



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101890032 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 24

(21) 申请号 200910143337. 7

(22) 申请日 2009. 05. 21

(71) 申请人 张作光

地址 100102 北京市朝阳区广顺南大街 19
号嘉润花园 B 座 406 室

(72) 发明人 张作光

(51) Int. Cl.

A61K 31/704 (2006. 01)

A61K 31/56 (2006. 01)

A61P 25/24 (2006. 01)

A23L 1/29 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 5 页

(54) 发明名称

Rg1、Rb1、甘草酸组方的抗抑郁药物组合物及
制法

(57) 摘要

本发明公开一组包括以人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸（甘草次酸）为原料制成的用于治疗抑郁症的药物组合物。本发明同时还公开有关上述药物组合物的制备方法。实验证明，本发明药物组合物可明显减少受试小鼠悬尾和强迫游泳不动时间，可快速激活大鼠海马区 CAMP-PKA 通路，提升 CREB、BDNF 的表达，故本发明系受体后作用机制的抗抑郁药物。

1. 一组用于治疗忧郁症的药物组合物,所述药物组合物是由包括人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸(或甘草次酸)为原料所制成。

2. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述药物组合物进一步由包括 1 ~ 100 重量份人参皂甙 Rg1、0.5 ~ 100 重量份人参皂甙 Rb1、0.5 ~ 100 重量份甘草酸(或甘草次酸)的原料所制成。

3. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其优选为由包括 10 重量份的人参皂甙 Rg1、5 ~ 10 重量份的人参皂甙 Rb1、5 ~ 10 重量份的甘草酸(或甘草次酸)的原料制成。

4. 如权利要求 1 所述的药物组合物,人参皂甙 Rg1 的纯度为 30 ~ 98%、Rb1 的纯度为 30 ~ 98%、甘草酸(或甘草次酸)的纯度为 30 ~ 98%。

5. 如权利要求 4 所述的药物组合物,人参皂甙 Rg1 的优选纯度为 90%、Rb1 的优选纯度为 90%、甘草酸(或甘草次酸)的优选纯度为 90%。

6. 本发明揭露了一种用于治疗忧郁症的药物组合物的制备方法:

(a) 将 1 ~ 100 重量份人参皂甙 Rg1、0.5 ~ 100 重量份人参皂甙 Rb1 和 0.5 ~ 100 重量份甘草酸(或甘草次酸)混合粉碎,即得本发明药物组合物。

(b) 将 1 ~ 100 重量份人参皂甙 Rg1、0.5 ~ 100 重量份人参皂甙 Rb1、0.5 ~ 100 重量份甘草酸(或甘草次酸)与设定量的淀粉、乳糖、微粉硅胶等辅料一起混合粉碎,即得本发明药物组合物。

上述制备方法中三种原料的优选配比,是由包括 10 重量份的人参皂甙 Rg1、5 ~ 10 重量份的人参皂甙 Rb1、5 ~ 10 重量份的甘草酸(或甘草次酸)的原料制成,它们的纯度为 30 ~ 98%,其中优选纯度为 90%。

7. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述药物含有选自药学上可接受的载体、添加剂及其组合。

8. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述药物组合物制成剂型,该剂型选自锭剂、胶囊剂、散剂、片剂、粉剂、溶液剂、微囊剂、混悬剂、乳剂、颗粒剂、滴丸剂、丸剂及药剂学上的口服药物剂型之一。

9. 如权利要求 1 所述的药物组合物,还可将其制成保健食品或营养剂。

Rg1、Rb1、甘草酸组方的抗抑郁药物组合物及制法

技术领域

[0001] 本发明涉及以人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸（或甘草次酸）为原料制成的用于治疗抑郁症的药物组合物，可将其作为药物、营养剂和保健食品使用。本发明还涉及上述用于治疗抑郁症的药物组合物的制备方法。

背景技术

[0002] 抑郁症是一种常见的疾病，据统计在一般人口中大约有 25% 女性在其一生中经历过抑郁症，男性中约有 10% 左右经历过抑郁症（张春兴著：《现代心理学》）。世界卫生组织（WHO）提供的数据：抑郁症在全世界的发病率约为 11%，目前全球约有 3.4 亿精神忧郁患者，而且这个数字仍成上升趋势，调查发现在今后 20 年，抑郁症将会上升为全球第二大常见疾病。

[0003] 现有技术中，抗抑郁药物以百忧解、赛乐特、左洛复等（SSRI、SNRI、NDRI 等类的 5-HT、NE、DA 再摄取抑制剂）为主，其作用机制是通过调节人体内单胺类神经递质（5-HT、NE 等）含量以缓解抑郁症状。但是，已问市的抗忧郁药物都有不同程度的副作用，例如：增加自杀率、头痛、头晕、晕眩、失眠、嗜睡、耳鸣、口干、厌食、食欲增加、体重上升、血压上升、肠胃不适、反胃、恶心、呕吐、消化不良、腹泻、便秘、下肢痛、皮肤出疹、颤抖、痉挛、多汗、水肿、性欲降低、性无能等。近年来百忧解等抗忧郁药物已成为社会严重关注的问题，美国食品暨药物管理局（Food and Drug Administration, FDA）更于 2004 年要求药厂将市场上主要的 32 种抗抑郁药物重新标示其副作用和警告的部分，并对医护人员强调这些药物可能增加儿童及青少年自杀的机率。其中，赛乐特早在 1996 年就被发现存在有安全隐患，自 2001 年开始陆续被从市场上召回。2004 年 6 月，美国纽约州总检察长指控英国葛兰素史克公司为了获取利润，欺骗性隐瞒了服用赛乐特与“增加青少年自杀倾向及行为的风险”之间有关联的研究报告。在这种背景下，如何研发新一代副作用低又能有明显抗忧郁作用的药物已成为全球医药界所关注的问题。

[0004] 近年来，国际医药界的科学家们在抑郁症致病机理的研究方面出现了新的突破，发现除了以 5-HT、NE、DA 的再摄取抑制方式治疗忧郁症之外，还可以通过调节受体后治疗抑郁症，而其代表药物罗列普拉（Rolipram）的问世，使受体后作用机制的抗抑郁药物成为医药界研究的热点。罗列普拉是 4 型磷酸二酯酶（phosphodiesterase 4, PDE4）的抑制剂，临床试验表明其具有明显的抗忧郁作用，但由于服用罗列普拉会出现强烈呕吐，故被迫终止临床试验，然而罗列普拉却开拓了新一代“受体后作用机制抗忧郁药物”的研发思路。

[0005] 综上所述，申请人在了解了公知技术中所具有的局限性后，经过悉心研究与探索，并本着锲而不舍的精神，终于发现了“以人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸（或甘草次甘草酸）为原料治疗忧郁症的药物组合物及其制法”。

