



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102973563 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 20

(21) 申请号 201110269735. 0

(22) 申请日 2011. 09. 07

(71) 申请人 温州医学院

地址 325035 浙江省温州市茶山高教园区温州医学院药学院 A522

(72) 发明人 潘建春 徐英

(51) Int. Cl.

A61K 31/4525(2006. 01)

A61K 31/05(2006. 01)

A61P 25/24(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

白藜芦醇与胡椒碱联用用于制备治疗抑郁症药物的用途

(57) 摘要

本发明涉及一种联合用药,白藜芦醇与胡椒碱联用用于治疗抑郁症。经过动物实验证明,具有较好的抗抑郁作用,是一种较有前途的天然抗抑郁药剂,可用于制备治疗抑郁症的药物。

1. 白藜芦醇与胡椒碱联用用于制备治疗抑郁症药物的用途。

白藜芦醇与胡椒碱联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与胡椒碱联用的一种新用途,特别是涉及用于制备治疗抑郁症药物的用途。

背景技术

[0002] 抑郁症是一种严重影响身心健康的情感障碍性精神疾病。随着人们生存和发展压力日益增加,抑郁症已成为现代社会的常见病。重度抑郁症患者表现为脑内单胺神经递质特别是去甲肾上腺素(NE)和5-羟色胺(5-HT)反射性地改变。目前,药物治疗是对抑郁症治疗的首选选择。临床上有几种典型的抗抑郁药都是通过提高单胺类物质水平如5-HT、NE发挥抗抑郁作用。但是大多数药物都具有不良反应,而且治疗效果不是很好。所以,对药物的有效性和安全治疗因素的研究显得意义重大。由于中国传统药用植物具有良好的顺应性和温和的副作用,被广泛应用于精神疾病的治疗。在我国的历史中,虎杖是一种对精神疾病具有良好治疗作用的植物。其主要有效成分反式白藜芦醇具有多种药理活性,如改善学习记忆、抗炎、抗氧化及神经保护等。研究显示,反式白藜芦醇具有抑制神经胶质细胞的单胺氧化酶(MAO)活性的能力。MAO是线粒体同工酶,可特异性催化代谢单胺类神经递质,如5-HT、NE、DA及其他微量胺类物质。MAO抑制剂对一些神经精神疾病有很好的治疗作用,比如情绪障碍、帕金森综合症等。近期对大鼠的研究显示,反式白藜芦醇可抑制大鼠脑内NE和5-HT的再摄取。但是反式白藜芦醇是否是通过抑制MAO活性的抑制,进而增加脑内胺类神经递质的水平尚无定论。

[0003] 胡椒碱是“香料之王”胡椒中的主要活性化学物质,属于桂皮酰胺生物碱,胡椒碱的药理作用较为广泛,具有抗氧化、免疫调节等作用,是一种生物活性增强剂,同时对慢性应激诱导的下丘脑-垂体-肾上腺轴功能失调有一定的调节作用。胡椒碱与一些多酚类化合物合用,可以明显提高多酚类化合物的生物利用度,使低剂量的多酚类化合物表现出很强的药理活性。多数多酚类化合物具有抑制单胺氧化酶的作用,将多酚类化合物与胡椒碱联合应用,可以作用于抑郁症发生的不同病理过程,以达到降低用药剂量,提高药物疗效的目的,为开发新一代高效低毒的天然抗抑郁药提供新的思路。

发明内容

[0004] 本发明的目的提供白藜芦醇与胡椒碱联用的一种新用途。

[0005] 经过动物实验发现白藜芦醇与胡椒碱联用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

[0006] 以下通过实施例说明本发明

[0007] 实施例1:小鼠悬尾实验,强迫游泳实验,自主活动实验,PCPA实验,利血平实验

[0008] 1、受试药物

[0009] 名称:白藜芦醇 (Resveratrol)、胡椒碱 (Piperine)

[0010] 性状:白藜芦醇,类白色精细粉末,气特殊,味淡,从虎杖中提取胡椒碱,白色晶体粉末

[0011] 来源:购自陕西森弗生物技术有限公司,纯度为 98%

[0012] 药物配制:胡椒碱用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶解,配成 2.5mg/kg,按 0.1ml/10g 剂量进行小鼠腹腔注射。白藜芦醇用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶解,分别配成 1.25mg/kg, 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg 五个剂量,按 0.1ml/10g 剂量进行小鼠灌胃口服。

