

本文引用:徐敬陶,陶兴隆,郑丽亚.中药材中酪氨酸酶抑制剂筛选方法研究进展[J].新乡医学院学报,2021,38(3):296-300. DOI:10.7683/xxyxyxb.2021.03.020.

中药材中酪氨酸酶抑制剂筛选方法研究进展

(河北医科大学第二医院药学部,河北 石家庄 050000)

摘要: 酪氨酸酶是目前已知的生物体中唯一参与黑色素合成的关键酶,酪氨酸酶抑制剂已经被广泛用于害虫防治、果蔬保鲜、护肤美白及色素沉着性疾病的治疗,但目前已发现的酪氨酸酶抑制剂往往存在一些稳定性及安全性问题,从而限制了其应用。因此,从中药中寻找稳定性高、不良反应较小的酪氨酸酶抑制剂成为关注的热点。但由于中药成分复杂,干扰物质较多,活性物质含量较低,如何快速高效地从中药中筛选出特异性的活性物质仍是现代药物研究的难点和热点。本文就既往文献报道中可用于筛选中药材中酪氨酸酶抑制剂的方法及其特点进行综述,旨在为其他研究者快速选择合适的筛选方法进行中药材中酪氨酸酶抑制剂的快速筛选提供技术参考。

中图分类号: Q356.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2021)03-0296-05

酪氨酸酶又称单酚氧化酶,是广泛分布于不同生物体内的一种多铜酶,在黑素合成和酶褐变过程中发挥着重要作用^[1]。目前已有天然来源(真菌、细菌、植物)和合成来源的酪氨酸酶抑制剂被广泛用于害虫防治、果蔬保鲜、护肤美白及色素沉着性疾病的治疗^[2-3],但即便是植物来源的酪氨酸酶抑制剂,也常常因为存在一些稳定性及安全性的问题而限制其应用,如熊果苷由于不稳定,可分解为对骨髓有潜在毒性的含苯代谢物、曲酸,具有致癌性^[4];因此,研究安全、有效、稳定性高的新型酪氨酸酶抑制剂仍是目前国内外学者的研究热点和方向。很多传统中草药具有美白祛斑的功效^[5],这些中草药中通常含有对酪氨酸酶活性具有抑制作用的成分,并且副作用较小,因此,从中药材中筛选酪氨酸酶抑制剂并进行研究成为较好的选择。但由于中药材成分复杂,活性物质含量较低,干扰物质较多,作用机制不明确,因此,如何快速高效地从中筛选出特异性的活性物质仍然是现代药物研究的热点和难点^[6]。随着科技的发展,一些新的高通量筛选技术被开发和广泛应用于中药材中活性成分的筛选。酶抑制剂的体外筛选途径主要有基于活性的直接筛选和基于亲和作用的筛选。本文就可用于筛选中药材中酪氨酸酶抑制剂的方法及其特点进行综述,旨在为中药材中酪氨酸酶抑制剂的快速筛选提供技术参考。

活性筛选是通过测定酶促反应生成物或反应物的变化来判断待筛选物对酶的抑制效果^[7]。酪氨酸酶底物如单酚类底物酪氨酸或双酚类底物左旋多巴 (levodopa, L-DOPA) 可在酪氨酸酶的催化下生成多巴色素, 多巴色素具有一定的吸光性, 可通过测定吸光度来评估酪氨酸酶的活性。酪氨酸酶抑制剂可抑制酪氨酸酶的活性, 从而减少多巴色素的生成, 因此, 根据多巴色素含量的多少可评估酪氨酸酶的活性, 从而推算出待测物对酪氨酸酶的抑制率^[8]。

仪直接测定吸光度进行酪氨酸酶抑制剂筛选的方法是指直接将待测物与酪氨酸酶底物在酪氨酸酶的催化下进行反应,通过分光光度计或酶标仪测定多巴色素吸光度的改变来评估待测物对酪氨酸酶的抑制能力,由于该方法操作简单,因此广泛用于中药提取物中酪氨酸酶抑制剂的初步筛选或已知成分对酪氨酸酶抑制能力的验证。

