

大蒜皮中肉桂酰胺 *N-trans*-feruloyloctopamine 对老年痴呆大鼠模型的治疗作用

武燕¹, 刘健², 吴争荣^{3*} (1.甘肃中医药大学, 兰州 730030; 2.兰州大学第一附属医院, 兰州 730030; 3.兰州大学药学院, 兰州 730030)

摘要: 目的 研究大蒜皮中的肉桂酰胺类化合物 *N-trans*-feruloyloctopamine(FO)对老年痴呆模型大鼠的治疗作用。方法 采用 Meynert 基底核注射 A β_{1-40} 建立老年痴呆大鼠模型, 再给予 FO 进行灌胃后, 测定大鼠脑内乙酰胆碱(Ach)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)及乙酰胆碱酯酶(AchE)活性等指标, HE 染色后观察大鼠海马区神经细胞形态变化。结果 与模型组比较, 酪氨酸酶抑制剂 FO 组的 Ach, ChAT 和 AchE 均具有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$); 病理结果显示 FO 对 A β 引起的大鼠海马皮层神经元变性坏死症状明显改善。结论 FO 对大鼠 AD 模型具有较好防治作用。

关键词: *N-trans*-feruloyloctopamine; 大蒜皮; 酪氨酸酶; 老年痴呆

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)12-1437-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.006

Effect of *N-trans*-feruloyloctopamine from Garlic Skin on Alzheimer's Disease Model Rats

WU Yan¹, LIU Jian², WU Zhengrong^{3*} (1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 2. The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 3. School of Pharmaceutics, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of *N-trans*-feruloyloctopamine from garlic skin on Alzheimer's disease model rats. **METHODS** Adopted A β_{1-40} injected into meynert nuclei basales of rats to establish Alzheimer's disease model, then the compound was given by i.g. to the Alzheimer's disease model rats, the activities of acetylcholine, acetylcholine transferase and acetylcholinesterase of all samples were detected, the brain tissues were stained by HE staining, the ultrastructure images of the coronary slides in rat hippocampus were examined by electron microscope observation. **RESULTS** Compared with the model group, the related indexes had differences significantly in FO group ($P<0.05$, $P<0.01$). Pathology showed FO could protect neuron apoptosis caused by toxicity of A β . **CONCLUSION** FO has the good function to prevent and treat Alzheimer's disease on model rats.

KEY WORDS: *N-trans*-feruloyloctopamine; garlic skin; tyrosinase; Alzheimer's disease

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)是一种多发于老年人群的神经退行性疾病, 折磨着全球数百万的患者, 每年治疗及护理费用高达 1 400 亿美元^[1], 步入老年社会的中国, 面临着日益严峻的挑战^[2]。其发病机制的主要学说是淀粉样肽假说, 主要病理特征改变是皮质、海马等部位出现大量老年斑等^[3]。

酪氨酸酶是一种含铜的多酚氧化酶, 是生物体合成黑色素等而产生色斑的关键酶, 近年来文献研究表明, AD 的发生与酪氨酸酶直接相关, 很多酪氨酸酶抑制剂均表现出一定的抗 AD 作用^[4]。

笔者前期研究发现来自大蒜皮中的肉桂酰胺 *N-trans*-feruloyloctopamine(FO)对酪氨酸酶具有很强的抑制活性及低毒性^[5], 其结构式见图 1。因此

本研究拟通过在体大鼠 AD 模型, 研究 FO 对大鼠 AD 模型脑内乙酰胆碱(Ach)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)及乙酰胆碱酯酶(AchE)活性指标的影响, 探讨其抗 AD 的活性和机制, 为其更好地开发利用提供依据。

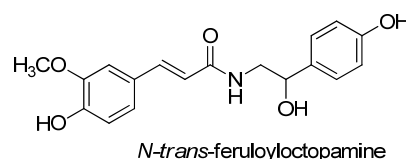


图 1 *N-trans*-feruloyloctopamine 的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of *N-trans*-feruloyloctopamine

1 材料与仪器

1.1 动物

SD 大鼠, ♂, 体质量 150~180 g, 由兰州大学

基金项目: 甘肃省科技计划项目(1506RJYA039)

作者简介: 武燕, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0931)8942208
(0931)8641185 E-mail: wuyan8188@163.com

E-mail: wuyanlcyx@163.com

*通信作者: 吴争荣, 男, 博士, 讲师 Tel:

