

百花花楸果中 β -谷甾醇及其衍生物的制备及抗抑郁活性研究[△]

刘晓峰^{1*}, 曹馨元¹, 尹永霞², 王波¹, 黄文华^{1#}(1.宁夏回族自治区人民医院药学部, 银川 750002; 2.吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

中图分类号 R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)01-0064-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.12

摘要 目的:制备百花花楸果中 β -谷甾醇(简称为“Sit”)及其衍生物,并考察其抗抑郁活性。方法:以百花花楸果实为原料,经过75%乙醇和20%KOH溶液提取,并经萃取结晶后得到Sit。以Sit的C3位羟基作为结构修饰位点,以二氯甲烷为反应溶剂、4-二甲氨基吡啶为催化剂、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺为脱水剂,分别加入4种有机酸(水杨酸、2-四氢糠酸、苯丙氨酸、山梨酸),通过羧合反应生成相应的酯类衍生物Sit-S、Sit-T、Sit-P、Sit-Sr,并采用红外和核磁共振等波谱技术鉴定其化学结构。根据悬尾实验和强迫游泳实验初步探讨Sit及其4种衍生物的抗抑郁活性,然后再根据悬尾实验和自发运动能力实验筛选抗抑郁活性较好的化合物的有效剂量。将筛选出的该化合物单用以及分别与阿戈美拉汀[40 mg/kg, 5-羟色胺(5-HT)和5-HT_{2C}受体拮抗剂]、氟哌啶醇[0.2 mg/kg, 非选择性D₂受体拮抗剂]和荷包牡丹碱[4 mg/kg, 竞争性 γ -氨基丁酸(GABA)拮抗剂]联用,腹腔注射给药60 min后,进行悬尾实验,然后通过酶联免疫吸附法检测小鼠脑组织中5-HT、多巴胺(DA)、GABA水平,初步探索该化合物的抗抑郁作用机制。实验均设置空白对照组,腹腔注射等量10%丙二醇溶液。结果:经波谱技术鉴定,Sit与4种有机酸成功地反应生成了相应的酯类衍生物。在Sit及其4种衍生物中,Sit-S组小鼠在悬尾实验和强迫游泳实验中的不动时间均最短,且显著短于空白对照组($P < 0.05$)。Sit-S的筛选结果显示,其抗抑郁的有效剂量为4 mg/kg,且与空白对照组比较不影响小鼠的自发活动($P > 0.05$)。该剂量作用下,Sit-S可显著缩短小鼠在悬尾实验中的不动时间($P < 0.01$),显著提高小鼠脑组织中5-HT、DA和GABA水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但该作用效果可被阿戈美拉汀、氟哌啶醇和荷包牡丹碱不同程度地逆转。结论:Sit的水杨酸酯衍生物Sit-S具有良好的抗抑郁活性,其作用机制可能是通过提高脑组织中5-HT、DA和GABA水平所介导的。

关键词 百花花楸果; β -谷甾醇;衍生物;抗抑郁活性

Preparation and Antidepressant Activity Study of β -sitosterol and Its Derivatives from the Fruit of *Sorbus pohuashanensis*

LIU Xiaofeng¹, CAO Xinyuan¹, YIN Yongxia², WANG Bo¹, HUANG Wenhua¹(1. Dept. of Pharmacy, Ningxia Hui Autonomous Region People's Hospital, Yinchuan 750002, China; 2. Chinese Medicine Material College, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare β -sitosterol (shorted for “Sit”) and its derivatives from the fruit of *Sorbus pohuashanensis*, and to investigate their antidepressant activities. METHODS: Using the fruit of *S. pohuashanensis* as raw material, extracted with 75% ethanol and 20% KOH solution, Sit was obtained after extraction and crystallization. C3 hydroxyl group of Sit was used as the structural modification site, CH₂Cl₂ was used as the reaction solvent, DMAP was used as catalyst, EDCI was used as dehydrating agent, 4 kinds of organic acids (salicylic acid, 2-tetrahydrofuranic acid, phenylalanine, sorbic acid) were added to make the carboxylation reaction to produce ester derivatives Sit-S, Sit-T, Sit-P and Sit-Sr. The chemical structure of its derivatives were elucidated by IR and NMR. The tail suspension test and the forced swimming model were used to preliminarily explore the antidepressant active components of Sit and 4 kinds of derivatives; tail suspension test and the spontaneous exercise capacity test were used to screen effective dose of the compounds with antidepressant active. The compound was used alone or in combination with agomelatine [40 mg/kg, 5-hydroxytryptamine (5-HT) and 5-HT_{2C} receptor antagonist], haloperidol [0.2 mg/kg, non-selective D₂ receptor antagonist] and bicuculline [4 mg/kg, competitive γ -aminobutyric acid (GABA) antagonist], respectively. Sixty minutes after intraperitoneal injection, tail suspension test was performed. The levels of 5-HT, dopamine (DA) and GABA in brain tissues of mice were detected by ELISA. The blank control group was given intraperitoneal injection of 10% propylene glycol solution. RESULTS: By spectrum technology, the corresponding ester compounds were synthesized by the reaction of Sit with four kinds of organic acids. Among Sit and its four derivatives, the immobility time of Sit-S group was the shortest in tail suspension test and forced swimming test, which was significantly shorter than that of blank control group ($P < 0.05$). Screening results of Sit-S

[△] 基金项目:宁夏自然科学基金资助项目(No.2018AAC03273)

* 副主任药师, 硕士。研究方向:医院药学、药物代谢。E-mail: liuxf04@126.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。E-mail: huangwenhua1666@163.com

showed that the effective antidepressant dose was 4 mg/kg, and it did not affect the spontaneous activity of mice compared with the blank control group ($P > 0.05$). With this dose, Sit-S could significantly shorten the immobility time of mice in tail suspension test ($P < 0.01$), and can significantly increase the

levels of 5-HT, DA and GABA in the brain tissue of mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but its effect can be reversed by agomelatine, haloperidol and bicuculline to different extent. CONCLUSIONS: Sit salicylate derivatives Sit-S exhibits good antidepressant activity, and its mechanism of action may be mediated by increasing the levels of 5-HT, DA and GABA.

