

藏药中乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选

杨中锋*,任晋,薛鹏辉,杨明俊
(兰州理工大学生命科学与工程学院,兰州 730050)

[摘要] 目的:从 8 种藏药中筛选对乙酰胆碱酯酶具有高抑制活性的提取物。方法:药材经乙醇提取、酸碱处理、氯仿和正丁醇萃取后,得到氯仿部分和正丁醇部分。各部分用薄层色谱生物自显影法初步筛选其乙酰胆碱酯酶抑制活性,再用改良的 Ellman 法进一步测定抑制率及半数抑制浓度(IC₅₀)。结果:8 种藏药生物碱提取物的氯仿部分有不同程度的乙酰胆碱酯酶抑制活性,其中止泻木 *Holarrhena antidysenterica*、秦艽花 *Gentiana straminea*、山莨菪 *Anisodus tanguticus* 抑制活性最强,IC₅₀ 分别为 6.32,28.20,34.80 mg·L⁻¹。正丁醇部分中,山莨菪的抑制活性显著,IC₅₀ 为 51.70 mg·L⁻¹。结论:止泻木、秦艽花、山莨菪具有显著的乙酰胆碱酯酶抑制活性,说明其含有抑制乙酰胆碱酯酶的成分,为进一步跟踪分离活性成分奠定基础。

[关键词] 藏药;乙酰胆碱酯酶抑制剂;生物碱;生物自显影法

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0194-03

Screening of Total Alkaloids from Tibetan Medicine for
Acetylcholinesterase Inhibitory Activity

YANG Zhong-duo*, REN Jin, XUE Peng-hui, YANG Ming-jun
(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To screen acetylcholinesterase inhibitory activity of total alkaloidal extracted from 8 tibetan medicines. **Method:** Tibetan medicines were extracted by ethanol and treated with hydrochloric acid and base, and then extracted by chloroform and n-butanol to obtain chloroform and n-butanol-soluble fractions. The AChE inhibitory activity was tested by TLC bioautographic method and modified Ellman's colorimetric method in 96-well microplates. **Result:** The results indicated that most of the chloroform-soluble fractions among the tested samples exhibited various activities. *Holarrhena antidysenterica*, *Gentiana straminea*, *Anisodus tanguticus* were demonstrated having significant activity with IC₅₀ values of 6.32, 28.2 and 34.80 mg·L⁻¹ respectively. The n-butanol-soluble fractions of *A. tanguticus* also exhibited AchE inhibitory activity with the IC₅₀ value of 51.7 mg·L⁻¹. **Conclusion:** *H. antidysenterica*, *G. straminea*, *A. tanguticus*, as sources of AchE inhibitor, are worthy of futher study.

[Key words] tibetan medicine; acetylcholinesterase inhibitors; alkaloids; TLC bioautographic method

阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD),即老年痴呆症,是一种威胁老年人健康的进行性和致命性疾病^[1]。根据其公认的病理-胆碱能学说^[2],抑制乙酰胆碱酯酶的活性已成为目前治疗 AD 的一个主要策略。近年来,人们对植物中的天然乙酰胆碱酯酶抑制剂进行了大量筛选,发现生物碱、萜、黄酮、香豆素等成分具有抑制乙酰胆碱酯酶的作用^[3]。其中生物碱如石杉碱甲、加兰它敏等因具有高的抑制活性和强的选择性已用于临床。

藏药是我国宝贵的民族传统药物,在许多疾病的治疗方面,尤其是一些疑难杂症、慢性病、老年病的治疗方面,具有独特的作用,正越来越受到人们的

[收稿日期] 20101206(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(20802031);兰州理工大学优秀青年教师培养计划项目(Q200904)

[通讯作者] * 杨中锋,博士,副教授,研究方向:天然药物研究与开发, Tel: 0931-2976703, E-mail: yangzhongduo@126.com

青睐。但是对于其在老年痴呆方面的现代研究却鲜见报道。为了得到具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的提取物,以便进一步跟踪分离获得活性先导化合物,本文对 8 种藏药的总生物碱提取物进行了乙酰胆碱酯酶(AchE)抑制活性筛选。研究发现止泻木 *Holarrhena antidysenterica*、秦艽花 *Gentiana straminea*、山莨菪 *Anisodus tanguticus* 具有显著的乙酰胆碱酯酶抑制活性。

1 材料

HH-2 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)、ZF-7 型三用紫外分析仪(上海金达生化仪器有限公司)、RE-5286A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、Biotek Elx 808 型酶标仪。

