

# 药用植物中乙酰胆碱酯酶抑制活性和抗氧化活性的筛选

杨赞<sup>1</sup>, 刘敏<sup>1\*</sup>, 李建<sup>1</sup>, 张玉强<sup>2</sup>, 陆亮<sup>3</sup>

(1. 防化学院, 北京 102205; 2. 汕头大学理学院生物系, 广东 汕头 515063;  
3. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 乌鲁木齐 830052)

**[摘要]** 目的:对 24 种药用植物醇提物的乙酰胆碱酯酶抑制活性和抗氧化活性进行筛选研究。方法:70% 乙醇回流提取植物粗提物;目标粗提物采用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取,得到氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水部位;乙酰胆碱酯酶抑制活性测定采用改良的 Ellman 法和薄层色谱(TLC)生物自显影法相结合的方法;抗氧化活性采用清除 DPPH 自由基能力进行评价。结果:结合改良 Ellman 法和 TLC 生物自显影法对 24 种植物的醇提物的抗乙酰胆碱酯酶抑制活性进行评价,结果表明红毛七、金不换、飞龙掌血、白花映山红和八角枫 5 种植物粗提物具有显著的抑制活性,在终浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,其抑制率分别为  $(88.72 \pm 1.47)\%$ ,  $(82.25 \pm 1.32)\%$ ,  $(77.71 \pm 1.61)\%$ ,  $(77.00 \pm 1.38)\%$ ,  $(75.22 \pm 1.28)\%$ , 其清除 DPPH 自由基  $\text{IC}_{50}$  分别为  $153.75, 74.95, 50.00, 10.87, 24.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在这 5 种植物粗提物不同萃取部位中,红毛七和金不换氯仿部位对乙酰胆碱酯酶抑制活性最强,其  $\text{IC}_{50}$  为  $33.97, 38.79 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其清除 DPPH 自由基的  $\text{IC}_{50}$  为  $302.95, 79.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:金不换和红毛七粗提物氯仿部位具有较强的乙酰胆碱酯酶抑制活性和抗氧化活性,可进行进一步的追踪分离研究。

**[关键词]** 药用植物; 抗乙酰胆碱酯酶活性; 抗氧化性; 老年性痴呆

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0213-06

**[收稿日期]** 20120826(017)

**[基金项目]** 海南三亚市专项科研试制项目(2011ks 15)

**[第一作者]** 杨赞,在读硕士研究生,从事生化药理研究, Tel: 010-66756378, E-mail: yangyun074@sina.com

**[通讯作者]** \* 刘敏,博士,教授,从事药理毒理研究, Tel: 010-66756378, E-mail: liumin99999@sina.com

- [ 2 ] 孙秀才,冯建章,斐晓阳,等. 姜黄素对食高脂饲料家兔血管内皮功能的保护作用[J]. 岭南医学杂志, 2004, 10(1):60.
- [ 3 ] Bharti A C, Donato N, Sing S, et al. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and Ikappa Balpha kinase in human multiplemyeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis [J]. Blood, 2003, 101(3):1053.
- [ 4 ] 赵珍东. 姜黄素抗肝纤维化作用及机理研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(03):122.
- [ 5 ] 钟益宁,甄汉深,滕建北,等. 姜黄素衍生物的合成、表征及其体外抗菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 12(2):46.
- [ 6 ] 覃葆,谢金鲜,杨海玲,邓欢,等. 不同炮制方法对广西莪术姜黄素成分及镇痛抗炎的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):35.
- [ 7 ] 曾晓会,陈玉兴,赵自明,等. 姜黄素微囊在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2):107.
- [ 8 ] 胡颖军,张进朝,王岚,等. 银丹心脑血管软胶囊对高脂血症大鼠血脂和血管内皮分泌物质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21):162.
- [ 9 ] 王左,张春燕. 还原注射液对急性脑出血大鼠脑组织中乳酸、 $\text{Ca}^{2+}$  及自由基代谢的影响[J]. 中医杂志, 2000, 41(2):106.
- [ 10 ] Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis [J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(2):110.
- [ 11 ] 李丹,李玉洁,杨庆,等. 氧化应激与心血管疾病的关系研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):60.
- [ 12 ] 李丹,李玉洁,杨庆,等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8):272.
- [ 13 ] 王蕊,李景君,徐京育. 复方丹参饮对胰岛素抵抗型大鼠血管内皮细胞一氧化氮及内皮的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(2):191.

