

文章编号: 1000-5862(2012)01-0005-03

# 应用于粉刺治疗的植物单体 5 $\alpha$ -还原酶抑制剂活性筛选

付时雨, 孙常磊, 任宇红\*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

**摘要:** 建立一种简单的 5 $\alpha$ -还原酶抑制剂体外筛选模型, 用于 20 种植物单体物质的 5 $\alpha$ -还原酶抑制活性检测, 以寻求对粉刺治疗有效的药物. 以睾酮为底物、NADPH 为供氢体, 对 5 $\alpha$ -还原酶体外测定体系进行了优化, 并测定了 20 种中草药标准品的 5 $\alpha$ -还原酶抑制活性. 确定了 5 $\alpha$ -还原酶反应的最适底物浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$ , 最适反应温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ , 最适反应 pH 值为 6.5. 确定了知母总苷、连翘素、蛇麻酮对 5 $\alpha$ -还原酶有抑制作用, 其半数抑制常数( $IC_{50}$ )分别为 12.4、20.8 和 45.6  $\mu\text{g/mL}$ . 知母皂、连翘素和蛇麻酮在抗粉刺领域具有潜在应用价值.

**关键词:** 粉刺; 5 $\alpha$ -还原酶抑制剂; 植物单体

**中图分类号:** Q 935

**文献标志码:** A

粉刺是一种复杂的、慢性的和普遍性的皮脂腺功能紊乱疾病, 主要发生在青少年的脸部、前胸和后背. 近年来, 粉刺的发病机理已经被发现了很多, 但是还是有一些机理尚未明确. 简单地说, 粉刺发生的主要机理有: 雄激素分泌过多引起的皮脂腺功能亢进; 角质化细胞增生过度堵塞毛囊; 厌氧细菌尤其是痤疮丙酸杆菌的大量繁殖; 炎症的产生<sup>[1]</sup>. 近年来, 通过研究发现, 粉刺的产生与过氧化物酶体增生物受体(PPAR)、P物质、细胞因子、金属蛋白酶等都有重要的关系<sup>[2]</sup>.

雄激素分泌过多引起的皮脂腺功能亢进是粉刺产生的一个重要原因, 睾酮(T), 尤其二氢睾酮(DHT)是刺激粉刺产生的主要雄性激素. 甾醇硫酸脱氢酶、3 $\beta$ -羟基甾醇脱氢酶(3 $\beta$ -HSD)、细胞色素P450C19和5 $\alpha$ -还原酶等都在T和DHT生物合成中起了重要作用, 而5 $\alpha$ -还原酶则是T直接向DHT合成的催化酶<sup>[3]</sup>.

5 $\alpha$ -还原酶是一种依赖还原型辅酶 I (NADPH) 催化T生成DHT的还原酶. NADPH作为5 $\alpha$ -还原酶的供氢体起到了催化作用, 催化反应使NADPH还原为NADP<sup>+</sup>, 使T转化为DHT, 氢离子传递到T空间位阻较小的 $\alpha$ 面, 形成更具活性的雄激素DHT<sup>[4]</sup>. 因此, 预防和治疗粉刺的生成, 抑制5 $\alpha$ -还原酶的活性非常重要.

## 1 材料

### 1.1 动物

雌性 SD 大鼠, 体质量(300 $\pm$ 30)g, 购买于上海实验动物研究中心.

### 1.2 仪器与试剂

UV2300 紫外分光光度计、超高速离心机、NADPH 四钠盐(购于 sigma 公司, 以 0.1 mol/L pH=10.0 Tris 缓冲液配置)、非那雄胺(购于 sigma 公司, 以无水乙醇配置)、睾酮(购于 sigma 公司, 以无水乙醇配置)、二硫苏糖醇等, 其它试剂均为分析纯.

