

# 黄连解毒汤的抗氧化作用及抑制乙酰胆碱酯酶活性的研究

宋建芳, 王宏洁, 司南, 边宝林\*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 筛选黄连解毒汤中与治疗老年性疾病有关的有效成分。方法: 运用紫外分光光度法, 建立体外抗氧化模型和抑制乙酰胆碱酯酶(AchE)活性实验模型, 分析比较了黄连解毒汤全方、单味药及其主要成分的抗氧化作用和对乙酰胆碱酯酶的抑制作用。结果: 复方黄连解毒汤的抗氧化活性比黄连、黄柏和栀子单味药强; 黄芩及其主要成分黄芩苷( $IC_{50} = 12.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )具有较强的抗氧化活性; 与对照品毒扁豆碱和加兰他敏比较, 小檗碱( $IC_{50} = 9.52 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )对乙酰胆碱酯酶的抑制活性较高, 其次是黄连( $IC_{50} = 18.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )水提物, 而黄芩和栀子抑制活性不明显。结论: 黄连解毒汤具有抗氧化和抑制乙酰胆碱酯酶活性作用, 其中具有多羟基的黄酮类是抗氧化活性的主要成分; 而生物碱类则是抑制乙酰胆碱酯酶的主要成分。

[关键词] 黄连解毒汤; 1,1-二苯基-2-三硝基苯胍; 乙酰胆碱酯酶; 老年性痴呆

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0061-04

## Antioxidant Activity and Inhibition on Acetylcholinesterase by Huanglianjiedu Decoction

SONG Jian-fang, WANG Hong-jie, SI Nan, BIAN Bao-lin\*

(Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate and screen the active compounds of Huanglianjiedu decoction(HLJD) for senile dementia. **Method:** Inhibition on acetylcholinesterase and antioxidant activity by HLJD was studied with ultraviolet spectrometry. The single herbs and the major compounds of HLJD were also determined and compared by a rapid and effective acetylcholinesterase inhibition assay and antioxidant assay. **Result:** The formula HLJD had a better antioxidant activity than single herbs except for *Radix Scutellaria* which is rich in polyphenolic compounds. The most active compounds was baicalin ( $IC_{50} = 12.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). The results also indicate that the most active herbs and compounds for AChE inhibition were *Coptidis Rhizoma* ( $IC_{50} = 18.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and berberine ( $IC_{50} = 9.52 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); *Radix Scutellariae*, *Fructus Gardenia* as well as the major compounds of them showed no or lower inhibitory activity. **Conclusion:** It can be concluded that alkaloid compounds in HLJD contribute to the inhibitory activity for acetylcholinesterase and flavanoids compounds contribute to the antioxidant activity.

**[Key words]** HuanglianJiedu Decoction; DPPH; AchE; senile dementia

黄连解毒汤出自《肘后方》,方名始见于《外台秘要》引崔氏方:“前军督护刘车者,得时疾三日已汗解,因饮酒复剧,苦烦干呕,口燥呻吟,错语不得

卧,余思作此黄连解毒汤。”此方系清热解毒代表方剂,由黄连、黄芩、黄柏、栀子(3 2 2 3)组成。主治实热火毒,三焦热盛之证<sup>[1]</sup>。此方化学成分主要包括生物碱类、黄酮类和环烯醚萜类等,其中以小檗碱,黄芩苷和京尼平苷为主要成分。现代药理研究表明黄连解毒汤对肿瘤、脑缺血、糖尿病<sup>[2-4]</sup>等疾病具有良好效果,尤其老年性痴呆<sup>[5]</sup>方面的报道更多。

老年性痴呆为老年人常见疾病之一。调查发

[收稿日期] 2010-01-13

[第一作者] 宋建芳,女,硕士研究生

[通讯作者] \* 边宝林,男,研究员,主要研究中药化学及新药开发, Tel: (010) 64021008; E-mail: bian50101@sina.com

