

槐米中槲皮素对焦虑模型小鼠的保护作用研究

聂忠富*(攀钢集团总医院药材科,四川攀枝花 617023)

中图分类号 R285;R332 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2905-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.09

摘要 目的:研究槐米中槲皮素对焦虑模型小鼠的保护作用。方法:以不确定刺激复制小鼠焦虑模型。小鼠跳台实验分为空白对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、地西泮(10 mg/kg)组与槲皮素高、低剂量(60、15 mg/kg)组,灌胃给药,每天1次,在给药第6天进行跳台训练实验,第7天为正式测试实验。小鼠明暗箱实验分为空白对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、地西泮(10 mg/kg)组与槲皮素高、低剂量(60、15 mg/kg)组,灌胃给药,每天1次,末次给药后进行明暗箱实验。以高效液相-荧光检测法测定小鼠脑内 γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(Glu)、5-羟色胺(5-HT)的含量。结果:与模型组比较,槲皮素高剂量组小鼠穿箱次数显著增加($P<0.05$);槲皮素高、低剂量组小鼠测试期错误反应次数显著减少($P<0.01$),小鼠脑内GABA、Glu含量显著增加($P<0.01$)。结论:槲皮素具有明显的抗焦虑作用,其机制与提高小鼠脑内GABA、Glu含量有关。

关键词 槲皮素;抗焦虑;跳台实验;明暗箱实验; γ -氨基丁酸;谷氨酸

Protective Effects of Quercetin of *Sophora japonica* on Anxiety Model Mice

NIE Zhong-fu (Dept. of Pharmacy, General Hospital of Pangang Group Company Ltd., Sichuan Panzhihua 617023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of quercetin of *Sophora japonica* on anxiety model mice. METHODS: Anxiety model was induced by uncertain stimulation. In step-down test, mice were divided into blank control group (equal volume of normal saline), model group (equal volume of normal saline), diazepam group (10 mg/kg) and quercetin high-dose and low-dose groups (60, 15 mg/kg). They were given relevant medicines intragastrically once a day. Model mice were included in step-down training test on sixth day of medication, and on seventh days for formal test. In light-dark box, mice were divided into blank control group (equal volume of normal saline), model group (equal volume of normal saline), diazepam group (10 mg/kg) and quercetin high-dose and low-dose groups (60, 15 mg/kg). They were given relevant medicines intragastrically once a day. The test was conducted after last administration. The contents of γ -propanalpine (GABA), glutamate (Glu) and 5-serotonin (5-HT) were determined by HPLC-fluorescence assay. RESULTS: Compared with model group, the number of light-black transitions increased significantly in quercetin high-dose group ($P<0.05$); the number of error response decreased significantly in quercetin high-dose and low-dose groups ($P<0.01$), while the contents of GABA and Glu in cerebral tissue of mice increased significantly ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Quercetin has obvious anti-anxiety effects, and the mechanism may be associated with the increase of GABA and Glu contents in cerebral tissue of mice.

KEY WORDS Quercetin; Anti-anxiety; Step-down test; Light-dark box; γ -propanalpine; Glutamate

焦虑症又称焦虑性神经症,以广泛性焦虑症(慢性焦虑症)和发作性惊恐状态(急性焦虑症)为主要临床表现,常伴有头晕、胸闷、心悸、呼吸困难、口干、尿频、尿急、出汗、震颤和运动性不安等症状。近年来,焦虑症发病率不断增高,引起社会的广泛关注,目前临床上常用的西药在治疗焦虑症时存在不良反应多、依赖性强、易复发等缺点,而天然药物具有疗效明显、毒副作用小等优点,能够很好地避免西药治疗焦虑症的诸多不足,因此成为当前研发抗焦虑新药的热点。槐米来源于豆科植物槐树 *Sophora japonica* L. 的干燥花蕾,主要有芸香苷、槲皮素、槐花米甲素(黄酮类)和缩合鞣质等药效成分。槲皮素(Quercetin)别名栎精或槲皮黄素,呈黄色针状结晶或结晶性粉末,熔点 314 °C,易溶于乙醇、甲醇等有机溶剂,且溶液呈黄色,在水中的溶解度极小,有良好的祛痰、止咳、平喘之功。槲皮素属于黄酮类化合物中的黄酮醇类,其3位上有被羟基取代

