

## 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

王志雁<sup>1</sup>, 沈红玲<sup>1</sup>, 孟庆艳<sup>2</sup>, 张航航<sup>1</sup>, 贾旭<sup>1</sup>, 刘文杰<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>塔里木大学生命科学学院; <sup>2</sup>新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆阿拉尔 843300

**摘要:** 本文研究了小花棘豆及苦马豆对乙酰胆碱酯酶(AChE)的抑制活性及抑制动力学, 为进一步开展植物中乙酰胆碱酯酶抑制剂奠定了基础。采用超声辅助溶剂提取、有机溶剂梯度萃取等方法得到各相提取物, 运用改良的 Ellman 比色法对小花棘豆和苦马豆进行了 AChE 抑制活性和动力学研究。结果表明, 小花棘豆根、叶以及苦马豆叶的氯仿相萃取物具有较高的 AChE 抑制活性, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.67、1.69 mg/mL 和 0.17 mg/mL, 而其他萃取相表现出较弱的 AChE 抑制活性。此外, 小花棘豆和苦马豆叶氯仿相的抑制类型均为可逆的混合型抑制。

**关键词:** 萃取物; 乙酰胆碱酯酶; 抑制机理; 动力学

中图分类号: Q553

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.10.013

## Acetylcholinesterase Activity and Mechanisms of Different Extracts from *Oxytropis glabra* DC. and *Swainsonia salsula* (Pall.) DC.

WANG Zhi-yan<sup>1</sup>, SHEN Hong-ling<sup>1</sup>, MENG Qing-yan<sup>2</sup>, ZHANG Hang-hang<sup>1</sup>, JIA Xu<sup>1</sup>, LIU Wen-jie<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>College of life of science, Tarim University; <sup>2</sup>Key Laboratory of Protection and Utilization of

Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production and Construction Groups, Xinjiang Alar 843300, China

**Abstract:** In order to evaluate the activity and potential application of acetylcholinesterase inhibitors from *Oxytropis glabra* DC. and *Swainsonia salsula* (Pall.) DC., the inhibition mechanism and kinetics were investigated in this study. Each extract was prepared using different polarity solvents associated with ultrasonic assisted extraction. In addition, improved Ellmans' colorimetric method was employed to exploit the acetylcholinesterase inhibition activity and kinetics. Results showed that the chloroform extracts of both root and leaf of *O. glabra* and the leaf of *S. salsula* demonstrated higher AChE inhibitory activities over other extracts with the IC<sub>50</sub> values of 0.67 mg/mL, 1.69 mg/mL and 0.17 mg/mL, respectively. The inhibition mechanism of chloroform extracts from leaf of these two plants are both mixed type reversible inhibition.

**Key words:** extract; acetylcholinesterase; inhibition mechanism; kinetics

乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 是主要存在于人体神经肌肉组织突触后膜上的一种递质水解酶, 其主要生物学功能是在胆碱能突触间高效地水解神经递质乙酰胆碱 (ACh), 防止神经传导介质 ACh 的积累, 从而维持神经系统的正常生理功能<sup>[1]</sup>。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 是发生在老年期前后的一种以进行性记忆衰退, 认知功能障碍、个性改变和精神行为异常等为主要特征的一种慢性、进行性中枢神经系统退化性疾病<sup>[2]</sup>。多

方面研究表明, AD 是一种多病因疾病, 其中被广泛接受的病理理论是胆碱能假说<sup>[3]</sup>。因此, 目前医学上多采用乙酰胆碱酯酶抑制剂 (Acetylcholinesterase inhibitor, AChEI) 来抑制 AChE 活性, 延缓乙酰胆碱 (ACh) 水解的速度, 提高突触间隙 ACh 的水平, 发挥对 AD 的治疗作用<sup>[4]</sup>。他克林是 FDA 批准上市的第一代用于治疗 AD 的 AChEI 药物, 此外还有多奈哌齐、利斯的明、加兰他敏<sup>[5,6]</sup>, 而我国自主开发的 AChEI 石杉碱甲 (Huperzine A)<sup>[7]</sup> 也已在国内上市。

