

藜欢解郁方中抗抑郁成分的不同提取方法比较

周海松¹, 张文婷², 凌霜², 刘梅², 许锦文², 李萍¹, 奉建芳^{2*}

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 上海中医药大学穆拉德中药现代化研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 优选藜欢解郁方中抗抑郁成分的提取方法。方法: 采用水提法、醇提法、水提加醇提法提取藜欢解郁方中抗抑郁有效物质, 运用小鼠强迫游泳试验、敞箱试验、拮抗利血平所致体温降低试验优选提取方法。结果: 在小鼠强迫游泳试验中, 藜欢解郁方水提物组与模型组比较能明显缩短小鼠不动时间, 表现出抗抑郁作用。拮抗利血平所致体温降低试验中, 水提物组与模型组比较有显著性差异, 敞箱试验表明各组间小鼠自主活动无显著性差异。结论: 水提法为藜欢解郁方抗抑郁的最佳提取方法。

[关键词] 藜欢解郁方; 抗抑郁; 强迫游泳试验; 提取方法; 药效学试验

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)14-0056-03

Comparison of Different Extraction Methods for Antidepressant Components from Lihuan Jieyu Prescription

ZHOU Hai-song¹, ZHANG Wen-ting², LING Shuang², LIU Mei², XU Jin-wen², LI Ping¹, FENG Jian-fang^{2*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Murad Research Center for Traditional Chinese Medicine Modernization, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To optimize extraction method of antidepressant ingredients from Lihuan Jieyu prescription. Method: Water extraction, ethanol extraction and water-ethanol extraction were used to extract antidepressant active substances from Lihuan Jieyu prescription, optimum extraction method was determined by pharmacodynamics tests, such as forced swimming test, reserpine hypothermia test and open tank test in mice. Result: Compared with model group, water extraction group of Lihuan Jieyu decoction could significantly shortened immobility time of mice in forced swimming test, it showed antidepressant effect. There was significantly difference of water extraction group and model group in reserpine hypothermia test. In open tank test, there was no significant difference of spontaneous activity in all groups. Conclusion: Water extraction method was optimum extraction technology for antidepressant components from Lihuan Jieyu prescription.

[Key words] Lihuan Jieyu prescription; antidepressant; forced swimming test; extraction method; pharmacodynamic experiment

抑郁症是常见的精神障碍性疾病, 以焦虑不安、情绪低落为主要特征, 同时伴有思维迟钝、注意力和学习记忆力下降、意志活动减弱或持续显著的紧张不安伴自主神经功能兴奋等症状^[1-2]。相对于西药的单靶点抗抑郁作用^[3-6], 传统中药复方或单味中药化学成分多样性和药理作用的多靶点性, 使其具有低毒、低副作用的特点, 很少存在药物依赖性、停药后高复发或反跳作用等情况, 具有广泛应用前景。藜欢解郁方源自临床有效验方, 由刺蒺藜、甘草、石菖蒲等 4 味中药按一定比例组成, 对抑郁症有显著疗效。中药复方制剂实际生产工艺中, 水、醇是

[收稿日期] 20120220(011)
[基金项目] 上海市科委中药现代化项目(10DZ1971800)
[第一作者] 周海松, 研究生, 从事中药药理的研究, Tel: 021-51322532, E-mail: haisongzhou@163.com
[通讯作者] * 奉建芳, 研究员, 从事中药新剂型与新制剂的研究, Tel: 021-51322046, E-mail: fjf@shutcm.edu.cn

最常用提取溶剂。为筛选出藜欢解郁方抗抑郁有效物质的提取方法,本试验运用小鼠强迫游泳试验、敞箱试验及拮抗利血平所致体温降低试验等药效学试验为指标,分别对水提法、醇提法、水提加醇提法提取藜欢解郁方抗抑郁有效物质进行考察,以确定藜欢解郁方抗抑郁最佳提取方法,为藜欢解郁方的新药开发提供依据。

1 材料

FA1604 型电子分析天平(上海上天精密仪器有限公司),MC-341 型电子数字式温度体温计(奥姆龙中国有限公司),小鼠旷场反应箱(自制,高 25~30 cm,底边长 40 cm,内壁涂黑,底面平均分为 25 个小方格),刺蒺藜、甘草、石菖蒲等药材均购于上海康桥药业有限公司,经上海中医药大学王长宏研究员鉴定,均符合《中国药典》的有关要求。

盐酸氟西汀胶囊(礼来苏州制药有限公司,批号 9924A),利血平(西安斯诺特生物技术有限公司,纯度 95%,批号 SNP110720)。

KM 种雄性小鼠(SPF 级)60 只,体重 18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司合格证号 SCXK(沪)2007-0005。适应性饲养 1 周后开始试验。