的结构,黄酮醇类有许多种衍生物,如二氢黄酮醇、异黄酮等。由于黄酮类化合物广泛分布于植物界中,且生理活性多种多样,引起了国内外的广泛重视,研究进展迅速。目前,对槲皮素药理作用的研究主要集中在心血管系统方面^[1-7],但至今未见关于槲皮素具有抗焦虑作用的报道。本研究首次采用经典动物模型小鼠跳台实验和小鼠明暗箱实验对其行为学进行评价,观察槐米中槲皮素对小鼠神经递质含量的影响,探讨槲皮素抗焦虑作用的机制,为进一步研发高效、低毒的抗焦虑新药提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

KL-UP-II-20型艾柯超纯水机(成都康宁实验专用纯水设备厂);SK5200LH型超声仪(上海科导超声仪器有限公司);KK23V65TI型冰箱(德国西门子公司);DHG-9240A型恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);BS224S型电子天平(北京

*主管中药师。研究方向:临床药学。电话:0812-3396066

赛多利斯仪器系统有限公司);ZH-500型小鼠光电刺激仪、ZH-500型小鼠避暗仪(安徽淮北正华生物仪器有限公司)。

1.2 药材

槐米产自宁夏,由笔者鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

地西洋(天津力生制药股份有限公司,批号:070884);实验所用试剂均为分析纯。

1.4 动物

清洁级KM小鼠,♂,体质量18~22g,购于四川省医学实验动物中心[动物使用许可证号:SCXK(川)2008-14]。每天接受12h光照/12h黑暗,光照周期为8:00-20:00,实验室温度(20±2)℃,湿度60%,小鼠可自行摄取标准饲料和清洁用水,动物实验遵守国际实验动物伦理学要求。小鼠适应性饲养1周后进行实验。

2 方法

2.1 槲皮素的制备

取槐米粗粉1500g,加水8000ml加热并加氢氧化钠调pH为8~8.5,升温至80℃,加硼砂32g,搅拌加热,95℃保温50min,趁热滤过,滤渣再如上提取1次合并滤液。向滤液加入10%HCl调pH为4~5,放置过夜,抽滤。用冷蒸馏水洗滤渣至中性,于80℃干燥得槲皮素粗品。将粗品置于5000ml三口烧瓶中,加入20倍量95%乙醇,加入1%的硫酸适量,加热回流,使其溶解,趁热滤过,取滤液用20倍量蒸馏水稀释,静置24h,滤过,得槲皮素精品。经西南交通大学生命科学与工程学院吴晓青副教授测定,槲皮素纯度>95%,达到实验要求。

2.2 模型的复制^[8]

参考文献,以不确定性刺激复制焦虑模型小鼠。

2.3 槲皮素对模型小鼠行为学的影响

2.3.1 槲皮素对模型小鼠跳台实验的影响 100只小鼠随机均分为5组,即空白对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、地西洋(10mg/kg)组与槲皮素高、低剂量(60、15mg/kg)组。空白对照组、模型组与槲皮素高、低剂量组ig给药,每天1次,连续7d;地西洋组在第6天开始ig给药,每天1次,连续2d。第6天ig给药2h后开始小鼠跳台训练实验,以小鼠爬上绝缘台第一次开始计数,单脚或尾巴落掉下绝缘台不做记录,双脚落下铁丝网或四肢同时落下为1次,记录小鼠跳下跳台的次数,此作训练期成绩;第7天ig给药2h后开始正式小鼠跳台实验,以小鼠爬上绝缘台第一次开始计数,单脚或尾巴落掉下绝缘台不做记录,双脚落下铁丝网或四肢同时落下为1次,此作测试期成绩。

2.3.2 槲皮素对模型小鼠明暗箱实验的影响 分组同“2.2”项下方法。空白对照、模型与槲皮素高、低剂量组ig给药,每天1次,连续14d;地西洋组在第13天开始ig给药,每天1次,连续2d。末次给药2h后开始小鼠明暗箱实验,采用明暗箱不插电,小鼠的暗箱背向阳光,明箱面向阳光,在自然状态下记录小鼠进入明箱的次数(从第一次进入明箱开始计数,单脚或尾巴进入明箱不做记录,双脚或四肢完全进入明箱记录1次)。

2.4 槲皮素对模型小鼠脑内 γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(Glu)、5-羟色胺(5-HT)含量的影响

2.4.1 小鼠脑组织的处理 明暗箱实验后,小鼠立即断头处

死,冰台上迅速剥离全脑,置于液氮贮藏,备用。每100mg脑组织加入1ml 0.4mol/L高氯酸,置于冰浴上充分匀浆1.5min后沉淀30min;于4℃、10000r/min离心15min,取上清液将其分为A、B两部分。A部分(2ml)每1ml加0.4%的碳酸氢钠溶液0.75ml,充分混匀,于4℃、15000r/min离心10min,供Glu、GABA的含量测定。取B部分(2ml)于4℃、15000r/min离心10min,供5-HT的含量测定。

