



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101721396 A

(43) 申请公布日 2010.06.09

(21) 申请号 200910154160.0

(22) 申请日 2009.11.09

(71) 申请人 温州医学院

地址 325035 浙江省温州市温州茶山高教园
区温州医学院

(72) 发明人 徐英 潘建春 李高文 李善
尤文挺

(74) 专利代理机构 温州新瓯专利事务所 33210
代理人 陈旭宇

(51) Int. Cl.

A61K 31/05(2006.01)

A61P 25/24(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

白藜芦醇用于制备治疗抑郁症药物的用途

(57) 摘要

本发明涉及白藜芦醇用于制备治疗抑郁症药物的用途,经过动物实验证明白藜芦醇具有较好的抗抑郁作用,是一种较有发展前途的天然抗抑郁剂,可用于制备治疗抑郁症的药物。

1. 白藜芦醇用于制备治疗抑郁症药物的用途。

白藜芦醇用于制备治疗抑郁症药物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及白藜芦醇的一种新用途,特别是涉及白藜芦醇用于制备治疗抑郁症药物的用途。

背景技术

[0002] 抑郁症是一种中枢神经系统致残性疾病,随着社会现代化进程的加快,各种应激因素导致的抑郁症已成为现代社会的常见病和多发病。目前全世界约有 3% -5% 的人罹患抑郁症,位居致残性疾病的首位。发病率高且难以根治的抑郁症正悄悄地构建可观的抗抑郁药市场,这正是近年来国内外对中枢神经系统药物的研究和开发特别活跃的主要原因之一。所以,研究和开发新型、高效、低毒副作用的抗抑郁药始终是精神药理学领域的一个重要研究课题。由于抑郁症的病因复杂,涉及到交感神经、内分泌和免疫系统等机体多个方面。“单胺假说”是抑郁症机制研究的主流观点,认为单胺类神经递质(5-羟色胺、去甲肾上腺素和多巴胺神经递质)在抑郁症的病因、病理中起关键作用。目前临床上使用的抗抑郁药一般是通过影响单胺递质的重吸收、抑制单胺的代谢或阻断突触前抑制性自主或非自主受体而发挥作用。药物大致可分成三类:1. 单胺重摄取抑制剂;2. 单胺氧化酶抑制剂;3. 5-HT 受体拮抗剂。由于临床上使用的这些药物大约只对 65% 的病人起效,而且许多药物疗效并不稳定,毒副作用较大,生物利用度不高,一般要在 2-4 周起效。因此,从天然植物中开发安全有效、毒副作用小,生物利用度高的天然抗抑郁药成为这一领域的研究方向。白藜芦醇(Resveratrol)是一种多酚类物质,其化学式为 3,5,4'-三羟基二苯乙烯(3,5,4'-trihydroxysitlbene),广泛存在于天然植物中,尤其在葡萄科植物果皮中含量最高。白藜芦醇为脂溶性物质,易通过血脑屏障。研究表明,白藜芦醇具有抗氧化、免疫调节、抗衰老及预防神经退行性疾病等作用,目前尚未见将白藜芦醇用于治疗抑郁症的研究报道。

发明内容

[0003] 本发明的目的提供白藜芦醇的一种新用途。

[0004] 经过动物实验发现白藜芦醇具有较好的抗抑郁作用,是一种较有发展前途的天然抗抑郁剂,可用于制备治疗抑郁症的药物。

具体实施方式

[0005] 以下通过实施例说明本发明。

[0006] 实施例 1:小鼠悬尾实验,强迫游泳实验,自主活动实验

[0007] 1、受试药物

[0008] 名称:白藜芦醇(Resveratrol)

[0009] 性状:类白色精细粉末,气特殊,味淡,从虎杖中提取

[0010] 来源:购自陕西森佛生物技术有限公司,纯度为 98%

[0011] 药物的配置:用 0.5% 浓度的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶解白藜芦醇,分别配成

10mg/kg, 20mg/kg, 40mg/kg 和 80mg/kg 四个剂量, 按 0.1ml/10g 剂量给予小鼠灌胃口服。

[0012] 2、对照药物

[0013] 盐酸丙咪嗪 (Imipramine): 购自美国 Sigma 公司, 临用前用双蒸水配置成 10mg/kg 浓度, 按上述规格给予小鼠腹腔注射。

[0014] 3、动物及分组

[0015] ICR 雄性小鼠, 体重 20-24g。温州医学院实验动物中心提供。

[0016] 动物随机分为 6 组, 正常对照组, 白藜芦醇 10mg/kg, 20mg/kg, 40mg/kg 和 80mg/kg 四个剂量组以及阳性对照药丙咪嗪组, 每组动物 12 只。