### 1.3 中草药标准品

穿心莲内酯、知母总苷、连翘素、蛇麻酮、芹菜素、没食子酸、阿魏酸、蛇床子素、雷公藤甲素、山奈酚、金丝桃苷、木犀草素、黄芩苷、柚皮苷、丹皮酚、橙皮苷、大黄素、植酸、甘草酸、甘草次酸购自中国药科大学植物研究所, 质量分数均大于 98.0%, 用乙醇溶液配置成 1 mg/mL 贮存液, 临用前稀释.

## 2 方法

### 2.1 5 $\alpha$ -还原酶的制备

取清洁级雌性 SD 大鼠 3 只, 禁食过夜后脱颈

收稿日期: 2011-11-09

基金项目: 国家自然科学基金(21076079)资助项目.

作者简介: 任宇红(1967-), 男, 江西上饶人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事生物化工、天然产物活性评价研究.

处死, 0℃下取出肝脏称量剪碎. 用预冷的缓冲液(0.32 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 20 mmol/L 磷酸钠, pH 值为 6.5)在玻璃匀浆器制成 1:4 匀浆, 在 0℃下, 依次做 10 000 g、15 min 和 100 000 g、1 h 离心, 制备出 5 $\alpha$ -还原酶悬液, 分装, -80℃冰箱保存<sup>[5]</sup>.

## 2.2 5 $\alpha$ -还原酶活性测定体系优化

NADPH 作为 5 $\alpha$ -还原酶催化 T 生成 DHT 的供氢体而起到催化作用, NADPH 在 340 nm 处有最大光吸收, 在反应过程中不断消耗, 故可根据 NADPH 的吸光值间接反应酶活性. 设置空白对照组(T+磷酸盐缓冲液+NADPH+5 $\alpha$ -还原酶)、阳性对照组(T+磷酸盐缓冲液+NADPH+5 $\alpha$ -还原酶+非那雄胺), 在 340 nm 下 10 min 内, 通过 UV2300 对 NADPH 吸光值的时间扫描, 对底物浓度、温度、pH 值对酶活性的影响进行优化, 确立最佳酶反应体系.

## 2.3 药物活性测定

设置空白组(T+磷酸盐缓冲液+NADPH+5 $\alpha$ -还原酶)、阳性对照组(T+磷酸盐缓冲液+NADPH+5 $\alpha$ -还原酶+非那雄胺)、药物组(T+磷酸盐缓冲液+NADPH+5 $\alpha$ -还原酶+药物)分别测定待测药物对 5 $\alpha$ -还原酶的抑制作用及有抑制活性药物的 IC<sub>50</sub>(半数抑制常数).

# 3 结果

## 3.1 底物浓度对 5 $\alpha$ -还原酶活性的影响

在底物浓度为 0~20  $\mu\text{mol/L}$  内, 酶反应速率逐渐增大. 当底物浓度增加到 20  $\mu\text{mol/L}$  以后, 反应速率逐渐趋于稳定. 因此, 其最适底物浓度>20  $\mu\text{mol/L}$  (见图 1), 本实验采用 25  $\mu\text{mol/L}$  为其最适底物浓度.

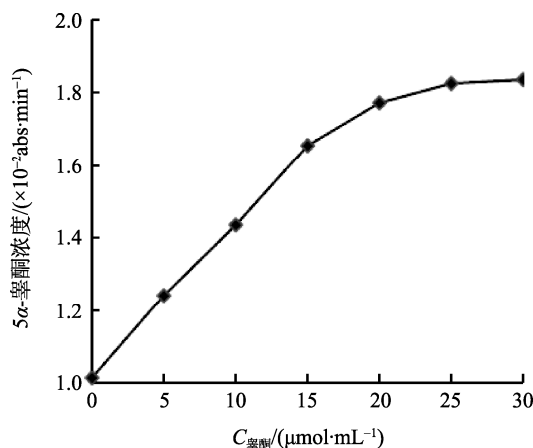


图 1 底物浓度对 5 $\alpha$ -还原酶活性的影响

## 3.2 温度对 5 $\alpha$ -还原酶活性的影响

在 27~42℃实验点范围内, 酶反应速率在 37℃最大(见图 2). 因此, 本实验采用 37℃作为 5 $\alpha$ -还原酶反应最适温度.

