

去氢吴茱萸碱的制备及其生物活性研究进展

赵楠* 王楠 张春楠

(牡丹江师范学院生命科学与技术学院 牡丹江 157011)

摘要 去氢吴茱萸碱是中药吴茱萸中的吲哚喹唑啉类生物碱,具有抗阿尔茨海默症、抗肿瘤、抗炎及抗菌等多种生物活性,具有巨大的开发潜力及应用价值。本文对去氢吴茱萸碱的提取分离、合成和生物活性的研究进展进行了综述,并对该化合物及其衍生物的研究方向及应用进行展望,以为去氢吴茱萸碱及其衍生物的进一步开发利用提供参考。

关键词 去氢吴茱萸碱 阿尔茨海默症 生物活性

Research Progress in Preparation and Bioactivity of Dehydroevodiamine

Zhao Nan*, Wang Nan, Zhang Chunnan

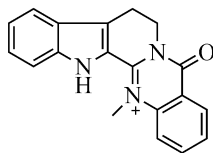
(College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, 157011)

Abstract Dehydroevodiamine is an indolequinazalone alkaloid isolated from *Euodia rutaecarpa*, which has various biological activities such as anti-Alzheimer's disease, anti-tumor, anti-inflammatory and antibacterial, and has great development potential and application value. In this paper, the research progress in extraction and isolation, synthesis and biological activity of dehydroevodiamine is reviewed, and the research direction and application of this compound and its derivatives are prospected, so as to provide reference for the further development and utilization of dehydroevodiamine and its derivatives.

Keywords Dehydroevodiamine, Alzheimer's disease, Bioactivity

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实^[1]。吴茱萸味辛、苦,有小毒,具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效^[2],其化学成分包括生物碱类、柠檬苦素类、黄酮及挥发油等^[3]。去氢吴茱萸碱(Dehydroevodiamine, DHED)是吴茱萸中的天然吲哚喹唑啉类季胺型生物碱(化学结构见图式 1),由于其理化性质的特殊性,以及季胺氮上容易发生脱甲基反应,因此在提取分离过程中有别于其他类成分。现代药理学研究表明 DHED 具有广泛的药理活性,尤其在对抗阿尔茨海默症等相关病症表现出积极作用,本文对 DHED 的提取分离方法、合成及其生物活性研究

进行了综述,并展望其应用。



图式 1 去氢吴茱萸碱(1)的化学结构

Scheme 1 Chemical structure of dehydroevodiamine (1)

1 DHED 的制备方法

1.1 DHED 的提取分离

DHED 为中药吴茱萸主要的活性生物碱成分之一,1926 年 Asahina 等^[4]首次报道了 DHED 这一天然产物,1962 年 Nakasato 等^[5]首次在吴茱萸叶中发现 DHED 并通过化学方法鉴定了其结构。从化学结构上看,DHED 为吲哚喹唑啉类季胺型

* 联系人,赵楠 女,博士,讲师,主要从事天然产物研究与开发。E-mail: swxzn0@126.com

黑龙江省省属高校基本科研业务费(1452MSYQN008)和牡丹江师范学院科研项目(MNUB201710)资助

2022-08-22 收稿,2022-09-08 接受

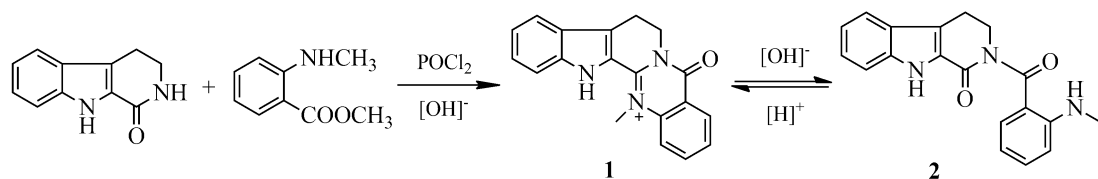
生物碱,根据 DHED 具有中等极性具有一定碱性的性质,开展了多种提取分离方法的研究。

