

天然药物中乙酰胆碱酯酶抑制剂的快速发现

王蕊¹, 赵川^{2*}, 唐生安^{3*}

1. 天津市和平区中医医院, 天津 300050

2. 天津医科大学基础医学院, 天津 300070

3. 天津医科大学药学院, 天津 300070

摘要: **目的** 建立从天然药物中快速发现乙酰胆碱酯酶抑制剂的有效方法, 为中药及其活性成分治疗阿尔茨海默病提供支持。**方法** 通过 Ellman 比色法, 对多种药用植物乙醇提取物的抗乙酰胆碱酯酶活性进行评价, 筛选出活性较好的提取物样品, 应用亲和超滤超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 联用技术分离鉴定其中的活性成分。

结果 元胡、黄柏、钩藤、血三七具有较强的乙酰胆碱酯酶抑制活性。经过快速筛选, 发现 3-二氢异卡丹宾或者 3-二氢卡丹宾、钩藤碱、异钩藤碱、柯诺辛或异柯诺辛可能为钩藤中的活性化合物。**结论** 采用亲和超滤 UPLC-Q-TOF/MS 联用技术从天然药物中快速筛选出乙酰胆碱酯酶抑制剂, 方法可行、快速, 能够为治疗阿尔茨海默病的新药开发提供先导化合物。

关键词: 乙酰胆碱酯酶; Ellman 比色法; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱; 活性筛选; 亲和超滤技术; 天然产物
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)24-5756-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.005

Rapid discovery of acetylcholinesterase inhibitors from natural organism

WANG Rui¹, ZHAO Chuan², TANG Sheng-an³

1. Tianjin Heping Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300050, China

2. School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: **Objective** To establish an effective method to rapidly detect acetylcholinesterase inhibitors from natural products, and provide support for the treatment of Alzheimer's disease with Chinese medicine and its active ingredients. **Methods** The activity of restraining acetylcholinesterase of crude extracts of a variety of medicinal plants were evaluated by applying Ellman's colorimetric, and the better activity of the extract sample solution was filtered out. The active ingredients of medicinal plants were identified and separated by the application of AS/UF-UPLC-MS. **Results** According to the experimental data, *Corydalis yanhusuo*, *Phellodendron chinense*, *Uncaria rhynchophylla*, and *Gynura segetum* had significant restraining acetylcholinesterase activity. Rapid screening showed that 3 α -dihydrocadambine, 3 α -isodihydrocadambine, rhynchophylline, isorhynchophylline, corynoxine, and isocorynoxine were active ingredients in *U. rhynchophylla*. **Conclusion** The results suggest that it is feasible to screen acetylcholinesterase inhibitors from natural organism plants. Using AS/UF-UPLC-MS methods, leading compounds for the development of new drugs for Alzheimer's disease would be developed and provided.

Key words: acetylcholinesterase; Ellman's method; UPLC-Q-TOF/MS technology; activity screening; affinity ultrafiltration; natural products

阿尔茨海默病 (Alzheimer's, AD) 是一种多发生于老年人中的神经退行性疾病, 主要影响老年人的中枢神经系统, 出现脑组织退化、神经功能丧失, 最终导致死亡。AD 已经成为继心血管疾病和肿瘤之后严重威胁老年人生命健康的主要疾病之一, 预测

到 2050 年, 受其影响人数将超过 1.14 亿^[1]。乙酰胆碱酯酶 (acetyl cholinesterase, AChE) 是 AD 的一个酶抑制剂作用靶点, AChE 催化乙酰胆碱的裂解反应, 导致乙酰胆碱的缺失, 直接造成神经信号传递失败, 引起 AD^[2-3]。目前大多数已上市的治疗

收稿日期: 2018-09-12

作者简介: 王蕊 (1985—), 女, 本科, 研究方向为中药学。

*通信作者 唐生安 (1977—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然药物化学。E-mail: tangshengan@tmu.edu.cn

赵川 (1983—), 男, 博士, 高级实验师, 研究方向为天然药物化学。E-mail: zhaochuan@tmu.edu.cn

AD 的药物大部分为乙酰胆碱酯酶抑制剂 (acetylcholinesterase inhibitors, AChEI), 如加兰他敏、卡巴拉汀、多奈哌齐等, 其长期服用的有效性有待商榷^[4]。

