

黄秋葵果实提取物抗阿尔茨海默病活性考察及其化学成分鉴定

谭亮¹, 贾静², 皮立¹, 马家麟¹, 冀恬¹, 王婷¹, 贺明珠¹, 任倩雯¹,
李玉林^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 青海 西宁 810001;
2. 山东省东营市工业产品检验与计量检定中心, 山东 东营 257091)

摘要: 目的 研究黄秋葵果实提取物抗阿尔茨海默病活性, 并对其活性部位的化学成分进行鉴定。方法 对小鼠侧脑室注射适量 $\text{A}\beta_{1-42}$ 建立阿尔茨海默病模型, 分为空白组, 假手术组, 模型组, 多奈哌齐组, 水提取物低、高剂量组, 石油醚层、二氯甲烷层、乙酸乙酯层、水层低、高剂量组, 每组 12 只, 采用 Y 迷宫和 Morris 水迷宫进行行为学实验, ELISA 法检测小鼠皮质和海马组织 SOD 活性和 MDA 水平。乙酸乙酯提取物采用硅胶、ODS、半制备 HPLC 进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物结构。结果 与空白组比较, 模型组小鼠自发交替反应率降低 ($P < 0.05$), 逃避潜伏期延长 ($P < 0.05, P < 0.01$), 寻找平台所在象限的时间缩短 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 乙酸乙酯层各剂量组小鼠自发交替反应率升高 ($P < 0.05$), 逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$), 寻找平台所在象限的时间延长 ($P < 0.05$), 脑内皮质和海马组织 SOD 活性升高 ($P < 0.01$), MDA 水平降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。从中分离得到 6 个化合物, 分别鉴定为香草酸 (1)、N-反式阿魏酸酰酷胺 (2)、N-反式对香豆酰酷胺 (3)、槲皮素 (4)、熊果酸 (5)、 β -谷甾醇 (6)。结论 黄秋葵果实乙酸乙酯提取物能改善 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的学习记忆功能障碍, 其作用机制可能与小鼠脑内氧化应激水平的降低有关。

关键词: 黄秋葵果实提取物; 阿尔茨海默病; 化学成分; 分离鉴定

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)07-2434-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.052

黄秋葵为锦葵科秋葵属一年生草本植物, 别名秋葵、羊角豆等^[1-2], 我国拥有 81 个种及 36 个变种, 分布于各地, 资源丰富^[3], 有护肤、健胃、保肝、强肾等功效^[4]。现代药理研究表明, 它具有抗疲劳、降血糖、降血脂、抗氧化、抗肿瘤、提高免疫力等作用^[5-8]。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 是一种不可逆的中枢神经退行性疾病, 是痴呆病中常见的类型, 临床表现为记忆能力减退、持续性认知能力下降、运动障碍及一系列精神病症状, 主要病变损害位于与记忆有关的海马等结构中, 病理特征是脑内神经元之间出现大量老年斑、神经原纤维缠结和神经元丢失^[9-10]。随着对阿尔茨海默病机制研究的不断深入, 从中药及其提取物中发现具有预防、治疗本病的活性成分正成为热点。目前, 对黄秋葵的研究集中在化学成分方面^[11-18], 而其抗阿尔茨海默病活性未见报道。

老年斑是阿尔茨海默病重要的病理基础和关键性指标, 其主要成分是 β -淀粉样蛋白 ($\text{A}\beta$)^[19], 包括 $\text{A}\beta_{1-40}$ 、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 、 $\text{A}\beta_{1-43}$, 病理学研究表明 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚体对神经细胞产

生的毒性作用较强, 更能促使 $\text{A}\beta$ 纤维聚集形成老年斑, 也更能模拟阿尔茨海默病的发展过程^[20]。本研究对小鼠侧脑室注射适量 $\text{A}\beta_{1-42}$ 建立阿尔茨海默病模型, 确定黄秋葵果实提取物抗阿尔茨海默病的活性部位及成分组成, 以期为其作用机制探讨提供方向。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 KM 小鼠 180 只, 雌雄各半, 5 周龄, 体质量 25~30 g, 购自兰州大学医学实验中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2018-0002, 实验动物使用许可证号 SYSK (甘) 2018-0002, 购买后保持环境清洁, 采用专用饲料喂养, 饮食饮水不限。动物手术均按照《实验动物护理和使用指南》进行, 经中国科学院西北高原生物研究所动物伦理与福利委员会批准 (伦理号 NWIPB20190025)。

1.2 药材 新鲜黄秋葵果实购自山东莱阳, 经中国科学院西北高原生物研究所高原生态学研究中心高庆波研究员鉴定为锦葵科秋葵属植物黄秋葵 *Abelmoschus esculentus* L. Moench 的成熟果实, 初步清洗后超声处理 20 min, 滤纸吸去多余水分, 去除两端并切成约 2 cm 厚的小段, 置于

