

葛根异黄酮抗抑郁作用的实验研究

王海岭^{1*}, 师天元²

(1. 新乡医学院第二附属医院药剂科, 河南 新乡 453002;
2. 河南省精神病医院中心实验室, 河南 新乡 453002)

[摘要] **目的:**初步探讨葛根异黄酮的抗抑郁作用及其机制。**方法:**雄性昆明小鼠随机分为正常对照组、氟西汀组(10 mg·kg⁻¹)和葛根异黄酮组(50, 100, 200 mg·kg⁻¹),连续 ig 给药 14 d 后,进行开场实验(OFT)、小鼠强迫游泳实验(FST)和悬尾实验(TST);除正常对照组外,各组连续 ig 给药 14 d 后,分别 ip 利血平(2 mg·kg⁻¹)或 5-羟色氨酸(5-HTP,150 mg·kg⁻¹),观察葛根异黄酮对利血平所致小鼠眼睑下垂、体温下降和运动不能的拮抗作用,以及对 5-HTP 诱导小鼠甩头行为的影响。**结果:**开场实验中,正常组小鼠 2 min 内穿梭格次数和前肢上抬次数分别为(57.23 ± 18.35), (22.16 ± 13.28)次,各给药组与之相比均无显著差异;正常组小鼠 FST 和 TST 不动时间分别为(132.7 ± 37), (98.4 ± 28)s,葛根异黄酮低、中、高剂量均显著缩短了不动时间($P < 0.05$),其中 100 mg·kg⁻¹葛根异黄酮组小鼠 FST 和 TST 不动时间分别缩至(72.1 ± 27), (68.8 ± 19)s;葛根异黄酮低、中、高剂量显著增强了 5-HTP 诱导的小鼠甩头行为,使用头次数由(4.7 ± 2.3)次分别增至(16.2 ± 7.9), (27.4 ± 13.1), (28.8 ± 12.5)次,差异具有显著意义($P < 0.001$),且呈剂量依赖性;葛根异黄酮对利血平所致的小鼠眼睑下垂、运动不能以及体温下降等症状亦有显著对抗作用($P < 0.05$)。**结论:**葛根异黄酮具有显著的抗抑郁作用,其机制可能与调节单胺能神经系统功能有关。

[关键词] 葛根异黄酮; 抗抑郁; 开场实验; 强迫游泳实验; 悬尾实验; 利血平; 5-羟色氨酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0268-04

Experiment Study on Anti-depressant Effects of Pueraria Isoflavone

WANG Hai-ling^{1*}, SHI Tian-yuan²

(1. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453002, China; 2. The Central Laboratory of Henan Psychiatric Hospital, Xinxiang 453002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-depressant effects of pueraria isoflavone in mice. **Method:** Male KM mice were randomly divided into 5 groups: control groups (normal saline), fluoxetine group (10 mg·kg⁻¹), pueraria isoflavone groups (50, 100, 200 mg·kg⁻¹). After oral administration for 14 days, the open field test (OFT), forced swimming test (FST), tail suspension test (TST), 5-Hydroxytryptophan (5-HTP)-induced head-twitch test and reserpine-antagonism test were carried out to evaluate the anti-depressant effects of pueraria isoflavone. In particular, reserpine (2 mg·kg⁻¹) and 5-HTP (150 mg·kg⁻¹) were given by intraperitoneal injections before the reserpine-antagonism test and 5-HTP-induced head-twitch test respectively. **Result:** The number of wearing and grooming in 2 min in control mice were (57.23 ± 18.35) and (22.16 ± 13.28) respectively, and there was no significant different between pueraria isoflavone groups and control group. The immobility time of FST and TST in control mice was (132.7 ± 37), (98.4 ± 28)s respectively and there were significant decrease in pueraria isoflavone groups. pueraria isoflavone at dose of 100 mg·kg⁻¹ could short immobility time to (72.1 ± 27), (68.8 ± 19) s. Moreover, pueraria isoflavone enhanced the head-twitch response evoked by 5-HTP in dose-dependent manner ($P < 0.001$). Compared with model group, pueraria isoflavone could significantly reverse the ptosis, acinesia, and decrease in body temperature induced by reserpine in mice ($P <$

[收稿日期] 20120405(007)

[通讯作者] *王海岭, Tel:13598665364, E-mail: wanghailing123789@163.com

0.05)。 **Conclusion:** Pueraria isoflavone has anti-depressant effects, and its mechanism may be related to regulating the functions of monoaminergic nervous system.