发明内容

[0006] 为了克服现有抗抑郁药物的不足，发明人结合现代医学和药理学理论对传统中药

治疗忧郁症的病机和作用机理进行了研究,并在此基础之上提出本发明,目的在于提供一种以人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸(或甘草次酸)为原料、按优选配比制成的用于治疗抑郁症的药物组合物或保健食品。这种受体后抗抑郁的药物组合物,特点是组方的三种原料人参皂甙 Rg1、Rb1 和甘草酸(或甘草次酸)均为高纯度的单体提取物(30~98%),其功效成分明确,作用机理清楚,可以量化,因此,用其制备的药物质量可控,稳定,疗效明显,安全性高,服用方便,且可快速起效。

[0007] 本发明的另一目的,是提供上述以人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸(或甘草次酸)为原料所制成的用于治疗忧郁症的药物组合物或保健食品的制备方法。

[0008] 本发明药物的解决方案和组方是经发明人潜心研究探索和筛选的结果,依据现代医学治疗忧郁症的病理及药理学理论,特别是结合受体后作用机制抗忧郁药靶标研究,经过大量的动物实验证明:人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸(或甘草次酸)均为 cAMP 磷酸二酯酶抑制剂,它们相互配伍,协同作用,可透过血脑屏障,快速激活海马区 cAMP-PKA 通路,提升 CREB 和 BDNF 的表达,故其具有明显的抗抑郁功能。另外,人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸(或甘草次酸),虽各自都有一定程度的抗抑郁作用,但小鼠悬尾正交实验筛选的结果证明,它们三者优选配比组合物(即本发明的优选药物组合物)的抗抑郁作用要明显强于其中任何一个单体,因此,本发明药物组合物相对于人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸(或甘草次酸)在抗抑郁作用上具有新颖性和创造性。人参、甘草是中医食补药膳常用的药材和食品,在千百年的食用和临床使用中已充分证明人参、甘草二者配伍的安全性、合理性,而从人参、甘草中提取的人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸(或甘草次酸)三者配伍制成的药物或保健食品,同样副作用小,可以长期服用,用于进行调理性的治疗。

[0009] 为完成本发明的目的,特提出以下技术方案。

[0010] 本发明揭露了一组用于治疗抑郁症的药物组合物,所述药物组合物是由包括人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸(或甘草次酸)为原料所制成。

[0011] 本发明的药物组合物,是由包括 1~100 重量份人参皂甙 Rg1、0.5~100 重量份人参皂甙 Rb1、0.5~100 重量份甘草酸(或甘草次酸)的原料所制成。

[0012] 优选地,本发明的药物组合物,是由包括 10 重量份的人参皂甙 Rg1、5~10 重量份的人参皂甙 Rb1、5~10 重量份的甘草酸(或甘草次酸)的原料制成。

[0013] 本发明的药物组合物,人参皂甙 Rg1 的纯度为 30~98%、Rb1 的纯度为 30~98%、甘草酸(或甘草次酸)的纯度为 30~98%。

[0014] 本发明的药物组合物,人参皂甙 Rg1 的优选纯度为 90%、Rb1 的优选纯度为 90%、甘草酸(或甘草次酸)的优选纯度为 90%。

[0015] 本发明还揭露了一种用于治疗忧郁症的药物组合物的制备方法:

[0016] (a) 将 1~100 重量份人参皂甙 Rg1、0.5~100 重量份人参皂甙 Rb1、0.5~100 重量份甘草酸(或甘草次酸)混合粉碎,即得本发明药物组合物。

[0017] (b) 将 1~100 重量份人参皂甙 Rg1、0.5~100 重量份人参皂甙 Rb1、0.5~100 重量份甘草酸(或甘草次酸)与淀粉、乳糖、微粉硅胶等辅料一起混合粉碎,即得本发明药物组合物。

[0018] 上述制备方法中三种原料的优选配比,是由包括 10 重量份的人参皂甙 Rg1、5~10 重量份的人参皂甙 Rb1、5~10 重量份的甘草酸(或甘草次酸)的原料制成。

[0019] 优选地,本发明的药物组合物可以加工制成剂型,该剂型选自锭剂、胶囊剂、散剂、片剂、粉剂、溶液剂、微囊剂、混悬剂、乳剂、颗粒剂、滴丸剂、丸剂及药剂学上的口服药物剂型之一。

[0020] 优选地,本发明的药物组合物可以包括药学上可接受的载体或添加剂。

[0021] 优选地,本发明的药物组合物还可用来制成保健食品和营养剂。

[0022] 上述的药物组合物是实现本发明目的的核心配方,在本发明公开后,本领域的技术人员可以根据中医理论或是相关现代药理学理论,对上述药物组合物进行常规的加减化裁。这种常规的加减化裁是本领域技术人员的一般性技术活动,只要是在本发明药物组合物的配方基础上所进行的一般性技术加减,均在本发明的保护范围之内。

[0023] 通过参阅附图及详细说明可以更好地了解本发明。

[0024] 附图概述

[0025] 图 1 制备本发明实施例 1、实施例 3 药物的方法流程示意图

[0026] 图 2 制备本发明实施例 2 药物的方法流程示意图。

[0027] 图 3 实施例 3 小鼠强迫游泳不动时间试验结果图。

[0028] 图 4 实施例 1 给药 8h 后,大鼠海马组织中 Cyclic AMP 的含量变化结果图。

[0029] 图 5 为实施例 1 给药 8h 后, cAMP-Dependent PKA 活性实验中典型的凝胶电泳照片。

[0030] 图 6 为实施例 1 给药 8h 后,大鼠海马组织中 cAMP-Dependent PKA 活性差异结果图。

[0031] 图 7 实施例 1 给药 8h 后,大鼠海马组织中 p-CREB 的含量变化结果图。

[0032] 图 8 实施例 1 对大鼠海马组织中 PDE 活性的影响结果图。

具体实施例

[0033] 以下将结合附图和具体实施例进一步说明本发明。

[0034] 实施例 1

[0035] 按图 1 制备本发明实施例 1 药物。按图 1 的方法流程示意图,直接将已制备成纯度为 90% 的 100g 人参皂甙 Rg1、纯度为 90% 的 100g 人参皂甙 Rb1 和纯度为 90% 的 100g 甘草酸混合粉碎,即得 300g 本发明药物实施例 1。

[0036] 实施例 2

[0037] 按图 2 制备本发明实施例 1 药物。按图 2 的方法流程示意图,直接将已制备成纯度为 92% 的 100g 人参皂甙 Rg1、纯度为 95% 的 100g 人参皂甙 Rb1、纯度为 93% 的 100g 甘草酸,与 20g 淀粉、10g 乳糖、10g 微粉硅胶一起混合粉碎,制成 1000 粒胶囊,即得本发明药物实施例 2。

[0038] 实施例 3

[0039] 按图 1 制备本发明实施例 3 药物。按图 1 的方法流程示意图,直接将已制备成纯度 95% 的 100g 人参皂甙 Rg1、纯度 92% 的 50g 人参皂甙 Rb1 和纯度 91% 的 50g 甘草次酸混合粉碎,即得 200g 本发明药物实施例 3。