KEYWORDS Fruit of *Sorbus pohuashanensis*; β -sitosterol; Derivative; Antidepressant activities

植物甾醇是稳定植物细胞膜磷脂双分子层的必需类固醇分子,其结构与胆固醇相似,是一大批具有良好生物活性的成分,主要包括 β -谷甾醇(β -Sitosterol, 简称为“Sit”)、豆固醇、菜油甾醇等^[1-4]。由于植物甾醇可降低胆固醇水平,故引起了人们极大的兴趣^[5]。但植物甾醇是由亲脂的甾体母核及17位脂肪侧链组成,且常存在烯炔及3-羟基结构,故纯植物甾醇在水或油中的溶解度有限,其不溶于水,且几乎不溶于油脂,这也大大地限制了其应用^[6-7]。为了克服这个问题,许多研究者将目光集中在植物甾醇的化学结构修饰上。

抑郁症作为一种严重的情感性精神障碍疾病,全世界范围内人群的患病率已达15%~17%,其发病机制与中枢神经系统炎症密切相关^[8]。目前临床使用的抗抑郁药多是化学药物,包括单胺氧化酶抑制剂(MAOI)、选择性去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRIs)、选择性5-羟色胺(5-HT)再摄取抑制剂(SSRIs)和三环抗抑郁药(TCAs)等^[8],但这些药物仅能改善抑郁症表面的某些症状,并具有严重的副作用。因此,迫切需要探索一种自然、安全、有效的新型抗抑郁疗法。

蔷薇科花楸属植物百花花楸 *Sorbus Pohuashanensis* Hedl. 主产自我国黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等地区^[9]。《长白山植物药志》记载:“百花花楸果可镇咳祛痰,健脾利水”^[10]。民间常用百花花楸果治疗咳嗽、慢性气管炎、肺结核以及水肿等疾病^[11]。有研究发现,首发青年抑郁障碍患者血清中总胆固醇水平的高低与其认知功能关系密切^[12-13]。而本项目组前期研究发现,百花花楸果中富含可降低胆固醇水平的Sit。因此,本项目组拟从百花花楸果中提取制备Sit,并进一步选择其C3位羟基作为结构修饰位点,与有机酸发生羧合反应制备一系列Sit衍生物,从而改善Sit的溶解度,并对相应衍生物的抗抑郁作用及机制进行初步研究,以期发现可用于抑郁临床治疗的先导化合物。

1 材料

1.1 仪器

ALPHA II型傅里叶红外光谱(IR)仪[布鲁克(北京)科技有限公司]; Bruker AM-400型核磁共振(NMR)仪(德国Bruker公司); Spectra MAX 190型酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司); CXTM-3000型高效液相色谱(HPLC)仪(北京创新通恒科技有限公司); Avanti TM J-301型离心机(美国Beckman公司); JHD-001型氮吹仪(上海极恒实业有限公司); XW-80A型漩涡混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); KQ-250B型数控超声

波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9140A型恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); ZZ-6型小鼠自主活动仪(上海益联医学仪器发展有限公司); ABS-4N型分析天平(上海岛韩实业有限公司); DY89-1型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

百花花楸果采自吉林农业大学药用植物园,经吉林农业大学中药材学院赵岩教授鉴定为真品; Sit标准品(上海源叶生物科技有限公司,批号: B20273, 纯度: 98.5%); 氟哌啶醇片(宁波大红鹰药业股份有限公司,批号: 160605, 规格: 2 mg); 阿戈美拉汀片(江苏豪森药业股份有限公司,批号: H1528155, 规格: 25 mg); 荷包牡丹碱对照品(湖北巨胜科技有限公司,批号: FS-00142, 纯度: >98%); γ -氨基丁酸(GABA)、5-HT、多巴胺(DA)酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(美国R&D Systems公司,批号: ELK1513、YM-qw3174、ELK7879); 2-四氢糠酸(北京百灵威科技有限公司,批号: LT50N33); N-Boc-L-苯丙氨酸(上海毕得医药科技有限公司,批号: APA447); 4-二甲基氨基吡啶(DMAP)、山梨酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号: I1912065、31977); 水杨酸(国药集团化学试剂有限公司,批号: 30073424); 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI, 上海思域化工科技有限公司,批号: A01141020); 甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为纯化水。

1.3 动物

健康ICR小鼠312只, SPF级, 雄性, 体质量(18±20) g, 购自长春亿斯实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号为SCXK(吉)2018-0023。实验期间小鼠自由进食、饮水, 控制环境温度为(25±1)℃、湿度为(55±5)%, 并维持正常昼夜节律。将小鼠适应性饲养1周后用于实验。本研究方案由吉林农业大学动物保护和使用委员会批准。