收稿日期: 2023-08-28

基金项目: 青海省重点实验室建设专项项目 (2023-2024)

作者简介: 谭亮 (1984—), 男 (藏族), 硕士, 高级工程师, 从事中藏药及食品成分检测分析、质量标准建立、分析检测新技术和新方法开发研究。Tel: (0971) 6132750, E-mail: tanliang@ nwipb. cas. cn

* 通信作者: 李玉林 (1970—), 男, 博士, 研究员, 从事中藏药化学成分、药效药理、质量标准、新药开发研究。Tel: (0971) 6183048, E-mail: liyulin@ nwipb. cas. cn

60℃电热鼓风干燥箱中烘干，临用前粉碎，过60目筛，装入密封袋中密封，置于干燥器中保存。

1.3 试剂与药物 盐酸多奈哌齐片购自浙江万邦药业股份有限公司。淀粉样蛋白($\text{A}\beta_{1-42}$)(编号A9810)、二甲基亚砜(DMSO)(编号276855)均购自美国Sigma公司；微量丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA法，批号A003-2-2)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒(羟胺法，批号A001-1-2)均购自南京建成生物工程研究所有限公司。柱层析硅胶(100~200、200~300目)、柱层析用聚酰胺(60~90目)、聚酰胺薄膜、薄层层析硅胶GF₂₅₄、薄层层析硅胶G均购自青岛海洋化工有限公司；ODS柱层析材料购自德国Merck公司；RP-18反相高效薄层板购自上海安谱科学仪器有限公司；羧甲基纤维素钠(CMC-Na)购自国药集团化学试剂有限公司。95%乙醇、石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、正丁醇、甲醇、甲酸、六氟异丙醇(分析纯)均购自天津市百世化工有限公司；乙腈(色谱纯)购自山东禹王实业有限公司；水为超纯水。

1.4 仪器 脑立体定位仪(型号DB053)、Morris水迷宫视频分析系统(型号DB001)、Y迷宫刺激器(型号DB003)、小动物活动记录仪(型号DB-YLS-1C)均购自北京智鼠多宝生物科技有限责任公司；反相制备高效液相色谱仪(型号Shimadzu LC-8A)、紫外可见检测器(型号Shimadzu SPD-10A)、流分收集器(型号Shimadzu FRC-10A)均购自日本Shimadzu公司；核磁共振光谱仪(型号ARX-300)购自瑞士Bruker公司；真空干燥箱(型号DZF-6030A)购自上海一恒科学仪器有限公司；旋转蒸发仪(型号IKA RV8)、数显型分散机(型号IKA T25)均购自艾卡(广州)仪器设备有限公司；数显电热恒温水浴锅(型号HH-4)购自常州国华电器有限公司；电热鼓风干燥箱(型号101-1)购自北京科伟永兴仪器有限公司；离心机(型号TGL-16C)购自上海安亭科学仪器厂；恒温培养箱(型号SMI7-2)购自美国Shellab公司；超声波清洗器(型号KQ5200B)购自昆山市超声仪器有限公司；超纯水机(型号UPE-II-40L)购自上海优普实业有限公司。

2 方法

2.1 提取物制备 称取黄秋葵果实干燥粉末1kg，按料液比1:10用蒸馏水加热煮沸提取3次，每次2h，合并滤液，浓缩制得水总提物浸膏0.203kg；另称取10kg，按料液比1:10用95%乙醇于80℃加热回流提取3次，每次2h，合并滤液，减压浓缩至无醇味，制得醇总提物浸膏1.3kg，适量去离子水溶解，按料液比1:1依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯各萃取3次，剩余部分即为水层，减压浓缩后得到石油醚层提取物浸膏98g、二氯甲烷层提取物浸膏52g、乙酸乙酯层提取物浸膏20g、水层提取物浸膏178g。

2.2 溶液制备 将“2.1”项下各层浓缩浸膏用0.5%CMC-Na溶液溶解，水层、石油醚层、乙酸乙酯层提取物制成80、240mg/kg溶液，水提取物、二氯甲烷层提取物

制成50、150mg/kg溶液，置于4℃冰箱中冷藏。

2.3 寡聚肽 $\text{A}\beta_{1-42}$ 制备 精密称取1mg $\text{A}\beta_{1-42}$ ，溶于600 μL 六氟异丙醇中，迅速盖紧管盖，封口膜密封，超声溶解5min，摇床上200r/min室温振摇过夜，分装 $\text{A}\beta_{1-42}$ ，快速氮气吹干，在冷冻真空干燥器中干燥1h，温度不得高于-42℃。将1mg $\text{A}\beta_{1-42}$ 合成寡聚体溶于20 μL 无水DMSO中，充分溶解后加入420 μL 超纯水，混合均匀后置于4℃冰箱中冷藏，24h后转移到-20℃冰箱中冷冻保存。

