



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101716170 A

(43) 申请公布日 2010.06.02

(21) 申请号 200910154161.5

(22) 申请日 2009.11.09

(71) 申请人 温州医学院

地址 325035 浙江省温州市温州茶山高教园
区温州医学院

(72) 发明人 潘建春 徐英 李高文 李善
尤文挺

(74) 专利代理机构 温州新瓯专利事务所 33210
代理人 陈旭宇

(51) Int. Cl.

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

原花青素用于制备治疗抑郁症药物的用途

(57) 摘要

本发明涉及原花青素用于制备治疗抑郁症药物的用途,经过动物实验证明原花青素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。

1. 原花青素用于制备治疗抑郁症药物的用途。

原花青素用于制备治疗抑郁症药物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及原花青素的一种新用途,特别是涉及原花青素用于制备治疗抑郁症药物的用途。

背景技术

[0002] 随着社会主义现代化进程的加快,各种应激因素导致的抑郁症已成为现代社会的常见病和多发病,其发病率正在快速攀升。据统计,目前全世界罹患抑郁症的患者占总人口的3% -5%。发病率高且难以根治的抑郁症正悄悄地构建可观的抗抑郁药市场,这正是近年来国内外对中枢神经系统药物的研究和开发特别活跃的主要原因之一。所以,研究和开发新型、高效、低毒副作用的抗抑郁药始终是精神药理学领域的一个重要研究课题。现有的各类化学合成的抗抑郁药虽具有肯定的疗效,但大多数存在抗抑郁谱窄、副作用大、药价高和易复发等缺点。因此,从植物中尤其是传统中草药中寻找高效、低毒的抗抑郁药成为此领域的一个新的研究方向。原花青素(Proanthocyanidins)是一种多酚类化合物,由5,7,3',4'-四羟基黄烷-三醇(5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-3-ol)聚合物构成,是由儿茶素、表儿茶素形成的聚合物。原花青素按其聚合度分为单聚体、低聚体和多聚体,其中二聚体至四聚体称低聚体(Olipomeric Procyanidins, OPC),五聚体到十聚体称多聚体(Polymeric Procyanidins PPC)。OPC为水溶性物质,易吸收;PPC为脂溶性物质,容易通过脑血屏障(blood brain barrier, BBB),水溶性较差。在各类原花青素中,二聚体分布最广,研究最多,是重要的一类原花青素。原花青素广泛存在于植物的种子、果实和树皮中。松树皮和葡萄籽中原花青素的含量最高,其中葡萄籽中可高达95%,目前对葡萄籽原花青素提取物的研究最多。药理学大量研究表明:葡萄籽原花青素提取物具有抗氧化、预防心脑血管疾病、保护肝脏、抑制肿瘤细胞发生等生物活性,对数十种植物的原花青素的低聚体和高聚体进行的药理学研究发现不同聚合度的原花青素有不同的功效,低聚物能够预防海尔默兹病,改善学习记忆,具有神经保护的作用,而对多聚物的中枢研究甚少,目前尚未见将原花青素用于治疗抑郁症的研究报道。

发明内容

[0003] 本发明的目的提供原花青素的一种新用途。

[0004] 经过动物实验发现原花青素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

[0005] 以下通过实施例说明本发明。

[0006] 实施例1:小鼠悬尾实验,强迫游泳实验,自主活动实验

[0007] 1、受试药物

[0008] 名称:原花青素(Proanthocyanidin)

[0009] 性状:褐色粉末,从葡萄籽中提取

[0010] 来源:购自天津尖峰天然产物研究开发有限公司,纯度>95%

[0011] 药物的配置:用0.5%浓度的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶解原花青素,分别配成12.5mg/kg,25mg/kg和50mg/kg三个剂量,按0.1ml/10g剂量给予小鼠灌胃口服。

[0012] 2、对照药物

[0013] 盐酸丙咪嗪(Imipramine):购自美国Sigma公司,临用前用双蒸水配置成10mg/kg浓度,按上述规格给予小鼠腹腔注射。

[0014] 3、动物及分组

[0015] ICR雄性小鼠,体重20-24g。温州医学院实验动物中心提供。

[0016] 动物随机分为5组,正常对照组,原花青素12.5mg/kg,25mg/kg和50mg/kg三个剂量组以及阳性对照药丙咪嗪组,每组动物12只。

[0017] 4、实验方法

[0018] ①小鼠悬尾实验:按照文献(SteruL, ChermatR, ThierryB, etal. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice[J]. Psychopharmacol, 1985, 85:367.)进行,给药后60min(原花青素)或者30min(丙咪嗪, ip),在距小鼠尾尖部末梢约2cm的部位用胶布固定于铁架台上,使小鼠头向下悬挂,倒挂于箱子(30cm×30cm×25cm)中,头部距离箱底15cm。开始时,小鼠头部上下左右活动,企图找到攀抓的地方,一段时间后因失望而活动次数减少,即出现间断性不动。观察6min内实验动物行为,并记录后4min内小鼠的不动时间。