2.4.2 GABA和Glu含量的测定 色谱条件为色谱柱ODS C₁₈(4.6mm×250mm,5 μ m);流动相为50mmol/L乙酸钠-甲醇-四氢呋喃[A:82:17:1(V/V/V);B:22:77:1];过0.45 μ m的微孔滤膜,超声脱气;流速为0.8ml/min,梯度洗脱;发射波长为338nm,激发波长为425nm;柱温为30℃。在此条件下,供试品溶液中的GABA、Glu与其他峰分离良好。按1:1(V/V)的比例加入衍生化试剂[邻苯二甲醛(OPA)54mg,1ml甲醇,40 μ l 2-巯基乙醇和四硼酸钠缓冲液],于20℃静置3min后进样。该条件下精密度、重复性、稳定性、加样回收率等均符合要求。

2.4.3 5-HT含量的测定 流动相为0.1mol/L的乙酸钠(内含0.1mol/L的EDTA二钠),其余色谱条件同“2.4.2”项下条件;用冰醋酸调pH5.1,用此缓冲液与甲醇按9:1(V/V)混合。过0.45 μ m的微孔滤膜,超声脱气;流速为1.0ml/min,进样量为20 μ l,发射波长为338nm,激发波长为290nm;柱温为30℃。在此条件下,供试品溶液中5-HT与其他峰分离良好。该条件下精密度、重复性、稳定性、加样回收率等均符合要求。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计学软件对结果进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 槲皮素对模型小鼠行为学的影响

3.1.1 槲皮素对模型小鼠跳台实验的影响 与空白对照组比较,模型组小鼠测试期错误反应次数显著增加($P<0.01$);与模型组比较,槲皮素高、低剂量组小鼠测试期错误反应次数显著减少($P<0.01$)。槲皮素对模型小鼠跳台行为的影响见表1。

表1 槲皮素对模型小鼠跳台行为的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of quercetin on step-down behavior in model mice($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量,mg/kg	n	错误反应次数	
			训练期	测试期
空白对照组		20	1.8±0.6	1.7±0.6
模型组		20	1.7±0.6	2.1±0.4*
地西洋组	10	20	2.0±0.8	0.8±0.3*
槲皮素高剂量组	60	20	1.3±0.5	0.4±0.3*
槲皮素低剂量组	15	20	1.5±0.6	0.7±0.5*

与空白对照组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: # $P<0.01$

vs. blank control group: * $P<0.01$;vs. model group: # $P<0.01$

3.1.2 槲皮素对模型小鼠明暗箱实验的影响 与空白对照组比较,模型组小鼠穿箱次数显著减少($P<0.01$);与模型组比较,槲皮素高剂量组小鼠穿箱次数显著增加($P<0.05$)。槲皮素对模型小鼠明暗箱穿箱次数的影响见表2。

表2 槲皮素对模型小鼠明暗箱穿箱次数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of quercetin on the number of light-black transitions in model mice($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量,mg/kg	n	穿箱次数
空白对照组		20	7.8±3.4
模型组		20	6.1±3.5*
地西洋组	10	20	27.6±7.1**
槲皮素高剂量组	60	20	18.2±5.8*
槲皮素低剂量组	15	20	10.7±6.2

与空白对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

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

3.2 槲皮素对模型小鼠脑内GABA、Glu和5-HT含量的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠脑内GABA、Glu含量显著减少,5-HT含量显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,槲皮素高、低剂量组小鼠脑内GABA、Glu含量显著增加($P < 0.01$)。槲皮素对模型小鼠脑内GABA、Glu和5-HT含量的影响见表3。

表3 槲皮素对模型小鼠脑内GABA、Glu和5-HT含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab 3 Effects of quercetin on the contents of GABA, Glu and 5-HT in cerebral tissue of model mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量,mg/kg	GABA, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Glu, $\mu\text{g}/\text{kg}$	5-HT, $\mu\text{g}/\text{kg}$
空白对照组		79.40±11.80	84.34±15.70	21.40±2.81
模型组		51.40±12.80*	67.40±16.99*	24.82±2.75*
地西洋组	10	68.29±16.79*	92.80±24.09*	18.97±2.71*
槲皮素高剂量组	60	96.35±15.80*	99.80±18.69*	24.09±2.68
槲皮素低剂量组	15	82.39±15.80*	94.58±18.69*	23.90±2.68

