

多裂骆驼蓬中乙酰胆碱酯酶抑制剂的靶向筛选及其抑制作用机制

郭炎峰¹, 付小珊¹, 李 霄², 黄丹蓉², 赵思同¹, 张爱芹^{1*}, 申刚义^{2*}

1. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

2. 中央民族大学药学院 民族医药教育部重点实验室, 北京 100081

摘要: 目的 采用亲和超滤-液质联用技术 (affinity ultra-filtration-liquid chromatography-mass spectrometry, AUF-LC-MS) 靶向筛选特色药材多裂骆驼蓬中的乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 抑制剂, 并探究其抑制机制。方法 采用 Ellman 法评价多裂骆驼蓬不同极性部位提取物的 AChE 抑制活性, 采用 AUF-LC-MS 对活性成分精准筛选和鉴定。利用酶抑制动力学、分子对接和分子动力学模拟探究活性成分对 AChE 抑制作用机制。结果 从二氯甲烷和正丁醇 2 个部位共筛选出 7 个活性成分, 包括 1 个黄酮类和 6 个生物碱。酶抑制动力学显示 7 种成分分属于可逆竞争型 (蒙花苷)、可逆非竞争型 (鸭嘴花碱、鸭嘴花酮碱、哈尔酚) 和可逆混合型 (脱氧鸭嘴花碱、脱氧鸭嘴花酮碱、去氢骆驼蓬碱) 3 种抑制类型。分子对接显示, 活性成分与 AChE 有良好的结合性能, 不同抑制剂的结合位点和作用力存在差异。分子动力学模拟表明体系已达稳定, 在动态结合过程中, 抑制剂与 AChE 存在与分子对接过程中类似的强且稳定的相互作用。结论 相关研究为诠释多裂骆驼蓬防治阿尔茨海默病提供科学依据, 为发现高效低毒 AChE 抑制剂提供新参考。

关键词: 阿尔茨海默病; 乙酰胆碱酯酶抑制剂; 多裂骆驼蓬; 亲和超滤-液质联用; 抑制机制; 蒙花苷; 鸭嘴花碱

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)19-7532-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.19.004

Targeted screening of acetylcholinesterase inhibitors from *Peganum multisectum* and their mechanisms of inhibition

GUO Yanfeng¹, FU Xiaoshan¹, LI Xiao², HUANG Danrong², ZHAO Sitong¹, ZHANG Aiqin¹, SHEN Gangyi²

1. College of Life and Environment Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. School of Pharmacy, Key Laboratory of Ethnomedicine, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract: Objective To screen acetylcholinesterase (AChE) inhibitors from the specific medicinal herbs *Peganum multisectum* by affinity ultra-filtration-liquid chromatography-mass spectrometry (AUF-LC-MS), and to explore their inhibition mechanisms. **Methods** The AChE inhibitory activities of various polar fractions of *P. multisectum* were evaluated by Ellman's test, and the active components were precisely screened by AUF-LC-MS. The action mechanisms of the active components on AChE were investigated by enzyme inhibition kinetics, molecular docking and molecular dynamics simulations. **Results** A total of seven active components, including one flavonoid and six alkaloids, were identified from the dichloromethane and *n*-butanol fractions. Enzyme inhibition kinetics suggested that these components belonged to three inhibition types: reversible competitive inhibition (linarin), non-competitive (vasicine, vasicinone and harmol), and reversible mixed inhibition (deoxyvasicine, deoxyvasicinone and harmaline). Molecular docking results revealed that all compounds exhibited good affinities to AChE. And the binding sites and interaction forces of these inhibitors with AChE differed. Molecular dynamics simulation indicated that the system had reached a stable state, and the inhibitors had strong and stable interactions with AChE. **Conclusions** This study provided a scientific basis for elucidating the potential of *P. multisectum* in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and offered a new reference for the discovery of high-efficiency AChE inhibitors.

收稿日期: 2026-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82374161); 中央高校基本科研业务费-中央民族大学交叉学科研究专项 (2024JCYJ09); 北京市级大学生科学研究与创业行动计划项目 (BEIJ2024110151)

作者简介: 郭炎峰 (2004—), 本科生, 从事天然产物开发。Tel: (010) 68932241 E-mail: 23011930@muc.edu.cn

*通信作者: 张爱芹, 博士, 研究方向为生物相互作用机制。Tel: (010) 68932241 E-mail: zhangaiqin582@163.com

申刚义, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药与民族药分析方法的开发。Tel: (010) 68939942 E-mail: shengyi@muc.edu.cn

Key words: Alzheimer's disease; acetylcholinesterase inhibitors; *Peganum multisectum* (Maxim.) Bobr.; affinity ultra-filtration-liquid chromatography-mass spectrometry; inhibition mechanism; linarin; vasicine

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经系统退行性疾病, 俗称老年痴呆。随着全球人口老龄化进程加速, AD 已成为当前社会面临的重大公共卫生挑战。深入探究 AD 发病机制、开发高效抗 AD 药物是医学界最关注的重大课题之一。

胆碱能系统损伤学说是最早提出的 AD 病理理论。抑制乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 活性是改善 AD 症状的核心治疗策略之一^[1-2]。目前临床获批的 AChE 抑制剂仅能暂缓症状, 无法阻断疾病进展, 且存在胃肠道反应、肝毒性等不良反应^[3]。因此, 筛选高效低毒的 AChE 抑制剂尤为重要^[4]。

中药材作为我国特色传统药物, 蕴涵丰富且类型多样的活性成分, 是新药发现的源头。多裂骆驼蓬 *Peganum multisectum* (Maxim.) Bobr. 是中医和维吾尔医常用药材, 在解郁补脑、改善认知等方面具有悠久临床应用历史^[5]。药理学研究表明该植物中的多种活性成分可显著改善 AD 模型小鼠的学习记忆能力, 但其抑制 AChE 药效物质基础及其抑制作用机制尚未明确^[6-7]。

