

References:

- [1] Shan B N, Li Q X, Liang W J. Experimental study on anti-tumor effects of *Cortex Acanthopanax Senticosu* E *in vivo* and *in vitro* [J]. *Chin J Intergr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2004, 24(1): 55-58.
- [2] Shan B N, Si C Y, Zhang J Z. The Isolation of anti-tumor component of *Acanthopanax Gracilistylus* [J]. *Carcinog Teratog Mutage* (癌变·畸变·突变), 2004, 16(4): 203-207.
- [3] Shan B N, Duan J P, Zhang L H. Stimulating activity of *Acanthopanax gracilistylus* anti-tumor component on monocytes [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2003, 19: 490-493.
- [4] Zhao X T, Shan B N, Zhang J. *In vivo* tissue distribution of Age protein from *Cortex Acanthopanax* in normal and tumor-bearing mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(7): 1038-1041.
- [5] Angeletti R H, Angeletti P U, Levi-Montalcini R. Selective accumulation of [125 I] labeled nerve growth factor in sympathetic ganglia [J]. *Brain Res*, 1972, 46: 421.
- [6] Tang G H, Jiang G H, Zhang Y. Isotope tracer labeling method for determination of nerve growth factor plasma concentration [J]. *Chin J Pharmacol* (中国药理学杂志), 1988, 33(4): 227-229.
- [7] Tang G H, Tang X L, Jiang G H. Preparation of 125 I labelled nerve growth factor and study of its pharmacokinetics [J]. *J Nucl Radiochem* (核化学与放射化学), 2002, 24(1): 59-60.
- [8] Welling P G, Balant L P. *Pharmacokinetics of Drugs* [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1994.
- [9] Tang G H, Jiang G H, Wang S H, *et al.* Studies on metabolic transformation of perlorine in rat [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(6): 457-460.
- [10] Palmer L, Andersson L, Andersson T, *et al.* Determination of tolterodine and 5-hydroxymethyl metabolite in plasma, serum and urine using gas chromatography mass spectrometry [J]. *Pharm Biomed Anal*, 1997, 16(1): 155-165.
- [11] Tang Z M, Liu X W, Chai B X. Methodology and experimental design in pharmacokinetics of proteins and peptides [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1996, 10(3): 161-168.
- [12] Kuo B S, Nordblom G D, Wright D S. Perturbation of epidermal growth factor clearance after radiodination and its implications [J]. *Pharm Sci*, 1997, 86(3): 290.
- [13] Zhang Q, Wang G J. The progress of analysis method of protein polypeptide drug pharmacokinetics [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2000, 7(2): 126-128.

丹参有效部位对吗啡依赖性小鼠位置偏爱效应的影响

何方, 余涓, 陈崇宏*

(福建医科大学 药理学系, 福建 福州 350004)

摘要:目的 观察丹参脂溶性有效部位对吗啡诱导的小鼠条件性位置偏爱效应的影响, 并对丹参有效部位进行初步鉴定。方法 隔天分别 sc 吗啡和生理盐水, 共 6 d, 引起小鼠产生显著的条件性位置偏爱效应。在训练阶段 sc 吗啡前 30 min ip 不同剂量的丹参脂溶性有效部位。建立反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 鉴定丹参脂溶性有效部位的主要成分。结果 吗啡模型组小鼠在伴药箱停留时间明显延长, 丹参脂溶性有效部位 (40 mg/kg) 可使小鼠在伴药箱停留时间显著缩短 ($P < 0.01$)。经 RP-HPLC 法初步鉴定丹参脂溶性有效部位的主要成分为隐丹参酮。结论 丹参脂溶性有效部位 (隐丹参酮) 能在一定程度上抑制吗啡诱导的小鼠条件性位置偏爱效应的形成。

关键词: 丹参; 吗啡; 条件性位置偏爱; 隐丹参酮

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)03-0405-04

Effect of radix of *Salvia miltiorrhiza* fraction on conditioned place preference in mice induced by morphine