近年来, 研究人员从天然药物中开发、寻找适宜长期服用、毒副作用小等优点的 AD 治疗药物, 发现了一些具有 AChE 抑制活性的单体成分, 主要为生物碱、萜类、黄酮和香豆素类^[2,5-6]。本实验以多种天然药用植物为研究对象, 采用 Ellman 比色法对多种药用植物的乙醇提取物进行活性初筛, 对于活性显著的提取物, 应用亲和超滤超高效液相色谱-质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 联用技术快速筛选鉴别, 为药用植物中 AChEI 的快速筛选、鉴别提供方法和技术支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Acquity 超高效液相色谱仪、紫外检测器、Synapt Q-TOF MS (美国沃特斯公司); SHB-III A 循环水式多用真空泵、DLSB 低温冷却循环泵 (上海豫康科教仪器设备有限公司); RE-2000 旋转蒸发器 (上海洪旋实验仪器有限公司); KQ-200VDE 型双频数控超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 10KD 超滤离心管 (美国密理博公司); Avanti J-26XP 高速冷冻离心机 (美国贝克曼库尔特公司); SynergyMx 多功能酶标仪 (美国伯腾公司); BT-125D 电子天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

1.2 药品与试剂

黄柏、百部、元胡、平贝母、荷叶、布渣叶、钩藤、博落回、珠芽艾麻、活血莲、青刺尖、雄黄连、山鸡椒、雷公藤、落新妇、血三七、空心莲子草等药材均于 2013 年购自河北安国药材市场, 由天津医科大学药学院唐生安副教授鉴定分别为芸香科黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮; 百部科蔓生百部 *Stemona japonica* (Bl.) Miq. 的干燥块根; 罂粟科延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎; 百合科平贝母 *Fritillaria ussuriensis* Maxim. 的干燥鳞茎; 睡莲科莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶; 椴树科破布叶 *Microcos paniculata* L. 的干燥叶; 茜草科钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil 的带钩干燥枝茎; 罂粟科博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. 的带根全草; 荨麻科珠芽艾麻 *Laportea bulbifera* (Sieb. et Zucc.) Wedd. 的带根全草; 毛茛科聚叶花蓼乌头 *Aconitum scaposum*

Franch. var. *vaginatatum* (Pritz.) Rapaics 带根全草; 蔷薇科扁核木 *Prinsepia utilis* Royle 的全株; 蓼科毛脉蓼 *Polygonum ciliinerve* (Nakai) Ohwi 的干燥块根; 樟科山鸡椒 *Litsea cubeba* (Lour) Pers. 的果实; 卫矛科雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的块根; 虎耳草科落新妇 *Astilbe chinensis* (Maxim.) Franch. et Sav. 的全草; 蓼科中华抱茎蓼 *Polygonum amplexicaule* D. Don var. *sinense* Forbes et Hemsl. 的干燥根茎; 苋科空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. 的全草。乙醇 (分析纯)、甲醇 (色谱纯)、稀盐酸、氢氧化钠、二甲基亚砜 (DMSO) 均购自天津基准化学试剂有限公司; 毒扁豆碱、AChE、5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) (dithiobisnitrobenzoic acid, DTNB) 均购自 Sigma 公司; 碘化硫代乙酰胆碱 (acetylthiocholine, ATCI, Fluka 公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液的配制

药用植物样品粉碎, 100 g 样品粉末用 95% 乙醇在 80 °C 水浴中回流提取 2 次, 每次 2 h。合并乙醇提取液滤过, 滤液减压浓缩至浸膏。粗提物浸膏各取 0.1 g, 用 5 mL 蒸馏水溶解, 离心得到上清液, 滤过, 滤液在减压条件下蒸干, 称定质量, PBS 缓冲液 (pH 8.0) 配制成 10 mg/mL 样品储备溶液, 4 °C 冰箱中保存。取储备溶液 10 μL, 加入 90 μL PBS 缓冲液 (pH 8.0) 稀释成 1 mg/mL 的供试品溶液。