课题组前期利用 UPLC-MS/MS 技术, 从多裂骆驼蓬中鉴定出多种主要活性成分^[8]。本研究进而以 AChE 为靶点, 利用亲和超滤-液质联用 (affinity ultra-filtration-liquid chromatography-mass spectrometry, AUF-LC-MS) 技术从多裂骆驼蓬中靶向垂钓筛选 AChE 抑制剂。结合酶抑制动力学、分子对接及分子动力学方法系统探究活性成分对 AChE 的抑制作用机制, 从分子水平探讨活性成分与 AChE 的结合模式, 解析作用力类型和结合位点特征等相互作用, 以期抗 AD 药物开发提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

三重四极杆-线性离子阱复合液质联用仪 UPLC-QTRAP/MS 5500 (美国 AB SCIEX 公司); FlexStation3 型多功能酶标仪 (上海美谷分子仪器有限公司); 电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司) Centrifuge 5804R 离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 药品与试剂

多裂骆驼蓬药材采集于内蒙古阿拉善盟, 经中国科学院植物研究所陈文俐研究员和内蒙古蒙医院陈伊勒苏研究员鉴定为蒺藜科骆驼蓬属植物多

裂骆驼蓬 *P. multisectum* (Maxim.) Bobr.; 乙酰胆碱酯酶 (AChE, 来源于苍蝇头部, 100 U/g, 批号 ks336616)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)、对照品石杉碱甲 (批号 F26HB176608, 质量分数 ≥ 98%)、蒙花苷 (批号 A11IB222723, 质量分数 ≥ 98%)、哈尔酚 (批号 Z30J11H120070, 质量分数 ≥ 98%)、去氢骆驼蓬碱 (批号 Y22A11Q122083, 质量分数 ≥ 98%)、鸭嘴花酮碱 (批号 IB236599, 质量分数 ≥ 98%)、脱氧鸭嘴花酮碱 (批号 X19S10L98125, 质量分数 ≥ 98%)、鸭嘴花碱 (批号 KT35515A, 质量分数 ≥ 98%)、脱氧鸭嘴花碱 (批号 KT401636, 质量分数 ≥ 95%) 购自上海源叶生物科技有限公司。质谱纯乙腈购自美国 Fisher 公司; 其余分析纯试剂购自北京通广精细化工公司。

2 方法

2.1 多裂骆驼蓬样品的制备

多裂骆驼蓬药材阴干后粉碎过筛。取 1 kg 粉末, 按料液比 1:8 加入 95%乙醇 (8 L) 浸泡过夜, 回流提取 3 次, 每次 3 h, 合并提取液, 滤过、浓缩得到总浸膏。取总浸膏 130.0 g, 用水分散, 依次以石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 滤过、浓缩得石油醚部位 (6.83 g)、二氯甲烷部位 (4.30 g)、醋酸乙酯部位 (3.44 g)、正丁醇部位 (56.37 g) 和水萃取部位 (36.60 g)。

称取各萃取部位样品溶解于 1 mL DMSO 中, 用 PBS 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 8.0) 配制质量浓度 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00、2.50 mg/mL 的溶液。

2.2 溶液的配制

2.2.1 AChE 溶液 取 200 U 的 AChE 溶解于 PBS 缓冲液中, 配置成 10 U/mL 母液, 进而稀释成系列浓度溶液。

2.2.2 碘化乙酰硫代胆碱 (acetylthiocholine iodide, ATCI) 溶液 准确称取 43.34 mg ATCI 加蒸馏水定容至 10 mL, 配制 18 mmol/L 的溶液, 稀释成 6、9、12、15 mmol/L。

2.2.3 DTNB 溶液 准确称取 15.84 mg DTNB, 用 200 μL 无水乙醇溶解, 加 6 mg NaHCO₃ 用 PBS 定容至 20 mL, 配制 2 mmol/L。

2.2.4 对照品溶液 准确称取各对照品溶于 DMSO 中, 用 PBS 配制 5 mmol/L 母液, 进而稀

释成系列浓度溶液。

2.3 色谱条件

Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 含 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~1 min, 3%~5% B; 1~3 min, 5%~7% B; 3~7 min, 7%~15% B; 7~17 min, 15%~40% B; 17~25 min, 40%~95% B; 25~35 min, 95% B; 进样体积 5 μL, 柱温 40 °C; 体积流量 0.3 mL/min。

2.4 质谱条件

Turbo V™ 离子源, 正离子扫描, 离子化电压 5 500 V, MRM 检测模式。气体条件: 喷雾气 GS1 为 344.74 kPa, 辅助加热气 GS2 为 344.74 kPa, 气帘气 CUR 为 241.32 kPa, 辅助加热气温度为 550 °C。去簇电压 (DP) 100 V, 入口电压 (EP) 10 V, 碰撞池电压 (CXP) 17 V。

2.5 AChE 抑制活性的测定

基于 Ellman 法进行抑制活性测定。在 96 孔酶标板中依次加入 140 μL PBS、20 μL 待测样品溶液和 20 μL AChE 溶液。混匀后 4 °C 孵育 20 min。再分别加入 10 μL DTNB 和 ATCI 溶液, 37 °C 反应 20 min, 405 nm 下检测吸光度 (*A*) 值, 按公式计算待测部位的抑制率 (*I*)。

将上述待测样品溶液替换为系列浓度 (0.01、0.1、1、5、50、100、500 μmol/L) 的各活性成分溶液, 其余步骤同上。以非线性回归拟合并计算半抑制浓度 (IC₅₀) 值。

$$I = [(A_{\text{空白对照}} - A_{\text{空白本底}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品本底}})] / (A_{\text{空白对照}} - A_{\text{空白本底}})$$
空白对照组为含 AChE、底物、不含待测样品; 空白本底组为不含 AChE 与待测样品; 样品组为含 AChE、底物及待测样品; 样品本底组为含待测样品、不含 AChE

2.6 AUF-LC-MS 对 AChE 抑制剂的筛选

2.6.1 实验组 向 YM-100 超速离心管 (截留相对分子质量为 1×10^5) 中依次加入 40 μL 二氯甲烷部位溶液 (1 mg/mL)、40 μL AChE (3 mg/mL) 和 120 μL PBS。37 °C 下孵育 30 min, 4 °C 超滤离心 (12 000 r/min) 15 min。用 200 μL PBS 缓冲液 (pH 8.0) 冲洗超滤管内壁, 4 °C 超滤离心 (12 000 r/min) 10 min, 弃掉滤液, 重复 3 次。加入 200 μL 甲醇失活处理 30 min, 4 °C 超滤离心 (12 000 r/min) 10 min, 得滤液。重复 3 次, 合并滤液, 37 °C 下 N₂ 吹干, 用 100 μL 初始流动相复溶, 用于 LC/MS 分析。

