

石杉碱乙的抗胆碱酯酶作用

徐 泓¹、唐希灿 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 用比色法测定表明,石杉碱乙(Hup-B)有抗ChE作用。它对大鼠 rbc 膜及猪脑尾核 AChE 的 PI_{50} 各为 6.2 及 6.1, 作用比加兰他敏强, 但弱于石杉碱甲, 新

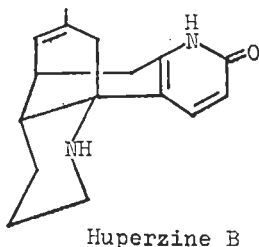
斯的明和毒扁豆碱。Hup-B 对 BuChE 的抑制作用远弱于 AChE。Hup-B 对 AChE 的抑制作用是可逆的, 属混合型。

1986年2月27日收稿 1986年6月27日修回

¹ 现址: 苏州铁道师范学院生物系。

关键词 石杉碱乙; 石杉碱甲; 新斯的明; 毒扁豆碱; 加兰他敏; 胆碱酯酶; 红细胞膜; 尾核

草药千层塔 (*Huperzia serrata* (Thunb. Trev.) 在浙江民间作为药用, 有清热、除湿、消淤和止血等作用。从该植物内曾分到多种化学成分, 其中的石杉碱甲(huperzine A, Hup-A)与石杉碱乙(huperzine B, Hup-B)已证实为新结构生物碱⁽¹⁾。Hup-A 对 AChE 有很强的抑制作用⁽²⁾, 已在临床使用^(3,4)。Hup-B 的结构与 Hup-A 很类似, 为阐明它是否也具有类似于 Hup-A 的药理作用, 故进行了研究。本文报道 Hup-B 的抗胆碱酯酶作用。



材料与方 法

药物与试剂 Hup-B 及 Hup-A 为游离碱, 微黄色结晶性粉末, mp 分别为 271°C 和 230°C, 以稀 HCl 助溶配制成 10 mg/ml 水溶液, 置冰箱内保存备用。甲基硫酸新斯的明(Neos)针剂, 上海信谊药厂产品。柳酸毒扁豆碱 (Phys) 粉剂, 英国生产。氢溴酸加兰他敏(Gal) 针剂, 上海第十三制药厂产品。肝素钠粉剂系上海化学试剂分装厂出品。碘化硫代乙酰胆碱粉剂, 上海试剂一厂产品。碘化硫代丁酰胆碱粉剂, 英国 Koch-Light Lab 产品。5-5' 联硫 2-2'-硝基苯甲酸(DTNB) 粉剂, 上海东风生化试剂厂产品。十二烷基硫酸钠(SDS), 英国 BDH 公司产品。胆酸钠粉剂, 瑞士 Fluka 公司产品。

胆碱酯酶制备

1. rbc 膜 AChE 杂种大鼠, 体重 368 ± SD 23 g, 由中国科学院上海分院实验动物中心站供应, 大鼠以乙醚麻醉后, 每鼠从腹主动脉取血 5-8 ml 加 0.5-1 ml (10 mg/ml) 肝素钠抗凝, 1000 × g 离心 15 min, 血球以 1:8 (vol/vol) 加入 NaCl 0.15 mol/L 及 pH 7.4 的磷酸盐 5

mmol/L 等渗缓冲液, 重复洗 3 次, 按 1:40 (vol/vol) 加入预冷的 8.45 mmol/L pH 8.0 磷酸盐低渗缓冲液溶血, 4°C 离心 9000 × g, 重复 3 次。再按 1:4 (vol/vol) 加入 pH 7.4 Tris-HCl 10 mmol/L 缓冲液, 4°C 离心 9000 × g, 洗 3 次, 得到乳白色糊状 rbc 膜, 悬于 Tris-HCl 缓冲液内, -20°C 保存。

2. 猪脑尾核 AChE⁽⁵⁾ 新鲜猪脑购自上海龙华肉类加工厂。取尾核 5 g, 加 30 ml 0.5% 胆酸钠 (pH 7.2 磷酸盐 10 mmol/L 缓冲液配制), 匀浆 2 min 后 28 000 × g 4°C 离心 45 min, 取上清液, -20°C 保存备用。