2.4 动物实验

2.4.1 分组、造模与给药 168只小鼠适应性喂养7d后，随机分为空白组，假手术组，模型组，多奈哌齐组，水提取物低、高剂量组，石油醚层、二氯甲烷层、乙酸乙酯层、水层低、高剂量组，每组12只，4%水合氯醛麻醉，固定在小鼠脑立体定位仪上，除空白组与假手术组外其余各组小鼠侧脑室注射3 μL 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 3min(匀速)，留针3min以保证溶液充分弥散。在手术部位撒青霉素钠药粉防止感染，缝合头皮，造模后连续3d肌肉注射0.1mL40000U青霉素钠溶液，于相同位置给予假手术组小鼠侧脑室注射3 μL 生理盐水，术后处理方法同上。空白组、假手术组、模型组小鼠灌胃给予0.5%CMC-Na溶液，多奈哌齐组小鼠灌胃给予3mg/kg多奈哌齐溶液，水层、石油醚层、乙酸乙酯层高、低剂量组小鼠灌胃给予240、80mg/kg相应药物，二氯甲烷层、水提取物高、低剂量组小鼠灌胃给予150、50mg/kg相应药物，连续14d。在行为学实验的最后1天，将模型组、空白组、假手术组和乙酸乙酯层高、低剂量组的小鼠断头处死，取脑。

2.4.2 动物行为学实验

2.4.2.1 Y迷宫实验 Y迷宫由120°臂A、B、C组成，材料为内外表面均涂有黑色油漆的铁板，臂长40cm，高12cm，宽3cm，3个臂的一端交汇处为等边三角形，实验时在其底部铺一层新鲜垫料，且在每只小鼠实验结束后更换，并用70%乙醇消除上一只小鼠留下的气味。实验开始前，将小鼠于面向A臂一端放下，让其在迷宫中自由探索8min，记录进臂总次数(除尾部外身体全部进入臂内即为进臂1次)和进臂顺序，计算自发交替反应率^[21]，公式为自发交替反应率=[正确交替反应次数/(总次数-2)]×100%。

2.4.2.2 Morris水迷宫实验 Morris水迷宫由直径120cm、高度40cm的圆形水池，自动录像及分析系统组成，加水后再加入黑墨水以防止干扰，水温保持在22℃左右，水池四周用黑色布帘遮挡，并在布帘上悬挂不同的装饰物作为参照物。将水迷宫分为东南、东北、西南、西北4个象限，在某一象限中央处放置1个低于水平面1cm的黑色圆形平台，测试时将小鼠面向某象限的池壁放入水中，根据水迷宫视频跟踪系统记录小鼠找到并爬上平台所需时间，即逃避潜伏期，每只小鼠每天训练2次，连续5d进行上述定位航行实验，在前几次训练中如果超过60s，则引导小鼠到平台上停留10s。本实验设置最大逃避潜伏期为120s，

即如果小鼠在 120 s 内未找到平台, 逃避潜伏期均记为 120 s。在第 6 天定位航行试验后进行空间探索实验, 即撤去平台, 对角象限起始点任选一个入水点, 将小鼠面向池壁放入水中, 考察小鼠对原平台的记忆, 记录游泳轨迹和找到目标象限所需的游泳时间^[22]。

2.4.3 ELISA 法检测小鼠脑内皮质和海马组织 SOD 活性和 MDA 水平 水迷宫实验结束后, 小鼠脱颈处死, 置于冰台上, 立即取出全脑并分离皮质和海马组织, 预冷生理盐水冲洗表面血液, 滤纸擦干, 称定质量, 于-80 °C 冷冻保存, 称取适量, 加预冷生理盐水, 细胞分散机快速研磨, 制成 10% 组织匀浆, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 取组织上

清液, 严格按照相关试剂盒说明书操作, 检测 SOD 活性和 MDA 水平。

2.4.4 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析和 Student's *t* 检验, 2 组间比较采用 LSD 检验; 若方差不齐, 2 组间比较采用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.5 提取与分离 取乙酸乙酯层提取物浸膏 20 g, 用甲醇-二氯甲烷 (1:1) 溶解, 再用 100~200 目硅胶拌样, 反复操作至无颗粒状态, 经 200~300 目硅胶分离, 以氯仿-甲醇系统为洗脱剂, 具体流程见图 1, 共得到 6 个化合物。