大量研究表明, 天然植物药用成分具有疗效好、作用面广、毒副作用小且适宜患者长期服用等优点<sup>[8]</sup>, 因而, 从天然资源中寻找 AChE 抑制剂先导物已成为当今医药研究方面的热点课题<sup>[9]</sup>。

小花棘豆 (*Oxytropis glabra* DC.) 是疯草中豆科

收稿日期: 2017-03-29 接受日期: 2017-06-08

基金项目: 国家自然科学基金 (21365018); 新疆生产建设兵团科技攻关项目 (2011AB030); 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放课题 (BRYR1404)

\* 通信作者 E-mail: lury@sina.com

棘豆属的一种,在新疆分布极为广泛。新疆阿克苏地区每年因采食小花棘豆中毒而死亡的家畜占5%~10%,严重时达50%,对畜牧业生产造成了严重的危害<sup>[10]</sup>。苦马豆[*Swainsonia salsula* (Pall.) DC.]系豆科苦马豆属植物,也是一种有毒植物,家畜过量采食会导致中毒死亡,给草原畜牧业造成严重的经济损失<sup>[11]</sup>。目前小花棘豆和苦马豆的研究主要集中于其对家畜造成的毒副作用,而鲜有关于对乙酰胆碱酯酶抑制机理及动力学方面的报道。为此,本文对采自新疆南疆的2种特色有毒植物小花棘豆和苦马豆的各相萃取物进行了乙酰胆碱酯酶抑制活性及动力学研究,旨在从具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的萃取相中进一步追踪分离得到其中的活性成分,同时为小花棘豆和苦马豆这两种有毒植物的可持续开发与综合利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器

BRO-RAD550 酶标仪(日本 BRO-RAD 公司);XTP-100 型高速多功能粉碎机(浙江永康市红太阳机电有限公司);KQ-3200 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);RE-52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);BCD-235CM 美的电冰箱(合肥美的荣事达电冰箱有限公司);GZX-9246 MBE 数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);XH-C 漩涡混合器(金坛市白塔新宝仪器厂)。

#### 1.1.2 药品与试剂

乙酰胆碱酯酶(AChE, 500 U/mg, 来源于电鳗)、10 mmol/L 5,5-二硫双(2-硝基苯甲酸)(DTNB, 用 50 mmol/L pH=7.0 的 PBS 配制)、10 mmol/L 碘化硫代乙酰胆碱(ATCI, 用 50 mmol/L pH=8.0 的 PBS 配制)均购自美国 Sigma 公司,石杉碱甲片(50 μg/0.05 mg)

购自河南太龙药业股份有限公司,其余试剂均为国产分析纯,实验用水为去离子水。

#### 1.1.3 植物材料

本实验所需要的植物材料均于 2016 年 7 月采自新疆阿拉尔市周边地区,由塔里木大学生命科学学院黄文娟副教授鉴定为豆科棘豆属 *Oxytropis glabra* DC. 的地上部分、地下部分和豆科苦马豆属 *Swainsonia salsula* (Pall.) DC. 的根、茎、叶、种子、种皮,分别阴干、粉碎,备用。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 样品的制备

称取不同部位的样品 1500 g,按照料液比 1:8 加入 75% 的乙醇,室温浸泡提取 3 次,合并提取液,减压回收溶剂得乙醇浸膏。将所获得的每部分浸膏用 1 mol/L 的 HCL 溶解后,用氯仿反复萃取 3 次后,弃去有机相,得到酸水液。然后用氨水调 pH9~10,再依次用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇分步萃取 3 次得各相萃取物。精确称取各相萃取物溶于尽可能少的甲醇溶液中,用 pH=8.0 的磷酸缓冲液将其配置成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液,然后将此溶液分别稀释成 8.00、6.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25 mg/mL 的样品溶液,4 °C 冰箱保存,备用。