HE Fang, YU Juan, CHEN Chong-hong

(Department of Pharmacology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of lipid soluble fraction in the radix of *Salvia miltiorrhiza* (FSM) on conditioned place preference (CPP) in mice induced by morphine and preliminarily identify the fraction in the radix of *S. miltiorrhiza*. **Methods** Morphine or NS was sc injected every other day to induce the obvious CPP in mice for 6 d. Before 30 min of sc injecting morphine, mice were ip administered different doses of lipid soluble fraction in the radix of *S. miltiorrhiza*. RP-HPLC method was used to identify the major component in the lipid soluble fraction in the radix of *S. miltiorrhiza*. **Results**

收稿日期: 2006-10-23

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (04A026)

作者简介: 何方 (1980—), 女, 福建省福安市人, 福建医科大学药理学系 2003 级硕士研究生, 研究方向为神经药理。

* 通讯作者 陈崇宏 Tel: 13328697328 E-mail: CCH@mail.fjmu.edu.cn

The staying time in morphine-paired white compartment was significantly prolonged. After treatment with lipid soluble fraction in the radix of *S. miltiorrhiza* (40 mg/kg, ip), the staying time in morphine-paired white compartment was significantly shortened ($P < 0.01$). The major component in the lipid soluble fraction of *S. miltiorrhiza* was indentified as cryptotanshinone. **Conclusion** Lipid soluble fraction in the radix of *S. miltiorrhiza* (cryptotanshinone) could restrain the acquisition of CPP in mice induced by morphine to a certain extent.

Key words: the radix of *Salvia miltiorrhiza* Bunge; morphine; conditioned place preference (CPP); cryptotanshinone

阿片类药物长期使用会产生耐受和成瘾。在临床治疗方面,对精神依赖及戒断期过后的强烈的不可抑制的毒品心理渴求而导致的“复吸”,目前尚无十分有效的方法。丹参是唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎。近年来将传统中药丹参用于中药戒毒复方中,在脱毒及抗稽延性戒断症状中均已在临床上获得较好的效果^[1]。国外的动物实验研究表明鼠尾草属植物可以减轻吗啡引起的戒断症状^[2]。本课题组在最近的研究中也发现丹参提取物对吗啡依赖小鼠的戒断症状有阻断作用,可拮抗小鼠吗啡身体依赖性的形成^[3]。本实验通过条件性位置偏爱 (conditioned place preference, CPP) 试验,观察丹参脂溶性有效部位对吗啡引起小鼠精神依赖的影响,并对丹参有效部位的主要成分进行了初步鉴定。通过探索中药丹参戒毒的药理作用,并为解决戒毒后的“复吸”等问题及开发低耐受性、多靶点作用、质量可控的新型抗依赖药物奠定基础。

1 材料

1.1 动物:雄性昆明种小鼠,体重 18~22 g,由福建医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK (闽) 2004-0002。

1.2 药品与试剂:丹参饮片,福建省回春药业公司提供,经本校天然药物化学系鉴定为正品。盐酸吗啡注射液,沈阳第一制药厂提供,批号 011105。柱色谱硅胶 (100~200 目) 与薄层色谱硅胶 G,青岛海洋化工集团提供。分离提取丹参所用的试剂均为 AR 级。丹参酮 I_A 与隐丹参酮对照品由中国药品生物制品检定所提供。甲醇为色谱纯,水为自制双蒸水。

1.3 仪器:条件性位置偏爱箱仿文献方法制作^[4],箱体由两个正方体 (15 cm×15 cm×15 cm) 组成,中间有一可活动的隔板,将隔板抽起后,小鼠可在两个箱体之间自由活动。箱体的一侧除玻璃面板外内侧各面均漆成黑色,底面粗糙,另一侧除玻璃面板外各面均漆成白色,底板制成光滑面,整个实验箱具有视觉和触觉两种线索。Agilent 1100 系列高效液相色谱

