

# 独活挥发油对 *N*-脂肪酰基乙醇胺水解酶的抑制作用及抗炎作用研究

孙文畅, 杨隆河, 邱彦, 任杰, 黄锐, 傅瑾\*

(厦门大学 医学院 药理学系, 福建 厦门 361005)

**【摘要】** 目的: 研究独活挥发油对内源性大麻素水解酶 *N*-脂肪酰基乙醇胺水解酶(*N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, NAAA) 水解活性的影响以及对脂多糖(LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应模型的抗炎作用。方法: 采用水蒸气蒸馏法提取独活挥发油, GC-MS 检测化学成分; 采用 LC-MS 检测 NAAA 水解活性; 采用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞建立细胞炎症反应模型; 采用 LC-MS 检测细胞内棕榈酸乙醇胺(*N*-palmitoylethanolamine, PEA) 水平; 采用实时定量 PCR 检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、诱导型一氧化氮合酶(iNOS) 和白细胞介素-6(IL-6) mRNA 表达; 采用酶联免疫吸附法(ELISA) 检测 TNF- $\alpha$  含量; 采用 Griess 法检测一氧化氮(NO) 含量。结果: 独活挥发油可抑制 NAAA 水解活性, 升高 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞内 PEA 水平; 独活挥发油可下调 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6 mRNA 表达; 独活挥发油可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$  和 NO 释放。结论: 独活挥发油能够抑制 NAAA 水解活性, 升高细胞内 PEA 水平, 降低炎症因子表达, 具有一定的抗炎作用。

**【关键词】** 独活挥发油; 炎症; *N*-脂肪酰基乙醇胺水解酶; 棕榈酸乙醇胺; 小鼠巨噬细胞

传统中药独活(*Angelicae Pubescentis Radix*, APR) 是一种药用价值极高的植物, 为伞形科植物独活 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根, 具有祛风除湿、通痹止痛之功效。味辛、苦、微温, 归肾、膀胱经<sup>[1]</sup>。独活药用历史悠久, 主要用于风寒湿痹、腰膝疼痛、少阴伏风头痛等。挥发油是独活的主要成分之一, 近几年, 科学家对独活挥发油的化学成分和药理学功效进行了大量研究<sup>[2]</sup>, 在抗炎镇痛方面的也有一些报道<sup>[3]</sup>, 但是机制仍不是很明确。

棕榈酸乙醇胺(*N*-palmitoylethanolamine, PEA) 在炎症和神经性疼痛发生过程中发挥着重要的作用, 是一类重要的镇痛、抗炎和神经保护物质<sup>[4-5]</sup>。PEA 在体内极易被 *N*-脂肪酰基乙醇胺水解酶(*N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, NAAA) 水解代谢<sup>[6]</sup>。因此, 寻找 NAAA 有效抑制剂, 使 PEA 维持在一定生理水平便成为镇痛抗炎药物的新思

路。作者在前期对 NAAA 抑制剂的筛选过程中发现, 独活挥发油对 NAAA 有一定的抑制作用。本研究以 NAAA 和 PEA 为靶点, 考察独活挥发油的抗炎作用及机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞、高表达 NAAA 人胚肾上皮细胞株 HEK293-rNAAA 细胞由美国加州大学欧文分校惠赠。

**1.2 药材和试剂** 独活购自福建省厦门市鹭燕大药房, 由厦门大学医学院药理学系邱彦副教授鉴定。LPS(美国 Sigma 公司); 胎牛血清、DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); TRIZOL 抽提试剂盒(美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒(日本 TOYOBO 公司); Real time-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司); 小鼠 TNF- $\alpha$  Elisa 试剂盒(美国 RD Biosciences 公司); Griess 试剂盒(碧云天公司)。引物由上海生工生物公司合成。其余试剂均为国产分析纯。

**1.3 仪器** 1200 型液相色谱仪、5975B inert XL MSD 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司); 3200 Q Trap 型质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司); DU800 型核酸蛋白分析仪(美国 Beckman Coulter 公司); 7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); SpectraMax M2 型多功能酶标仪