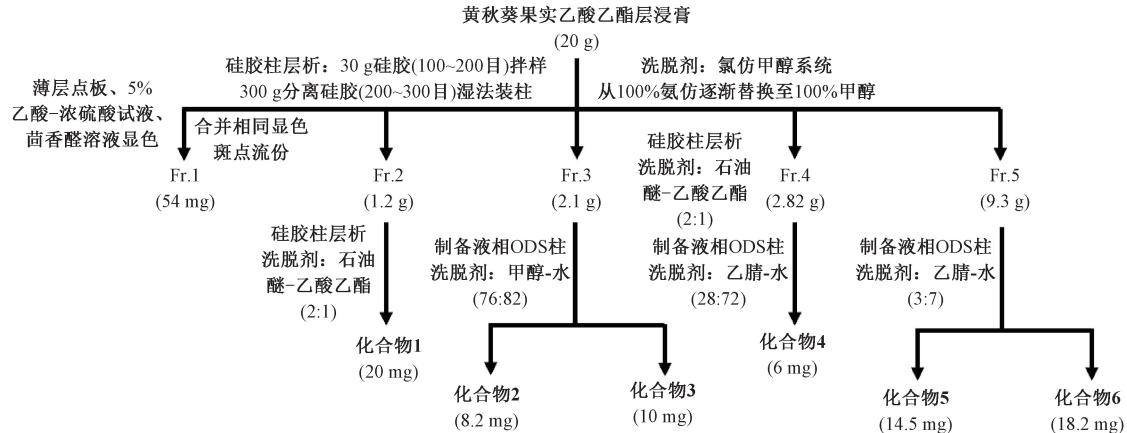
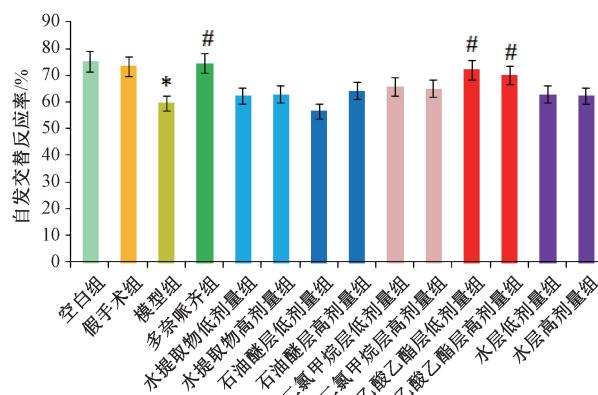


图 1 黄秋葵果实乙酸乙酯层提取分离流程

3 结果

3.1 黄秋葵果实提取物对小鼠学习记忆的影响 与空白组比较, 模型组小鼠自发交替反应率降低 ($P < 0.05$), 表明侧脑室注射 $\text{A}\beta_{1-42}$ 对小鼠的短时记忆造成损伤; 与模型组比较, 乙酸乙酯层高、低剂量组和多奈哌齐组小鼠自发交替反应率升高 ($P < 0.05$), 表明乙酸乙酯层提取物和多奈哌齐能缓解侧脑室注射 $\text{A}\beta_{1-42}$ 对小鼠造成的短时记忆损伤, 见图 2。



注: 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 黄秋葵果实提取物对记忆损伤小鼠 Y 迷宫实验中自发交替反应率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

3.2 黄秋葵果实提取物对小鼠行为学实验的影响 与空白

组比较, 模型组小鼠从第 2 天开始逃避潜伏期延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明侧脑室注射 $\text{A}\beta_{1-42}$ 对小鼠造成了定位航行的记忆损伤, 而假手术组小鼠逃避潜伏期无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明手术并未对小鼠定位航行认知功能造成损伤; 与模型组比较, 石油醚层高剂量组小鼠从第 4 天开始逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$), 二氯甲烷层高、低剂量组小鼠从第 2 天开始逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 乙酸乙酯层低剂量组从第 2 天开始逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 乙酸乙酯层高剂量组从第 3 天开始逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 1。

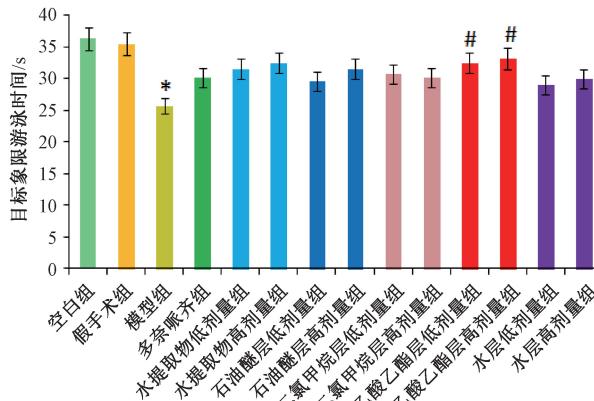
与空白组比较, 模型组小鼠寻找平台所在象限的时间缩短 ($P < 0.05$), 表明侧脑室注射 $\text{A}\beta_{1-42}$ 对小鼠造成了空间探索过程的记忆损伤; 与模型组比较, 乙酸乙酯层高、低剂量组小鼠在平台所在象限的时间延长 ($P < 0.05$), 表明乙酸乙酯层提取物能缓解和修复侧脑室注射 $\text{A}\beta_{1-42}$ 对小鼠造成的空间探索过程的记忆损伤, 见图 3。