仪,Agilent 自动进样器,Agilent DAD 检测器,vero 8.01-Chemstation 色谱工作站。

2 方法

2.1 丹参脂溶性有效部位的提取分离:丹参饮片粉碎后,取 100 g 用甲醇回流提取 2 次,每次 2 h。甲醇提取液浓缩后得到浸膏 25.43 g。将浸膏用水溶解,再分别用石油醚、乙醚进行萃取,浓缩后得到石油醚提取物 0.34 g 和乙醚提取物 2.58 g。乙醚提取物用硅胶色谱柱,以石油醚-醋酸乙酯 (90:10~75:25) 梯度洗脱。根据薄层色谱合并收集液得到 3 个组分,浓缩烘干。经小鼠条件性位置偏爱实验筛选后,确定洗脱出的第 2 组分 (0.047 g) 为丹参抗吗啡精神依赖的有效部位 (fraction of *Salvia miltiorrhiza*, FSM)。

2.2 预处理:小鼠在动物房适应性饲养 2 d 后,第 3 天将位置偏爱箱箱体的隔板抽出,把小鼠逐只放入箱体中间,观察 15 min,以小鼠的头部为准记录小鼠在各箱体停留时间。观察过程在隔音条件下进行。剔除对箱体某一侧有显著偏爱的小鼠,以排除非条件性位置偏爱对实验结果的影响。结果显示,几乎所有小鼠偏爱黑箱。因此,将白箱作为非偏爱侧。

2.3 FSM 对吗啡诱导的小鼠条件性位置偏爱效应获得的影响:将达到实验条件的小鼠 50 只随机分为生理盐水对照组、吗啡模型组 (6 mg/kg) 及 FSM (10、20、40 mg/kg) 分别加吗啡 (6 mg/kg) 的 3 个给药组,共 5 组,每组 10 只。除对照组外,各组小鼠隔天分别注射吗啡 (第 2、4、6 天) 和生理盐水 (第 1、3、5 天),均采用背部 sc 给药。注射吗啡后置于伴药箱白色箱体,注射生理盐水后置于另一侧黑色箱体,时间均为 30 min。共训练 6 d,小鼠形成条件性位置偏爱。给药组小鼠在每次 sc 吗啡前 30 min, ip 不同质量浓度 FSM,生理盐水对照组与吗啡模型组 ip 同体积的生理盐水。最后 1 次 sc 吗啡后 24 h 进行条件性位置偏爱试验,检测过程与预处理阶段相同,记录小鼠在白箱中的停留时间。

2.4 RP-HPLC 法鉴定 FSM 中的主要成分

2.4.1 色谱条件:依利特 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水 (75 : 25);体积流量:1.0 mL/min;进样量:10 μL;检测波长:270 nm,柱温:25 ℃。

2.4.2 对照品溶液制备:精密称取对照品丹参酮 I_A 8.8 mg 和隐丹参酮 2.2 mg,用甲醇配成质量浓度分别 0.176、0.044 mg/mL 的混合对照品储备液。精密吸取 2.5 mL,置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 0.044、0.011 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.4.3 样品溶液:精密称取 1.1 mg 样品,置于 50 mL 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,超声震荡 10 min,摇匀,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为样品溶液。进样前经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。根据色谱图保留时间进行对比定性。