[0017] 4、实验方法

[0018] ① 小鼠悬尾实验: 按照文献 (SteruL, ChermatR, ThierryB, etal. Thetail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. Psychopharmacol, 1985, 85 :367.) 进行, 给药后 60min (白藜芦醇 i. g.) 或者 30min (丙咪嗪, i. p.), 在距小鼠尾尖部末梢约 2cm 的部位用胶布固定于铁架台上, 使小鼠头向下悬挂, 倒挂于箱子 (30cm×30cm×25cm) 中, 头部距离箱底 15cm。开始时, 小鼠头部上下左右活动, 企图找到攀抓的地方, 一段时间后因失望而活动次数减少, 即出现间断性不动。观察 6min 内实验动物行为, 并记录后 4min 内小鼠的不动时间。

[0019] ② 小鼠强迫游泳实验: 按照文献 (Porsolt, RD, Bertin, A, JalfreM, etal. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977, 229 :327.) 进行, 正式测试前 24h, 将小鼠置于水深 10cm 的玻璃大烧杯 (1500ml) 中, 水温 (24±1)℃, 作游泳训练 15min。给药后 60min (白藜芦醇, i. g.) 或者 30min (丙咪嗪, i. p.), 再次将小鼠置于水深 10cm 的玻璃大烧杯内强迫游泳 6min, 观察记录后 4min 内小鼠的不动时间。小鼠放入水中后即游泳, 寻找栖息的地方, 一段时间后便因失望而漂浮不动, 当小鼠停止挣扎, 浮在水中保持不动, 或仅作一些必要的轻微动作保持头部浮在水面上的时间视为不动时间。

[0020] ③ 小鼠自发活动实验: 按照文献 (Li J X, Zhang Q, Liang J H, etal. Valproate prevents the induction, but not the expression of morphine sensitization in mice [J]. Behav Brain Res, 2004, 52 :251.) 进行, 给药后 60min (白藜芦醇, i. g.) 或者 30min (丙咪嗪, i. p.) 后将小鼠放入自主活动测试仪的小室内, 由内置的摄像头拍摄记录小鼠活动。小鼠适应环境 10min 后, 记录 10min 内小鼠的活动次数作为自主活动的评价指标。

[0021] 5、数据统计处理

[0022] 结果数据用均数 ± 标准差表示, 用 SPSS11.0 统计软件, 选用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间差异比较用 Dunnett's test 检验。

[0023] 6、结果统计

[0024] ① 小鼠悬尾实验结果:

组别	剂量 (mg/kg)	第一天悬尾不动时间 (s)
正常组		157.3±34.7
[0025] 白藜芦醇组	10	154.9±36.2
	20	137.5±58.2
	40	116.0±26.7*
	80	104.9±34.5*
丙咪嗪组	10	103.0±21.2*
氟西汀组	10	102.9±39.1*

[0026] 注:与正常组相比,*P < 0.05,**P < 0.01

[0027] ②小鼠强迫游泳实验结果:

组别	剂量 (mg/kg)	第一天游泳不动时间 (s)
正常组		121.4±28.2
[0028] 白藜芦醇组	10	96.9±24.0
	20	75.7±28.7*
	40	71.0±50.0**
	80	60.9±38.8***
丙咪嗪组	10	52.3±12.6***
氟西汀组	10	59.7±16.4**

[0029] 注:与正常组相比,*P < 0.05,**P < 0.01,***P < 0.001

[0030] ③小鼠自发活动实验结果:

组别	剂量 (mg/kg)	第一天自主活动格数 (每格 8cm)
正常组		119.2±13.2
[0031] 白藜芦醇组	10	114.5±12.4
	20	113.2±13.2
	40	113.7±14.2
	80	112.0±12.6
丙咪嗪组	10	112.8±7.2
氟西汀组	10	118.9±20.6

[0032] 实施例 2:小鼠单胺氧化酶,单胺递质及其代谢物含量测定

[0033] 1、受试药:同实施例 1

[0034] 2、阳性对照药:二氢溴犬脲胺,4-氢喹啉,司立吉林,氯吉林,5-羟色胺(5-HT),去甲肾上腺素(NA),多巴胺(DA),5-羟基异丁酸(5-HIAA),二羟苯乙酸(DOPAC)均购自美国 Sigma 公司。吗氯贝胺由军事医学科学院毒物与药物研究所提供,纯度为 95%。

