

补骨脂醇提物 UPLC-Q-TOF-MS 化学成分分析及促黑色素生成作用机制初探

何婷¹, 王银洁^{2*}, 詹莹莹³, 莫婷¹, 杨丽娟¹, 杨森¹

¹宁夏回族医药研究所, 银川 750021; ²宁夏医科大学附属银川市中医医院, 银川 750001;

³广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006

摘要: 分析补骨脂醇提物 (Psoraleae Fructus alcohol extract, PFE) 化学成分并探讨其促黑色素生成作用机制。采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 对 PFE 化学成分进行鉴定; 观察 PFE 对斑马鱼黑色素生成的影响; 通过实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 考察 PFE、补骨脂素和异补骨脂素对小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 中酪氨酸酶 (tyrosinase, Tyr)、酪氨酸酶相关蛋白 1 (Tyr-related protein 1, Tyrp1) 和相关蛋白 2 (Tyr-related protein 2, Tyrp2) mRNA 表达的影响。结果在 PFE 中共鉴定 47 个化学成分, 其中黄酮类 27 个, 香豆素类 10 个, 单萜酚类 8 个和其他类 2 个; 发现 PFE 作用斑马鱼 18 hpf (受精后小时, hours post fertilization) 后, 能明显增加其体内黑色素水平; qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, PFE 能显著增加 Tyr 和 Tyrp2 mRNA 的表达, 其他给药组均能不同程度地增加 Tyr、Tyrp1 和 Tyrp2 mRNA 的表达。

关键词: 补骨脂醇提物; 黑色素; UPLC-Q-TOF-MS; 补骨脂素; 异补骨脂素

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880 (2024) 6-0968-15

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.6.007

Chemical composition analysis of Psoraleae Fructus alcohol extract by UPLC-Q-TOF-MS and its mechanisms of promoting melanogenesis

HE Ting¹, WANG Yin-jie^{2*}, ZHAN Ying-ying³, MO Ting¹, YANG Li-juan¹, YANG Sen¹

¹Ningxia Hui Medicine Research Institute, Yinchuan 750021, China; ²Yinchuan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to the Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, China;

³The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: This study aims to analyze the chemical constituents of Psoraleae Fructus ethanol extract (PFE) and explore its mechanism of promoting melanin production. The chemical constituents of PFE were analyzed and identified by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) technology. Zebrafish was used to investigate the effects of PFE on the melanogenesis. The regulation effects of PFE, psoralen and isopsoralen on the mRNA expression of tyrosinase (Tyr), Tyr-related protein 1 (Tyrp1) and Tyr-related protein 2 (Tyrp2) in mouse melanoma cells (B16-F10) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). A total of 47 compounds were identified in PFE extract, including 27 flavonoids, ten coumarins, eight monoterpenoids and two other compounds. Meanwhile, the Zebrafish experiment results showed that PFE could significantly increase the melanin level in zebrafish after 18 hpf (hours post fertilization). The results of qRT-PCR showed that compared with the control group, PFE could significantly increase the mRNA expression of Tyr and Tyrp2, while other groups exhibited up-regulation effects on the mRNA expression of Tyr, Tyrp1 and Tyrp2 in varying degrees.

Key words: Psoraleae Fructus alcohol extract; melanin; UPLC-Q-TOF-MS; psoralen; isopsoralen

收稿日期: 2023-11-07

接受日期: 2024-04-19

基金项目: 宁夏自然科学基金 (2023AAC03717); 宁夏青年科技人才托举工程项目 (2020-78); 宁夏回族自治区卫生健康委员会 2023 年度科研项目 (2023-NWKYP-038)

* 通信作者 Tel: 86-951-5058083; E-mail: wyjie41@163.com

白癜风是一种临床常见的局限性色素脱失性皮肤病, 在世界范围内的患病率约为 0.5% ~ 2%, 易诊难治, 发病率高, 病程长, 对患者的身心健康带来消极的影响^[1]。补骨脂为豆科植物补骨脂 (*Psoralea*

corylifolia L.) 的干燥成熟果实, 中医临床主要用于治疗肾阳不足所致阳痿遗精、腰膝冷痛、肾虚作喘、外用也可治疗白癜风、斑秃^[2]。不仅我国有使用补骨脂治疗白癜风的历史, 在东南亚诸国如日本、韩国、印度等亦有记载(称“Babchi seeds”“Bakuchi powder”“Bakuchiol”等)^[3]。补骨脂治疗白癜风的剂型也多种多样, 包括煎汤、酊剂和注射液(国药准字 Z41022361)。尽管补骨脂治疗白癜风的文献记载较多, 但其治疗白癜风的作用机制和物质基础都尚未完全明确。因此, 本文采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术, 研究补骨脂醇提物(*Psoraleae Fructus alcohol extract*, PFE)的化学成分; 通过开展斑马鱼促黑色素实验, 考察 PFE 促黑色素生成作用, 再运用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)法检测 PFE、补骨脂素(psoralen, PSO) 和异补骨脂素(isopsoralen, IPSO) 对小鼠黑色素瘤细胞(B16-F10)细胞中酪氨酸酶(tyrosinase, Tyr)、酪氨酸酶相关蛋白 1(Tyr-related protein 1, Tyrp1) 和相关蛋白 2(Tyr-related protein 2, Tyrp2)的 mRNA 表达水平, 为进一步寻找治疗白癜风的活性化合物和作用靶点奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

盐补骨脂(批号 2203286, 产地: 江西), 购于宁夏明德中药饮片有限公司, 经杨丽娟副主任药师鉴定为豆科植物补骨脂(*Psoralea corylifolia* L.) 的干燥成熟果实。

补骨脂素对照品(批号: RP190515)、异补骨脂素对照品(批号: RP190423)、新补骨脂异黄酮对照品(批号: RP190226)、补骨脂甲素对照品(批号: RP200309)、补骨脂宁对照品(批号: RP200309)、补骨脂定对照品(批号: RP191212)、补骨脂乙素对照品(批号: RP191230), 对照品(成都麦德生科技有限公司); 甲酸(色谱级, 上海霍尼韦尔贸易有限公司, 批号: H158A); 甲醇(色谱级, LiChrosolv, 批号: I1077207008); 乙腈(色谱级, LiChrosolv, 批号: JB079830); 1-苯基-2-硫脲(PTU)(Sigma-Aldrich, 纯度 $\geq 98\%$, 批号: BCBT2428); 屈臣氏蒸馏水; 小鼠黑色素瘤细胞系 B16-F10(北纳生物, 批号: BNCC 100309); AB 系野生型斑马鱼(中国斑马鱼资源中心); 胎牛血清(美国 Sigma 公司, 批号: F8318)、胰蛋白酶(大连美仑生物技术有限公司, 批号: MA0233); 青-链霉素(大连美仑生物技术有限公司,

批号: MA0110); RPMI 1640(大连美仑生物技术有限公司, 批号: MA0215); mRNA 反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司, 批号: R223-01); $2 \times$ TS-INGKE[®] Master qPCR Mix 试剂盒(北京擎科生物科技有限公司, 批号: TSE501); 引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备

精密称取各对照品适量, 配制成药 1.00 mg/mL 单一对照品储备液, 精密吸取适量储备液, 配制浓度分别为补骨脂素 140.3 $\mu\text{g/mL}$ 、异补骨脂素 141.7 $\mu\text{g/mL}$ 、新补骨脂异黄酮 138.9 $\mu\text{g/mL}$ 、补骨脂甲素 140.5 $\mu\text{g/mL}$ 、补骨脂宁 139.1 $\mu\text{g/mL}$ 、补骨脂定 141.8 $\mu\text{g/mL}$ 、补骨脂乙素 141.9 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 过 0.22 μm 的微孔滤膜, 备用。

1.2.2 供试品溶液的制备

取盐补骨脂适量, 粉碎至粗粉, 精密称取盐补骨脂粗粉 100 g, 用 65% 乙醇溶液, 按《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)(通则 0189)渗滤法进行提取, 滤液终体积为 1500 mL。渗滤液采用旋转蒸发仪进行浓缩, 浓缩至约 60~80 mL 时, 转移至蒸发皿, 放置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 24 h。将冷冻后的样品转移至真空冷冻干燥机冷冻干燥 72 h, 回收样品, 计算提取率为 27.13%。

