

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520081153503

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

独活挥发油对 *N*-脂肪酰基乙醇胺水解酶的
抑制作用以及抗炎作用的研究

Identify nature *N*-acylethanolamide-hydrolyzing acid
amidase (NAAA) inhibitor: the effect of essential oil from
Radix Angelicae Pubescentis on anti-inflammation

孙文畅

指导教师姓名: 傅瑾 教授

专业名称: 药 理 学

论文提交日期: 2011 年 5 月

论文答辩时间: 2011 年 5 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(傅瑾 教授)课题(组)的研究成果,获得(傅瑾 教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(傅瑾 教授)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 研究独活 (*Radix Angelicae Pubescentis*, RAP) 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)、脂肪酰胺水解酶 (Fatty Acid Amide Hydrolase, FAAH)、单酰基甘油酯酶 (Monoacylglycerol Lipase, MGL) 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以及可能机制的探讨。

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 NAAA、FAAH、MGL 过表达细胞蛋白和 LC/MS 检测内源性大麻素水解酶 NAAA、FAAH、MGL 的水解活性; 采用 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立细胞炎症反应模型; 采用 LC/MS 检测细胞内 *N*-棕榈酸乙醇胺 (*N*-Palmitoylethanolamine, PEA) 水平; 采用实时定量 PCR (RealTime-PCR) 检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、白细胞介素-6 (IL-6) mRNA 表达; 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 TNF- α 含量; 采用 Griess 法检测一氧化氮 (NO) 含量。

结果: 独活挥发油可有效抑制 NAAA 水解活性, 对 FAAH 只有在高剂量下有一定的抑制作用, 对 MGL 没有抑制作用; GC/MS 鉴定出独活挥发油的主要化学成分, 包括蛇床子素 (Osthole)、1,2-二氮-1-杂萘硫醇 (1,2-Dihydro-1-thioxophthalazine)、 α -红没药醇 (α -Bisabolol)、4-羟基-2-甲基苯乙酮 (4-Hydroxy-2-methylacetophenone) 等 20 个化合物; 在 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应模型中, 独活挥发油能够逆转炎症反应的发生, 呈现出 PEA 升高和炎症因子表达降低: 细胞内 PEA 水平上升, 炎症因子 TNF- α 、IL-6 以及 iNOS mRNA 表达、TNF- α 和 NO 释放在炎症模型中被抑制。

结论: 独活挥发油通过抑制 NAAA 水解活性, 升高细胞内 PEA 水平, 降低炎症因子表达, 从而发挥其抗炎作用。

关键词: 独活挥发油; *N*-脂肪酰基乙醇胺水解酶; *N*-棕榈酸乙醇胺; 脂多糖诱导炎症

Abstract

Objective: To investigate the effect of Radix Angelicae Pubescentis (RAP) essential oil on endocannabinoid hydrolases, *N*-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase (NAAA), Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH), Monoacylglycerol Lipase (MGL) activity and demonstrate that the mechanism of RAP essential oil on anti-inflammatory effect by using *in vitro* lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation model.

Method: RAP essential oil was extracted by steam distillation, and the chemical components were identified by GC/MS. Enzymatic activity was performed by using recombinant NAAA, FAAH, MGL-overexpressing protein and detected by LC/MS. Lipids were extracted by using methanol/chloroform mix and analysis by LC/MS. mRNA and protein expression levels of proinflammatory genes were examined by RealTime-PCR and ELISA assay kit, respectively. Nitric oxide production was detected by Griess reaction.

Result: RAP essential oil dose-dependently inhibited NAAA activity and was identified the 20 active components, mainly including Osthole, 1,2-Dihydro-1-thioxophthalazine, α -Bisabolol and 4-Hydroxy-2-methylacetophenone. On the LPS-induced inflammation RAW264.7 cells, RAP essential oil dose-dependently reversed LPS-suppressed *N*-palmitoylethanolamide (PEA) contents and reduced LPS-induced proinflammatory genes, TNF- α and IL-6, Moreover, RAP essential oil reduced the mRNA expression of iNOS, subsequently reduced the release of nitro oxide (NO), a classic inflammatory marker.

Conclusion: Our data demonstrated that the effect of RAP essential oil on inflammation is mediated by the inhibition of NAAA activity, which is increasing the cellular endobioactor PEA levels and decreasing of proinflammatory factor. The results suggest that RAP essential oil is serving as a nature NAAA inhibitor that attenuates inflammation.