[责任编辑 聂淑琴]

## Screening of Some Medicinal Plants for Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity

YANG Yun<sup>1</sup>, LIU Min<sup>1\*</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, ZHANG Yu-qiang<sup>2</sup>, LU Liang<sup>3</sup>

(1. Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China;

2. Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China;

3. Food Science and Pharmacy Colleges, Xinjiang Agricultural University, Wulumuqi 830052, China)

**[ Abstract ] Objective:** The ethanol extracts of 24 medicinal plants were screened for their anti-acetylcholinesterase (AChE) activity and antioxidant activity. **Method:** The medicinal plants were extracted by ethanol (70%) under reflux. The objective extracts would be extracted by different solvents-dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol, and water respectively, in order to obtain their dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol, and aqueous-soluble fractions. The AChE inhibitory activity was tested by TLC bioautographic method combined with modified Ellman's colorimetric method; Antioxidant activity was evaluated by 2, 2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method. **Result:** On the basis of the evaluation of 24 medicinal plants tested by TLC bioautographic method and modified Ellman's colorimetric method, some medicinal plants had taken on significant anti-acetylcholinesterase activity and DPPH free radical-scavenging activity, such as *Leonfice robustum* (Maxim.) Diels, *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo, *Toddalia asiatica* (L.) lam., *Rhododendron mucronatum* G. Don and *Alangium chinense* (Lour.) Harms. The inhibition rates of the above medicinal plants were (88.72 ± 1.47)%, (82.25 ± 1.32)%, (77.71 ± 1.61)%, (77.00 ± 1.38)% and (75.22 ± 1.28)% at the concentration of 1g · L<sup>-1</sup>, respectively; And IC<sub>50</sub> value of DPPH free radical-scavenging activity were 153.75, 74.95, 50.00, 10.87, 24.40 mg · L<sup>-1</sup>, respectively. Compared with the the various extracts based on kinds of solvents, dichloromethane fractions of *L. robustum* and *S. kwangsiensis* had the higher anti-acetylcholinesterase activity, which IC<sub>50</sub> value were 33.97, 38.79 mg · L<sup>-1</sup>, while IC<sub>50</sub> value of DPPH free radical-scavenging activity were 302.95, 79.45 mg · L<sup>-1</sup>. **Conclusion:** Dichloromethane fractions of *L. robustum* and *S. kwangsiensis* extracts have shown high AChE inhibitory capacity and antioxidant activity, so they will be further performed bio-guided isolation and purified to obtain active compounds.

**[ Key words ]** medicinal plants; anti-acetylcholinesterase activity; antioxidant activity; Alzheimer's disease

老年性痴呆,即阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD),是大脑半球的记忆、语言和推理等智能处于受损状态而产生的一种疾病,是老龄人口中发病率最高的疾病之一<sup>[1]</sup>。尽管对 AD 没有明确的病因学,但通过乙酰胆碱酯酶抑制剂(acetylcholinesterase inhibitors, AChEIs)来增加乙酰胆碱的数量作为最有效的治疗策略已经被广泛接受。目前美国食品药品监督管理局(FDA)批准的用于 AD 治疗的药物仅有 5 种,其中 4 种(Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, Tacrine)<sup>[2]</sup>就为胆碱酯酶抑制剂。此外,最近的研究<sup>[3]</sup>指出,在 AD 大脑衰老斑中发现的 Aβ 蛋白能够诱导炎症过程中氧自由基的释放<sup>[4]</sup>,氧自由基能破坏细胞的成分,同时也能在炎症中作为第二种信使,抗氧化剂能够清除氧