• 3161 •

**【稿件编号】** 20101204001

**【通信作者】** \* 傅瑾 教授, 博士生导师, 主要从事内源性大麻素系统药理学研究, Tel: (0592) 2188681, E-mail: fuj888@yahoo.com

**【作者简介】** 孙文畅, 硕士, Tel: (0592) 2187210, E-mail: swenchang@163.com

(美国 Molecular Devices 公司)。

## 2 方法

**2.1 独活挥发油的提取** 将独活 100 g 粉碎后用挥发油提取器按《中国药典》2010 年版一部附录 XD 方法提取挥发油,经无水硫酸钠干燥后得挥发油。独活挥发油为淡黄色透明油状物,具有特殊浓郁香味,得油率为 1.7%,密度为  $0.82 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,不溶于水,DMSO 溶解。

**2.2 NAAA 水解活性测定** 培养高表达 NAAA 的 HEK293+NAAA 细胞,使用  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  G418 进行筛选。采用超声破碎法和反复冻融法提取 NAAA 蛋白,BCA 法测蛋白浓度。NAAA 水解反应:体系组成为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  NAAA 蛋白  $20 \mu\text{L}$ ,不同质量浓度独活挥发油(终质量浓度为 10,50,250  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $2 \mu\text{L}$ ,底物  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  十七酰乙醇胺(heptadecanoyl ethanolamide)  $5 \mu\text{L}$ ,NAAA 反应液( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸氢二钠缓冲液,pH 5.0,0.1% Triton X-100,  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  二硫苏糖醇)  $173 \mu\text{L}$ 。以上体系在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴反应 30 min,用含有  $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  十七烷酸(heptadecanoic acid) 内标的甲醇终止液  $200 \mu\text{L}$  终止反应,LC-MS 分析水解反应产物含量。LC-MS 条件:液相色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱( $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm} \ 5 \mu\text{m}$ ),柱温保持在  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量  $5 \mu\text{L}$ ,流动相 A 为水(含 0.25% 醋酸和  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸铵),流动相 B 为甲醇,流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,95% B 洗脱 10 min。质谱为 ESI 负离子源,干燥气为  $\text{N}_2$ ,温度  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ ,扫描范围  $m/z$  50~400。结果以十七烷酸  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  269 作为内标对 NAAA 水解产物 17:1 脂肪酸  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  267 进行定量分析。

**2.3 独活挥发油 GC-MS 化学成分分析** GC-MS 检测独活挥发油化学成分。GC-MS 条件:色谱柱为 DB-5 石英毛细管色谱柱( $0.25 \text{ mm} \times 30 \text{ m}, 0.25 \mu\text{m}$ ),进样口温度  $260 \text{ }^\circ\text{C}$ ,程序升温:  $3 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (停留 10 min)~ $240 \text{ }^\circ\text{C}$ (停留 10 min),载气为 He,柱流量  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,进样量  $0.2 \mu\text{L}$ 。质谱为 EI 离子源,离子源温度  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ,扫描范围  $m/z$  30~500。对总离子流图中各峰经质谱扫描后得到质谱图,通过 Xcalibur 工作站 NIST 标准质谱图库进行检索确认各组分,通过数据处理系统,按峰面积归一化法计算各组分在挥发油中的相对含量。