Keywords: Radix Angelicae Pubescentis essential oil, *N*-acylethanolamide-hydrolyzing acid amidase (NAAA), *N*-palmitoylethanolamide (PEA), LPS-induced inflammation

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要	I
Abstract	II
第一章 前言	1
1.1 内源性大麻素系统概述	1
1.1.1 大麻素受体	2
1.1.2 内源性大麻素	3
1.1.4 内源性大麻素的主要合成和降解途径	4
1.1.4 内源性大麻素系统的主要功能	5
1.2 棕榈酸乙醇胺 (PEA)	8
1.2.1 NAEs 的主要合成和降解途径	8
1.2.2 PEA 抗炎镇痛的机制	10
1.2.3 PEA 的治疗前景	11
1.3 PEA 的特异性水解酶——脂肪酰基乙醇胺水解酶 (NAAA)	12
1.3.1 NAAA 的水解性质	12
1.3.2 NAAA 的抑制剂	13
1.3.3 NAAA 的分布	14
1.3.4 NAAA 的功能	15
1.4 立题依据	16
1.5 参考文献	17
第二章 独活挥发油的提取以及对内源性大麻素水解酶的作用	25
2.1 序言	25
2.2 材料	26
2.2.1 药材	26
2.2.2 细胞株	26
2.2.3 试剂	26
2.2.4 仪器	26
2.2.5 主要试剂的配制	26
2.3 方法	27

2.3.1 独活挥发油的提取	27
2.3.1 蛋白酶的制备	27
2.3.1 蛋白酶水解反应	27
2.3.2 LC/MS 水解产物含量分析	29
2.3.3 统计学分析	31
2.4 结果	31
2.4.1 独活挥发油的性状	31
2.4.2 独活挥发油对 NAAA 水解活性的作用	31
2.4.3 独活挥发油对 FAAH 水解活性的作用	32
2.4.5 独活挥发油对 MGL 水解活性的作用	33
2.5 讨论	33
2.6 小结	35
2.7 参考文献	35
第三章 独活挥发油的化学成分分析	37
3.1 序言	37
3.2 材料	37
3.2.1 试剂	37
3.2.2 仪器	37
3.3 方法	37
3.3.1 GC/MS 条件	37
3.3.2 独活挥发油化学成分分析	38
3.4 结果 独活挥发油化学成分分析	38
3.5 讨论	40
3.6 小结	41
3.7 参考文献	41
第四章 独活挥发油对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型的作用	42
4.1 序言	42
4.2 材料	42
4.2.1 细胞株	42
4.2.2 试剂	42
4.2.3 仪器	43
4.3 方法	43

4.3.1 CCK-8 法测定细胞毒作用	43
4.3.2 PEA 水平的定量分析	44
4.3.3 RealTime-PCR 测定 TNF- α 、iNOS 和 IL-6 mRNA 表达	45
4.3.4 Elisa 法测定 TNF- α 含量	48
4.3.5 Griess 法测定 NO 含量	48
4.3.6 统计学分析	49
4.4 结果	49
4.4.1 给药剂量的确定	49
4.4.2 独活挥发油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 PEA 水平的影响	50
4.4.3 独活挥发油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子 TNF- α 、iNOS 和 IL-6 mRNA 水平的影响	51
4.4.4 独活挥发油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 TNF- α 蛋白表达的影响	52
4.4.5 独活挥发油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响	54
4.5 讨论	55
4.6 小结	56
4.7 参考文献	57
第五章 全文结论	59
附录	60
缩略语表	61
致 谢	62

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Endocannabinoid system	1
1.1.1 Cannabinoid receptors	2
1.1.2 Endocannabinoids	3
1.1.3 Major pathways for the biosyntheses and degradations	4
1.1.4 Possible roles	5
1.2 <i>N</i>-palmitoylethanolamine (PEA)	8
1.2.1 Major pathways for the biosyntheses and degradations of NAEs	8
1.2.2 Mechanism of anti-inflammatory and analgesic effects.....	10
1.2.3 Therapeutic opportunities	11
1.3 <i>N</i>-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA)	12
1.3.1 Catalytic properties.....	12
1.3.2 Inhibitors	13
1.3.3 Distribution	14
1.3.4 Possible roles	15
1.4 Foundation	16
1.5 References	17
Chapter 2 Extraction of Radix Angelicae Pubescentis (RAP) essential oil and effects on endocannabinoid hydrolases	25
2.1 Introduction	25
2.2 Materials	26
2.2.1 Drugs	26
2.2.2 Cell lines.....	26
2.2.3 Reagents	26
2.2.4 Instruments	26
2.2.5 Solution preparation	26
2.3 Methods	27