[0040] 具体实验例

[0041] 实验例 1

[0042] (1) 实验名称

[0043] 人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸各种不同组合抗抑郁作用的筛选研究

[0044] (2) 实验目的

[0045] 筛选人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸三种原料抗抑郁的优选配比组合。

[0046] (3) 实验材料

[0047] 动物：ICR 小鼠，雄性，体重 $20 \pm 1g$ ，由维通利华动物实验中心提供。

[0048] 药物：受试药物人参皂甙 Rg1、Rb1 与甘草酸，北京欧纳尔生物工程技术有限公司提供；阳性药物盐酸氟西汀胶囊（百优解），礼来苏州制药有限公司，批号：A333341-070608，国药准字 J20030017，日服用量，20mg/日。

[0049] (4) 实验器材

[0050] JZ 型 300g 张力换能器（高碑店市新航积淀设备有限公司），Medlab 生物信号采集处理系统（南京易美）

[0051] (5) 实验方法

[0052] 1、人参皂甙 Rg1 (A)、Rb1 (B)、甘草酸 (C) 组合的正交设计

[0053] 采用正交试验的方法，以小鼠悬尾不动时间为指标，对 Rg1 (A)、Rb1 (B)、甘草酸 (C) 的剂量和组合进行优选。

[0054] 因素水平表、正交试验表分别如下：

[0055] 表 1 因素水平表

[0056]

因素 水平	A A 药 (mg)	B B 药 (mg)	C C 药 (mg)
1	10	10	10
2	5	5	5
3	0	0	0

[0057] 表 2 L₉(3⁴) 正交试验表

[0058]

因素 实验号	A A 药 (mg)	B B 药 (mg)	C C 药 (mg)	D 误差
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

[0059] 根据因素水平表和正交试验表，给药方案如下表所示：

[0060] 表 3 给药方案表

[0061]

给药组	A 药/kg/d	B 药/kg/d	C 药/kg/d	盐酸氟西汀/kg/d
给药 0 组	A 药 0mg	B 药 0mg	C 药 0mg	
给药 1 组	A 药 10mg	B 药 10mg	C 药 10mg	
给药 2 组	A 药 10mg	B 药 5mg	C 药 5mg	
给药 3 组	A 药 10mg	B 药 0mg	C 药 0mg	
给药 4 组	A 药 5mg	B 药 10mg	C 药 5mg	
给药 5 组	A 药 5mg	B 药 5mg	C 药 0mg	
给药 6 组	A 药 5mg	B 药 0mg	C 药 10mg	
给药 7 组	A 药 0mg	B 药 10mg	C 药 0mg	
给药 8 组	A 药 0mg	B 药 5mg	C 药 10mg	
给药 9 组	A 药 0mg	B 药 0mg	C 药 5mg	
给药 10 组				3.5mg

[0062] 2、分组给药

[0063] 每组实验将正常小鼠按体重随机分成 11 个组, 每组 20 只, 即给药 1-9 组、阳性药盐酸氟西汀胶囊 (Y 组, 3.5mg/kg/d), 空白对照组。各组均按 0.2ml/10g 体重给药, 连续给药 2 天。

[0064] 3、测试方法

[0065] 以上各组均连续给药 2 天, 分别于第 2 天给药后 1h 进行实验。将小鼠尾端 (在距尾尖 2cm 处) 用胶布固定在 100g 张力换能器的连线上, 使其呈倒悬状态, 头部离实验台约 15cm, 每次同时测试 2 只动物, 相互之间用纸板隔开。换能器连接到 Medlab 生物信号采集处理系统, 适应 2min 后, 记录 4min 之内的结果, 将不动状态换算成时间 (s)。

[0066] 4、实验结果

[0067] 表 4 小鼠悬尾实验结果

[0068]

组别	剂量 (mg/kg)	样本数	不动时间 ($\bar{x} \pm s$)
空白组	—	20	113.4 ± 42.4
阳性组	3.5mg	20	63.9 ± 42.9**
第一组	A 药 10mg + B 药 10mg + C 药 10mg	20	63.0 ± 30.8**
第二组	A 药 10mg + B 药 5mg + C 药 5mg	20	69.0 ± 41.2**
第三组	A 药 10mg + B 药 0mg + C 药 0mg	20	78.0 ± 31.8**
第四组	A 药 5mg + B 药 10mg + C 药 5mg	20	74.1 ± 30.1**
第五组	A 药 5mg + B 药 5mg + C 药 0mg	20	84.2 ± 45.3*
第六组	A 药 5mg + B 药 0mg + C 药 10mg	20	78.1 ± 40.4**
第七组	A 药 0mg + B 药 10mg + C 药 0mg	20	86.5 ± 39.2*
第八组	A 药 0mg + B 药 5mg + C 药 10mg	20	81.4 ± 38.4*
第九组	A 药 0mg + B 药 0mg + C 药 5mg	20	87.9 ± 44.1*

[0069] 与空白组比较, *P < 0.05 **P < 0.01

[0070] 表 5 L9(3⁴) 正交试验表

[0071]

因素 实验号	A A 药 (mg)	B B 药 (mg)	C C 药 (mg)	D 误差	小鼠悬尾 不动时间 (x) (s)
1	1	1	1	1	63.0
2	1	2	2	2	69.0
3	1	3	3	3	78.0
4	2	1	2	3	74.0
5	2	2	3	1	84.2
6	2	3	1	2	78.1
7	3	1	3	2	86.5
8	3	2	1	3	81.4
9	3	3	2	1	87.9
小鼠	K1	70.0	74.5	74.1	78.3
悬尾	K2	78.8	78.2	77.0	77.9
不动	K3	85.2	81.3	82.9	77.8
时间	R	15.2	6.8	8.8	0.5

[0072] 分析结果：

[0073] ①最佳组合是 A1B1C1 和 A1B2C2, 即 Rg₁10mg、Rb₁10mg、甘草酸 10mg 和 Rg₁10mg、Rb₁5mg、甘草酸 5mg。

[0074] ② Rg₁ 的贡献度最大。

[0075] ③单独的 Rg₁10mg、Rb₁10mg、甘草酸 5mg 都有抗实验性抑郁功效, 但从筛选实验数据上可看出效果是呈递减的趋势

[0076] 6、结论：

[0077] 通过正交实验的比较, 提示 Rg₁10mg、Rb₁10mg 甘草酸 10mg 组合用药 (10mg+10mg+10mg) 具有显著而稳定的抗抑郁药效, 单独的 Rg₁、Rb₁、甘草酸虽然也可抗抑郁, 但不如三者组合用药的功效强和稳定 (本发明药物组合物实施例 1、实施例 2 即按该优化配比进行组方制备的)。

[0078] 实验例 2 实施例 3 对小鼠强迫游泳实验的影响

[0079] 动物: KM 小鼠, 雄性 (20±2g), 购于中国医学科学院实验动物研究所 (合格证号 SCXK(京)2004-0001), 动物饲养于明暗交替 (12h:12h) 清洁级动物房中, 自由进食饮水。动物在动物房中适应环境 3 天后开始进行实验。