3.3 黄秋葵果实乙酸乙酯层提取物对小鼠脑内皮质和海马组织 SOD 活性和 MDA 水平的影响 与空白组比较, 模型组小鼠脑内皮质和海马组织 SOD 活性降低 ($P < 0.01$), MDA 水平升高 ($P < 0.01$), 这可能是由于侧脑室注射 $\text{A}\beta_{1-42}$ 造成小鼠自由基清除失衡, 并同时加重了 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的神经毒性作用; 与模型组比较, 乙酸乙酯层各剂量组小鼠脑内皮质和海马组织 SOD 活性升高 ($P < 0.01$), MDA 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 这可能是由于黄秋葵果实乙酸乙

表1 黄秋葵果实提取物对小鼠逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	逃避潜伏时间/s				
	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
空白组	80.78±4.55	57.98±3.52	40.40±2.61	30.32±2.18	15.14±1.39
假手术组	79.57±2.80	57.17±2.67	41.17±4.23	30.08±2.41	15.20±1.22
模型组	80.64±3.30	66.28±4.19 [*]	55.27±4.63 ^{**}	44.95±3.80 ^{**}	39.73±3.14 ^{**}
多奈哌齐组	79.21±4.42	58.15±4.04 [#]	49.62±2.82 [#]	25.57±1.85 ^{##}	13.41±1.06 ^{##}
水提取物低剂量组	78.40±4.66	67.59±3.88	66.33±4.70	43.32±2.86	23.50±2.20 ^{##}
水提取物高剂量组	81.38±6.55	65.45±2.75	64.35±5.55	42.40±3.17	33.26±2.73
石油醚层低剂量组	80.27±4.33	66.88±5.31	56.11±5.02	46.68±4.05	34.61±2.53
石油醚层高剂量组	79.81±5.01	67.44±4.72	58.29±3.29	39.09±3.10 ^{##}	30.48±2.18 ^{##}
二氯甲烷层低剂量组	80.42±3.68	57.73±3.56 [#]	60.05±4.44 [#]	38.83±2.46 ^{##}	32.02±2.30
二氯甲烷层高剂量组	79.85±6.30	57.69±4.12 [#]	47.70±2.76 [#]	40.41±3.24	27.98±2.36 ^{##}
乙酸乙酯层低剂量组	78.34±2.96	57.92±3.69 ^{##}	45.12±3.32 [#]	23.84±2.16 ^{##}	14.63±1.14 ^{##}
乙酸乙酯层高剂量组	80.15±4.22	60.36±4.51	47.91±3.51 [#]	25.72±2.28 ^{##}	16.74±1.32 ^{##}
水层低剂量组	79.06±4.60	68.13±4.85	56.23±5.25	49.10±3.57	38.57±2.66
水层高剂量组	79.93±5.86	67.28±5.34	54.22±4.87	45.31±3.26	37.70±2.75

注: 与空白组比较, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01; 与模型组比较, [#]P<0.05, ^{##}P<0.01。



注: 与空白组比较, ^{*}P<0.05; 与模型组比较, [#]P<0.05。

图3 黄秋葵果实提取物对记忆损伤小鼠在 Morris 水迷宫实验中目标象限游泳时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=12)

表2 黄秋葵果实乙酸乙酯层提取物对小鼠脑内皮质和海马组织 SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	海马组织		皮质组织	
	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
空白组	13.41±1.12	0.95±0.08	23.21±1.57	0.59±0.07
模型组	11.62±1.05 ^{**}	1.65±0.11 ^{**}	19.47±1.62 ^{**}	0.76±0.08 ^{**}
乙酸乙酯层低剂量组	15.26±0.86 ^{##}	0.98±0.10 ^{##}	24.13±1.67 ^{##}	0.54±0.07 ^{##}
乙酸乙酯层高剂量组	13.73±0.94 ^{##}	1.09±0.08 ^{##}	15.86±1.33 ^{##}	0.63±0.06 [#]

注: 与空白组比较, ^{**}P<0.01; 与模型组比较, [#]P<0.05, ^{##}P<0.01。

(DMSO-*d*₆, 600 MHz), 显示有7个苯环质子信号 [δ : 7.36 (1H, d, *J*=15.4 Hz, H-7), 7.11 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 7.01 (2H, d, *J*=8.5 Hz, H-2', 6'), 6.98 (1H, dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, H-6), 6.79 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 6.68 (2H, d, *J*=8.5 Hz, H-3', 5'), 6.36 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8)], 其中 δ : 7.36 (1H, d, *J*=15.4 Hz, H-7) 和 6.36 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8) 为2个反式烯基质子信号; δ : 3.82 (3H, s, 3-OCH₃) 和 3.37

