

doi:10.11920/xnmdzk.2025.01.009

# 柳杉叶马尾杉生物碱成分及抑制 乙酰胆碱酯酶活性研究

姜雨辰, 崔佳, 黄昕玥, 陈小华, 廖 珅, 李丽梅  
(西南民族大学药学与食品学院, 四川 成都 610041)

**摘要:**柳杉叶马尾杉(*Phlegmariurus cryptomerinus* (Maxim.) Satou)的生物碱成分及神经保护活性至今未见研究报道。为探索其生物碱成分及抑制乙酰胆碱酯酶活性,采用薄层层析、柱层析和高效液相色谱等方法对其全草中生物碱成分进行分离和纯化,通过ESI-MS、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR和ECD等波谱技术鉴定生物碱化合物的结构,采用改进的Ellman法对分离得到的化合物进行抑制乙酰胆碱酯酶活性筛选,并通过分子对接技术研究化合物与乙酰胆碱酯酶蛋白的作用机制。结果表明,从柳杉叶马尾杉全草总生物碱中分离得到3个生物碱化合物,分别鉴定为:4R,15R-huperzine R(1)、phlegmariurine B(2)和nankakurine A(3),其中nankakurine A(3)对乙酰胆碱酯酶活性的IC<sub>50</sub>值为(46.51 ± 0.49) μM,同时,分子对接结果显示,nankakurine A(3)可以作用于乙酰胆碱酯酶的外周阴离子位点,与作用位点亲和力良好达到了一定抑制作用。化合物1~3均为首次从该植物中分离得到,其中4R,15R-huperzine R(1)为首次从马尾杉属中分离得到。

**关键词:**柳杉叶马尾杉;石松生物碱;4R,15R-huperzine R;乙酰胆碱酯酶

中图分类号:R284

文献标志码:A

文章编号:2095-4271(2025)01-0065-06

## Alkaloids of *Phlegmariurus cryptomerinus* and their inhibitory activity on acetylcholinesterase

JIANG Yuchen, CUI Jia, HUANG Xinyue, CHEN Xiaohua, LIAO Shen, LI Limei

(School of Pharmacy and Food, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The alkaloid constituents of *Phlegmariurus cryptomerinus* (Maxim.) Satou and their neuroprotective activity have not been reported. In order to explore its alkaloid constituents and inhibit acetylcholinesterase activity, the alkaloids were isolated using HPLC, column chromatography, and TLC. The structures of the alkaloid compounds were identified using spectroscopic techniques such as ESI-MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, and ECD. The inhibitory activity against acetylcholinesterase was carried out using the modified Ellman method. The interaction mechanism between active compound and acetylcholinesterase was studied by molecular docking. Three alkaloid compounds, namely 4R,15R-huperzine R(1), phlegmariurine B(2), and nankakurine A(3), were isolated and identified from the whole plant of *Phlegmariurus cryptomerinus*. Nankakurine A(3) showed inhibitory activity on acetylcholinesterase with an IC<sub>50</sub> of (46.51 ± 0.49) μM. The molecular docking results showed that compound 3 could bind to the peripheral anionic site of acetylcholinesterase and showed good affinity for the action site. All three compounds were obtained for the first time from this plant, and 4R,15R-huperzine R(1) was first found in *Phlegmariurus* genus.

**Keywords:** *Phlegmariurus cryptomerinus*; lycopodium alkaloid; 4R,15R-Huperzine R; acetylcholinesterase

收稿日期:2024-06-13

通信作者:李丽梅(1976-),女,教授,博士,研究方向:中药化学。E-mail:limeili@swun.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(31870341);国家民委中青年英才培养计划项目;西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(2023NYXXS084)

石松科(Lycopodiaceae P. Beauv. ex Mirb.)植物共 16 属,全球广布,我国有 6 属<sup>[1]</sup>.石松生物碱是石松科植物的特征成分,主要包括四种结构类型,即 lycodine、lycopodine、fawcettimine 和 phlegmarine<sup>[2-4]</sup>.许多石松生物碱对乙酰胆碱酯酶活性有不同程度的抑制作用,其中从蛇足石杉(*Huperzia serrata*)中分离出的石杉碱甲是近年来广为瞩目的天然药物成分,其对乙酰胆碱酯酶(AChE)活性的抑制作用非常显著,临床试验的结果显示,其对重症肌无力和阿尔茨海默病都有明显疗效,现为全球公认的第二代乙酰胆碱酯酶抑制剂之一<sup>[5]</sup>.

