

具有单胺氧化酶与抑制活性的生物碱筛选

陈效威*, 杨中铎, 朱保应, 孙建慧, 赵俊文

兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050

摘要: 采用酶标法测定从荷叶、钩藤、两面针、止泻木、平贝母 5 种药用植物中分离的 24 个生物碱样品单胺氧化酶抑制活性的筛选。生物活性实验结果表明荷叶中的阿朴啡类生物碱 N-降荷叶碱[N-nornuciferine (**3**)] 具有较好的抑制活性, 其 IC_{50} 值为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其余类生物碱均无活性。阿朴啡类生物碱是一个有用的先导结构, 可以进一步结构改造修饰得到高活性的单胺氧化酶抑制剂。

关键词: 单胺氧化酶抑制剂; 生物碱; N-降荷叶碱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.031

Screening of Alkaloids Isolated from Medicinal Plant for MAO Inhibitory Activity

CHEN Xiao-wei*, YANG Zhong-duo, ZHU Bao-ying, SUN Jian-hui, ZHAO Jun-wen

School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, 730050, China

Abstract: To screen potential monoamine oxidase inhibitor from 24 alkaloids. 24 alkaloids were isolated from five medicinal plants. The MAO inhibitory activity was tested by colorimetric method in 96-well microplates. The result showed that among 24 alkaloids, N-nornuciferine (**3**) belonging to aporphine-type alkaloid obtained from *Nelumbo nucifera* showed a significant anti-MAO activity with IC_{50} values of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The aporphine-type alkaloid may be a useful leading structure for MAO inhibitors.

Key words: MAO inhibitors; alkaloid; N-nornuciferine

单胺氧化酶(MAO)是人体内的一种重要的氧化酶,能催化氧化生物体内的各种胺类物质(多巴胺、5-色胺、去甲肾上腺素、色胺等),产生醛和双氧水。该酶存在两种同分异构体即单胺氧化酶 A(MAO-A)和单胺氧化酶 B(MAO-B)^[1]。单胺氧化酶在神经组织中过多,会产生过量的胺代谢产物,而这些产物被认为是引发各类精神疾病(如帕金森病、老年抑郁症以及老年焦虑症)的重要原因^[2]。因此,单胺氧化酶抑制剂被认为具有潜在治疗和改善抑郁症以及帕金森病等神经疾病的作用^[3]。但是现有用于临床的单胺氧化酶抑制剂大多存在严重的副作用。因而进一步开展药用植物中 MAO 抑制剂的研究,寻找新结构类型的化合物具有重要意义。生物碱是目前成药希望最大的一类天然产物,因此

本文研究了(荷叶(*Nelumbo nucifera*)、钩藤(*Uncaria-hynchophylla*)、两面针(*Zanthoxylum nitidum*)、止泻木(*Holarrhenaanti-dysenterica*)、平贝母(*Fritillaria-aussuriensis*)中分离的 24 个生物碱的单胺氧化酶抑制活性,期望发现高抑制活性的单胺氧化酶抑制剂先导物。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

本论文中测定的 24 种生物碱均为课题组前期分离的化合物(图 1),其结构通过¹H NMR、¹³C NMR、MS 谱结合文献鉴定^[6-10]。其名称、参考文献、植物源见表 1。

雌性 Wistar 大鼠购自甘肃中医药大学实验动物中心。合格证号:SYXK(甘)2015-0005。

1.2 实验仪器

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)、SHB-III A 循环水式多用真空泵(长城科工贸有限公司)、RE-52CS 型旋转蒸发器

收稿日期:2016-07-11 接受日期:2016-08-31

基金项目:国家自然科学基金(21262022);浙江省自然科学基金(LY12B02005);农业部兽药创制重点实验室和甘肃省新兽药工程重点实验室开放基金(1610322011011)