2 方法与结果

2.1 Sit的制备

称取干燥百花花楸果实粉末适量, 按料液比1:3(g/mL)加入75%乙醇, 超声(功率: 250 W, 频率: 40 kHz)提取2 h后, 真空浓缩, 回收乙醇溶剂; 待残余的乙醇挥发完毕后, 将浓缩液置于80℃干燥箱中烘干, 然后加入20% KOH水溶液10 mL, 90℃水浴下加热回流提取1.5 h。待其冷却后移入分液漏斗中, 加适量乙醚萃取3次; 合并乙醚萃取液, 回收乙醚, 蒸干得黄色膏状物。

将上述黄色膏状物以适量95%乙醇加热溶解,然后置于4℃冰箱中,析出的白色晶体即为Sit粗品;再经80%乙醇反复重结晶后,得到纯化后的Sit(产率为2.32%)^[14]。

2.2 Sit的鉴定和纯度检测

采用HPLC法进行检测。色谱条件:色谱柱为Agilent ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(98:2, V/V);柱温:40℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;进样量:10 μL。将Sit样品和Sit标准品分别以甲醇溶解,制备成质量浓度均为0.1 mg/mL的溶液,分别按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,并根据峰面积归一化法计算Sit的纯度。结果,制备的Sit样品与Sit标准品具有相同的保留时间,Sit样品的纯度为98.2%。色谱图见图1。

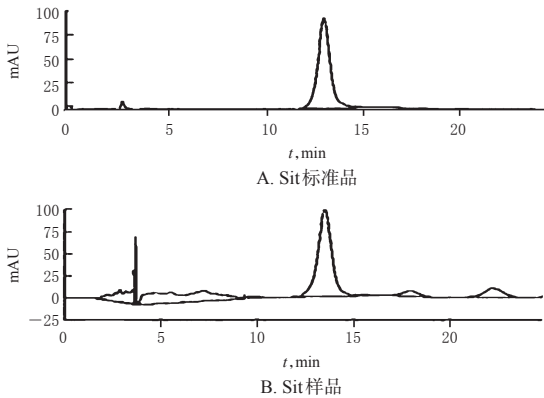


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3 Sit衍生物的合成

按照文献报道的方法^[15],本研究选用二氯甲烷为反应溶剂、DMAP为催化剂、EDCI为脱水剂,分别加入不同有机酸(水杨酸、2-四氢糠酸、苯丙氨酸、山梨酸),使之发生羧酸反应生成酯类化合物。以水杨酸β-谷甾醇酯(Sit-S)为例的合成过程:将水杨酸41.4 mg和Sit 83.0 mg在5 mL二氯甲烷中混合后,加入脱水剂EDCI 76.8 mg脱水10 min后,加入催化剂DMAP 7.4 mg,将该溶液加热回流6 h;减压除去溶剂,将残余物先在常温下通过硅胶254色谱柱洗脱,然后再采用石油醚-二氯甲烷-乙酸乙酯(7:7:1, V/V/V)洗脱,得到浅黄色油状胶体(95.8 mg),即为Sit-S。同法制备2-四氢糠酸、苯丙氨酸、山梨酸与Sit生成的酯类衍生物Sit-T、Sit-P、Sit-Sr。通过HPLC法确定4种衍生物的纯度均大于98%。Sit的母核及其衍生物的结构见图2。

2.4 Sit衍生物的结构确证

采用傅里叶变换红外光谱法(IR)和核磁共振氢谱(¹H-NMR)、碳谱(¹³C-NMR)等技术对化合物进行结构确证。

2.4.1 Sit-T 分子式为C₃₄H₅₆O₄,分子量为528。IR光谱:2 964~2 888 cm⁻¹处有饱和烷烃的碳氢单键伸缩振

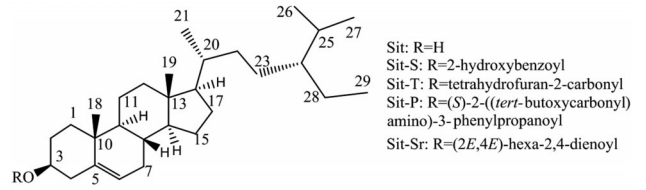


图2 Sit的母核及其衍生物的结构

Fig 2 Mother nucleus of Sit and the structure of its derivatives

动信号(ν_{CH}),提示存在饱和烷烃基团;1 738 cm⁻¹处有羰基碳氧双键的伸缩振动信号($\nu_{C=O}$),提示存在羰基;1 629 cm⁻¹处有碳碳双键的伸缩振动信号,提示存在碳碳双键($\nu_{C=C}$);1 384、1 372 cm⁻¹处有甲基碳氢变形振动信号,提示有多个甲基存在。¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 5.377(d, 1H, $J=4.8$ Hz, 6-H), 4.681(m, 1H, 2''-H), 4.433(m, 1H, 3-H), 4.025(dd, 1H, $J=7.2, 14.4$ Hz, 5''-Ha), 3.940(m, 1H, 5''-Hb), 1.010(s, 3H, 10-CH₃), 0.922(d, 3H, 2'-CH₃), 0.859(t, 3H, 5'-CH₃), 0.813(d, 6', 6'-CH₃), 0.668(s, 3H, 13-CH₃); 2.343~0.753处的信号为甾体母核、甾体17侧链和2-四氢糠酸中其他饱和碳上的氢信号。¹³C-NMR(75 MHz, CDCl₃) δ : 172.67(C1'), 139.41(C5), 122.68(C6), 76.79(C2''), 74.33(C3), 69.17(C5''), 56.63(C14), 56.01(C17), 49.99(C9), 45.82(C24), 42.25(C13), 39.67(C12), 37.95(C4), 36.89(C1), 36.51(C10), 36.06(C20), 33.91(C22), 31.81(C3''), 30.12(C7, 8), 29.16(C25), 28.13(C2), 27.63(C23), 26.13(C15), 25.09(C4''), 24.20(C16), 23.04(C28), 20.96(C11), 19.70(C26), 19.20(C27), 18.98(C21), 18.70(C18), 11.89(C29), 11.76(C19)。