石松科马尾杉属(*Phlegmariurus*)约有 200 种,在热带与亚热带地区分布较广.我国现已知的马尾杉属植物有 21 种,可供药用的有 10 种,主要分布于秦岭以南各省(区),其中华南马尾杉、闽浙马尾杉、柄叶马尾杉、美丽马尾杉的资源比较丰富<sup>[6,7]</sup>.马尾杉属植物因含有结构类型复杂多样的石松生物碱,所以一直是研究热点之一<sup>[8-11]</sup>.例如,从龙骨马尾杉(*Phlegmariurus carinatus* (Desv. ex Poir.) Ching)中分离得到 3 个新生物碱,其中 phlegmarine A 具有新颖的 5/9/6/6 四环结构<sup>[2]</sup>;从马尾杉(*Phlegmariurus phlegmaria* (L.) Holub)的全株植物中分离得到 6 个新生物碱,其中 lycophelgmarine A 为一个具有 9/5/5 环的 C<sub>15</sub>N 新骨架结构,并提出了其合理的生物合成途径<sup>[3]</sup>.

柳杉叶马尾杉(*Phlegmariurus cryptomerinus* (Maxim.) Satou)是一种中型附生蕨类植物,分布于中国福建、湖南、浙江、广西、台湾等地,附生于岩石或树干上,偶有土生<sup>[6]</sup>.目前未见其生物碱成分的研究报道.为探索柳杉叶马尾杉的神经保护活性成分,对其化学成分研究采用了正相硅胶柱层析、MCI 柱层析、凝胶层析和制备高效液相色谱等方法,进行分离,采用波谱分析技术(ESI-MS、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 和 ECD)鉴定分离得到化合物的结构,同时采用改进的 Ellman 法<sup>[12]</sup>研究生物碱化合物对 AChE 的抑制活性效果,并通过分子对接技术研究化合物与乙酰胆碱酯酶蛋白的作用机制.

## 1 实验与方法

### 1.1 仪器与材料

核磁共振波谱仪(Bruker Avance III);多功能全波

长酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);薄层层析硅胶板 GF<sub>254</sub>和正相硅胶(200~300目)(青岛海洋化工有限公司);反相硅胶(RP-18,德国 Merck 公司);葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20 gel,美国 GE 公司);DTNB(D8130型,Sigama 公司);PBS(pH=8)、ATCI、石杉碱甲(huperzine A)、乙酰胆碱酯酶(来源:苍蝇头部)(上海源叶生物科技有限公司).

柳杉叶马尾杉全草采自云南省德宏傣族景颇族自治州瑞丽市,由中国科学院西双版纳热带植物园纳智研究员鉴定,标本(No. LMPC1811)保存在西南民族大学药学与食品学院.

### 1.2 生物碱提取与分离

柳杉叶马尾杉全草干重 1.1 kg,粉碎后,选用分析级甲醇室温浸取 5 次,每次 3 d,将提取液进行合并和过滤,并减压浓缩后得到 230 g 醇提物.醇提物经 1 L 反渗水分散后,用 2 M HCl 调至 pH=1~2,并使用 1.5 L 的乙酸乙酯萃取 2 次,去除非碱性脂溶性杂质,酸水层用 2 M NaOH 溶液调至 pH=10,并使用等体积的氯仿连续萃取 5 次,减压浓缩氯仿层,得到总生物碱 18.8 g.总生物碱先使用 MCI 柱,30%~90% 甲醇-水梯度洗脱,合并相同组分后分为 3 个组分,分别是 Fr. 1~3.组分 Fr. 1(1.8 g)经二氯甲烷-甲醇(50:1)正相硅胶柱分离得到化合物 1(2 mg).组分 Fr. 2(150 mg)先经过石油醚-丙酮(10:1~5:1)正相硅胶柱分离得到 Fr. 2.1(15.6 mg),接着采用半制备 HPLC(35% 甲醇-水)得到化合物 2(5 mg, 3 mL/min, t<sub>R</sub>=32 min).组分 Fr. 3(1.2 g)先经过 Sephadex LH-20(MeOH)分离得到 Fr. 3.1(940 mg),接着采用氯仿-甲醇(10:1)正相硅胶柱分离得到化合物 3(51.8 mg),化学结构见图 1.