2 方法与结果^[7]

2.1 提取药液的制备

2.1.1 水提法 称取全方药材共 80 g,加适量水浸泡后,加至 8 倍水煎煮 2 次,第 1 次 1 h,第 2 次 40 min,合并 2 次提取液,浓缩,作为动物试验用药。

2.1.2 醇提法 全方(80 g)加入 5 倍 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并醇提液,回收乙醇至无醇味,加入适量水溶解作为动物试验用药。

2.1.3 水提加醇提法 按处方比例称取全方药材(80 g),加入 5 倍量 70% 乙醇回流提取提取 2 次,每次 2 h,合并醇提液;药渣加 8 倍水煎煮 2 次,第 1 次 1 h,第 2 次 40 min。合并水提液和醇提液,浓缩。将 2 种提取物混合,作为动物试验用药。

2.2 抗抑郁药效学评价

2.2.1 给药方案 KM 种小鼠随机分为空白组、模型组、阳性药组、水提组、醇提组、水提加醇提组。每组 10 只。于每日上午 9:00~10:00 灌胃 1 次,连续灌胃给药 21 天。正常组和模型组予以等体积生理盐水,盐酸氟西汀胶囊组给药剂量为 4 mg·kg⁻¹,水提法组、醇提法组及水提加醇提组给药剂量均为 11 180 mg·kg⁻¹。

2.2.2 小鼠强迫游泳试验 模型组按 4 mg·kg⁻¹给予利血平,其余各组按 2.2.1 项下方法给药,第 21 d 给药后 1 h 进行试验。试验前小鼠训练游泳 10 min,24 h 后测试。小鼠单只放入盛水容器中[20 cm×14 cm 容器,水深 11 cm,水温(23±2)℃],适应 2 min 后,记录 4 min 内累计不动时间。所谓不动是指动物在水中停止挣扎,或动物呈漂浮状态,仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面。

2.2.3 旷场试验 按 2.2.1 项下方法给药,取小鼠旷场反应箱,每次放入 1 只小鼠在敞箱正中格中进行观察。有 2 位评定者,分别评定 1 只小鼠在 5 min 内的活动情况,记录其由底面中心开始走动的穿越格数。每只小鼠试验后应用清洁剂将装置清洗干净。每只小鼠只进行 1 次试验。

2.2.4 拮抗利血平诱发的小鼠体温降低试验^[8] 模型组按 4 mg·kg⁻¹给予利血平,其余各组按 2.2.1 项下方法给药,体温测定采用数字式电子体温计。用少许甘油涂擦电子体温计,使之润滑,将体温计探头轻轻插入小鼠肛门 1~2 cm,当温度显示稳定后记录读数。共测试 2 次,首次于第 20 d 给药前进行测试作为基础体温,第 20 d 给药 1 h 后,腹腔注射利血平(2.5 mg·kg⁻¹),2 h 后进行第 2 次测试。分别对比第 1 次与第 2 次组间数值的差异性。

以上试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。采用单因素方差分析法进行统计学分析,数据由 SPSS 15.0 软件处理。结果见表 1。

表 1 藜欢解郁方不同提取方法对小鼠药效学指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	不动时间/s	穿越格子数/个	基础体温/℃	体温变化/℃
空白	91.0±47.44	111.3±23.8	36.92±0.55	38.20±0.56
模型(利血平)	151.2±43.51 ¹⁾	130.3±15.8	37.28±0.46	36.56±0.46 ¹⁾
阳性(盐酸氟西汀)	89.5±37.41 ²⁾	117.0±18.3	36.82±0.56	37.99±0.43 ²⁾
水提法	83.8±34.67 ²⁾	93.6±23.7	37.23±0.60	37.85±0.29 ²⁾
醇提法	113.1±31.57	89.1±20.9	36.90±0.67	37.54±0.84 ²⁾
水提加醇提法	140.5±43.89	111.0±15.5	37.23±0.75	37.14±1.10

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05。

由结果可知,造模后模型组不动时间延长,与空白组进行比较有显著性差异,说明模型组造模成功。

与模型组比较,复方水提取物可明显缩短小鼠强迫游泳不动时间。与阳性对照组比较在给药后无显著性差异。说明复方水提取物可显著对抗小鼠因强迫游泳造成的抑郁症状。

与空白组比较,模型组无显著性差异,各给药组与模型组间也无显著性差异。提示藜欢解郁方无中枢神经兴奋作用,排除因中枢兴奋作用导致的小鼠强迫游泳不动时间缩短的假阳性。

与空白组比较,各组在注射利血平前,基础体温数值均无显著性差异。注射利血平后,模型组小鼠体温下降,与空白组比较有差异说明造模成功。与模型组小鼠体温比较,盐酸氟西汀组,水提组、醇提组均能显著升高体温,说明各给药组均显著逆转了利血平导致的体温降低,有抗抑郁作用。

