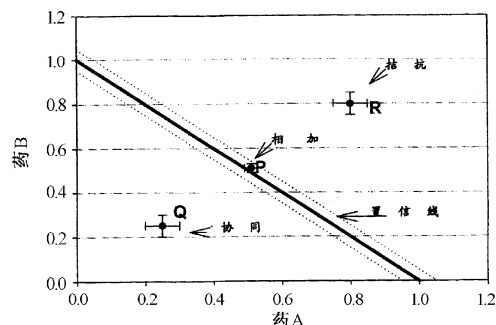


图 1 等高线图(示意图)

**2.3.2 改良的等高线法<sup>[8]</sup>** 据 Tallarida 的改良等高线法, 运用软件“Pharmtoolspro (The MacCary Group, Inc)”进行处理, 得出相互作用指数  $\alpha$ , 将药物相互作用的程度定量化。

## 3 实验结果

**3.1 桔梗、甘草及各种配比对 TYR 的抑制作用** 如图 2 所示, 甘草、桔梗及各种它们的配比, 均能剂量依赖性地抑制 TYR 的活性。如图 2A, 桔梗皂苷的 IC<sub>30</sub> 为 143 ± 27 μg·mL<sup>-1</sup>, 甘草皂苷 IC<sub>30</sub> 为 9 ± 2 μg·mL<sup>-1</sup>, 甘草皂苷的抑制效果强于桔梗皂苷。如图 2B, 2C 甘桔混合物随着桔梗比例的增加, 量效曲线右移, 效能降低。量效回归方程为: E (%) = 56.91 × Log(Dose(mg/mL)) + 147.13 (甘草皂苷), E (%) = 26.86 × Log(Dose(mg/mL)) + 52.65 (桔梗皂苷)。

**3.2 等高线法评价桔梗、甘草的相互作用** 从图 3 中可以看出, 随着甘草剂量的增加, 二药的作用从相加(40: 1)到拮抗(20: 1), 再到相加(1: 1, 10: 1), 最后到协同(1: 80, 1: 40, 1: 20, 1: 10)。表明在桔梗、甘草合用比例小于 1: 10 时应用, 具有较好的协同作用。

**3.3 改良的等高线法评价桔梗、甘草的相互作用** 软件“Pharmtoolspro (The MacCary Group, Inc)”是根据药物相互作用的经典著作《Drug synergism and dose-effect data analysis》的原理编制的软件, 可以运用相互作用指数(Interaction Index)  $\alpha$  进行协同或拮抗程度的定量化计算。若  $\alpha > 1$  则说明二药拮抗, 若  $\alpha = 1$  说明二药相加, 若  $\alpha < 1$  则说明二药协同。从图 4 中可以看出, 桔梗和甘草在 40: 1 配比时相加 ( $\alpha - SE_{\alpha} < 1$ ;  $\alpha + SE_{\alpha} > 1$ ), 增加甘草的量, 20: 1 时二药拮抗 ( $\alpha$

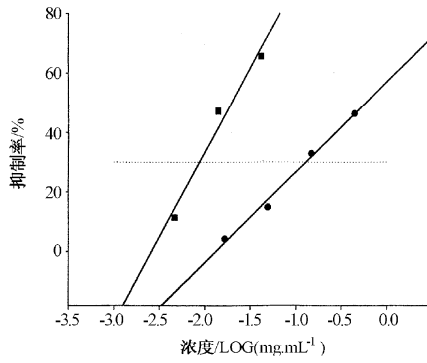


图 2A 桔梗和甘草单药的量效曲线

■—甘草皂苷; ●—桔梗皂苷; .....30% 效应线

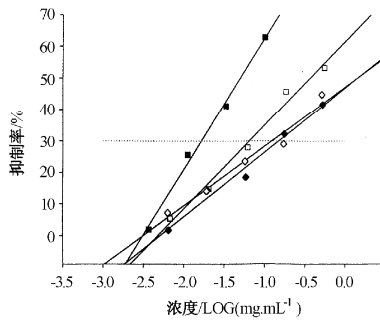


图 2B 桔梗大于甘草的比例时的量效曲线(桔梗:甘草)

■1:1; □10:1; ◆20:1; ◇40:1; .....30% 效应线

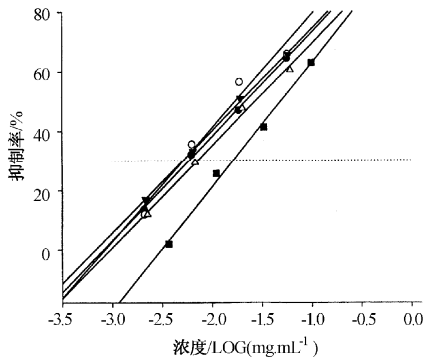


图 2C 甘草大于桔梗的比例时的量效曲线(桔梗:甘草)