[0080] 强迫游泳实验中, 实施例 3 对慢性应激抑郁小鼠的不动时间的影响。

[0081] 实验结果显示: 实施例 3 可缩短小鼠在强迫游泳试验中的不动时间, 且低剂量组显示出更好的趋势, 但两个剂量组之间无明显差异。

[0082] 实验结果表明, 实施例 3 可减少小鼠强迫游泳不动时间, 与对照组相比 *P < 0.05, **P < 0.01, means ± SD, n = 12 (见图 3)。

[0083] 实验例 3 实施例 1 对正常小鼠海马内 cAMP、PKA、CREB、BDNF 的影响

[0084] 1. 实验器材

[0085] 1.1 实验动物：

- [0086] 健康雄性 SD 大鼠, 体重 180-200g, 70 只, 购于北京维通利华动物试验中心。
- [0087] 1.2 试剂
- [0088] Parameter Cyclic AMP Assay Kit, KGE002 (美国 R&D Systems, Inc.); DuoSet IC Human/Mouse/Rat Phospho-CREB (S133) ELISA Kit, DY2510-2 (美国 R&D Systems, Inc.);
- [0089] PepTag Assay for Non-Radioactive Detection of cAMP-Dependent Protein Kinase Kit, V5340 (美国 Promega Corporation.);
- [0090] PDE-Glo Phosphodiesterase Assay Kit, V1361 (美国 Promega Corporation.);
- [0091] Pierce BCA Protein Assay Kit, 23227, (美国 Thermo);
- [0092] 盐酸帕罗西汀 (批号: 08030078, 中美天津史克制药有限公司);
- [0093] 环磷酸腺苷、腺苷等对照品购自中国药品生物制品检定所;
- [0094] 实施例 1 由北京欧纳尔生物工程技术有限公司提供;
- [0095] NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 KCl 、 NaCl 、 MgCl_2 、Tris Base、Tris-HCl 等试剂均为细胞培养级生化试剂, 购自美国 Sigma 公司;
- [0096] E-64、APROTININ、LEUPEPTIN、Pepstatin A、PMSF、NaF、EDTA、EGTA、DTT、 NaVO_4 、Sodium pyrophosphate、琼脂糖、甘油等试剂均为高纯级, 购自加拿大 BioBasic 公司;
- [0097] 乙腈、甲醇 (色谱纯, 德国 MERCK 公司); 超纯水 (MilliQ 纯水, 本单位自制)。
- [0098] 1.3 实验仪器
- [0099] FlexStation 3 多功能微孔板分析仪 (美国 Molecular Devices Corporation.); Waters600E 高效液相色谱仪 (四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、紫外检测器, 美国 Waters 公司);
- [0100] 冷冻离心机 (美国 BECKMAN 公司);
- [0101] 电子超声匀浆器 (美国 UNTRASOUND TECHNOLOGY 公司);
- [0102] 电泳仪 (北京六一仪器厂);
- [0103] 凝胶成像仪 (SYN GENE 公司);
- [0104] ULTRA LOW 超低温冰箱 (日本 SANYO 公司);
- [0105] mLine 单道移液器、8 道移液器 (芬兰 Biohit 公司)。
- [0106] 2. 给药
- [0107] 大鼠适应性饲养三天后, 随机分为 3 个组, 分别标记为: A 生理盐水组、B 帕罗西汀组、C 实施例 1 组。盐酸帕罗西汀片碾碎, 用超纯水配成一定浓度的混悬液, 大鼠灌胃给药剂量为 5mg/kg; 实施例 1 取其内容物用水配成一定浓度的溶液, 大鼠灌胃给药剂量为 30mg/kg; 生理盐水组给予等体积的 0.9% 生理盐水; 给药之前所有大鼠称重并用苦味酸标记, 所有药物均在 37°C 下预热 30min 后给药。
- [0108] 3. 取材
- [0109] A、B、C 三组实验动物给药 8h 后, 乙醚麻醉, 股动脉放血处死, 冰上断头取脑, 分取海马组织, 精细切割成三份, 分别置于预先编号标记的 1.5mL 彩盖螺口冻存管中, 准确称重后迅速投入液氮中速冻 15min, 再置于 -80°C 冰箱中保存备用。
- [0110] 4. 样本检测
- [0111] 4.1 大鼠海马组织中 Cyclic AMP 含量测定
- [0112] 将海马组织样本解冻, 用少量生理盐水冲洗, 再按 1 : 20 (g : mL) 的比例加入

试剂盒提供的细胞裂解液（将 5 倍浓缩液稀释后使用），电子超声匀浆器匀浆 30s, 4℃ 下 10000rpm 冷冻离心 5min, 取上清液置于预先编号的 1.5mL 彩色 Eppendorf 离心管中, 置于冰盒内, 待测。应用美国 R&D Systems 公司 Parameter Cyclic AMP Assay ELISA 试剂盒进行样本检测。将样品恢复至室温, 按试剂盒说明书采用竞争性 ELISA 法测定样品中 Cyclic AMP 含量。用多孔板分析仪在 450nm 下测定 OD 值, 根据标准曲线计算出样本中 Cyclic AMP 含量。

[0113] 4.2 大鼠海马组织中 cAMP-Dependent PKA 活性测定

[0114] 将海马组织样本解冻, 用少量生理盐水冲洗, 再按 1 : 10 (g : mL) 的比例加入 PKA extraction buffer (按照试剂盒中配方配制), 电子超声匀浆器匀浆 30s, 4℃ 下 10000rpm 离心 5min, 取上清液置于预先编号的 1.5mL 彩色 Eppendorf 离心管中, 置于冰盒内, 待测。应用美国 Promega 公司 PepTag Assay for Non-Radioactive Detection of cAMP-Dependent Protein Kinase 试剂盒进行检测分析。在预先编号的 200 μ L PCR 八联管中按照试剂盒说明书加入预混的试剂, 分别取 9 μ L 各样本对号加入各管中, 涡旋混匀, 离心, 室温反应 30min, 然后置于 PCR 仪中 98℃ 5min 对酶进行灭活。实验中按照说明书要求分别设置正对照与负对照管, 随行实验。制备 0.8% 的琼脂糖凝胶, 将酶反应后的样本各取 10 μ L 加入凝胶的梳孔中, 100V, 130mA 电泳 30min, 电泳液为 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液。电泳后将琼脂糖凝胶取出, 凝胶成像仪照相, 然后置于紫外分析仪上, 将已磷酸化反应的 PepTag AlPeptide 斑点切下, 分别置于预先编号标记的 1.5mL 彩盖螺口冻存管中。加热使琼脂糖凝胶融化, 用超纯水定容到 250 μ L, 迅速取出 125 μ L 加入预先编号的 1.5mL 彩色 Eppendorf 离心管中, 再加入 75 μ L 试剂盒提供的溶胶液和 50L 冰醋酸, 涡旋混匀, 取 200 μ L 加入 96 孔酶标板中, 以负对照管正极方向琼脂糖为空白对照, 在多孔板分析仪上进行荧光分析。设定 Excitation Wavelength 568nm, Emission Wavelength 592nm。以样本荧光强度表示 PKA 活性。

