

连翘叶抑制胆碱酯酶活性部位筛选

党莉¹, 马红², 社会枝^{2*} (1.山西药科职业学院, 太原 030031; 2.山西大学分子科学研究所, 太原 030006)

摘要: 目的 筛选连翘叶中抑制胆碱酯酶活性的部位。方法 加热回流法制备连翘叶粗提物, 再以不同浓度梯度的乙醇溶液过大孔树脂洗脱, 制得 5 种洗脱物。用 HPLC 指认粗提物和各洗脱物中主要成分。Ellman 法研究抑酶活性。结果 连翘叶粗提物对乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的抑制效果明显好于丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase, BChE); 抑制 AChE 活性最佳部位为 20%乙醇洗脱物; 连翘苷和连翘脂素对 AChE 酶均表现出一定程度的促进作用, 而连翘酯苷 E 和连翘酯苷 I 能够抑制 AChE 的活性。结论 连翘叶不同洗脱物抑制胆碱酯酶活性的作用与其主要成分对 AChE 酶活性的不同作用相关。

关键词: 连翘叶; 洗脱物; 乙酰胆碱酯酶; 丁酰胆碱酯酶; 抑酶活性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)18-2316-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.18.003

引用本文: 党莉, 马红, 社会枝. 连翘叶抑制胆碱酯酶活性部位筛选[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(18): 2316-2321.

Screening of Inhibiting-cholinesterase Active Fractions from *Forsythia Suspensa* Leaves

DANG Li¹, MA Hong², DU Huizhi^{2*} (1. Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan 030031, China; 2. Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To screen the inhibiting-cholinesterase active fractions from *Forsythia suspensa* leaves. **METHODS** The crude extract of *Forsythia suspensa* leaves was prepared by heating reflux method, and then the macroporous resin with ethanol solution of different concentration gradient was used to prepare five kinds of separated parts. The main components in crude extract and separated parts were identified by HPLC. Ellman method was used to study the inhibitory effects on cholinesterase. **RESULTS** The inhibition effect of the crude extract from *Forsythia suspensa* leaves on acetylcholinesterase(AChE) was better than that of butyrylcholinesterase(BChE). The separated part in 20% ethanol showed the best ability to inhibit AChE activity. Phillyrin and phillygenin promoted the activity of AChE to a certain extent, while forsythoside E and forsythoside I inhibited the activity of AChE. **CONCLUSION** The inhibitory effects of separated parts of *Forsythia suspensa* leaves on cholinesterase was related to the different effects of its main components on AChE activity.

KEYWORDS: *Forsythia suspensa* leaves; separated parts; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; inhibitory effects

连翘叶为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的叶子, 呈锯齿状椭圆形^[1]。经蒸、煮、炒、晒等方法将连翘嫩叶制成保健茶, 民间有饮用这种连翘叶茶的习惯^[2]。现代典籍《中药大辞典》中记载“连翘茎叶, 味苦, 性寒, 功能主治为清热解暑, 主治心肺积热”^[3]。2017 年山西省卫计委和山西省药品监管局发布公告将连翘叶列入山西地方特色食品, 并颁布其食品安全地方标准(DBS14/001-2017)。连翘叶的化学成分与连翘果实非常相似^[4], 主要有苯乙醇苷类、木脂素类、黄酮类等^[5-8], 但含量上略有不同^[9], 有些成分的含量比常作为药材原料入药的连翘果实中的含量要高的多^[10-11]。例如连翘叶主要含连翘苷、连翘酯苷、右旋松脂酚和芦丁等化学成分, 其中连翘酯苷含量比连翘果实中高 5~10 倍, 连翘苷含量更

是高达其 10 倍左右。有研究者从连翘叶水提物中分离得到了 6 个化合物, 分别为 Forsythenside F, Forsythenside I, Calcelarioside D, Calcelarioside C, (+)松脂素-4-O-β-D 葡萄糖苷和 Suspensaside A, 均具有抗氧化、抗菌和抗炎活性^[7]。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病机制极其复杂, “胆碱能缺失学说”是其发病机制的主要学说之一^[12]。该理论认为 AD 患者认知障碍的发病机制可能与胆碱能神经传递的功能低下有关^[13-14]。乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)含量降低, 胆碱功能缺乏早于其他因素, 神经元凋亡也主要发生在胆碱能神经元中, 是导致 AD 患者学习记忆功能下降的直接病理基础。ACh 是一种神经递质, 在脑内可被乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)和丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase, BChE)水解,