2.6.2 空白组 用 PBS (pH 8.0) 代替 AChE 溶液,

其余步骤一致。以空白组总离子流图为参照, 对比实验组图谱中色谱峰的有无及峰强度, 筛选出与 AChE 特异性结合成分。实验组和空白组均重复 3 次。

正丁醇萃取部位方法同上。

2.7 酶抑制动力学测定

基于上述抑制效果, 结合 IC₅₀ 值与活性成分的浓度范围, 选择 0、25、50、100 μmol/L 作为各活性成分浓度梯度, 用于抑制动力学测定。在 Ellman 法反应体系中固定 ATCI 浓度, 分别加入活性成分浓度梯度, 测定不同 AChE 浓度 (0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 U/mL) 下的酶促反应速率。以 AChE 浓度为横坐标 (*X*), 以反应速率为纵坐标 (*Y*) 作图, 确定 AChE 的抑制机制。在 Ellman 法反应体系中固定 AChE 浓度, 分别加入上述系列浓度 (0、25、50、100 μmol/L) 的各活性成分溶液, 测定不同 ATCI 浓度 (6、9、12、15、18 mmol/L) 下酶促反应速率 (*V*), 绘制 Lineweaver-Burk 曲线, 确定抑制类型。

2.8 分子对接及分子动力学研究

2.8.1 分子对接 从 RCSB 蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org>) 中下载 AChE 复合物 (PDB ID: 1EVE) 晶体结构。该结构为野生型电鳗 AChE 与配体多奈哌齐复合物, 无突变信息, 是 AChE 抑制剂筛选分子对接研究中常用结构^[9-10]。从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库下载小分子配体三维结构的 sdf 格式文件, 用 Openbabel 转换为 pdb 格式。用 Pymol 对蛋白质和配体进行前处理, 使用 Autodock Vina 分子对接。通过原配体复原对接, 设置对接过程盒子中心坐标 (*X*=5.326, *Y*=61.385, *Z*=63.829), 大小 60 Å×60 Å×50 Å (1 Å=0.1 nm), 以覆盖 AChE 全部活性位点。

2.8.2 分子动力学模拟 采用 Gromacs 2024.5 软件对 AChE-配体复合物进行全原子分子动力学模拟。蛋白质采用 Amber14SB 力场参数化, TIP3P 水模型对立方体周期性溶剂化; 配体通过 sobtop 程序生成拓扑文件及 itp 文件; 定义晶胞并填充水, 添加 Na⁺、Cl⁻ 离子维持电荷平衡。随后对蛋白质和配体进行 NVT、NPT 平衡。动力学过程中采用 Nose-Hoover 控温 (26.85±1.00) °C、Parrinello-Rahman 控压 (100 kPa), 步长 2 fs, 每 10 ps 采集一帧构象, 运行 100 ns, 获得均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD)、均方根波动 (root mean square fluctuation, RMSF)、回转半径 (radius of gyration, Rg) 值等参

数并系统分析。

2.9 数据分析与处理

每组实验平行 3 次, 采用 Excel 2021 整理, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 Origin2021 软件绘制图形与分析, 以非线性回归方法拟合抑制曲线并计算 IC_{50} 值。

3 结果与分析

3.1 不同萃取部位对 AChE 抑制活性

多裂骆驼蓬不同萃取部位对 AChE 的抑制活性见图 1。其中二氯甲烷和正丁醇部位对 AChE 抑制

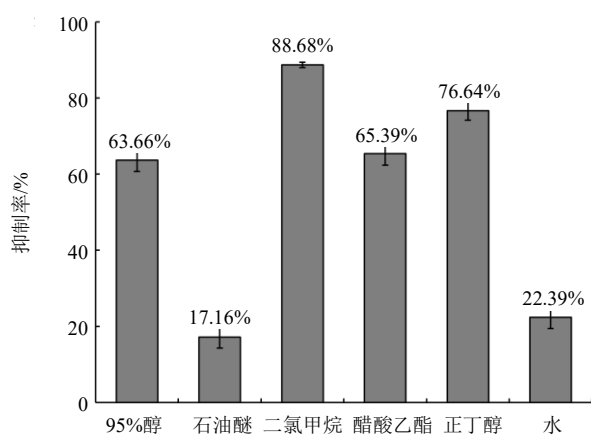
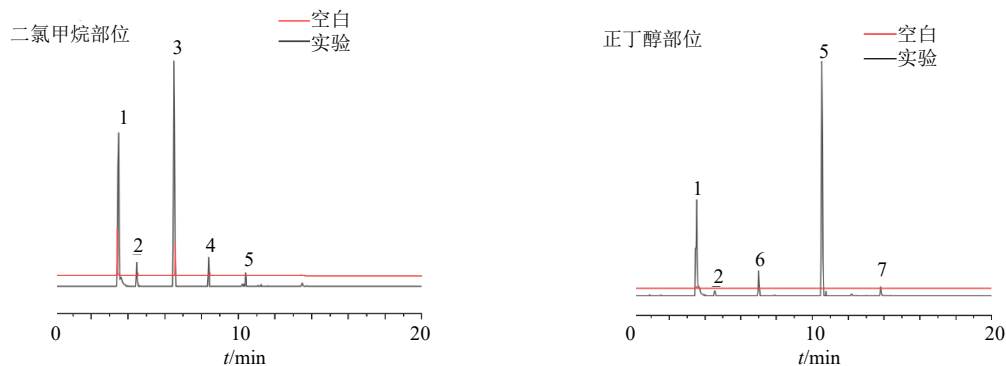


图 1 多裂骆驼蓬不同萃取部位对 AChE 的抑制作用
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Inhibitory activity of AChE by different fraction of *P. multisectum* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



1-鸭嘴花碱; 2-脱氧鸭嘴花碱; 3-鸭嘴花酮碱; 4-脱氧鸭嘴花酮碱; 5-去氢骆驼蓬碱; 6-哈尔酚; 7-蒙花苷。

1-vasicine; 2-deoxyvasicine; 3-vasicinone; 4-deoxyvasicinone; 5-harmine; 6-harmol; 7-linarin.