2.4.2 Sit-P 分子式为C₃₇H₅₉NO₃,分子量为565。IR光谱:3 450 cm⁻¹处有氨基氮氢单键的伸缩振动信号,提示有氨基存在;3 044 cm⁻¹处有碳氢键伸缩振动信号,提示有碳氢键的存在;1 734、1 722 cm⁻¹处有羰基碳氧双键伸缩振动信号,提示有羰基存在;1 670 cm⁻¹处有双键碳碳骨架伸缩振动信号,提示甾体母核中有双键的存在;1 384、1 370 cm⁻¹处有甲基碳氢变形振动信号,提示有多个甲基存在。¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 7.311(m, 2H, 3', 5'-H), 7.276(m, 2H, 2', 6'-H), 7.140(m, 1H, 4'-H), 5.371(d, 1H, $J=4.8$ Hz, 6-H), 5.034(d, 1H, $J=8.1$ Hz, 2'-NH), 4.642(m, 1H, 3-H), 3.080(m, 1H, 2'-H), 1.416[s, 3H, 1'''-(CH₃)₃], 1.001(s, 3H, 18-H), 0.936(d, 3H, $J=6.6$ Hz, 21-H), 0.873(t, 3H, $J=7.2$ Hz, 29-H), 0.828(d, 6H, $J=6.6$ Hz, 26, 27-H), 0.679(s, 3H, 19-H); 2.383~0.767处的信号为甾体母核、甾体17侧链和2-丁基羰基氨基苯丙酸基团中其他饱和碳上的氢信号。¹³C-NMR(75 MHz, CDCl₃) δ : 171.14(C1'), 154.98(C1'''), 139.30(C5), 136.06(C1''), 129.36(C3'', 5''), 128.34(C2'',

6"), 126.82(C4"), 122.78(C6), 79.62(C1""), 73.52(C3), 56.59(C14), 55.95(C17), 54.46(C2'), 49.92(C9), 45.74(C24), 42.22(C13), 39.63(C12), 37.83(C4), 36.91(C3'), 36.82(C1), 36.47(C10), 36.07(C20), 33.85(C22), 31.81(C7), 31.76(C8), 29.07(C25), 28.23[C1""-(CH₃)₃], 28.17(C2), 27.59(C23), 25.99(C15), 24.21(C16), 22.99(C28), 20.94(C11), 19.76(C26), 19.20(C27), 18.98(C21), 18.71(C18), 11.91(C29), 11.78(C19)。

2.4.3 Sit-Sr 分子式为C₃₅H₅₆O₃, 分子量为524。IR光谱: 3 075 cm⁻¹处有碳氢伸缩振动信号, 提示有碳氢键的存在; 2 975~2 877 cm⁻¹处有饱和烷烃的碳氢单键伸缩振动信号(ν_{CH}), 提示有饱和烷烃基存在; 1 733 cm⁻¹处有羰基碳氧双键伸缩振动信号, 提示有羰基的存在; 1 644 cm⁻¹处有碳碳双键骨架伸缩振动信号, 提示甾体母核中有双键存在; 1 383、1 369 cm⁻¹处有甲基碳氢变形振动信号, 提示有多个甲基存在。¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 7.259(dd, 1H, $J=9.9, 15.3$ Hz, 3'-H), 6.213(dd, 1H, $J=9.9, 15.3$ Hz, 4'-H), 5.759(d, 1H, $J=15.3$ Hz, 2'-H), 5.367(m, 1H, 6-H), 5.357(m, 1H, 5'-H), 4.675(m, 1H, 3-H), 1.839(d, 3H, $J=5.7$ Hz, 6'-H), 1.011(s, 3H, 18-H), 0.914(d, 3H, $J=6.3$ Hz, 21-H), 0.851(t, 3H, $J=7.2$ Hz, 29-H), 0.806(d, 6H, $J=6.6$ Hz, 26, 27-H), 0.661(s, 3H, 19-H); 2.347~0.745处的信号为甾体母核、甾体17侧链和(2E, 4E)-己烷-2, 4-二壬基中其他饱和碳上的氢信号。¹³C-NMR(75 MHz, CDCl₃) δ : 166.67(C=O), 144.68(C3'), 139.70(C5), 139.00(C5'), 129.77(C4'), 122.54(C6), 119.43(C2'), 73.67(C3), 56.64(C14), 55.98(C17), 49.98(C9), 45.78(C24), 42.26(C13), 39.68(C12), 38.17(C4), 36.98(C1), 36.57(C10), 36.11(C20), 33.88(C22), 31.86(C7), 31.82(C8), 29.09(C25), 28.21(C2), 27.82(C23), 26.01(C15), 24.25(C16), 23.01(C28), 20.98(C11), 19.78(C26), 19.29(C27), 18.99(C21), 18.73(C18), 18.60(C6'), 11.94(C29), 1.81(C19)。