**2.4 PEA 水平的定量分析** RAW264.7 细胞接种于  $10 \text{ cm}$  培养板,待长至 80% 左右时,更换含终质

量浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS 的培养基,给药组加入不同质量浓度独活挥发油(终质量浓度为 1,5,25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 共同培养 6 h。每个样本用含有  $100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  [ $^2\text{H}$ ]-十七酰乙醇胺内标的甲醇-水(1:1)混合液  $2 \text{ mL}$  收集细胞,超声破碎法裂解细胞,加入  $2 \text{ mL}$  氯仿萃取,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取下层有机层,  $\text{N}_2$  吹干,  $100 \mu\text{L}$  甲醇-氯仿(3:1)混合液重新溶解,LC-MS 分析 PEA 水平。LC-MS 条件:液相色谱柱型号同方法 2.2,柱温保持在  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量  $5 \mu\text{L}$ ,流动相 A 为甲醇,流动相 B 为水,流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,梯度洗脱:0 min 75% B,5 min 85% B,25 min 95% B,30 min 100% B。质谱为 ESI 正离子源,干燥气为  $\text{N}_2$ ,温度  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ ,扫描范围  $m/z$  50~400。结果以 [ $^2\text{H}$ ]-PEA  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  326 作为内标对 PEA  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  322 进行定量分析。

**2.5 Real time-PCR 测定 TNF- $\alpha$ , iNOS 和 IL-6 mRNA 表达** RAW264.7 细胞接种于 6 孔培养板,待长至 80% 左右时,更换含终质量浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS 的培养基,给药组加入不同质量浓度独活挥发油(终质量浓度为 1,5,25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 共同培养 6 h。RNA 提取按 TRIzol 抽提试剂说明书进行,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。逆转录反应按试剂盒说明书进行,按以下条件进行反应:  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  15 min,  $98 \text{ }^\circ\text{C}$  5 min。得到的 cDNA 置于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。Real time-PCR 反应按试剂盒说明书进行,按以下条件进行反应:预变性  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,PCR 反应  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  31 s,40 个循环。iNOS: sense 5'-CCCGTCCACAGTATGTGAGGAT-3', anti-sense 5'-CATTACCTAGAGCCGCCAGTGA-3' (195 bp); IL-6: sense 5'-AATTAAGCCTCCGACTTGTGAAG-3', anti-sense 5'-CTTCCATCCAGTTGCCITCTTG-3' (141 bp); TNF- $\alpha$ : sense 5'-AATGGCCTCCCTCTCATCAGTTCT-3', anti-sense 5'-TGAGATAGCAAATCGGCTGACGGT-3' (297 bp); GAPDH: sense 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3', anti-sense 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3',结果以 GAPDH 为内参计算 mRNA 表达。

**2.6 ELISA 法测定 TNF- $\alpha$  含量** RAW264.7 细胞接种于 6 孔培养板,待长至 80% 左右时,更换含终质量浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS 的培养基,给药组加入不同质量浓度独活挥发油(终质量浓度为 1,5,25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 共同培养 12 h,每孔取  $100 \mu\text{L}$  上清,按 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒说明书于  $450 \text{ nm}$  波长测定吸光度 A 计算 TNF- $\alpha$  含量。

**2.7 Griess 法测定 NO 含量** RAW264.7 细胞接种于 6 孔培养板,待长至 80% 左右时,更换含终质量浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS 的培养基,给药组加入不同质量浓度独活挥发油(终质量浓度为 1, 5, 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 共同培养 24 h,每孔取 100  $\mu\text{L}$  上清,加入 100  $\mu\text{L}$  Griess 试剂,于 540 nm 波长测定吸光度  $A$  计算 NO 含量。

**2.8 统计学分析** 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 GraphPad Prism 统计软件,多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 独活挥发油对 NAAA 水解活性的影响** 独活挥发油给药组(10, 50, 250  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 能够降低 NAAA 水解产物含量,与相应的模型组比较差异有显著性,并呈现量效关系,表明独活挥发油能够抑制 NAAA 水解活性,见表 1。

**3.2 独活挥发油化学成分分析** 独活挥发油 GC-MS 检测的总离子流图见图 1。鉴定出的含量相对较高的 20 个化合物见表 2,主要成分有蛇床子素(osthole) 相对质量分数为 17.943%; 1,2-二氮-1-杂萘硫醇(1,2-dihydro-1-thioxophthalazine) 相对质量分数 16.411%;  $\alpha$ -红没药醇( $\alpha$ -bisabolol) 相对质