胡念芳等^[9]采用分光光度计测定法研究了 31 种中草药提取物在 200 ~ 400 nm 处的紫外吸收情况,筛选出前 7 位紫外吸收较强的植物提取物,并应用 α , α -二苯基- β -苦味肼 (α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl, DPPH) 法筛选出 4 种清除 DPPH 自由基作用较强的物质,然后采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法,以维生素 C 为对照,验证了 4 种物质对酪氨酸酶的抑制作用,最终筛选出大黄、槐米、黄芩、檀香提取物 4 种具有广谱吸收性能、较强抗氧化能力及一定美白功

通信作者:李德强(1981-),男,河北廊坊人,博士,副主任药师,研究方向:中药活性成分筛选与评价;E-mail:degli@163.com。

效的植物防晒剂。穆丹丹等^[10]采用酪氨酸酶催化氧化 L-DOPA 速率法研究了 15 种中药的活性成分对酪氨酸酶的抑制作用,最终筛选出槲皮素、豆蔻明 2 种天然高效的具有酪氨酸酶抑制作用的活性成分。该方法还被用于七子美白成分、阿胶多糖、槐米、大黄、无患子等物质对酪氨酸酶抑制作用的研究^[11-17]。

应用分光光度计或酶标仪直接测定吸光度筛选酪氨酸酶抑制剂的不足之处在于其仅能判断待测物是否具有抑制酪氨酸酶活性的能力,当待测物的成分复杂时无法检测出究竟是哪一种成分具有抑制酪氨酸酶活性的能力;而且有些植物的粗提物虽然能表现出较强的抑制酪氨酸酶活性的能力,但无法经过传统的精制过程得到高活性的单体。因此,越来越多的研究人员开始采用目标明确、操作简单、筛选效率高的亲和筛选法。

1.2 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) -谱效关系筛选法 中药谱效学是指将中药指纹图谱与药效学方法结合起来,其不但能标示出中药中含有的多种成分,还能很好地揭示出这些成分与药效之间的关系^[18]。该方法常用于阐明中药中各种成分对药效的贡献程度,主要方法包括偏最小二乘回归分析法、多元线性回归分析法等^[19]。

孙慧玲等^[20]取不同采收时期的紫荆叶样品 16 批,采用偏最小二乘回归分析法,根据紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用,考察其特征图谱所代表的不同成分对该抑制作用的贡献程度,以期筛选具有抑制酪氨酸酶活性作用的天然美白原料提供理论基础和试验依据,该实验最终筛选出 6 个与对酪氨酸酶的抑制作用呈正相关的共有峰和 2 个呈负相关的共有峰。

采用 HPLC-谱效关系进行酪氨酸酶抑制剂筛选的方法得到的共有峰的峰面积与酪氨酸酶活性的相关性只能表示其作用趋势,并不能表明这些化合物对酪氨酸酶的活性起到抑制或激活作用,而且谱效关系分析的前体是以各个峰作为独立样本进行分析,忽略了不同化合物之间可能存在的相互作用。因此,得到的色谱峰所代表的化合物的结构及对酪氨酸酶的抑制作用仍需进一步鉴定。

1.3 高效薄层色谱法 (high performance thin layer chromatography, HPTLC) 自动分析筛选法 HPTLC 自动检测技术是将被分离的化合物固定在固相二氧化硅上,通过直接偶联薄层色谱板上的可视酶反应而进行的活性筛选^[21]。该方法将色谱分离的优点与活性评估相结合,为复杂植物提取物的

化学和生物筛选提供了一种简单、快速的方法^[22]。

REVOLTELLA 等^[22]用 2 种不同溶剂对 133 种欧洲植物的花、根、叶或果实进行提取,得到 476 份提取物,并采用 HPTLC 自动分析法对其进行了酪氨酸酶抑制作用的研究。该实验以曲酸作为阳性对照,分别在 HPTLC 板的前、后位置进行对照,展开剂展开并用氨水中和后,所有平板均衍生化,先用底物溶液 L-DOPA 喷洒,由于酪氨酸被氧化成相应的多巴基酮,而酪氨酸酶抑制剂在深色背景下显示白色斑点^[23],最终筛选出铁角蕨、钩状松亚种、黄芩 3 种具有较好的抑制酪氨酸酶活性的植物。