图 2 多裂骆驼蓬与 AChE 特异性结合活性成分总离子流图

Fig. 2 Total ion flow chromatogram of active components of *P. multisectum* specifically binding to AChE

蒙花苷、鸭嘴花酮碱、鸭嘴花碱抑制活性较强, IC_{50} 分别为 5.14、10.17、16.11 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.3 抑制动力学研究

蒙花苷作用下的 AChE 酶促反应速率曲线如图 4, 不同浓度作用下的酶促反应速率与酶浓度曲线

活性最强, 平均抑制率为 88.68% 和 76.64%, IC_{50} 分别为 83.84、91.55 $\mu\text{g/mL}$, 比文献报道的小花棘豆 (0.76 mg/mL)^[11]、苦马豆 (0.17 mg/mL)^[11]、箭叶淫羊藿 (9.27 mg/mL)^[12] 等提取物抑制效果更强。以阳性药石杉碱甲为参照测得 IC_{50} 为 0.051 $\mu\text{mol/L}$, 与文献值 (0.047 $\mu\text{mol/L}$ ^[13]) 接近, 证明了实验方法的可靠性。为聚焦优势活性部位、提高筛选效率, 进一步选择二氯甲烷和正丁醇部位用于活性成分筛选。

3.2 基于 AUF-LC-MS 技术的多裂骆驼蓬中 AChE 抑制剂活性成分的筛选

课题组前期利用 UPLC-TOF-MS/MS 和 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS 技术从多裂骆驼蓬总提物、二氯甲烷和正丁醇部位鉴定出多种活性成分^[8]。为提高选择性并降低干扰, 本研究采用多反应离子监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描模式, 在正离子模式下进行 MS 分析并结合对照品进行验证。如图 2 所示, 从二氯甲烷部位筛选出鸭嘴花碱、脱氧鸭嘴花碱、鸭嘴花酮碱、去氢骆驼蓬碱和脱氧鸭嘴花酮碱 5 个与 AChE 强特异性结合的活性成分。从正丁醇中鉴定出蒙花苷、鸭嘴花碱和脱氧鸭嘴花碱、哈尔酚、去氢骆驼蓬碱。其中鸭嘴花碱、脱氧鸭嘴花碱和去氢骆驼蓬碱为 2 个部位共有 (表 1)。7 种活性成分对 AChE 抑制的结果 (表 1、图 3) 显示, 其中

都交于原点, 且随着蒙花苷浓度的增加, 曲线斜率逐渐降低, 表明蒙花苷是一种可逆型的 AChE 抑制剂。它与 AChE 以非共价键与结合成复合物而影响后者活力, 可通过物理方法使其活力恢复。其他 6 种活性成分也表现出相同的可逆型抑制机制 (表 1)。进一

表 1 7 种活性成分对 AChE 的 IC_{50} 及抑制机制
Table 1 IC_{50} values and inhibition mechanisms of seven components on AChE

序号	化合物	萃取部位		$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	R^2	作用机制	抑制类型	K_I	K_{IS}
		二氯甲烷	正丁醇						
1	鸭嘴花碱	+	+	16.11	0.991 6	可逆	非竞争性		
2	脱氧鸭嘴花碱	+	+	18.99	0.993 0	可逆	混合 I 型	128.56	334.86
3	鸭嘴花酮碱	+	—	10.17	0.998 4	可逆	非竞争性		
4	脱氧鸭嘴花酮碱	+	—	83.06	0.993 8	可逆	混合 I 型	64.29	213.53
5	去氢骆驼蓬碱	+	+	31.31	0.990 7	可逆	混合 I 型	89.84	417.63
6	哈尔酚	—	+	22.42	0.995 4	可逆	非竞争性		
7	蒙花苷	—	+	5.14	0.995 4	可逆	竞争性		

+-含该成分；--不含该成分；空白-该数据未计算。

+-containing the component; --without the compound; blank-data not calculated.

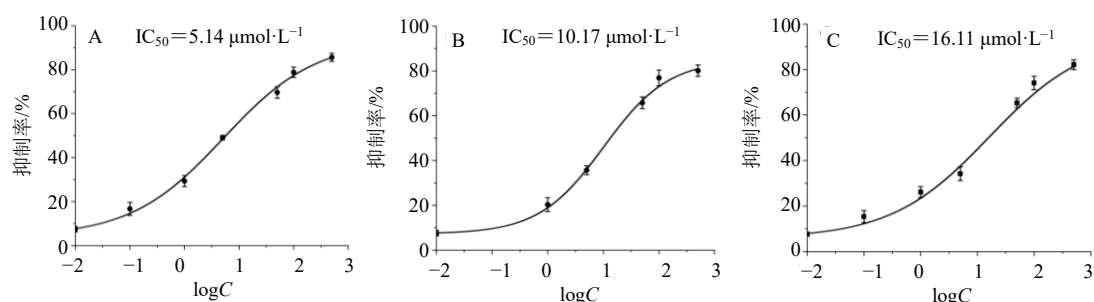
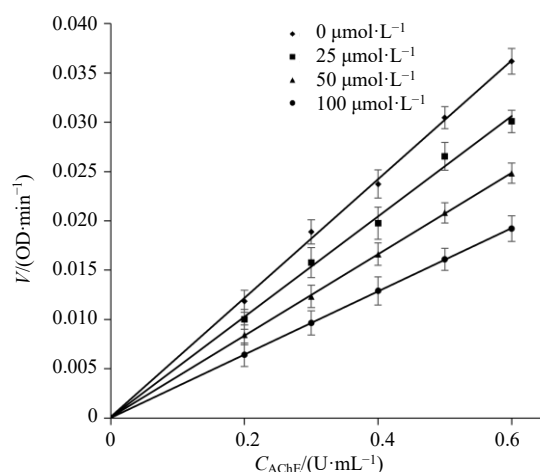


图 3 蒙花苷 (A)、鸭嘴花酮碱 (B)、鸭嘴花碱 (C) 对 AChE 抑制活性曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Inhibitory activity curves of linarin (A), vasicinone (B) and vasicine (C) against AChE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



AChE 浓度梯度为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 U/mL。

The concentration gradients of AChE are 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 U/mL.