[0035] 3、实验方法

[0036] ①单胺氧化酶的测定:

[0037] 给药后 60min(白藜芦醇, i. g.) 或 30min(丙咪嗪, i. p.), 将小鼠快速断头处死, 在冰上迅速分离出脑组织, 称重后加入 4ml 冰冷磷酸缓冲液 (pH = 7.8, 0.05mol/l) 制成匀浆液, 在 2.5ml 磷酸缓冲液中加入 20% 曲通 0.4ml 和组织匀浆液 0.2ml, 溶液混合后 38℃ 预孵育 10min, 在反应液中加入 30 μ l 2.19mmol/L 底物 (终浓度为 22 μ mol/L), 37℃ 预孵育 30min, 在反应液中加入 0.2ml 5mol/L 高氯酸溶液, 冷却并离心 (1500 \times g, 10min), 在 0.5ml 上清液中加入 1mol/L 氢氧化钠溶液 2.5ml。通过荧光分光光度计在激发光 318nm, 发射光 380nm 处测定产物 4- 氢喹啉的荧光强度。单胺氧化酶活性以 nmol/30min/mg protein 表示。采用 Bradford 法测定蛋白含量。

[0038] ②单胺递质及其代谢物含量测定:

[0039] 给药后 60min(白藜芦醇, i. g.) 或 30min(丙咪嗪, i. p.), 将小鼠快速断头处死, 在冰上迅速分离出额叶皮层、海马和下丘脑, 称重后放入 Eppendorf 管中, 置于 -80℃ 冰箱中保存。

[0040] 每 100mg 脑组织中加入 200 μ l 冰冷 A 液 (0.4mol/L HClO₄), 冰浴中超声匀浆, 4℃ 避光静置 60min, 离心 20min (12,000rpm, 4℃), 取上清液, 加入半量体积的 B 液 (0.2mol/L 柠檬酸钾, 0.3mol/L K₂HPO₄ 和 0.2mol/L EDTA), 涡旋混匀 10min, 4℃ 避光静置 60min, 再次离心 20min (12,000rpm, 4℃), 取上清液进行单胺测定。

[0041] 脑组织中 5-HT、NA、DA、5-HIAA 和 DOPAC 的含量采用高效液相电化学法测定。样品上清液过滤 (孔径 0.22 μ m) 处理后, 取 20 μ l 自动进样。色谱柱为 Diamonsilim C18 (150 \times 4.6mm I. D., 5 μ m), 流动相组成: 125mmol/L 枸橼酸 - 柠檬酸钠缓冲液 (pH = 4.3), 0.1mmol/L EDTA, 1.2mmol/L 辛烷基磺酸钠, 16% 甲醇。流速: 1.0ml/min。检测器工作电压分别为: 50, 100, 200, 300, 400 和 500mV。脑组织中单胺及其代谢产物的含量以 ng/g 湿组织重表示。

[0042] 4、实验结果:

[0043] ①小鼠脑内单胺氧化酶活性的测定 (n = 8, 均数 \pm 标准差)

[0044]

组别	剂量 (mg/kg)	单胺氧化酶 A 活性 (nmol / 30 min / mg protein)	单胺氧化酶 B 活性 (nmol / 30 min / mg protein)
正常组		60.4 \pm 1.7	182.3 \pm 2.8
白藜芦醇组	10	55.5 \pm 1.7	175.6 \pm 3.0
	20	52.7 \pm 2.0*	173.5 \pm 3.0
	40	51.1 \pm 1.5**	172.6 \pm 2.1
	80	45.3 \pm 1.2***	169.7 \pm 2.4**
马氯吡胺组	20	36.6 \pm 1.7***	179.0 \pm 2.8
丙咪嗪组	10	59.8 \pm 1.9	177.3 \pm 2.9
氟西汀组	10	61.0 \pm 1.8	179.4 \pm 2.2

[0045] 注: 与正常组相比, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

[0046] ②小鼠不同脑区单胺递质及其代谢产物含量测定

[0047] 表一: 白藜芦醇对小鼠额叶皮层脑区单胺递质及其代谢产物含量的影响 (n = 8, 均数 \pm 标准差)

[0048]