[0115] 4.3 大鼠海马组织中 p-CREB 含量测定

[0116] 应用美国 R&D Systems 公司 DuoSet IC Human/Mouse/Rat Phospho-CREB (S133) ELISA 试剂盒进行样本检测。将海马组织样本解冻, 用少量生理盐水冲洗, 再按 1 : 20 (g : mL) 的比例加入组织匀浆液 (按照试剂盒中 IC DELUENT6# 配方配制), 电子超声匀浆器匀浆 30s, 4℃ 下 10000rpm 离心 5min, 取上清液置于预先编号的 1.5mL 彩色 Eppendorf 离心管中, 置于冰盒内, 待测。测定时将样品恢复至室温, 按试剂盒说明书采用 sandwich ELISA 法测定样品中 p-CREB 含量。用多孔板分析仪在 450nm 下测定 OD 值, 根据标准曲线计算出样本中 p-CREB 含量。

[0117] 4.4 大鼠海马组织中总蛋白测定

[0118] 为了更准确标定样本中每毫克蛋白所含的 p-CREB 蛋白的量, 需要对样本的总蛋白含量进行测定。取 p-CREB 测定试验中的组织匀浆离心后的上清液, 用 PBS 稀释 25 倍后, 作为测试样本, 按照 Pierce BCA Protein Assay Kit 试剂说明书, 用多孔板分析仪在 562nm 下测定 OD 值, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准品, 根据标准曲线计算出样本中总蛋白含量。

[0119] 4.5 磷酸二酯酶 (PDE) 活性测定

[0120] 使用美国 Promega 公司生物发光法 (Bioluminescent) PDE-Glo Phosphodiesterase Assay 试剂盒测定实施例 1 对大鼠脑海马组织中 PDE 活性的影响。

[0121] 4.5.1 药液配制：

[0122] 实施例 1 取内容物配制成 0.02mg/mL、0.05mg/mL 和 1.0mg/mL 三个浓度。

[0123] 4.5.2 样品制备：

[0124] 取一定量的海马组织，少量生理盐水冲洗后，按 1 : 10(g : mL) 的比例加入 PDE-Glo Reaction Buffer(Tris-HCl 40mM, MgCl₂10mM, BSA 0.1mg/ml, 另加入 PMSF 1mM, leupetin 2 μ M/mL, aprotinin 2 μ M/mL, E-642 μ M/mL), 电子超声器匀浆, 4℃下 14000rpm 离心 30 分钟, 取上清液作为酶液, 备用。

[0125] 4.5.3 生物发光法测定

[0126] 按照试剂盒说明书提供的方法进行操作, 酶反应液部分, 加入 1 μ L 药液, 1.5 μ L 酶液, 共 2.5 μ L; 加入含有 2 μ mol Cyclic AMP 的底物溶液 2.5 μ L, 混匀, 37℃反应 30min, 然后加入含有 PDE 强抑制剂 IBMX 的反应终止溶液 2.5 μ L, 混匀; 加入测试溶液 2.5 μ L, 混匀, 室温反应 20min; 最后加入发光试剂 10 μ L, 室温反应 10min 后在多功能微孔板分析仪上进行测试。

[0127] 五、实验结果

[0128] 1. 大鼠海马组织中 Cyclic AMP 含量

[0129] 用 ELISA 法测定了大鼠海马组织匀浆液中 Cyclic AMP 浓度, 除以称量的组织样本重量, 得到海马组织中含有的 Cyclic AMP 的含量, 以 pmol/g Tissue 表示。

[0130] 实施例 1 组与生理盐水组和帕罗西汀组比较, 大鼠海马组织中 Cyclic AMP 的含量显著升高, *P < 0.05, n = 10(见图 4)。

[0131] 2. 大鼠海马组织中 cAMP-Dependent PKA 活性

[0132] 酶反应后, 样本进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪照相, 进行粗略分析。

[0133] 泳道自左至右 1-4 生理盐水组; 5-8 帕罗西汀组; 9-11 实施例 1 组; 12 正对照样本; 13 负对照样本(见图 5)。

[0134] 磷酸化的 A1 肽带有负电荷, 向正极方向移动; 未磷酸化的 A1 肽带有正电荷, 向负极方向移动, 将二者分开。其中向正极方向移动的已磷酸化的 A1 肽斑点亮度越高, 表明磷酸化水平越高, 样本中 cAMP-Dependent PKA 活性越高。图中可见实施例 1 组样本正极方向斑点亮度较生理盐水组和帕罗西汀组亮度更高。

[0135] 切割琼脂糖凝胶斑点, 熔胶后定容, 以荧光法测定大鼠海马组织中 cAMP-Dependent PKA 活性, 以荧光强度表示

[0136] 给药 8h 后, 实施例 1 组与空白对照组和帕罗西汀组比较, 大鼠海马组织中 cAMP-Dependent PKA 活性显著升高, *P < 0.05, n = 10(见图 6)。

[0137] 3. 大鼠海马组织中总蛋白含量

[0138] 用 BCA 法测定了大鼠海马组织样本匀浆液中总蛋白的浓度, 用以标定每 μ g 总蛋白中含有 p-CREB 的量。结果见表 1:

[0139] 表 1 大鼠海马组织样本匀浆液总蛋白浓度 (μ g/mL)

[0140]

	生理盐水组	帕罗西汀组	实施例 1 组
1	308.627	310.458	289.965
2	303.134	318.697	268.697
3	312.218	333.697	295.246
4	311.937	341.162	302.218
5	306.162	324.613	283.204
6	306.796	318.275	307.007
7	314.542	304.754	277.430
8	307.077	310.458	287.359
9	297.570	301.514	295.528
10	276.796	293.627	315.880
Mean±SD	304.486±10.877	315.725±14.646	292.254±14.066

[0141] 4. 大鼠海马组织中 p-CREB 含量

[0142] 采用 sandwich ELISA 法测定了大鼠海马组织样品匀浆液中 p-CREB 浓度,并以 p-CREB(pg)/总蛋白(μ g)表示大鼠海马组织中 p-CREB 含量。

[0143] 给药 8h 后,实施例 1 组与生理盐水组和帕罗西汀组比较,大鼠海马组织中 p-CREB 的含量升高,统计学无显著性差异, $n = 10$ (见图 7)。

[0144] 5. 药物对大鼠海马组织中磷酸二酯酶 (PDE) 活性影响

[0145] 用生物发光法测定了海马组织中 PDE 的活性以及体外给予药物后对 PDE 活性的抑制作用。以发光强度表示 PDE 活性,与对照组比较,发光强度较高,说明 PDE 活性较高;发光强度较低,说明 PDE 活性被抑制。