自由基,同时也能减弱炎症途径。因此,抗氧化剂就有可能用作 AD 的治疗<sup>[5-6]</sup>。

从药物发现的历史来看,植物往往是发现新活性化合物的源头。就 AChEIs 而言,从植物中分离出的石杉碱甲<sup>[7]</sup>(huperzine A)、加兰他敏(galantamine)因活性高、选择性强、副作用小等优点<sup>[8]</sup>,已用于临床。我国的药用天然植物有上万种,这给寻找天然乙酰胆碱酯酶抑制剂和抗氧化药物提供了丰富的资源宝库<sup>[9]</sup>。为了寻找同时具有乙酰胆碱酯酶抑制活性和抗氧化性的天然高活性化合物,本实验对 24 种药用植物的醇提物进行了乙酰胆碱酯酶抑制活性和抗氧化活性的筛选及活性部位的分离追踪。

## 1 材料

**1.1 药材** 独角芋 *Caladium bicolor* (Ait.) vent (块茎,河北)、金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu (根,云南)、臭牡丹 *Clerodendron bungei* Steud. (茎,安徽)、红茴香根 *Illicium lanceolatum* A. C. Smith (根,广西)、红毛七 *Leonice robustum* (Maxim.) Diels (根,陕西)、山皂角 *Gleditsia horrida* (Thunb.) Makino (果实,河北)、丝绵木 *Euonymus bungeanus* Maxim. (根,吉林)、飞龙掌血 *Toddalia asiatica* (L.) lam. (根,广西)、八角枫 *Alangium chinense* (Lour.) Harms (根,辽宁)、小贯众 *Cyrtomium fortunei* J. Smith. (茎,陕西)、野烟 *Lobelia seguinii* Lévl. Et Vant. (叶,贵州)、地椒 *Thymus serpyllum* L. (全草,河北)、络石藤 *Trachelospermum jasminoides* (Lindl.) Lem. (茎叶,安徽)、青木香 *Aristolochia contorta* Bunge (根,安徽)、白花映山红 *Rhododendron mucronatum* G. Don (茎叶,四川)、无爷藤 *Cassytha filiformis* L. (全草,广西)、莽草 *Illicium religiosum* Sieb. (果实,广西)、草豆蔻 *Alpinia katsumadai* Hayata (种子,海南)、槟榔 *Areca catechu* L. (种子,海南)、金不换 *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo (根块茎,广西)、常春藤 *Hedera nepalensis* K. Koch var. *sinensis* (Tobl.) Rehd. (茎叶,江苏)、算盘子 *Glochidion peberum* (L.) Hutch (全株,云南)、阿魏 *Ferula assa foetida* L. (分泌的树脂,新疆)、苏木 *Caesalpinia sappan* L. (干燥心材,海南)。以上实验所用的植物药材均购买于安国市冷背药材有限公司,由防化学院生物教研室刘敏教授鉴定。

**1.2 动物** 实验所用老鼠均为 SD 大鼠,雄性,体重 180~200 g,合格证号 SCXK (京) 2009-0007,购买于北京华卓康生物科技有限公司。

**1.3 仪器与试剂** RE52CS 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),LGJ-10 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司),智能生化培养箱(宁波海曙赛富实验仪器厂),680 型酶标仪(美国 BIO-RAD)。

乙酰胆碱酯酶(AChE from Electric eel, EC 3.1.1.7, type-VI-S, Sigma-Aldrich),5'-二硫代双硝基苯甲酸(dithiobisnitrobenzoic acid, DTNB, Sigma-Aldrich),碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, ATCI, Sigma-Aldrich),薄层层析硅胶板(HSGF254)(烟台江友硅胶开发有限公司),乙酸- $\alpha$ -萘脂( $\alpha$ -Naphthyl acetate, Amresco),Fast Blue B Salt (Sigma-Aldrich),毒扁豆碱(Eserine, Sigma-Aldrich)。

## 2 方法

**2.1 大鼠匀浆组织的制备** 实验中 Ellman 法所用的酶均来自大鼠匀浆组织,制备方法采用 Qin Zhao 等<sup>[10]</sup>报道的方法,略微有所改动。考马斯亮蓝法测得蛋白含量为  $3.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.2 植物粗提物样品的制备** 取药材 100 g,粉碎,于 1 L 70% 乙醇中加热回流提取 3 次,每次 2 h,抽滤除渣,合并提取液。合并的提取液用旋转蒸发仪在 60 °C 减压蒸馏后,冷冻干燥,研磨粉碎后,得植物粗提物样品,称重,4 °C 储存、备用。