2.5 统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件进行完全随机设计资料的单因素方差分析。

3 结果

3.1 FSM 对吗啡诱导的小鼠条件性位置偏爱效应获得的影响:与对照组比较,吗啡模型组小鼠在白箱中停留时间显著延长,说明小鼠产生了明显的位置偏爱效应 ($P < 0.01$)。高剂量 FSM (40 mg/kg) 可明显地拮抗小鼠吗啡位置偏爱效应,与吗啡模型组比较,小鼠在白箱滞留时间显著缩短 ($P < 0.01$)。中剂量 FSM (20 mg/kg) 对小鼠吗啡位置偏爱效应有较明显的影响 ($P < 0.05$),但与对照组比较差异也显著 ($P < 0.05$);这提示中剂量 FSM (20 mg/kg) 抑制小鼠吗啡位置偏爱效应获得的作用不稳定。低剂量 FSM (10 mg/kg) 与吗啡模型组相比,小鼠在白箱停留时间无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 FSM 对吗啡诱导的小鼠条件性位置偏爱效应获得的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of FSM on acquisition of CPP in mice induced by morphine ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂 量/ (mg · kg ⁻¹)	小鼠在白色伴药箱停留时间/s	
		给药前	给药后
对照	—	347.2 ± 61.3	359.5 ± 53.5
吗啡模型	6	336.2 ± 72.6	496.4 ± 60.8**
FSM+吗啡	10+6	356.7 ± 81.9	474.0 ± 83.3
	20+6	367.4 ± 85.1	429.6 ± 63.4**
	40+6	352.6 ± 77.8	404.7 ± 63.5**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 FSM 样品 HPLC 测定结果:分别取混合对照品溶液 10 μL 和样品溶液 10 μL,进样测定。色谱图 (图 1) 显示样品 FSM 的保留时间为 12.704 min,分离良好。混合对照品中隐丹参酮的保留时间为 12.788 min,丹参酮 I_A 的保留时间为 21.046 min。将样品与对照品的保留时间进行比对,可判断丹参脂溶性有效部位 FSM 的主要成分是隐丹参酮。根据标准曲线计算出丹参脂溶性有效部位 FSM 中隐丹参酮的质量分数为 85.11%。

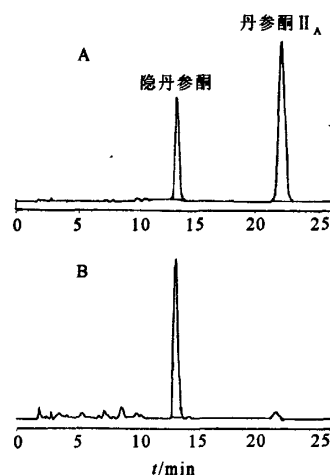


图 1 隐丹参酮和丹参酮 I_A 混合对照品 (A) 和样品 FSM (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of cryptotanshinone and tanshinone I_A mixture reference substance (A) and FSM sample (B)

4 讨论

条件性位置偏爱试验是由 Katz 和 Gormenzano 于 1979 年提出的一种判定药物奖赏效应的行为药理学实验^[5],近十几年来其方法逐步完善,是评价药物精神依赖性的一种简单有效的方法。本实验通过记录吗啡诱导小鼠在伴药箱的停留时间来反应小鼠的精神依赖情况。结果表明高剂量的丹参有效部位 FSM (40 mg/kg) 能缩短小鼠在白色伴药箱的停留时间,可在一定程度上抑制吗啡诱导的条件性位置偏爱的形成。丹参脂溶性成分的化合物种类有 40 多种,主要活性成分有丹参酮 I、丹参酮 I_A、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 等^[6]。通过样品 FSM 与隐丹参酮和丹参酮 I_A 混合对照品的 RP-HPLC 图谱,将保留时间进行比对,可初步判断丹参有效部位 FSM 的主要成分是隐丹参酮。

阿片类药物反复给药可使中枢神经元细胞内 Ca²⁺ 浓度显著升高。丹参具有钙拮抗作用,可抑制

Ca²⁺内流,减少胞内Ca²⁺浓度^[7],因而有可能通过影响细胞内信号传导通路Ca²⁺-CaM-CaMK-CREB以及Ca²⁺-NOS-NO-cGMP来参与依赖形成过程。戒断后病人的焦虑烦躁症状和记忆是造成复吸的主要原因,现代研究表明丹参能明显改善单侧颞叶缺血性损害大鼠的空间认知能力障碍^[8]。丹参改善记忆和空间认知能力的作用,能增强对药瘾无关的记忆,降低对药瘾的记忆,在理论上可以抑制吗啡的精神依赖的形成。因此,推测丹参脂溶性成分中的隐丹参酮对吗啡诱导的精神依赖有拮抗作用,是主要的有效部位,为丹参及隐丹参酮用于干预阿片类药物依赖行为提供了研究线索,为研究新型有效的戒毒药应用于临床提供了理论基础。但其确切的作用机制仍有待进一步深入研究。

References:

- [1] Pu W C, Xiao B, Cao D, et al. Experimental study on the effect of Huatongyu a traditional Chinese medicine on controlling drug abstinence syndromes in rats and analgesia in mice [J]. *Chin J Drug Depend* (中国药物依赖性杂志), 1999, 8 (3): 195-198.
- [2] Hosseinzadeh H, Lary P. Effect of *Salvia leriifolia* leaf extract on morphine dependence in mice [J]. *Phytother Res*, 2002, 14(5): 384-387.
- [3] Qiu H Q, Chen C H, Yu J. Effect of *Salvia miltiorrhiza* extracts on morphine physical dependence in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(5): 720-723.
- [4] Lieberman J M, Cooper S J. *The Neuro Pharmacological Basis of Reward* [M]. New York: Oxford University Press, 1989.
- [5] Katz R J, Gromezano G. A rapid and inexpensive technique for assessing the reinforcing effects of opiate drugs [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1979, 11(4): 213.
- [6] Du G H, Zhang J T. The general situation and progress of the modern research of red sage root (*Radix Salviae Miltiorrhizae*) [J]. *Her Med* (医学导报), 2004, 23(1): 355-360.
- [7] Qiu M F, Mo S W, Luo H Y, et al. Calcium antagonizing effect of Compound Danshen Sustained-release Tablet and comprehensive evaluation of sustained-release effect *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(3): 354-357.
- [8] Jing S J, Wu W P, Kuang P G. *Radix Salviae Miltiorrhizae* (RSM) could improve spatial cognition of rats with left cerebral temporal infarction and expression of HSP32 [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 1999, 16(5): 257-259.

槲皮素及异槲皮素、芦丁抗自由基活性的比较研究

金越¹, 吕勇¹, 韩国柱^{1*}, 孙慧君¹, 鱼红闪², 金凤雯²

(1. 大连医科大学 药理教研室, 辽宁 大连 116027; 2. 大连轻工学院 食品与生物工程系, 辽宁 大连 116034)

摘要:目的 评价3种黄酮类同系化合物槲皮素及其单糖苷异槲皮素和双糖苷芦丁的体外抗自由基作用,进一步研究其构效关系。方法 采用H₂O₂/Fe²⁺体系,通过Fenton反应生成羟自由基(·OH);采用邻苯三酚自氧化法产生超氧阴离子(O₂⁻)。利用·OH造成肝细胞脂质过氧化以及红细胞膜破裂,观察受试化合物的保护作用,并计算IC₅₀。结果 在以上4种体外模型中,3种药物均表现出极强的清除自由基能力。在·OH以及O₂⁻清除实验中,抗氧化活性顺序为芦丁>异槲皮素>槲皮素;在抑制肝匀浆脂质过氧化及红细胞膜破裂实验中,抗氧化活性顺序为槲皮素>异槲皮素>芦丁。结论 3种受试黄酮类化合物均具有十分强大的自由基清除作用,且呈现明显的剂量依赖性和糖基结构依赖性,在不同的实验体系中其抗自由基活性强弱顺序不同。

关键词: 黄酮化合物; 自由基; 槲皮素; 异槲皮素; 芦丁

中图分类号: R286.75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)03-0408-05

Comparative study on *in vitro* anti-free radical activities of quercetin, isoquercetin, and rutin

JIN Yue¹, LÜ Yong¹, HAN Guo-zhu¹, SUN Hui-jun¹, YU Hong-shan², JIN Feng-xie²

(1. Department of Pharmacology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2. Department of Eatables and Biological Engineering, Dalian Light Industrial College, Dalian 116034, China)

Abstract; Objective To assess *in vitro* anti-free radical activities of three flavonoids: quercetin, its monoglycoside isoquercetin, and diglycoside rutin, and further investigate their structure-effect relationship. **Methods** Hydroxyl free radical (·OH) was generated using H₂O₂/Fe²⁺ system via Fenton

收稿日期: 2006-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371744, 30470055, 20476017)

* 通讯作者 韩国柱 Tel: (0411) 84720229 E-mail: hgzhx2236@sina.com