现,随着年龄的增加,老年性痴呆的发病率明显增加<sup>[6]</sup>。氧自由基是老年性疾病及许多其他疾病的致病因子,作为新陈代谢的产物,会导致突变,细胞去分化或酶的破坏,引发动脉粥样硬化,阿尔茨海默病,酒精肝,肺气肿等疾病。乙酰胆碱系统是调节神经功能的重要系统,参与机体众多的生理功能,与老年性疾病密切相关。目前,治疗老年性疾病的方法主要是抗胆碱能药物和改善多巴胺递质药物<sup>[7]</sup>。

运用抗氧化和乙酰胆碱酯酶抑制活性两种关于老年性痴呆的常用药理模型,分析比较黄连解毒汤全方、单味药材和复方主要成分的药理作用,旨在分析和筛选黄连解毒汤治疗老年痴呆的有效成分。

## 1 材料

**1.1 仪器** DU800 紫外/可见分光光度计 (USB001: S/N 8001413, Beckman coulter)。

**1.2 试剂** 乙酰胆碱酯酶 (AChE) (C3389, Sigma, -20); 乙酰胆碱 (ACh) (A5751, Sigma, 1 g, -20); 5, 5-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid) (DTNB) (D8130, Sigma, 2~8); 水杨酸毒扁豆碱 (Eserine) (E8375, Sigma, 2~8); 氢溴酸加兰他敏 (G1660-2MG, Sigma, -20); Trizma Preset crystals (T8443, Sigma); 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) (D9132, Sigma, less than 0); 芦丁 (7176.1 Roth, Sigma, 5 g); 京尼平苷 (Geniposide)、小檗碱 (Berberine)、黄芩苷 (Baicalin) 均由本课题组分离得到,纯度大于 90%; 二甲基亚砜 (DMSO, 北京化学试剂公司, 060730)。黄连和黄柏产于四川省, 栀子产于江西省, 黄芩产于内蒙古自治区, 以上 4 味药材经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定: 黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎; 黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮; 黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georigi 的干燥根; 栀子为 *Gardenia jasminoides* Ellis. 的干燥成熟果实。

## 2 样品的提取与制备

**2.1 复方及单味药材的提取** 复方提取: 按照黄连、黄芩、黄柏、栀子 (3:2:2:3) 比例称取 100 g 药材, 粉碎过一号筛, 加蒸馏水 100 mL, 在 100 温度下提取 2 次, 每次 1.5 h, 收集滤液, 浓缩干燥作为提取物。

单味药提取: 分别取单味药材 100 g, 加水 100

mL, 在 100 温度下提取两次, 每次 1.5 h, 收集滤液, 浓缩干燥作为药材提取物。

**2.2 抗氧化实验样品溶液的制备** 分别精密称取一定量的复方或单味药材的提取物及黄芩苷、小檗碱、栀子苷, 以甲醇溶解, 配制成浓度为 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  作为储备液。

**2.3 乙酰胆碱酯酶抑制活性实验样品溶液的制备** 分别精密称取一定量的复方或单味药材的提取物和黄芩苷、小檗碱、栀子苷, 以二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 配制成 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的储备液, 使用时, 用 DMSO 稀释成所需浓度。