表 1 独活挥发油对 NAAA 水解活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAAA 水解产物
对照	-	$0.0076 \pm 0.0008$
NAAA	-	$0.1732 \pm 0.0139^{1)}$
RAP	10	$0.0668 \pm 0.0050^{2)}$
	50	$0.0402 \pm 0.0050^{2)}$
	250	$0.0368 \pm 0.0020^{2)}$

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.001$ ; 与 NAAA 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.001$ 。

量分数 9.181%; 4-羟基-2-甲基苯乙酮(4-hydroxy-2-methylacetophenone) 相对质量分数 9.092%。

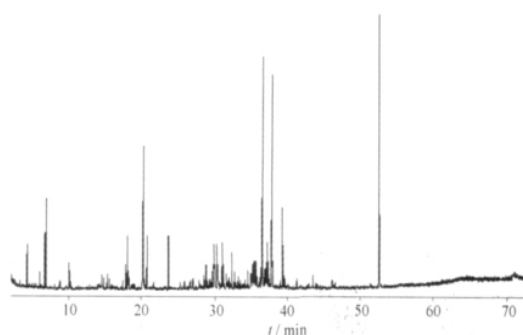


图 1 独活挥发油 GC-MS 检测的总离子流图

表 2 独活挥发油的组成及相对质量分数

No.	$t_R$ /min	名称	分子式	相对分子 质量	相对质量 分数/%
1	4.283	(1R)- $\alpha$ -pinene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	136.23	1.467
2	6.681	1-methyl-2-(1-methylethyl)-benzene	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}$	134.22	3.042
3	6.876	4-methyl-1-(1-methylethyl)-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	136.23	6.261
4	10.057	3-ethylidene-1-methyl-cyclopentene	$\text{C}_8\text{H}_{12}$	108.18	2.063
5	17.809	1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-benzene	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}$	164.24	1.738
6	18.052	2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-benzene	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}$	164.24	3.111
7	20.181	4-hydroxy-2-methylacetophenone acetic acid,	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$	150.17	9.092
8	20.699	1,7,7-trimethyl-bicyclo[2.2.1]hept-2-yl ester	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$	196.29	3.769
9	23.654	1,2-diethyl-1-methyl-cyclohexane	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}$	154.30	3.462
10	28.797	(S)-1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-cyclohexene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.35	1.656
11	30.331	(4aR-trans)-decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethylidene)-naphthalene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.35	1.870
12	31.103	[3R-(3 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 7 $\beta$ , 8 $\alpha$ )]-2,3,4,7,8,8a-hexahydro-3,6,8,8-tetramethyl-1H-3a,7-methanoazulene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.35	2.834
13	32.373	1,3,3-trimethyl-tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	136.23	2.277
14	35.522	1,2,3,3a,4a,5,6,7,8,9,9a,9b-dodecahydrocyclopenta[def]phenanthrene	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}$	202.34	1.732
15	35.733	2,6,6,9-tetramethyl-tricyclo[5.4.0.0(2,8)]undec-9-ene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.35	1.912
16	36.592	1,2-dihydro-1-thioxophthalazine	$\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{S}$	162.21	16.411
17	37.289	2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)-bicyclo[3.1.1]hept-2-ene	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}$	176.30	4.564
18	37.883	$\alpha$ -bisabolol	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	222.37	9.181
19	39.358	(Z)-11-pentadecenol	$\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}$	226.41	5.613
20	52.647	osthole	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$	224.28	17.943

**3.3 独活挥发油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 PEA 水平的影响** 在  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS 刺激下,模型组与对照组相比 PEA 水平有显著降低 ( $P < 0.05$ ),而独活挥发油给药组能够阻断炎症反应下的 PEA 下降,升高 PEA 水平,与相应的模型组比较差异有显著性,并呈现量效关系,表明独活挥发油能够升高 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞内 PEA 水平,见表 3。