### 1.2.2 不同溶剂萃取物的 AChE 抑制率测定

以 DTNB 为显色剂,ATCI 为底物,采用改良的 Ellman<sup>[12]</sup> 比色法对各相萃取物进行 AChE 的活性测定,每种梯度做三个平行,每个平行中设置样品和空白两组对照。简单地说,在 96 孔板中依次加入 140 μL 的 PBS(50 mM, pH=8.0),20 μL 样品溶液和 15 μL 的 AChE(0.3 U/mL),混匀后,4 °C 培养 20 min。取出后,加入 10 μL 的显色剂 DTNB(10 mM)和 10 μL 的 ATCI(10 mM),37 °C 培养 20 min 后,405 nm 下用酶标仪读取吸光度值,做各萃取相乙酰胆碱酯酶抑制率随浓度变化曲线。

样品对照组用 15 μL 的 PBS(50 mM, pH=8.0)代替 15 μL 的 AChE(0.3 U/mL),空白组用 20 μL 的(50 mM, pH=8.0)代替 20 μL 样品溶液,其他条件不变。阳性对照为石杉碱甲,按照下式计算出各相萃取物平均的抑制率<sup>[13]</sup>。

$$\text{平均抑制率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

其中 A0 代表空白组的吸光度值,A1 代表样品组的吸光度值,A2 代表样品对照组的吸光度值。

样品对 AChE 的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)是通过测定 8 个不同样品浓度对乙酰胆碱酯酶的抑制率,然后将不同样品浓度对应的抑制率输入 GraphPad Prism 5 软件从而得到样品的 IC<sub>50</sub> 值

### 1.2.3 乙酰胆碱酯酶催化反应速率的测定

酶催化反应产物浓度的变化可以通过酶标仪测得的吸光度值变化反映出来。在酶催化反应线性区间内,测定生成黄色化合物的吸光度值随时间的变化曲线,计算其斜率即可求得酶催化反应的速率<sup>[14]</sup>。

## 1.2.4 小花棘豆及苦马豆对 AChE 的抑制动力学研究

### 1.2.4.1 小花棘豆及苦马豆对 AChE 的抑制机理

在 96 孔板反应系统内,固定 ATCI 浓度为 10 mmol/L,不加样品和分别加入 0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/mL 5 种不同浓度的小花棘豆叶氯仿相和苦马豆叶氯仿相,逐渐改变加入的 AChE 浓度 (0.1 ~ 0.5 U/mL),通过计算 2 组吸光度值随时间变化的曲线斜率,可以得到 AChE 催化反应速率随酶浓度变化的曲线,根据曲线的变化趋势从而判断出小花棘豆和苦马豆叶氯仿相对 AChE 的抑制机理。如果加入样品后的曲线与没加样品时的曲线平行,则样品对 AChE 的抑制类型属于不可逆抑制;如果加入样品后的曲线斜率小于没加样品时的曲线斜率,则样品对 AChE 的抑制类型属于可逆抑制<sup>[15]</sup>。

### 1.2.4.2 小花棘豆及苦马豆对 AChE 的动力学研究

为了研究小花棘豆及苦马豆对 AChE 动力学研究,在 96 孔板反应系统内,固定 AChE 浓度为 0.3

U/mL,改变样品浓度和 ATCI 浓度,应用 Lineweaver-Burk 双倒数法,以反应速率的倒数 (1/v) 对底物浓度的倒数 (1/[s]) 作图,并依据米氏常数  $K_m$  和最大反应速率  $V_{max}$  来判断小花棘豆及苦马豆叶氯仿相对 AChE 的抑制类型<sup>[16]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 小花棘豆和苦马豆各萃取相对乙酰胆碱酯酶抑制活性

小花棘豆和苦马豆不同萃取相的乙酰胆碱酯酶抑制率随浓度变化曲线见图 1。从图 1 中可以看出,随着各萃取相样品浓度的增加 AChE 抑制率先随之增加,后趋于平缓或略有降低,且小花棘豆根、叶以及苦马豆叶的氯仿相萃取物具有较高的 AChE 抑制活性,其最大平均抑制率分别为 89.38%、77.25% 和 95.90%。而没有经过有机溶剂梯度萃取的小花棘豆叶和根以及其他萃取相则表现出较弱的 AChE 抑制活性。