2.2 对照品溶液的配制

2.2.1 AChE 溶液 精密称取 AChE, 溶解于 PBS 缓冲液 (pH 8.0) 中, 配制成 0.28 U/mL 的酶溶液供 Ellman 比色法使用; 配制成 7.8 mg/mL 的酶溶液供 AChEI 的鉴别使用。

2.2.2 毒扁豆碱溶液 称取 2 mg 的毒扁豆碱粉末溶解在 2 mL 的无水甲醇中, 充分震荡, 配制成 0.125 mg/mL 的待用溶液。

2.2.3 DTNB 溶液 精密称取适量 DTNB 粉末, 用 DMSO 配制成 0.1 mol/L 的储备液, 实验所需时用 PBS 缓冲液 (pH 8.0) 配制成 0.01 mol/L 的溶液。

2.2.4 ATCI 溶液 精密称取适量 ATCI 粉末, 用 PBS 缓冲液 (pH 8.0) 配制成 0.075 mol/L 的溶液。

2.3 色谱条件

BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相甲醇 (A)-水 (B)。使用前超声脱气, 0.22 μm 微孔滤膜滤过; 梯度洗脱程序: 0~3 min, 20% A; 3~7 min, 20%~100% A; 7~9 min, 100% A; 柱

温为 30 ℃, 体积流量 0.4 mL/min, 进样量 5 μL, 检测波长 254 nm。

2.4 质谱条件

采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式检测, 毛细管电压 3.1 kV, 锥孔电压 35 V; 离子源温度 110 ℃, 脱溶剂气温度 400 ℃; 锥孔气流量 50 L/h; 脱溶剂气为氮气, 体积流量 800 L/h; 扫描范围 m/z 50~1 200。

2.5 Ellman 比色法评价药用植物粗提物的 AChE 抑制活性

取 140 μL PBS 缓冲液 (pH 8.0), 20 μL 药用植物供试品溶液, 15 μL 0.28 U/mL 的 AChE 溶液在微孔里混合, 震荡混匀 10 min, 4 ℃ 培养 20 min, 依次加入 10 μL DTNB 溶液、10 μL ATCI 溶液开始反应, 震荡混匀 10 min。37 ℃ 培养 20 min 后, 405 nm 下测量吸光度 (A) 值。数据分为 4 组, 分别为实验组、阳性控制组 (毒扁豆碱溶液代替供试品溶液), 空白组 (pH 8.0 PBS 缓冲液代替供试品溶液), 实验控制组 (pH 8.0 PBS 缓冲液代替 AChE 溶液)。抑制率 (I) 通过公式计算, 所用样品平行进行 3 次, 取平均值^[7-9]。

$$I = [(A_{\text{空白}} - A_{\text{阳性控制}}) - (A_{\text{实验}} - A_{\text{实验控制}})] / (A_{\text{空白}} - A_{\text{阳性控制}})$$

2.6 亲和超滤技术对 AChEI 的鉴别

取 12.5 μL 供试品储备液 (10 mg/mL), 依次加入 462.5 μL PBS 缓冲液 (pH 8.0)、25.0 μL AChE 溶液, 在 37 ℃ 下孵育 30 min, 采用离心超滤管在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min, 然后用 500 μL PBS 缓冲液 (pH 8.0) 冲洗超滤管内壁, 同样在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃掉滤液, 重复 2 次。加入 500 μL 甲醇反应 20 min, 使酶变性, 在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min, 再用 250 μL 甲醇冲洗超滤管内壁, 在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min, 重复 2 次, 合并滤液。滤液在减压条件下蒸干后, 加入 100 μL 50% 甲醇溶解, 用 UPLC-TOF/MS 测定。数据分为 2 组, 分别为实验组和空白组 (pH 8.0 PBS 缓冲液代替 AChE 溶液)。

3 结果与分析

3.1 Ellman 比色法测定结果

实验结果显示, 在质量浓度为 1 mg/mL 时, 黄柏、元胡、钩藤、血三七的粗提取物显示了较为显著的 AChE 抑制活性, 百部、平贝母、荷叶、布渣叶 (枝)、布渣叶 (叶)、布渣叶总生物碱、博落回、珠芽艾麻、活血莲、青刺尖 (叶)、雄黄连、雷公藤、