[**Key words**] pueraria isoflavone; antidepressant; open field test; forced swimming test; tail suspension test; reserpine; 5-hydroxytryptophan

抑郁症是由多种原因引起的一种情感性精神障碍疾病,由于具有发病率高、自杀率高、疾病负担高等特点而备受关注。临床常用的抗抑郁药物多为化学合成药物,如三环类、四环类、5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)、单胺氧化酶抑制剂(MAOI)等。这些药物长期应用均给患者带来较大的不良反应,甚至有诱发心血管疾病的风险。因此,从天然产物中寻找安全、高效的药物来治疗抑郁症成为当前的研究方向。葛根异黄酮是从豆科植物葛根中提取出的黄酮类成分,包括葛根素、大豆苷元、大豆苷等,临床上用于补充女性雌激素。现代药理研究表明,葛根异黄酮还具有抗氧化、保护心肌缺血、保护肝细胞、降压、调节血脂、抗肿瘤等广泛的药理作用^[1-4],但目前关于葛根异黄酮抗抑郁作用的报道较少。本文通过建立小鼠行为绝望模型,对葛根异黄酮的抗抑郁作用进行初步探讨。

1 材料

1.1 动物 SPF级昆明小鼠,雄性,体重18~20 g,购自河南省实验动物中心,许可证号SYXK(豫)2007-0008,合格证号0009511,0009547。在实验室常规环境下适应性饲养3 d后使用。

1.2 试剂与仪器 葛根异黄酮购于安徽农业大学生物技术重点实验室,纯度为40%;盐酸氟西汀(常州四药制药有限公司,批号20110723),利血平(上海复旦复华药业有限公司,批号080302);5-HTP购自Sigma;PC396秒表(天福);MC-246电子体温计(欧姆龙);550D数码相机(佳能)。

2 方法

2.1 开场实验(OFT) 将小鼠随机分为5组,每组10只,分别为正常对照组(生理盐水)、氟西汀组(10 mg·kg⁻¹)、葛根异黄酮低、中、高剂量组(50, 100, 200 mg·kg⁻¹)。每天上午8时ig给药,连续14 d。末次给药1 h后,将小鼠放入长40 cm、宽40 cm、高30 cm、底部25等分的木箱的正中央格后开始计时,记录小鼠2 min内穿越格数及前肢上抬次数。

2.2 强迫游泳实验 分组及给药方法同2.1,末次给药1 h后,将小鼠单个放入水深10 cm,水温23℃~25℃的圆形玻璃缸中(高20 cm,直径16 cm)。观察小鼠6 min内的活动状态,并计算小鼠后

4 min内的不动时间(小鼠停止运动或仅四肢有轻微动作)。

2.3 悬尾实验 分组及给药方法同2.1,末次给药1 h后,将小鼠尾端(距尾尖2 cm)固定在悬尾箱(18 cm×20 cm×35 cm)的支架上,使小鼠倒悬,其头部距箱底5 cm。观察小鼠6 min内的活动状态,并计算小鼠后4 min内的不动时间(小鼠停止运动或仅四肢有轻微动作)。

2.4 5-HTP诱导小鼠甩头实验 分组及给药方法同2.1,末次给药1 h后,腹腔注射150 mg·kg⁻¹的5-HTP,观察小鼠20 min内的活动状态,并计算后15 min内小鼠的甩头次数。

2.5 利血平拮抗实验 将小鼠随机分为6组,每组15只,分别为正常对照组、氟西汀组(10 mg·kg⁻¹)、利血平组、葛根异黄酮低、中、高剂量组(50, 100和200 mg·kg⁻¹)。每天上午8时ig给药,连续14 d。末次给药1 h后,正常对照组ip生理盐水2 mg·kg⁻¹,其余5组均ip利血平2 mg·kg⁻¹。注射利血平1 h后,根据小鼠眼睑下垂程度评分,其中眼闭1/4为1分,眼闭1/2为2分,眼闭3/4为3分,全闭为4分。注射利血平1 h后,将小鼠放于直径7.5 cm的圆形白纸的中央,观察15 s后,记录每组动物仍然呆在圈内的个数。注射利血平4 h后,在小鼠肛门内约2 cm处,用电子体温计测量肛温。

2.6 统计方法 采用SPSS 13.0软件统计数据。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料和计数资料分别采用t检验和 χ^2 检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 表示显著性差异。

3 结果

3.1 对小鼠自主活动的影响 正常对照组小鼠2 min内穿格次数和前肢上抬次数分别为(57.23 ± 18.35), (22.16 ± 13.28)次。葛根异黄酮和氟西汀组与正常对照组小鼠之间的穿格次数和前肢上抬次数均无显著差异,表明在本次实验剂量范围内,葛根异黄酮无兴奋或抑制中枢神经的作用。

3.2 对小鼠强迫游泳不动时间的影响 葛根异黄酮低、中、高剂量组均明显缩短小鼠FST不动时间,与正常对照组相比有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$),其中以100 mg·kg⁻¹葛根异黄酮作用最