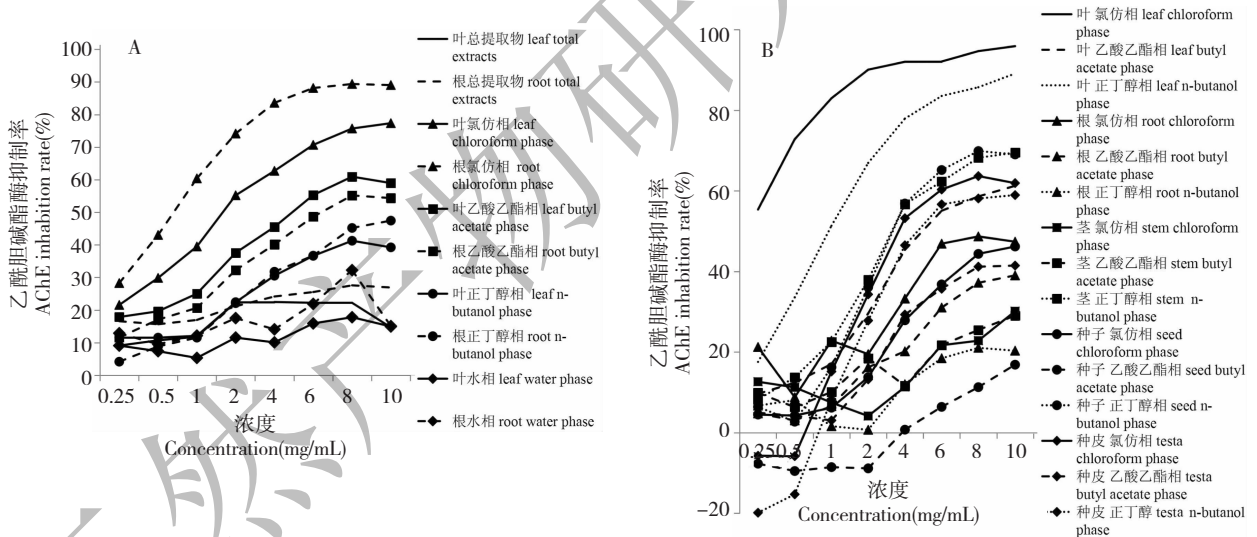


图 1 小花棘豆(A)和苦马豆(B)不同萃取相的乙酰胆碱酯酶平均抑制率

Fig. 1 AChE inhibition rate of different extracts of *O. glabra* (A) and *S. salsula* (B)

### 2.2 小花棘豆和苦马豆各萃取相抗 AChE 活性的 $IC_{50}$ 值

小花棘豆和苦马豆各萃取相抗 AChE 活性的  $IC_{50}$  值见图 2。从图 2A 中可以看出,无论是小花棘豆的叶还是根,其氯仿相都具有较高的 AChE 抑制活性, $IC_{50}$  值分别为 1.69 mg/mL 和 0.67 mg/mL,而乙酸乙酯相和正丁醇相对 AChE 的抑制活性较低。从图 2B 中可以看出苦马豆叶氯仿相具有最高的

AChE 抑制活性,其  $IC_{50}$  值为 0.17 mg/mL,而其他各萃取相对 AChE 的抑制活性较低,有的萃取相甚至因活性较低而无法准确测定  $IC_{50}$ 。