3. BuChE 取自大鼠及人血清 人血清自上海市血液供应中心站。

酶活力测定 用比色法⁽⁶⁾测 ChE 活力。酶活力反应液总容量为 4 ml, 内含碘化硫代乙酰胆碱 0.3 mmol/L 或碘化硫代丁酰胆碱 0.4 mmol/L, pH 7.4 磷酸盐 25 mmol/L 缓冲液 1 ml, 37°C 保温 5 min 后, 加入酶液, 继续保温 8 min, 加入 1 ml 3% SDS 溶液中止反应, 再加 1 ml 0.2% DTNB 显色, 然后在 721 型分光光度计(440 nm)测光密度。

结果与讨论

Hup-B 对 ChE 的抑制作用 用大鼠 rbc 膜

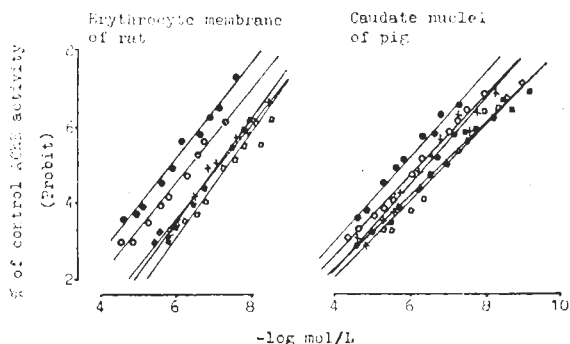


Fig 1. Anti-AChE activities of galanthamine (●), huperzine B (○), neostigmine (×), physostigmine (■) and huperzine A (□). AChE was incubated with acetyl thiocholine iodide (0.3 mmol/L) and phosphate 25 mmol/L buffer (pH 7.4) for 8 min at 37°C

及猪脑尾核 AChE 的测定结果见图 1, 以剩余酶活力的 probit 对药物摩尔浓度的负对数(pI)作图. 测得 Hup-B 抑制酶活力 50% 的浓度(pI₅₀)为 6.2(rbc)及 6.1(尾核), 其抑制 AChE 作用强度为 Gal 的 3.1 倍(pI₅₀ 分别为 5.7 与 5.6), 但弱于 Neos (6.8 与 6.3)、Phys(6.9 与 6.7) 和 Hup-A(7.2 与 6.9). 它们对 AChE 的抑制强度依次为 Hup-A > Phys > Neos > Hup-B > Gal. 对 BuChE 抑制作用的结果见图 2. Hup-B 对大鼠及人血清 BuChE 的 pI₅₀ 值分别为 3.9 与 2.8, 弱于 Gal (4.9 与 4.7)、Neos(5.2 与 4.9) 及 Phys (5.6 与 6.1), 但与 Hup-A (4.1 与 2.9) 较接近, 对 BuChE 的抑制作用强度依次为 Phys > Neos > Gal > Hup-A > Hup-B. Hup-B 对 rbc 膜 AChE 的抑制相对强度比大鼠与人血清 BuChE 分别强 200 与 2520 倍, 而 Hup-A 则分别强 1260 与 19 968 倍. Neos、Phys 及 Gal 分别强 40、79 倍, 20、6 倍和 6、5 倍. 用尾核 AChE 测试也获得类似结果. 试验表明, Hup-B 及 Hup-A 不仅对 AChE 及 BuChE, 而且对不同种属的 BuChE 的抑制作用强度均存在明显差异. 但 Neos、Phys 及 Gal 的上述抑制作用差异并不明显. Hup-B 与 Hup-A 的化学结构差异仅是后者结构中的伯胺变为仲胺, 并多了一个环, 基本结构无大的改变, 推论它们对 AChE 具有相似的较强选择抑制作

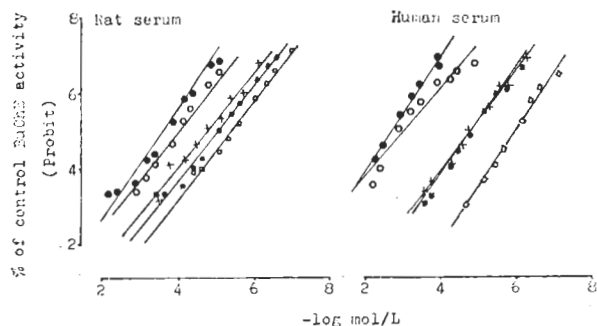


Fig 2. Anti-BuChE activities of huperzine B (●), huperzine A (○), galanthamine (×), neostigmine (■) and physostigmine (□). BuChE was incubated with butyrylthiocholine iodide (0.4 mmol/L) and phosphate 25 mmol/L buffer (pH 7.4) for 8 min at 37°C

用, 是与它们均具有共同的基本结构有关.