邹弢等^[6]通过响应面分析法优化了乙醇溶剂法提取 DHED 的工艺,优化的提取工艺条件为吴茱萸药材粉碎度 90 目、18.73 倍 65.22% 的乙醇溶液提取 0.82h,其提取率为 6.97mg/g。刘倩等^[7]通过 pH 区带色谱法从中药吴茱萸中分离纯化 DHED,以加入三乙胺的碱性溶液作为流动相,加入盐酸的溶液作为固定相,从 2g 吴茱萸生物碱粗提物中纯化得到的 DHED 纯度达 93.1%,其提取率为 152mg/g。袁金斌等^[8]根据 DHED 的碱性这一性质,采用酸水溶剂进行提取,结合聚酰胺柱色谱、结晶及重结晶等方法,从吴茱萸中药材中提取纯化 DHED 的纯度达 98% 以上,提取率约为 2.2mg/g。王志奇等^[9]根据 DHED 的中等极性,采用醇溶剂提取,结合吸附柱色谱、脱色及重结晶等手段,从吴茱萸中提取纯化 DHED,当采用 AB 型大孔树脂作为吸附柱色谱进行分离时提取率最高为 2.2mg/g,且发现 DHED 对多种农业病原菌

具有较强的抑制活性。Schramm 等^[10]开发了一种可以纯化克级 DHED 的简单方法,仅通过阳离子交换树脂和制备型 RP-HPLC(反相高效液相色谱)提纯得到的 DHED 纯度高达 95% 以上。

1.2 DHED 的合成

目前为止,对 DHED 的合成及其衍生物的研究报道较少,究其原因主要是由于在反应过程中容易发生脱甲基副反应,导致很难得到目标产物。1960 年,Paechter 等^[11]通过研究发现 DHED 在碱性条件下以开环的二羰基形式(2)存在(图式 2)。Nakayama 等^[12]通过苯并内酰胺和邻氨基苯甲酸酯合成 DHED。Wehle 等^[13]通过相同的方法合成了 DHED 及其衍生物 3(图式 3),且该衍生物的水溶性较 DHED 提高。活性研究表明吲哚结构为其抗氧化活性必须基团。Danieli 等^[14]在合成吴茱萸碱的过程中发现,吴茱萸碱经过多步复杂的氧化反应可以得到 DHED。



图式 2 DHED 的二羰基形式

Scheme 2 The dicarbonyl form of DHED

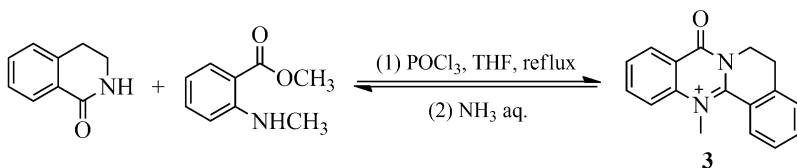
目前,合成得到的 DHED 衍生物数量有限,且多为研究吴茱萸碱衍生物过程中的产物^[15-17],多为其氧代或硫代衍生物,结构见图式 4。研究者主要评价了它们的体外抗肿瘤活性,在 4a~4ab、5a~5s 和 6a~6m 等氧代衍生物中,3-Cl 或 10-OH 取代的衍生物活性最强,10-OCH₃ 取代或其他取代形式的衍生物仅具有中等活性,而 3-位酰胺基团取代或并联苯环对活性影响不大。在 7a~7m 硫代衍生物中,构效关系研究结果显示,3-Cl 或 10-OH 同样可以显著提高抗肿瘤活性。进一步对衍生物的抗癌谱进行研究,发现其中 7k 对 A549(人肺癌细胞)、HCT116(人结肠癌细胞)、MDA-MB-435(人乳腺癌细胞)、PC-3(人前列腺癌细胞)、BEL7407(人肝癌细胞)等多种肿瘤细胞的细胞毒作用均强于阳性对照药喜树碱,研究表明该衍生物可同时抑制 Top I(抑制拓扑异构酶 I)、Top II(拓扑异构酶 II)及微管蛋白发挥抗肿瘤作用,具有巨大的开发价值。