与空白对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

vs. blank control group: * $P < 0.01$; vs. model group: ** $P < 0.01$

4 讨论

跳台实验属一次性刺激回避反应实验,是评价动物对药物及其他干预后的神经行为学一个测试现象较为明显的实验。该方法的优点为操作简便易行,一次可同时观察多只动物,能较客观地反映动物经过一次刺激后记忆获得的情况,尤其适用于药物筛选实验^[9-10]。因为不同的药物引起记忆障碍的机制不同,因而通过观察益智药物对这些模型的药效可分析益智药物的作用机制。其缺点为动物的躲避性反应的个体差异较大。本研究中槲皮素能和抗焦虑药地西洋一样显著减少小鼠测试期的错误反应次数。

明暗箱实验是一个经典的抗焦虑模型,通过将动物置于明箱中央,背朝隔板^[11-12],观察小鼠在规定时间内穿箱次数来评价药物是否具有抗焦虑作用。本研究中模型组小鼠在明暗箱探寻装置中会表现出穿箱次数减少,槲皮素高剂量组小鼠穿箱次数增加。综合以上结果,提示槲皮素有抗焦虑活性。

焦虑症发病机制主要有神经递质假说和神经内分泌功能紊乱假说,前者主要包括5-HT系统功能亢进、去甲肾上腺素(NE)系统功能亢进、7-氨基丁酸功能不足等;后者主要有下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴、下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴活动异常^[13-18]。笔者通过对GABA、Glu进行含量测定,观察到槲皮素可使模型小鼠脑内Glu、GABA含量显著增加,而5-HT的含量

无明显变化,提示其抗焦虑活性可能与增加脑内的GABA、Glu含量有关。

本研究采用经典的小鼠跳台实验和小鼠明暗箱实验对其行为学进行评价,观察槐米中槲皮素对小鼠神经递质含量的影响,但对其他模型动物的抗焦虑作用及药效作用的物质基础及作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王艳芳,王新华,朱宇同.槲皮素药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2003,15(12):171.
- [2] 宋玉娇,姚凌云,曹蔚,等.槲皮素的药理作用研究近况[J].西北药学杂志,2002,17(1):40.
- [3] 李云峰.槲皮素代谢的研究进展[J].生理科学进展,2002,33(1):53.
- [4] 林蓉,刘俊田,李旭,等.槲皮素对血管内皮细胞损伤的保护作用[J].中国循环杂志,2000,15(5):304.
- [5] 张敏.槲皮素与5-FU对两种人结肠直肠癌细胞株细胞抑制作用的相互关系[J].新医药:植物药分册,1996,11(3):127.
- [6] 张琼,徐明娟,宋亮年,等.槲皮素对人卵巢癌细胞系增殖的影响[J].第二军医大学学报,1999,20(6):380.
- [7] 胡昕,余燕影,李华,等.染料木素、槲皮素及其化学修饰物清除自由基能力研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(2):2032.
- [8] 林文娟,王玮雯,邵枫.慢性情绪应激对大鼠行为、神经内分泌和免疫反应的影响:一个新的情绪应激模型[J].科学通报,2003,48(9):926.
- [9] Cao GH, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships[J]. *Free Radic Bio Med*, 1997,22(5):749.
- [10] Cassidy JM, Baird WM, Chang CJ. Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemo preventive agents[J]. *J Nat Prod*, 1990,53(1):23.
- [11] 张琼,徐明娟,宋亮年,等.槲皮素对人卵巢癌细胞系增殖的影响[J].第二军医大学学报,1999,20(6):380.
- [12] 宛晓春.茶叶生物化学[M].北京:中国农业出版社,2003:15.
- [13] 魏志文,宛晓春,李大祥,等.茶叶中槲皮素单体的分离与制备[J].食品与发酵工业,2009,35(3):187.
- [14] 吴景林.鱼腥草中槲皮素提取方法的研究[J].四川化工,2010,13(1):17.
- [15] 郑金贵.农产品品质学:第1卷[M].厦门:厦门大学出版社,2004:309.
- [16] 程祖铤,何海华,陈团生,等.超声波辅助提取芹菜槲皮素工艺[J].亚热带农业研究,2011,7(1):47.
- [17] 蔡金腾,丁筑红.金樱子果汁饮料的加工工艺[J].食品科学,1996,17(3):42.
- [18] 陈士铎.本草新编[M].北京:中国中医药出版社,2008:9.

(收稿日期:2013-05-06 修回日期:2013-06-13)