[0146] 与对照组相比,实施例 1 中剂量组 PDE 活性受到明显抑制, $*P < 0.05$, $n = 4$ (见图 8)。

[0147] 六、结论

[0148] 1. 本实验研究表明实施例 1 中剂量组可显著抑制大鼠海马组织中磷酸二酯酶的活性,由于磷酸二酯酶是 Cyclic AMP 的灭活酶,其受到抑制后可使大鼠海马组织中 Cyclic AMP 含量升高。

[0149] 2. 大鼠灌胃给药 8 小时后,实施例 1 组与生理盐水组和帕罗西汀组比较,脑海马组织 Cyclic AMP 含量显著升高;cAMP-Dependent PKA 活性显著增强;p-CREB 含量也有提高。

[0150] 3. 本实验证实了实施例 1 可以通过第二信使 Cyclic AMP 细胞信号转导通路发挥药理作用,并在给药 8 小时后即可快速激活 cAMP-PKA-CREB (p-CREB) 通路 (与生理盐水组和帕罗西汀组相比有显著差异, $*P < 0.05$)。

[0151] 4. 同样 8 小时给药,阳性对照药帕罗西汀不能激活 cAMP-PKA-CREB (p-CREB) 通路。

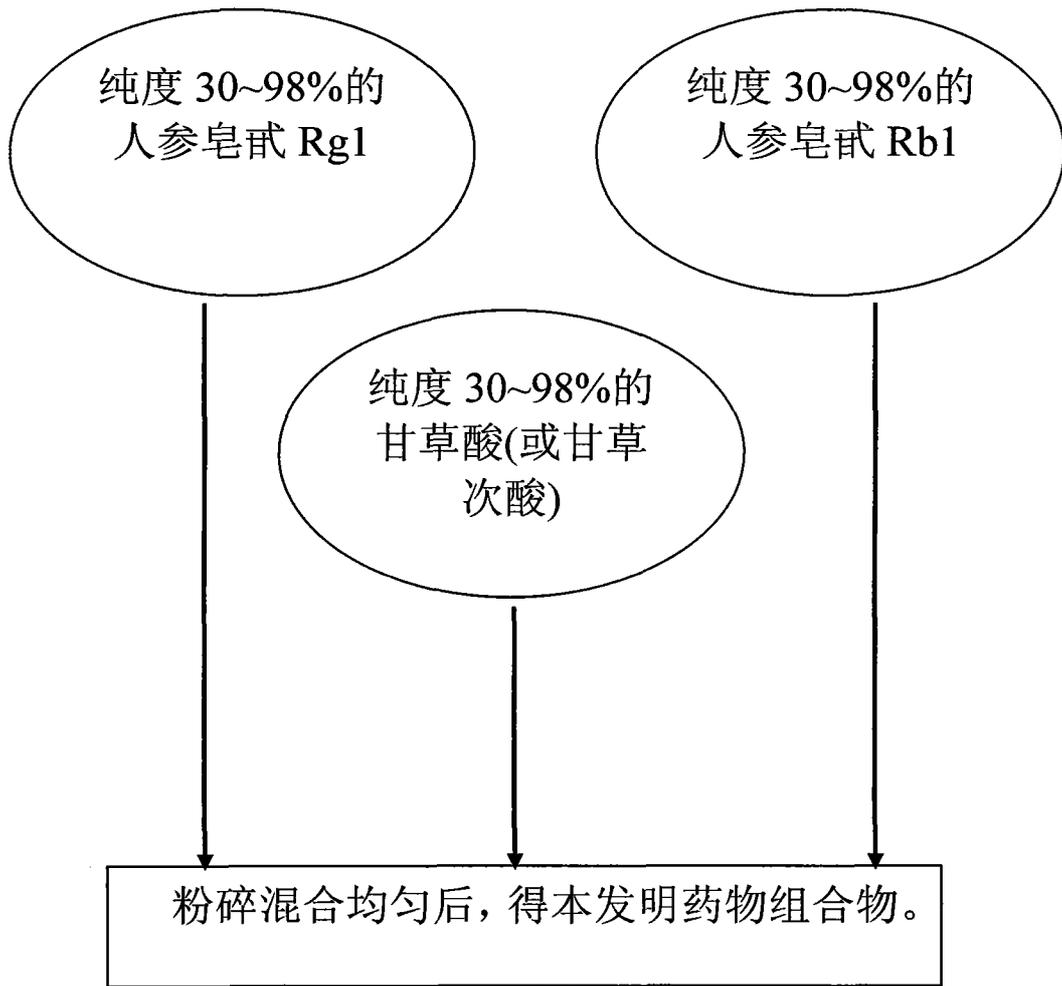


图 1

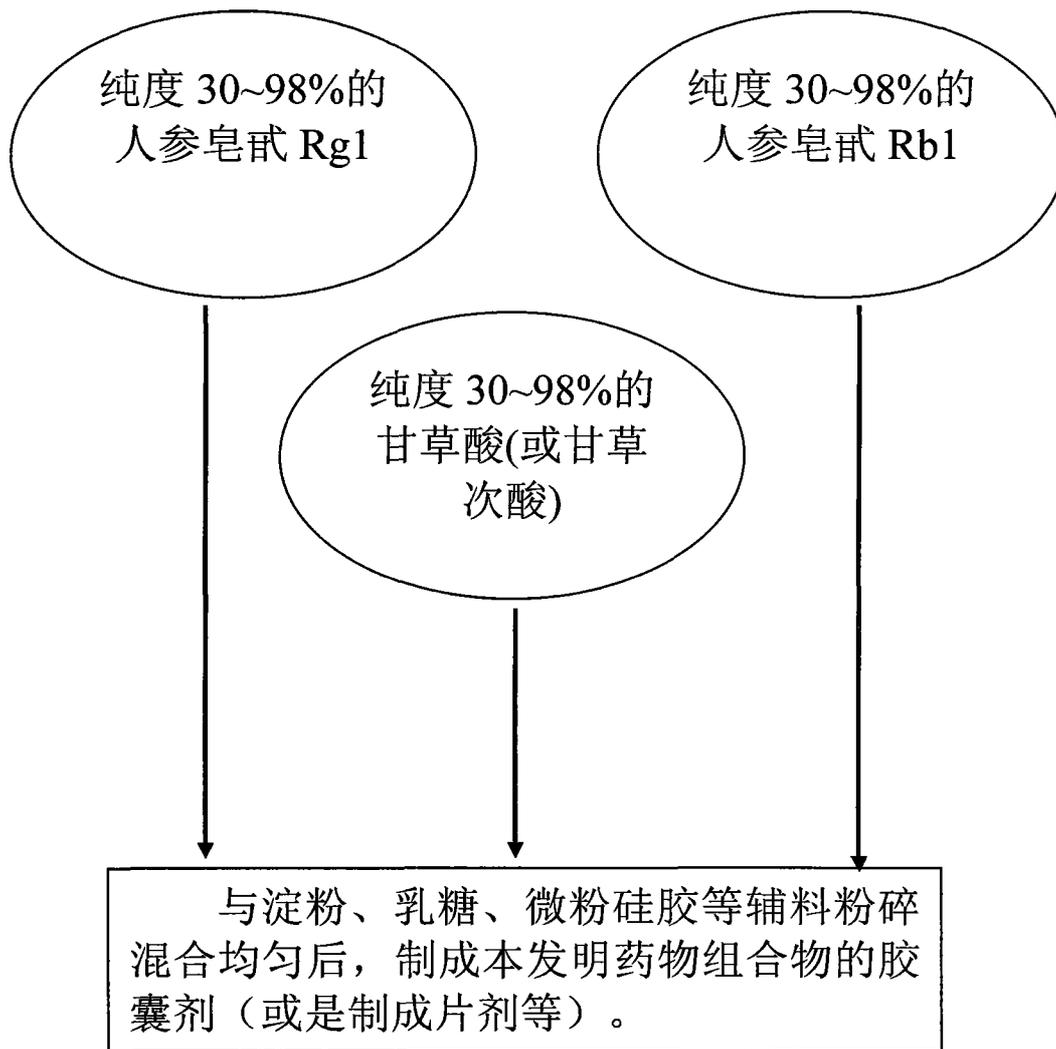