(2H, t, *J*=7.4 Hz, H-7') 和 2.64 (2H, t, *J*=7.4 Hz, H-8') 为2个亚甲基质子信号, 还有1个活泼质子信号 δ : 7.99 (1H, brs); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) 给出18个碳信号, 15个sp²杂化碳信号, 其中 δ : 165.8 (9-C=O), 156.1 (4'-OH)、148.7 (3-CH₃O) 和 148.3 (4-OH) 为3个连氧芳香碳信号, 56.0 (3-OCH₃), 41.1 (C-1') 和 34.9 (C-2') 为2个亚甲基碳信号, 139.3 (C-7) 和 119.5 (C-8) 为2个反式烯基碳信号, 126.9 (C-1), 111.2 (C-

2), 116.1 (C-5), 122.0 (C-6), 123.0 (C-1'), 156.1 (4'-OH), 115.6 (C-3', 5'), 129.9 (C-2', 6')。以上数据与文献[24-25]报道基本一致, 故鉴定为N-反式阿魏酸酰酷胺。

化合物3: 淡黄色固体, ESI-MS m/z : 282.2 [M-H]⁻。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 7.37 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2'), 6.78 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3) 为苯环上AA'BB'偶合的氢信号; 7.01 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-6), 6.67 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-5) 为另一个苯环上AA'BB'偶合的氢信号; 7.30 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-7), 6.39 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8) 为反式双键的氢信号; 9.84 (1H, s, -OH) 和 9.18 (1H, s, -OH) 为2个酚羟基的氢信号; 8.00 (1H, t, *J*=5.6 Hz, -NH) 为酰胺基的氢信号; 3.34 (2H, m, H-8') 和 2.64 (2H, t, *J*=7.4 Hz, H-7') 为与酰胺基相连2个亚甲基相互偶合的氢信号;¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ : 165.3 (9-C=O), 158.8 (C-4), 155.6 (C-4'), 138.5 (C-7), 129.5 (C-1'), 129.5 (C-2, 6), 129.2 (C-2', 6'), 125.9 (C-1), 118.7 (C-8), 115.7 (C-3, 5), 115.1 (C-3', 5'), 40.7 (C-8'), 34.4 (C-7')。以上数据与文献[26]报道基本一致, 故鉴定为N-反式对香豆酰酷胺。

化合物4: 黄色针状结晶, ESI-MS m/z : 303.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz), 存在1组ABX偶合系统和1组间位偶合系统, δ : 12.48 (1H, s, -OH) 为黄酮C-5位上的活泼质子信号, 而无C-3位的质子信号, 据此推测该化合物可能为黄酮醇类化合物。 δ : 7.67 (1H, s, H-2'), 7.54 (1H, d, *J*=8.09 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, *J*=8.12 Hz, H-5') 为B环上未完全裂分的ABX偶合系统, 6.40 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, s, H-6) 为A环上未裂分的间位偶合系统;¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 175.9 (C-4), 145.1 (C-2), 135.8 (C-3) 为C环上的特征碳信号, 164.0 (C-7), 160.7 (C-5), 156.2 (C-9) 是A环上的间三氧取代的碳信号, 148.2 (C-4'), 145.7 (C-3') 为B环上氧取代的碳信号。以上数据与文献[27]报道基本一致, 故鉴定为槲皮素。

化合物5: 黄绿色固体, ESI-MS m/z : 455.5 [M-H]⁻。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz), 在高场区有5个尖锐的甲基峰为与季碳相连的甲基质子信号, 且与叔碳连接的甲基碳有裂分, δ : 11.95 (1H, s, -COOH), 2.10 (1H, d) 是C-18位特征质子信号, 5.12 (1H, brs, H-12), 4.31 (1H, d, *J*=5.28 Hz, H-3), 2.98 (1H, m, H-3 α), 2.10 (1H, d, *J*=11.28 Hz, H-18), 1.45 (3H, s, H-27), 1.04 (3H, s, H-26), 0.86 (3H, s, H-30), 0.74 (3H, s, H-23), 0.67 (3H, s, H-24), 0.91 (3H, d, *J*=7.95 Hz, H-29), 0.80 (3H, d, *J*=6.20 Hz, H-25);¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 39.2 (C-1), 27.0 (C-2), 79.2 (C-3), 39.2 (C-4), 55.8 (C-5), 18.7 (C-6), 33.5 (C-7), 39.7 (C-8), 47.9 (C-9), 7.3 (C-10), 17.2 (C-2438

11), 125.9 (C-12), 138.6 (C-13), 42.3 (C-14), 28.4 (C-15), 24.6 (C-16), 48.3 (C-17), 53.3 (C-18), 39.5 (C-19), 39.1 (C-20), 31.1 (C-21), 37.0 (C-22), 28.2 (C-23), 15.7 (C-24), 15.9 (C-25), 27.1 (C-26), 23.7 (C-27), 23.8 (C-29), 21.3 (C-30)。以上数据与文献[28]报道基本一致, 故鉴定为熊果酸。