### 2.3 小花棘豆和苦马豆叶氯仿相对 AChE 抑制机理的检测

小花棘豆和苦马豆叶氯仿相 AChE 催化反应速率随酶浓度变化的曲线见图 3,图中的空白的直线代表样品浓度为 0 mg/mL 时酶催化反应速率随酶

浓度的变化。从图中可以看出,加入样品后的直线斜率小于空白的直线斜率,且随着小花棘豆和苦马豆样品浓度的提高,酶催化反应速率逐渐降低,由此

可以说明,小花棘豆和苦马豆对 AChE 的抑制机理为可逆抑制。

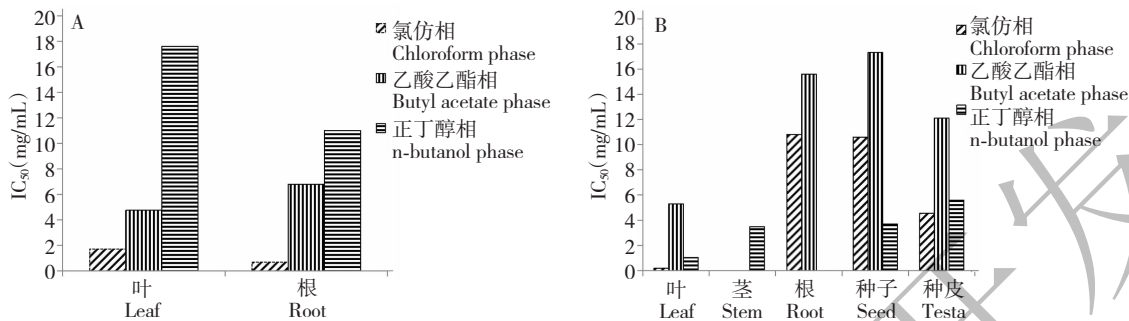


图2 小花棘豆(A)和苦马豆(B)不同萃取相抗AChE IC<sub>50</sub>值

Fig. 2 IC<sub>50</sub> values of AChE inhibition activity of different extracts of *O. glabra* (A) and *S. salsula* (B)

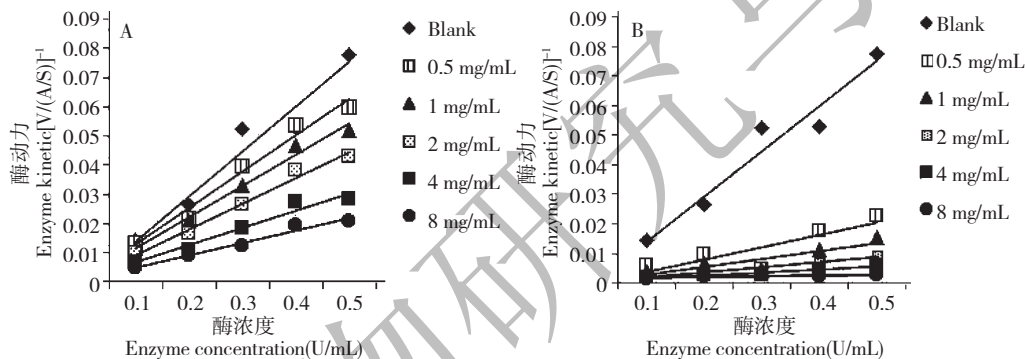


图3 小花棘豆(A)和苦马豆(B)的乙酰胆碱酯酶抑制机理

Fig. 3 AChE inhibition mechanism of *O. glabra* (A) and *S. salsula* (B)

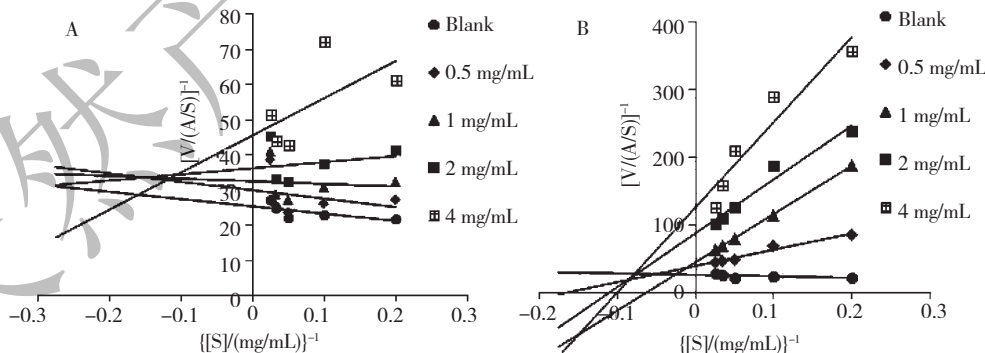


图4 小花棘豆(A)和苦马豆(B)的Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots of *O. glabra* (A) and *S. salsula* (B)

### 2.4 小花棘豆和苦马豆叶氯仿相对 AChE 的动力学研究

小花棘豆和苦马豆叶氯仿相的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线如图4所示,由双倒数曲线计算得到的

抑制动力学参数见表1。如图4所示,五条双倒数曲线相交于第二象限,如表1所示,随着小花棘豆和苦马豆叶氯仿相浓度的增大,酶的最大反应速率  $V_{max}$  逐渐降低,由空白时的 0.0392 降低到样品浓度