[0019] ②小鼠强迫游泳实验:按照文献(Porsolt, RD, Bertin, A, JalfreM, etal. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants[J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977, 229:327.)进行,正式测试前24h,将小鼠置于水深10cm的玻璃大烧杯(1500ml)中,水温(24±1)℃,作游泳训练15min。给药后60min(原花青素)或者30min(丙咪嗪, ip),再次将小鼠置于水深10cm的玻璃大烧杯内强迫游泳6min,观察记录后4min内小鼠的不动时间。小鼠放入水中后即游泳,寻找栖息的地方,一段时间后便因失望而漂浮不动,当小鼠停止挣扎,浮在水中保持不动,或仅作一些必要的轻微动作保持头部浮在水面上的时间视为不动时间。

[0020] ③小鼠自发活动实验:按照文献(Li J X, Zhang Q, Liang J H, etal. Valproate prevents the induction, but not the expression of morphine sensitization in mice[J]. Behav Brain Res, 2004, 52:251.)进行,给药后60min(原花青素, ig)或者30min(丙咪嗪, ip)后将小鼠放入自主活动测试仪的小室内,由内置的摄像头拍摄记录小鼠活动。小鼠适应环境10min后,记录10min内小鼠的活动次数作为自主活动的评价指标。

[0021] 5、数据统计处理

[0022] 结果数据用均数±标准差表示,用SPSS11.0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。

[0023] 6、结果统计

[0024] ①小鼠悬尾实验结果:

[0025]

组别	剂量 (mg/kg)	第一天悬尾不动时间 (s)	第七天悬尾不动时间 (s)
正常组		108.6±12.3	119.0±9.2
原花青素组	12.5	112.2±6.0	99.7±10.2
	25	97.6±9.5	82.4±4.8**
	50	94.2±9.1	76.4±6.1**
丙咪嗪组	10	58.3±10.6***	42.4±5.6***

[0026] 注:与正常组相比,*P < 0.05,**P < 0.01,***P < 0.001

[0027] ②小鼠强迫游泳实验结果:

[0028]

组别	剂量 (mg/kg)	第一天游泳不动时间 (s)	第七天游泳不动时间 (s)
正常组		107.6±5.3	101.0±5.6
原花青素组	12.5	109.0±6.0	78.2±7.6*
	25	98.6±8.5	67.4±7.8**
	50	92.2±4.1	61.4±10.2***
丙咪嗪组	10	48.3±4.6***	43.4±5.0***

[0029] 注:与正常组相比,*P < 0.05,**P < 0.01,***P < 0.001

[0030] ③小鼠自发活动实验结果:

[0031]

组别	剂量 (mg/kg)	第一天自主活动格数 (每格 8cm)	第七天自主活动格数(每格 8cm)
正常组		121.5±15.2	112.0±23.0
原花青素组	12.5	123.8±22.1	120.2±25.6
	25	119.3±30.2	114.4±34.8
	50	118.6±21.2	118.4±27.1
丙咪嗪组	10	114.0±20.6	114.4±24.0

[0032] 实施例2:小鼠单胺氧化酶,单胺递质及其代谢物含量测定

[0033] 1、受试药:同实施例1

[0034] 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),二羟苯乙酸(DOPAC)均购自美国Sigma公司。吗氯贝胺由军事医学科学院毒物与药物研究所提供,纯度为95%。

[0035] 3、实验方法

[0036] ①单胺氧化酶的测定:

[0037] 给药后60min(原花青素, p. o.)或30min(丙咪嗪, i. p.),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冰冷磷酸缓冲液(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38℃预孵育10min,在反应液中加入30μl 2.19mmol/L底物(终浓度为22μmol/L),37℃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。

[0038] ②单胺递质及其代谢物含量测定:

[0039] 给药后 60min(原花青素, p.o.) 或 30min(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、海马和下丘脑, 称重后放入 Eppendorf 管中, 置于 -80℃ 冰箱中保存。