**2.3 抑制大鼠大脑匀浆组织 AChE 活性试验** 抑制大鼠大脑匀浆组织 AChE 活性采用改良的 Ellman 方法<sup>[11-12]</sup>,利用经典的反应体系: $140 \mu\text{L } 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS (pH 8.0),  $20 \mu\text{L}$  大鼠匀浆组织(酶液),  $20 \mu\text{L}$  样品溶液依次加入 96 孔酶标板,震荡混匀,4 °C 孵育 20 min 后,加入  $10 \mu\text{L}$  DTNB,再加入  $10 \mu\text{L}$  ATCI 后反应开始,37 °C 孵育 20 min 后,用酶标仪在 415 nm 测量吸光度(A)。Ellman 方法测抑制率的计算公式:

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{实验对照}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{空白对照}})] \times 100\%$$

其中,空白组用  $20 \mu\text{L}$  PBS 代替  $20 \mu\text{L}$  样品溶液;空白对照组用  $20 \mu\text{L}$  PBS 代替  $20 \mu\text{L}$  样品溶液,再用  $20 \mu\text{L}$  PBS 代替  $20 \mu\text{L}$  大鼠匀浆组织(酶);实验空白组用  $20 \mu\text{L}$  PBS 代替  $20 \mu\text{L}$  大鼠匀浆组织(酶)。实验以毒扁豆碱(Eserine)为阳性对照,所有实验重复 3 次。

**2.4 薄层色谱(TLC)生物自显影试验** TLC 生物自显影方法参考 Zhongduo Yang<sup>[13]</sup>报道的方法。

**2.5 清除 DPPH 自由基试验** 清除 DPPH 自由基的抑制率采用 Braca A. 报道<sup>[14]</sup>的方法,略微加以改动实验组:取一定浓度的植物粗提物样品溶液 1 mL 及 3 mL DPPH 溶液( $0.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )先后加入同一具塞试管中,摇匀,在黑暗中 37 °C 放置 30 min,以乙醇为空白在 517 nm 测定其吸光度(A)。实验空白组用 3 mL 乙醇代替 3 mL DPPH 溶液;空白组用 1 mL 乙醇代替 1 mL 植物粗提物样品溶液。对 DPPH 的抑制率公式:

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{实验空白组}}) / A_{\text{空白组}}] \times 100\%$$

**2.6 植物粗提物的萃取分离** 取 10 g 植物粗提物于 500 mL 水中溶解,依次分别用等体积的氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取 3 次,得氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水 4 种部位,减压旋蒸,冷冻干燥,得部位样品。

**2.7 数据处理** 所有样品平行做 3 次,实验结果用

$\bar{x} \pm s$  表示,通过 SPSS 16.0 软件进行  $t$  检验分析,对其显著性进行比较,当  $P < 0.05$  时表示其有显著性。所有  $IC_{50}$  值是通过 Origin 8.0 软件按照抑制率对浓度 Logit 作图拟合曲线而求出。

### 3 结果与讨论

**3.1** 24 种药用植物抗乙酰胆碱酯酶活性的筛选 Ellman 法对乙酰胆碱酯酶抑制活性测量的结果表明(表 1),在终质量浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,24 种中草药植物抗 AChE 抑制活性普遍较弱,只有白花映山红的抑制率较高,为  $(53.70 \pm 0.12)\%$ 。在终质量浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,大多数植物表现出明显的乙酰胆碱酯酶抑制活性,其中红毛七、金不换、飞龙掌血、白花映山红和八角枫具有显著的抑制活性,其抑制率分别为  $(88.72 \pm 1.47)\%$ ,  $(82.25 \pm 1.32)\%$ ,  $(77.71 \pm 1.61)\%$ ,  $(77.00 \pm 1.38)\%$  和  $(75.22 \pm 1.28)\%$ 。阳性对照毒扁豆碱在终质量浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对 AChE 的抑制率分别为

$(77.30 \pm 0.61)\%$  和  $(92.09 \pm 0.27)\%$ 。TLC 生物自显影法结果表明(见表 1),红毛七、飞龙掌血、白花映山红、金不换、苏木、八角枫、青木香等 7 种粗提物显示出抑制活性,其余植物用 TLC 方法均没有显示抑制活性。