2.4.4 Sit-S 分子式为C₃₆H₅₄O₄, 分子量为550。IR光谱: 3 450 cm⁻¹处有羟基氢氧伸缩振动信号, 提示有羟基存在; 3 080 cm⁻¹处有碳氢化合物伸缩振动信号, 提示有饱和烷烃基团的存在; 2 964~2 876 cm⁻¹处有饱和烷烃的碳氢单键伸缩振动信号(ν_{CH}), 提示有饱和烷烃基团存在; 1 724 cm⁻¹处有羰基碳氧双键伸缩振动信号, 提示有羰基存在; 1 614 cm⁻¹处有双键碳碳骨架伸缩振动信号, 提示甾体母核中有双键的存在; 1 604、1 582 cm⁻¹处有碳碳双键伸缩振动信号($\nu_{\text{Ac}}=\text{C}$), 提示有苯环存在; 1 384、1 372 cm⁻¹处有甲基碳氢变形振动信号, 提示有多个甲基存在。¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 10.836(s, 1H, 2"-H), 7.781(dd, 1H, $J=1.5, 7.8$ Hz, 6"-H), 7.377(dt, 1H,

$J=1.5, 7.8$ Hz, 5"-H), 6.896(dd, 1H, $J=0.9, 8.4$ Hz, 3"-H), 6.807(dt, 1H, $J=0.9, 8.4$ Hz, 4"-H), 5.356(d, 1H, $J=4.5$ Hz, 6-H), 4.818(m, 1H, 3-H), 0.988(s, 3H, 10-CH₃), 0.864(d, 3H, 2'-CH₃), 0.798(t, 3H, 5'-CH₃), 0.752(d, 6', 6'-CH₃), 0.612(s, 3H, 13-CH₃); 2.403~0.630处的信号为甾体母核、甾体17侧链中其他饱和碳上的氢信号。¹³C-NMR(75 MHz, CDCl₃) δ : 168.60(1'), 160.76(C2"), 138.30(C5), 134.39(C4"), 128.86(C6"), 122.08(C6), 117.90(C5"), 116.51(C3"), 111.90(C1"), 74.26(C3), 55.70(C14), 55.11(C17), 49.09(C9), 44.89(C24), 42.134(C13), 38.75(C12), 37.11(C4), 35.99(C1), 35.64(C10), 35.15(C20), 32.99(C22), 30.93(C7), 30.89(C8), 28.25(C25), 27.23(C2), 26.80(C23), 25.22(C15), 23.30(C16), 22.12(C28), 20.07(C11), 18.80(C26), 18.33(C27), 18.08(C21), 17.80(C18), 10.99(C29), 10.86(C19)。

2.5 Sit及其衍生物对抑郁模型小鼠的抗抑郁活性考察

本课题组前期预实验结果显示, Sit-T、Sit-P、Sit-Sr和Sit-S在1~20 mg/kg的剂量范围内均有一定的抗抑郁样活性, 故本研究初步选取2.5、10 mg/kg作为给药剂量, 考察Sit及其4种衍生物的抗抑郁活性。分别取2批小鼠(每批88只), 均随机分为空白对照组(10%丙二醇溶液)和Sit及其4个衍生物(Sit-T、Sit-P、Sit-Sr、Sit-S)的低、高剂量组(剂量均为2.5、10 mg/kg, 以10%丙二醇溶液为溶剂溶解), 每组8只。各组小鼠均腹腔注射给药, 给药体积均为1.0 mL。给药1 h后, 各取1批小鼠分别进行悬尾实验和强迫游泳实验^[16-17]。(1)悬尾实验: 将小鼠的尾巴悬挂固定在一个距离地面约40 cm的水平杆上, 小鼠头部朝下呈倒悬状。每只小鼠均用不透明的硬纸板隔开, 小鼠距离其周围空间不少于15 cm。观察小鼠的扭攀挣扎情况, 当其四肢静止不动时, 记录其不动时间。(2)强迫游泳实验: 将小鼠单独放置在一个水位高15 cm的开放型玻璃瓶(14 cm×30 cm×25 cm)内, 水温为(24±2) °C。从小鼠入水后开始计时, 总实验时间为6 min, 记录后4 min内小鼠的持续不动时间(即小鼠在水中停止挣扎或呈漂浮状态, 仅使头部露出水面的不动时间)。上述不动时间越长, 表明小鼠抑郁状况越严重。采用SPSS 19.0软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。各组小鼠悬尾实验和强迫游泳实验的不动时间测定结果见表1。

结果显示, 与空白对照组比较, Sit低剂量组, Sit-T低剂量组, Sit-P低、高剂量组, Sit-Sr低剂量组和Sit-S低、高剂量组小鼠在悬尾实验中的不动时间显著缩短($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而Sit高剂量组小鼠在悬尾实验

表1 各组小鼠的不动时间测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Immobility time of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	悬尾实验静止不动时间,s	强迫游泳实验不动时间,s
空白对照组	122.46 ± 12.77	155.72 ± 12.12
Sit-低剂量组	85.24 ± 10.08*	114.24 ± 13.25
Sit-高剂量组	197.52 ± 9.87*	135.78 ± 3.92
Sit-T低剂量组	86.36 ± 5.62*	95.27 ± 15.17*
Sit-T高剂量组	135.64 ± 8.74	117.89 ± 8.76
Sit-P低剂量组	67.75 ± 3.82*	97.13 ± 9.83
Sit-P高剂量组	92.19 ± 6.09*	116.49 ± 9.78
Sit-Sr低剂量组	56.92 ± 4.25**	91.22 ± 6.16*
Sit-Sr高剂量组	115.77 ± 4.57	115.95 ± 9.54
Sit-S低剂量组	41.18 ± 4.54**	85.58 ± 16.24*
Sit-S高剂量组	72.39 ± 3.21*	101.23 ± 11.15*

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. blank control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

中的不动时间显著延长($P < 0.05$); Sit-T低剂量组, Sit-Sr低剂量组和 Sit-S低、高剂量组小鼠在强迫游泳实验中的不动时间显著缩短($P < 0.05$)。结果提示,衍生物 Sit-S 对小鼠不动时间影响最为显著,故后续研究中重点对 Sit-S 的抗抑郁作用进行考察。