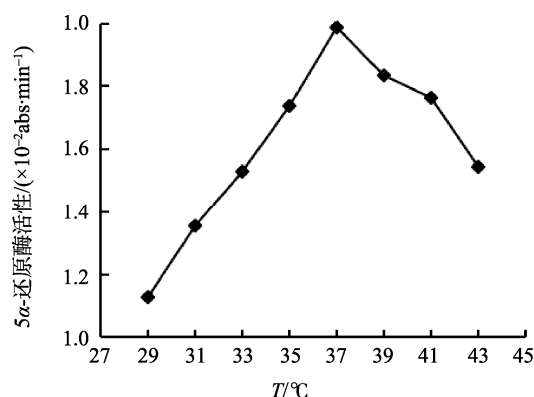


图 2 温度对 5 $\alpha$ -还原酶活性的影响

## 3.3 pH 值对 5 $\alpha$ -还原酶活性的影响

在 pH 值为 5.0~7.5 范围内, 酶反应速率在 pH 值为 6.5 时最大(见图 3). 因此, 本实验采用 pH 值为 6.5 作为 5 $\alpha$ -还原酶反应的最适 pH 值.

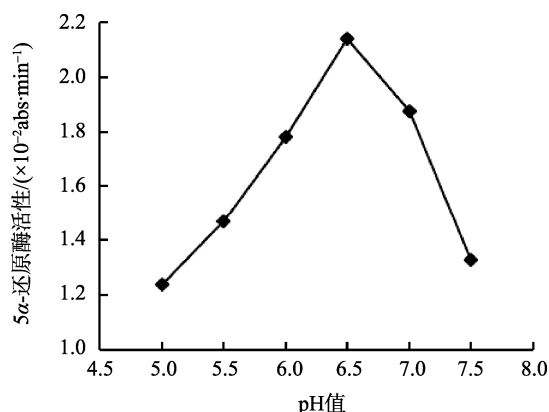


图 3 pH 值对 5 $\alpha$ -还原酶活性的影响

## 3.4 反应体系的确定

通过实验对不同底物浓度、温度和 pH 值进行了 5 $\alpha$ -还原酶活性测定, 确立的 5 $\alpha$ -还原酶反应体系如表 1 所示.

表 1 5 $\alpha$ -还原酶反应体系

	加入量/ $\mu\text{L}$	终浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
5 $\alpha$ -还原酶液	100	-
睾酮	50	25
NADPH	100	100
待测药物	50	-
pH 值为 6.5 的磷酸盐缓冲液	2 200	-

### 3.5 药物的 5 $\alpha$ -还原酶活性抑制 $IC_{50}$

通过对 20 种中药标准品的测定, 发现知母皂苷、连翘脂素和蛇麻酮等具有 5 $\alpha$ -还原酶活性抑制作用, 其  $IC_{50}$  分别为 12.4、20.8、45.6  $\mu\text{g/mL}$ , 结果见表 2。

表 2 5 $\alpha$ -还原酶活性抑制药物的  $IC_{50}$

药物	$IC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
非那雄胺	0.053
知母总苷	12.400
连翘素	20.800
蛇麻酮	45.600

## 4 讨论

5 $\alpha$ -还原酶催化 T 生成 DHT 的催化过程需要 NADPH 的参与, 且 NADPH 在 340 nm 下有光吸收, 随着反应的进行, NADPH 的吸光值逐渐下降<sup>[6]</sup>, 因此, 本文利用分光光度计法检测 NADPH 的下降量间接反应 5 $\alpha$ -还原酶的活性。利用来源于雌性 SD 大鼠内的 5 $\alpha$ -还原酶粗酶, 通过对底物浓度、反应温度、反应 pH 值的优化, 获得了最佳的反应条件。传统筛选 5 $\alpha$ -还原酶抑制剂的方法主要为同位素标记法, 通过标记底物并采用放射性免疫手段, 定量分析底物消耗量而确定 5 $\alpha$ -还原酶活性<sup>[7]</sup>。但这些方法因操作过程复杂, 而且受环境因素和设备的制约, 与同位素测定 5 $\alpha$ -还原酶活性相比, 该方法操作简单, 成本低廉, 且能避免因同位素造成的环境污染, 适用于高通量的 5 $\alpha$ -还原酶抑制剂的筛选。