图 2

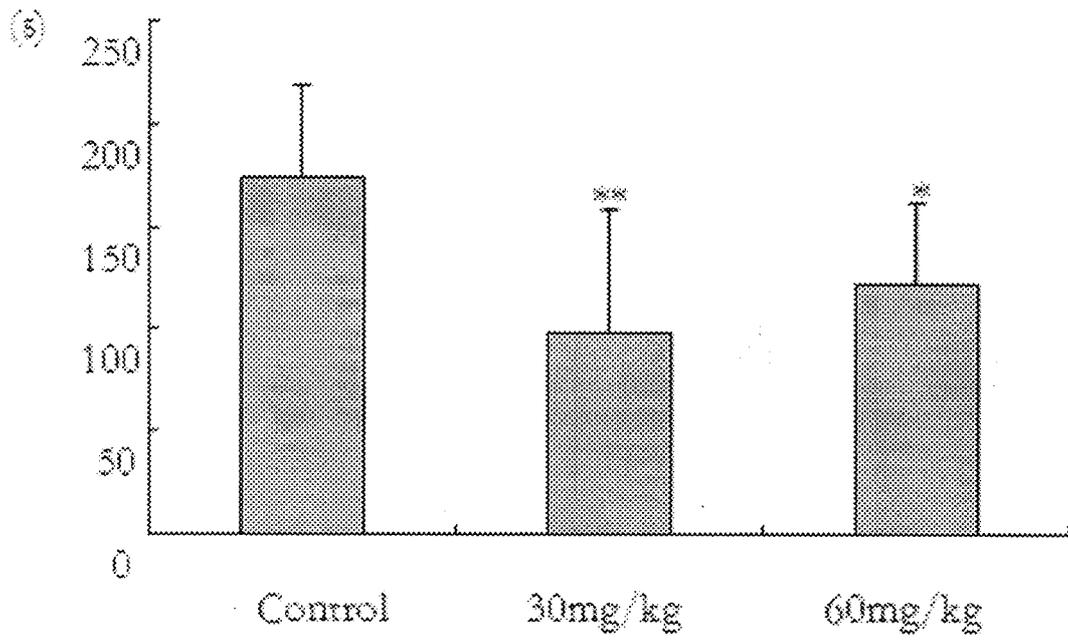


图 3

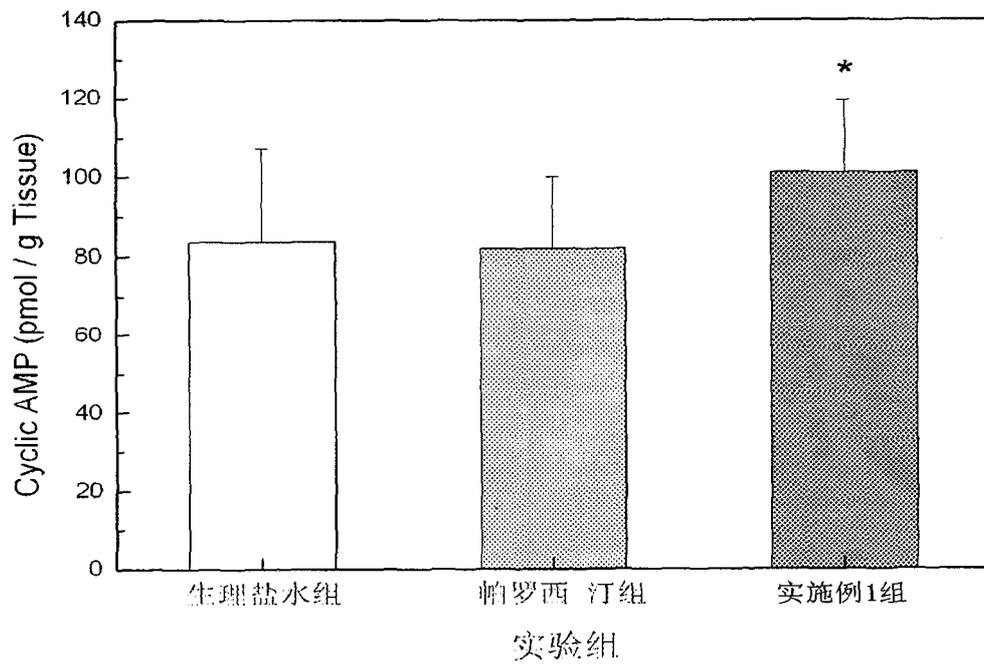


图 4

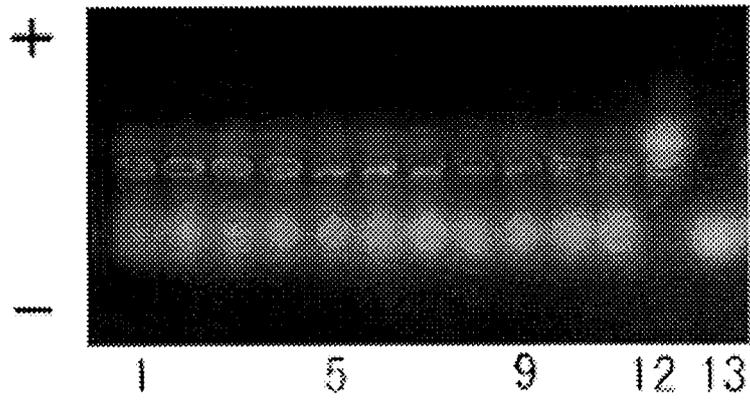


图 5

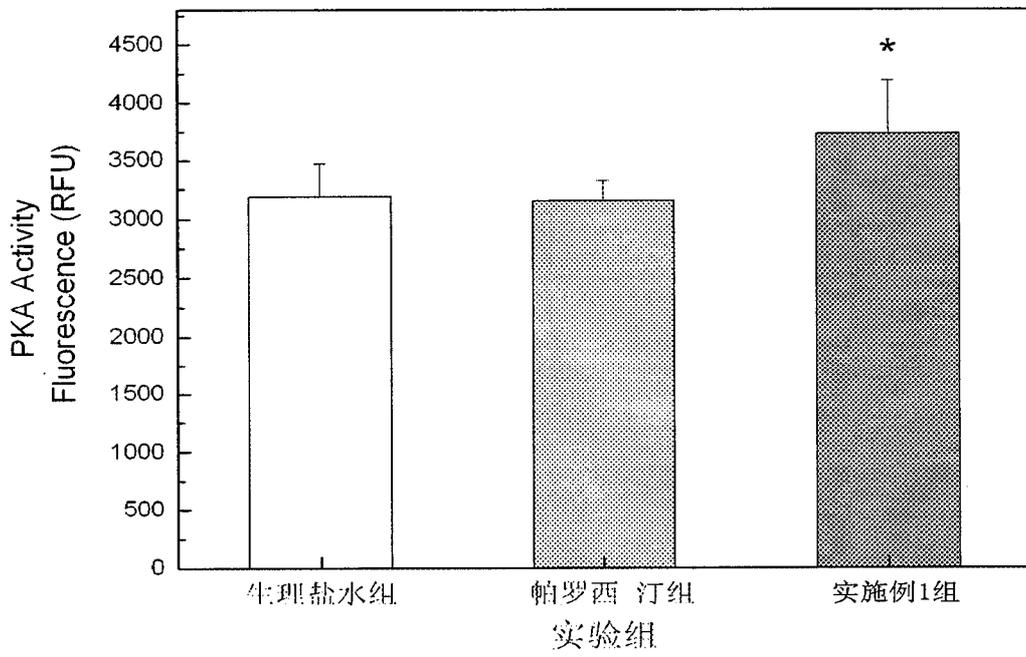


图 6

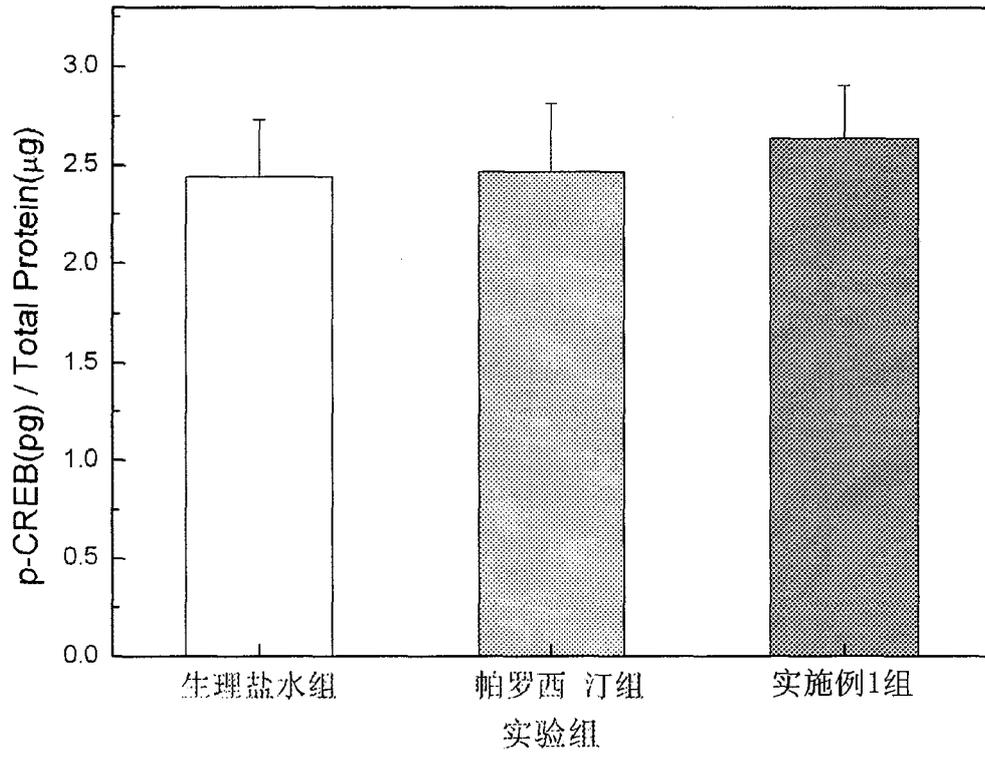


图 7

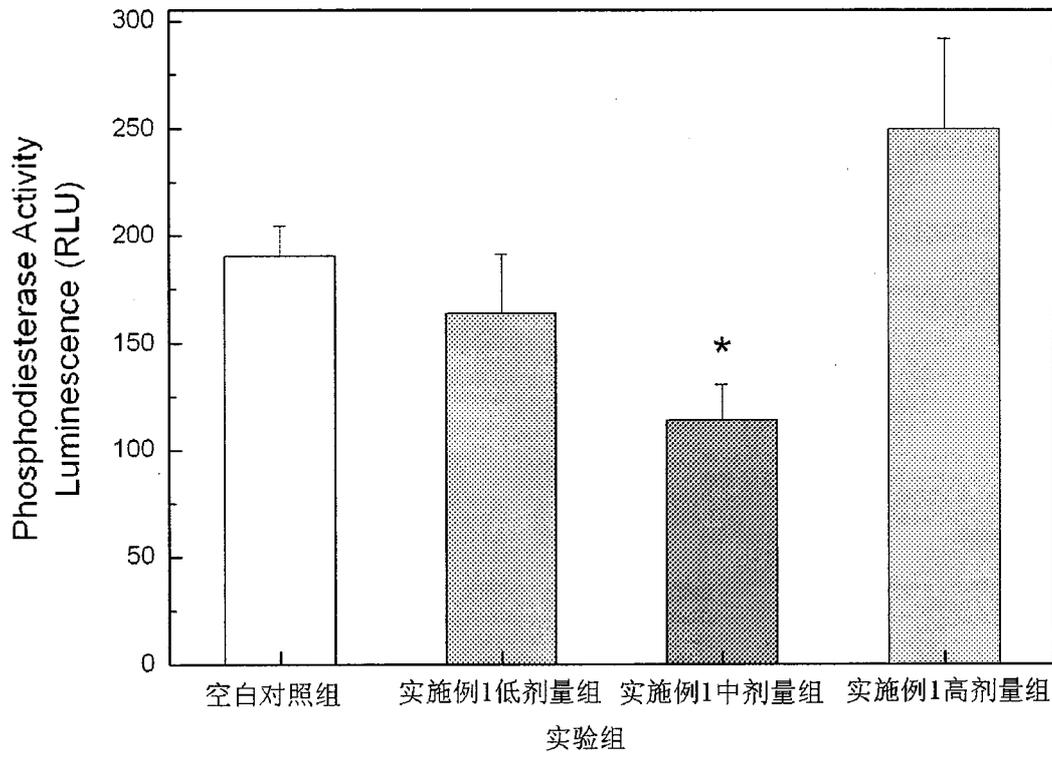


图 8