2.6 Sit-S 抗抑郁有效剂量的筛选

分别另取2批小鼠(每批48只),均随机分为空白对照组(10%丙二醇溶液)和 Sit-S 不同剂量组(0.5、1、2、4、6 mg/kg,以10%丙二醇溶液为溶剂制备),每组8只。各组小鼠均腹腔注射给药,给药体积均为1.0 mL。给药1 h后,各取1批小鼠分别进行悬尾实验和自发运动能力测试实验^[18]。(1)悬尾实验:方法同“2.5”项下,测定各组小鼠的不动时间。(2)自发运动能力测试实验:将小鼠放置于小鼠自主活动测试仪器中,观察每只小鼠在黑暗、安静的环境中的自发运动活性。在小鼠适应3 min后,观察并记录其在后续4 min内的自主活动次数。按照“2.5”项下统计学方法进行数据分析。各组小鼠的不动时间和4 min内的自主活动次数测定结果见表2。

表2 各组小鼠的不动时间和4 min内的自主活动次数测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Immobility time and autonomous activity times within 4 min of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/kg	不动时间,s	4 min内的自主活动次数,次
空白对照组		127.57 ± 7.51	205.26 ± 5.94
Sit-S组	0.5	131.42 ± 7.43	195.53 ± 8.22
	1	114.98 ± 8.58	208.14 ± 8.47
	2	96.76 ± 4.57*	200.02 ± 9.59
	4	62.25 ± 8.29**	214.76 ± 9.12
	6	71.33 ± 3.68**	203.72 ± 7.55

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. blank control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

结果显示,与空白对照组比较,2、4、6 mg/kg Sit-S 组小鼠的不动时间均显著缩短($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而4

min内的活动次数差异均无统计学意义($P > 0.05$)。这提示,2、4、6 mg/kg 剂量下,Sit-S 具有较好的抗抑郁作用,并且不会影响小鼠的自主活动,其中以4 mg/kg 剂量的效果最好,故本项目组后续选择此剂量进行作用机制研究。

2.7 Sit-S 抗抑郁作用的机制研究

将剩余40只小鼠随机分为空白对照组(10%丙二醇溶液)、Sit-S组(4 mg/kg,以10%丙二醇溶液为溶剂制备)、荷包牡丹碱+Sit-S组[4 mg/kg 荷包牡丹碱(竞争性GABA拮抗剂)+4 mg/kg Sit-S]、阿戈美拉汀+Sit-S组[40 mg/kg 阿戈美拉汀(5-HT和5-HT_{2C}受体拮抗剂)+4 mg/kg Sit-S]、氟哌啶醇+Sit-S组[0.2 mg/kg 氟哌啶醇(非选择性D₂受体拮抗剂)+4 mg/kg Sit-S],每组8只。3种拮抗剂的给药剂量均按照临床成人用量换算而得。各组小鼠均腹腔注射给药,给药体积均为1.0 mL。给药60 min后,按“2.5”项下方法进行悬尾实验,测定其不动时间。悬尾实验结束后,将小鼠脱颈处死,于无菌操作台上取出其脑组织,用生理盐水冲洗干净,称质量,并加入约9倍体积(mL/g)的生理盐水,匀浆,然后以10 000 r/min离心10 min,取上清液,在-80℃条件下冻存,待测。采用ELISA法测定小鼠脑组织中5-HT、DA、GABA水平,具体操作严格按照相应试剂盒说明书进行。按照“2.5”项下方法进行数据的统计分析。各组小鼠不动时间和脑组织中5-HT、DA、GABA水平测定结果见表3。

表3 各组小鼠不动时间和脑组织中5-HT、DA、GABA水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Immobility time and the levels of 5-HT, DA and GABA in brain tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	不动时间,s	神经递质水平,μmol/g		
		5-HT	DA	GABA
空白对照组	85.17 ± 12.85	80.09 ± 3.44	14.54 ± 0.52	12.12 ± 1.92
Sit-S组	34.64 ± 7.08**	124.31 ± 10.94*	22.26 ± 0.48*	24.85 ± 2.48**
阿戈美拉汀+Sit-S组	56.12 ± 8.71*	85.87 ± 8.13*		
氟哌啶醇+Sit-S组	49.47 ± 4.94*		16.59 ± 0.77*	
荷包牡丹碱+Sit-S组	42.28 ± 8.22			13.78 ± 2.13**

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 Sit-S 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. blank control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; vs. Sit-S group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

结果显示,与空白对照组比较,Sit-S组小鼠的不动时间显著缩短($P < 0.01$),脑组织中5-HT、DA、GABA水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 Sit-S 组比较,3种抑制剂联用组小鼠的不动时间均有一定延长,其中阿戈美拉汀+Sit-S组、氟哌啶醇+Sit-S组的不动时间显著延长($P < 0.05$),并且阿戈美拉汀+Sit-S组的5-HT水平、氟哌啶醇+Sit-S组的DA水平和荷包牡丹碱+Sit-S组的GABA水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