表 3 独活挥发油对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 PEA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	PEA/ $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	-	$5.637 \pm 0.633 4$
LPS	-	$2.863 \pm 0.334 6^{1)}$
APR	1	$4.235 \pm 0.038 4$
	5	$4.620 \pm 0.316 8^{2)}$
	25	$6.189 \pm 0.529 8^{3)}$

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 LPS 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.001$ (表 4,5 同)。

**3.4 独活挥发油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ , iNOS 和 IL-6 mRNA 水平的影响** 在  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS 刺激下,模型组与对照组相比炎症因子 TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6 mRNA 水平有显著升高 ( $P < 0.001$ ),表明 LPS 能诱导 RAW264.7 细胞大量表达 TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6 mRNA。而独活挥发油给药组能够降低 TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6 mRNA 水平,与相应的模型组比较差异有显著性,并呈现量效关系,表明独活挥发油能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6 mRNA 表达,见表 4。

**3.5 独活挥发油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 TNF- $\alpha$  和 NO 的影响** 在  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS 刺激下,模型组与对照组相比细胞 TNF- $\alpha$  和 NO 含量显著增多 ( $P < 0.001$ ),表明 LPS 能诱导 RAW264.7 细胞大量释放 TNF- $\alpha$  和 NO。而独活挥发油给药组能够降低 TNF- $\alpha$  和 NO 含量,与相应的模型组比较差异有显著性,并呈现量效关系,表明独活挥发油能够

表 4 独活挥发油对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- $\alpha$	iNOS	IL-6
对照	-	$11.82 \pm 0.527 1$	$0.02 \pm 0.000 2$	$0.01 \pm 0.001 2$
LPS	-	$97.38 \pm 0.921 4^{1)}$	$20.50 \pm 0.747 3^{1)}$	$66.33 \pm 1.762 0^{1)}$
APR	1	$96.43 \pm 0.797 1$	$21.10 \pm 0.500 2$	$68.67 \pm 0.700 8$
	5	$91.37 \pm 0.300 6^{2)}$	$16.08 \pm 1.200 0^{3)}$	$64.86 \pm 0.965 7$
	25	$67.01 \pm 2.332 0^{4)}$	$14.72 \pm 0.747 7^{3)}$	$42.20 \pm 1.205 0^{4)}$

抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$  和 NO 释放,见表 5。

表 5 独活挥发油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 TNF- $\alpha$  和 NO 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- $\alpha$ / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	-	$0.0 \pm 0.002 7$	$0.130 9 \pm 0.012 1$
LPS	-	$244.4 \pm 0.498 1^{1)}$	$0.215 5 \pm 0.006 6^{1)}$
APR	1	$205.4 \pm 0.399 0^{3)}$	$0.196 3 \pm 0.004 0$
	5	$203.3 \pm 0.156 8^{3)}$	$0.183 0 \pm 0.006 7^{3)}$
	25	$124.3 \pm 0.449 4^{4)}$	$0.105 3 \pm 0.008 5^{4)}$

#### 4 讨论

PEA 最初是在 20 世纪 70 年代作为呼吸道感染的抗病毒药物在东欧上市<sup>[7]</sup>,而最近的研究发现 PEA 是一类重要的镇痛、抗炎和神经保护物质,可作用于中枢及感觉神经系统、免疫细胞等多个靶点而发挥作用。PEA 镇痛抗炎的机制众说纷纭,目前