实验动物中心提供，实验动物合格证号：SCXK(甘)2009-0004。

1.2 药剂与仪器

A β_{1-40} (美国 Biosource 公司); Ach、ChAT、AchE 及考马斯亮兰蛋白试剂盒购于南京建成生物制品研究所(批号: 20130812, 20130815, 20130815); 石杉碱甲(河南太龙药业股份有限公司, 批号: 20140105); Z-36HK 台式离心机(德国 Hermle); UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津); DK-98-1 型数显恒温水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂); BS-224-S 型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。FO 按照前期研究的方法合成制得^[5], HPLC 法分析其纯度>98.6。

2 方法

2.1 A β_{1-40} 孵育

A β_{1-40} 加入 0.1% 三氟乙酸后, 放入 38 °C 水浴恒温箱孵育 48 h, 使其成为凝聚状态备用。

2.2 AD 模型建立

将 48 只 SD 大鼠随机分为 6 组, 即空白对照组、阳性对照组(石杉碱甲 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、模型组、FO 高(120 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、低(80 mg·kg⁻¹·d⁻¹)剂量组后, 除空白组以外, 其余组按照文献描述的方法进行造模^[6-7], 并采用 Morris 水迷宫法检测, 选取各组造模成功的大鼠采用灌胃给药($n=6$), 给予相应剂量的药物进行干预, 连续 12 d 后, 处死大鼠, 在 4 °C 条件下取出大脑海马和皮质部位冻存, 用于测定相应的生化指标和病理学研究。

2.3 生化指标的测定

将冻存的海马和皮质组织分别用匀浆捣碎器处理后, 用生理盐水配成 10% 的匀浆, 按照试剂盒操作进行 Ach、ChAT、AchE 及考马斯亮兰蛋白测定。

2.4 病理学研究

大鼠断头处死后, 迅速取大脑海马和皮质组织, 福尔马林固定后, 取脑组织进行石蜡切片, HE 染色, 光镜下观察脑组织的病理变化。

2.5 统计学处理

数据用 SPSS 18.0 统计软件处理, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 受试动物的 Morris 水迷宫表现

6 组大鼠一共进行 6 次水迷宫训练, 平均逃避

潜伏期前 3 次下降明显, 从第 3 次开始平稳。模型组较空白对照组潜伏期明显延长($P<0.01$), 说明学习记忆能力下降。相对于模型组, FO 高剂量组和阳性对照组, 潜伏期有了一定程度的缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 1。

3.2 海马和皮质 Ach 活性的变化

由表 1 可知, 模型组 Ach 含量低于各对照组, 与空白对照组比较, 差别有显著性意义($P<0.01$)。FO 中、高剂量组和阳性对照组的 Ach 活性低于空白对照组, 但高于模型组, 且有显著性差异($P<0.01$), 说明 FO 能显著提高脑内 Ach 活性。

表 1 各组大鼠的潜伏期及海马和皮质中 Ach 含量的变化
Tab. 1 The latency period and Ach contents in hippocampus and cortex of each group

组别	n	给药量/ mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	潜伏期/s	Ach 海马/ μg·mL ⁻¹	Ach 皮质/ μg·mL ⁻¹
空白对照组	8	—	12.2±1.7	104.7±6.5	90.4±9.2
模型组	6	—	40.5±7.3 ¹⁾	43.2±12.4 ¹⁾	45.8±11.9 ¹⁾
阳性对照组	6	100	22.5±4.0 ³⁾	82.5±8.9 ³⁾	76.2±7.3 ³⁾
FO 低剂量组	6	80	34.2±5.6	54.2±10.3	60.6±4.2 ²⁾
FO 中剂量组	6	100	29.8±8.2	79.8±7.8 ³⁾	74.7±6.5 ³⁾
FO 高剂量组	6	120	25.8±5.5 ²⁾	85.8±8.6 ³⁾	84.2±9.4 ³⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.3 海马和皮质 AchE 和 ChAT 活性的变化

模型组 AchE 和 ChAT 活性低于其他各组, 与空白对照组比较, 差别均具有显著性意义($P<0.01$); FO 中、高剂量组和阳性对照组的 AchE 和 ChAT 活性明显高于模型组, 且具有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。说明了 FO 能显著提高 AD 大鼠脑内 AchE 和 ChAT 活性, 增强脑内胆碱能的代谢。结果见表 2。

3.4 脑组织的病理学变化

FO 高剂量组对 AD 大鼠模型效果显著, 选择该剂量组进行病理学研究。脑组织切片显示结果见图 2, 对照组海马和皮层神经细胞染色均一、结构完整, 细胞膜清晰。模型组海马可见明显散在的或连续的神经细胞变性坏死, 表现为胞浆深染、核固缩、胞膜核膜界限不清晰; FO 高剂量组相对于模型组, 对 A β 引起的大鼠海马皮层神经元变性坏死明显改善。