基金项目: 细胞生理学教育部重点实验室(山西医科大学)开放项目(KLMEC/SXMU-201911)

作者简介: 党莉, 女, 硕士, 讲师 E-mail: 1070100174@qq.com

*通信作者: 社会枝, 女, 博士, 教授 E-mail: duhuizhi@sxu.edu.cn

前者起主要作用,后者是辅助调节作用,二者相辅相成,共同调解 ACh 的含量。抑制 AChE 活性,防止突触间 ACh 的过度减少是治疗 AD 的重要途径之一^[15]。

笔者所在课题组前期研究^[16]已表明,相同浓度时,连翘叶醇提物的神经保护作用优于连翘酯苷 A,并从化学角度和生物学角度研究了连翘酯苷 A 对胆碱系统的作用^[17]。为进一步研究连翘叶提取物的抗 AD 作用,本研究首先对连翘叶进行提取和分离,制备得到连翘叶粗提物和各洗脱物,并进行成分分析及抑制胆碱酯酶活性比较;探究其主要成分对 AChE 酶活性的作用;最后进行连翘叶各洗脱物抑制 AChE 酶活性的初步筛选。

1 材料与方法

1.1 仪器

RE-52A 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);A8964 酒精计(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);Pilot10-15M 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);Agilent 1260 液相色谱系统(美国 Agilent 公司);PHS-3C pH 计(成都世纪方舟科技有限公司);Spectra Max 190 酶标仪(美国 MD 公司)。

1.2 试剂

连翘叶于 2018 年采摘自山西省陵川县,经山西大学分子科学研究所张立伟教授鉴定为木犀科植物连翘的叶子。

连翘酯苷 E、连翘酯苷 I、连翘酯苷 A、芦丁、连翘苷、连翘脂素、(+)-松脂素-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司,含量均>98%,批号分别为 MUST-20081803, MUST-18051610, MUST-21031105, MUST-21011510, MUST-17031610, MUST-21080708, MUST-21042533; AChE(麦克林公司,批号: C10791816;规格: 200 U·g⁻¹); BChE(批号: 12025275;规格: 4 U·mg⁻¹); 十二烷基硫酸钠(SDS,批号: WXBC1167)均购于 Sigma 公司;碘化硫代乙酰胆碱(Asch,批号: F612BA0501)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB,批号: G703BA0013)均购于生工(上海)公司;碘化硫代丁酰胆碱(Bsch,批号: BCCB1960)、氯化钠(批号: 20200714)均购于阿拉丁公司;色谱醋酸(批号: 018421)、色谱甲醇(批号: 20200401)均购于天津市大茂化学试剂厂;D101 大孔树脂(天津制胶厂,批号: 20191226);其他试剂药品为分析纯级别。

1.3 连翘叶粗提物的制备

向提取瓶中加入 300 g 连翘叶和 3 L 纯净水,料液比为 1:10,静置浸泡 0.5 h,加热回流 1 h,用纱布粗滤;再加入 3 L 纯净水提取 1 h,用纱布粗滤。合并 2 次滤液,旋蒸,得到浓缩液,冷冻干燥即得连翘叶粗提物粉末。

1.4 D101 大孔树脂柱分离制备连翘叶不同洗脱物

配制 20%, 40%, 60%, 80%乙醇溶液,并用酒精计测定乙醇含量。将事先预处理过的大孔吸附树脂装入柱中,连翘叶粗提物用尽可能少的水溶解,硅胶拌样后干法上样。以乙醇-水为洗脱剂,按照水和 20%, 40%, 60%, 80%乙醇梯度洗脱连翘叶粗提物。各洗脱梯度约 250 mL 接收 1 份,共接收 5 份,结合颜色变化收集洗脱液,当洗脱液颜色变浅到不变时,用下一个梯度的洗脱剂继续洗脱。将各段洗脱液减压浓缩,冷冻干燥,即得到连翘叶不同洗脱物的粉末: Q1(水洗洗脱物)、Q2(20%乙醇洗脱物)、Q3(40%乙醇洗脱物)、Q4(60%乙醇洗脱物)、Q5(80%乙醇洗脱物)。

