

· 药理 ·

小鼠灌胃大枣提取物后血清和海马组织中 cyclic AMP 的含量变化

田俊生¹, 高杉¹, 崔元璐^{1*}, 王强松¹, 刘录平², 张作光²

(1. 天津中医药大学 教育部方剂学重点实验室, 天津 300193;

2. 北京欧纳尔生物工程技术有限公司, 北京 100102)

[摘要] 目的: 观察小鼠 ig 给予大枣提取物($0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后 24 h 内血清和海马组织中 cyclic AMP(cAMP) 含量随时间的变化规律, 初步阐明大枣提取物抗抑郁作用可能的机制。方法: 首先采用高效液相色谱法测定大枣提取物种 cAMP 的含量, 再使用健康 ICR 小鼠, 单次 ig 给予大枣提取物后在 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 股动脉取血, 分离海马组织, 采用荧光 ELISA 法测定血清和海马组织中 cAMP 浓度。结果: 大枣提取物中 cAMP 的平均含量为 1.54%。血清中 cAMP 浓度在 0.5 h 达最大值, 在 8 h 内逐渐减少, 在 8 ~12 h 又明显升高, 此后又开始降低。而海马组织中 cAMP 浓度在前 6 h 之内缓慢升高, 6 ~8 h 内明显升高, 24 h 达最大值。结论: 大枣提取物中可能同时存在具有磷酸二酯酶抑制作用的物质, 能够在 6 ~12 h 内抑制磷酸二酯酶的活性, 增加 cAMP 的浓度, 这可能是大枣提取物抗抑郁的作用机制之一。

[关键词] 大枣提取物; 荧光酶联免疫检测法; 环磷酸腺苷; 磷酸二酯酶抑制剂; 抗抑郁

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0102-03

The Cyclic AMP Content with Time Variation after Oral Administration of the Extract of Fructus Jujubae in Mice

TIAN Jun-sheng¹, GAO Shan¹, CUI Yuan-lu^{1*}, WANG Qiang-song¹, LIU Lu-ping¹, ZHANG Zuo-guang²

(1. Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education,

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Beijing Wonner Biotech Co. Ltd, Beijing 100102, China)

[Abstract] Cyclic AMP is one of the bioactive components in the extract of Fructus Jujubae, which is reported to be involved with the treatment of depression. To investigate the content of cAMP in the plasma and hippocampus according to the time variation after a single administration of the extract orally at the dose of $0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ in mice, the plasma and hippocampi were collected at the time of 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h and the ELISA method is used to determine the content of cAMP. As a result, the content of cAMP in plasma reaches to the maximum at the 0.5 h, and then decreases gradually from the 0.5 h to the 8 h. However, the content reversely increases rapidly from the 8 h to the 12 h, while decreases again in the following 12 hours. As to the hippocampi, differences are significant. The cAMP content in hippocampi is ascending gently in the first 6 hours and increasing quickly in the following hours. It is an indication that some bioactive substances in the extract of Fructus Jujubae are likely to be the specific inhibitor of Phosphodiesterase type (PDE4). Therefore, the extract treated to the mice can inhibit the activity of PDE4 and increase the content of cAMP in the plasma and hippocampi during the time of 6 to 12 h. Thus, a possible mechanism for the antidepressant like effect of the extract of Fructus Jujubae is involved

[收稿日期] 20100111(009)

[基金项目] 国家重点基础研究计划(973)(2006CB504703)

[作者简介] 田俊生, 博士研究生, 研究方向为神经药理学, E-mail: mikal2008@sina.com

[通讯作者] * 崔元璐, Tel: (022) 23051965, E-mail: labtcmds@tjutc.edu.cn

with the inhibition of PDE4.