藏药止泻木 *H. antidysenterica*、山莨菪 *A. tanguticus*、腺毛黑种草 *Nigella glanduhfera*、镰形棘豆 *Oxytropis falcata*、独一味 *Lamiophlomis rotata*、短尾铁线莲 *Clematis brevicaudata*、秦艽花 *G. straminea*、天仙子 *Hyoscyamus niger*。以上药材均购自青海西宁八一药材市场,由兰州大学生命科学院张国梁教授鉴定。乙酰胆碱酯酶(AchE, EC 3.1.1.7, Sigma 公司)、石杉碱甲(huperzine A, Sigma 公司)、0.1 mol·L⁻¹的 pH 8.0 和 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(dithiobisnitrobenzoic acid, DTNB, Sigma 公司)、碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, ATCI, Sigma 公司)、硅胶 G 板(青岛海洋化工厂分厂)、乙酸-1-萘酯(化学纯,国药集团化学试剂有限公司)、Fast Blue B Salt(Sigma 公司)、其余所用试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 待测样品的制备 取藏药 100 g,粉碎,700 mL 乙醇水浴回流提取 2 次,每次 2 h,抽滤,合并滤液,减压回收乙醇得稠浸膏,加入 100 mL 蒸馏水悬浮浸膏,用 2 mol·L⁻¹ HCl 调 pH 2~3,静置过夜,抽滤,滤液用 1 mol·L⁻¹ 氨水调 pH 10~11,碱液依次用氯仿(100 mL×3)、水饱和正丁醇(100 mL×3)萃取,合并萃取液,减压回收氯仿和正丁醇即得氯仿部分和正丁醇部分。将所得样品用 PBS 溶解配制 10, 1 g·L⁻¹ 的溶液,备用。

2.2 活性筛选方法

2.2.1 薄层色谱生物自显影法^[4] 取硅胶 G 板一块,丙酮展开除去杂质,电吹风完全吹干。用 10 μL 的移液枪吸取样品溶液(10 g·L⁻¹)1 μL,点于经上

述处理过的硅胶板上,适当的展开剂展开后,完全吹干。均匀的喷上 AchE(1 U·mL⁻¹)和乙酸-1-萘酯(1.5 g·L⁻¹),37 ℃ 湿润的环境下孵育 20 min 后,均匀的喷上 Fast Blue B Salt 溶液(0.5 g·L⁻¹),有活性的化合物将在薄层板上出现白色斑点(紫色背景)。

2.2.2 酶标法 采用改进的 Ellman 方法^[5]在 96 孔酶标板上测定样品的 AchE 抑制活性。具体操作如下:在 96 孔酶标板中依次加入 140 μL PBS(0.1 mol·L⁻¹, pH 8.0), 20 μL 样品溶液(1 g·L⁻¹), 15 μL AChE(0.28 U·mL⁻¹, pH 8.0 PBS 溶解稀释)。4 ℃ 孵育 20 min 后,加 10 μL DTNB(0.075 mol·L⁻¹)及 10 μL ATCI(0.01 mol·L⁻¹)。37 ℃ 孵育 20 min 后,用酶标仪在 405 nm 下测定其吸光度值。根据下式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = [(A_{\text{空白组}} - A_{\text{完全抑制组}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品本底}})] / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{完全抑制组}}) \times 100\%$$

其中,空白组用 20 μL PBS(pH 8.0)代替 20 μL 样品溶液;完全抑制组用 20 μL 石杉碱甲(0.125 g·L⁻¹)代替 20 μL 样品溶液。样品本底组用 15 μL PBS(pH 8.0)代替 15 μL AChE。

样品对 AChE 的半数抑制浓度(IC₅₀),是通过测定样品不同浓度下的抑制率计算而得。所用样品平行做 3 次,取其平均值,石杉碱甲为阳性对照。

3 结果

薄层色谱生物自显影法测定结果见表 1。从表 1 中可以看出:止泻木、山莨菪、秦艽花、短尾铁线莲、镰形棘豆的氯仿部分中具有较强的抑制斑点;天仙子具有中等强度的抑制斑点;腺毛黑种草、独一味没有抑制斑点。正丁醇部分中,山莨菪具有强抑制斑点;腺毛黑种草、天仙子具有中等强度的抑制斑点;其他部分没有明显斑点。

Ellman 法测定结果见表 2。从表中可以看出:8 种藏药的氯仿部分和正丁醇部分都具有不同程度的 AchE 抑制活性。氯仿部分中,止泻木、秦艽花、山莨菪的抑制活性最强,在终浓度为 100 mg·L⁻¹时,抑制率分别为 89.01%, 78.27%, 87.41%。IC₅₀ 分别为 6.32, 28.20, 34.80 mg·L⁻¹。镰形棘豆、短尾铁线莲具有中等的抑制活性,抑制率在 40% 以上。独一味和天仙子的活性则较弱,抑制率在 30% 左右。正丁醇部分中,山莨菪的抑制活性最显著,抑制率达到 84.58%, IC₅₀ 为 51.70 mg·L⁻¹。止泻木和天仙子具