HPTLC 自动分析法用于大量样本中酪氨酸酶抑制剂的筛选具有简单、快速的优点,但仍不能确定具体为何种成分具有抑制能力,因此,目前主要用于复杂成分的初步筛选。

1.4 HPLC 联合液质联用仪 (liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS) 筛选法 HPLC 能够快速分离得到纯度高且保持活性的产物,经过分离得到的物质经活性测定后,再经 LC-MS 快速鉴定化学结构,从而可筛选出能够抑制酪氨酸酶活性的物质,该方法也越来越多地被用于酪氨酸酶抑制剂的筛选。

邢珍珍等^[24]采用 HPLC 联合 LC-MS 对甘草甜味素中抑制酪氨酸酶活性的物质进行了筛选。甘草甜味素经 HPLC 色谱柱分离后,利用二极管阵列 (photo-diode array, PDA) 检测器得到各活性组分的紫外光谱图,接取流出液在 96 孔板中与酪氨酸酶、L-DOPA 作用,利用酶标仪检测酶剩余活力,从而实现筛选的目的,然后利用 PDA 检测器及串联质谱仪进行鉴定,最终从甘草甜素中共鉴定出 4 个明显具有抑制酪氨酸酶活性的化合物,分别为甘草苷、18 α -羟基甘草次酸甲酯、甘草查耳酮 C、18 α -甘草次酸。

由于 HPLC 联合 LC-MS 进行筛选的方法需采用脱机、非在线的色谱联用技术,样品在处理过程中容易发生污染、变质和损失,因此,这也成为限制其应用的主要弊端。

2 亲和筛选法

亲和筛选是用质谱及相关技术测定抑制剂与酶的结合情况来评价酶活性,从而进行酶抑制剂的筛选^[7]。药物发挥作用的第一步是与生物大分子(如受体、酶、脱氧核糖核酸、核糖核酸等)的亲和^[25],基于亲和作用的筛选方法是一种利用大分子靶标与配体结合的原理,从复杂混合物中分离潜在配体的极为方便有效的方法^[26],例如,将靶分子亲和技术与

质谱检测技术联合的靶分子亲和质谱联用技术已经广泛应用于中药活性成分的筛选。此类方法具有高效、快速、灵敏度高、特异性强等特点^[27]。目前已报道的可用于酪氨酸酶抑制剂筛选的技术有超滤-LC-MS 技术、中空纤维固定-LC-MS 技术、涡流色谱-LC-MS 技术、基于 HPLC 的柱后衍生技术、固定化酶微反应器-毛细管电泳法。

2.1 超滤-LC-MS 技术筛选法 超滤-LC-MS 技术是利用超滤膜的分子筛作用,通过超滤离心法对靶蛋白、靶蛋白与活性小分子的结合物以及未结合的小分子物质进行分离,利用结合前后小分子物质峰面积的减少进行分析来辨别活性成分。该方法是亲和筛选法中最为常用的一种方法^[27]。

YIN 等^[28]以白藜芦醇为阳性对照,采用超滤-HPLC-PDA 检测器-LC-MS 技术和分子对接技术对木蝴蝶中潜在的酪氨酸酶抑制剂进行了筛选和鉴定,最终鉴定出 7 种与酪氨酸酶有结合亲和力的化合物,其中黄芩素和木蝴蝶苷 A 2 种化合物显示出对酪氨酸酶有较强的抑制作用。LIU^[29]等以熊果酸为阳性对照,采用亲和超滤-LC-MS 技术对葛根提取物中的酪氨酸酶抑制剂进行筛选,最终筛选出葛根素、葛根素芹菜糖苷、黄豆苷和 genistein 4 种潜在的酪氨酸酶抑制剂,经过验证,葛根素、葛根素芹菜糖苷对酪氨酸酶具有较强的抑制作用。张鸽^[30]采用离心超滤质谱技术分别从中药白附子和葛根中筛选出 5 种和 7 种酪氨酸酶抑制剂。