[0013] 2、对照药物

[0014] 盐酸丙咪嗪 (imipramine hydrochloride)、氟西汀 (fluoxetine hydrochloride)、PCPA (p-chlorophenylalanine HCl):购自美国 Sigma 公司。使用前将丙咪嗪与氟西汀用双蒸水配制成 10mg/kg 浓度,PCPA 用双蒸水配制成 300mg/kg 浓度,按上述规格给予小鼠腹腔注射。利血平 (Reserpine):购自中国药品生物制品检定所。使用前用 1% 冰醋酸配制成 2.5mg/kg 浓度,按上述剂量给予小鼠皮下注射

[0015] 3、动物及分组

[0016] ICR 雄性小鼠,体重 20-24g。温州医学院实验动物中心提供。

[0017] 动物随机分成 7 组,对照组胡椒碱 2.5mg/kg,五个剂量组胡椒碱 2.5mg/kg+ 白藜芦醇 1.25mg/kg, 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg 以及阳性对照药组丙咪嗪组,每组 12 只。

[0018] 4、实验方法

[0019] ①小鼠悬尾实验:根据文献 (Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., and Simon, P. (1985) The Tail Suspension Test: A New Method for Screening Antidepressants in Mice. *Psychopharmacology* (Berl) 85:367-370.) 进行。用胶布在距小鼠尾端 1cm 处固定,并悬挂于离地 50cm 处。开始时,小鼠挣扎活动,一段时间后因绝望而静止不动,观察 6min 内实验动物行为,并记录后 4min 内累计的不动时间。

[0020] ②小鼠强迫游泳实验:根据文献 (Porsolt, R. D., Bertin, A., and Jalfre, M. (1977) Behavioral Despair in Mice: A Primary Screening Test for Antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327-336.) 进行。于测试前 24h,将小鼠置于玻璃容器内 (高 25cm; 直径 10cm; 水深 10cm; 水温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$) 训练 15min。小鼠放入水中即开始游泳,一段时间后因绝望而漂浮不动,当小鼠停止挣扎,浮在水中,只做一些必要的动作保持头部浮于水面上,即视为不动时间。观察 6min 内实验动物行为,计后 4min 不动时间。

[0021] ③小鼠自发活动:依照文献 (Xu, Y., Ku, B. S., Yao, H. Y., Lin, Y. H., Ma, X., Zhang, Y. H. et al. (2005) Antidepressant Effects of Curcumin in the Forced Swim Test and Olfactory Bulbectomy Models of Depression in Rats. *Pharmacol Biochem Behav* 82:200-206.) 进行。将小鼠置于自发活动测试仪内,内置摄像头纪录小鼠活动。先放入适应 5min 后,记录 10min 内小鼠的活动次数。

[0022] ④ PCPA 实验:依照文献 (Redrobe, J. P., Bourin, M., Colombel, M. C., and Baker, G. B. (1998) Psychopharmacological Profile of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, Paroxetine: Implication of Noradrenergic and Serotonergic Mechanisms.

J Psychopharmacol 12 :348-355.) 进行。连续 3 天,每天注射一次 PCPA(300mg/kg)。至第 4 日,给予胡椒碱、白藜芦醇或氟西汀 60min 和 30min 后,分别进行强迫游泳和悬尾测试。

[0023] ⑤ 利血平实验:根据文献 (Bourin, M., Poncelet, M., Chermat, R., and Simon, P. (1983) The Value of the Reserpine Test in Psychopharmacology. Arzneimittelforschung 33 :1173-1176.) 进行。将小鼠皮下注射 2.5mg/kg 利血平。给药前测定肛温作为基础体温,给药后 4h 测定体温下降情况。眼睑下垂于给药后 0.5h, 1h 测定,并根据以下要求评分:0,眼睛完全睁开;1,1/4 闭眼;2,1/2 闭眼;3,3/4 闭眼;4,完全闭眼。

[0024] 5、数据统计处理

[0025] 结果数据用均数 ± 标准误表示,用 SPSS13.0 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。

[0026] 6、结果统计

[0027] ① 小鼠悬尾实验结果:

[0028]

组别	剂量 (mg/kg)	悬尾不动时间 (s)
胡椒碱	2.5	128.2±10.1
胡椒碱 (2.5mg/kg) + 白藜芦醇组	1.25	118.7±16.2
	2.5	118.8±15.9
	5	119.8±7.6
	10	80.5±14.0*
	20	68.5±19.9*
丙咪嗪组	10	45.0±21.1**

[0029] 注:与正常组相比,*P < 0.05,**P < 0.01

[0030] ② 小鼠强迫游泳实验结果:

[0031]

组别	剂量 (mg/kg)	强迫游泳不动时间 (s)
胡椒碱	2.5	141.0±10.4
胡椒碱 (2.5mg/kg) + 白藜芦醇组	1.25	112.3±12.8
	2.5	110.7±5.5
	5	100.0±25.6
	10	93.4±2.1*
	20	83.8±9.9*
丙咪嗪组	10	82.3±3.1**