3 讨论

目前常见的抗抑郁药物包括^[9]三环和四环类抗抑郁剂、单胺氧化酶(MAO)抑制剂、选择性 5-羟色胺(5-HT)重吸收抑制剂等。其起效快,用药量少,但长期服用都有一定毒副作用。如临床最常见的选择性 5-羟色胺(5-HT)重吸收抑制剂盐酸氟西汀(百忧解),很多病人因其恶心、呕吐或食欲减退等毒副作用,而放弃治疗,以致病情进一步恶化^[10]。

中医药在抑郁症的治疗用药方面有着丰富的经验,关于中药复方治疗抑郁症的报道共 120 多篇,涉及处方 50 余首,但多是柴胡疏肝散、逍遥散、开心散、百合地黄汤和四逆散等治疗抑郁症基本处方的加减化裁。对常用抗抑郁复方的综合分析得知,复方中使用频率最高的前 10 味中药为石菖蒲、郁金、柴胡、远志、白芍、茯苓、当归、香附、合欢、酸枣仁。本复方中就含有其中 2 味,且此 4 味中药的原药材或提取物均具有抗抑郁作用^[11-16]。

本试验将最佳制备工艺筛选与药效学试验相结合,运用小鼠强迫游泳试验,拮抗利血平所致的体温降低等常见的经典动物试验抑郁模型,对处方的制备工艺进行抗抑郁活性筛选,可保证处方最佳制备工艺的有效性。试验表明处方水提组在各项试验中均表现出良好的抗抑郁效果,由于中枢兴奋性药也能缩短不动状态的持续时间,故本课题组进行了敞箱试验,发现各给药组药物均不影响动物的自主活动。说明药物缩短动物不动状态的持续时间与中枢神经系统兴奋性无关。

[参考文献]

[1] Berton O,Nestler E J. New approaches to antidepressant

drug discovery beyond monoamines [J]. Nat Rev Neurosci,2006,7(2):137.

[2] Kercher A J,Rapee R M,Schniering C A. Neuroticism, life events and negative thoughts in the development of depression in adolescent girls [J]. J Abnorm Child Psycho,2009,37(7):903.

[3] Krass M, Rünkorg K, Wegener G. Nitric oxide is involved in the regulation of marble-burying behavior [J]. Neurosci Lett,2010,480(1):55.

[4] Cheryl A F, Alicia A W. Progesterone reduces depression-like behavior in a murine model of Alzheimer's disease [J]. Age,2009,31(2):143.

[5] Stevenson J R,Schroeder J P,Nixon K,et al. Abstinence following alcohol drinking produces depression-like behavior and reduced hippocampal neurogenesis in mice [J]. Neuropsychopharmacol,2009,34(5):1209.

[6] Terence Y C,Pang X D,Michelle S Zajac,et al. Hannan altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease [J]. Human Molecular Genetics,2009,18(4):753.

[7] 徐叔云,卞如谦,陈修,等. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:807.

[8] 王景霞,张建军,李伟,等. 白芍提取物治疗抑郁症的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):183.

[9] Sidney H, Kennedy. A review of antidepressant treatments today [J]. Eur Neuropsychopharmacol,2006(16):619.

[10] Anita E Autry, Megumi Adachi, Pengfei Cheng, et al. Gender specific impact of BDNF signaling on stress-induced depression-like behavior [J]. Biol Psychiatry,2009,66(1):84.

[11] 李明亚,李娟好,季宁东,等. 石菖蒲几种粗提取物的抗抑郁作用 [J]. 广东药学院学报,2004,20(2):141.

[12] 李腾飞,孙秀萍,高江晖,等. 石菖蒲水提物对获得性无助模型的抗抑郁作用 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):132.

[13] 赵志宇,王卫星,郭洪祝,等. 甘草苷对慢性应激抑郁模型大鼠的抗抑郁作用 [J]. 中国临床康复,2006,10(27):69.

[14] 褚书地,瞿伟菁. 蒺藜化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源,2003,22(4):4.

[15] 沈双宏,沈晓东,胡随遇,等. 刺蒺藜苷对抑郁模型大鼠海马齿状回神经发生的影响 [J]. 中医药学报,2008,36(3):13.

[16] 徐丽君,黄光英. 中药蒺藜的皂苷类成分及主要药理作用研究概述 [J]. 中西医结合研究,2009,1(2):102.

[责任编辑 全燕]