超滤-LC-MS 技术能对复杂中药样品中具有靶酶亲和作用的成分进行快速筛选,具有灵敏度高、分析速度快、样品用量少、高通量以及特异性强等优点,但存在因非特异性结合而出现假阳性结果的可能。

2.2 中空纤维固定-LC-MS 技术筛选法 中空纤维离心超滤装置由一根折成 U 形的中空纤维和玻璃试管组成,在离心过程中,待测样品通过中空纤维内外进行迁移运动^[31],以达到对样品分离纯化的目的。

段坤峰等^[32]采用中空纤维固定化酪氨酸酶法特异性筛选了北沙参中可抑制酪氨酸酶活性的成分,该实验采用物理吸附法把靶蛋白固定在聚丙烯中空纤维中,与样品溶液一起孵育后,将作用前后的色谱图进行对比,筛选出具有靶酶亲和作用的 5 个成分,并用对照品对其中 3 个成分(花椒毒素、补骨脂素和氧化前胡素)进行鉴定和活性验证,结果显示,这 3 种成分均有一定的抑制酪氨酸酶活性的能力,而且该方法与超滤法相比,具有酶用量少、成本低、操作简单等优点。ZHAO 等^[33]同样采用中空纤维固定化酪氨酸酶法从葛根提取物中筛选出 7 个潜

在的酪氨酸酶抑制剂,并通过 LC-MS 技术初步鉴定了其化学结构,然后对其中的 4 个化合物进行了体外活性验证,结果发现,葛根素、葛根素-6"-O-木糖苷和葛根素芹菜糖苷 3 个化合物均具有较好的抑制酪氨酸酶活性的能力。

2.3 涡流色谱-LC-MS 技术筛选法 涡流色谱柱是采用大粒径填料填充的一种色谱柱,具有液相色谱和分子排阻色谱的双重特性。流动相在高流速下可产生涡流状态,大分子的基质成分如蛋白质等还未能扩散进入填料孔隙就被快速洗脱,而小分子物质可得以保留^[27],从而起到分离大分子与小分子物质的目的。

徐敬朴等^[34]采用涡流色谱-LC-MS 技术对可药食两用的葛根中潜在的酪氨酸酶抑制剂进行筛选,具体方法:葛根提取物与酪氨酸酶共同孵育后,经涡流色谱柱分离,然后收集大分子流出物(靶酶-配体复合物),采用甲醇沉淀蛋白的方式将与酪氨酸酶结合的物质进行解离,解离液经 LC-MS 定性分析,最终筛选出 3 种可与酪氨酸酶结合的组分,并以筛选出的葛根素为代表对其抑制酪氨酸酶活性的能力进行了验证。

涡流色谱具有能快速实现对大小分子的分离、不影响靶标-分子结合的动态平衡等特点,且与超滤法相比具有较小的非特异性结合的优势。

2.4 基于 HPLC 的柱后衍生技术筛选法 基于 HPLC 的柱后衍生技术是通过将混合样品注入 HPLC 后在选定的色谱条件下进行分离,各组分从色谱柱流出后,先后与衍生化试剂在一定条件下进行反应,生成衍生产物,再依次进入检测器进行检测。柱后衍生技术是分析化学中常用的一种在线处理技术,该方法可不改变被分离物的色谱行为,并可使化合物的分离、鉴定和活性评价有机结合,一次进样即可同时获得化合物的化学和生物活性信息。

罗碧^[35]建立了一种基于 HPLC 的柱后衍生法用于薰衣草花提取物中酪氨酸酶抑制剂的快速筛选,具体方法是在优化好条件后,先用已知的强效酪氨酸酶抑制剂对该系统进行可靠性验证,然后运用该系统从薰衣草花提取物中发现了 3 种可抑制酪氨酸酶活性的成分,并经分离纯化确定了其中一种化合物为 5-羟甲基-糠醛。王立军^[36]同样利用 HPLC 柱后衍生技术对白芍、桑白皮提取物中的活性成分进行在线筛选,得到了没食子酸等 6 种酪氨酸酶抑制剂。