为 4.00 mg/mL 时的 0.0219, 而米氏常数  $K_m$  逐渐增大, 由空白时的 0.8075 增加到样品浓度为 4.00 mg/mL 时的 2.3076。由酶的可逆抑制动力学

特征, 我们可以得出小花棘豆和苦马豆对 AChE 的抑制类型为混合型抑制。

表 1 小花棘豆(A)和苦马豆(B)的抑制动力学参数

Table 1 Inhibitory kinetic parameters of *O. glabra*(A) and *S. salsula*(B)

		米氏方程 Michaelis- Menten equation	纵截距 Vertical intercept	横截距 Horizontal intercept	$V_{max}$	$K_m$
A	空白 Blank	$y = -20.76x + 25.48$	25.4840	1.2383	0.0392	-0.8075
	0.5 mg/mL	$y = -24.07x + 30.10$	30.1000	1.2503	0.0332	-0.7998
	1.00 mg/mL	$y = -7.91x + 32.54$	32.5410	4.1151	0.0307	-0.2430
	2.00 mg/mL	$y = 18.09x + 36.26$	36.2580	-2.0056	0.0276	0.4986
	4.00 mg/mL	$y = 105.55x + 45.74$	45.7400	-0.4333	0.0219	2.3076
B	空白 Blank	$y = -20.76x + 25.48$	25.4840	1.2383	0.0392	-0.8075
	0.5 mg/mL	$y = 239.30x + 38.94$	38.9410	-0.1627	0.0257	6.1452
	1.00 mg/mL	$y = 711.06x + 44.11$	44.1050	-0.0620	0.0227	16.1220
	2.00 mg/mL	$y = 797.41x + 87.03$	87.0290	-0.1091	0.0115	9.1626
	4.00 mg/mL	$y = 1253.20x + 125.23$	125.2300	-0.0999	0.0080	10.0072

### 3 结论

本实验对小花棘豆和苦马豆 2 种植物的共 25 相萃取物进行了 AChE 抑制活性和动力学研究, 实验结果显示, 小花棘豆根、叶以及苦马豆叶的氯仿相萃取物具有较高的 AChE 抑制活性, 其  $IC_{50}$  值分别为 0.67、1.69 mg/mL 和 0.17 mg/mL, 表明这 3 种萃取相中极有可能含有较强的 AChE 抑制剂, 对其化学成分进一步研究, 将有可能获得有价值的活性先导物。目前对这些萃取相的活性追踪、化学成分的分析分离与结构鉴定工作正在进行中。另外, 动力学研究表明, 小花棘豆和苦马豆对 AChE 的抑制类型均为可逆的混合型抑制。

#### 参考文献

- Xie XY (谢修银), Wang CX (汪存信), Wang ZY (王志勇). Thermokinetic studies on the inhibition of acetylcholinesterase reaction by SDS. *Acta Chim Sin* (化学学报), 2006, 21: 2151-2156.
- Ji KY (冀开元). Gene expression data analysis of Alzheimer's disease on etiology. Guangzhou: Southern Medical University (南方医科大学), PhD. 2015.
- Paraoanu LE, Steinert G, Klaczinski J, et al. On functions of cholinesterases during embryonic development. *J Mol Neurosci*, 2006, 30: 201-204.

- Sun CH (孙春红), Zou ZR (邹峥嵘). Research progress on plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 21: 3172-3184.
- Ibach B, Haen E. Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Design*, 2004, 10: 231-251.
- Zou L (邹磊), Quan HM (全海明). Advances in the research of acetylcholinesterase inhibitors. *Food Sci* (食品科学), 2005, 26: 105-108.
- Lou YH (楼影涵), Cha XM (查晓明), Zhang LL (张莉莉), et al. Advances in acetylcholinesterase inhibitors derived from natural products. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2012, 9: 385-393.
- Yin SW (殷帅文), Huang FC (黄凤春), Zhang YY (张圆圆), et al. Evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity of different plant belonging to pteridophyta extracts. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21: 854-857.
- Oh MH, Houghton PJ, Whang WK, et al. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. *Phytomedicine*, 2004, 11: 544-548.
- Wang S (王帅), Wu SQ (吴书奇), Hu JJ (胡建军), et al. Isolation and detection of swainsonine from *Oxytropis glabra* in the southern Xinjiang region. *Pratac Sci* (草业科学), 2011, 6: 1194-1197.
- Zhao QM (赵清梅), Yu YT (余永涛). Quantitative determination of total alkaloids in *Swainsoniasalsula* with acid dye colorimetry. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), 2015, 7: 1710-1712.