1.5 连翘叶粗提物 and 不同洗脱物的液相分析

混合对照品溶液配制:精密称取 7 种对照品各 1 mg,溶解于 4 mL 色谱甲醇中,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过。将连翘叶粗提物和连翘叶不同洗脱物分别用超纯水和甲醇配制成 1 mg·mL⁻¹的供试品溶液,用 0.45 μm 滤膜过滤。采用 Agela Technologies Venusil XBP-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱于 Agilent 1260 液相色谱系统进行 HPLC 分析。分析条件^[18]:流速为 0.8 mL·min⁻¹;检测波长为 280 nm;进样量为 10 μL;流动相为甲醇(A)-0.3%醋酸水溶液(B);梯度洗脱 0~8 min, 30%→33%A; 8~24 min, 33%→40%A; 24~39 min, 40%→52%A; 39~55 min, 52%→64%A。

1.6 胆碱酯酶的酶活性测定

1.6.1 配制 pH 7.4 的 PBS 缓冲液 准确称取 35.80 g 的 Na₂HPO₄·12H₂O 和 3.12 g 的 NaH₂PO₄·2H₂O 分别溶于 500, 100 mL 超纯水中,搅拌充分溶解后,分别量取 405 mL Na₂HPO₄ 溶液和 95 mL NaH₂PO₄ 溶液混合,加水稀释到 1 000 mL,再加入 8.78 g NaCl,搅拌均匀,稀盐酸调节溶液的 pH 值到 7.4, 4 °C 保存备用。

1.6.2 溶液配制 将 10 mg AChE 粉末溶于 465 μL PBS 中,配制成浓度为 21.5 mg·mL⁻¹(4.3 U·mL⁻¹)的 AChE 储备液,分装于-20 °C 保存备用。将 0.55 mg 的 BChE 粉末溶于 512 μL PBS 中,配制成

浓度为 $10.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($4.3 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 BChE 储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存。连翘苷和连翘脂素分别溶于 DMSO 中, 配制成浓度为 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存。连翘酯苷 E 和连翘酯苷 I 分别溶于超纯水中, 配制成浓度为 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存。将连翘叶粗提物溶于超纯水配成不同浓度样品液; 将连翘叶洗脱物溶于 DMSO 配成不同浓度样品液。将 3.7 mg 的 DTNB 粉末溶于 $300 \mu\text{L}$ PBS 中, 配制成浓度为 $300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DTNB 显色剂储备液。将 2.7 mg 的 Asch 粉末溶于 $300 \mu\text{L}$ PBS 中, 配制成浓度为 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Asch 底物储备液。将 2.9 mg BsCh 粉末溶于 $300 \mu\text{L}$ PBS 中, 配制成浓度为 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BsCh 底物储备液。将 1 g SDS 粉末溶解在超纯水里, 得到 4% 的 SDS 溶液。

1.6.3 酶活性测定 采用改良的 Ellman 方法^[19], 在 96 孔板中测定胆碱酯酶活性, 试验方案见表 1。将 PBS、酶液(终浓度为 $0.07 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)、不同浓度的样品液、溶剂以及 DTNB(终浓度为 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 混合, 涡旋混匀, 于 96 孔板中每孔加入 $95 \mu\text{L}$ 混合溶液, 每组 3 个复孔, 将各孔混合液振荡均匀后, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后向每个孔加入 Asch 或 BsCh(终浓度为 $2.86 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 25 min, 最后加入 4% SDS 溶液, 终止反应。用酶标仪在 412 nm 下测吸光度值, 平行 3 次试验。根据下列公式计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品组}} - A_{\text{样品本底对照组}}}{A_{\text{空白对照组1}} - A_{\text{空白对照组2}}} \right) \times 100\%$$

表 1 测定胆碱酯酶活性试验设计

Tab. 1 Experimental design for determination of cholinesterase activity μL

试剂名称	空白对照组 1	空白对照组 2	样品组	样品本底对照组
PBS 缓冲液	275	275	275	275
AChE/BChE	5	0	5	0
样品液	0	0	10	10
溶剂(DMSO/ H ₂ O)	10	15	0	5
DTNB	10	10	10	10
Asch/BsCh	10	10	10	10

2 结果与讨论

2.1 连翘叶粗提物的成分分析

经与对照品比对, 鉴定出连翘叶粗提物中 7 个主要的色谱峰。色谱峰 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 分别是连翘酯苷 E、连翘酯苷 I、(+)-松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷、连翘酯苷 A、芦丁、连翘苷、连翘脂素。结果见图 1。