与已有的在线筛选方法相比,基于 HPLC 的柱后衍生法具有省时、省力、结果准确的特点,但由于

该方法需针对不同的药物靶标开发出专属、灵敏、稳定的在线酶活性检测方法,因此该方法并不适用于所有药物;而且该法需要将靶标持续泵入分析系统,成本较高。

2.5 固定化酶微反应器-毛细管电泳筛选法 对酶抑制剂进行筛选的毛细管电泳主要有 2 种模式:(1)酶反应脱机进行的毛细管前酶分析;(2)将取样、反应、分离、检测集成在单个毛细管中的毛细管内酶分析法。毛细管内酶分析法包括电泳介导微分析和固定化酶微反应器 2 种方式,实现了自动操作,降低了样品和溶液的消耗^[37]。以固定化酶作为催化剂进行酶促反应的装置称为固定化酶反应器,固定化酶是通过物理或化学的方法,将酶束缚于水不溶性的载体或一定的空间内,限制了酶分子的自由流动,但是酶能充分发挥其催化作用^[38]。在线固定化酶微反应器具有分析时间快、样品操作次数少、可重复使用和延长酶的贮存时间等优点。

CHENG 等^[39]建立了一种利用在线固定化酶微反应器-毛细管电泳技术从中药材中筛选酪氨酸酶抑制剂的新方法,并通过分子对接技术研究了酶与抑制剂之间的分子相互作用。为了缩短分析时间,提高筛选效率,该研究在毛细管电泳中采用了短端进样工艺,从毛细管出口端依次进行基质(L-DOPA)和产物的采样、酶反应、分离和检测,并用已知的酪氨酸酶抑制剂曲酸对该方法进行了验证,最终从 15 种中药材中发现槲皮素、山奈酚、巴伐其素和巴枯酚 4 种具有酪氨酸酶抑制作用的成分。该方法具有样品消耗少、实验成本低、操作自动化、分析速度快的优点,有利于进行酪氨酸酶抑制剂的高通量筛选。

3 结语

中药成分复杂多样,开发出切实可行的活性成分快速识别方法并将识别到的活性成分提取纯化用于现代医学研究以使更多的患者获益,是现代中药研究与开发的关键。随着科学技术的不断发展,越来越多的新技术被用于中药等复杂体系中活性成分的筛选。除本文中总结的技术外,分子排阻色谱-质谱联用技术、限制介入-质谱联用技术等均可用于中药等复杂体系中活性成分的快速筛选,或许也可应用于酪氨酸酶抑制剂的筛选。为了加快酪氨酸酶抑制剂的研究进程,希望未来有更多高效率、低成本、操作简单的方法能得到开发和应用。

参考文献:

[1] HAŁDYS K, GOLDEMAN W, ANGER-GÓRA N, *et al.* Monosub-

stituted acetophenone thiosemicarbazones as potent inhibitors of tyrosinase: synthesis, inhibitory studies, and molecular docking [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(1): 74.

[2] 朱丹, 陈胜凯, 谢萍, 等. 橘黄酮抗氧化活性及抑制酪氨酸酶活性的研究[J]. *生物化工*, 2020, 6(1): 79-81, 93.

[3] 胡泳华, 贾玉龙, 陈清西. 酪氨酸酶抑制剂的应用研究进展[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2016, 55(5): 760-768.

[4] 马梓育, 陆洋. 体内黑色素合成、调控及常用天然、中药来源的黑色素抑制剂[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24): 5898-5916.

[5] 张国哲, 刘平平, 季禹乔, 等. 不同中药乙醇提取物对酪氨酸酶抑制活性的比较[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(16): 34-36, 48.

[6] 尹星烁, 李国芳, 李德强. 色谱联用技术在中药酪氨酸酶抑制药筛选中的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(7): 910-912.

[7] 朱黎, 邹旋, 刘堂荣, 等. 质谱技术在酶抑制剂筛选中的研究进展[J]. *药学报*, 2019, 54(5): 818-827.