### 1.3 抑制乙酰胆碱酯酶活性筛选

采用改进的 Ellman 法<sup>[12]</sup>,测定了量稍多的化合物 2、3 抑制乙酰胆碱酯酶活性的能力.在 96 孔板中加入 140 μL PBS(pH=8)缓冲液,20 μL 各浓度梯度待测样品溶液和 20 μL 的 0.2 U/mL 酶溶液,混合均匀后在 37 °C 下孵育 10 min.随后加入 10 μL 3 mM DTNB 和 10 μL 15 mM ATCI,在 37 °C 反应 20 min 后,在 405 nm 处读取吸光度值.每组实验设置三个复孔,huperzine A 为阳性对照.

$$\text{Inhibition rate}(\%) = \frac{(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)}{A_1 - A_2} \times 100\%$$

$A_1$ 为空白对照组(有酶无抑制剂); $A_2$ 为空白本底组(无酶无抑制剂); $A_3$ 为实验组(有酶有抑制剂); $A_4$ 为实验本底组(无酶有抑制剂)。

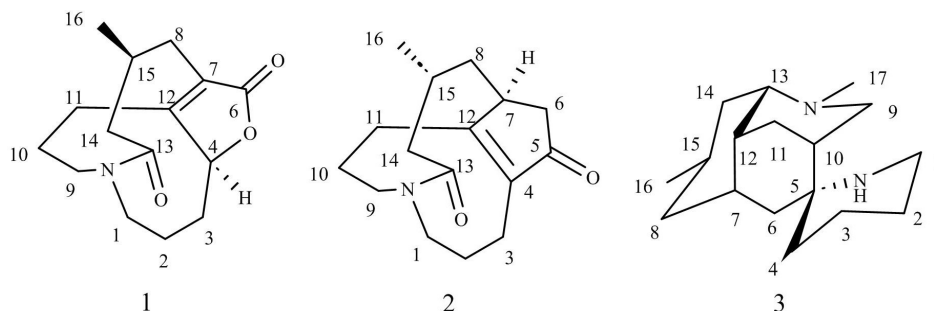


图 1 化合物 1~3 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-3

## 2 结果与讨论

### 2.1 结构鉴定

化合物 1:为白色无定形粉末,易溶于三氯甲烷;在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑,碘化铋钾反应呈阳性. ESI-MS  $m/z$ : 264  $[M + H]^+$ , 分子式  $C_{15}H_{21}NO_3$ .  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.12 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H), 1.35 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.96 (m, 1H), 2.01 (m, 1H), 2.03 (dd,  $J = 13.2, 11.4$  Hz, 1H), 2.16 (m, 1H), 2.20 (m, 1H), 2.42 (m, 1H), 2.43 (m, 1H), 2.45 (m, 1H), 2.50 (m, 1H), 2.51 (m, 1H), 2.56 (dd,  $J = 12.6, 12.6$  Hz, 1H), 2.93 (ddd,  $J = 14.2, 4.1, 4.1$  Hz, 1H), 3.12 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H), 3.95 (ddd,  $J = 14.0, 3.4, 3.4$  Hz, 1H), 4.03 (ddd,  $J = 15.1, 13.5, 3.4$  Hz, 1H), 4.81 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H);  $^{13}C$ -NMR (100

### 1.4 分子对接研究

乙酰胆碱酯酶蛋白质序列来自蛋白质数据库 (PDB ID: 2CMF). 分子对接采用 Autodock Tool 软件. 按照以前报道的方法进行分子对接<sup>[13]</sup>.