综合比较,2 种方法测定的结果基本是一致的,红毛七、飞龙掌血、白花映山红、金不换和八角枫用 Ellman 方法测定具有显著的抑制活性,同时用 TLC 方法也显示出抑制活性。青木香和苏木用 Ellman 法活性较弱,但其 TLC 生物自显影结果却显示出了活性,可能是因为 Ellman 法的检测线高于 TLC 生物自显影法<sup>[15]</sup> 所导致的。因此,初步选定红毛七、飞龙掌血、白花映山红、金不换和八角枫 5 种植物粗提物为下一步追踪筛选的对象。

**3.2** 5 种具有较高抑制 AChE 活性的粗提物的追踪筛选 为了筛选出既具有抗 AChE 活性,又有抗氧化性的 AD 药物。实验进一步对初选的红毛七、

表 1 Ellman 法和 TLC 生物自显影法对 24 种植物粗提物 AChE 抑制活性的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

No.	药材名称	植物学名	提取率 /%	抑制率/% (Ellman 法)		TLC 法
				$100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	
1	独角芋	<i>Caladium bicolor</i> (Ait.) vent	11.84	$23.80 \pm 0.83^{(3)}$	$30.47 \pm 0.51^{(3)}$	-
2	金铁锁	<i>Psammophilus tunicoides</i> W. C. Wu	48.80	$29.85 \pm 0.73^{(3)}$	$40.27 \pm 1.01^{(3)}$	-
3	臭牡丹	<i>Clerodendron bungei</i> Steud.	8.10	$18.69 \pm 0.57^{(3)}$	$50.95 \pm 0.39^{(3)}$	-
4	红茴香根	<i>Illicium lanceolatum</i> A. C. Smith	10.52	$29.25 \pm 0.64^{(3)}$	$58.14 \pm 0.11^{(3)}$	-
5	红毛七	<i>Leonice robustum</i> (Maxim.) Diels	16.16	$42.55 \pm 1.13^{(3)}$	$88.72 \pm 1.47$	++
6	山皂角	<i>Gleditsia horrida</i> (Thunb.) Makino	9.52	$16.22 \pm 1.76^{(3)}$	$47.62 \pm 0.87^{(3)}$	-
7	丝绵木	<i>Euonymus bungeanus</i> Maxim.	7.53	$16.74 \pm 0.57^{(3)}$	$56.88 \pm 1.01^{(3)}$	-
8	飞龙掌血	<i>Toddalia asiatica</i> (L.) lam.	8.93	$33.99 \pm 1.54^{(3)}$	$77.71 \pm 1.61^{(1)}$	++
9	八角枫	<i>Alangium chinense</i> (Lour.) Harms	15.58	$19.94 \pm 0.31^{(3)}$	$75.22 \pm 1.28^{(2)}$	+
10	小贯众	<i>Cyrtomium fortunei</i> J. Smith.	14.00	$7.54 \pm 1.31^{(3)}$	$38.19 \pm 0.84^{(3)}$	-
11	野烟	<i>Lobelia seguinii</i> Lévl. Et Vant.	9.64	$18.18 \pm 1.66^{(3)}$	$57.94 \pm 0.28^{(3)}$	-
12	地椒	<i>Thymus serpyllum</i> L.	12.10	$13.44 \pm 0.26^{(3)}$	$68.22 \pm 0.22^{(3)}$	-
13	络石藤	<i>Trachelospermum jasminoides</i> (Lindl.) Lem.	21.00	$9.87 \pm 0.82^{(3)}$	$48.19 \pm 2.94^{(3)}$	-
14	青木香	<i>Aristolochia contorta</i> Bunge	12.23	$14.50 \pm 0.64^{(3)}$	$52.77 \pm 0.16^{(3)}$	+
15	白花映山红	<i>Rhododendron mucronatum</i> G. Don	27.20	$53.70 \pm 0.12^{(3)}$	$77.00 \pm 1.38^{(2)}$	++
16	无谷藤	<i>Cassytha filiformis</i> L.	37.46	$45.14 \pm 0.45^{(3)}$	$54.96 \pm 3.44^{(3)}$	-
17	莽草	<i>Illicium religiosum</i> Sieb.	9.77	$38.19 \pm 0.25^{(3)}$	$52.61 \pm 1.15^{(3)}$	-
18	草豆蔻	<i>Alpinia katsumadai</i> Hayata	10.40	$22.20 \pm 0.91^{(3)}$	$58.92 \pm 1.04^{(3)}$	-
19	槟榔	<i>Areca catechu</i> L.	16.61	$19.21 \pm 1.25^{(3)}$	$50.05 \pm 2.12^{(3)}$	-
20	金不换	<i>Stephania kwangsiensis</i> H. S. Lo	8.93	$42.25 \pm 1.31^{(3)}$	$82.25 \pm 1.32$	++
21	常春藤	<i>Hedera nepalensis</i> K. Koch var. <i>sinensis</i> (Tobl.) Rehd.	12.45	$32.55 \pm 0.32^{(3)}$	$43.62 \pm 1.42^{(3)}$	-
22	算盘子	<i>Glochidion peberum</i> (L.) Hutch	43.42	$12.26 \pm 1.35^{(3)}$	$64.45 \pm 2.20^{(3)}$	-
23	阿魏	<i>Ferula assa foetida</i> L.	24.47	$25.31 \pm 0.83^{(3)}$	$42.32 \pm 0.02^{(3)}$	-
24	苏木	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	11.50	$27.16 \pm 1.29^{(3)}$	$58.47 \pm 1.85^{(2)}$	+
	毒扁豆碱	-	-	$77.30 \pm 0.61$	$92.09 \pm 0.27$	++ <sup>a</sup>