2.3.1 Extraction of RAP essential oil	27
2.3.1 Recombined proteins preparation	27
2.3.1 Enzyme assay	27
2.3.2 LC/MS analysis	29
2.3.3 Statistical analysis	31
2.4 Results	31
2.4.1 Properties	31
2.4.2 Effect of RAP essential oil on NAAA activity	31
2.4.3 Effect of RAP essential oil on FAAH activity	32
2.4.5 Effect of RAP essential oil on MGL activity	33
2.5 Discussion	33
2.6 Conclusion	35
2.7 References	35
Chapter 3 Chemical components identification of RAP essential oil	37
3.1 Introduction	37
3.2 Materials	37
3.2.1 Reagents	37
3.2.2 Instruments	37
3.3 Methods	37
3.3.1 GC/MS analysis	37
3.3.2 Chemical components identification	38
3.4 Results Chemical components identification	38
3.5 Discussion	40
3.6 Conclusion	41
3.7 References	41
Chapter 4 Effects of RAP essential oil on LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells	42
4.1 Introduction	42
4.2 Materials	42
4.2.1 Cell lines	42
4.2.2 Reagents	42
4.2.3 Instruments	43
4.3 Methods	43
4.3.1 CCK-8 assay	43

4.3.2 PEA quantification	44
4.3.3 RealTime-PCR	45
4.3.4 Elisa assay	48
4.3.5 Griess assay	48
4.3.6 Statistical analysis	49
4.4 Results	49
4.4.1 Cytotoxicity effect of RAP essential oil on RAW264.7 cells	49
4.4.2 Effects of RAP essential oil on PEA level	50
4.4.3 Effects of RAP essential oil on TNF- α , iNOS, IL-6 mRNA expression	51
4.4.4 Effects of RAP essential oil on TNF- α release	52
4.4.5 Effects of RAP essential oil on NO release	54
4.5 Discussion	55
4.6 Conclusion	56
4.7 References	57
Chapter 5 Conclusion	59
Appendix	60
Table of Abbreviation	61
Acknowledgement	62

第一章 前言

1.1 内源性大麻素系统概述

大麻 (Cannabis)，作为最早被人类所认识和使用的成瘾性植物之一，是目前滥用最多的成瘾性药物。短期吸食大麻可引起神经兴奋、欣快、短程记忆受损等症状，长期使用可使人成瘾，导致幻觉、焦虑、判断力和记忆力受损、食欲降低等症状。然而，大麻又因其具有极其重要的药理作用而受到人们的重视。大麻一直作为治疗多种疾病的草药，其使用可追溯到几千年前，主要用于缓解疼痛和痛性痉挛，还用于抗焦虑、肠道便秘、女性月经不调、疟疾等疾病的治疗。

内源性大麻素系统 (Endocannabinoid System, ECBS) 作为一个极其重要的神经化学系统，对其功能的探讨和研究是近些年才开始的。大麻含有 400 多种化学成分，其中 60 多种可归为大麻素 (Cannabinoids) 一类，而最主要的活性成分是 1964 年 Gaoni 等从大麻中分离出 Δ^9 -四氢大麻酚 (Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC)。THC 是大麻中使人感到兴奋的最主要神经性化学物质，会影响大脑的短时记忆功能。研究表明，THC 是一种高度亲脂性分子，能够进入神经细胞的细胞膜脂质中，大麻中毒的机制主要就是因为 THC 所引起的细胞状态的变化和神经元信号的改变。之后的研究发现了大麻素受体的存在，但是当这些受体被首次发现时，并没有发现能够与这些受体结合的内源性分子的存在。因此早期研究认为，这些受体系统可能与过去大麻的使用有关，但是之后的研究发现，这些受体的功能并不是调节大麻在人体中的作用，而是要与大麻素结合。1968 年，Petwee 等最早开始对大麻素的作用机制进行研究，并于 20 世纪 90 年代提出大麻素受体的概念。至此，大麻素以及大麻素受体在人体正常生理功能中的作用便成为人们研究的的重点。目前的多项研究表明，大麻素及其受体构成了广泛的调节系统——大麻素系统，具有非常重要的生理学功能。