MHz,  $CDCl_3$ ) 数据见表 1, 上述结果与文献报道数据<sup>[14-15]</sup>基本一致, 确定化合物 1 的平面结构为 huperzine R. 化合物 1 的 C-4 和 C-5 可能构型有两种 (4*R*, 15*R* 和 4*R*, 15*S*, 图 2), 由于未见 huperzine R 绝对构型及其 ECD 的数据报道, 所以本研究通过计算 ECD 方法确定化合物 1 的绝对构型. 首先将化合物 1 的构型导入 Gaussview 6.0.16 软件中的 MMFF94s 程序, 使用  $10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  的能量窗进行构型搜索. 对搜索出来的优势构型使用 Gaussian 16 软件进行优化后, 再进行 ECD 运算, 然后在 SpecDis1701 程序中, 进行 ECD 算法结果拟合. 结果显示化合物 1 的实验 ECD 与 4*R*, 15*R*-huperzine R 的 ECD 高度吻合 (图 3), 所以化合物 1 被鉴定为 4*R*, 15*R*-huperzine R.

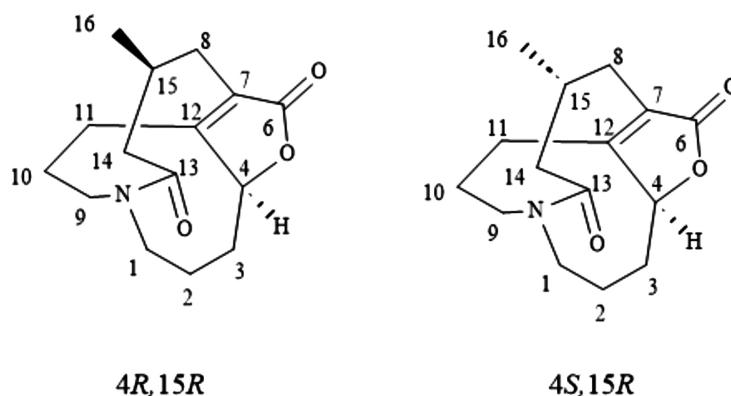


图 2 化合物 1 的 2 种可能构型结构

Fig. 2 Two possible configurations of compound 1

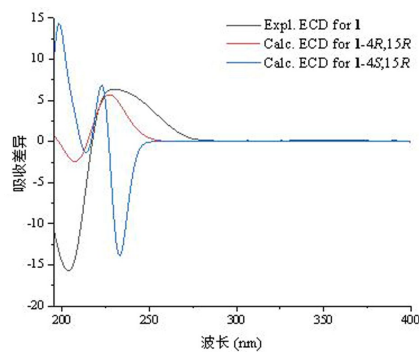


图 3 化合物 1 的实验和计算 ECD 谱图

Fig. 3 Experimental and calculated ECD spectra of compound 1

化合物 2: 为无色针状结晶, 易溶于三氯甲烷; 在紫外波长 254 nm 下观察示暗斑, 碘化铯钾反应呈阳性. ESI-MS  $m/z$ : 262  $[M + H]^+$ , 分子式  $C_{16}H_{23}NO_2$ .  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.07 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.41 (dd,  $J = 9.9, 3.0$  Hz, 1H), 1.95 ~ 1.73 (m, 5H), 2.24 ~ 2.08 (m, 2H), 2.48 ~ 2.31 (m, 4H), 2.86 ~ 2.56 (m, 6H), 3.21 ~ 3.14 (m, 1H), 3.91 ~ 3.82 (m, 1H), 4.06 (dd,  $J = 15.5, 3.6$  Hz, 1H);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ) 数据见表 1, 上述结果与文献报道数据<sup>[16]</sup>基本一致, 化合物 2 鉴定为 phlegmariurine B.

化合物 3: 为黄色无定形粉末, 易溶于甲醇; 碘化铯钾反应呈阳性. ESI-MS  $m/z$ : 263  $[M + H]^+$ , 分子式  $C_{17}H_{30}N_2$ .  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 0.86 (dd,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 0.87 (m, 1H), 1.19 (t,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 1.54 ~ 1.43 (m, 7H), 1.75 ~ 1.66 (m, 3H), 1.95 ~ 1.82 (m, 4H), 2.02 (m, 2H), 2.13 (m, 4H), 2.28 (m, 1H), 2.54 (dd,  $J = 14.5, 10.9$  Hz, 1H), 2.83 (dd,  $J = 14.6, 3.6$  Hz, 1H), 3.0 (m, 1H);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ) 数据见表 1, 上述结果与文献报道数据<sup>[17-18]</sup>基本一致, 化合物 3 鉴定为 nankakurine A.