此外 Zhang 等^[18]认为 DHED 的存在形式影响其体内生物利用度,因此合成了多种 DHED 盐酸盐,通过改变 DHED 的存在形式来改变其稳定性,其中 DHED·HCl·2H₂O 形式稳定性最高。

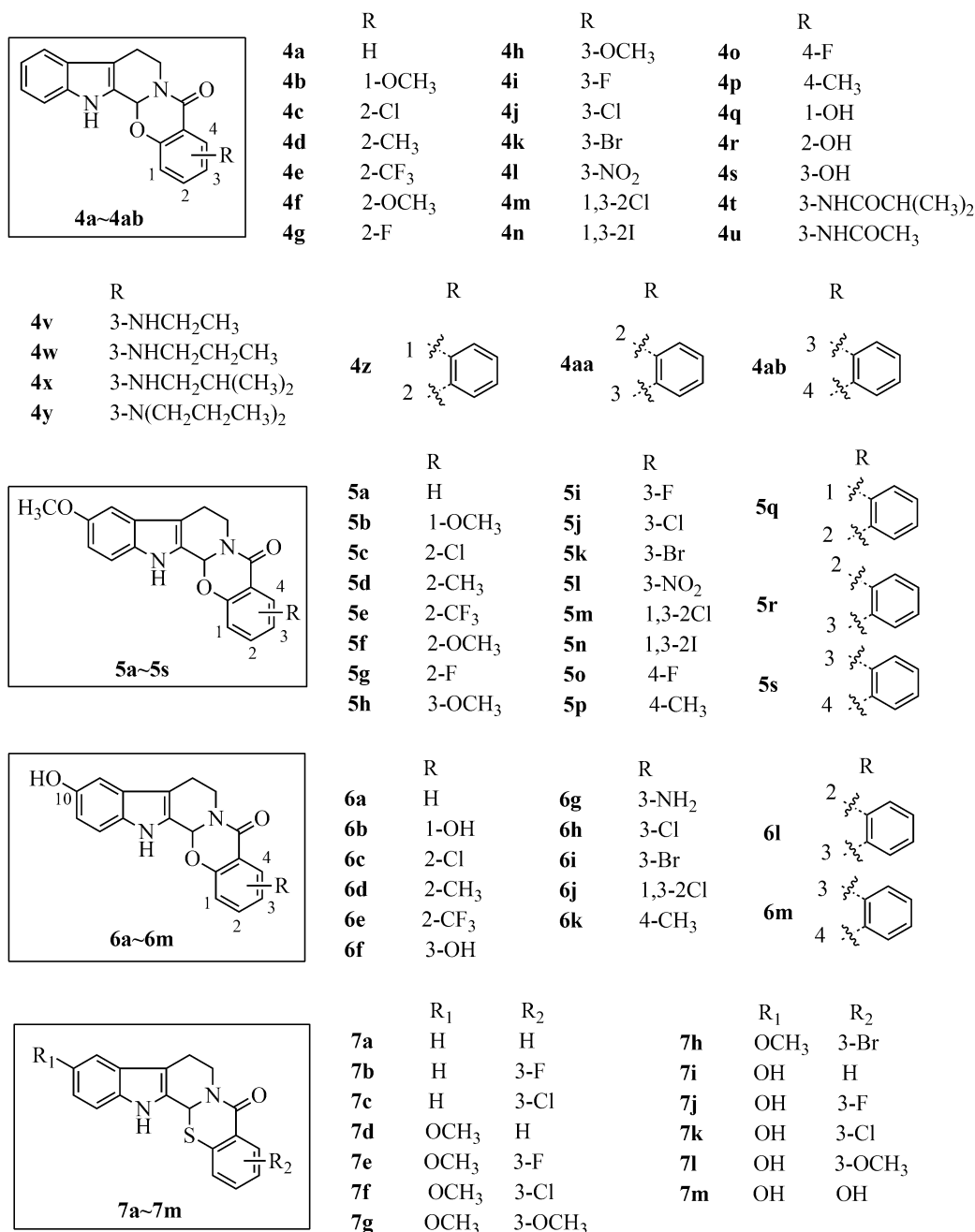
2 生物活性

2.1 抗老年痴呆

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)为中枢神经系统退行性疾病,临床表现以渐进性记忆功能障碍和认知功能障碍为主,目前研究其发病机制包括中枢胆碱能损伤、基因突变或多型性学说、免疫功能突变等多种假说,其中 tau 蛋白异常学说和 β-淀粉样蛋白(Aβ)学说被广泛认可,基于这两种学说开展了 DHED 对 AD 的作用机制研究,DHED 作为胆碱酯酶抑制剂,具有改善记忆障碍、提高认知能力以及保护神经等作用。糖原合酶激酶-3(GSK-3)过表达可导致小鼠 tau-蛋白的过度磷酸化及空间记忆障碍^[19],Peng 等^[20]的



图式 3 DHED 的衍生物 3
Scheme 3 DHED derivative 3



图式 4 DHED 衍生物的化学结构式

Scheme 4 Chemical structures of DHED derivatives

研究指出在 GSK-3 过表达的 AD 小鼠模型中, DHED 能够有效地抑制 tau 蛋白过度磷酸化,改善小鼠的空间记忆功能。在代谢活跃的大鼠脑片

上, DHED 可减弱多个 AD 相关位点上由 Calyculin A(花萼海绵体诱癌素 A)诱导的 tau 蛋白过度磷酸化^[21]。Noh 等^[22]发现, DHED 通过抑