注:与毒扁豆碱组比较<sup>(1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>(2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>(3)</sup>  $P < 0.001$ ; ++ 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; <sup>a</sup> 表示毒扁豆碱质量为  $1 \times 10^{-2} \mu\text{g}$  时的抑制斑点,实验以毒扁豆碱阳性对照进行比较。

飞龙掌血、白花映山红、金不换和八角枫 5 种粗提物的抗氧化活性和活性部位进行了追踪筛选。

**3.2.1** 5 种中药植物粗提物的抗氧化性 采用 2.5 方法对红毛七、飞龙掌血、白花映山红、金不换和八角枫 5 种植物的粗提物的清除 DPPH 自由基的活性进行测定,图 1 为 5 种植物粗提物的量效曲线图,结果表明随着粗提物浓度的逐渐增大,5 种植物粗提物对 DPPH 的抑制率都呈现出先快速增大,而后趋于平缓的趋势,最高抑制率都可达到 90% 以上。其中曲线斜率从大到小的顺序分别为白花映山红、八角枫、飞龙掌血、金不换和红毛七。

红毛七、飞龙掌血、白花映山红、金不换和八角枫 5 种植物粗提物对 DPPH 自由基清除的  $IC_{50}$  分别为 153.75, 50.00, 10.87, 74.95, 24.40  $mg \cdot L^{-1}$ 。其中白花映山红的  $IC_{50}$  最小,抑制活性最强,其余依次为八角枫、飞龙掌血、金不换和红毛七,这与图 1 的结果是一致的。

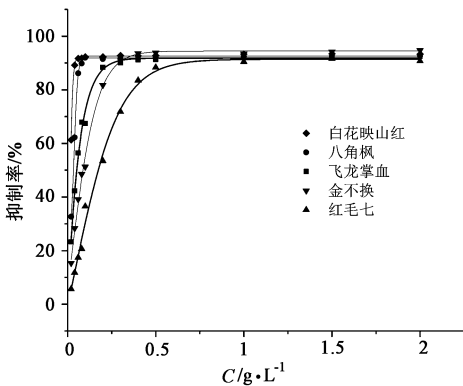


图 1 5 种植物粗提物对 DPPH 自由基清除率随浓度的变化曲线

**3.2.2** 5 种植物粗提物不同萃取部位抗乙酰胆碱酯酶活性 采用 2.6 方法,对 5 种植物的 4 种不同萃取部位分别用 Ellman 法和 TLC 生物自显影法测定其抗 AChE 活性。结果(表 2)表明,在终质量浓

度为 100  $mg \cdot L^{-1}$  时,红毛七氯仿部位和金不换氯仿部位具有显著的抑制活性,其抑制率分别为  $(64.62 \pm 0.09)\%$  和  $(63.84 \pm 1.48)\%$ 。TLC 生物自显影法的测定结果显示红毛七氯仿部位和金不换氯仿部位也都表现出显著的活性,这与 Ellman 法结果是一致的。所以,选定红毛七氯仿部位和金不换氯仿部位进行进一步的活性追踪。