图 4 不同浓度蒙花苷作用下 AChE 的酶促反应速率曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Enzymatic reaction rate curves of AChE under treatment with linarin at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

步研究活性成分对 AChE 的抑制类型，结果显示 7 种可逆型抑制剂对 AChE 表现出 3 种不同的抑制类

型 (表 1)。

其中，不同浓度蒙花苷作用下的酶促反应速率与底物浓度的双倒数曲线交于 Y 轴一点 (图 5-A)。Y 轴截距为 $1/V_{\max}$ ，说明改变蒙花苷的浓度， $1/V_{\max}$ 不变。且随着蒙花苷浓度的增大，拟合直线的斜率增大，表明米氏常数 (K_m) 随着抑制剂浓度的增大而增大。结合文献报道^[14]，表明蒙花苷对 AChE 的抑制类型为竞争性抑制，可与底物竞争 AChE 催化位点而抑制其活力。与蒙花苷不同，不同浓度鸭嘴花碱作用下酶促反应速率与底物浓度的双倒数曲线交于 X 轴一点 (图 5-B)。X 轴截距为 $1/K_m$ ，表明改变鸭嘴花碱的浓度， $1/K_m$ 不变。并且随着鸭嘴花碱浓度增大，直线斜率增大，表明最大反应速率 ($V_{\max}$) 随着鸭嘴花碱浓度的增大而减小。结合文献报道^[15]，表明鸭嘴花碱对 AChE 为非竞争性抑制。揭示出鸭嘴花碱不与底物竞争结合 AChE 的催化位点，而是通过非共价键结合在其它位点而抑制其活力。除了鸭嘴花碱，鸭嘴花酮碱和哈尔酚也表现为非竞争性抑制的特点。

其余 4 种活性成分则与前 3 者不同。如图 5-C 所示，不同脱氧鸭嘴花碱浓度作用下的酶促反应速

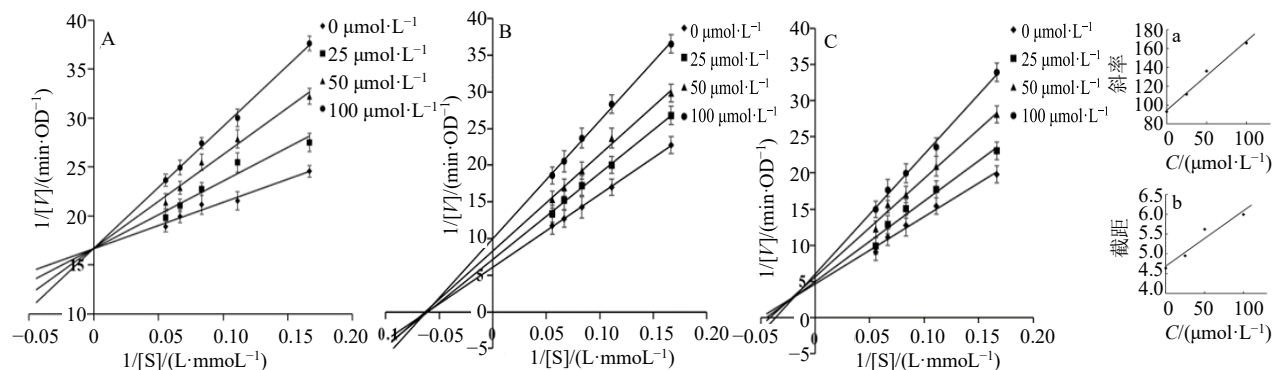


图 5 蒙花苷 (A)、鸭嘴花碱 (B)、脱氧鸭嘴花碱 (C) 对 AChE 抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线及斜率 (a)、截距 (b) 随脱氧鸭嘴花碱浓度的变化曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Lineweaver-Burk plots for inhibition of linarin (A), vasicine (B) and deoxyvasicine (C) on AChE together with plots of slope (a) and intercept (b) versus deoxyvasicine concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

率与底物浓度的双倒数曲线相交于第二象限一点 (图 5-C)。且随着浓度升高, K_m 变大, V_{max} 降低。结合文献报道^[11,16], 脱氧鸭嘴花碱为混合 I 型抑制, 其既可与游离 AChE 结合, 也可与 AChE-底物复合物结合。以图 5-C 的直线和截距分别对脱氧鸭嘴花碱浓度作图 (图 5-A、B) 可计算脱氧鸭嘴花碱对 AChE 的抑制常数 (K_I) 和对 AChE-底物复合物的抑制常数 (K_{IS})。由于 $K_{IS} > K_I$, 表明脱氧鸭嘴花碱对游离 AChE 的抑制强于对 AChE-底物复合物的抑制^[17]。脱氧鸭嘴花碱、去氢骆驼蓬碱和脱氧鸭嘴花碱对 AChE 也表现出同样的抑制类型。

3.4 分子对接及分子动力学研究

分子对接研究表明, 7 种活性成分与 AChE 结合的吉布斯自由能 (ΔG) 分别为 -11.4 kcal/mol (蒙花苷)、-8.6 kcal/mol (哈尔酚)、-8.4 kcal/mol (鸭嘴花碱)、-8.4 kcal/mol (去氢骆驼蓬碱)、-8.1 kcal/mol (鸭嘴花碱)、-8.0 kcal/mol (脱氧鸭嘴花碱)、-7.7 kcal/mol (脱氧鸭嘴花碱), 均低于 -7.0 kcal/mol, 显示他们与 AChE 具有强亲和作用^[18]。

蒙花苷与 AChE 分子对接结果见图 6-A, 其主要结合于 AChE 分子活性中心“峡谷”底部。与催化三联体 His440、Ser200 形成范德华作用力, 与胆碱结合位点 Phe330、Phe331 形成碳氢作用力, 氧阴离子孔上 Gly118 形成 π -Donor 氢键作用力。通过占据底物结合位点竞争性抑制 AChE 活性, 该结合模式与酶抑制动力学实验结果一致。同时蒙花苷还与 Trp84、Gln69、Asp72 等残基形成多重氢键、范德华力等多种非共价键作用力, 相较其他成分展现出最强的亲和力。