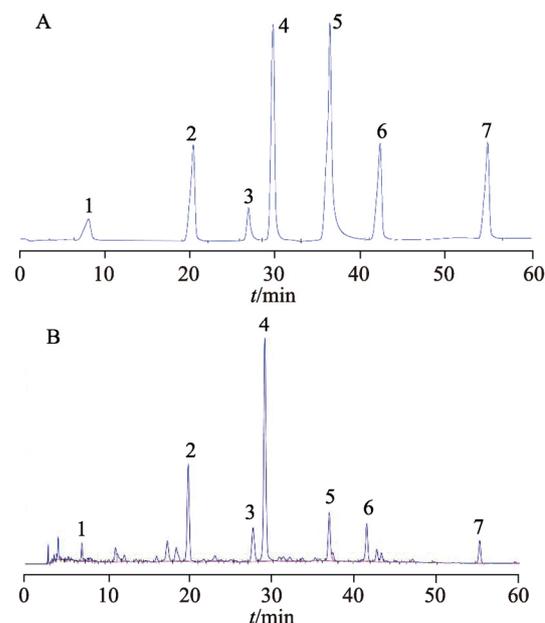


图 1 混合对照品和连翘叶粗提物的 HPLC 色谱图

A-混合对照品溶液; B-连翘叶粗提物; 1-连翘酯苷 E; 2-连翘酯苷 I; 3-(+)-松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷; 4-连翘酯苷 A; 5-芦丁; 6-连翘苷; 7-连翘脂素。

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substance and crude extract of *Forsythia suspensa* leaves

A-mixed reference standard solution; B-crude extract of *Forsythia suspensa* leaves; 1-forsythoside E; 2-forsythoside I; 3-(+)-pinoresin- β -D-glucopyranoside; 4-forsythoside A; 5-rutin; 6-phillyrin; 7-phillygenin.

2.2 连翘叶不同洗脱物的成分分析

经大孔树脂柱粗分离, 得到 5 个洗脱物: 分别是水洗(Q1)和 20%(Q2), 40%(Q3), 60%(Q4), 80%(Q5)乙醇洗脱部位。通过与对照品比对, 指出连翘叶不同洗脱物中的主要成分见图 2。Q1 和 Q2 的主要成分为连翘酯苷 E、连翘酯苷 I、(+)-松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷、连翘酯苷 A、芦丁; Q3 主要包括连翘酯苷 E、连翘酯苷 I、(+)-松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷、连翘酯苷 A、芦丁和连翘苷; Q4 主要包括连翘酯苷 I、(+)-松脂素- β -D 葡萄糖苷、连翘酯苷 A、芦丁和连翘苷; Q5 主要有连翘酯苷 I、(+)-松脂素- β -D 葡萄糖苷、连翘酯苷 A、芦丁、连翘苷和连翘脂素。5 个洗脱物的主要成分相似, 但含量有所不同, 由 HPLC 色谱图分析得到不同洗脱物各个主要成分的峰面积占比见表 2。其中 Q1、Q2、Q3 和 Q4 中连翘酯苷 A 的峰面积占比均最大, 说明连翘酯苷 A 是连翘叶提取物中的一种主要成分。随着洗脱剂中乙醇比例的增大。连翘苷和连翘脂素的含量逐渐增加, Q5 中峰面积占比最大的成分是连翘脂素; Q2 中连翘苷和连翘脂素的含量几乎为零, 而在 Q5 中连翘苷(峰面积占比

表 2 连翘叶洗脱物中各成分的峰面积占比

洗脱物	连翘酯苷 E	连翘酯苷 I	(+)-松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷	连翘酯苷 A	芦丁	连翘苷	连翘脂素
水洗(Q1)	3.58	10.93	2.04	14.04	7.31	0	0
20%乙醇洗脱部位(Q2)	2.67	23.52	5.73	37.99	6.80	0	0
40%乙醇洗脱部位(Q3)	2.97	20.08	7.90	39.97	7.87	1.28	0
60%乙醇洗脱部位(Q4)	0.39	13.74	8.33	34.27	12.62	12.24	0.36
80%乙醇洗脱部位(Q5)	0	1.32	1.40	2.81	1.28	17.62	45.23