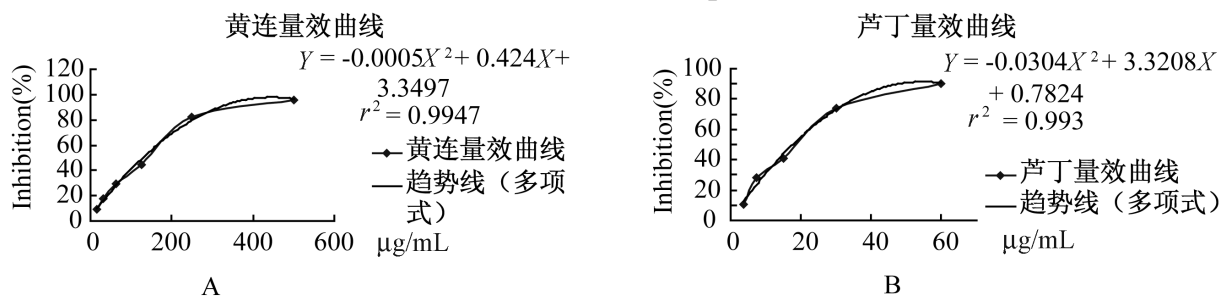
## 3 方法和结果

**3.1 抗氧化活性** 精密吸取上述中药提取物和化合物储备液, 用甲醇稀释成 8 个浓度梯度 7.8 ~ 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  作为样品溶液。精密移取 2.5 mL 的样品溶液和 1 mL 的 DPPH 自由基甲醇溶液 0.3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 0.12  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 混匀, 室温黑暗环境下反应 30 min, 在 518 nm 波长下测定其吸光度值  $A_{\text{sample}}$ , 同时测定上述 2.5 mL 样品溶液与 1 mL 甲醇的混合溶液在 518 nm 的吸光度值作为空白, 再测定 2.5 mL 甲醇与 1 mL 的 DPPH 的混合溶液在 518 nm 的吸光度值  $A_{\text{control}}$ <sup>[8]</sup> 作为对照。按照公式 (1), 以抑制率为纵坐标, 以样品浓度为横坐标, 绘制量效曲线, 根据量效曲线找出拟合度 ( $r^2 = 0.99$ ) 最高的趋势线, 得到一个回归方程, 根据回归方程计算  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 值, 即抑制率为 50% 时样品的浓度, 结果见图 1, 表 1。

**3.2 乙酰胆碱酯酶抑制活性** 精密吸取上述复方或单味药材的提取物和黄芩苷、小檗碱、栀子苷等化合物储备液, 用 DMSO 稀释成 8 个浓度梯度 (7.8 ~ 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 毒扁豆碱除外), 参照 Ellman<sup>[9]</sup> 所建立的比色法<sup>[10]</sup>, 将 20  $\mu\text{L}$  的样品溶液 (20  $\mu\text{L}$  的 DMSO 作为空白  $A_{40\text{control}}$ ) 和 40  $\mu\text{L}$  AChE (2  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Buffer pH 8.0) 溶液加入到 1 900  $\mu\text{L}$  的 pH 8.0 的 0.709% 的 Buffer 溶液中, 在 4 温度下培养 30 min, 快速加入 20  $\mu\text{L}$  的 DTNB (10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Buffer pH 8.0) 和 20  $\mu\text{L}$  的 ACh (12  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Buffer pH 8.0), 在 412 nm 下测定其在 0 min 和 10 min 的吸光度, 记为  $A_{0\text{min}}$  和  $A_{10\text{min}}$ 。按照公式 (2), 以抑制率为纵坐标, 以样品溶液浓度为横坐标, 绘制量效曲线, 根据量效曲线找出拟合度 ( $r^2 = 0.99$ ) 最高的趋势线, 得到一个回归方程, 根据回归方程计算

IC<sub>50</sub> ( μg·mL<sup>-1</sup>) 值, 结果见图 2, 表 1。

$$\text{Inhibition}/\% = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100\% \quad (1)$$