比较公认的机制是认为 PEA 能激活过氧化物酶体增殖激活受体- $\alpha$ (peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$ , PPAR- $\alpha$ ),调节下游多种炎症因子的表达,抑制炎症反应,从而发挥镇痛抗炎的作用<sup>[8]</sup>。NAAA 是一类与酸性神经酰胺结构和功能相类似的水解酶,主要存在于溶酶体中,在巨噬细胞中有较高的表达<sup>[9-10]</sup>,因此本研究选择 RAW264.7 作为实验细胞株。NAAA 能够水解脂肪酸链长度为  $C_{12} \sim C_{20}$  的 *N*-酰基乙醇胺(*N*-acylethanolamines, NAEs),其中只有 PEA 是 NAAA 的特异性水解底物, $K_m$  值为  $35 \sim 97 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[11-12]</sup>。NAAA 可将 PEA 水解为脂肪酸和乙醇胺,使 PEA 水平显著降低,阻碍其发挥正常的生理功能。因此,有效抑制 NAAA 活性,使 PEA 维持在一定生理水平是治疗炎症的一个重要靶点<sup>[13]</sup>。NAAA 抑制剂研究还处于早期阶段,目前报道的主要有 *N*-cyclohexanecarbonylpentadecylamine (CCP)<sup>[14]</sup> 和 *N*-[(3*S*)-2-oxo-3-oxetanyl]-3-phenyl-

propan-amide [(S)-OOPP]<sup>[15]</sup>,但是这 2 种抑制剂又存在抑制活性低、在体内稳定性差等缺点。

独活挥发油具有祛风、除湿、抗炎、止痛的功效,这与 NAAA 抑制剂作用相类似。因此,本研究选择 NAAA 和 PEA 为靶点来研究独活挥发油抗炎作用的分子机制。本研究表明,独活挥发油能够抑制 NAAA 活性,使 NAAA 水解 PEA 的能力降低,从而使 PEA 水平升高,是一类新发现的 NAAA 抑制剂。本研究又对其化学成分进行分析,GC-MS 结果显示独活挥发油成分主要为蛇床子素、1,2-二氮-1-杂萘硫醇、 $\alpha$ -红没药醇、4-羟基-2-甲基苯乙酮等化合物,而这些化合物很可能就是抑制 NAAA 的有效化合物,而具体有效成分还有待进一步研究确认。

LPS 是巨噬细胞最有效的激活剂,LPS 诱导的 RAW264.7 细胞模型已经被广泛用于炎症反应研究。当 RAW264.7 细胞受到 LPS 的刺激时,可分泌大量炎症因子。TNF- $\alpha$  和 IL-6 是激活的巨噬细胞分泌的主要炎症因子,在炎症和免疫反应中发挥非常重要的作用。NO 是一种具有生物活性的气体分子,同样调节炎症和免疫反应的发生和发展<sup>[16-17]</sup>。在巨噬细胞中,NO 的合成主要依赖于 iNOS。本研究表明,独活挥发油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应模型呈现出降低炎症因子表达的作用,炎症因子 TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6 mRNA 表达、TNF- $\alpha$  和 NO 释放在炎症模型中被抑制,表明独活挥发油具有一定的抗炎作用。独活挥发油的抗炎作用研究为研制较为理想的抗炎镇痛新药提供了药理学基础,使独活这味古老的中药发挥出更大的作用。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 185.
- [2] 杨秀伟,刘玉峰,陶海燕,等. 独活挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(8): 663.
- [3] 范莉,李林,何慧凤. 独活挥发油抗炎、镇痛药理作用的研究[J]. 安徽医药, 2009, 13(2): 133.
- [4] Re G, Barbero R, Miolo A, et al. Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals[J]. Vet J, 2007, 173(1): 14.
- [5] Ganley O H, Graessle O E, Robinson H J. Anti-inflammatory activity on compounds obtained from egg yolk, peanut oil, and soybean lecithin[J]. J Lab Clin Med, 1958, 51(5): 709.
- [6] Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S. Purification and characterization of an acid amidase selective for *N*-palmitoyl-ethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance[J]. J Biol Chem, 2001, 276(38): 35552.
- [7] Masek K, Perlík F, Klíma J, et al. Prophylactic efficacy of *N*-2-hydroxyethyl palmitamide (impulsin) in acute respiratory tract infections[J]. Eur J Clin Pharmacol, 1974, 7(6): 415.
- [8] LoVerme J, Fu J, Astarita G, et al. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide[J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(1): 15.
- [9] Tsuboi K, Zhao L Y, Okamoto Y, et al. Predominant expression of lysosomal *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase in macrophages revealed by immunochemical studies[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1771(5): 623.
- [10] Tsuboi K, Sun Y X, Okamoto Y, et al. Molecular characterization of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase[J]. J Biol Chem, 2005, 280(12): 11082.
- [11] Tsuboi K, Takezaki N, Ueda N. The *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA) [J]. Chem Biodivers, 2007, 4(8): 1914.
- [12] Ueda N, Tsuboi K, Uyama T. *N*-acylethanolamine metabolism with special reference to *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA) [J]. Prog Lipid Res, 2010, 49(4): 299.
- [13] Pentrosino S, Iuvone T, DiMarzo V. *N*-palmitoyl-ethanolamine: biochemistry and new therapeutic opportunities[J]. Biochimie, 2010, 92(6): 724.
- [14] Tsuboi K, Hilligsmann C, Vandevoorde S, et al. *N*-cyclohexane-carbonylpentadecylamine: a selective inhibitor of the acid amidase hydrolyzing *N*-acyl-ethanolamines, as a tool to distinguish acid amidase from fatty acid amide hydrolase[J]. Biochem J, 2004, 379(1): 99.
- [15] Solorzano C, Zhu C, Battista N, et al. Selective *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase inhibition reveals a key role for endogenous palmitoylethanolamine in inflammation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(49): 20966.
- [16] Lala P K, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression[J]. Lancet Oncol, 2001, 2(3): 149.
- [17] Yang F, Contois A S, Fang L, et al. Nitric oxide derived nitrate anion contributes to endotoxic shock and multiple organ injury / dysfunction[J]. Crit Care Med, 2002, 30(3): 650.