1.2.3 色谱条件

Hypersil GOLD AQ C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μm); 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 4 μL ; 流动相: 0.1% 甲酸乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱程序: 0~1 min, 95% B; 1~2 min, 95% \rightarrow 90% B; 2~8 min, 90% \rightarrow 75% B; 8~15 min, 75% \rightarrow 65% B; 15~20 min, 65% \rightarrow 55% B; 20~22 min, 55% \rightarrow 5% B; 22~23 min, 5% \rightarrow 0% B; 23~24 min, 0% \rightarrow 95% B; 24~25 min, 95% B。

1.2.4 质谱条件

离子源为电喷雾离子源, 采用信息关联模式, 进行正、负离子扫描; 喷雾电压: 5500/4500 V, 去簇电压: 100/-100 V; 去溶剂温度: 500 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气: N_2 , 雾化气压: 55 psi, 辅助加热气压: 55 psi, 气帘气压: 35 psi; 质量扫描范围: 100~2 000 Da; 碰撞能量: 45/-45 eV; 扩展碰撞器能量为 10/15 eV。

1.2.5 质谱数据分析

采用“1.2.3”项和“1.2.4”项下的条件对制备的对照品溶液和 PFE 溶液进行分析, 采集质谱数

据,利用 Peakview 1.5 软件(AB Sciex)对质谱数据进行查看,通过对比对照品质谱信息,结合中英文文献及 CFM-ID 4.0 数据库中二级碎片,参考相关裂解规律,对 PFE 的化学成分进行鉴定。

1.2.6 斑马鱼实验

AB 系野生型斑马鱼,每天光照 14 h、黑暗 10 h,早晚各喂食一次。胚胎置于胚胎培养液中,于 28.5 °C 的光照培养箱里培养约 9 hpf (hours post fertilization, 受精后小时),彻底换液清洗胚胎,转移至 6 孔板中,每孔放 30 枚胚胎。分为 4 组,分别为空白对照组(Con)、1-苯基-2-硫脲组(PTU)、1-苯基-2-硫脲-胚胎组织培养液组(PTU-W)、1-苯基-2-硫脲-PFE 组(PTU-PFE)。Con 组:9~72 hpf 使用胚胎组织培养液进行培养;PTU 组:9~72 hpf 使用含阳性药 PTU (200 $\mu\text{mol/L}$) 的胚胎组织培养液进行培养;PTU-W 组:9~54 hpf 使用含阳性药 PTU 的胚胎组织培养液培养,54~72 hpf 更换为新鲜的胚胎组织培养液进行培养;PTU-PFE 组:9~54 hpf 使用含阳性药 PTU 的胚胎组织培养液培养,54~72 hpf 更换为含 PFE (10 $\mu\text{g/mL}$) 的胚胎组织培养液进行培养;在 72 hpf 时,观察斑马鱼胚胎状态及黑色素变化,并拍照^[4]。

1.2.7 细胞培养及药物分组处理

B16-F10 细胞使用完全培养基(90% RPMI 1640 + 10% 胎牛血清 + 1% 青-链霉素)进行培养,于 37 °C,5% CO_2 恒温培养箱中培养。待细胞汇合度达到 90% 时进行传代并接种至 6 孔板。当 6 孔板中的细胞合度达到 70%~80% 时,分别在 6 孔板中加入 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 PFE、PSO 和 IPSO,24 h 后收集细胞并提取细胞 RNA, qRT-PCR 检测 *Tyr*、*Tyrrp1* 和 *Tyrrp2* mRNA 的变化情况。使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物具体信息见表 1。以 *MM-ACTB*

为内参基因,反应条件为:95 °C 5 min,95 °C 5 s,60 °C 31 s,40 个循环。基因相对表达量计算:相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ 目标基因 - ΔCt 内参基因),目标基因 ΔCt 值 = Ct 样品 - Ct 对照,内参基因 ΔCt 值 = Ct 样品 - Ct 对照。

表 1 *Tyr*、*Tyrrp1* 和 *Tyrrp2* 基因引物序列

Table 1 The gene primer sequences of *Tyr*, *Tyrrp1* and *Tyrrp2*

基因 Gene	引物序列(5'→3') Sequence(5'→3')
<i>Tyr</i>	F: CAGGCTCCCATCTTCAGCAGAT R: ATCCCTGTGACTGGACTGGCAA
<i>Tyrrp1</i>	F: AGCCACAGGATGCACTCAGTG R: GCAGGGTCATATTTTCCCGTGG
<i>Tyrrp2</i>	F: GCAAGATTGCCTGTCTCTCCAG R: CTTGAGAGTCCAGTGTTCCTC

1.2.8 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析,计量资料符合正态分布所有数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,不符合正态分布采用 $M(P25, P75)$ 。计量资料呈正态并进行方差齐性检验,两组间比较,方差齐,采用独立样本 t 检验,方差不齐,用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PFE 化学成分鉴定

采用 UPLC-Q-TOF-MS 对对照品和 PFE 溶液进行分析,正离子模式下对照品提取离子图见图 1,正、负离子模式下补骨脂样品溶液总离子图见图 2,通过与文献^[5-10]、CFM-ID 4.0 数据库以及对对照品的数据信息对比,在 PFE 样品溶液中共推测鉴定到 47 个化学成分,其中黄酮类 27 个,香豆素类 10 个,单萜酚类 8 个和其他类 2 个,详细质谱信息见表 2,并选取每种类型中的代表性成分进行裂解规律分析。

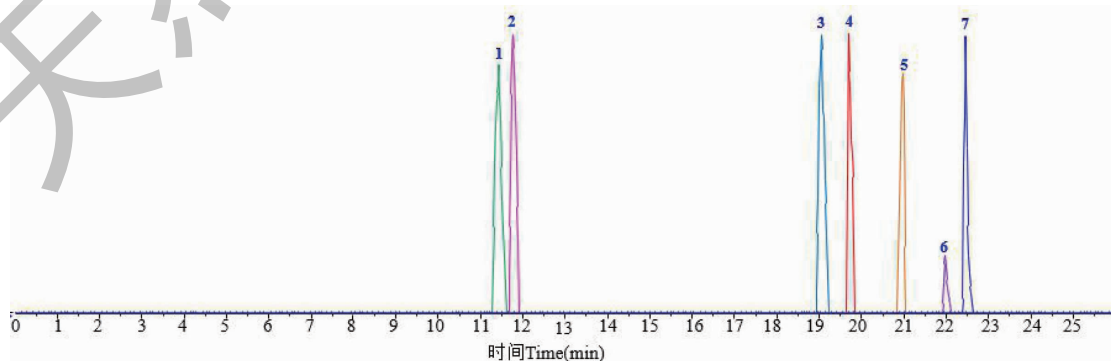


图 1 正离子模式下对照品溶液提取离子流图

Fig. 1 Extraction ion chromatogram of reference samples in positive ion mode

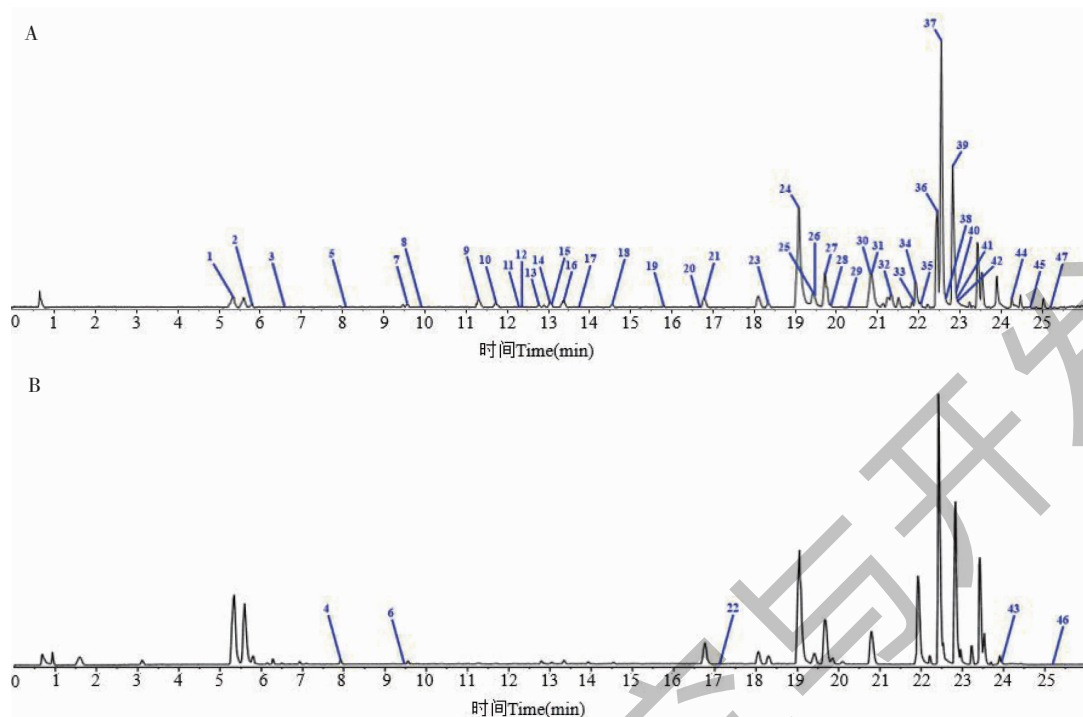


图 2 正(A)、负(B)离子模式下PFE溶液总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of PFE in positive(A) and negative(B) ion mode