表 2 FO 对 AD 大鼠模型海马和皮质中 AchE 和 ChAT 活性的影响

Tab. 2 The AchE and ChAT activity in hippocampus and cortex of each group

组 别	n	给药量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	AchE _{海马} /IU·g ⁻¹	AchE _{皮质} /IU·g ⁻¹	ChAT _{海马} /μg·mg ⁻¹	ChAT _{皮质} /μg·mg ⁻¹
空白对照组	8	—	50.5±8.3	39.6±7.4	98.3±7.8	82.5±6.5
模型组	6	—	13.4±9.5 ¹⁾	15.3±8.7 ¹⁾	33.4±9.3 ¹⁾	35.3±6.7 ¹⁾
阳性对照组	6	100	44.3±7.9 ³⁾	31.2±6.1 ³⁾	70.5±8.2 ²⁾	68.2±8.4 ²⁾
FO 低剂量组	6	80	18.5±7.0	20.9±10.5	44.5±7.1	40.9±6.9
FO 中剂量组	6	100	38.5±8.5 ³⁾	25.3±8.0 ²⁾	58.3±9.4 ²⁾	43.7±7.5
FO 高剂量组	6	120	45.4±7.3 ³⁾	32.4±7.2 ³⁾	65.4±7.3 ²⁾	67.5±5.8 ²⁾

注：与空白对照组比较，¹⁾P<0.01；与模型组比较，²⁾P<0.05，³⁾P<0.01。

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.01; compared with model group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01.

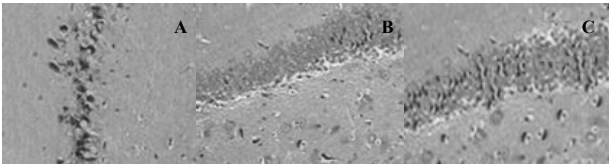


图 2 各组大鼠大脑组织 HE 染色结果(100×)

Fig. 2 HE staining of hippocampus neuronal tissue of rats in each group(100×)

4 讨论

Ach、ChAT、AchE 作为人类脑功能衰老研究的主要指标,也是探讨 AD 药物治疗机制的主要方面^[6]。AD 结果最为明确的是 Ach 和谷氨酸(Glu)的减少。前脑胆碱能神经元的退变以及皮质和海马 Ach 的减少也为 AD 的突出特征。Aβ 能促进神经元释放胆碱至细胞外,耗竭细胞内胆碱从而减少 Ach 等生化指标的合成。

本实验研究结果显示 FO 对大鼠 AD 模型具有一定的治疗作用,可明显提高 AD 模型大鼠脑内 Ach、ChAT 及 AchE 的活性,Aβ 致老年痴呆的产生的不良反应是一个不可逆转的发病过程,FO 及石杉碱甲可以减少 Aβ 毒性,从而防治 AD。病理学检查是评价治疗效果的一个比较客观的指标,研究结果进一步表明 FO 对大鼠 AD 模型的细胞超微结构有所好转,可改善或防止由 Aβ 引起的神经细胞亚显微结构的破坏作用。笔者前期研究发现 FO 具有很强的酪氨酸酶抑制活性和低毒性,可

以抑制黑色素的合成^[5],因此该研究进一步证明酪氨酸酶抑制活性和抗 AD 之间具有一定的相关性。

REFERENCES

- [1] CHAN K Y, WANG W, WU J J, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis [J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2016-2023.
- [2] AKIYAMA H, ARAI T, KONDO H, et al. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain [J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2000, 14(Suppl 1): 47-53.
- [3] WANG G, CHEN L, WU F, et al. Effect of trans-resveratrol on learning and memory abilities in Alzheimer's disease mice induced by Aβ25-35 [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(7): 785-790.
- [4] HAN P, QIU L, HUANG H, et al. The comparison of inhibition of ethanol extracts of leaves and sarcotesta from *Ginkgo biloba* on mushroom tyrosinase [J]. J Xiamen Univ(Nat Sci)(厦门大学学报: 自然科学版), 2005, 44(Sup): 116-119.
- [5] WU Y, WU Z R, CHEN P, et al. Effect of the tyrosinase inhibitor (S)-N-trans-feruloyloctopamine from garlic skin on tyrosinase gene expression and melanine accumulatin in melanoma cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(7): 1476-1478.
- [6] ZHOU L S, ZHU S X, WANG L S. Experimental study of Walnut kernel extracts on Ach, ChAT and AchE activities in Alzheimer's disease rats model [J]. Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志), 2011, 31(6): 446-449.
- [7] YANG R, WANG Q J. The effect of edaravone on learning and memory deficits and HNE expression of hippocampus for senile dementia disease model in rats [J]. Chin J Neuroanatomy(神经解剖学杂志), 2011, 27(5): 545-548.

收稿日期: 2015-07-02