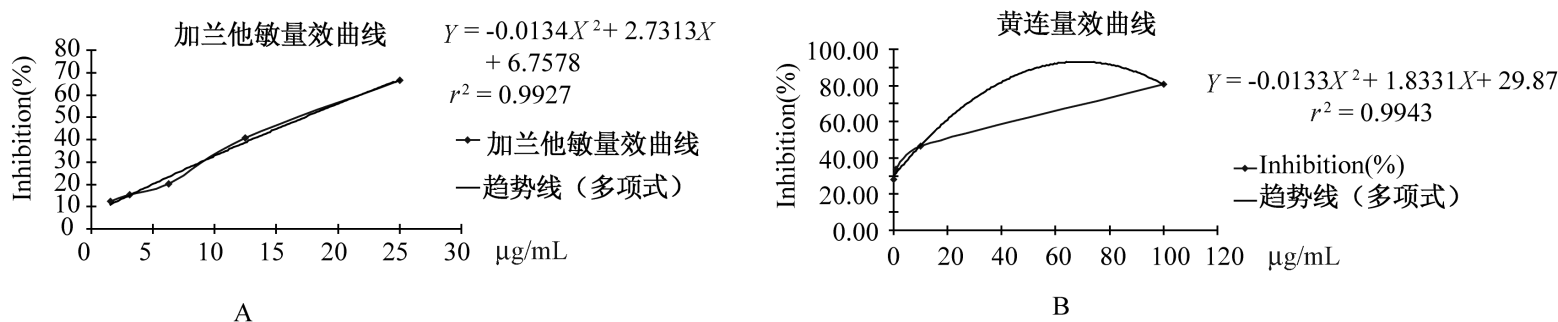


A. 药材黄连; B. 阳性对照芦丁

图 1 抗氧化活性量效曲线及其回归方程(符合多项式分布)

$$A_{0\text{min}} - A_{00\text{min}} = A \quad (2)$$

$$\text{Inhibition}/\% = 100 \times (A_{0\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{0\text{control}}$$



A. 阳性对照氢溴酸加兰他敏; B. 药材黄连

图 2 抑制乙酰胆碱酯酶的量效曲线及其回归方程(符合多项式分布)

表 1 黄连解毒汤抗氧化活性和乙酰胆碱酯酶抑制活性( 珉±s, n=3) / μg·mL<sup>-1</sup>

样品名称	抗氧化(IC <sub>50</sub> )	抑制乙酰胆碱酯酶(IC <sub>50</sub> )
黄连解毒汤复方	116.8 ± 6.27	84.67 ± 3.51
黄连	165.73 ± 15.51	18.89 ± 3.14
黄芩	42.73 ± 7.35	NA
黄柏	150.08 ± 20.39	63.53 ± 14.32
栀子	176.78 ± 15.12	NA
小檗碱	1753.10 ± 36.77	9.52 ± 1.13
京尼平苷	604.13 ± 78.29	74.67 ± 7.30
黄芩苷	12.06 ± 0.98	NA
芦丁	18.44 ± 2.29	—
水杨酸毒扁豆碱	—	0.04 ± 0.01
氢溴酸加兰他敏	—	18.17 ± 0.95

注: “—”: 没有进行对应实验; NA: not active; 所有数据经 Microsoft Excell 中的 STDEV 函数计算, 用均数 ± 标准差( 珉±s) 表示。

从实验结果可以看出, 复方黄连解毒汤的抗氧化活性比黄连、黄柏和栀子强, 黄芩及其主要成分黄芩苷具有较强的抗氧化活性, 说明黄连解毒汤中的抗氧化活性的成分可能是具有多羟基的黄酮类; 与对照品毒扁豆碱和加兰他敏比较, 小檗碱对乙酰胆碱酯酶的抑制活性最高, 其次是含小檗碱较高的黄连, 而在此浓度范围内, 黄芩和栀子没有表现出抑制

活性, 说明对黄连解毒汤中具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的成分可能是生物碱类。

#### 4 讨论

体内氧自由基的增加是人体衰老的一项重要指标, 越来越多的研究发现氧自由基的产生与老年性痴呆(AD) 有关, 并认为氧应激在 AD 发生发展中起关键作用, 淀粉样蛋白的产生和聚集可能诱导氧自由基产生并导致 AD。胆碱酯酶抑制剂 ChEI 可抑制中枢突触间隙的 AChE, 阻止 ACh 的分解, 增加 ACh 活性, 提高脑内 ACh 的含量, 修复老年性痴呆病患者已丧失的胆碱能功能, 阻止神经元间乙酰胆碱的代谢。对提高学习、记忆关系重大。

本实验分析了黄连解毒汤中主要成分的抗氧化作用及抑制乙酰胆碱酯酶活性作用。实验发现, 黄连解毒汤中抗氧化活性的成分主要是黄酮类化合物, 抑制乙酰胆碱酯酶活性的成分主要是生物碱类化合物。

#### [参考文献]

- [ 1 ] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 100.
- [ 2 ] 孙健, 温庆辉, 宋宇, 等. 黄连解毒汤抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(17): 1461.