化合物6: 无色透明针状结晶(甲醇), ESI-MS m/z : 415.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz), 显示有典型的6个甲基单峰质子信号 [δ : 1.12 (3H, s), 1.04 (3H, m), 1.02 (3H, m), 0.94 (3H, m), 0.85 (3H, m), 0.71 (3H, s)], 3.92 (1H, m, H-3) 为连氧次甲基质子信号, 5.49 (1H, m, H-6) 为烯氢质子信号;¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 11.9 (C-18), 19.5 (C-19), 18.7 (C-21), 19.9 (C-26), 19.1 (C-27), 12.0 (C-29) 为6个甲基特征碳信号, 71.8 (C-3) 为连有-OH特征碳信号, 140.7 (C-5) 和 121.6 (C-6) 为2个特征烯碳信号。以上数据与文献[29]报道基本一致, 故鉴定为 β -谷甾醇。

4 讨论

阿尔茨海默病患者数逐年增加, 引起了世界各国政府和医学界的普遍关注。在阿尔茨海默病发病机制中, 有关氧化应激损伤与自由基毒性已成为人们研究的热点。现在普遍认为, 氧化应激参与了阿尔茨海默病的形成过程, 是其形成的一个重要因素, 然而其具体发病机制仍不明确, 目前主流学说为A β 学说和tau学说^[30], A β 学说被广泛接受, 认为老年斑的主要成分是A β 在特定脑区内聚集形成的, 能诱导神经元的毒性, 最终导致突触损伤, 神经元凋亡; tau学说中异常磷酸化tau蛋白(Ptau)与微管蛋白竞争结合正常tau, 抑制微管聚集, 导致正常情况下其具有的稳定微管和促进微管蛋白聚合成微管的作用丧失, Ptau则自身聚集成NFT结构, Ptau与微管竞争结合tau蛋白, 导致tau蛋白从微管上面解离出来, 微管的功能发生紊乱, 最终导致神经细胞凋亡。另外, 氧化应激会影响神经突触的发生进而影响到学习记忆功能, 有研究发现A β 沉淀与自由基有很大关系。

本研究基于对黄秋葵抗氧化活性的相关研究^[15,31-32], 对其果实提取物抗阿尔茨海默病活性进行了筛选。Y迷宫实验表明, 侧脑室注射A β ₁₋₄₂对小鼠的短时记忆造成了损伤, 乙酸乙酯层提取物能缓解侧脑室注射A β ₁₋₄₂对小鼠造成的短时记忆损伤。Morris水迷宫定位航行试验表明, 侧脑室注射A β ₁₋₄₂对小鼠造成定位航行的记忆损伤, 乙酸乙酯层低剂量组效果比二氯甲烷层更稳定。Morris水迷宫空间探索实验表明, 侧脑室注射A β ₁₋₄₂小鼠造成空间探索过程的记忆损伤, 而乙酸乙酯层提取物能缓解和修复损伤。

ELISA法检测结果表明, 黄秋葵果实乙酸乙酯层提取物能增加小鼠脑皮质和海马组织SOD活性, 降低MDA水平, 表明它具有抗阿尔茨海默病的活性, 通过调节皮质和海马组织中的氧化应激水平、清除自由基进而减弱侧脑室

注射 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的脑细胞功能障碍造成记忆损伤。氧化应激是机体内产生和清除自由基失衡所致，也是与衰老退行性疾病相关的病理生理基础。本实验发现，模型组小鼠脑内皮质和海马组织 SOD 活性降低，MDA 水平升高，可能是自由基清除失衡所致，同时加重了 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的神经毒性作用。

N-反式阿魏酸酰酷胺是由阿魏酸的羧基与酪胺的氨基脱去一分子水形成酰胺键（肽键）而形成，而阿魏酸抗阿尔茨海默病已有报道^[33-34]，故黄秋葵果实乙酸乙酯层提取物能改善 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导小鼠的学习记忆功能障碍，降低脑内氧化应激水平，升高脑内营养因子水平，对神经纤维有一定的保护作用，可能与其含有 *N*-反式阿魏酸酰酷胺有关。但由于神经系统疾病病理机制较为复杂，故 *N*-反式阿魏酸酰酷胺对阿尔茨海默病的改善作用仍需进一步研究。