* 通讯作者 E-mail: yangzhongduo@126.com

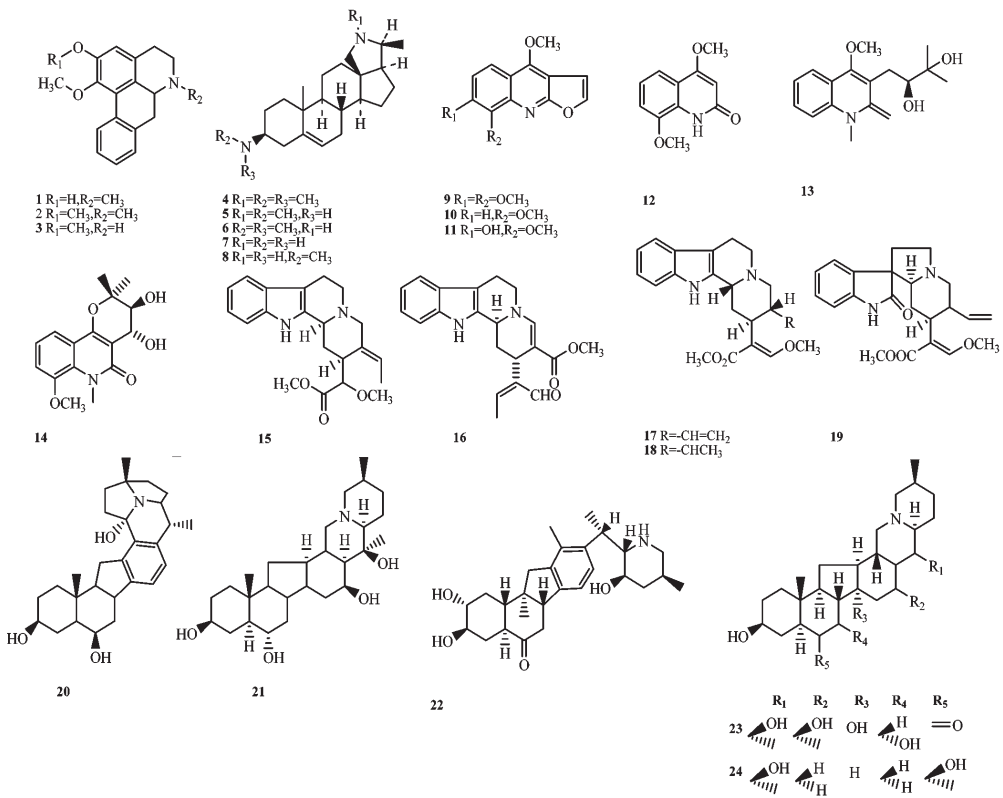


图1 化合物1~24的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-24

(上海亚荣生化仪器厂)、DNM-9602型酶标仪(北京普朗新技术有限公司)。

1.3 药品和试剂

酪胺、香草酸、4-氨基安替吡啉、磷酸异丙烟肼、辣根过氧化物酶(II型)(阿拉丁试剂公司);蔗糖(国药集团化学试剂有限公司);所用试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 单胺氧化酶的制备

雌性 Wistar 大鼠(180~250 g)颈椎脱臼处死,取肝,用事先4℃冰箱保存的磷酸缓冲液(0.2 M pH=7.6)洗涤肝脏表面。将肝脏剪碎,用4℃保存的缓冲液洗涤数次后,0.3 M 蔗糖溶液按一定比例匀浆。匀浆液1000×g离心10 min,取上清,弃沉淀,上清液在1200×g离心15 min,取上清,合并两次的上清液,10000×g离心30 min,得到线粒体沉淀。沉淀溶解于4 mL 0.3 M 蔗糖溶液中做为 MAO 酶原。用前将此酶液稀释10倍,即可用于活性测定^[4]。

2.2 活性测定

本实验采用改进的 Holt 方法评价单胺氧化酶

抑制活性,反应原理如下:单胺类物质在单胺氧化酶的作用下被氧化,同时生成副产物过氧化氢,过氧化氢在过氧化物酶的作用下氧化4-氨基安替吡啉,该氧化产物与香草酸反应,生成在490 nm下有吸收的红色染料。通过吸光度值的变化来确定被测物质对酶的抑制活性。

反应孔:在96孔酶标板孔中加入40 μL酶溶液(每1 mL含有0.5 mg蛋白质,由Bradford^[5]法测定),40 μL待测样品,混匀后在37℃培养20 min,再加入120 μL酪胺(5 mmol/L),40 μL显色剂(1 mmol/L香草酸,0.5 mmol/L 4-氨基安替吡啉和4 U/mL辣根过氧化酶的混合液)(以上均用0.2 mol/L, pH 7.6磷酸缓冲液配制),在恒温培养箱中37℃培养60 min,在490 nm测定吸光度值。空白孔:用40 μL缓冲液代替待测样品,其他不变。空白阴性孔:用120 μL缓冲液代替底物酪胺,其他不变。每个样品平行测定三次取平均值。