表 2 PFE 化学成分的UPLC-Q-TOF-MS 鉴定

Table 2 Identification of compounds in PFE by UPLC-Q-TOF-MS

序号 No.	t_R (min)	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子 MS/MS fragment ion	分子式 Molecular formula	化合物 Compound
1	5.38	$[M+H]^+$	367.102 6	367.102 4	0.69	367.102 6 $[M+H]^+$ 、 205.051 6 $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$ 、 187.037 6 $[M+H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^+$ 、 143.049 4 $[M+H-C_6H_{10}O_5-H_2O-CHO_2]^+$ 、 115.056 8 $[M+H-C_6H_{10}O_5-H_2O-CHO_2-CO]^+$	$C_{17}H_{18}O_9$	补骨脂苷 Psoralenside
2	5.81	$[M+H]^+$	417.118 2	417.118 0	0.50	417.118 2 $[M+H]^+$ 、 255.064 4 $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$ 、 227.069 7 $[M+H-C_6H_{10}O_5-CO]^+$ 、 199.075 2 $[M+H-C_6H_{10}O_5-CO-CO]^+$ 、 137.023 3 $[M+H-C_6H_{10}O_5-C_8H_6O]^+$	$C_{21}H_{20}O_9$	大豆苷 Daidzin
3	6.62	$[M+H]^+$	563.175 8	563.175 9	-0.19	563.175 8 $[M+H]^+$ 、 255.064 9 $[M+H-C_{12}H_{20}O_9]^+$ 、 227.069 5 $[M+H-C_{12}H_{20}O_9-CO]^+$ 、 199.073 5 $[M+H-C_{12}H_{20}O_9-CO-CO]^+$	$C_{27}H_{30}O_{13}$	Bavadin
4	7.93	$[M-H]^-$	447.092 9	447.093 3	-0.93	447.093 4 $[M-H]^-$ 、 285.039 3 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 、 284.031 8 $[M-H-C_6H_{11}O_5]^-$ 、 257.046 1 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO]^-$ 、 256.037 3 $[M-H-C_6H_{11}O_5-CO]^-$ 、 255.029 6 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO-2H]^-$ 、 227.034 9 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO-2H-CO]^-$	$C_{21}H_{20}O_{11}$	紫云英苷 Astragalgin

续表 2 (Continued Tab. 2)

序号 No.	t_R (min)	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子 MS/MS fragment ion	分子式 Molecular formula	化合物 Compound
5	8.13	$[M+H]^+$	271.060 2	271.060 1	0.24	271.059 5 $[M+H]^+$ 、 253.050 2 $[M+H-H_2O]^+$ 、 243.064 6 $[M+H-CO]^+$ 、 225.053 3 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 215.069 7 $[M+H-CO-CO]^+$ 、 197.058 9 $[M+H-H_2O-CO-CO]^+$ 、 187.072 8 $[M+H-CO-CO-CO]^+$ 、 169.064 3 $[M+H-H_2O-CO-CO-CO]^+$	$C_{15}H_{10}O_5$	7,2',4'-Trihydroxy- 3-aryl coumarin
6	9.48	$[M-H]^-$	353.102 6	353.103 1	-1.19	351.989 1 $[M-H]^-$ 、 335.092 7 $[M-H-H_2O]^-$ 、 251.034 7 $[M-H-C_5H_{10}O_2]^-$ 、 223.038 4 $[M-H-C_5H_{10}O_2-CO]^-$ 、 135.008 8 $[M-H-C_{13}H_{14}O_3]^-$	$C_{20}H_{18}O_6$	Corylifol E
7	9.60	$[M+H]^+$	255.065 0	255.065 2	-0.89	255.065 4 $[M+H]^+$ 、 227.070 5 $[M+H-CO]^+$ 、 199.075 3 $[M+H-CO-CO]^+$ 、 137.024 2 $[M+H-C_8H_6O]^+$	$C_{15}H_{10}O_4$	大豆苷元 Daidzein
8	9.94	$[M+H]^+$	285.075 8	285.075 8	0.12	285.074 5 $[M+H]^+$ 、 270.050 9 $[M+H-CH_3]^+$ 、 257.050 9 $[M+H-CO]^+$ 、 253.048 6 $[M+H-CH_3OH]^+$ 、 242.056 3 $[M+H-CH_3-CO]^+$ 、 229.048 4 $[M+H-CO-CO]^+$ 、 197.059 5 $[M+H-CO-CO-CH_3OH]^+$	$C_{16}H_{12}O_5$	鹰嘴豆牙素 A Biochanin A
9*	11.33	$[M+H]^+$	187.038 7	187.039 0	-1.44	187.041 8 $[M+H]^+$ 、 159.046 1 $[M+H-CO]^+$ 、 143.051 0 $[M+H-CO_2]^+$ 、 131.049 7 $[M+H-CO-CO]^+$ 、 115.055 4 $[M+H-CO_2-CO]^+$	$C_{11}H_6O_3$	补骨脂素 Psoralen
10*	11.74	$[M+H]^+$	187.038 7	187.039 0	-1.58	187.040 1 $[M+H]^+$ 、 159.047 3 $[M+H-CO]^+$ 、 143.050 8 $[M+H-CO_2]^+$ 、 131.050 0 $[M+H-CO-CO]^+$ 、 115.056 0 $[M+H-CO_2-CO]^+$	$C_{11}H_6O_3$	异补骨脂素 Isopsoralen
11	12.30	$[M+H]^+$	271.060 2	271.060 1	0.54	271.059 4 $[M+H]^+$ 、 253.049 4 $[M+H-H_2O]^+$ 、 243.062 7 $[M+H-CO]^+$ 、 225.052 5 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 215.071 4 $[M+H-CO-CO]^+$ 、 197.058 9 $[M+H-H_2O-CO-CO]^+$ 、 153.018 2 $[M+H-C_8H_6O]^+$	$C_{15}H_{10}O_5$	染料木黄酮 Genistein
12	12.38	$[M+H]^+$	283.060 4	283.060 1	0.95	283.059 0 $[M+H]^+$ 、 255.066 9 $[M+H-CO]^+$ 、 227.070 1 $[M+H-CO-CO]^+$ 、 199.076 2 $[M+H-CO-CO-CO]^+$ 、 137.024 3 $[M+H-C_9H_6O_2]^+$ 、 109.030 2 $[M+H-C_9H_6O_2-CO]^+$	$C_{16}H_{10}O_5$	补骨脂异黄酮醌 Corylinol

续表 2 (Continued Tab. 2)