为显著,使不动时间缩短至(72.1 ± 27) s。氟西汀亦显著缩短 FST 不动时间($P < 0.001$)。见表 1。

3.3 对小鼠悬尾不动时间的影响 葛根异黄酮呈剂量依赖性缩短了 TST 小鼠不动时间,其中以 200 mg·kg⁻¹ 葛根异黄酮作用最为显著,使不动时间由(98.4 ± 28) s 缩短至(66.3 ± 22) s,差异有显著意义($P < 0.01$)。氟西汀亦显著缩短 FST 不动时间($P < 0.001$)。见表 1。

表 1 葛根异黄酮对小鼠强迫游泳的不动时间和悬尾实验的不动时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	FST/s	TST/s
正常对照	-	132.7 ± 37	98.4 ± 28
氟西汀	10	68.3 ± 15 ³⁾	45.9 ± 18 ³⁾
葛根异黄酮	50	97.5 ± 26 ¹⁾	79.6 ± 21 ¹⁾
	100	72.1 ± 27 ²⁾	68.8 ± 19 ²⁾
	200	75.4 ± 17 ²⁾	66.3 ± 22 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (表 2 同)。

3.4 对 5-HTP 诱导小鼠甩头行为的影响 葛根异黄酮呈剂量依赖性增加了 5-HTP 诱导的小鼠甩头次数;与正常对照组相比,葛根异黄酮各剂量组和氟西汀组均具有显著性意义($P < 0.001$)。见表 2。

表 2 葛根异黄酮对 5-HTP 诱导小鼠甩头行为的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	甩头次数/次
正常对照	-	4.7 ± 2.3
氟西汀	10	32.5 ± 15.4 ³⁾
葛根异黄酮	50	16.2 ± 7.9 ³⁾
	100	27.4 ± 13.1 ³⁾
	200	28.8 ± 12.5 ³⁾

3.5 葛根异黄酮对利血平的拮抗作用 与正常对照组相比,利血平组小鼠出现明显的眼睑下垂、运动不能以及体温下降($P < 0.001$)。与利血平组相比,葛根异黄酮低、中、高剂量组小鼠眼睑下垂症状明显减轻($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$),运动不能症状亦显著减轻($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)。另外,中、高剂量葛根异黄酮亦能显著对抗利血平所致小鼠体温下降($P < 0.01$)。氟西汀组小鼠眼睑下垂、运动不能和体温下降的症状均显著减轻($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 3。

4 讨论

近年来的研究发现,葛根异黄酮对海马神经元具有保护作用,并能改善动物学习记忆能力^[5]。在

表 3 葛根异黄酮对利血平的拮抗作用($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	眼睑下垂/分	运动不能/只	肛温/°C
正常对照	-	0.43 ± 0.02 ³⁾	0 ³⁾	37.4 ± 1.6 ³⁾
利血平	-	3.72 ± 0.66	15	32.5 ± 2.7
氟西汀	10	2.36 ± 0.54 ²⁾	6 ²⁾	34.9 ± 2.3 ¹⁾
葛根异黄酮	50	3.08 ± 0.75 ¹⁾	9 ¹⁾	33.8 ± 4.6
	100	2.51 ± 0.69 ²⁾	3 ³⁾	35.2 ± 3.7 ²⁾
	200	2.64 ± 1.08 ²⁾	3 ³⁾	36.1 ± 5.4 ²⁾

注:与利血平组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

体外实验中也证明了葛根异黄酮对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡具有抑制作用^[6-7]。这些研究提示我们,葛根异黄酮的神经保护作用有可能用于治疗中枢神经系统疾病。在临床研究中,陈爱春^[8]等发现葛根异黄酮可显著减轻更年期妇女的抑郁症状,其作用与补充体内雌激素有关。雌激素的缺乏通常与更年期抑郁密切相关,补充雌激素可通过加速 MAO 的灭活而减少 5-羟色胺(5-HT)的降解,亦可促进 5-HT 的前体物质进入大脑,提高中枢 5-HT 水平而减轻抑郁症状。这进一步提示了葛根异黄酮可能作为雌激素调节机体单胺类神经递质水平,进而发挥抗抑郁作用。基于此,本实验在动物抑郁模型中进行验证,并初步探索其作用机制。

小鼠强迫游泳与悬尾是最常用的筛选抗抑郁药物的模型,以一定时间内小鼠的不动时间来反映其“绝望”情绪,具有敏感性高、操作简便等特点。本实验结果显示,葛根异黄酮能显著缩短小鼠强迫游泳和悬尾不动时间,与正常对照组相比有显著差异。在开场实验中发现葛根异黄酮对小鼠的自主活动行为无明显影响,表明其无中枢兴奋作用,这初步证明了葛根异黄酮具有一定的抗抑郁作用。