[Key words] extract of Fructus Jujubae; ELISA method; cyclic AMP; inhibitor of PDE4; antidepressant

抑郁症是一类严重危害人类身心健康的精神疾病,其主要症状表现为显著而持久的情绪低落等。世界卫生组织已将抑郁症列为第四大重要疾病^[1]。研究表明抑郁症的发生发展与环磷酸腺苷/蛋白激酶/CAMP 反应元件结合蛋白(cAMP/PKA/CREB)受体后信号转导通路有密切关系^[2]。吴立坤^[3]等的研究表明含有大枣的平郁胶囊抗抑郁作用机理之一可能是通过调节受体后 cAMP-PKA 信号转导通路而实现的。而 cAMP(相对分子质量为 329.21)是大枣中重要的活性成分,成熟大枣中 cAMP 含量是一般动植物的数千倍至数万倍,具有重要开发利用价值^[4]。本研究采用荧光酶联免疫检测法(ELISA)测定小鼠血清和海马组织中 cAMP 浓度,寻找小鼠口服平郁胶囊主要成分大枣提取物 24 h 内血清和海马组织中 cAMP 浓度的变化规律,初步探讨平郁胶囊治疗抑郁症的作用机制。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠,雄性,体重 18 ~22 g,北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2007-0001。

1.2 药物与试剂 大枣提取物(北京欧纳尔生物工程有限公司,批号 081209)。cAMP 检测试剂盒(批号 R8053,美国 Molecular Devices 公司)。cAMP 对照品(纯度 98.5%,供含量测定用,中国药品生物制品检定所)。MILLIQ 超纯水(实验室自制)。

1.3 仪器 FlexStation 3 多功能微孔板分析仪(美国 Molecular Devices 公司);冷冻离心机(美国 BECKMAN 公司);电子超声匀浆器(美国 Ultrasound Technology 公司);Waters600E 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 大枣提取物制备 大枣提取物制备所用原料为河北大枣,产自河北沧州,经天津中医药大学李天祥副教授鉴定为鼠李科植物大枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥果实。大枣破碎后加入一定量的 70% 乙醇,回流提取 2 次,合并两次提取液,浓缩至一定体积,过 XAD 7HP 大孔吸附树脂,收集所需要的洗脱部分,真空浓缩干燥,即得。

2.2 大枣提取物 cAMP 含量测定 精密称取环磷酸腺苷对照品适量,用超纯水溶解配成 $7.94 \mu\text{g} \cdot$

mL^{-1} 的对照品溶液。精密称取大枣提取物适量,用超纯水溶解,过 $0.45 \mu\text{m}$ 孔径微孔滤膜,续滤液 $10 \mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪,测定其中的 cAMP 含量,平行操作 3 份。色谱条件为^[5]: 甲醇- $0.05 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 水溶液(10:90)为流动相, Thermo C_{18} 色谱柱($4.6 \text{mm} \times 250 \text{mm}$, $0.45 \mu\text{m}$), 流速 $1.0 \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 254nm , 室温。

2.3 给药与取材 80 只健康 ICR 小鼠随机分为 8 组,每组 10 只。各组动物同时 ig 给予大枣提取物水溶液 0.5mL , 剂量为 $0.35 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以 cAMP 表示,剂量为 $5.75 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。分别于给药后 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 冰上断头分离海马组织,称重,液氮中速冻, -80°C 保存,待测。同时收集小鼠股动脉血, $4000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,取上层血清,待测。

2.4 血清中 cAMP 浓度测定 取不同时间点待测血清样本,按 1:5 的比例加入 pH7.4 的缓冲液(Tris 盐酸: 0.661g , Tris 碱: 0.097g , 0.9% NaCl, 1% NP40, 超纯水定容至 100mL), 涡旋 30 s, $14000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 精密吸取上清液适量加入至 96 孔板中,按试剂盒说明书操作,用多功能微孔板分析仪在 450nm 下测定吸收度,根据标准曲线计算出血清中 cAMP 的浓度。