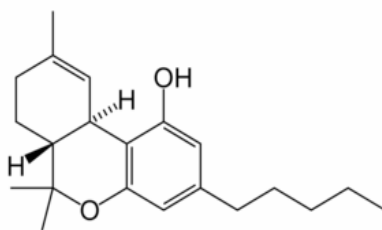


图 1.1 四氢大麻酚的化学结构

Fig.1.1 Chemical structure of THC

1.1.1 大麻素受体

目前研究已证实，人体中主要存在两种大麻素受体：CB1 受体（Cannabinoid Receptor 1）和 CB2 受体（Cannabinoid Receptor 2），这两种受体已分别于 1990 年和 1993 年在哺乳动物组织中被成功克隆出来。研究发现，这两种受体有 44% 的氨基酸序列同源，跨膜区氨基酸序列有 68% 的同源性，结构中都包含 7 次亲酯跨膜 α 螺旋结构。CB1 和 CB2 受体均属于 G 蛋白偶联受体，与相应的配体结合后活性增强，激活 G_i/o 蛋白，使腺苷环化酶活性降低，环磷酸腺苷（cAMP）生成减少，蛋白激酶 A（PKA）活性受到抑制，导致该酶靶蛋白（离子通道等）磷酸化受阻，进而发挥其生理学作用^[1]。此外，除了 CB1 和 CB2 受体，研究者们还观察到一些其它类型的大麻素受体，但至今未成功克隆出来，其活性作用和功能也不是很清楚。如 2007 年的研究证实一种新型大麻素受体——孤儿受体（Orphan Receptor）GRP55。此受体也为 G_i/o 型 G 蛋白偶联受体，与内源性大麻素 AEA 有较强亲和力^[2]，但 GRP55 的分布及其介导的生物活性仍不是很清楚。

CB1 受体包含 473 个氨基酸，主要位于脑、脊髓和外周神经系统中，又称中枢型大麻素受体。脑内 CB1 受体主要分布于基底神经节（黑质、苍白球、外侧纹状体）、海马 CA 锥体细胞层、小脑和大脑皮质。CB1 受体是大麻类物质产生神经、精神效应的物质基础，它的激活可以降低多巴胺、GABA 等神经递质的释放，来参与记忆、认知和运动控制的调节。外周神经系统比中枢神经系统表达的 CB1 受体量少，它们分散地表达于诸如神经末梢等处，介导神经递质的释放。CB2 受体包含 360 个氨基酸，主要分布在外周，如脾脏边缘区、免疫细胞、扁桃体、胸腺等与免疫调节有关的部位，又称外周型大麻素受体。在中

中枢神经系统中则主要分布在与免疫相关的细胞上，如小胶质细胞、脑干和和小脑的神经元细胞上。CB2 受体与调节免疫，抑制炎症关系密切，作用主要包括调节中枢神经系统内外的细胞因子释放和免疫细胞迁移^{[3][4]}。

1.1.2 内源性大麻素大麻素

大脑中一些被公认的内源性大麻素已被分离，包括 *N*-Arachidonoyl ethanolamide (Anandamide, AEA)、2-Arachidonoylglycerol (2-AG)、2-Arachidonoylglycerol ether (Noladin ether)、*N*-Arachidonoyldopamine (NADA) 和 Virodhamine。其他内源性大麻素类化合物包括相关的脂肪酸衍生物 Oleamide、*N*-Palmitoylethanolamide (PEA) 和一个新的 Arachidonoyl 氨基酸家族。这些物质缺少与大麻素受体的亲和力，但却能促进内源性大麻素的功能。到目前为止，AEA 和 2-AG 是研究最深入、功能最清楚的内源性大麻素。因此，这两种化合物在内源性大麻素研究中的地位是最重要的。