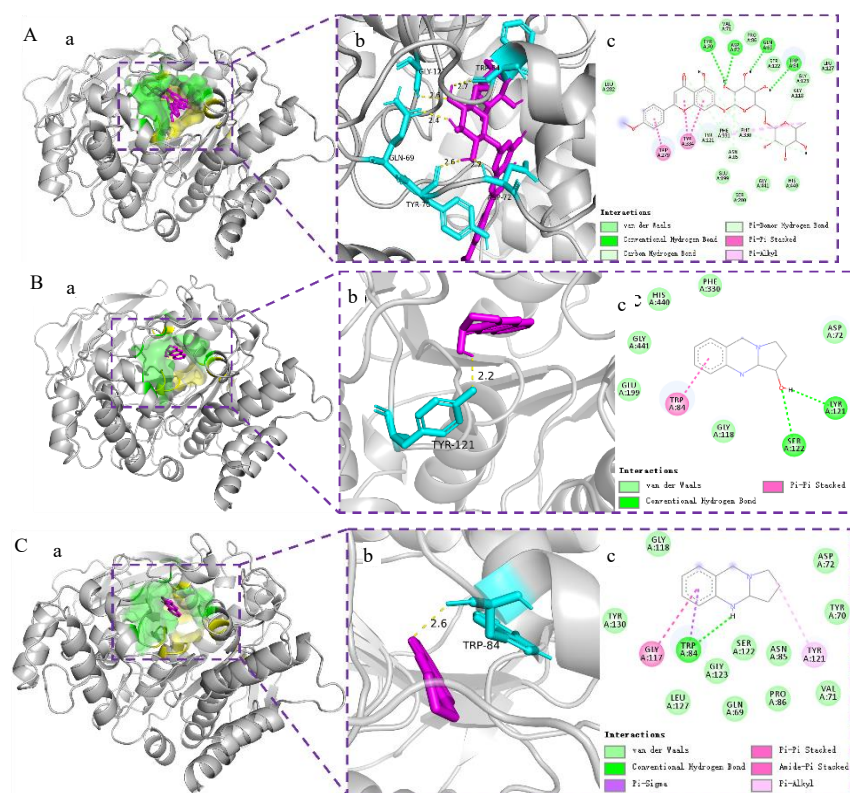
鸭嘴花碱则主要结合在 AChE 活性谷上中部 (图 6-B)。与外周阴离子位点 (PAS) 的 Asp72 形成范德华力、与 Tyr121、Ser122 形成氢键力, 与胆碱结合位点 Glu199、Phe330 形成范德华力。鸭嘴花碱还与中心阴离子位点 (CAS) 的 Trp84 形成 π - π 堆积作用力。鸭嘴花碱未占据底物结合位点, 但可通过结合 AChE 诱导催化位点构象改变而影响酶活, 表现出非竞争性抑制的特点, 与酶动力学结果一致。

脱氧鸭嘴花碱结合于活性谷中下部至底部 (图 6-C), 与 CAS 关键残基 Trp84 形成氢键, 与氧阴离子孔 Gly118 形成疏水作用力, 与 PAS 位点 Tyr121 形成 π -Alkyl 作用力, 与 Asp72、Tyr70 形成范德华力。其分子骨架向底物结合通道延伸产生空间位阻效应, 阻碍底物进入底部催化位点。兼具竞争性结合与构象调控双重作用, 表现为混合型抑制特征。

综上, 分子对接结果与酶抑制动力学实验结果高度一致, 揭示了不同抑制类型的分子作用机制。

分子动力学模拟结果显示, 自由酶、活性成分与 AChE 相互作用过程中形成的酶-配体复合物的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 值大多在 0.1~0.2 nm。这表明在 100 ns 时间内, 各复合物体系均表现出良好的动态稳定性, 可有效评估复合物的结合稳定性和动态相互作用特征。

其中 AChE-蒙花苷复合物的 RMSD 在模拟初期缓慢上升, 30 ns 后进入稳定波动阶段, 并维持在相对恒定范围内 (图 7-A)。AChE-鸭嘴花碱复合物在模拟初期表现出波动性, 在 40 ns 之后逐渐趋于平稳 (图 7-B)。AChE-脱氧鸭嘴花碱复合物则缓慢上升到 40 ns 后趋于稳定 (图 7-C)。其余 4 种复合



A-AChE-蒙花苷; B-AChE-鸭嘴花碱; C-AChE-脱氧鸭嘴花碱; a-对接整体模式; b-局部放大; c-活性成分与氨基酸残基的相互作用。

A-AChE-linarin; B-AChE-vasicine; C-AChE-deoxyvasicine. a-overall docking mode; b-zoomed-in view of the docking interface; c-interactions between residues and compounds.

图 6 活性成分与 AChE 最佳对接模式

Fig. 6 Molecular docking models of active components with AChE

物均在 50 ns 后达平衡, 形成平台期。结果还显示自由酶与酶-配体复合物的 RMSD 的平均差值约 0.05 nm, 说明配体结合对蛋白构象影响小, 仅发生局部构象调整, 复合物整体结构高度稳定。

Rg 分析结果表明, 在分子动力学模拟过程中, 酶-配体复合物的 Rg 均稳定在 2.29 nm 附近 (图 7-D~F), 且波动范围均小于 0.05 nm。表明在结合过程中, 蛋白质的分子结构较为稳定、紧凑。综合 Rg 和 RMSD 结果可知, 7 种活性成分与 AChE 复合体系在 40 ns 后均达到稳定平衡状态, AChE 构象保持稳定、紧凑的状态。

均方根波动 (root mean square fluctuation, RMSF) 结果如图 7-G~I 所示, 多数残基的 RMSF 基表现出一定的柔性波动, 但复合物构象整体稳定。