[8] ZOLGHADRI S, BAHRAMI A, KHAN M T H, *et al.* A comprehensive review on tyrosinase inhibitors [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019, 34(1): 279-309.

[9] 胡念芳, 熊丽丹, 李利. 植物防晒剂的筛选及防晒机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(1): 347-350.

[10] 穆丹丹, 俞桂新. 15 种中药活性单体化合物对酪氨酸酶抑制作用研究[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(70): 153-154.

[11] FAN M H, ZHANG G W, HU X, *et al.* Quercetin as a tyrosinase inhibitor: inhibitory activity, conformational change and mechanism [J]. *Food Res Int*, 2017, 100(1): 226-233.

[12] 陈森, 陈俊洩, 冯孝杰, 等. 七子白美白成分筛选及提取工艺研究[J]. *中医药导报*, 2019, 25(15): 56-58.

[13] 刘春媛, 廖峰, 汝文文, 等. 阿胶粗多糖脱蛋白方法比较及抑制酪氨酸酶活性研究[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(3): 182-184, 235.

[14] 谢凡, 姚佳晨, 陈丽文, 等. 十味归白散对酪氨酸酶活性及诱导豚鼠皮肤色素沉着的抑制作用[J]. *西北药学杂志*, 2020, 35(3): 396-400.

[15] 高彤彤, 许云, 晏志勇. 不同配比美白中药方剂乙醇提取物对酪氨酸酶抑制效果比较[J]. *中药材*, 2015, 38(5): 1039-1041.

[16] 王勇恒, 梁彦会, 孙培冬. 川芎提取物美白双靶点活性研究[J]. *日用化学工业*, 2020, 50(4): 249-254.

[17] 刘俊宏, 邱智东. 无患子总皂苷提取工艺优化及其对酪氨酸酶的抑制活性[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(9): 228-232.

[18] 曾令军, 林兵, 宋洪涛. 中药谱效关系研究进展及关键问题探讨[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(8): 1425-1432.

[19] 吕邵娃, 董书羽, 郭玉岩, 等. 数据分析技术在中药谱效关系中的应用进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(15): 226-230.

[20] 孙慧玲, 何楠, 史梦珺, 等. 紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性抑制作用的谱效关系研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(24): 3340-3343.

[21] BRĂM S, WOLFRAM E. Recent advances in effect-directed enzyme assays based on thin-layer chromatography [J]. *Phytochem Anal*, 2017, 28(2): 74-86.

[22]

REVOLTELLA S, RAINER B, WALTENBERGER B, *et al.* HPTLC autography based screening and isolation of mushroom tyrosinase inhibitors of European plant species [J]. *Chem Biodivers*,2019,16(3):1-12.

[23]

TAIBON J,ANKLI A,SCHWAIGER S,*et al.* Prevention of false-positive results;development of an HPTLC autographic assay for the detection of natural tyrosinase inhibitors [J]. *Planta Med*, 2015,81(12/13):1198-1204.

[24]

邢珍珍,孟庆艳,卢亚玲,等. 甘草甜味素中酪氨酸酶抑制剂的筛选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):163-166.

[25]

LI S P,ZHAO J,YANG B. Strategies for quality control of Chinese medicines[J]. *J Pharm Biomed Anal*,2011,55(4):802-809.

[26]

HOU X F,SUN M,BAO T. Recent advances in screening active components from natural products based on bioaffinity techniques [J]. *Acta Pharm Sin B*,2020,10(10):1800-1813.

[27]

李德强,肖媛媛,戴荣源,等. 靶分子亲和-质谱联用技术在中药活性成分筛选中的应用进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2015,31(21):2164-2169.

[28]

YIN X S,ZHANG X Q,YIN J T,*et al.* Screening and identification of potential tyrosinase inhibitors from semen oroxyli extract by ultrafiltration LC-MS and in silico molecular docking[J]. *J Chromatogr Sci*,2019,57(9):838-846.

[29]

LIU H C,ZHU Y T,WANG T,*et al.* Enzyme-site blocking combined with optimization of molecular docking for efficient discovery of potential tyrosinase specific inhibitors from puerariae lobatae radix[J]. *Molecules*,2018,11(23):2612.