序号 No.	t_R (min)	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子 MS/MS fragment ion	分子式 Molecular formula	化合物 Compound
13	12.79	$[M+H]^+$	341.138 5	341.138 4	0.58	341.137 0 $[M+H]^+$ 、 323.127 2 $[M+H-H_2O]^+$ 、 269.079 4 $[M+H-C_4H_8O]^+$ 、 221.079 8 $[M+H-C_8H_8O]^+$ 、 203.070 1 $[M+H-C_8H_8O-H_2O]^+$ 、 147.043 9 $[M+H-C_{11}H_{14}O_3]^+$ 、 119.049 4 $[M+H-C_{11}H_{14}O_3-CO]^+$	$C_{20}H_{20}O_5$	Psorachalcone A
14	13.04	$[M+H]^+$	341.138 3	341.138 4	-0.18	341.138 9 $[M+H]^+$ 、 323.125 3 $[M+H-H_2O]^+$ 、 269.080 6 $[M+H-C_4H_8O]^+$ 、 221.081 1 $[M+H-C_8H_8O]^+$ 、 203.070 1 $[M+H-C_8H_8O-H_2O]^+$ 、 147.043 9 $[M+H-C_{11}H_{14}O_3]^+$ 、 119.049 3 $[M+H-C_{11}H_{14}O_3-CO]^+$	$C_{20}H_{20}O_5$	补骨脂色酚酮 Bavachromanol
15	13.07	$[M+H]^+$	339.123 0	339.122 7	0.99	339.123 0 $[M+H]^+$ 、 321.113 0 $[M+H-H_2O]^+$ 、 279.065 3 $[M+H-H_2O-C_3H_6]^+$ 、 267.066 5 $[M+H-C_4H_8O]^+$ 、 239.071 2 $[M+H-C_4H_8O-CO]^+$ 、 137.023 2 $[M+H-C_{13}H_{14}O]^+$	$C_{20}H_{18}O_5$	Bakuisoflavone
16	13.39	$[M+H]^+$	339.123 0	339.122 7	0.86	339.122 5 $[M+H]^+$ 、321.111 8 $[M+H-H_2O]^+$ 、 279.065 2 $[M+H-H_2O-C_3H_6]^+$ 、 267.065 1 $[M+H-C_4H_8O]^+$ 、 251.070 0 $[M+H-H_2O-C_3H_6-CO]^+$ 、 239.069 8 $[M+H-C_4H_8O-CO]^+$ 、 137.023 7 $[M+H-C_{13}H_{14}O_2]^+$	$C_{20}H_{18}O_5$	Psoralenol
17	13.76	$[M+H]^+$	357.133 3	357.133 3	0.04	357.134 2 $[M+H]^+$ 、 339.116 7 $[M+H-H_2O]^+$ 、 237.074 0 $[M+H-C_5H_{12}O_3]^+$ 、 147.043 9 $[M+H-C_{11}H_{14}O_4]^+$ 、 119.049 3 $[M+H-C_{11}H_{14}O_4-CO]^+$	$C_{20}H_{20}O_6$	Brosimacutin G
18	14.57	$[M+H]^+$	337.107 0	337.107 1	-0.28	337.107 4 $[M+H]^+$ 、 279.065 7 $[M+H-C_3H_6O]^+$ 、 251.071 0 $[M+H-C_3H_6O-CO]^+$	$C_{20}H_{16}O_5$	异补骨脂定 Isopsoralidin
19	15.82	$[M+H]^+$	353.102 3	353.102 0	0.95	353.102 6 $[M+H]^+$ 、 281.044 7 $[M+H-C_4H_8O]^+$ 、 253.049 3 $[M+H-C_4H_8O-CO]^+$ 、 237.055 0 $[M+H-C_4H_8O-CO_2]^+$ 、 225.054 8 $[M+H-C_4H_8O-CO-CO]^+$ 、 209.058 9 $[M+H-C_4H_8O-CO_2-CO]^+$ 、 197.060 4 $[M+H-C_4H_8O-CO-CO-CO]^+$ 、 181.064 6 $[M+H-C_4H_8O-CO_2-CO-CO]^+$	$C_{20}H_{16}O_6$	2',3'-环氧补骨脂定 Psoralidin-2',3'-oxide
20	16.69	$[M+H]^+$	353.102 2	353.102 0	0.59	353.101 3 $[M+H]^+$ 、 335.091 8 $[M+H-H_2O]^+$ 、 307.096 8 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 267.066 3 $[M+H-C_5H_{10}O]^+$ 、 239.069 8 $[M+H-C_5H_{10}O-CO]^+$	$C_{20}H_{16}O_6$	补骨脂香豆雌烷 A Bavacumestan A

续表 2(Continued Tab. 2)

序号 No.	t_R (min)	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子 MS/MS fragment ion	分子式 Molecular formula	化合物 Compound
21	16.80	$[M + H]^+$	339.122 9	339.122 7	0.71	339.120 5 $[M + H]^+$ 、 311.125 4 $[M + H-CO]^+$ 、 283.060 2 $[M + H-C_4H_8]^+$ 、 265.049 2 $[M + H-C_4H_8-H_2O]^+$ 、 255.065 2 $[M + H-C_4H_8-CO]^+$ 、 237.054 5 $[M + H-C_4H_8-H_2O-CO]^+$ 、 153.070 6 $[M + H-C_{13}H_{14}O]^+$	$C_{20}H_{18}O_5$	3'-二甲基烯丙 基染料木黄酮 Isowightone
22	17.12	$[M + COOH]^-$	303.159 8	303.159 1	2.32	303.163 8 $[M + COOH]^-$ 、 185.058 8 $[M + COOH-C_4H_8O]^-$ 、 157.028 5 $[M + COOH-C_4H_8O-C_2H_4]^-$	$C_{17}H_{22}O_2$	15-Demethyl-12,13- dihydro-13- ketobakuchiol
23	18.35	$[M + H]^+$	341.138 5	341.138 4	0.37	341.138 8 $[M + H]^+$ 、 269.081 0 $[M + H-C_4H_8O]^+$ 、 221.081 0 $[M + H-C_8H_8O]^+$ 、 147.044 3 $[M + H-C_{11}H_{14}O_3]^+$ 、 119.050 0 $[M + H-C_{11}H_{14}O_3-CO]^+$	$C_{20}H_{20}O_5$	Bakuchalcone
24*	19.09	$[M + H]^+$	323.127 6	323.127 8	-0.49	323.127 8 $[M + H]^+$ 、 267.064 9 $[M + H-C_4H_8]^+$ 、 255.064 8 $[M + H-C_5H_8]^+$ 、 239.069 9 $[M + H-C_4H_8-CO]^+$ 、 227.070 4 $[M + H-C_4H_8-C_2HO]^+$ 、 211.075 6 $[M + H-C_4H_8-CO-CO]^+$ 、 199.075 6 $[M + H-C_4H_8-C_2HO-CO]^+$ 、 137.024 2 $[M + H-C_{13}H_{14}O]^+$	$C_{20}H_{18}O_4$	新补骨脂异黄酮 Neobavaisoflavone
25	19.44	$[M + H]^+$	323.127 8	323.127 8	0.12	323.128 5 $[M + H]^+$ 、 267.064 5 $[M + H-C_4H_8]^+$ 、 255.065 3 $[M + H-C_5H_8]^+$ 、 239.070 3 $[M + H-C_4H_8-CO]^+$ 、 211.075 3 $[M + H-C_4H_8-CO-CO]^+$ 、 121.029 3 $[M + H-C_{12}H_{10}O_3]^+$	$C_{20}H_{18}O_4$	Chromenoflavanone
26	19.47	$[M + H]^+$	299.091 1	299.091 4	-0.93	299.083 7 $[M + H]^+$ 、 179.035 1 $[M + H-C_8H_8O]^+$ 、 151.039 3 $[M + H-C_8H_8O-CO]^+$ 、 147.010 8 $[M + H-C_8H_8O_3]^+$ 、 121.029 8 $[M + H-C_9H_8O_4]^+$	$C_{17}H_{14}O_5$	新异补骨脂素查尔酮 Isoneobavachalcone
27*	19.73	$[M + H]^+$	325.143 5	325.143 4	0.34	325.143 5 $[M + H]^+$ 、 269.080 9 $[M + H-C_4H_8]^+$ 、 205.085 8 $[M + H-C_8H_8O]^+$ 、 149.023 2 $[M + H-C_8H_8O-C_4H_8]^+$ 、 121.029 2 $[M + H-C_8H_8O-C_4H_8-CO]^+$	$C_{20}H_{20}O_4$	补骨脂甲素 Bavachin
28	19.85	$[M + H]^+$	289.179 9	289.179 8	0.12	289.179 9 $[M + H]^+$ 、 123.045 1 $[M + H-C_{11}H_{18}O]^+$	$C_{18}H_{24}O_3$	Psoracorylifol A
29	20.28	$[M + H]^+$	293.044 5	293.044 4	0.26	293.043 7 $[M + H]^+$ 、 265.047 8 $[M + H-CO]^+$ 、 237.054 3 $[M + H-CO-CO]^+$ 、 221.059 6 $[M + H-CO-CO_2]^+$ 、 209.060 3 $[M + H-CO-CO-CO]^+$	$C_{17}H_8O_5$	新补骨脂素 Neopsoralen
30	20.84	$[M + H]^+$	289.179 8	289.179 8	-0.16	289.179 8 $[M + H]^+$ 、 123.045 2 $[M + H-C_{11}H_{18}O]^+$	$C_{18}H_{24}O_3$	Psoracorylifol B

续表 2(Continued Tab. 2)