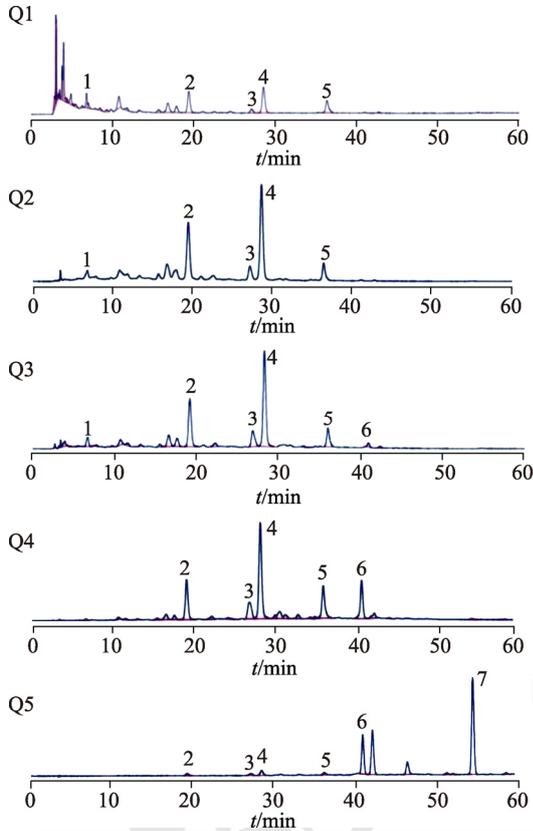


图 2 连翘叶洗脱物的 HPLC 色谱图

Q1~Q5 分别表示水洗和 20%、40%、60%、80%乙醇的洗脱物；1-连翘酯苷 E；2-连翘酯苷 I；3-(+)-松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷；4-连翘酯苷 A；5-芦丁；6-连翘苷；7-连翘脂素。

Fig. 2 HPLC chromatograms of the separated parts of *Forsythia suspensa* leaves

Q1~Q5 represented separated parts by water and 20%, 40%, 60%, 80% ethanol, respectively. 1-forsythoside E; 2-forsythoside I; 3-(+)-pinoresin- β -D-glucopyranoside; 4-forsythoside A; 5-rutin; 6-phillyrin; 7-phillygenin.

为 17.62%)和连翘脂素(峰面积占比为 45.23%)的含量最大。连翘酯苷 E 和连翘酯苷 I 的含量随洗脱梯度的增大而逐渐减小,连翘酯苷 E 在 Q1 中含量最大,峰面积占比为 3.58%;连翘酯苷 I 在 Q2 中含量最大,峰面积占比为 23.52%;它们在 Q5 中含量均最少(连翘酯苷 E 和连翘酯苷 I 的峰面积占比分别为 0%和 1.32%)。

2.3 连翘叶粗提物对胆碱酯酶的抑制作用

随着浓度的增大,连翘叶粗提物对 AChE 和 BChE 的抑制作用均逐渐增强,且对 AChE 的抑制

活性(IC_{50} 值为 $720.87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)明显大于对 BChE 的抑制活性(IC_{50} 值为 $1\ 196.97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。结果见图 3。

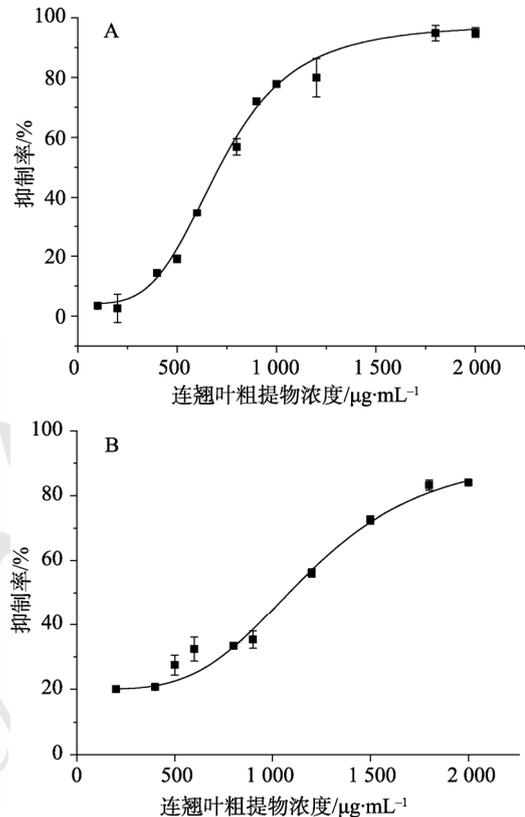


图 3 连翘叶粗提物对 AChE 和 BChE 的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$) A-AChE; B-BChE。

Fig. 3 Inhibition effect of crude extract from *Forsythia suspensa* leaves on AChE and BChE ($\bar{x} \pm s, n=3$) A-AChE; B-BChE.