Hup-B 对 AChE 的抑制作用分析

1. Hup-B 对 AChE 抑制作用类型分析

在含有 0.1, 0.2, 0.3 和 0.4 ml rbc 膜 AChE 的反应系统内, 分别加入 Hup-B 0.29 或 0.58 μmol/L, 测定酶促反应的初速度, 用酶浓度对初速度作图结果表明, Hup-B 的反应速度与酶浓度的关系是一条通过零点的直线, 用猪脑尾核 AChE 测试也得到类似结果(图 3).

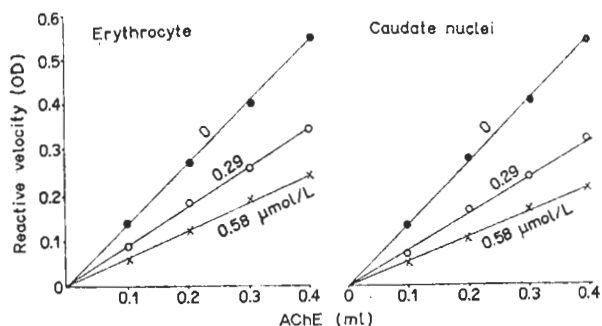


Fig 3. Inhibitory effect of AChE by huperzine B. AChE was incubated with acetyl thiocholine iodide (0.3 mmol/L) and phosphate 25 mmol/L buffer (pH 7.4) for 8 min at 37°C

将 Hup-B 与 rbc 膜混合, 在 37°C 预保温, 于不同时间分次取出等量混合液测 AChE 活力, 结果见图 4. Hup-B 与 AChE 预保温 1 min, 酶活力下降 7.1%, 3 min 则下降 14%, 继续延长预保温时间至 7 min, 酶活力未再继续下降. Gal 与酶预保温 1 min, 酶活力下降 2.8%, 延长至 7 min, 酶活力也未见下降. 异二丙基氟磷酸(DFP)与 AChE 预保温, 随保温时间延长, 酶活力持续下降. Hup-B 对 AChE 的抑制作用与可逆 ChE 抑制剂 Gal 相似, 而不同于不可逆 ChE 抑制剂 DFP.

将 Hup-B 与 AChE 保温 3 min 的反应液, 用 pH 7.4 Tris-HCl 50 mmol/L 缓冲液进行洗脱, 每次离心 12 min (12 000 × g, 4°C) 反复 3 次, 测定每 μg 蛋白的酶活力. 结果表明, 洗脱可使 Hup-B 与酶的结合解离, 使酶活力恢复到 98.3 ± 1.2%, 上述试验结果表明 Hup-B 是可逆性 ChE 抑制剂.

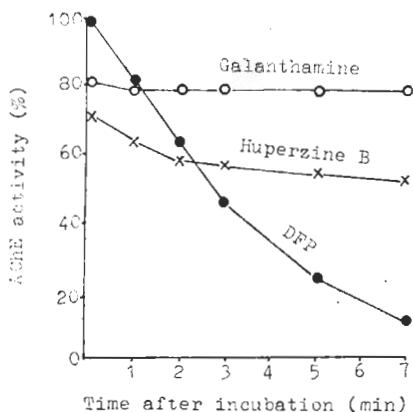


Fig 4. RBC ChE activity after incubation with huperzine B. AChE was incubated with acetylthiocholine iodide (0.3 mmol/L) and phosphate 25 mmol/L buffer (pH 7.4) for 8 min at 37°C