落新妇、空心莲子草的粗提取物显示了弱的 AChE 抑制活性。实验中均以毒扁豆碱为阳性对照, 其 I 为 100% (图 1)。

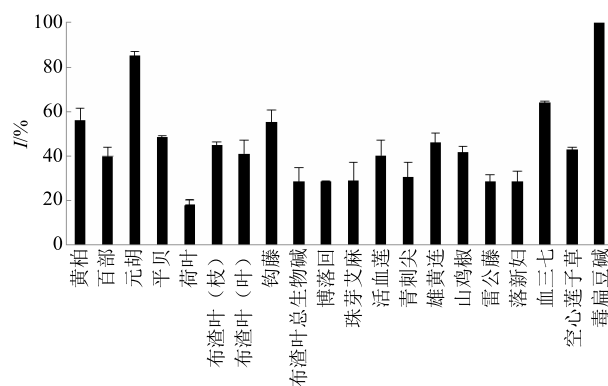


图 1 药用植物粗提物的 AChE 抑制活性

Fig. 1 Acetylcholinesterase inhibitory activity of crude extracts from medicinal plants

3.2 钩藤提取物液质联用法测定结果

通过“3.1”项结果可知, 黄柏、元胡、钩藤、血三七的粗提取物具有明显的 AChE 抑制活性。有文献报道^[10-11], 钩藤提取物及其活性成分具有神经保护、改善记忆损伤等作用, 有预防治疗 AD 的潜能。为此, 选择钩藤作为实验对象, 采用亲和超滤超高效液相色谱-质谱联用技术对样品中 AChEI 进行快速筛选 (图 2、3)。

分析钩藤的总离子流图, 发现相对于空白组, 实验组在 3.59、4.22 min 处离子流峰强有较大的增强, 因此可以推断这几个离子流峰相对应的化合物应该为与酶结合的化合物, 为 AChEI。质谱分析得

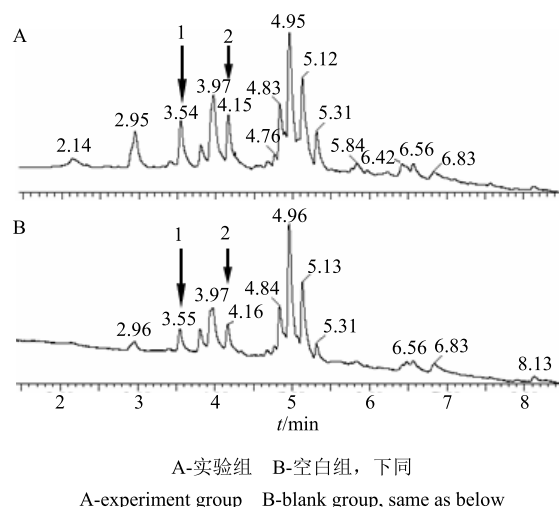


图 2 钩藤提取物的液相色谱图

Fig. 2 UPLC of extracts from *U. rhynchophylla*

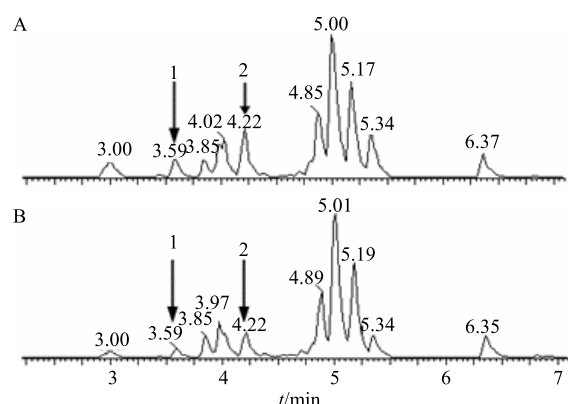


图 3 钩藤提取物的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram for extract from *U. rhynchophylla*

表 1 钩藤提取物 UPLC-Q-TOF/MS 分析结果

Table 1 Analysis results for *U. rhynchophylla* by UPLC-Q-TOF/MS

峰号	t_R/min	分子式	质荷比 (m/z)		化学成分
			实测值	理论值	
1	3.59	$\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_{10}$	547.228 9	547.229 2	3-二氢异卡丹宾/3-二氢卡丹宾
2	4.22	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$	385.222 7	385.212 7	钩藤碱/异钩藤碱/柯诺辛/异柯诺辛

亲和超滤技术结合了亲和色谱与超滤技术的优点, 适合对成分复杂的中药提取物进行分离纯化。与传统的中药成分分离手段相比, 亲和超滤技术同时具有较高的选择性与较强的处理能力。提取液中目标组分相对分子质量较小, 能顺利通过超滤膜; 而当其与大分子配体结合形成复合物后, 则被超滤膜截留, 用合适的洗脱液处理可以使目标组分分离出来, 进而达到分离纯化的目的^[12-15]。本实验中, 应用亲和超滤液质联用技术对天然药物的粗提物进行 AChEI 的分离、鉴别, 取得了初步的成果, 说明此种分离、鉴别方式是可行的, 能够为开发治疗 AD 的新药提供有用的先导化合物。