应用优化后的模型对 20 种中药单体物质进行了筛选, 结果显示知母总苷、连翘脂素和蛇麻酮对 5 $\alpha$ -还原酶具有抑制作用。知母提取物抑制 5 $\alpha$ -还原酶活性已有报道<sup>[8]</sup>, 且已有 2 种单体分离出来, 知母总苷

中可能含有这 2 种单体的苷元。连翘酯素、蛇麻酮抑制 5 $\alpha$ -还原酶的活性尚未见文献报道, 但连翘和啤酒花提取物常见于治疗粉刺复方的应用。

与非那雄胺相比, 知母总苷、连翘酯素、蛇麻酮等单体物质的 5 $\alpha$ -还原酶活性抑制  $IC_{50}$  都比较高, 可能跟这些单体的结构和 5 $\alpha$ -还原酶催化特定底物的  $K_m$  值不同有关。

## 5 参考文献

- [1] Masahiko Toyoda, Masaaki Morohashi. Pathogenesis of acne [J]. Med Electron Microsc, 2001, 34: 29-40.
- [2] Henry Pawin, Claire Beylot. Physiopathology of acne vulgaris: recent data, new understanding of the treatments [J]. Eur J Dermatol, 2004, 14: 4-12.
- [3] Chen Wenchieh, Diane Thiboutot, Christos C Zouboulisw. Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives [J]. The Journal of Investigative Dermatology, 2002, 119: 992-1007.
- [4] Thiboutot D, Harris G, Iles V, et al. Activity of the type 5 $\alpha$  reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin [J]. Invest Dermatol, 1995, 105: 209-214.
- [5] Liu Jie, Kuniyoshi Shimizu, Fumiko Konishi. Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of Ganoderma lucidum [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1691-1696
- [6] 孙祖越, 吴建辉, 屠曾宏. 一个简捷的甾体 5 $\alpha$ -还原酶抑制剂体外筛选模型 [J]. 上海实验动物科学, 2002, 22(4): 204-208.
- [7] Fredrick W George. Androgen metabolism in the prostate of the finasteride-treated, adult rat: A possible explanation for the differential action of testosterone and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone during development of the male urogenital tract [J]. Endocrinology, 2007, 138: 871-877.
- [8] Hideaki Matsuda, Noriko Sato, Miho Yamazaki. Testosterone 5 $\alpha$ -reductase inhibitory active constituents from anemarrhenae rhizoma [J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24: 586-587.

## The Screening of 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitor from Botanic Substance for Anti-Acnes

FU Shi-yu, SUN Chang-lei, REN Yu-hong\*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** Establishing a simple and easy method to screen 5 $\alpha$ -reductase inhibitor from Chinese medicinal herbs active constituents in vitro for cure of acnes in this study. The method was optimized with testosterone as substrate and NADPH as proton donor. The optimal 5 $\alpha$ -reductase reaction conditions are: the concentration of substrate is 25  $\mu\text{mol/L}$ , the temperature is at 37 $^{\circ}\text{C}$  and pH is at 6.5. The method was used for screening 20 botanic substances from Chinese medicinal herbs. The results showed that the  $IC_{50}$  of 5 $\alpha$ -reductase is 12.4, 20.8 and 45.6  $\mu\text{g/mL}$ , which corresponding Rhizoma Anemarrhenae total glycosides, forsythin and lupulone, respectively. Rhizoma Anemarrhenae total glycosides, forsythin and lupulone may have potential value for curing acnes.

**Key words:** acnes; 5 $\alpha$ -reductase inhibitor; botanic substance

(责任编辑: 刘显亮)