抑制率(%) = [(空白组-空白本底)-(样品-样品本底)] / (空白组-空白本底) × 100%。由以上公式计算抑制率。

表 1 生物碱的抗单胺氧化酶活性

Table 1 The anti-monoamine oxidase activity of alkaloid

化合物 No.	生物碱名称 Name	分离的植物源 Origin	抑制率(%) (终浓度 167 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	参考文献 Reference
1	2-hydroxy-1-methoxy-aporphine	荷叶	37.61 \pm 0.28	Nd	[6]
2	nuciferine	荷叶	39.72 \pm 0.31	Nd	[6]
3	N-nornuciferine	荷叶	73.43 \pm 0.18	40 \pm 0.14	[6]
4	conessine	止泻木	1.03 \pm 0.32	Nd	[7]
5	isoconessimine	止泻木	0	Nd	[7]
6	conessimin	止泻木	43.56 \pm 0.15	Nd	[7]
7	conarhimin	止泻木	0	Nd	[7]
8	conimin	止泻木	24.84 \pm 0.3	Nd	[7]
9	skimmianine	两面针	6.36 \pm 0.25	Nd	[8]
10	γ -fagarine	两面针	4.62 \pm 0.26	Nd	[8]
11	edulitine	两面针	0	Nd	[8]
12	haplopine	两面针	16.47 \pm 0.31	Nd	[8]
13	(-)-(S)-Edulinine	两面针	0	Nd	[8]
14	zanthodioline	两面针	0	Nd	[8]
15	geissoschizine methyl-ether	钩藤	22.75 \pm 0.25	Nd	[9]
16	vallesiachotamine	钩藤	34.92 \pm 0.24	Nd	[9]
17	hisuteine	钩藤	38.43 \pm 0.3	Nd	[9]
18	hirsutine	钩藤	34.51 \pm 0.16	Nd	[9]
19	cisocorynoxeine	钩藤	32.06 \pm 0.24	Nd	[9]
20	ussuriedine	平贝母	47.62 \pm 0.16	Nd	[10]
21	benzo[7,8]fluoreno[2,1-b]-quinolizine cevine-3,6,16,20-tetrol	平贝母	25.5 \pm 0.32	Nd	[10]
22	pingbeimuone A	平贝母	13.72 \pm 0.33	Nd	[10]
23	pingbeimine C	平贝母	28.32 \pm 0.25	Nd	[10]
24	verticine	平贝母	19.11 \pm 0.26	Nd	[10]
阳性对照	磷酸异丙烟肼	-	100	1.8 \pm 0.12	-

注:Nd 表示未测定。

Note:Nd indicated not determined.

3 结果与讨论

24 种生物碱的活性测定结果见表 1。

本文研究了五种药用植物[荷叶(*Nelumbo nucifera*)、钩藤(*Uncaria rhynchophylla*)、两面针(*Zanthoxylum nitidum*)、止泻木(*Holarrhena anti-dysenterica*)、平贝母(*Fritillaria ussuriensis*)]中分离的 24 种生物碱的单胺氧化酶抑制活性,生物活性实验结果表明荷叶碱类化合物对单胺氧化酶具有一定抑制活性,其中 N-降荷叶碱(*N-nornuciferine*(**3**))的活性为最高。而从钩藤、两面针、止泻木、平贝母四种药物植物中分离的化合物未均表现出抑制活性。本论文

进一步通过化学结构与生物活性的数据分析 3 种荷叶碱,可以明显看出 1 位甲氧基的缺失对单胺氧化酶抑制活性没有显著影响,如 2-hydroxy-1-methoxy-aporphine(**1**)和 nuciferine(**2**)抑制率相当。但当这类化合物的结构中 N 上甲基缺失时,表现出较强的抑制活性,如无 N-甲基的 N-降荷叶碱(*N-nornuciferine*,**3**)。当终浓度为 167 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制率达到 73.43%,进一步表明无 N-甲基的 N-降荷叶碱其对单胺氧化酶的抑制具有浓度依赖性,其 IC₅₀ 为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。阿朴啡类生物碱是一个有用的先导结构,可以进一步改造修饰得到高活性的单胺氧化酶抑制剂。

参考文献

- 1 Tipton KF, Carroll AM, *et al.* The catalytic behavior of monoamine oxidase. *Neural Transm*, 1987, 23: 25-35.
- 2 Riederer P, Danielczyk W, Grunblatt E. Monoamine oxidase-B inhibition in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 2004, 25: 271-277.
- 3 Yang XY(扬小莹), Chen J(陈杰), *et al.* Advances in antidepressants and research methods of depression. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007, 32: 770-771.
- 4 Holt A, Sharman DF, *et al.* A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Anal Biochem*, 1997, 244: 384-392.
- 5 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- 6 Yang ZD(杨中锋), Zhang X(张旭), Du J(杜娟), *et al.* An aporphine alkaloid from *Nelumbo lutea* as an acetylcholinesterase inhibitor and the primary investigation for structure-activity correlations. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 26: 387-392.
- 7 Yang ZD(杨中锋), Duan DZ(段东柱), *et al.* Steroidal alkaloids from *Holarhena antidysenterica* as acetylcholinesterase inhibitors and the investigation for structure-activity relationships. *Life Sci*(生命科学), 2012, 90: 929-933.
- 8 Yang ZD(杨中锋), Zhang DB(张东博), *et al.* Acetylcholinesterase inhibitory activity of the total alkaloid from traditional Chinese herbal medicine for treating Alzheimer's disease. *Med Chem Res*(药物化学研究), 2012, 21: 734-738.
- 9 Yang ZD(杨中锋), Du J(杜娟), Yang MJ(杨明俊), *et al.* Geissoschizine methyl ether, a corynanthean-type indole alkaloid from *Uncaria rhynchophylla* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 26: 22-28.
- 10 Yang ZD(杨中锋), *et al.* A new alkaloid from *Fritillaria ussuriensis* Maxim. *Fitoterapia*, 2012, 83: 137-141.