参考文献

- [1] Liu X L, Cao P, Yang J Z, *et al.* Linearized and kernelized sparse multitask learning for predicting cognitive outcomes in Alzheimer's disease [J]. *Comput Math Method M*, 2018, doi: 10.1155/2018/7429782.
- [2] Murraya P A, Faraonia M B, Castroa M J, *et al.* Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2013, 11(4): 388-413.
- [3] Khaled N Z R, Ana C C S, Paulo M P F, *et al.*

到其相对分子质量分别为 546 (3.59 min)、384 (4.22 min)。根据相对分子质量检索钩藤的化学成分, 查阅对应的化合物, 相对分子质量 546 对应的化合物为 3-二氢异卡丹宾或者 3-二氢卡丹宾; 相对分子质量 384 对应的化合物为钩藤碱、异钩藤碱、柯诺辛或异柯诺辛 (表 1)。

4 讨论

通过 Ellman 比色法评价了共 19 种天然产物粗提物的抗 AChE 活性, 结果显示, 黄柏、元胡、钩藤、血三七的粗提取物具有较为显著的 AChE 抑制活性。应用亲和超滤液质联用技术对钩藤粗提物进行乙酰胆碱酯酶抑制剂的分离、鉴别, 发现化合物 3-二氢异卡丹宾或者 3-二氢卡丹宾; 钩藤碱、异钩藤碱、柯诺辛或异柯诺辛为活性化合物。

Phytoconstituents and evaluation of acetylcholinesterase inhibition by methanol extract of *Liquidambar styraciflua* (L.) aerial parts [J]. *J Appl Pharm*, 2014, 2(6): 143-152.

- [4] Čolović M B, Krstić D Z, Lazarević-Pašti T D, *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2013, 11(3): 315-335.
- [5] Koirala P, Seong S H, Jung H A, *et al.* Comparative evaluation of the antioxidant and anti-Alzheimer's Disease potential of coumestrol and puerarol isolated from *Pueraria lobata* using molecular modeling studies [J]. *Molecules*, 2018, doi: 10.3390/molecules23040785.
- [6] Yang Z, Duan D Z, Xue W W, *et al.* Steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica* as acetylcholinesterase inhibitors and the investigation for structure-activity relationships [J]. *Life Sci*, 2012, 90(23/24): 929-933.
- [7] 杨中锋, 赖东海, 张东博, 等. 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的总生物碱提取物的筛选 [J]. *中医药学报*, 2011, 39(3): 71-74.
- [8] Elsa R, Goran S, Mira S S, *et al.* Comparison of protocols for measuring activities of human blood cholinesterases by the Ellman method [J]. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2000, 51(1): 13-18.
- [9] 宋波, 李宗阳, 刘亚旻, 等. 独活抑制乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶活性研究 [J]. *中南药学*, 2011, 9(10):

- 721-724.
- [10] Xian Y F, Mao Q Q, Wu J C, *et al.* Isorhynchophylline treatment improves the amyloid- β -induced cognitive impairment in rats via inhibition of neuronal apoptosis and tau protein hyperphosphorylation [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 39(2): 331-346.
- [11] Matsumoto K, Zhao Q, Niu Y, *et al.* Kampo formulations, chotosan, and yokukansan, for dementia therapy: Existing clinical and preclinical evidence [J]. *J Pharm Sci*, 2013, 122(4): 257-269.
- [12] Mike S L, Edward H K. LC/MS applications in drug development [J]. *Mass Spectrom Rev*, 1999, 18(3/4): 187-279.
- [13] Ranjith M, Vanisree M, Angela I C. Screening of natural compounds for ligands to PfTrxR by ultrafiltration and LC-MS based binding assay [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2011, 55(2): 265-271.
- [14] 曾宪放. 亲和超滤新技术及其在生物工程中的应用 [J]. 生命的化学, 1991, 11(6): 27-29.
- [15] 吴新安, 付贵峰, 朱捷, 等. 亲和超滤技术快速发现中药中抗炎成分的方法学 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(8): 759-762.