**3.3** 红毛七和金不换氯仿部位抗 AChE 活性和清除 DPPH 自由基的量效曲线和  $IC_{50}$  红毛七和金不换氯仿部位抑制 AChE 的抑制率先是随着浓度的增大而增大,随后趋于平稳;红毛七和金不换清除 DPPH 自由基的清除率先是随着浓度的增加而增加,最后趋于平稳,见图 2。

表 3 为抗 AChE 和清除 DPPH 的半抑制浓度  $IC_{50}$  值,从结果可以看出红毛七和金不换粗提物氯仿部位抑制 AChE 的  $IC_{50}$  两者相差不大,其中阳性对照毒扁豆碱的抑制 AChE 的  $IC_{50}$  为 23.74  $\mu g \cdot L^{-1}$ ;金不换氯仿部位清除 DPPH 自由基的  $IC_{50}$  值要小于红毛七。

**4 结论**

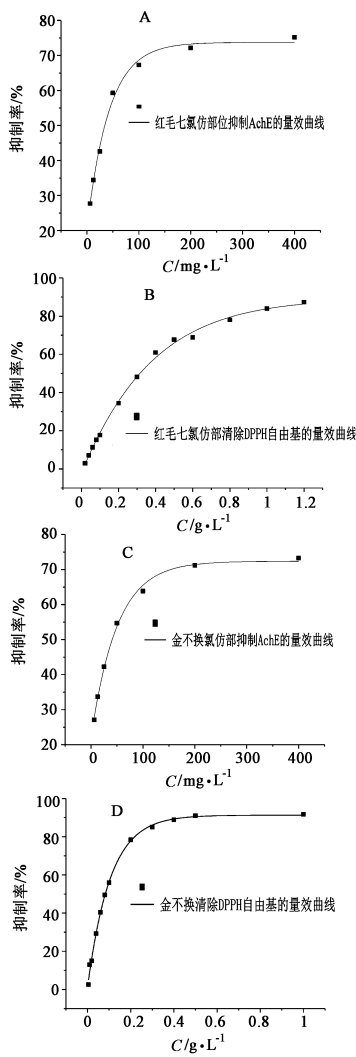
本实验对 24 种药用植物的醇提粗提物的抗乙酰胆碱酯酶活性和抗氧化活性进行了筛选研究,并对初选的金不换、红毛七、白花映山红、飞龙掌血和八角枫 5 种植物粗提物进行了进一步的追踪筛选。结果表明,金不换、红毛七、白花映山红、飞龙掌血和八角枫 5 种植物粗提物具有较强的抗乙酰胆碱酯酶活性和抗氧化活性;红毛七和金不换粗提物氯仿部位具有显著的抗乙酰胆碱酯酶活性和较强的抗氧化活性,可作为进一步活性追踪的部位。总之,这些具有抑制乙酰胆碱酯酶活性和抗氧化活性的植物很有可能能够帮助预防和缓解 AD 病。

表 2 Ellman 法和 TLC 生物自显影法对 5 种植物粗提物的

4 种不同极性萃取部位在终浓度为 100  $mg \cdot L^{-1}$  时的 AChE 抑制活性比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

中药名称	氯仿部位		乙酸乙酯部位		正丁醇部位		水部位	
	TLC 法	抑制率/%	TLC 法	抑制率/%	TLC 法	抑制率/%	TLC 法	抑制率/%
红毛七	++	$64.62 \pm 0.90^{3)}$	-	$44.04 \pm 0.97^{3)}$	-	$46.62 \pm 0.69^{3)}$	-	$35.96 \pm 0.38^{3)}$
飞龙掌血	++	$42.03 \pm 1.38^{3)}$	-	$20.19 \pm 0.13^{3)}$	++	$41.19 \pm 0.51^{3)}$	-	$10.07 \pm 1.63^{3)}$
八角枫	++	$16.84 \pm 0.77^{3)}$	++	$28.01 \pm 0.84^{3)}$	+	$16.41 \pm 0.44^{3)}$	-	$4.52 \pm 0.92^{3)}$
白花映山红	-	$22.93 \pm 0.54^{3)}$	-	$22.52 \pm 0.21^{3)}$	-	$17.87 \pm 0.95^{3)}$	-	$12.50 \pm 0.60^{3)}$
金不换	++	$63.84 \pm 1.48^{2)}$	++	NM	-	$44.33 \pm 0.58^{3)}$	-	$14.11 \pm 0.81^{3)}$