制 A β 蛋白产生,从而减缓 Tg2576 转基因小鼠的认知功能障碍。DHED 能够改变大鼠海马 CA1 区的突触传递,持续兴奋突触传递^[23],有效地改善由东莨菪碱引起的大鼠健忘症状^[24]。DHED 减少原代皮层神经元中钙离子水平及 A β 蛋白诱导的活性氧自由基(ROS)的产生,降低神经细胞毒性,提高 A β_{1-42} 大鼠模型的学习和记忆能力^[25]。将 DHED 制成羧基化衍生物后,其水溶性增加,生物利用度提高,在阿尔茨海默症 5 $\times$ FAD 小鼠模型实验中,该衍生物能够减少 tau 蛋白磷酸化,提高突触稳定性,改善记忆障碍等^[26]。

随着研究的深入,针对 A β 治疗的 AD 药物在临床中大多以失败告终^[27],A β 沉积程度可能并不是 AD 的主要发病机制,越来越多的研究表明线粒体氧化应激可能参与了 AD 的多种病理机制^[28]。DHED 对过氧化氢(H₂O₂)导致的 PC-12 (大鼠嗜铬细胞瘤)细胞损伤有一定的保护作用^[29],对谷氨酸/H₂O₂ 诱导的大鼠原代神经细胞的损伤呈剂量依赖性的保护作用^[30]。在 D-半乳糖致小鼠衰老模型中,DHED 可使该模型小鼠脑内 SOD(超氧化物歧化酶)明显提高,MDA(丙二醛)含量降低,同时使脑组织中的 A β 含量降低,从而改善小鼠的空间学习记忆能力^[31,32]。

组织学研究表明,DHED 能够显著降低心肌缺血大鼠脑海马区 CA1 的神经元缺失,减少损伤性缺血的梗死范围,提示 DHED 也可用于血管型痴呆^[33]。体内外实验研究表明,DHED 可缓解精神压力引起的记忆障碍及抑郁行为^[34]。此外,DHED 可能会影响神经元和星形胶质细胞的发育,并调节谷氨酸能神经系统^[35]。通过数据库筛选及分子对接等方式预测出 DHED 可作为乙酰胆碱酯酶^[36]和丁酰胆碱酯酶抑制剂^[37],Decker^[17]合成了 DHED 的衍生物,对乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶均具有一定的抑制作用。