4R, 15R-huperzine R (1) 和 phlegmariurine B (2) 属于 fawcettimine 型生物碱, nankakurine A (3) 属于  $C_{17}N_2$  型新骨架生物碱. phlegmariurine B (2) 也在龙骨马尾杉 (*P. carinatus*)<sup>[2]</sup>、粗糙马尾杉 (*P. squarrosus*)<sup>[19]</sup>、椭圆叶马尾杉 (*P. henryi*)<sup>[20]</sup> 和福氏马尾杉 (*P. fordii*)<sup>[21]</sup> 中分离得到, Hirasawa 等在喜马拉雅马尾杉 (*P. hamiltonii*) 中也发现了 nankakurine A (3)<sup>[17]</sup>, 表明柳杉叶马尾杉和其他马尾杉属植物有密切的化学分类学关系. huperzine R 曾被从蛇足石杉 (*Huperzia serrata*) 中分离得到, 并鉴定了相对构

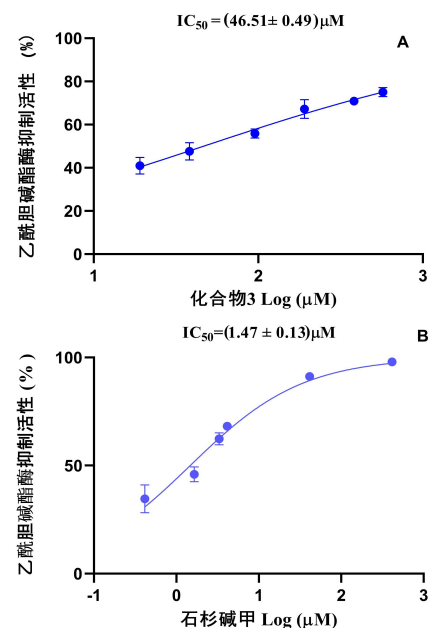
型<sup>[14]</sup>, 本研究通过计算 ECD 确定化合物 1 的绝对构型为 4R, 15R-huperzine R (1), 其为首次从马尾杉属中分得该成分, 说明 4R, 15R-huperzine R 可以作为柳杉叶马尾杉区别于其他马尾杉属植物的分类标记.

表 1 化合物 1 ~ 3  $^{13}C$ -NMR 数据Table 1  $^{13}C$ NMR data of compounds 1-3

No.	1	2	3
1	49.9	51.0	40.8
2	18.8	19.8	26.5
3	32.1	22.4	20.8
4	81.9	141.8	34.9
5		207.4	56.5
6	173.2	38.5	39.6
7	126.8	41.2	34.4
8	32.7	41.0	41.7
9	51.2	51.0	58.7
10	25.4	25.8	37.6
11	26.5	29.0	32.8
12	162.7	171.7	36.5
13	172.2	173.4	65.4
14	40.4	40.8	39.8
15	30.0	27.2	21.9
16	23.3	26.7	22.9
17			43.0

## 2.2 抑制乙酰胆碱酯酶活性筛选结果

本研究结果表明化合物 3 对 AChE 有一定抑制作用. 随着化合物 3 浓度的增加, 抑制率逐渐增加, 呈浓度依赖关系. 化合物 3 抑制 AChE 的  $IC_{50}$  值为  $(46.51 \pm 0.49) \mu M$  (图 4).



(A: 化合物; B: 阳性对照石杉碱甲)

图 4 化合物 3 和石杉碱甲对 AChE 的抑制率曲线

Fig. 4 AChE inhibitory activity of compound 3 and huperzine A

### 2.3 化合物 3 与乙酰胆碱酯酶对接结果

分子对接技术可以提供很多小分子配体与蛋白质受体的结合信息,研究表明受体与配体之间的结合能越低结合的构象越稳定,通常结合能 $< -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 则表明两者之间亲和力良好<sup>[22]</sup>. 本研究中化合物 3 与乙酰胆碱酯酶的结合能力为 $-8.83 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,说明化合物 3 可以与乙酰胆碱酯酶自主结合. 如图 5 所示,化合物 3 酰胺键上的氢原子与 2CMF 的氨基酸残基 TYR-458 形成一条氢键,从而与 AChE 的外周阴离子位点(PAS)连接发挥抑制作用.