- 12 Hung TM, Na MK, Min BS, *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors effect of lignans isolated from *Schizandrachinensis*. *Arch Pharm Res*, 2007, 30:685-690.
- 13 Yin SW (殷帅文), Liu LP (刘丽萍), Wang AP (王安萍), *et al.* 17 Kinds of plant different solvent extracts acetylcholinesterase inhibition activity. *Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), 2012, 10:293-296.
- 14 Liu B (刘斌), Zhou PJ (周培疆), Wu XG (吴新国), *et al.* Inhibition effect of benzidine on alkaline phosphatase and its kinetics study. *Environ Sci Technol* (环境科学与技术), 2005, 28(3):6-8.
- 15 Duan DZ (段东柱). Anti-acetylcholinesterase activity constituents from medicinal plants. Lanzhou: Lanzhou University of Technology (兰州理工大学), Ph.D. 2011.
- 16 Liu X, Jia YL, Chen JW, *et al.* Inhibition effects of benzyldeneacetone, benzylacetone, and 4-phenyl-2-butanol on the activity of mushroom tyrosinase. *J Biosci Bioeng*, 2015, 119: 275-279.
- 
- (上接第 1676 页)
- 4 Gao TS (高天曙), Zhao YY (赵玉瑶), Wei Z (魏征). Study of hypolipidemic effects of asiaticoside on obese mice induced by high fat diet. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2016, 3:279-282.
- 5 Jiang HQ (江汉奇), Liang YH (梁益辉). Research review of TCM in treating hyperlipidemia. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2013, 5(7):119-122.
- 6 Piao SH (朴胜华), Guo J (郭姣), Hu ZP (胡竹平). Clinical research of Chinese medicine syndromes of hyperlipidemia inpatients. *Chin J Integr Tradit Western Med* (中国中西医结合杂志), 2012, 32:1322-1325.
- 7 Zhu ML (朱美林), Jia LQ (贾连群), Yang GL (杨关林), *et al.* Study on the effects of spleen deficiency state on liver cholesterol metabolism in rat with hyperlipidemia and its mechanism. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2015, 30:2712-2716.
- 8 Zhan Y (占煜), Chen TY (陈泰宇), Tang SY (唐诗宇), *et al.* Study on the treatment of chronic constipation with colon water solution mediated by aquaporin 3. *J North Sichuan Med Coll* (川北医学院学报), 2014, 29:542-545.
- 9 Wang KS, Komar AR, Ma T, *et al.* Gastric acid secretion in aquaporin-4 knockout mice. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 279:448-453.
- 10 Kang L (康乐), Gao M (高明), Ding N (丁宁), *et al.* Effects of compound catechu anti-diarrhea ointment on expression of aquaporin3 in colonic tissues of diarrhea model rats. *Tianjin Med J* (天津医药), 2013, 41:1089-1091.
- 11 Niu TH (牛亭惠), Wu GT (吴国泰), Chen ZH (陈振鹤), *et al.* Expression of aquaporin-3 in colon mucosa of rats with slow transit constipation. *J Gansu Univ Chin Med* (甘肃中医药大学学报), 2017, 34(2):7-10.
- 12 Ji TL (姬甜丽), Qian HH (钱海华). Comparison of two kinds of rat model for slow transit constipation and expression of aquaporins in them. *Chin J Rehabil Theory Pract* (中医康复理论与实践) 2017, 23:529-533.
- 13 Li ZH (李姿慧), Wang J (王键), Cai RL (蔡荣林), *et al.* Effects of Shenling Baizhu Powder on the expressions of AQP3 and AQP4 in UC rats via ERK/p38 MAPK signal pathway. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2015, 37:1883-1888.