2.2 抗肿瘤

酪蛋白激酶 2(CK2)是由两个催化亚基和两个调节亚基组成的高度保守的磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶,它参与细胞生长、增殖、细胞周期调控以及 DNA 的修复等过程,同时在癌症发展及病毒感染过程中起重要作用,因此 CK2 被认为是癌症治疗的潜在靶点。Anjum 等^[38]通过 IMPPAT(印度药用植物、植物化学及治疗应用)在线数据库,从植物来源的天然产物中筛选出 DHED 可作为 CK2 抑制剂。原癌基因 c-Hyb 在多种肿瘤细胞中

均表现出过表达的现象,被认为是抑制肿瘤的潜在靶点,Li 等^[39]通过电喷雾电离质谱(ESI-MS)方法研究发现,DHED 与 c-Hyb 基因 G-四链体结构有高度亲和力,推测 DHED 可以调控原癌基因 c-Hyb 的表达。DHED 能够直接抑制酪氨酸酶的活性,使 B16F10(黑色素瘤细胞)黑色素的生成减少,而不影响酪氨酸酶基因的表达^[40]。DHED 抑制 HCT116 等多种结直肠癌细胞活性,诱导细胞凋亡与自噬,减少结直肠癌的转移^[41]。

2.3 抗炎

炎症反应是机体的一种保护性反应,涉及多种炎症因子,许多疾病与综合征都与炎症有关。消化性溃疡是一种多病因疾病,临床上常发生在胃和十二指肠的溃疡。通过胃溃疡大鼠模型的研究^[42]发现,DHED 可以抑制 Rho/NF- κ B 信号转导,调控大鼠体内炎症反应及氧化应激,促进胃黏膜修复。DHED 剂量依赖性抑制小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 中一氧化氮的生成,其机制可能与启动 IFN- γ 信号通路和 iNOS(诱导型一氧化氮合酶)蛋白合成有关^[43]。此外,DHED 可以通过炎症代谢通路的调控对甲基硝基亚硝基胍^[44]和吡啶美辛^[45]引起的胃损伤起到治疗与保护的作用。

2.4 抗菌、抗病毒

人类疱疹病毒(Epstein-Barr Virus,EBV)是传染性单核细胞增多症(也称接吻病)的病原体,主要通过唾液传播,是一种与肿瘤发生相关的病毒。Azizah 等^[46]通过分子对接方法得出,DHED 对 EBV 蛋白酶有较好的抑制作用,可作为治疗接吻病的口服候选药物。CK2 抑制剂可以促进应激颗粒的形成,通过抑制病毒的复制来发挥抗病毒作用,因此,采用 IMPPAT 数据库筛选得到的 CK2 抑制剂 DHED^[38],有可能可进一步开发为 COVID-19(新型冠状病毒肺炎)等病毒的治疗药物。此外,DHED 对油菜菌核病菌等植物病原真菌抑制较弱^[47],对水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌等多种农业病原菌均具有较强的抑制活性^[9]。

2.5 抗心律失常

心律失常是由于心脏电冲动的起源或传导异常引起的心脏节律、频率或激动顺序异常,临床表现为心动过速、过缓,心率不齐或心脏停搏等。Loh 等^[48]通过豚鼠离体心肌细胞实验发现,DHED 可以抑制心肌细胞 L 型钙电流内流,减少细胞内 Ca²⁺超载,抑制触发性心律失常。人离体

心肌细胞实验研究^[49]进一步发现,DHED 能够减少 Na^+ 和 Ca^{2+} 的内流、提高静息状态下细胞内 pH 及 Na^+-H^+ 交换,从而抑制药源性心律失常。Baburin 等^[50]研究发现,DHED 可以在纳摩尔浓度下抑制钾离子通道 hERG,在人源诱导多能干细胞分化的心肌细胞(hiPSC-CM)模型中延长动作电位时程及早期后去极化,对慢性房室传导阻滞(cAVB)犬模型的抗心律失常作用呈剂量依赖性。

2.6 其他

实验研究表明,DHED 在体内与体外均具有一定降压作用^[51],这种负性变时作用可能与抗组胺、阻滞 Ca^{2+} 通道有关,而与 α -肾上腺素受体的抑制无关^[52,53]。He 等^[54]通过细胞膜色谱法分离得到 DHED,可以与 α_{1A} -肾上腺素受体结合,从而抑制由去氧肾上腺素引起的收缩。DHED 还可以选择性增加脑血流量^[55]。