2.4 连翘叶洗脱物中的活性成分对酶活性的作用探究

连翘叶洗脱物中的活性成分连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 E 和连翘酯苷 I 对 AChE 酶活性的作用见图 4。从图 4A、4B 可以看出,浓度在 $10\sim 400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,连翘苷和连翘脂素均表现出一定的促酶作用,即促进 AChE 的酶活力,其中连翘苷的促进率从 14.29%上升到 39.41%,连翘脂素的促进率从 2.45%增大到 36.59%。由图 4C、4D 可知,浓度在 $50\sim 3\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,随浓度的增大,连翘酯苷 E 和连翘酯苷 I 的抑酶活性均呈现

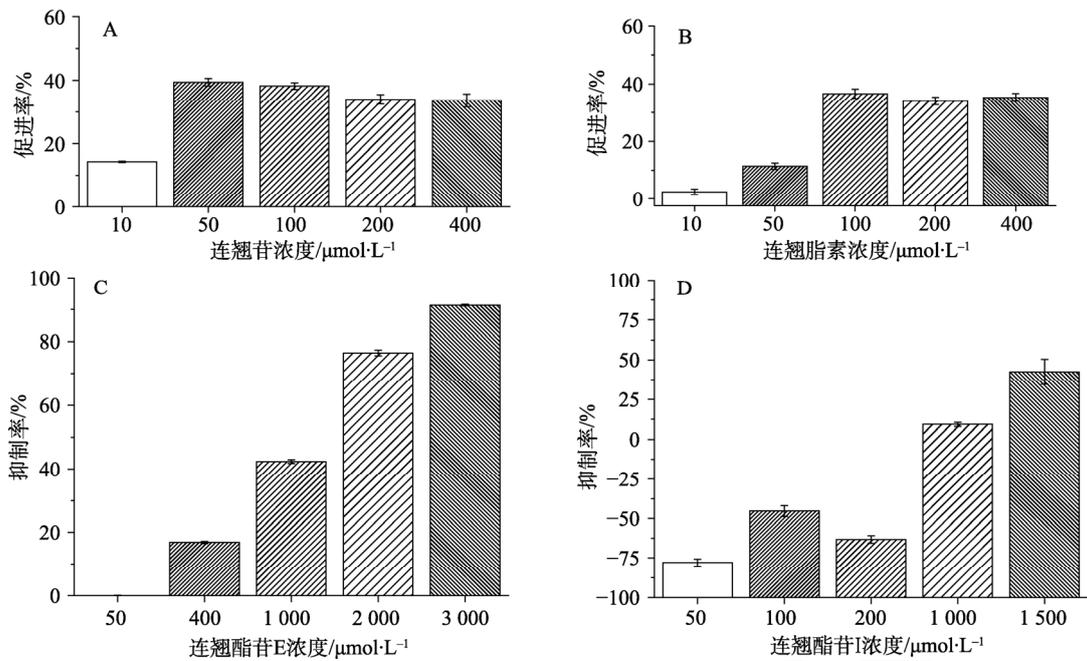


图4 连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 E、连翘酯苷 I 对 AChE 的作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

A-连翘苷; B-连翘脂素; C-连翘酯苷 E; D-连翘酯苷 I。

Fig. 4 Effects of phillyrin, phillygenin, forsythoside E, and forsythoside I on AChE ($\bar{x}\pm s, n=3$)

A-phillyrin; B-phillygenin; C-forsythoside E; D-forsythoside I.

增强的趋势。其中连翘酯苷 E 的抑制率从零增大到 91.37%; 而连翘酯苷 I 在低浓度(50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下表现出促酶作用(抑制率为负值), 高浓度时则有一定的抑制作用(1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制率为 42.46%)。

2.5 连翘叶不同洗脱物对 AChE 的抑制作用

连翘叶的 20%(Q2)、40%(Q3)、60%(Q4)和 80%(Q5)乙醇洗脱部位对 AChE 酶活性的抑制作用见图 5。随着浓度的增大, 各个洗脱物 Q2、Q3、Q4、Q5 对 AChE 酶活性的抑制作用都随之增强, 即 Q2、Q3、Q4、Q5 的浓度越高, 对 AChE 酶活性抑制作用越强。通过比较 IC_{50} 值大小, 可以得出对 AChE 酶活性的抑制力从大到小顺序为 Q2($\text{IC}_{50}\approx 698.97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)>连翘叶粗提物($\text{IC}_{50}\approx 720.87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)>Q3($\text{IC}_{50}\approx 906.29 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)>Q4($\text{IC}_{50}\approx 2\,059.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)>Q5($\text{IC}_{50}\approx 2\,340.67 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 其中 Q2 部位的抑酶活性最佳。连翘叶各洗脱物的成分分析显示, 抑制 AChE 酶活性的成分连翘酯苷 E、连翘酯苷 I、连翘酯苷 A 和芦丁的总峰面积在 Q2 和 Q3 中几乎相同, 分别为 70.98%和 70.89%, 各物质的峰面积也相差不大, 而 Q3 中出现了 1.28%的促进 AChE 酶活性的连翘苷, 所以 Q3 对 AChE 酶活性的抑制能力略弱于 Q2。Q4 与 Q5 相比, Q4 中连翘酯苷 E、连翘酯苷 I 和连翘酯苷 A 的含量相对较高, 而 Q5 中具有促酶活性的连