2.5 海马组织中 cAMP 含量测定 取不同时间点待测海马组织样本,按 1:10 的比例加入 pH7.4 的缓冲液(组成与配制同 2.4), 电子匀浆器匀浆 30 s, 100°C 沸水中灭活 5 min, $14000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 精密吸取上清液适量加入至 96 孔板中,按试剂盒说明书操作,用多功能微孔板分析仪在 450nm 下测定吸收度,根据标准曲线计算出海马组织中 cAMP 的浓度。

2.6 数据统计 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 的方式表示,实验数据用 Origin Pro 7.5 软件统计分析作图。

3 结果

3.1 大枣提取物中 cAMP 含量测定 高效液相法测得本批大枣提取物中 cAMP 的平均含量为 1.54%。

3.2 血清中 cAMP 含量变化 小鼠 ig 给予大枣提取物后在血液中迅速分布,在 0.5 h 能够达到最大值(83.65 ± 5.49) $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 随后开始逐渐下降,在 8 h 时间点达到最小值(5.88 ± 2.58) $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而从 8 h 开始又逐渐升高,在 12 h 升高至($41.16 \pm$

4.07) $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 此后又开始下降, 结果见图 1。

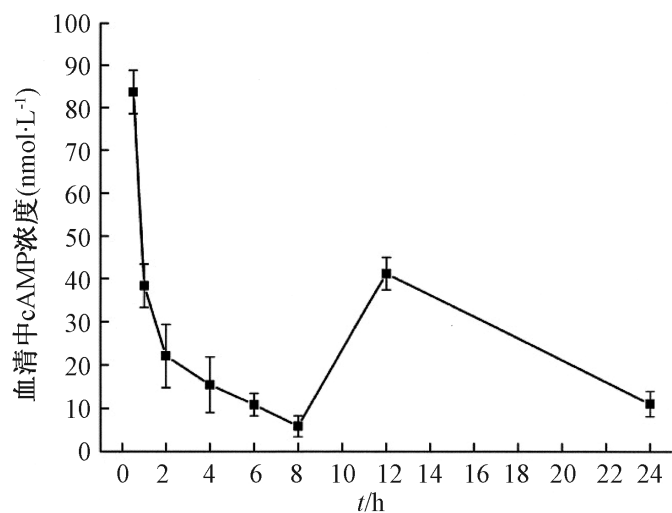


图 1 ig 大枣 $0.35\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后小鼠血清中 cAMP 的浓度

3.3 海马组织中 cAMP 含量变化 小鼠 ig 给予大枣提取物 6 h 之内 cAMP 浓度缓慢升高, 6 ~8 h 之间迅速升高, 在 24 h 达最大值 (365.12 ± 32.29) $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结果见图 2。

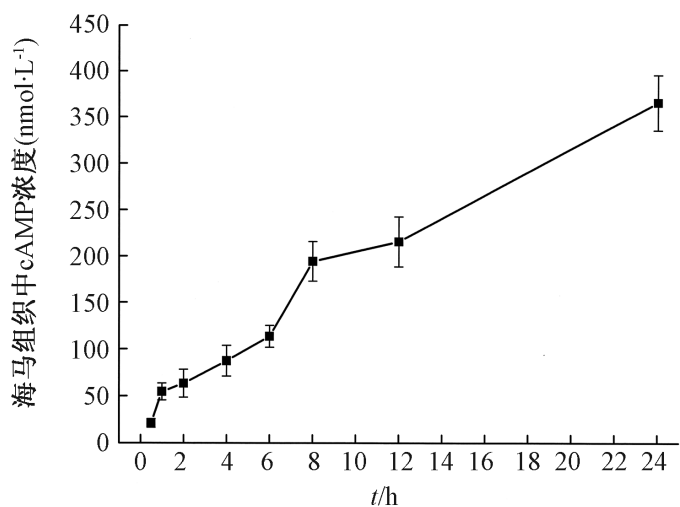


图 2 ig 大枣 $0.35\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后小鼠海马组织中 cAMP 的浓度