3 结语

中药吴茱萸为经典名方“左金丸”、“吴茱萸汤”等的主要药味组成,在临床上应用广泛。DHED 作为吴茱萸中发挥药效的主要生物碱类成分,一直备受关注。

DHED 为季胺型吡啶类生物碱,具有中等极性以及一定的碱性。在提取分离过程中,可以根据其极性采用溶剂法或吸附色谱法,或者根据其碱性采用酸水法或阳离子交换树脂方法。其合成方法一般采用内酰胺与邻氨基苯甲酸酯在二氯氧磷/三氯氧磷催化下反应,由于反应过程中易发生脱甲基,生成其类似物吴茱萸次碱,故对其衍生物的研究比较有限。DHED 的生物活性多样,其中抗阿尔茨海默症活性备受关注。DHED 对阿尔茨海默症的记忆障碍、认知功能障碍、抑郁等临床表现均具有一定改善作用,体内外实验研究发现 DHED 不仅可以抑制 tau-蛋白的过度磷酸化和 $\text{A}\beta$ 蛋白产生,还可以通过氧化应激机制改善记忆、学习障碍,同时其对乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶均具有抑制作用。目前对 DHED 衍生物的生物活性集中在抗肿瘤的研究,可以进一步研究它们在抗阿尔茨海默症、抗炎、抗病毒等多方面的生物活性。

此外,DHED 还具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗病毒等生物活性,其中在抗植物病原菌方面表现突出,但目前研究较少,因此可以进一步研究其在抗

农业病原菌等农业方面的应用,为开发新型植物源农药提供新的思路。

参 考 文 献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] 杨春启, 连闻雨, 王宇光, 等. 中国中药杂志, 2021, 46 (20): 5218~5225.

[3] Zhao N, Li Z L, Li D H, et al. Phytochemistry, 2015, 109: 133~139.

[4] Asahina Y, Oohta T. Yakugoku Zasshi, 1926, 530: 293~299.

[5] Nakasato T, Asada S, Marui K. Yakugaku Zasshi, 1962, 82: 619~626.

[6] 邹弢, 杨家强. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (14): 59~61.

[7] 刘倩, 周思多, 李大鹏, 等. 食品与药品, 2015, 17 (1): 17~20.

[8] 袁金斌, 董嘉皓, 何军伟, 等. CN: 108840869B.

[9] 王奇志, 徐曙, 刘飞, 等. CN: 106892919A.

[10] Schramm A, Hamburger M. Fitoterapia, 2014, 94: 127~133.

[11] Pachter I J, Suld G. J. Org. Chem., 2003, 25 (9): 1680~1682.

[12] Nakayama A, Kogure N, Kitajima M, et al. Heterocycles, 2008, 76 (1): 861~865.

[13] Wehle S, Espargaró A, Sataté R, et al. Tetrahedron, 2016, 72 (20): 2535~2543.

[14] Danieli B, Palmisano G. Heterocycles, 1978, 9 (7): 803~806.

[15] Dong G Q, Wang S Z, Miao Z Y, et al. J. Med. Chem., 2012, 55: 7593~7613.

[16] Wang S Z, Fang K, Dong G Q, et al. J. Med. Chem., 2015, 58: 6678~6696.

[17] Decker M. Eur. J. Med. Chem., 2005, 36 (27): 305~313.

[18] Zhang G S, Shang X Q, Han W, et al. CrystEngComm, 2020, 22: 3777~3788.

[19] Liu S J, Zhang A H, Li H L, et al. J. Neurochem., 2003, 87: 1333~1344.

[20] Peng J H, Zhang C E, Wei W, et al. Neuropharmacology, 2007, 52 (7): 1521~1527.

[21] Fang J, Liu R, Tian Q, et al. Acta Pharmacol. Sin., 2007, 28 (11): 1717~1723.

[22] Noh S J, Shin K Y, Suh Y H. Neurosci. Res., 2009, 65: S152.

[23] Park E J, Suh Y H, Kim J Y, et al. Neuroreport, 2003, 14 (3): 399~403.