注:毒扁豆碱在终质量浓度为 100  $mg \cdot L^{-1}$  时对 AChE 的抑制率为  $(77.30 \pm 0.61)\%$ 。与毒扁豆碱组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.001$ ;“NM”表示部位没有萃取质量,++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, $1 \times 10^{-2} \mu g$  的毒扁豆碱的抑制斑点为++;实验以毒扁豆碱为阳性对照进行比较。



A. 红毛七粗提物氯仿部抑制 AChE 量效曲线;  
B. 红毛七粗提物氯仿部清除 DPPH 量效曲线;  
C. 金不换粗提物氯仿部抑制 AChE 量效曲线;  
D. 金不换粗提物氯仿部清除 DPPH 量效曲线

图 2 红毛七和金不换粗提物氯仿部位的  
抗 AChE 活性与清除 DPPH 自由基的量效曲线

表 3 红毛七、金不换氯仿部位对 DPPH, AChE 的半抑制浓度 IC<sub>50</sub>

部位	IC <sub>50</sub> /mg·L <sup>-1</sup>	
	清除 DPPH	抑制 AChE
红毛七氯仿部位	302.95	33.97
金不换氯仿部位	79.45	38.79

注: IC<sub>50</sub> 值是通过 Origin 软件按照抑制率对浓度 Logit 作图拟合曲线而求出(最少取 6 个不同的浓度)。

【参考文献】

[ 1 ] K Blennow, M J de Leon, H Zetterberg. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2006, 368(9533): 387.  
[ 2 ] José M, Barbosa Filho. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase [ J ]. Braz J Pharmacogn, 2006, 16(2): 258.

[ 3 ] Stuchbury G, Munch G. Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies [J]. J Neural Transm, 2005, 112(3): 429.  
[ 4 ] Vina J, Lloret A, Orti R, Alonso D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress [J]. Mol Aspects Med, 2004, 25(1): 117.  
[ 5 ] 孙蓉, 钱晓路, 张丽美. 基于当归有效成分的抗早老性痴呆药理作用及分子机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 255.  
[ 6 ] Gibson G E., Huang H M. Oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. Neuro Biol Aging, 2005, 26(5): 575.  
[ 7 ] Wang R, Yan H, Tang X C. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(1): 1.  
[ 8 ] Victoria Zarotsky, John J Sramek, Neal R Cutler. Galantamine hydrobromide: An agent for Alzheimer's disease [J]. Am J Health-Syst Ph, 2003, 60(5): 446.  
[ 9 ] WANG Ying, HUANG Lu-qi. Retrospect and prospect of active principles from Chinese herbs in the treatment of dementia [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(6): 649.  
[ 10 ] Zhao Qin, Tang Xi Can. Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms *in vitro*: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 455(2/3): 101.  
[ 11 ] I Orhan, A R Gülpınar. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of Cyclotrichium niveum, Thymus praecox subsp. caucasicus var. caucasicus, Echinacea purpurea and E. Pallida [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(6): 1304.  
[ 12 ] 杨中锋, 任晋, 薛鹏辉, 等. 藏药种乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 194.  
[ 13 ] Yang Zhongduo, Zhang Xu, Duan Dongzhu, et al. Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts [J]. J Sep Sci, 2009, 32(18): 3257.  
[ 14 ] Braca A, Tommasi N D, Bari L D, et al. Antioxidant principles from Bauhinia terapotensis [J]. J Natural Products, 2001, 64(7): 892.  
[ 15 ] A Marston, J Kissling, K Hostettmann. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants [J]. Phytochemical Analysis, 2002, 13(1): 51.

[责任编辑 聂淑琴]