4 讨论

大枣是鼠李科植物枣树 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实^[6], 原产于中国。传统中医药理论认为, 大枣具有补中益气、养血安神的作用^[7]。现代研究认为含有大枣的中药复方如甘麦大枣汤、平郁胶囊等均具有良好的抗抑郁效果, 其中所含的 cAMP 一般被认为是发挥抗抑郁作用的主要有效成分。

cAMP 是第一个发现的第二信使, 通过激活依赖 cAMP 的蛋白激酶(PKA), 把调节信息带到细胞内特定的靶位, 从而起到调节酶的活性、基因表达、细胞分化等重要的生理作用^[8]。cAMP 的测定方法有很多种, 主要有 HPLC、放免法、酶联免疫法等, 其中酶免法(ELISA 法) 又分为竞争拮抗酶免法和荧光酶免法等。本实验测定血清和组织中 cAMP 的浓度主要采用的是荧光 ELISA 法, 该法操作简便快捷, 灵敏度高, 能够同时应用于大规模血清和组织样本中 cAMP 的测定。

本实验通过 ig 给予小鼠较高剂量的大枣提取

物, 测定不同时间点血清和海马组织中 cAMP 含量。实验结果发现 cAMP 浓度在血清和海马组织中存在明显差异: 血清中 cAMP 浓度迅速升高后逐渐下降, 而在海马组织中前 6 h cAMP 浓度缓慢升高, 6 h 以后开始快速升高。其原因可能是 ig 给药后药物迅速进入血液, 快速分布, 然后逐渐消除, 而由于血脑屏障的存在, 药物分布于脑内组织中需要一定的时间, 因此给与大枣提取物后海马组织中外源性 cAMP 是逐渐升高的。实验还发现测定结果中海马组织中 cAMP 的浓度明显高于血清中 cAMP 的浓度, 可能是因为我们测定的 cAMP 是内源性与外源性的总和, 而海马组织中内源性 cAMP 浓度远高于血液中。

体内参与 cAMP 降解的限速酶是特异性的磷酸二酯酶, 它能够将体内的 cAMP 水解为腺苷, 起到调节体内第二信使分子浓度的作用。从图 1 ~2 中可以看出血清中 cAMP 浓度在 8 ~12 h 内出现第 2 次升高, 海马组织中 cAMP 浓度在 6 ~8 h 内也出现快速升高的现象, 该结果提示大枣提取物中可能存在着另外一种或一类具有磷酸二酯酶抑制作用的物质, 能够在一定时间抑制磷酸二酯酶的活性, 导致 cAMP 浓度显著升高, 具体是什么样的物质具有这样的作用, 相关研究正在进行中。

[参考文献]

- [1] Murthy R S. The World Health Report 2001: Mental Health, New Understanding [C], New Hope: World Health Organization, 2001.
- [2] Tian JS, Cui Y L, Zhang Z G. PingYu Capsule activates cAMP/PKA/CREB signaling pathway in rat hippocampus: A possible mechanism for antidepressant-like effect [C], The 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Beijing, China, 2009, June 11.
- [3] 吴立坤, 张建军, 王景霞, 等. 平郁胶囊对慢性应激抑郁大鼠受体后信号传导通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1743.
- [4] 刘孟军, 王永惠. 枣和酸枣等 14 种园艺植物 cAMP 含量的研究[J]. 河北农业大学学报, 1991, 14(4): 20.
- [5] 张倩, 樊君, 罗云书. HPLC 测定陕北大枣和新疆大枣中环磷酸腺苷含量的研究[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(6): 895.
- [6] 中国药典[S]. 一部. 北京: 北京化工出版社. 2005: 16.
- [7] 樊君, 吕磊, 尚红伟. 大枣的研究与开发进展[J], 食品科学, 2003, 24(4): 161.
- [8] Daniel P B. Cyclic AMP signaling and gene regulation [J]. Annu Rev Nutr, 1998, (18): 353.

[责任编辑 聂淑琴]