## Identify nature *N*-acylethanolamide-hydrolyzing acid amide ( NAAA) inhibitor: effect of *Angelicae Pubescentis Radix* on anti-inflammation

SUN Wenchang , YANG Longhe , QIU Yan , REN Jie , HUANG Rui , FU Jin\*  
( Department of Pharmacology , Medical College of Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the effect of *Angelicae Pubescentis Radix* ( APR ) on the activity of endocannabinoid hydrolase and *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase ( NAAA ) , and to demonstrate the mechanism of anti-inflammatory effect of APR by *in vitro* lipopolysaccharide ( LPS ) -induced inflammation model. **Method:** APR essential oil was extracted by steam distillation , and the chemical components were identified by GC-MS. Enzymatic activity was performed by using recombinant NAAA-overexpressing protein and detected by LC-MS. Lipids were extracted by methanol/chloroform mixture and analyzed by LC-MS. mRNA and protein expression levels of proinflammatory genes were examined by Real time-PCR and ELISA assay kit , respectively. The content of nitro oxide ( NO ) was detected by Griess reaction. **Result:** Twenty active components were identified from APR essential oil which inhibited NAAA activity in a dose-dependent manner. On the LPS-induced RAW264.7 cells , APR essential oil reversed LPS-suppressed *N*-palmitoylethanolamide( PEA ) contents in a dose-dependent manner and reduced LPS-induced proinflammatory genes , TNF- $\alpha$  and IL-6. Moreover , APR essential oil reduced the mRNA expression of iNOS , subsequently reduced the release of NO , a classic inflammatory marker. **Conclusion:** The research demonstrated that the effect of APR on inflammation is mediated by the inhibition of NAAA activity , which increase the cellular endobioactor PEA levels and decrease proinflammatory factor. The results suggest that APR can serve as a nature NAAA inhibitor.

**[Key words]** essential oil from *Angelicae Pubescentis Radix*; *N*-acylethanolamide-hydrolyzing acid amide ( NAAA) ; *N*-palmitoylethanolamide ( PEA) ; LPS-induced inflammation

doi: 10.4268/cjcm20112221

[责任编辑 张宁宁]