序号 No.	t_R (min)	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子 MS/MS fragment ion	分子式 Molecular formula	化合物 Compound
31*	20.85	$[M+H]^+$	321.112 4	321.112 1	0.78	321.112 8 $[M+H]^+$ 、 306.089 7 $[M+H-CH_3]^+$ 、 279.066 0 $[M+H-C_3H_6]^+$ 、 137.023 8 $[M+H-C_{13}H_{12}O]^+$	$C_{20}H_{16}O_4$	补骨脂宁 Corylin
32	21.33	$[M+H]^+$	323.127 9	323.127 8	0.43	323.128 5 $[M+H]^+$ 、 267.064 5 $[M+H-C_4H_8]^+$ 、 255.065 3 $[M+H-C_5H_8]^+$ 、 203.070 2 $[M+H-C_8H_8O]^+$ 、 147.044 7 $[M+H-C_{11}H_{12}O_2]^+$ 、 119.049 9 $[M+H-C_{11}H_{12}O_2-CO]^+$	$C_{20}H_{18}O_4$	异补骨脂色 烯查耳酮 Isobavachromene
33	21.90	$[M+H]^+$	341.138 6	341.138 4	0.65	341.138 6 $[M+H]^+$ 、 285.073 8 $[M+H-C_4H_8]^+$ 、 165.017 4 $[M+H-C_4H_8-C_8H_8O]^+$ 、 137.022 3 $[M+H-C_4H_8-C_8H_8O-CO]^+$ 、 121.064 0 $[M+H-C_{12}H_{12}O_4]^+$	$C_{20}H_{20}O_5$	6-Prenylnaringenin
34*	21.93	$[M+H]^+$	337.107 0	337.107 1	-0.14	337.108 8 $[M+H]^+$ 、 309.114 0 $[M+H-CO]^+$ 、 281.044 8 $[M+H-C_4H_8]^+$ 、 253.049 9 $[M+H-C_4H_8-CO]^+$ 、 237.055 5 $[M+H-C_4H_8-CO_2]^+$ 、 225.055 1 $[M+H-C_4H_8-CO-CO]^+$ 、 209.060 2 $[M+H-C_4H_8-CO-CO_2]^+$ 、 197.059 7 $[M+H-C_4H_8-CO-CO-CO]^+$ 、 181.065 1 $[M+H-C_4H_8-CO-CO_2-CO]^+$	$C_{20}H_{16}O_5$	补骨脂定 Psoralidin
35	22.03	$[M+H]^+$	407.185 3	407.185 3	0.12	407.186 8 $[M+H]^+$ 、 389.174 9 $[M+H-H_2O]^+$ 、 267.065 1 $[M+H-C_9H_{16}O]^+$ 、 255.064 8 $[M+H-C_{10}H_{16}O]^+$ 、 239.070 1 $[M+H-C_9H_{16}O-CO]^+$ 、 137.023 7 $[M+H-C_{18}H_{22}O_2]^+$	$C_{25}H_{26}O_5$	Corylifol G
36*	22.44	$[M+H]^+$	325.143 3	325.143 4	-0.51	325.143 3 $[M+H]^+$ 、 269.080 6 $[M+H-C_4H_8]^+$ 、 205.086 0 $[M+H-C_8H_8O]^+$ 、 149.022 8 $[M+H-C_8H_8O-C_4H_8]^+$ 、 131.012 5 $[M+H-C_8H_8O-C_4H_8-H_2O]^+$ 、 121.028 6 $[M+H-C_8H_8O-C_4H_8-CO]^+$	$C_{20}H_{20}O_4$	补骨脂乙素 Isobavachalcone
37	22.55	$[M+H]^+$	339.158 8	339.159 1	-0.75	339.159 5 $[M+H]^+$ 、 283.096 8 $[M+H-C_4H_8]^+$ 、 271.096 1 $[M+H-C_5H_8]^+$ 、 256.073 3 $[M+H-C_5H_8-CH_3]^+$ 、 219.100 9 $[M+H-C_8H_8O]^+$ 、 151.038 6 $[M+H-C_8H_8O-C_5H_8]^+$	$C_{21}H_{22}O_4$	甲基补骨脂黄酮 A Bavachinin
38	22.66	$[M+H]^+$	335.091 3	335.091 4	-0.37	335.091 1 $[M+H]^+$ 、 307.096 9 $[M+H-CO]^+$ 、 263.070 3 $[M+H-CO-CO_2]^+$ 、 235.075 5 $[M+H-CO-CO_2-CO]^+$ 、 195.080 1 $[M+H-CO-CO_2-C_5H_8]^+$	$C_{20}H_{14}O_5$	槐属香豆雌烷 A Sophoracoumestan A

续表 2(Continued Tab. 2)

序号 No.	t_R (min)	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子 MS/MS fragment ion	分子式 Molecular formula	化合物 Compound
39	22.82	$[M+H]^+$	391.190 2	391.190 4	-0.52	391.191 4 $[M+H]^+$ 、 335.128 8 $[M+H-C_4H_8]^+$ 、 323.127 8 $[M+H-C_5H_8]^+$ 、 279.065 5 $[M+H-C_8H_{16}]^+$ 、 267.064 2 $[M+H-C_9H_{16}]^+$ 、 255.064 6 $[M+H-C_7H_4O_3]^+$ 、 239.068 9 $[M+H-C_9H_{16}-CO]^+$ 、 211.075 2 $[M+H-C_9H_{16}-CO-CO]^+$ 、 137.023 7 $[M+H-C_{18}H_{22}O]^+$	$C_{25}H_{26}O_4$	Corylifol A
40	23.89	$[M+H]^+$	257.189 7	257.190 0	-1.04	257.190 9 $[M+H]^+$ 、 201.128 0 $[M+H-C_4H_8]^+$ 、 187.111 5 $[M+H-C_4H_8-CH_2]^+$ 、 173.095 9 $[M+H-C_4H_8-CH_2-CH_2]^+$ 、 147.080 7 $[M+H-C_4H_8-CH_2-CH_2-C_2H_2]^+$ 、 133.065 3 $[M+H-C_4H_8-CH_2-CH_2-C_2H_2-CH_2]^+$ 、 121.065 4 $[M+H-C_4H_8-CH_3-CH_2-C_2H_2-C_2H_2]^+$ 、 107.049 7 $[M+H-C_{11}H_{18}]^+$	$C_{18}H_{24}O$	补骨脂酚 Bakuchiol
41	23.91	$[M+H]^+$	273.184 2	273.184 9	-2.47	273.184 2 $[M+H]^+$ 、 191.111 1 $[M+H-C_6H_{10}]^+$ 、 123.045 4 $[M+H-C_{11}H_{18}]^+$	$C_{18}H_{24}O_2$	Psoracorylifol D
42	23.93	$[M+H]^+$	459.252 4	459.253 0	-1.26	459.262 8 $[M+H]^+$ 、 403.189 5 $[M+H-C_4H_8]^+$ 、 391.189 3 $[M+H-C_5H_8]^+$ 、 375.159 7 $[M+H-C_4H_8-CO]^+$ 、 279.064 8 $[M+H-C_4H_8-C_9H_{16}]^+$ 、 267.064 6 $[M+H-C_5H_8-C_9H_{16}]^+$ 、 255.064 8 $[M+H-C_{12}H_{12}O_3]^+$ 、 251.069 5 $[M+H-C_4H_8-C_9H_{16}-CO]^+$ 、 137.022 8 $[M+H-C_5H_8-C_{18}H_{22}O]^+$	$C_{30}H_{34}O_4$	7- <i>O</i> - Isoprenylcorylifol A
43	23.95	$[M+COOH]^-$	299.165 0	299.164 2	2.78	299.163 8 $[M+COOH]^-$ 、 171.081 2 $[M+COOH-C_6H_{12}]^-$ 、 156.058 0 $[M+COOH-C_6H_{12}-CH_3]^-$	$C_{18}H_{22}O$	Delta(1),3-bakuchiol
44	24.25	$[M+H]^+$	279.232 1	279.231 9	0.77	279.092 4 $[M+H]^+$ 、 149.022 6 $[M+H-C_7H_{14}O_2]^+$ 、 109.101 8 $[M+H-C_{10}H_{18}O_2]^+$	$C_{18}H_{30}O_2$	亚麻子油酸 Alpha-linolenic acid
45	24.68	$[M+H]^+$	281.247 6	281.247 5	0.36	281.291 3 $[M+H]^+$ 、 263.068 6 $[M+H-H_2O]^+$ 、 573.348 6 $[M+COOH]^-$ 、 527.352 9 $[M-H]^-$	$C_{18}H_{32}O_2$	亚油酸 Linoleic acid
46	25.16	$[M+COOH]^-$	573.357 3	573.357 5	-0.32	485.283 5 $[M+COOH-C_3H_6]^-$ 、 271.169 5 $[M+COOH-C_{18}H_{24}O]^-$ 、 255.174 7 $[M+COOH-C_{18}H_{24}O_2]^-$ 、 172.089 2 $[M+COOH-C_{18}H_{24}O_2-C_6H_{12}]^-$	$C_{36}H_{48}O_3$	(12'S) - Bisbakuchiol C
47	25.21	$[M+H]^+$	543.346 9	543.346 9	0.03	543.349 4 $[M+H]^+$ 、 525.341 6 $[M+H-H_2O]^+$ 、 387.194 8 $[M+H-H_2O-C_{10}H_{18}]^+$	$C_{36}H_{46}O_4$	Bisbakuchiol A

注: * 通过与对照品对比鉴定得到的化合物。

Note: * Compounds identified by comparison with reference substance.