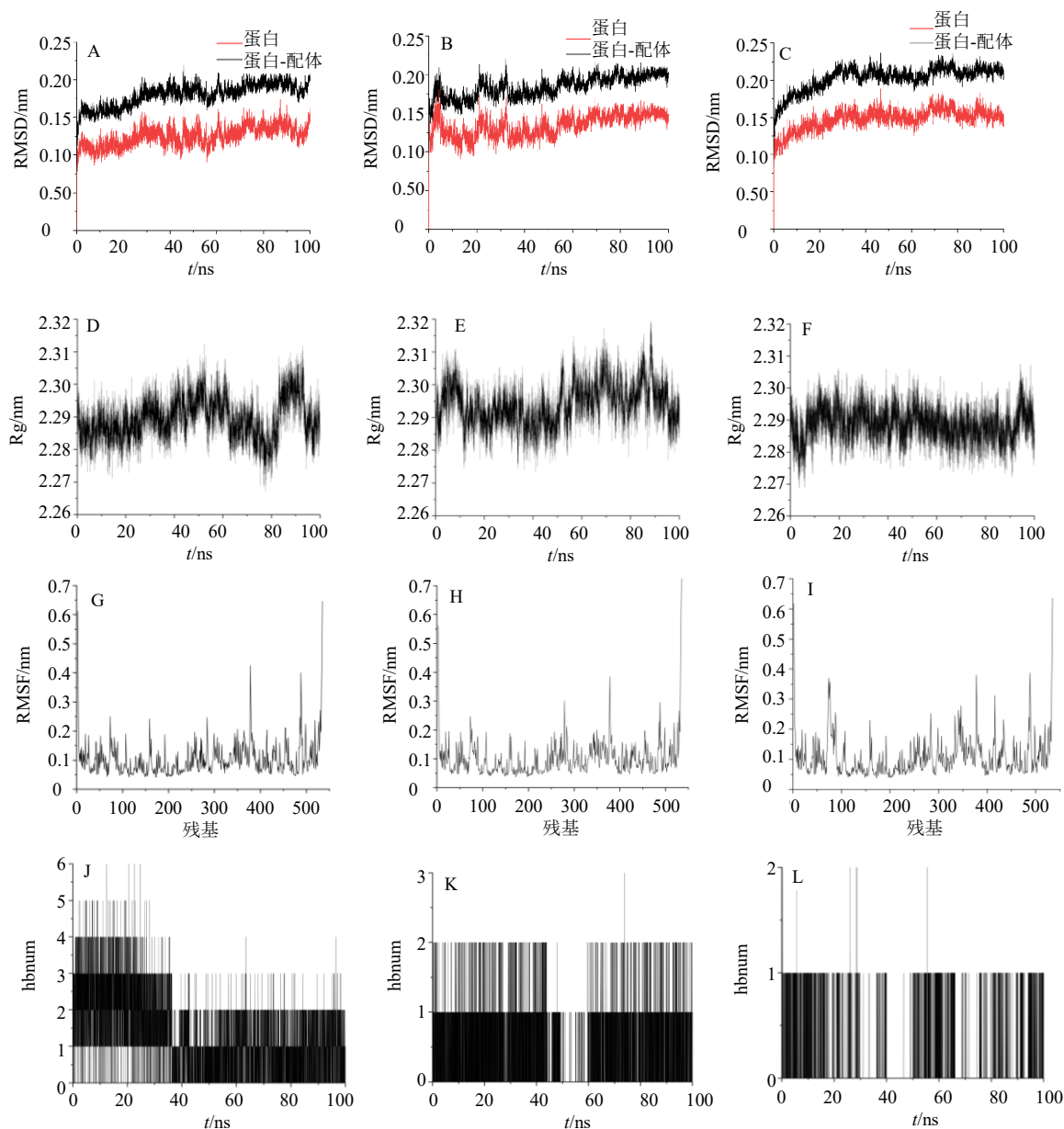
动力学模拟过程中氢键的数目变化如图 7-J~L 所示, 其中, 蒙花苷 (图 7~J) 在前 30 ns 的氢键数目较多, 在结合后期氢键数目逐渐减少并趋于稳定, 这一动态变化与蒙花苷分子从 PAS 位点逐步结合至底部催化位点的过程一致, 与分子对接的结

合模式相互印证。鸭嘴花碱 (图 7-K) 在结合过程中与 AChE 之间的平均氢键数目约为 0.5 个, 而脱氧鸭嘴花碱 (图 7-L) 则减少至约 0.16 个。这可能与脱氧鸭嘴花碱的脱氧结构减少了氢键供体/受体数量有关。该结果与分子对接结果趋势一致。

综上所述, 分子动力学模拟结果表明, 7 种活性成分与 AChE 形成的复合体系在模拟过程中均达到稳定动态平衡, AChE 整体构象保持高度稳定, 配体与 AChE 之间存在强且稳定的非共价相互作用, 为其发挥 AChE 抑制活性提供了结构基础。

4 讨论

骆驼蓬属植物富含类型多样的生物碱成分, 段金廛等^[6]、刘永建等^[19]分别从多裂骆驼蓬、骆驼蓬中分离鉴定出鸭嘴花碱、脱氧鸭嘴花碱、骆驼蓬碱等多种生物碱。Zheng 等^[20]从骆驼蒿中筛选出抑制 AChE 的鸭嘴花酮碱成分等。但相关研究多基于传统植物化学分离技术和活性测定, 周期长、目标性差。本研究利用 AUF-LC-MS 从多裂骆驼蓬中快速精准筛选出 7 种 AChE 活性成分, 大大提高了筛选



A-AChE-蒙花苷的 RMSD 随时间的变化; B-AChE-鸭嘴花碱的 RMSD 随时间的变化; C-AChE-脱氧鸭嘴花碱的 RMSD 随时间的变化; D-AChE-蒙花苷的 Rg 随时间的变化; E-AChE-鸭嘴花碱的 Rg 随时间的变化; F-AChE-脱氧鸭嘴花碱的 Rg 随时间的变化; G-蒙花苷作用下 AChE 的 RMSF; H-鸭嘴花碱作用下 AChE 的 RMSF; I-脱氧鸭嘴花碱作用下 AChE 的 RMSF; J-AChE-蒙花苷的过程中氢键数目变化; K-AChE-鸭嘴花碱过程中氢键数目变化; L-AChE-脱氧鸭嘴花碱过程中氢键数目变化。

A-RMSD of linarin-AChE over time; B-RMSD of vasicine-AChE over time; C-RMSD of deoxyvasicine-AChE over time; D-Rg of linarin-AChE with time; E-Rg of vasicine-AChE with time; F-Rg of deoxyvasicine-AChE with time; G-RMSF of AChE under the action of linarin; H-RMSF of AChE under the action of vasicine; I-RMSF of AChE under the action of deoxyvasicine; J-change of hydrogen bond number during the linarin-AChE simulation; K-Change of hydrogen bond number during the vasicine-AChE simulation; L-Change of hydrogen bond number during deoxy deoxyvasicine-AChE simulation.