参考文献：

- [1] 薛志忠, 刘思雨, 杨雅华. 黄秋葵的应用价值与开发利用研究进展[J]. 保鲜与加工, 2013, 13(2): 58-60.
- [2] 韩菊兰, 李臻, 胡韬, 等. 黄秋葵的功能特性及综合应用[J]. 现代农业科技, 2013(3): 105-106.
- [3] 云南省植物研究所. 云南植物志(第二卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 182.
- [4] 董彩文, 梁少华. 黄秋葵的功能特性及综合开发利用[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(5): 180-182.
- [5] 陈艳珍, 宋新华. 黄秋葵粉对衰老小鼠抗疲劳和免疫功能的影响[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(10): 170-172.
- [6] Lu Y Y, Demleitner M F, Song L X, et al. Oligomeric proanthocyanidins are the active compounds in *Abelmoschus esculentus* Moench for its α -amylase and α -glucosidase inhibition activity[J]. *J Funct Foods*, 2016, 20: 463-471.
- [7] 陈艳珍, 宋新华. 黄秋葵果实粉对衰老模型小鼠抗氧化能力的影响[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(15): 19-21.
- [8] 任丹丹, 陈谷. 黄秋葵多糖组分对人体肿瘤细胞增殖的抑制作用[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 353-356.
- [9] Mattson M P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2004, 430(7000): 631-639.
- [10] 毛剑琴, 张誉丹, 曾楚华, 等. 固本健脑液对阿尔茨海默病大鼠学习记忆及睡眠时相的影响[J]. 世界中医药, 2022, 17(24): 3491-3495; 3500.
- [11] 石金敏, 李震, 敬林林, 等. 黄秋葵氯仿部位化学成分研究[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(12): 987-990.
- [12] 徐寅鹏, 石金敏, 郭明明, 等. 黄秋葵乙酸乙酯部位化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(1): 56-59.
- [13] 贾陆, 李东, 敬林林, 等. 黄秋葵石油醚部位化学成分研究[J]. 中药材, 2010, 33(8): 1262-1265.
- [14] 高尚, 高玲, 张如莲. 黄秋葵营养与功能成分研究进展[J]. 中国热带农业, 2015(2): 46-49.
- [15] 郑忠培. 黄秋葵的化学成分及抗氧化活性研究[J]. 科技传播, 2016, 8(5): 138-139.
- [16] 温春秀, 贾东升, 谢晓亮, 等. 黄秋葵提取物的抗疲劳活性研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(23): 164-166.
- [17] 廖争争, 胡立汶, 刘爱敬, 等. 黄秋葵镇静催眠活性部位的筛选研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(10): 790-793.
- [18] 胡日查. 黄秋葵多糖分离、纯化及其免疫调节活性研究[D]. 海口: 海南大学, 2015.
- [19] Riemenschneider M, Schmolke M, Lautenschlager N, et al. Cerebrospinal beta-amyloid₁₋₄₂ in early Alzheimer's disease: association with apolipoprotein E genotype and cognitive decline [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 284(1-2): 85-88.
- [20] 郑衍芳, 宋志语, 吕文昌, 等. $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚体与阿尔茨海默病研究综述[J]. 局解手术学杂志, 2016, 25(2): 142-144.
- [21] Kim D H, Jeon S J, Son K H, et al. The ameliorating effect of oroxylin A on scopolamine-induced memory impairment in mice [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2007, 87(4): 536-546.
- [22] Mutlu O, Akar F, Celikyurt I K, et al. 7-NI and ODDQ disturbs memory in the elevated plus maze, morris water maze, and radial arm maze tests in mice[J]. *Drug Target Insights*, 2015, 9(1): 1-8.
- [23] 任冰如. 乌蕨(*Stenoloma chusanum*)化学成分研究及其资源利用评价[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [24] King R R, Calhoun L A. Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(20): 2468-2473.
- [25] Li W J, Cheng X L, Liu J, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of *Liriope muscari*[J]. *Molecules*, 2012, 17(2): 1797-1808.
- [26] 李勇军, 何迅, 刘志宝, 等. 茜草花水溶性化学成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 14-15.
- [27] 翟广玉, 朱玮, 巩文涛, 等. 槲皮素的光谱分析[J]. 光谱实验室, 2012, 29(4): 2443-2449.
- [28] 廖晓峰, 陈正行, 于荣. 桔子中三萜酸的提取及结构鉴定[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(4): 110-112.
- [29] 马玉翠, 吴晓毅, 王尉, 等. β -谷甾醇标准样品的研制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 90-95.
- [30] Masters C L, Simms G, Weinman N A, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(12): 4245-4249.
- [31] 李孟秋, 翟俊乐, 田欢, 等. 黄秋葵提取物体外抗氧化活性的研究[J]. 中国食品添加剂, 2015(10): 65-69.
- [32] 王华. 黄秋葵水提物的组分及体外抗氧化活性分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(7): 198-201.
- [33] 王玥, 王旭, 于嵩, 等. 阿魏酸对阿尔茨海默病转基因小鼠脑内氧化应激和凋亡相关蛋白的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(5): 762-766.
- [34] 洪倩, 马增春. 阿魏酸治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 军事医学, 2019, 43(3): 230-235.