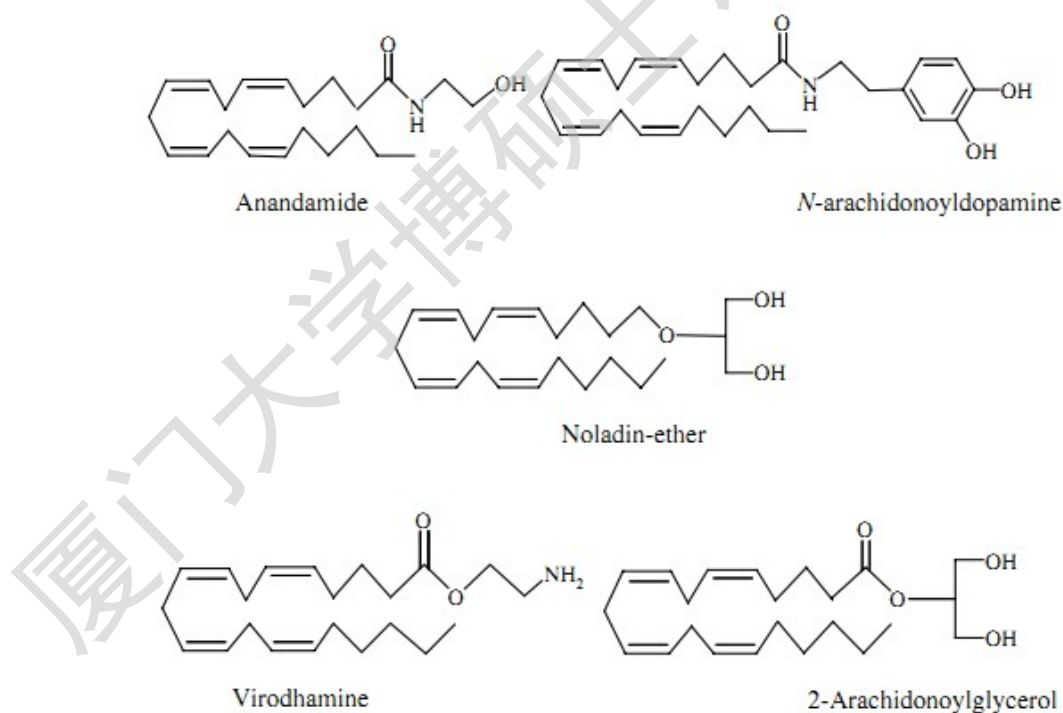


图 1.2 内源性大麻素的化学结构

Fig.1.2 Chemical structures of the proposed endocannabinoids

1992 年, Raphael 等首次从猪脑中提取出一种内源性大麻素样物质: *N*-花生四烯酸乙醇胺(*N*-Arachidonoyl ethanolamide, Anandamide, AEA)。Anandamide 取自梵语,意思是极乐(ananda)。AEA 为花生四烯酸衍生物,是一种多元不

饱和脂肪酸，同时它的代谢产物具有非常重要的生物活性。AEA 能够与大麻受体结合，对 CB1 受体的亲和力要大于 CB2 受体。AEA 与 THC 以及其他的大麻素在中枢神经系统和外周系统都具有相似的功能^[5]，这一点在啮齿类动物的行为学实验和与 THC 交叉耐药性实验结果中得到了证实。同时也有实验表明，AEA 也能够像 THC 那样在慢性和急性暴露之后呈现出小脑和海马区受体亲和力和数量增加的现象^[6]。因此证明，尽管 AEA 和 THC 在结构上有很大的不同，但是两者具有相似的作用机制。AEA 和 THC 对 CB2 受体的激动作用非常弱，于是研究者就假设肯定存在一种内源性大麻素，能够在外周组织中生成，并且能够选择性的激动 CB2 受体。最终研究者在犬科动物的肠道中发现了内源性大麻素 2-AG 的存在，之后在狗的脾脏和胰腺中也发现了 2-AG。这种花生四烯酸衍生物显示与 CB1 和 CB2 受体都能结合的特性，但是与 CB2 受体的亲和力要大于 CB1 受体。2-AG 能够影响小鼠的典型行为反应，影响 cAMP 水平^[7]，并且与 THC 在外周有类似的功能。此外，有研究发现 2-AG 也存在于大鼠的大脑，并且水平高于 AEA 100 倍以上，但是刺激后仅观察到 AEA 水平的增高，2-AG 并没有出现类似的反应^[8]。

1.1.3 内源性大麻素的主要合成和降解途径

内源性大麻素在脑和其他组织的基础水平较低，当需要时于局部合成与释放。当神经细胞受到外来刺激或生理性应急反应下，神经细胞膜上的磷脂（Phospholipid）分解产生 AEA 和 2-AG，然后降解排出体外。

AEA 的合成首先通过 Ca^{2+} 和 cAMP 依赖性机制，细胞膜上磷脂酰胆碱（Phosphatidylcholine, PC）向磷脂酰乙醇胺（Phosphatidylethanolamide, PE）转移首基，从而形成带有 *N*-arachidonoyl-基团的 PE (NAPE)，该过程在 *N*-酰基转移酶（*N*-acyltransferase, NAT）催化下完成。然后 NAPEs 被 NAPE-特异性磷脂酶（NAPE-phospholipase D, NAPE-PLD）^[9] 分解产生 AEA。不同于 AEA，2-AG 的合成首先是由磷酸酯酶 C（Phospholipase C, PLC）水解膜磷脂酰肌醇二磷酸（Phosphatidylinositol Bisphosphate）形成甘油二酯（Diacylglycerol, DAG），然后 DAG 经过 DAG-lipase^[10] 分解转化为 2-AG。

内源性大麻素的降解主要是由两个特殊的酶系统所完成的：脂肪酰胺水解酶（Fatty Acid Amide Hydrolase, FAAH）和单酰基甘油酯酶（Monoacylglycerol

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库