2.1.1 黄酮类化学成分鉴定

在 PFE 样品溶液中鉴定到 27 个黄酮类化学成分,包括黄酮、查尔酮、异黄酮和二氢黄酮,质谱裂解规律主要表现为黄酮苷类一般丢失糖基形成黄酮苷元,黄酮及其苷类均通常发生逆狄尔斯-阿德尔反应(RDA)。接下来以 **2**(黄酮苷)和 **24**(黄酮苷元)为例进行介绍。化合物 **2**:保留时间为 5.81 min,分子式为 $C_{21}H_{20}O_9$,准分子离子峰为 m/z 417.118 2 $[M + H]^+$, m/z 255.064 4 $[M + H - C_6H_{10}O_5]^+$ 为准分子离子峰丢失 1 分子葡萄糖产生的苷元离子,苷元离子进一步发生 RDA 裂解产生 m/z 137.023 3 $[M + H - C_6H_{10}O_5 - C_8H_6O]^+$,结合碎片离子 m/z 227.069 7

$[M + H - C_6H_{10}O_5 - CO]^+$ 和 199.075 2 $[M + H - C_6H_{10}O_5 - CO - CO]^+$,参考相关文献^[8],推测鉴定 **2** 为大豆苷。化合物 **24**:保留时间为 19.09 min,分子式为 $C_{20}H_{18}O_4$,准分子离子峰为 m/z 323.127 8 $[M + H]^+$,其发生 RDA 裂解产生 m/z 137.024 2 $[M + H - C_{13}H_{14}O]^+$, m/z 267.064 9 $[M + H - C_4H_8]^+$ 表明其含有异戊烯基结构,结合碎片离子 m/z 255.064 8、239.069 9、227.070 4、211.075 6 和 199.075 6,与对照品的保留时间和碎片离子进行对比,参考相关文献^[6],可鉴定 **24** 为新补骨脂异黄酮,其 MS/MS 质谱图和可能质谱裂解途径见图 3 和图 4。

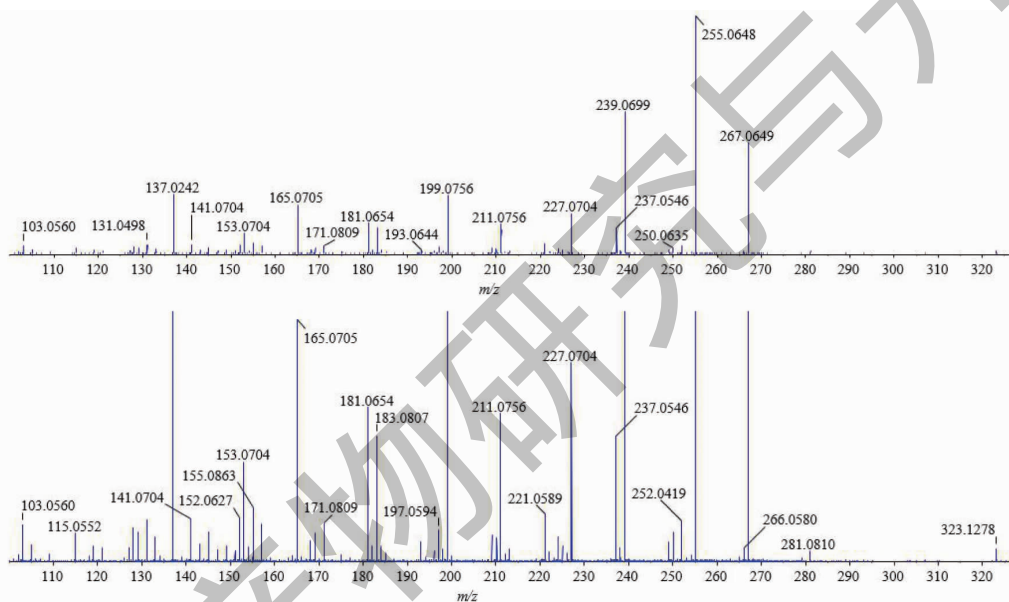


图 3 新补骨脂异黄酮质谱图

Fig. 3 The MS spectra of neopsoralen isoflavones

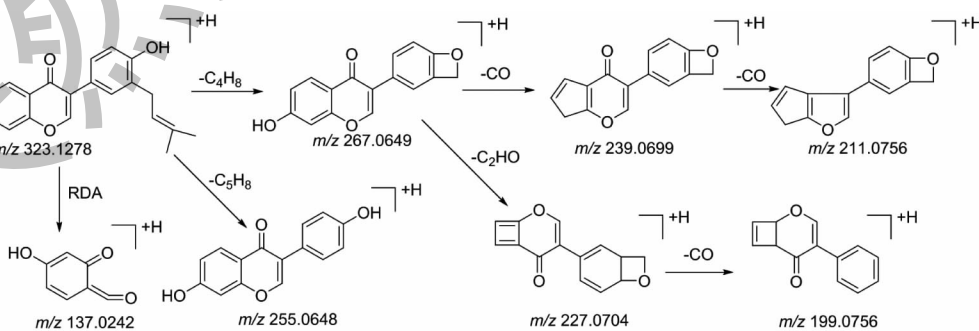


图 4 新补骨脂异黄酮可能的质谱裂解途径

Fig. 4 The possible fragmentation pathway of neopsoralen isoflavones

2.1.2 香豆素类化学成分鉴定

在 PFE 样品溶液中鉴定到 10 个香豆素类化学

成分,包括呋喃香豆素、拟雌内酯类和其他香豆素,质谱裂解规律主要表现为丢失 CO 、 CO_2 。以 **9**(呋喃

香豆素)和 **34**(拟雌内酯类)为例进行介绍。化合物 **9**:保留时间为 11.33 min,分子式为 $C_{11}H_6O_3$,准分子离子峰为 m/z 187.041 8 $[M + H]^+$,其丢失 1 分子 CO 产生 m/z 159.046 1 $[M + H - CO]^+$,进一步丢失 1 分子 CO 产生 m/z 131.049 7 $[M + H - CO - CO]^+$;准分子离子峰丢失 1 分子 CO_2 产生 m/z 143.051 0 $[M + H - CO_2]^+$,进一步丢失 1 分子 CO 产生 m/z 115.055 4 $[M + H - CO_2 - CO]^+$,与对照品的保留时间和碎片离子进行对比,参考相关文献^[8],可鉴定 **9** 为补骨脂素,其 MS/MS 质谱图和可能质谱裂

解途径见图 5 和图 6。化合物 **34**:保留时间为 21.93 min,分子式为 $C_{20}H_{16}O_5$,准分子离子峰为 m/z 337.108 8 $[M + H]^+$, m/z 281.044 8 $[M + H - C_4H_8]^+$ 表明其含有异戊烯基结构,结合碎片离子 m/z 309.114 0、253.049 9、237.055 5、225.055 1、209.060 2、197.059 7 和 181.065 1,与对照品的保留时间和碎片离子进行对比,参考相关文献^[10],可鉴定 **34** 为补骨脂定,其 MS/MS 质谱图和可能质谱裂解途径见图 7 和图 8。