[0032] 注:与正常组相比,*P < 0.05,**P < 0.01

[0033] ③ 小鼠自发活动实验结果:

[0034]

组别	剂量 (mg/kg)	自发活动格数
胡椒碱	2.5	134.5±8.8
胡椒碱 (2.5mg/kg) +白藜芦醇组	1.25	140.8±30.6
	2.5	140.4±23.5
	5	132.8±12.6
	10	142.8±17.8
	20	141.4±34.2
氟西汀组	10	133.5±31.1

[0035] ④ PCPA 实验结果：

[0036]

组别	剂量 (mg/kg)	悬尾不动时间 (s)	
		PCPA 组	盐水组
胡椒碱	2.5	138.6±3.0	138.9±9.2
胡椒碱 (2.5mg/kg) +白藜芦醇组	1.25	135.7±26.4	138.8±27.4
	2.5	133.8±10.4	99.0±18.9
	5	145.5±9.9	105.6±39.7
	10	120.4±8.3	88.2±5.8
	20	130.0±22.8	66.3±48.0*
氟西汀组	10	124.0±5.4	63.1±12.7**

[0037] 注：与正常组相比，*P < 0.05，**P < 0.01

[0038]

组别	剂量 (mg/kg)	强迫游泳不动时间 (s)	
		PCPA 组	盐水组
胡椒碱	2.5	155.6±11.0	155.1±24.4
胡椒碱 (2.5mg/kg) +白藜芦醇组	1.25	151.5±63.5	124.9±64.6
	2.5	153.1±8.9	118.1±38.7
	5	146.2±43.2	116.6±36.6
	10	150.2±17.6	109.5±45.2*
	20	146.2±19.8	110.6±50.2*
氟西汀组	10	150.7±20.2	115.7±31.5**

[0039] 注：与正常组相比，*P < 0.05，**P < 0.01

[0040] ⑤ 利血平实验

[0041]

组别	剂量 (mg/kg)	体温 (°C)		眼睑下垂
		0	2h	2h
胡椒碱	2.5	37.1±0.6	35.4±0.5	1.7±0.5
胡椒碱 (2.5mg/kg) +白藜芦醇组	1.25	37.0±1.0	36.2±0.9	0.9±0.9
	2.5	37.0±0.5	36.1±0.4	1.4±1.0
	5	37.0±1.3	36.1±0.6	1.1±0.9
	10	37.1±0.7	36.5±0.2**	1.1±1.1
	20	37.0±0.7	36.4±0.4**	0.6±0.5*
氟西汀组	10	37.1±0.4	36.5±0.5**	0.3±0.5**

[0042] 注:与利血平组相比,*P < 0.05,**P < 0.01

[0043] 实施例 2;小鼠单胺氧化酶,单胺递质及其代谢产物含量测定

[0044] 1、受试药:同实施例 1

[0045] 2、阳性对照药:二氢溴犬尿胺,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),二羟苯丁酸(DOPAC)均购自美国 Sigma 公司。吗氯贝胺购自中国药品生物制品检定所。

[0046] 3、实验方法

[0047] ①单胺递质及其代谢产物含量测定:

[0048] 给药后 60min(胡椒碱 i. p.;白藜芦醇, p. o.;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、纹状体和下丘脑,称重后放入 Eppendorf 管中,置于 -80°C 冰箱中保存。每 100mg 脑组织中加入 200 μ l 冰 0.4mol/L HClO₄,冰浴中超声匀浆,4°C 避光静置 60min,离心 20min(12,000rpm,4°C),取上清液,再次离心 20min(12,000rpm,4°C),取上清液进行单胺测定。

[0049] 脑组织中 5-HT、NE、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(150×4.6mm 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。

[0050] ②单胺氧化酶的测定:

[0051] 给药后 60min(胡椒碱 i. p.;白藜芦醇, p. o.;丙咪嗪, i. p.)或 60min(吗氯贝胺, p. o.),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 37°C 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°C 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×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。

[0052] 4、实验结果：

[0053] ①小鼠不同脑区单胺递质及其代谢产物含量的测定

[0054] 表一：白藜芦醇与胡椒碱联用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 ± 标准误)

[0055]