2. Hup-B 抑制 AChE 的动力学分析 结果见图 5。在含有 0.2, 0.3, 0.4, 0.8, 1.6 及 2.4 ml 碘化硫代乙酰胆碱的酶促反应系统中, 分别加入 Hup-B 0.29 与 0.58 $\mu\text{mol/L}$ 及等量的 rbc 膜或尾核 AChE, 测定酶活力, 按 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 以 $1/v$ 对 $1/S$ 作图, 结果得相交于第二象限的三条直线, 为混合型抑制图型。根据图 5 所得数据计算⁽⁷⁾, 用 rbc 膜测试, Hup-B 的 K_iS 为 1.12 $\mu\text{mol/L}$, K_I 为 0.233 $\mu\text{mol/L}$ 。用猪脑尾核测试, Hup-B 的 K_iS 为 1.48 $\mu\text{mol/L}$, K_I 为 0.245 $\mu\text{mol/L}$ 。rbc 膜对碘化硫代乙酰胆碱的 K_m 值为 56 mmol/L。猪脑尾核 AChE 的 K_m 为 89 mmol/L 与文献⁽⁵⁾报道一致。

本文结果表明, Hup-B 是一种可逆性 ChE 抑制剂。其抑制作用虽仅约为 Hup-A 的 1/10, 但为 Gal 的 3.1 倍。Hup-B 对大鼠或人血清的

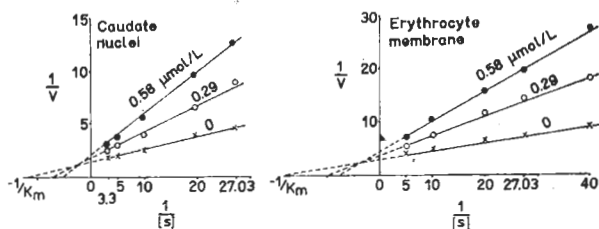


Fig 5. Double-reciprocal plots of AChE after huperzine B 0.29 and 0.58 $\mu\text{mol/L}$. AChE was incubated with acetylthiocholine iodide (0.3 mmol/L) and phosphate 25 mmol/L buffer (pH 7.4) for 8 min at 37°C

BuChE 的抑制作用, 在比较测试的 5 个 ChE 抑制剂中是最弱者, 对 AChE 具有更大的选择性抑制作用。因此, 对 Hup-B 的临床应用前景值得探讨。

参 考 文 献

- 1 Liu JS, Yu CM, Zhou YZ, *et al.* The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Can J Chem* 1986; 64 : 837
- 2 王月娥、岳冬贤、唐希灿。石杉碱甲的抗胆碱酯酶作用。中国药理学报 1986; 7 : 110
- 3 张守圭。治疗重症肌无力新药——石杉碱甲通过鉴定。新药与临床 1985; 4 : 235
- 4 程源深、吕传真、应智林、倪望云、张慈禄、桑国卫。石杉碱甲对 128 例重症肌无力症的疗效观察。同上 1986; 5 : 197
- 5 张振凡、张祖传、杨建中、曹蕙婷。亲和层析纯化猪脑尾核乙酰胆碱酯酶。生物化学与生物物理学报 1980; 12 : 257
- 6 Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7 : 88
- 7 许根俊。酶的作用原理。第 1 版, 北京, 科学出版社, 1983 : 44-66

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Jan, 8 (1) : 18-22

Cholinesterase inhibition by huperzine B

XU Hong, TANG Xi-Can

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT The anti-cholinesterase effect of huperzine B, a new alkaloid isolated

from Chinese herb *Huperzia serrata*⁽¹⁾, was examined *in vitro*. Erythrocyte membrane

of rat and caudate nuclei of pig were used as source of acetylcholinesterase (AChE). Rat serum and human serum were chosen as source of butyrylcholinesterase (BuChE). The pI_{50} (negative logarithm of molar concentration causing 50% inhibition of ChE) of huperzine B towards erythrocyte, caudate nuclei, rat serum and human serum were 6.1, 6.2, 3.9 and 2.8, respectively. Huperzine B exerted a more potent inhibi-

tory effect on AChE than that of BuChE. The order of anti-AChE activity were: huperzine A > physostigmine > neostigmine > huperzine B > galanthamine. Huperzine B is a mixed and reversible inhibitor of AChE.

KEY WORDS huperzine B; huperzine A; neostigmine; physostigmine; galanthamine; cholinesterases; erythrocyte membrane; caudate nucleus

* * * * *