组别	剂量 (mg/k g)	额叶皮层 (ng/g)					
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-H T	Noradrenaline	Dopamine	DOPAC
正常组		324.5±20.8	138.5±4.6	0.43±0.04	835.1±23.9	295.6±10.9	17.2±1.2
白藜芦醇组	10	307.4±16.5	133.5±3.9	0.44±0.03	824.2±11.5	286.3±6.5	17.7±1.0
	20	326.8±16.0	133.1±3.1	0.41±0.02	831.0±15.6	293.7±7.3	18.3±1.3
	40	333.8±13.6	133.9±3.0	0.40±0.02	854.4±16.9	308.4±7.3	17.7±0.7
	80	361.6±14.3**	131.1±8.0	0.36±0.02**	873.8±26.1*	313.2±12.2*	18.6±1.2
丙咪嗪组	10	366.9±20.1**	143.1±3.9	0.39±0.02	875.4±28.8*	302.1±13.5	17.2±1.0
氟西汀组	10	385.0±15.0***	153.0±6.0	0.40±0.01	846.0±19.6	310.2±9.4	17.6±1.4

[0049] 注:与正常组比较,*P < 0.05,**P < 0.01,***P < 0.001

[0050] 表二:白藜芦醇对小鼠海马脑区单胺递质及其代谢产物含量的影响(n = 8,均数 ± 标准差)

[0051]

组别	剂量 (mg/k g)	海马(ng/g)					
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-H T	Noradrenaline	Dopamine	DOPAC
正常组		330.3 ± 20.9	82.7 ± 2.0	0.25 ± 0.01	730.2 ± 18.2	109.2 ± 8.2	13.5 ± 1.3
白藜芦醇组	10	335.9 ± 10.4	84.5 ± 2.0	0.25 ± 0.01	710.9 ± 11.0	111.7 ± 9.4	12.3 ± 1.4
	20	344.0 ± 8.7	83.3 ± 2.1	0.24 ± 0.01	711.9 ± 12.9	106.9 ± 9.1	11.6 ± 1.5
	40	349.5 ± 9.9*	83.4 ± 2.0	0.24 ± 0.01	741.1 ± 13.5	107.3 ± 8.8	13.1 ± 1.4
	80	355.3 ± 8.8**	82.1 ± 3.4	0.23 ± 0.01*	752.6 ± 9.0*	114.2 ± 9.6	13.4 ± 1.3
丙咪嗪组	10	358.5 ± 7.7**	85.0 ± 1.7	0.24 ± 0.01	754.3 ± 16.8*	113.9 ± 10.9	14.8 ± 1.1
氟西汀组	10	358.6 ± 11.8**	85.2 ± 3.6	0.24 ± 0.01	737.1 ± 10.3	110.9 ± 11.6	14.1 ± 1.7

[0052] 注:与正常组比较,*P < 0.05,**P < 0.01

[0053] 表三:白藜芦醇对小鼠下丘脑脑区单胺递质及其代谢产物含量的影响(n = 8,均数 ± 标准差)

[0054]

组别	剂量 (mg/ kg)	下丘脑 (ng/g)					
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-H T	Noradrenaline	Dopamine	DOPAC
正常组		342.5±19.1	144.4±3.3	0.42±0.03	360.0±19.8	35.3±2.3	26.1±1.4
白藜芦醇组	10	332.3±10.4	140.8±2.0	0.42±0.01	339.4±12.8	33.2±3.4	25.7±1.8
	20	324.5±18.1	140.4±4.0	0.43±0.03	367.5±21.6	39.5±2.9	27.9±1.4
	40	349.7±25.0	140.6±3.1	0.42±0.03	354.9±23.1	34.0±3.6	25.9±1.9
	80	370.8±15.5*	141.4±3.1	0.38±0.02*	362.2±19.2	37.4±3.4	27.5±1.6
丙咪嗪组	10	370.1±6.8*	149.1±3.4	0.40±0.01	374.5±14.3	37.3±3.5	26.3±1.6
氟西汀组	10	374.8±10.6**	148.7±5.6	0.40±0.02	357.5±13.2	35.0±2.0	26.6±2.2

[0055] 注：与正常组比较，*P < 0.05，**P < 0.01

[0056] 本实验已对白藜芦醇的抗抑郁作用做了初步研究，采用经典小鼠行为绝望实验模型（悬尾和强迫游泳实验），从行为药理学和神经化学的角度探讨了白藜芦醇的抗抑郁作用。结果显示，白藜芦醇具有一定的抗抑郁作用，能显著减少小鼠在悬尾和强迫游泳实验中的不动时间。研究显示白藜芦醇能明显增加小鼠额叶皮层和海马中 5-HT 含量，下丘脑和纹状体中 NA 和 DA 含量也有一定增加。单胺氧化酶活性测定实验发现，白藜芦醇能明显抑制单胺氧化酶活性 A 的活性，对单胺氧化酶 B 活性也有一定抑制作用。