组别	剂量 (mg/kg)	额叶皮层 (ng/g)					
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-H T	NA	DA	DOPAC
胡椒碱	2.5	336.0±3.0	356.5±4.7	1.06±0.01	158.5±4.1	54.0±1.7	73.9±2.4
P+RES	1.25	337.4±5.2	354.9±5.5	1.05±0.02	158.8±5.1	55.2±1.6	76.0±1.2
	2.5	341.9±4.7	352.6±6.4	1.03±0.02	161.0±4.7	56.7±2.0	73.7±2.0
	5	342.1±3.7	349.9±4.5	1.02±0.02	162.9±3.5	56.8±1.0	75.8±2.1
	10	354.1±5.0*	353.6±6.9	1.00±0.02	167.2±3.9	57.6±1.4	76.0±2.5
	20	360.5±5.7**	353.1±6.0	0.98±0.02*	176.1±3.6*	61.6±2.3*	75.8±1.8
氟西汀	10	359.6±4.4**	361.8±6.4	1.01±0.02	176.5±4.8*	57.4±1.4	76.3±1.3

[0056] 与正常组相比, *P < 0.05, **P < 0.01

[0057] 表二：白藜芦醇与胡椒碱联用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 ± 标准误)

[0058]

组别	剂量 (mg/kg)	海马 (ng/g)					
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-H T	NA	DA	DOPAC
胡椒碱	2.5	341.5±5.3	414.0±9.7	1.21±0.03	134.8±3.9	7.2±0.22	38.9±1.4
P+RES	1.25	339.2±4.9	408.1±10.4	1.20±0.02	133.7±4.4	7.2±0.21	41.4±0.7
	2.5	347.7±6.2	408.8±8.0	1.18±0.04	138.8±3.7	7.3±0.14	39.1±1.4
	5	359.8±3.5	415.6±5.8	1.16±0.03	145.8±5.0	7.3±0.21	41.5±0.8
	10	362.2±6.3*	407.8±7.6	1.13±0.02	150.0±4.7	7.5±0.13	40.4±1.3
	20	366.9±4.3**	403.8±6.8	1.10±0.03*	154.0±4.0*	7.7±0.19	41.8±0.8
氟西汀	10	367.7±5.9**	416.9±8.1	1.14±0.03	152.3±4.6*	7.5±0.17	39.2±1.3

[0059] 与正常组相比, *P < 0.05, **P < 0.01

[0060] 表三：白藜芦醇与胡椒碱联用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 ± 标准误)

[0061]

组别	剂量 (mg/kg)	下丘脑 (ng/g)					
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-H T	NA	DA	DOPAC
胡椒碱	2.5	234.5±5.8	1574.1±47.1	6.7±0.2	1138.0±25.5	106.5±3.2	365.5±6.3
P+RES	1.25	225.1±4.4	1557.6±33.3	6.9±0.2	1127.3±34.3	111.1±4.0	358.9±7.1
	2.5	231.7±5.7	1513.2±34.5	6.5±0.2	1157.4±36.4	113.3±3.7	370.0±5.2
	5	243.5±5.1	1555.4±34.1	6.4±0.1	1179.0±41.6	112.3±3.6	371.6±4.8
	10	254.7±5.3*	1553.0±27.9	6.1±0.1	1191.1±31.7	110.7±3.7	376.8±7.0
	20	256.4±4.9*	1522.2±34.6	5.9±0.2*	1201.1±23.3	114.1±4.1	374.0±6.6
氟西汀	10	261.1±2.7**	1582.8±46.6	6.1±0.2	1180.7±25.5	117.0±4.1	369.3±4.6

[0062] 与正常组相比, *P < 0.05, **P < 0.01

[0063] ②小鼠脑内单胺氧化酶活性的测定 (n = 8, 均数 ± 标准误)

[0064]

组别	剂量 (mg/kg)	单胺氧化酶 A 活性	单胺氧化酶 B 活性
		(nmol/30min/mg protein)	(nmol/30min/mg protein)
胡椒碱	2.5	150.1±2.5	171.6±2.8
胡椒碱 (2.5mg/kg) + 白藜芦醇组	1.25	142.8±3.0	170.8±2.4
	2.5	140.5±3.4	169.1±2.4
	5	135.2±3.2*	170.1±2.3
	10	131.8±3.9**	169.7±2.1
	20	111.8±3.9***	168.7±1.9
吗氯贝胺	20	99.5±4.2***	168.4±2.3
丙咪嗪	10	148.3±2.9	166.5±1.9

[0065] 与正常组相比, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

[0066] 上述实验采用小鼠悬尾、强迫游泳、PCPA、利血平模型, 测定不同脑区单胺氧化酶活性, 从药理学和神经化学的角度探讨了白藜芦醇与胡椒碱联用的抗抑郁作用, 结果显示, 给药后白藜芦醇的抗抑郁作用与经典抗抑郁药丙咪嗪作用相似, 能显著减少小鼠在悬尾和强迫游泳实验中的不动时间, 而对自主活动没有明显影响。白藜芦醇能抑制单胺氧化酶 A 的活性, 对单胺递质合成和代谢的影响是白藜芦醇抗抑郁作用的机制之一。