●1:80; ○1:40; ▼1:20; △1:10; ■1:1; .....30% 效应线

图 2 桔梗、甘草及它们之间不同配比  
(桔梗比甘草)的对数量效关系

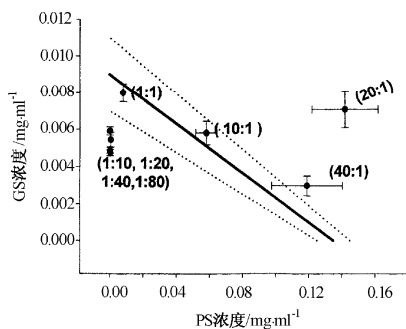


图 3 桔梗、甘草合用的等高线图

$\pm SE_{\alpha} > 1$ ), 1:10, 1:1, 10:1 时呈现相加( $\alpha - SE_{\alpha} < 1$ ;  $\alpha + SE_{\alpha} > 1$ ), 1:40 和 1:20 时二药协同( $\alpha \pm SE_{\alpha} < 1$ ), 1:80 二药又恢复相加( $\alpha - SE_{\alpha} < 1$ ;  $\alpha + SE_{\alpha} > 1$ )。

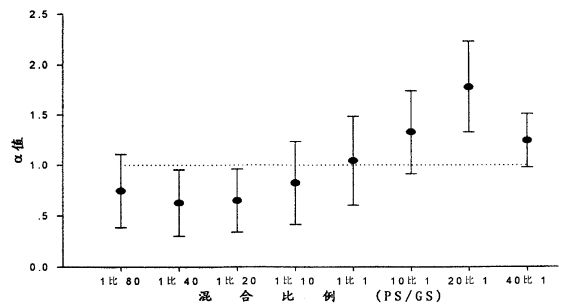


图 4  $\alpha$  值随桔梗和甘草配比的变化而发生变化

.....—二药相加效应( $\alpha = 1$ )

与等高线法评价的结论基本相同,在桔梗、甘草合用比例小于 1:20 时具有较好的协同作用。

#### 4 讨论

国内外文献普遍是以传统的试管法测定药物对 TYR 的抑制活性<sup>[6]</sup>。作为筛选模型,这种操作相对复杂,且由于所建立的方法未进行反应终止,因此要求各管光密度测定时其反应时间必须一致。本实验将反应从试管转移到了 96 孔板,不仅简化了操作,节省了试剂,更重要的是可以保证各孔反应时间的一致,从而大大增加了试验的准确性。

从以前的文献报道看,甘草对 TYR 抑制作用比较肯定<sup>[5]</sup>,但桔梗对 TYR 活性的影响报道并不一致。弓晓杰等人发现桔梗水提物在 1 mg/mL 的浓度明显抑制 TYR 活性<sup>[9]</sup>,而雷铁池等人的研究却显示其无明显的作用<sup>[2]</sup>,通过文献分析,发现在这两篇报道中,酶浓度差距较大。因此,我们选用了特定的桔梗皂苷浓度,不同的 TYR 浓度进行实验。如图 5 所示随着酶浓度升高,同剂量的药物的 TYR 抑制率降低,当酶浓度高于一定水平后,桔梗皂苷对 TYR 活性已基本没有明显的影响了。因此,在考察药物 TYR 抑制强度时,选择适当酶浓度是必须的。

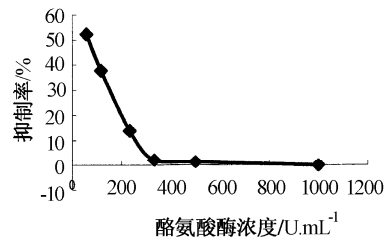


图 5 酪氨酸酶浓度和药物抑制率的关系

本文采用国外评价合并用药最常用的等高线法及改良等高线法。可以发现,两种评价方法得出了基本相同的结论。即桔甘配比在 1:40 到 40:1 的剂量范围内,其相互作用从协同经过相加逐渐变为拮抗,最后又回到相加。但是,也应当看到,在桔甘配比 1:10 及 1:80 两点上,两种评价方法的判断结果不尽相同。

等高线法判断的结果是协同,而改良的等高线法判断的结果却是相加。表明在处于两种合并用药效应“临界”状态的配比,可能因所采用的评价方法不同而不同。因此,建议对中药有效部位合并用药评价,应采用多配比的研究,从中发现药物相互作用随其配比改变而表现出的变化规律,这种变化规律不因采用的评价方法而改变。而对单一配比合并效应的评价,最好采取两种或两种以上的评价方法,这样可以得到更加科学准确的结论。

### [参考文献]

- [ 1 ] 邹先伟,蒋志胜.植物源酪氨酸酶抑制剂研究进展 [ J ].中草药,2004,25(6):702-706.
- [ 2 ] 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.
- [ 3 ] Greco WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a

critical review from a response surface perspective [ J ]. *Pharmacol Rev*, 1995, 47(2): 348-351.

- [ 4 ] Tallarida RJ. Drug Synergism: its detection and applications [ J ]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298(3): 865-872.
- [ 5 ] Ohad N, Jacob V, Ramadan M *et al*. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots [ J ]. *J Agr Food Chem*, 2003, 51(5), 1201-1207.
- [ 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): 153-156.
- [ 7 ] Berenbaum MC. What is synergy [ J ]. *Pharmacol Rev*, 1989, 41(2): 93-141.
- [ 8 ] Tallarida RJ. Drug synergism and dose-effect analysis[ M ]. Chapman & Hall/CRC, 2000: 57-89.
- [ 9 ] 弓晓杰,陈丽荣,孙印石,等.桔梗中抑制酪氨酸酶活性成分的研究[ J ].中药材,2004,27(4):257-259.