翘苷和连翘脂素的含量相对较高, 因此 Q4 的抑酶活性比 Q5 好。Q2 与 Q4、Q5 相比, 连翘酯苷 E 和连翘酯苷 I 含量相对较大, 而连翘苷和连翘脂素含量几乎为零, 可以证实 Q2 的抑酶活性较 Q4 和 Q5 好。综上, 推测 Q2、Q3、Q4 以及 Q5 的抑酶活性的大小可能与其中几种成分的不同酶活作用存在一定的相关性。

3 讨论

本实验对连翘叶进行提取分离制备出连翘叶粗提物和 5 个洗脱物, 通过 HPLC 分别对其成分进行分析, 鉴定出粗提物和洗脱物中的 7 种主要成分, 通过比较各洗脱物的成分和含量的相对值, 发现其成分种类相近, 但含量不同。探究连翘叶粗提物中 4 种主要成分连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 E 和连翘酯苷 I 对 AChE 酶活性的作用, 结果表明, 连翘苷和连翘脂素对 AChE 酶活性都表现出一定程度的促进作用, 而连翘酯苷 E 和连翘酯苷 I 能够抑制 AChE 的活性。通过比较不同洗脱物的抑制 AChE 酶活性的 IC_{50} 值, 筛选出抑制 AChE 酶活性最好的部位是 Q2。结合连翘叶粗提物和各洗脱物的主要成分, 推测连翘叶不同洗脱物抑制胆碱酯酶活性的大小可能与其主要成分对 AChE 酶活的不同作用有一定的相关性。本研究中未检测(+)-松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷对 AChE 酶活的作用, 尽管其在各个洗脱物的含量都较低, 但是也