表 1 TLC 生物自显影法测定结果

No.	药材名	藏药名	学名	氯仿部分	正丁醇部分
1	止泻木	毒毛茛	<i>Holarrhena antidysenterica</i>	++	-
2	秦艽花	结吉嘎保	<i>Gentiana straminea</i>	++	-
3	山莨菪	唐冲那保	<i>Anisodus tanguticus</i>	++	++
4	腺毛黑种草	司拉那保	<i>Nigella glanduhfera</i>	-	+
5	镰形棘豆	达哈	<i>Oxytropis falcata</i>	++	-
6	独一味	达巴巴	<i>Lamiophlomis rotata</i>	-	-
7	短尾铁线莲	叶濛	<i>Clematis brevicaudata</i>	++	-
8	天仙子	菟菪泽	<i>Hyoscyamus niger</i>	+	+

注: ++ 表示抑制斑点很明显, + 表示抑制斑点较弱, - 表示没有抑制斑点。

表 2 8 种藏药各组分对 AchE 的抑制率(终浓度 100 mg·L⁻¹) %

药材	氯仿部分/%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹	正丁醇部分/%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
止泻木	89.01 ± 0.36	6.32 ± 1.20	45.66 ± 0.77	-
秦艽花	78.27 ± 0.91	28.20 ± 1.40	8.09 ± 0.68	-
山莨菪	87.41 ± 0.38	34.80 ± 7.20	84.58 ± 1.12	51.70 ± 5.82
腺毛黑种草	50.63 ± 0.85	-	28.29 ± 0.69	-
镰形棘豆	41.50 ± 0.76	-	22.53 ± 1.01	-
独一味	38.57 ± 0.54	-	9.85 ± 0.89	-
短尾铁线莲	47.25 ± 0.49	-	7.68 ± 0.37	-
天仙子	26.85 ± 1.12	-	40.57 ± 0.14	-

注: - 表示未测定。

有中等的抑制活性,其抑制率为 45.66% ,40.57% 。腺毛黑种草、镰形棘豆的抑制活性较弱,抑制率在 20% 左右。秦艽花、独一味、短尾铁线莲的活性最弱,抑制率不超过 10% 。

4 讨论

本实验采用薄层色谱生物自显影法对 8 种藏药的生物碱提取物进行初步筛选,筛选出止泻木、秦艽花、短尾铁线莲、镰形棘豆的氯仿部分,腺毛黑种草正丁醇部分,山莨菪和天仙子的氯仿和正丁醇部分具有 AchE 抑制活性。考虑到这种方法容易出现假阳性结果且只能用于定性测定,因此又用 Ellman 法对所有部分进行了进一步测定。结果表明:秦艽花、腺毛黑种草、镰形棘豆、短尾铁线莲的氯仿部分,天仙子的正丁醇部分,止泻木和山莨菪的氯仿和正丁醇部分的抑制率较高,活性较好。

综合比较,这 2 种方法的测定结果基本一致,只有少数显示出很大差别。其中,天仙子的氯仿部分和腺毛黑种草的正丁醇部分在 TLC 上均显示出抑制活性,而抑制率却不足 30% 。腺毛黑种草氯仿部分的抑制率超过了 50% ,但在 TLC 上的抑制斑点却不明显。因此将这 2 种方法联用可以相互排除假阳

性的出现,使得测定结果更加真实、可信。

总之,8 种藏药活性筛选结果表明,止泻木、秦艽花、山莨菪具有显著的抑制 AchE 的活性,其中活性成分的分离鉴定研究正在进行中。

[参考文献]

[1] 吴海燕,周金云. 治疗阿尔茨海默病药物的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(7): 583.

[2] 邹垒,全明海,程永强,等. 乙酰胆碱酯酶抑制剂的研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(增刊): 105.

[3] 杨建红,陶媛媛,张云梅,等. 药用植物中乙酰胆碱酯酶抑制剂研究进展[J]. 云南化工, 2006, 33(6): 78.

[4] Yang Z D, Zhang X, Duan D Z, et al. Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts[J]. J Sep Sci, 2009, 32(18): 3257.

[5] Orhan I, Sener B, Choudhary MI, et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory acitivity of some Turkish medicinal plants [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 9(1): 57.

[责任编辑 邹晓翠]