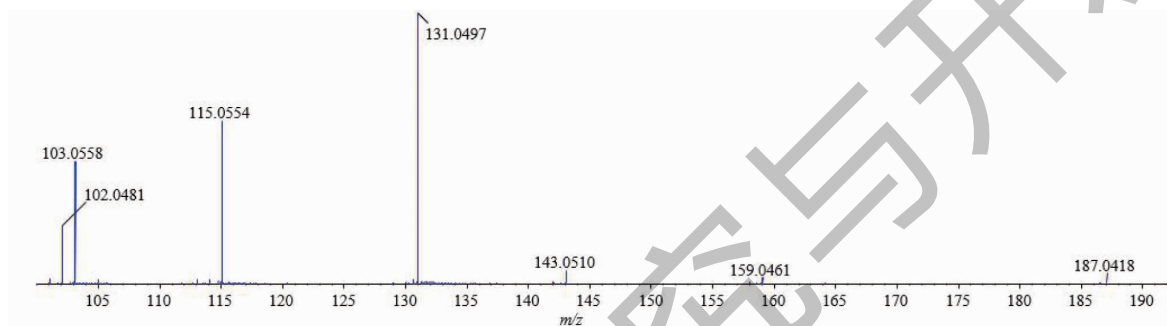


图 5 补骨脂素质谱图

Fig. 5 The MS spectra of psoralen

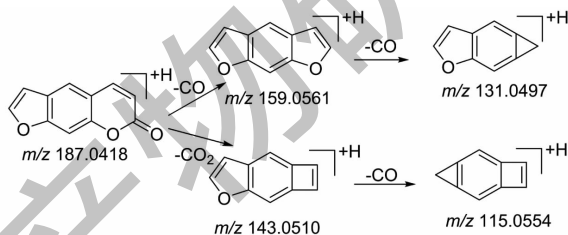


图 6 补骨脂素可能质谱裂解途径

Fig. 6 The possible fragmentation pathway of psoralen

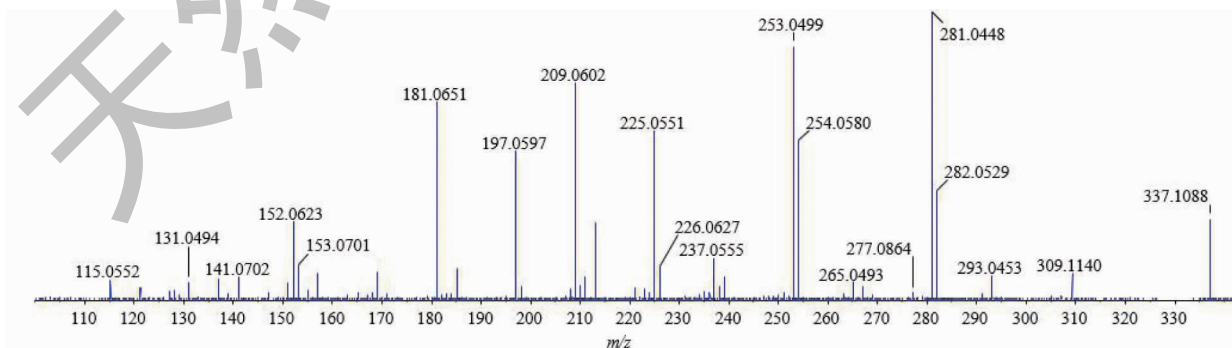


图 7 补骨脂定质谱图

Fig. 7 The MS spectra of psoralidin

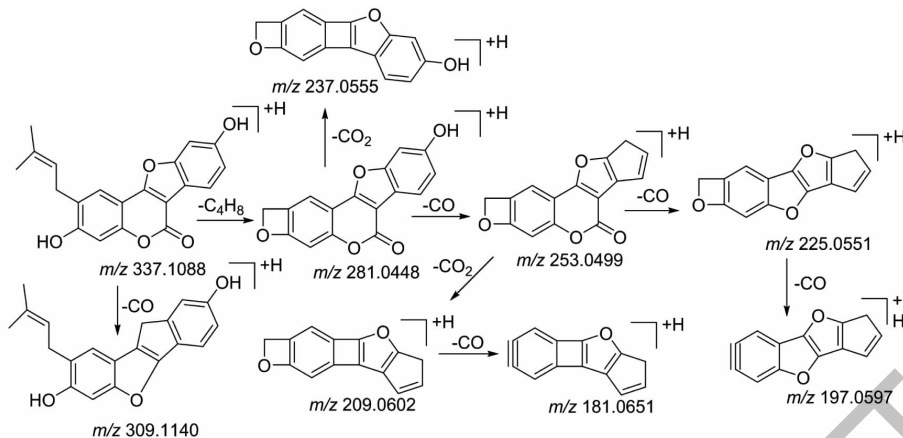


图 8 补骨脂定可能质谱裂解途径

Fig. 8 The possible fragmentation pathway of psoralidin

2.1.3 单萜酚类化学成分鉴定

在 PFE 样品溶液中鉴定到 8 个单萜酚类化学成分,质谱裂解规律主要表现为烃基支链上的裂解。以 **40** 为例进行介绍。化合物 **40**:保留时间为 23.89 min,分子式为 $C_{18}H_{24}O$,准分子离子峰为 m/z 257.1909 $[M + H]^+$,其丢失异丁烯基产生 m/z

201.1280 $[M + H - C_4H_8]^+$,结合其他烃基支链上的裂解产生的碎片离子 m/z 187.1115、173.0959、147.0807、133.0653、121.0654 和 107.0497,参考相关文献^[5],推测鉴定 **40** 为补骨脂酚。其 MS/MS 质谱图和可能质谱裂解途径见图 9 和图 10。

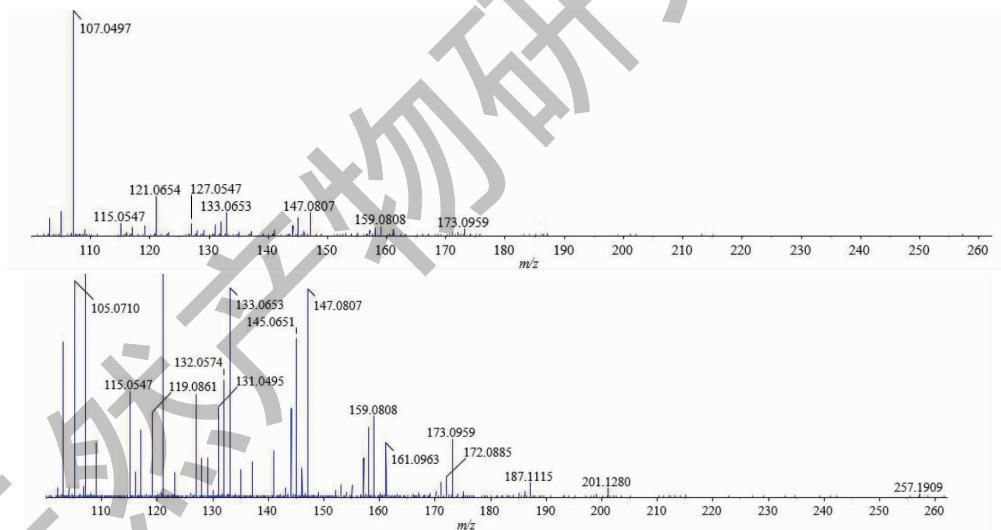


图 9 补骨脂酚质谱图

Fig. 9 The MS spectra of bakuchiol

2.2 斑马鱼促黑色素生成实验结果

斑马鱼促黑色素生成实验结果见图 11,表明斑马鱼经过酪氨酸酶抑制剂 PTU 处理 45 hpf 后,黑色素细胞迁移及分布无明显异常,但黑色素合成明显减少。经 PFE 继续处理 18 hpf 后,与胚胎培养液处理组相比,PFE 处理组能够加速斑马鱼幼鱼眼部、腹部、背脊及尾部黑色素的新生。

2.3 PFE、PSO 和 IPSO 对小鼠黑色素瘤细胞酪氨酸酶合成通路 mRNA 表达的影响

由图 12 可知,与对照组比较,PFE 能显著增加 B16-F10 细胞中 *Tyr* 和 *Tyrp2* mRNA 的表达,其他给药组均能不同程度地增加 *Tyr*、*Tyrp1* 和 *Tyrp2* mRNA 的表达,推测补骨脂醇提取物当中的其他未知化合物,亦能作用于酪氨酸酶合成通路相关基因的表达。