抑郁症的病理机制异常复杂,目前主要认为与中枢单胺类神经递质如 5-HT、去甲肾上腺素(NE)和多巴胺(DA)等水平低下有关。抗抑郁药物可通过阻断单胺类递质的再摄取或抑制 MAO 活性而发挥抗抑郁作用^[9]。本实验结果显示,葛根异黄酮可显著增加 5-HTP 诱导的小鼠甩头次数,表明葛根异黄酮具有增强 5-HT 系统功能的作用。利血平拮抗实验结果显示,葛根异黄酮可显著对抗利血平所致的小鼠眼睑下垂、运动不能以及及体温下降,表明葛根异黄酮的抗抑郁作用可能涉及 NE 和 DA 能系统。

综上所述,本研究在小鼠行为学上证实了葛根异黄酮的抗抑郁作用,并提示其机制可能涉及 5-HT,

包载紫杉醇的透明质酸聚合物胶束细胞毒性及细胞摄取研究

刘艳华¹, 孙进², 王文苹¹, 何仲贵^{2*}

(1. 宁夏医科大学药学院药剂学系, 银川 750004;
2. 沈阳药科大学药学院药剂教研室, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 研究 CD44 受体单靶向的透明质酸-十八烷基(HA-C₁₈)、叶酸和 CD44 受体双靶向的叶酸-透明质酸-十八烷基(FA-HA-C₁₈)载紫杉醇(PTX)胶束的肿瘤细胞靶向功能。方法: 选择叶酸和 CD44 受体表达丰富的 MCF-7 细胞, 评价 PTX-HA-C₁₈ 和 PTX-FA-HA-C₁₈ 胶束的细胞毒性和细胞摄取。结果: 相比于市售制剂泰素(taxol), HA 载药胶束在低浓度下表现出较强的细胞毒性, 且 PTX-FA-HA-C₁₈ 胶束的细胞毒性显著强于 PTX-HA-C₁₈ 胶束。HA 胶束能显著提高 PTX 在细胞中的摄取量, 且细胞摄取呈现浓度-时间依赖性。相比于 HA-C₁₈ 胶束, FA-HA-C₁₈ 胶束表现出更强的摄取能力。结论: HA 胶束具有良好的肿瘤细胞靶向功能, FA-HA-C₁₈ 双靶向胶束表现出最佳的靶向能力。

[关键词] 透明质酸-十八烷基胶束; 叶酸-透明质酸-十八烷基胶束; 紫杉醇; 细胞毒性; 细胞摄取

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0271-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120827.1046.012.html>

[网络出版时间] 2012-08-27 10:46

Study on Cytotoxicity and Cellular Uptake of Paclitaxel-loaded Hyaluronic Acid Polymeric Micelles

LIU Yan-hua¹, SUN Jin², WANG Wen-ping¹, HE Zhong-gui^{2*}

(1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Department of Biopharmaceutics, School of Pharmacy,

[收稿日期] 20120330(002)

[第一作者] 刘艳华, 博士, 讲师, 从事新型纳米给药系统研究, Tel:0951-6880581, E-mail:lyanhua1214@126.com

[通讯作者] * 何仲贵, 博士, 教授, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:024-23986320, E-mail:hezongui@gmail.com

NE 及 DA 能系统。本研究结果对于进一步推广葛根异黄酮的临床应用具有一定的参考价值。

[参考文献]

- [1] 郭密, 张仲君, 徐寿水, 等. 葛根素抗缺氧及抗氧化作用的实验研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2007, 9(4): 279.
- [2] 刘薇, 王亚利, 张式暖, 等. 葛根素对慢性缺氧心肌保护作用的实验研究 [J]. 山东医药, 2006, 46(5): 15.
- [3] 梁俊清, 丁春华, 凌亦凌, 等. 葛根素对糖尿病致肺损伤的保护作用及其机制的研究 [J]. 中国应用生理学杂志, 2007, 23(3): 355.
- [4] 陈晓莉, 王骊骊, 薛克昌. 葛根提取物对肝癌细胞增殖及细胞周期的作用 [J]. 广东药学院学报, 2001, 17(3): 183.

- [5] 陈亚奇, 王爱梅, 田敏. 葛根异黄酮对衰老模型大鼠学习记忆能力及海马神经元形态的影响 [J]. 医学理论与实践, 2011, 24(20): 2405.
- [6] 董妙先, 牛英才, 潘志, 等. 葛根异黄酮对 MPP⁺ 诱导的 PC12 氧化应激的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(2): 48.
- [7] 牛英才, 潘志, 李晓明, 等. 葛根异黄酮对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(1): 112.
- [8] 陈爱春, 顾宗欣. 葛根异黄酮治疗更年期抑郁症的临床疗效观察 [J]. 数理医药学杂志, 2011, 24(5): 604.
- [9] 高霄飞, 王雪琦, 何成, 等. 抑郁症单胺类递质受体研究进展 [J]. 生理科学进展, 2002, 33(1): 17.

[责任编辑 聂淑琴]