本研究以百花花楸干燥成熟果实为材料,经过75%乙醇和20%KOH溶液提取,并经萃取、结晶得到了Sit。为提高Sit的生物利用度和药理活性,本项目组对Sit进行了衍生化,最终得到了Sit-T、Sit-P、Sit-Sr、Sit-S等4种酯类衍生物,并通过NMR和IR法验证了各衍生物的结构。同时,采用悬尾实验和强迫游泳实验对Sit及其衍生物的抗抑郁活性进行了筛选。结果表明,Sit的水杨酸酯衍生物Sit-S(4 mg/kg)可显著缩短悬尾实验和强迫游泳实验中的小鼠不动时间,表现出优良的抗抑郁活性。此外,为了排除小鼠不动时间的减少是由于药物对其运动能力的影响所致,本研究还进行了小鼠自发运动能力测试实验,结果显示Sit-S不影响小鼠的自发活动。

5-HT不但可以与脑组织中的其他中枢神经相互作用,参与机体对外界刺激的适应和调节,而且也是情绪、睡眠和其他生理活动的重要调节因子,5-HT水平的增加对抑郁症的恢复具有积极的作用^[19-21]。本研究发现,Sit-S给药后可明显升高小鼠脑组织中5-HT水平,但联用阿戈美拉汀(5-HT受体拮抗剂)后,可以有效逆转Sit-S的这种作用,表明Sit-S可通过5-HT途径发挥其抗抑郁作用。DA受体广泛分布于中枢神经系统中,其中D₂受体是DA参与抑郁生物调控的重要物质,在抑郁症的发生和恢复中也起着至关重要的作用^[22-24]。有研究表明,重症抑郁患者的下丘脑组织中DA含量极少,给予抗抑郁药物治疗后,其DA水平开始上调,同时功能也趋于正常^[25]。本研究发现,给予Sit-S后可显著升高小鼠脑组织中DA水平,但联用氟哌啶醇(非选择性D₂受体拮抗剂)后,能明显消除Sit-S的抗抑郁作用。该结果证实了Sit-S的抗抑郁作用是由D₂受体的激活所引起的。GABA是神经元传递信息电路中重要的兴奋性神经递质,当其与GABA受体(GABARs)结合后,会促进电路中Cl⁻流出、Ca²⁺流入,从而强化神经元树突生长和突触发生,这一功能保证了细胞间兴奋性信息的成功传递^[26-27]。因此,补充GABA含量可以有效减轻抑郁症。本研究发现,给予Sit-S后可显著升高小鼠脑组织中GABA水平,而联用荷包牡丹碱(抑制性神经递质GABA拮抗剂)后,可一定程度上逆转Sit-S的抗抑郁作用,但是作用不显著。该结果提示Sit-S的抗抑郁样作用可能部分由GABA能系统介导的。

综上,本研究成功从百花花楸果实中分离、制备了Sit,并合成了4种酯类衍生物。其中,Sit与水杨酸经缩合反应得到的酯类衍生物Sit-S具有良好的抗抑郁活性,其作用机制可能是通过提高脑组织中5-HT、DA和GABA水平所介导的。

参考文献

[1] GARY P, ZALOGA MD. Phytosterols, lipid administration, and liver disease during parenteral nutrition[J]. J Pa-

renter Enteral Nutr, 2015, 39(1S): 39S-60S.

[2] ABUMWEIS SS, MARINANGELI CPF, FROHLICH J, et al. Implementing phytosterols into medical practice as a cholesterol-lowering strategy: overview of efficacy, effectiveness, and safety[J]. Can J Cardiol, 2014, 30(10): 1225-1232.

[3] YIN YX, LIU XF, LIU JP, et al. Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2018, 28(9): 1525-1533.

[4] DUCHATEAU G, COCHRANE B, WINDEBANK S, et al. Absolute oral bioavailability and metabolic turnover of beta-sitosterol in healthy subjects[J]. Drug Metab Dispos, 2012, 40(10): 2026-2030.

[5] 卢婧霞, 郑祖国, 徐志猛, 等. 植物甾醇降血脂机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(21): 4552-4559.

[6] ENGEL R, SCHUBERT H. Formulation of phytosterols in emulsions for increased dose response in functional foods[J]. Innov Food Sci Emerg, 2005, 6(2): 233-237.

[7] 张帆. 植物甾醇的生物活性与构效关系初探[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.

[8] 姜芳, 全继平, 邹春兰. 抗抑郁药物研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(7C): 168-169.

[9] 魏杰, 石佳, 侯潇, 等. 欧洲花楸的化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁大学学报(自然科学版), 2014, 41(4): 362-368.

[10] 李雪梅, 周雪, 赵英福, 等. 百花花楸果实水提取液镇咳平喘作用的实验研究[J]. 中国医学装备, 2014, 8(11): 76-76.

[11] 侯甲福, 李雪梅, 李文超, 等. 百花花楸果实抗炎有效部位的研究[J]. 中国药物经济学, 2013(5): 225-226.

[12] 李志君, 孙擎, 李环, 等. 血清胆固醇水平和抑郁患者自杀行为相关性Meta分析[J]. 吉林化工学院学报, 2017, 34(12): 27-34.

[13] 周珊珊, 李宁, 刘维娟, 等. 总胆固醇水平对首发青年抑郁症患者认知功能的影响研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(14): 1828-1829.

[14] 蒋琼凤, 袁志辉, 李进, 等. 蓼蓝中β-蓝谷甾醇的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(6): 108-112.

[15] 唐国胜. 杨树花化学成分分析、结构修饰及生物活性筛选[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.

[16] GHASEMI M, SADEGHIPOUR H, POORHEIDARI G, et al. A role for nitrergic system in the antidepressant-like effects of chronic lithium treatment in the mouse forced swimming test[J]. Behav Brain Res, 2009, 200(1): 76-82.

[17] 孙晓燕, 陈艾东. 抑郁模型的选择策略和优缺点分析[J]. 医学理论与实践, 2018, 31(22): 3342-3344.