[24] Wang H H, Chou C J, Liao J F, et al. Eur. J. Pharmacol., 2001, 413: 221~225.

[25] Shin K Y, Kim K Y, Suh Y H. Korean J. Physiol. Pharmacol., 2017, 21 (1): 55~64.

[26] Kang S, Ha S, Park H, et al. *Front. Behav. Neurosci.* , 2018, 12: 273.

[27] Doody R S, Thomas R G, Farlow M, et al. *New Engl. J. Med.* , 2014, 370: 311~321.

[28] 周玲玲, 钱康, 杨鹏, 等. *药学报*, 2022, 57 (6): 1630 ~ 1640.

[29] Zhang Y N, Yang Y F, Yang X W, et al. *Biomed. Pharmacother.* , 2018, 98: 82~87.

[30] Choi S H, Park C H, Seo J H, et al. *J. Neurochem.* , 2002, 81: 11~18.

[31] 康文静, 梁冰, 李淑芳, 等. *中国药科大学学报*, 2010, 41 (4): 372~374.

[32] 张常娥, 王晓丽, 赵灿国, 等. *广东医学*, 2012, 33 (16): 2395~2397.

[33] Park C H, Lee Y J, Lee S H, et al. *J. Neurochem.* , 2000, 74: 244~253.

[34] Kim H J, Shin K Y, Chang K A, et al. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* , 2014, 18: 55~59.

[35] Lim D K, Lee Y B, Kim H S. *Neurochem. Res.* , 2004, 29 (2): 407~411.

[36] Ahmad S S, Khan M B, Ahmad K, et al. *Molecules*, 2021, 26: 2641.

[37] Zheng F, Zhan M, Huang X Q, et al. *Bioorg. Med. Chem.* , 2014, 22 (1): 538~549.

[38] Anjum F, Sulaimani M N, Shafie A, et al. *RSC Adv.* , 2022, 12 (13): 7872~7882.

[39] Li F Y, Zhou J, Xu M, et al. *Int. J. Mass Spectrom.* , 2017, 414: 39~44.

[40] Luo L H, Seo J W, Nguyen D H, et al. *Korean J. Chem. Eng.* , 2010, 27 (3): 915~918.

[41] Jeon H D, Han Y H, Mun J G, et al. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153809.

[42] 万军, 包奇昌. *中草药*, 2020, 51 (18): 4698~4703.

[43] Chiou W F, Sung Y J, Liao J F, et al. *J. Nat. Prod.* , 1997, 60 (7): 708~711.

[44] Wen J X, Tong Y L, Ma X, et al. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153619.

[45] Wei Y, Ren S, Wang J, et al. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153764.

[46] Azizah R N, Suharti, Yahmin. *IOP Conf. Ser. : Mater. Sci. Eng.* , 2020, 833 (1): 012006.

[47] 马晨, 徐曙, 单宇, 等. *中草药*, 2017, 48 (10): 2018 ~ 2023.

[48] Loh S H, Lee A R, Huang W H, et al. *Brit. J. Pharmacol.* , 1992, 106 (3): 517~523.

[49] Loh S H, Tsai Y T, Lee C Y, et al. *J. Ethnopharmacol.* , 2014, 153 (3): 753~762.

[50] Baburin I, Varkevisser R, Schramm A, et al. *Pharmacol. Res.* , 2018, 131: 150~163.

[51] Xu S B, Huang Y M, Lau C N B, et al. *Am. J. Chin. Med.* , 1982, 10: 75~85.

[52] Yang H Y, Li S Y, Chen C F. *Asia-Pacific J. Pharmacol.* , 1988, 3: 191~196.

[53] Yang M, Wu S, Kuo J S, et al. *Eur. J. Pharmacol.* , 1990, 182 (3): 537~542.

[54] He X S, Xu X L, Sui Y, et al. *J. Pharmaceut. Biomed.* , 2021, 195: 113874.

[55] Haji A, Momose Y, Takeda R, et al. *J. Nat. Prod.* , 1994, 57 (3): 387~389.