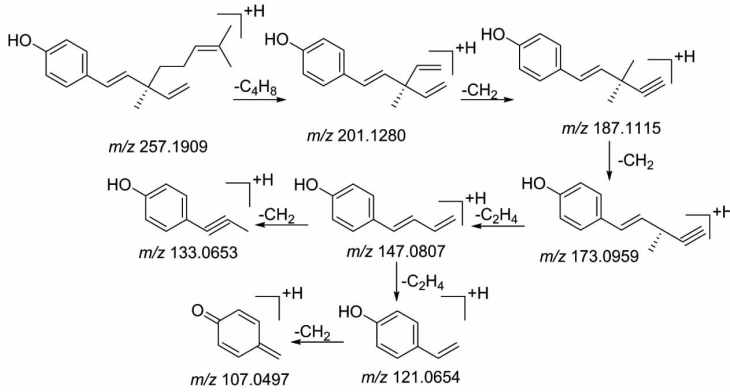


图 10 补骨脂酚可能质谱裂解途径

Fig. 10 The possible fragmentation pathway of bakuchiol

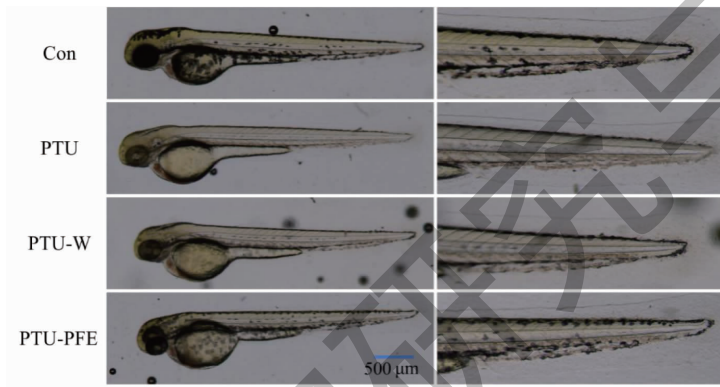


图 11 PFE 对 72 hpf 斑马鱼的促黑色素生成作用

Fig. 11 Effect of PFE on promoting the melanin formation in 72 hpf zebrafish

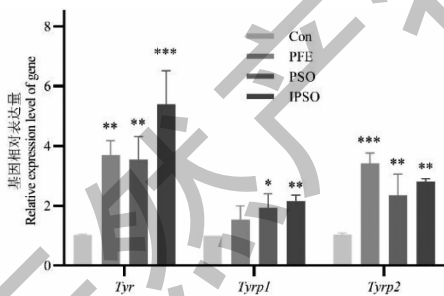


图 12 PFE、PSO 和 IPSO 对 *Tyr*、*Tyrp1* 和 *Tyrp2* mRNA 表达的影响

Fig. 12 Effects of PFE, PSO and IPSO on mRNA expression of *Tyr*, *Tyrp1* and *Tyrp2*

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3 讨论与结论

白癜风是由于黑色素细胞损伤而引发的皮肤局部白斑,是世界公认的疑难顽症,迄今为止,其病因

及发病机理尚未完全明确^[11]。研究表明^[12], 皮肤色素沉着主要与表皮中黑色素细胞代谢的三大环节具有密切的关系,包括黑色素细胞的增殖, TYR 的合成与激活以及黑色素的合成,黑色素从黑素体向角质形成细胞的转移途径。黑色素合成是一个发生在黑色素细胞内受到多种因子调节的复杂反应^[13], TYR 是黑色素合成的限速酶,其活力受到 TYRP1 和 TYRP2 的调控,是黑色素合成中的关键调节因子^[14]。

根据白癜风发病机制及临床表现,研究人员们近年来开发出一系列动物模型,如化学脱色剂诱导、黑色素细胞应激诱导、免疫诱导、外源性 T 细胞诱导、转基因、黑色素细胞脱离诱导等,动物多选择小鼠为主^[15]。据研究,71.4% 的人类蛋白质编码基因和 82% 的致病基因都与斑马鱼直系同源,这其中包括许多与人类皮肤疾病有关的基因。斑马鱼幼体透明,皮肤的整体结构和细胞结构类似于哺乳动物的皮肤,与人类具有相似的黑色素细胞和黑素体,色素

细胞在个体发育过程中易被观察,这使斑马鱼成为色素沉着研究中广泛使用的动物模型,这其中就包括白癜风、黑色素瘤等疾病^[16,17]。但是由于白癜风是一种复杂的多因素疾病,目前没有任何一种动物模型能充分模拟人类白癜风发生发展进程,因此白癜风的动物模型仍需继续探索。

PTU 是 TYR 的抑制剂,广泛用于阻断斑马鱼胚胎的色素沉着和提高光学透明度^[18],研究表明在斑马鱼原肠胚期(5.5 hpf)后使用 PTU 溶液代替养鱼用水,能有效抑制黑色素生成,保持斑马鱼透明性^[4]。本实验结果表明 PFE 处理 PTU 造模后的斑马鱼 18 hpf 后,与用胚胎培养液处理组相比,PFE 能够加速斑马鱼幼鱼眼部、腹部、背脊及尾部黑色素的新生,这与临床应用补骨脂治疗白癜风的结果相一致。

据《中国药典》及古今本草书籍记载,补骨脂是治疗白癜风疗效确切的一味中药,大部分医疗机构制剂都是将补骨脂制成酊剂来使用,使用乙醇浓度范围在 30% ~ 100%^[3],因此,结合文献及实际应用,本研究选择 65% 乙醇作为提取试剂。本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对 PFE 中的化学成分进行鉴定,共推测鉴定 47 个化学成分,主要为黄酮类化学成分(27 个)和香豆素类化学成分(10 个)。鉴定到的香豆素类化学成分 PSO 和 IPSO,可能为治疗白癜风的主要有效化学成分^[19],苯并呋喃类(补骨脂苷、异补骨脂苷)在体内中也可转化为 PSO 和 IPSO 发挥作用^[20],PSO 和 IPSO 也是《中国药典》中规定的补骨脂药材质量控制成分^[3],因此选择 PFE 和这两个化学成分进行细胞实验。初步探索作用机制,qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,PFE 能显著增加 B16-F10 细胞中 *Tyr* 和 *Tyrp2* mRNA 的表达,其他给药组均能不同程度地增加 *Tyr*、*Tyrp1* 和 *Tyrp2* mRNA 的表达,且具有统计学差异,证明补骨脂中的 PSO 和 IPSO 以及其他可能未知的化合物,均有可能通过增加酪氨酸酶含量发挥治疗白癜风的作用。但是,亦有文献报道 PSO 作用于人皮肤黑色素瘤细胞 A375,抑制酪氨酸酶启动子活性;下调 *Tyr*、*Tyrp1* 和 *Tyrp2* mRNA 的表达水平,抑制黑色素生成^[21],与本实验结果相反,分析其原因可能是研究对象不同或者 PSO 在不同给药浓度范围内,具有双向调节黑色素生成的作用等,这还需要更多研究者进一步开展研究,方能得出更加严谨准确的结论。对于补骨脂治疗白癜风,PSO 和 IPSO 则为主要的活性成分,可

作为该药或含有该中药的制剂质量控制指标。

参考文献

- Ezzedine K, Eleftheriadou V, Jones H, et al. Psychosocial effects of vitiligo: a systematic literature review [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2021, 22: 757-774.
- State Pharmacopoeia Commission; Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 195.
- Smith DA, Macdonald S. A rare case of acute hepatitis induced by use of babchi seeds as an ayurvedic remedy for vitiligo [J]. *BMJ Case Rep*, 2014, 2014: bcr2013200958.
- Zhang LJ, Shi HQ, Yuan XY, et al. Developmental and melanogenesis effects of 1-phenyl 2-thiourea (PTU) in zebrafish embryos [J]. *Chin J Comp Med (中国比较医学杂志)*, 2012, 22: 21-25.
- Tan G, Yang T, Miao H, et al. Characterization of compounds in *Psoralea corylifolia* using high-performance liquid chromatography diode array detection, time-of-flight mass spectrometry and quadrupole ion trap mass spectrometry [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2015, 53: 1455-62.
- Zhao LH, Huang CY, Shan Z, et al. Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC-MS [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 821: 67-74.
- Wang PL, Yao ZH, Zhang FX, et al. Identification of metabolites of *Psoraleae Fructus* in rats by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 112: 23-35.
- Huang GQ, Liang J, Wei JY, et al. Analysis and identification of chemical constituents in hypoglycemic effective fractions of *Longan Folium* based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2021, 27: 127-138.
- Ding YT, Zheng ZH, Zhao RY, et al. Rapid identification of chemical constituents in *Psoralea corylifolia* by UPLC-Q-TOF-MSE combined with UNIFI informatics platform [J]. *J Chin Mass Spec Soc (质谱学报)*, 2018, 39: 729-745.
- Chen YL, Guo YL, Li N, et al. Comparative study on chemical constituents of different processed products from *Psoralea corylifolia* L. by qualitative and quantitative analysis [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2019, 31: 2113-2122.
- Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, et al. Vitiligo [J]. *Lancet*, 2015, 386: 74-84.