图 7 活性成分与 AChE 复合物的分子动力学模拟结果

Fig. 7 Molecular dynamics of active components and AChE complexes

效率。除鸭嘴花碱、脱氧鸭嘴花碱、鸭嘴花酮碱、去氢骆驼蓬碱等 6 种生物碱, 还首次发现抑制活性良好的黄酮类成分蒙花苷, 揭示了多裂骆驼蓬抗 AD 活性成分的多样性和极具开发潜力的药用价值。

蒙花苷对 AChE 抑制性能虽低于石杉碱甲等临床药物, 但优于海鞘真菌杂蒴 ($IC_{50}=11.6 \mu\text{mol/L}$)^[21]、异莲心碱 ($IC_{50}=18.40 \mu\text{mol/L}$)^[22]等天然源 AChE 抑制成分。且蒙花苷为黄酮类成分, 毒性低、来源

广泛,经结构修饰后有望进一步提高其抑制活性。综上,本研究提出了一种从多裂骆驼蓬中快速筛选 AChE 抑制剂活性成分的策略,并从分子层次探究了活性成分对 AChE 的抑制作用机制,为阐明多裂骆驼蓬抗 AD 药效物质基础提供了重要的依据。本研究在分子层面体外验证方面取得进展,但缺乏细胞和动物水平的体内验证,无法全面评价活性成分的实际药效。后续将针对 AD 细胞和动物开展相关研究,为新型抗 AD 药物的研发奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Polanco J C, Li C Z, Bodea L G, *et al.* Amyloid- β and tau complexity: Towards improved biomarkers and targeted therapies [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(1): 22-39.
- [2] Lane R M, Potkin S G, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2006, 9(1): 101-124.
- [3] Teleanu D M, Niculescu A G, Lungu I I, *et al.* An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 5938.
- [4] Wang X Y, Sun G Q, Feng T, *et al.* Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression [J]. *Cell Res*, 2019, 29(10): 787-803.
- [5] 阿不都热依木·卡地尔. 中华本草-维吾尔药卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 297-299.
- [6] 段金彪, 周荣汗, 赵守训, 等. 多裂骆驼蓬种子中生物碱的化学组成和抗癌活性研究 [J]. 中国药科大学学报, 1998, 29(1): 21-23.
- [7] Du H T, Liu X L, Xie J S, *et al.* Novel deoxyvasicinone-donepezil hybrids as potential multitarget drug candidates for Alzheimer's disease [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(5): 2397-2407.
- [8] 程亚敏, 黄丹蓉, 任静玉, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 及网络药理学探讨多裂骆驼蓬治疗阿尔茨海默病的有效成分和作用机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(10): 1787-1799.
- [9] 王莲萍, 李庆杰, 刘晓艳, 等. 基于 UFLC-MS/分子模拟计算的吴茱萸醇提取物中胆碱酯酶抑制剂筛选 [J]. 高等学校化学学报, 2020, 41(1): 111-117.
- [10] Patowary P, Shakya A, Ghosh S K, *et al.* Molecular modeling, synthesis, and *in vitro* evaluation of AChE and BuChE inhibitory activity of novel *N*-thiazole substituted coumarin derivatives [J]. *J Mol Struct*, 2025, 1338: 142192.
- [11] 王志雁, 沈红玲, 孟庆艳, 等. 小花棘豆和苦马豆不同萃取相乙酰胆碱酯酶活性及机理探讨 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(10): 1706-1711.
- [12] 王秦军, 王翠萍, 刘建欣, 等. 箭叶淫羊藿提取物活性成分、抗氧化及酶抑制活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(12): 354-360.
- [13] 赵晨曦. EGCG 类似物对乙酰胆碱酯酶和单胺氧化酶的抑制活性评价及分子模拟研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
- [14] 王翌, 尹跃, 边媛媛, 等. 绞股蓝三萜类化合物及其抑制 α -葡萄糖苷酶和蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 的活性研究 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6142-6150.
- [15] 杜佐, 陈大为, 付志伟, 等. 白花前胡丙素、丁素、E 素对羧酸酯酶的抑制作用 [J]. 药学学报, 2017, 52(1): 66-70.
- [16] 刘蔓莉, 肖媛, 伍磊, 等. 不同取代度硫酸酯化裂褶多糖的制备及其降血糖和保湿活性 [J]. 现代食品科技, 2025, 41(2): 244-252.
- [17] Huang X H, Chen Q X, Wang Q, *et al.* Inhibition of the activity of mushroom tyrosinase by alkylbenzoic acids [J]. *Food Chem*, 2006, 94(1): 1-6.
- [18] 凌晓颖, 陶嘉磊, 孙逊, 等. 基于网络药理学的连花清瘟方抗冠状病毒的物质基础及机制探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1723-1730.
- [19] 刘永建, 刘浩, 李华爽, 等. 骆驼蓬子生物碱化学成分研究 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 705-710.
- [20] Zheng X Y, Zhang Z J, Chou G X, *et al.* Acetylcholinesterase inhibitive activity-guided isolation of two new alkaloids from seeds of *Peganum nigellastrum* Bunge by an *in vitro* TLC-bioautographic assay [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2009, 32(9): 1245-1251.
- [21] Jiang M H, Guo H, Wu Q L, *et al.* Two new picoline-derived meroterpenoids with anti-acetylcholinesterase activity from ascidian-derived fungus *Amphichorda felina* [J]. *Molecules*, 2022, 27(16): 5076.
- [22] 王二旭. 莲子心中乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选及其药代动力学研究 [D]. 石家庄: 河北师范大学, 2025.

[责任编辑 王文倩]