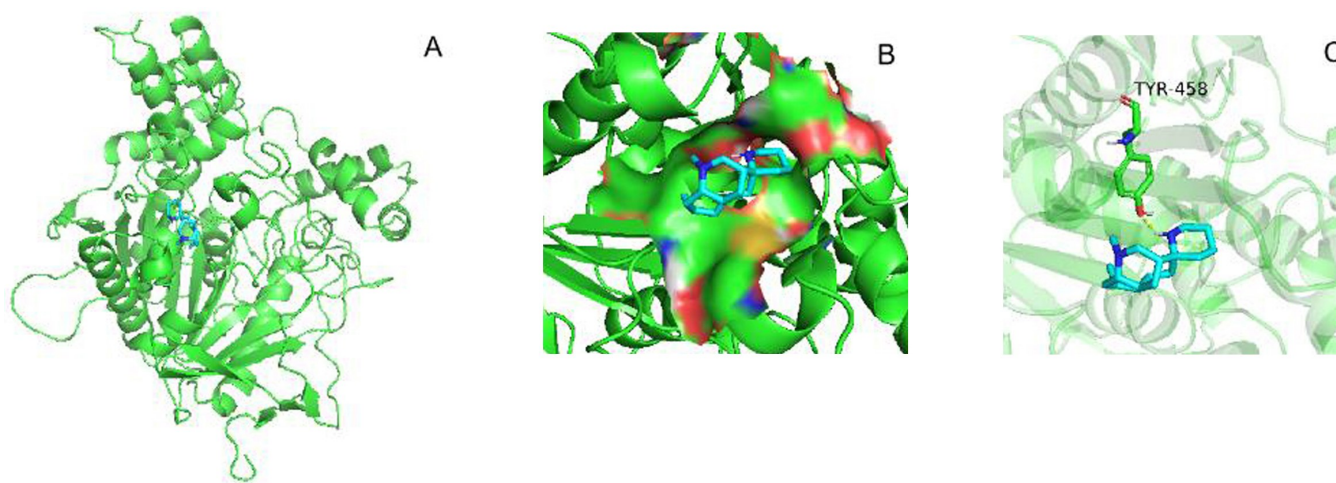


图 5 化合物 3 与乙酰胆碱酯酶之间的分子对接构象

Fig. 5 Molecular docking conformation of compound 3 and acetylcholinesterase

## 3 结论

本研究从柳杉叶马尾杉全草总生物碱中分离得到 3 个生物碱化合物:4*R*,15*R*-huperzine R(1)、phlegmariurine B(2)和 nankakurine A(3),均为首次从该植物中分离得到,其中 4*R*,15*R*-huperzine R(1)为首次从马尾杉属中分离得到. 化合物 nankakurine A(3)对乙酰胆碱酯酶活性显示一定抑制作用,IC<sub>50</sub> 值为 $(46.51 \pm 0.49) \mu\text{M}$ ,分子对接进一步证实了 nankakurine A(3)通过与 AChE 的氨基酸残基稳固结合发挥抑制其活性的作用. 因此,柳杉叶马尾杉含有具有神经保护作用的生物碱成分,本研究结果将为该植物的后续研究奠定基础.