[30]

张鸽. 超滤离心质谱法筛选中药中的酶抑制剂[D]. 大连:大连理工大学,2017.

[31]

陈颖,李琰,雷真真,等. 用中空纤维离心超滤法联合 HPLC-MS/MS 测定人血浆中游离型氯氮平的浓度[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(11):1571-1574.

[32]

段坤峰,尹星烁,郑旭光,等. 中空纤维固定化酪氨酸酶法快速筛选北沙参中抗黑色素生成活性成分[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(19):2412-2414.

[33]

ZHAO C P,YIN S J,CHEN G Y,*et al.* Adsorbed hollow fiber immobilized tyrosinase for the screening of enzyme inhibitors from Pueraria lobata extract [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021,193:113743.

[34]

徐敬朴,程新杰,卞广丽,等. 离线二维液质联用法快速筛选葛根中酪氨酸酶抑制剂[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(15):2317-2319.

[35]

罗碧. 基于 HPLC 柱后衍生的天然酪氨酸酶抑制剂筛选新方法研究[D]. 阿拉尔:塔里木大学,2015.

[36]

王立军. 白芍及桑白皮中酪氨酸酶抑制剂的筛选及其活性成分的抑制动力学研究[D]. 阿拉尔:塔里木大学,2016.

[37]

CHENG M X,CHEN Z L. Recent advances in screening of enzymes inhibitors based on capillary electrophoresis[J]. *J Pharm Anal*,2018,8(4):226-233.

[38]

闵文傲. 固定化酶微反应器-毛细管电泳法在线筛选酶抑制剂的研究[D]. 金华:浙江师范大学,2012.

[39]

CHENG M X,CHEN Z L. Screening of tyrosinase inhibitors by capillary electrophoresis with immobilized enzyme microreactor and molecular docking[J]. *Electrophoresis*,2017,38(3/4):486-493.

(本文编辑:李胜利)

(上接第 295 页)

[19]

PATEL A,SABBINENI H,CLARKE A,*et al.* Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to- mesenchymal transition,vascular permeability,microinvasion and metastasis[J]. *Life Sci*,2016,157:52-61.

[20]

ZHANG S,YU D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies;turning promise into triumph [J]. *Trends Pharmacol Sci*,2012,33(3):122-128.

[21]

CHEN R,CHEN B. The role of dasatinib in the management of chronic myeloid leukemia[J]. *Drug Des Devel Ther*,2015,9:773-779.

[22]

KONG D,BANERJEE S,AHMAD A,*et al.* Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells [J]. *PLoS One*, 2010,5(8):e12445.

[23]

吴婉柳,沈俊岭,任周新,等. 中药抗组织纤维化与肿瘤上皮间充质转化的作用及机制研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2020,37(4):391-396.

[24]

WHITEMAN E L,LIU C J,FEARON E R,*et al.* The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes[J]. *Oncogene*,2008,27(27):3875-3879.

[25]

DYBDAL-HARGREAVES N F,RISINGER A L,MOOBERRY S L. Regulation of E-cadherin localization by microtubule targeting agents;rapid promotion of cortical E-cadherin through p130Cas/ Src inhibition by eribulin [J]. *Oncotarget*, 2017,9(5):5545-5561.

[26]

谭琪. Slt₂-Robo1 信号通过活化 Src 诱导 E-cadherin 磷酸化及上皮-间质转化的研究[D]. 广州:南方医科大学,2020.

[27]

GEORGIOLOS A,BATISTATOU A,MANOLOPOULOS L,*et al.* Role and expression patterns of E-cadherin in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2006,25(1):5-14.

[28]

ZOU D,YOON H S,ANJOMSHOAA A,*et al.* Increased levels of active c-Src distinguish invasive from in situ lobular lesions[J]. *Breast Cancer Res*,2009,11(4):R45.

[29]

NAGATHIHALLI N S,MERCHANT N B. Src-mediated regulation of E-cadherin and EMT in pancreatic cancer[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*,2012,17(7):2059-2069.

(本文编辑:周二强)