[0040] 每 100mg 脑组织中加入 200 μl 冰冷 A 液 (0.4mol/L HClO₄), 冰浴中超声匀浆, 4℃ 避光静置 60min, 离心 20min (12,000rpm, 4℃), 取上清液, 加入半量体积的 B 液 (0.2mol/L 柠檬酸钾, 0.3mol/L K₂HPO₄ 和 0.2mol/L EDTA), 涡旋混匀 10min, 4℃ 避光静置 60min, 再次离心 20min (12,000rpm, 4℃), 取上清液进行单胺测定。

[0041] 脑组织中 5-HT、NA、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 μm) 处理后, 取 20 μl 自动进样。色谱柱为 Diamonsil C18 (150×4.6mm I.D., 5 μm), 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。

[0042] 4、实验结果:

[0043] ①小鼠脑内单胺氧化酶活性的测定 (n = 8, 均数 ± 标准差)

[0044]

组别	剂量 (mg/kg)	单胺氧化酶 A 活性 (nmol / 30 min / mg protein)	单胺氧化酶 B 活性 (nmol / 30 min / mg protein)
正常组		55.6±1.3	191.0±3.0
原花青素组	12.5	51.0±2.0*	186.2±5.6
	25	49.6±1.5**	174.4±4.8*
	50	47.2±1.1**	171.4±7.1*
马氯吡胺组	20	15.3±0.6***	194.4±4.0

[0045] 注: 与正常组相比, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

[0046] ②小鼠不同脑区单胺递质及其代谢产物含量测定

[0047] 表一: 原花青素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 ± 标准差)

[0048]

组别	剂 量 (mg/k g)	额叶皮层 (ng/g)				
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-H T	Noradrenaline	Dopamine
正常组		515.3±28.2	125.5±13.5	0.24±0.02	273.9±15.5	17.4±3.3
原花青素组	12.5	520.5±28.1	123.2±9.4	0.24±0.02	274.3±17.2	19.0±2.7
	25	605.6±22.2*	125.1±14.2	0.21±0.02	299.0±18.9	23.3±2.5
	50	628.8±24.0**	113.8±6.3	0.18±0.01*	334.9±24.4*	29.3±4.6*
丙咪嗪组	10	609.9±24.4*	112.4±6.4	0.18±0.01*	338.5±21.8*	19.6±2.1

[0049] 注:与正常组比较,*P < 0.05,**P < 0.01

[0050] 表二:原花青素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 ± 标准差)

[0051]

组别	剂 量 (mg/k g)	海马(ng/g)				
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-H T	Noradrenaline	Dopamine
正常组		615.9±22.1	195.1±10	0.32±0.02	283.7±12.4	23.6±4.1
原花青素组	12.5	635.5±14.7	184.7±9	0.29±0.01	271.8±18.5	22.6±2.4
	25	692.0±24.3*	174.8±9	0.25±0.01**	281.5±19.7	30.5±3.6
	50	708.5±19.9**	179.9±13.6	0.25±0.01**	342.0±15.9*	36.1±3.3*
丙咪嗪组	10	702.4±20.8**	180.2±11.7	0.26±0.02**	349.6±27.8*	34.1±2.4*

[0052] 注:与正常组比较,*P < 0.05,**P < 0.01

[0053] 表三:原花青素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 ± 标准差)

[0054]

组别	剂 量 (mg/k g)	下丘脑 (ng/g)				
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-H T	Noradrenaline	Dopamine
正常组		424.4±23.3	94.9±7.4	0.22±0.01	299.4±19.3	16.1±1.8
原花青素组	12.5	426.3±26.7	92.6±11.7	0.22±0.02	302.0±21.2	18.4±2.0
	25	493.8±13.7*	103.5±8.6	0.21±0.02	317.1±16.6	21.1±2.0
	50	549.5±20.5**	96.8±6.3	0.18±0.03	345.4±12.2	20.9±1.6
丙咪嗪组	10	510.0±28.7*	89.0±13.5	0.17±0.02*	368.0±21.8*	17.5±2.7

[0055] 注:与正常组比较,*P < 0.05,**P < 0.01

[0056] 上述实验采用小鼠悬尾和强迫游泳模型,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原花青素的抗抑郁作用,结果显示,给药1天和7天后,原花青素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。原花青素能抑制单胺氧化酶A的活性,对单胺递质合成和代谢的影响是原花青素抗抑郁作用的机制之一。