### 参考文献

[1]李沛玲,郭水良. 石杉科植物研究综述[J]. 安庆师范学院学报(自

然科学版),2005(01):56-62.  
 [2]WANLAYA T, WACHIRASAK T, PARATCHATA B, et al. Phlegcarines A-C, three lycopodium alkaloids from *Phlegmariurus carinatus* (Desv. ex Poir.) Ching [J]. *Phytochemistry*, 2023, 206:113553.  
 [3]JIANG J M, XIA D, ZHU X L, et al. Lycoplegmarinines A-F, new lycopodium alkaloids from *Phlegmariurus phlegmaria* [J]. *Tetrahedron*, 2022, 114:132782.  
 [4]YANG Y Y, WANG Z C, WU J C, et al. Chemical constituents of plants from the genus *Phlegmariurus* [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2016, 13(3):269-274.  
 [5]KUMBHAR S A, HANGARGEKAR C B, JOSHIA A. Huperzine A from *Huperzia serrata*-a systematic review[J]. *Journal of Advanced Scientific Research*, 2020, 11(3):22-29.  
 [6]蒋日红,向睿晨,张宪春. 中国马尾杉属(石松科)的分类修订[J]. *广西植物*, 2023, 43(10):1759-1783.  
 [7]赵惠. 石杉亚科植物有效成分含量及中国马尾杉属植物分子系统学研究[D]. 广西南宁:广西中医药大学,2018.  
 [8]ZHANG Z J, WANG C, WU X D, et al. Phlegmadine A: A lycopodium alkaloid with a unique cyclobutane ring from *Phlegmariurus phlegmaria*

- [J]. Journal of Organic Chemistry, 2019, 84(17): 11301-11305.
- [9] WANG Q, ZHENG D K, JIANG S P, et al. Lycopodium alkaloids from *Phlegmariurus carinatus* with cytotoxic and neuroprotective effects[J]. Chemistry & Biodiversity, 2023, 20(12): e202301449.
- [10] ZHU X L, XIA D, ZHOU Z B, et al. Lycosquarrines A-R, lycopodium alkaloids from *Phlegmariurus squarrosus*. [J]. Journal of Natural Products, 2020, 83(10): 2831-2843.
- [11] ZHANG Z J, ZHU Q F, WU X D, et al. Phlegmadines B and C, two lycopodium alkaloids with 6/5/5/5/7 pentacyclic skeleton from *Phlegmariurus phlegmaria*[J]. Tetrahedron Letters, 2020, 61(2): 151381.
- [12] 王建斌, 高莹, 何贵玲, 等. 绶草中活性成分 Spiranthol-A 的快速制备及抑制乙酰胆碱酯酶活性研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2023, 44(6): 103-108.
- [13] SONG M Q, MIN W, WANG J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of new carbazole-coumarin hybrids as dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase[J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1229(1): 129784.
- [14] TAN C H, CHEN G F, MA X Q, et al. Huperzine R, a novel 15-Carbon lycopodium alkaloid from *Huperzia serrata*[J]. Journal of Natural Products, 2002, 65(7): 1021-1022.
- [15] TOSHIMUNE N, SATOSHI Y, TOHRU F. Totalsynthesis of huperzine R[J]. Organic Letters, 2018, 20(1): 119-121.
- [16] 袁珊琴, 冯锐, 顾国明. 蛇足石杉生物碱成分的研究(II)[J]. 中草药, 1994, 25(9): 453-455.
- [17] YUSUKE H, JUNICHI K, YUTARO O, NORIMICHI N, et al. Nankakurine B, a new alkaloid from *Lycopodium hamiltonii* and revised stereostructure of nankakurine A [J]. Heterocycles, 2006, 68(11): 2357-2364.
- [18] ALTMAN R A, NILSSON B L, LARRY E, et al. Totalsynthesis of (+)-nankakurines A and B and ( $\pm$ )-5-epi-nankakurine A [J]. The Journal of Organic Chemistry, 75(22): 7519-7534.
- [19] LIU Y C, FAN M, JIANG W W, et al. Four new fawcettimine-related alkaloids from *Phlegmariurus squarrosus* [J]. Journal of Asian natural products research, 2015, 17(10): 967-975.
- [20] LIU Y C, SU J, WU X D, et al. Five new lycopodium alkaloids from the aerial parts of *Phlegmariurus henryi* [J]. Fitoterapia, 2016, 115: 148-154.
- [21] CHU B M, LI J. Studies on alkaloids of *Phlegmariurus fordii* (Baker) Ching [J]. Yaoxue Xuebao, 1988, 23(2): 115-121.
- [22] CAO J F, LI L L, XIONG L, et al. Research on the mechanism of berberine in the treatment of COVID-19 pneumonia pulmonary fibrosis using network pharmacology and molecular docking [J]. Phytomedicine Plus, 2022, 2(2): 100252.

(责任编辑:和力新,殷锋,付强,张阳,肖丽;英文编辑:周序林,郑玉才)