[18] YAMAGATA H, UCHIDA S, MATSUO K, et al. Altered plasma protein glycosylation in a mouse model of depression and in patients with major depression[J]. J Affect Dis-

雾化吸入和腹腔注射依达拉奉对烟雾吸入性损伤肺模型大鼠保护作用比较研究^Δ

肖长栓^{1*}, 刘娅平², 杨景哲^{1#}(1.承德医学院附属医院烧伤整形科, 河北承德 067000; 2.承德医学院附属医院妇二科, 河北承德 067000)

中图分类号 R285;R644 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)01-0070-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.13

摘要 目的:比较雾化吸入和腹腔注射依达拉奉对烟雾吸入性肺损伤模型大鼠急性肺损伤的保护作用。方法:将30只雄性SD大鼠按照随机数字表法分为正常对照组(A组)、致伤空白组(B组)、致伤腹腔注射治疗组(C组)和致伤低、高剂量雾化吸入治疗组(D、E组),每组6只。B~E组大鼠均被置于含松木屑的烟雾发生器中复制烟雾吸入性肺损伤模型;A组大鼠除不放松木屑外,其余操作同上。造模后30 min, C组大鼠腹腔注射依达拉奉18 mg/kg(每间隔70 min重复1次,共4次);D、E组大鼠雾化吸入依达拉奉9、18 mg/kg(雾化吸入10 min,每间隔60 min重复1次,共4次);A、B组大鼠不作任何处理。末次给药后6 h,进行大鼠动脉血气分析,并计算大鼠肺湿干比(W/D)和肺组织含水率;采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测其血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-10含量;采用ELISA等方法检测其肺组织中丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)含量;采用苏木精-伊红染色法观察其肺组织病理改变;采用TUNEL法检测其肺组织细胞凋亡率。结果:A组大鼠肺组织未见异常;B组大鼠肺组织中可见出血及水肿,肺泡结构难以辨认,并可见炎症细胞和红细胞浸润;C~E组大鼠肺组织上述症状均有不同程度改善。与A组比较,其余组大鼠动脉氧分后和吸入氧浓度比值(PaO₂/FiO₂)以及肺组织SOD含量均显著降低($P < 0.05$);肺含水率、W/D,血清TNF- α 、IL-6、IL-10含量以及肺组织MDA、MPO、Caspase-3含量和细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$)。与B组比较,各给药组大鼠动脉PaO₂/FiO₂以及血清IL-10含量均显著升高($P < 0.05$);肺含水率、W/D,血清TNF- α 、IL-6含量以及肺组织MDA、MPO、Caspase-3含量和细胞凋亡率均显著降低,且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。结论:依达拉奉对烟雾吸入性肺损伤模型大鼠具有一定的保护作用,可剂量依赖性地减少炎症介质和(或)细胞因子的产生及释放、减轻过氧化损伤并抑制细胞凋亡,且雾化吸入较腹腔注射的效果更明显。

关键词 雾化吸入;腹腔注射;依达拉奉;吸入性肺损伤;量效关系;大鼠;保护作用;炎症因子

- orders, 2018, 233(6):79-85.
- [19] ISHIKAWA C, SHIGA T. The postnatal 5-HT1A receptor regulates adult anxiety and depression differently via multiple molecules[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2017, 78(1):66-74.
- [20] OLIVIER JDA, HART MGVD, SWELM RPL, et al. A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders[J]. Neuroscience, 2008, 152(3):573-584.
- [21] LI Y, LIU J, LIU X, et al. Antidepressant-like action of single facial injection of botulinum neurotoxin A is associated with augmented 5-HT levels and BDNF/ERK/CREB pathways in mouse brain[J]. Neurosci Bull, 2019, 35(4):661-672.
- [22] LI ZC, HE Y, TANG JS, et al. Molecular imaging of striatal dopamine transporters in major depression: a meta-analysis[J]. J Affect Disord, 2015, 174(15):137-143.
- [23] CLAUSIUS N, BORN C, GRUNZE H. The relevance of dopamine agonists in the treatment of depression[J]. Neuropsychiatr, 2009, 23(1):15-25.
- [24] DANDEKAR MP, LUSE D, HOFFMANN C, et al. Increased dopamine receptor expression and anti-depressant response following deep brain stimulation of the medial forebrain bundle[J]. J Affect Disord, 2017, 217(8):80-88.
- [25] DUVAL F, MOKRANI M C, ERB A, et al. Thyroid axis activity and dopamine function in major depression[J]. Psychoneuroendocrinology, 2017, 83(11):42-45.
- [26] YAN TX, XU MJ, WU B, et al. The effect of Schisandra chinensis extracts on depression by noradrenergic, dopaminergic, GABAergic and glutamatergic systems in the forced swim test in mice[J]. Food Funct, 2016, 7(6):2811-2819.
- [27] LEI L, WATARU I, ALEXEI M. Overexpression of channelrhodopsin-2 interferes with the GABA_B receptor-mediated depression of GABA release from the somatostatin-containing interneurons of the prefrontal cortex[J]. Neurophotonics, 2018. DOI:10.1117/1.NPh.5.2.025003.

(收稿日期:2020-08-31 修回日期:2020-12-14)

(编辑:林静)

^Δ 基金项目:承德市基础研究项目(No.201904A107)

* 主治医师,硕士。研究方向:吸入性损伤、重症烧伤、烧伤后整形。电话:0314-2279277。E-mail:xiaochangshuanl@163.com

通信作者:副主任医师,硕士。研究方向:烧伤外科。电话:0314-2279277。E-mail:13653247707@163.com