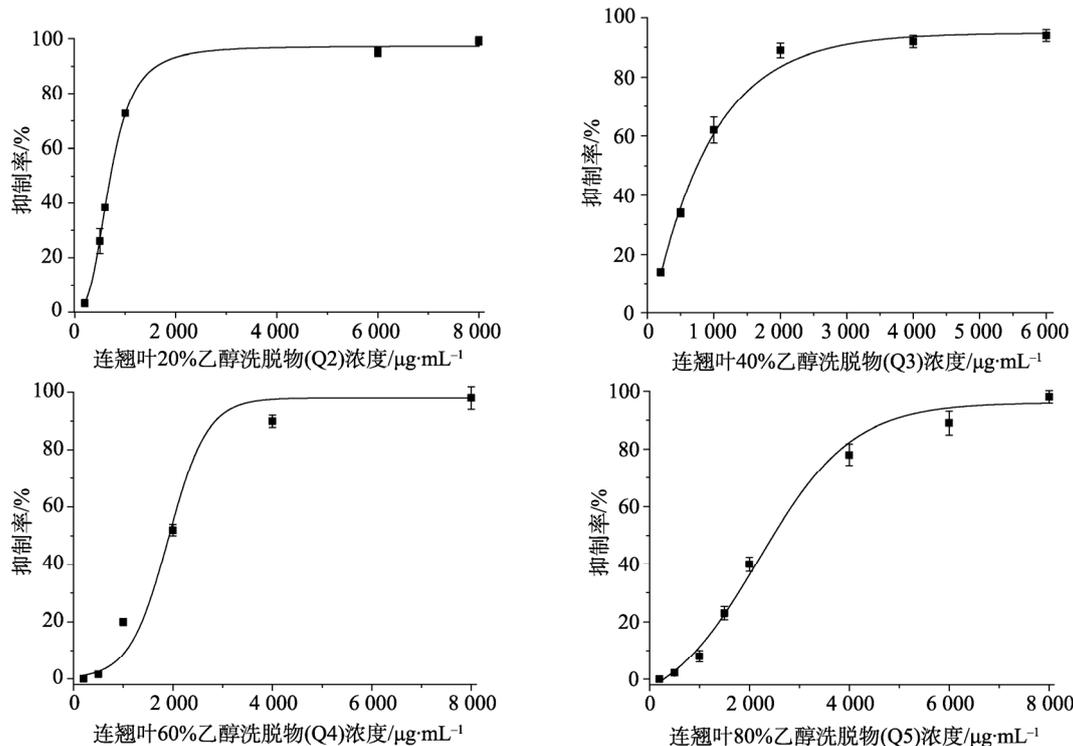


图5 连翘叶不同浓度乙醇洗脱物对AChE的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Inhibitory effects of different concentrations of ethanol extracts of *Forsythia suspensa* leaves on AChE($\bar{x} \pm s, n=3$)

可能影响洗脱物对AChE酶活性的抑制作用,所以后续应该完善此方面工作。连翘叶为山西省地方特色食品资源,可以制备食品或保健品,供人们长期食用,预防疾病。其有一定的抑酶活性,但是低于甚至远低于上市药品的抑酶活性。本研究为制备预防AD的相关连翘叶食品或保健品等提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 177.
- [2] 李倩, 李晓, 陈玲. 连翘叶研究进展[J]. 饲料研究, 2013(6): 21-23, 26.
- [3] (明)李时珍. 本草纲目[M]. 沈阳: 沈阳出版社, 1997.
- [4] WANG X Y, CHANG D L. Study on the fingerprints of extracts from *Forsythia* leaves and fruit[J]. Qilu Pharm Aff(齐鲁药事), 2011, 30(10): 574-575.
- [5] DUAN W J, GEN Y L, ZHU H, et al. Research advances of chemical constituents and analysis method of *Forsythia suspense*[J]. Shandong Sci(山东科学), 2010, 23(2): 33-37, 66.
- [6] 胡静, 马琳, 张坚, 等. 连翘的研究进展[J]. 中南药学, 2012, 10(10): 760-764.
- [7] SONG X J. Research progress on chemical constituents of different parts of *Forsythia suspense*[J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2014, 29(2): 220-222.
- [8] YAN X J, PENG Y, LIU Z X, et al. Three new lignan glycosides from the fruits of *Forsythia suspense*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16(6): 602-610.
- [9] PAN T T. Advances in *Forsythia suspensa* leaves[J]. Value Eng(价值工程), 2017, 36(6): 118-120.
- [10] QU H H, ZHAI X F, LI B X, et al. Study of the content of forsythiaside and forsythin from different parts of *Forsythia*

suspensa(Thunb.)Vahl[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(3): 382-385.

- [11] 臧志和, 曹丽萍, 钟铃. 芦丁药理作用及制剂的研究进展[J]. 医药导报, 2007, 26(7): 758-760.
- [12] MEHTA M, ADEM A, SABBAGH M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease[J]. Int J Alzheimers Dis, 2012(2012): 728983.
- [13] GUO X X, GUO E C, ZHONG Z G. Mechanism of traditional Chinese and western medicine research and treatment of senile dementia[J]. Asia Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2015, 11(13): 41-44.
- [14] SHIN J, KONG C, LEE J, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening improves adult hippocampal neurogenesis and cognitive function in a cholinergic degeneration dementia rat model[J]. Alzheimers Res Ther, 2019, 11(1): 110.
- [15] SCHLIEBS R, ARENDT T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration[J]. Behav Brain Res, 2011, 221(2): 555-563.
- [16] CHEN L Q, LIN L X, DONG Z, et al. Comparison of neuroprotective effect of *Forsythia suspensa* leaf extract and forsythiaside, one of its metabolites[J]. Nat Prod Res, 2018, 32(22): 2705-2708.
- [17] YAN X J, CHEN T G, ZHANG L W, et al. Protective effects of Forsythoside A on amyloid beta-induced apoptosis in PC12 cells by downregulating acetylcholinesterase[J]. Eur J Pharmacol, 2017(810): 141-148.
- [18] 汪青波, 张济世, 闫珍, 等. 利用发酵法提高连翘叶中连翘脂素含量的方法研究[J]. 化学研究与应用, 2020, 32(1): 143-149.
- [19] DONG Z, YAN X J, DU H Z. Screening acetylcholinesterase (AChE) inhibitors from green *Forsythia suspensa*[J]. J Shanxi Univ Nat Sci Ed(山西大学学报: 自然科学版), 2019, 42(4): 922-928.

收稿日期: 2021-09-28
(本文责编: 蔡珊珊)