



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101742992 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 23

(21) 申请号 200880023868. 6

A61K 31/085 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 07. 25

A61K 31/7032 (2006. 01)

(66) 本国优先权数据

A61P 25/24 (2006. 01)

200710066088. 7 2007. 08. 03 CN

A23L 1/30 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2010. 01. 11

CN 1330917 A, 2002. 01. 16, 权利要求 1-32.

(86) PCT申请的申请数据

CN 1680238 A, 2005. 10. 12, 权利要求 1-7.

PCT/CN2008/071752 2008. 07. 25

李宁, 等. 仙茅的化学成分研究. 《天然产物研究与开发》. 2003, 第 15 卷 (第 3 期), 208-211.

(87) PCT申请的公布数据

W02009/018747 ZH 2009. 02. 12

刘强, 等. 树苔浸膏、净油香味成分分析及其在卷烟中的应用. 《烟草科技》. 2005, (第 3 期), 18-21.

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650204 中国云南省昆明市蓝黑路 132 号

审查员 陈欢

专利权人 中国科学院昆明动物研究所

昆明晶镖生物科技有限公司

(72) 发明人 陈纪军 徐林 周俊 吕俊

毛榕榕 田孟 周启心 张雪梅

沈勇 江志勇 左爱学

(74) 专利代理机构 成都虹桥专利事务所 51124

代理人 武森涛 高芸

(51) Int. Cl.

A61K 31/05 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 24 页

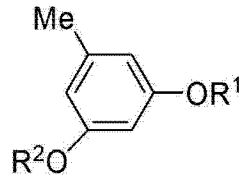
(54) 发明名称

5- 甲基 -1, 3 苯二酚或其衍生物用于制备治疗或预防抑郁症的药物或功能食品中的用途

(57) 摘要

5- 甲基 -1, 3 苯二酚及其衍生物或含有它们的药物组合物用于制备治疗或预防抑郁症的药物或功能食品中的用途。研究表明, 本发明的 5- 甲基 -1, 3 苯二酚及其衍生物与抗抑郁症药物氟西汀或丙咪嗪相比具有较强的抗抑郁症活性。

1. 如式 I 所示的 5-甲基-1,3 苯二酚或其衍生物或含有它们的药物组合物在制备治疗或预防抑郁症的药物或功能食品中的用途,

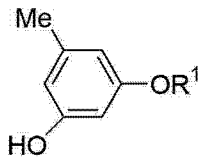


I

其中, R¹ 为氢、β-D-葡萄糖基、β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基、2,3,4,6-四乙酰基-β-D-葡萄糖基或乙酰基;

R² 为氢、β-D-葡萄糖基、β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基、2,3,4,6-四乙酰基-β-D-葡萄糖基或乙酰基。

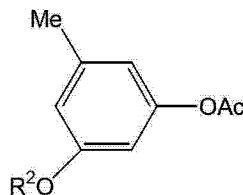
2. 式 II 所示的 5-甲基-1,3 苯二酚或其衍生物或含有它们的药物组合物用于制备治疗或预防抑郁症的药物或功能食品中的用途,



II

其中, R¹ 为氢、β-D-葡萄糖基或 β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基。

3. 式 IV 所示的 5-甲基-1,3 苯二酚衍生物或含有它们的药物组合物用于制备治疗或预防抑郁症的药物或功能食品中的用途,



IV

R² 为 2,3,4,6-四乙酰基-β-D-葡萄糖基或乙酰基,即所述的 5-甲基-1,3 苯二酚及其衍生物是指:1,3-二乙酰基苔黑酚或 3-氧-乙酰-苔黑酚-1-氧-(2,3,4,6-四乙酰基)-β-D-葡萄糖吡喃苷。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的用途,其特征在于:所述治疗或预防抑郁症是指对海马突触可塑性 LTP 直接调控和对抗心理应激增高的皮质激素水平。

5. 根据权利要求 1-3 任一项所述的用途,其特征在于:所述“抑郁症”为以下疾病分类亚型:

- 1)、抑郁型、狂燥型、抑郁和狂燥混合型、轻微狂燥型;或
- 2)、抑郁样障碍、心情恶劣;或
- 3)、具有抑郁症样特征的各种精神疾病或障碍的亚型,由于物质或治疗导致的情感障碍;或

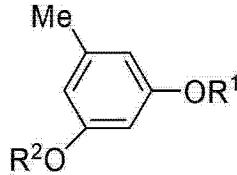
4)、反复发作的抑郁型和轻微狂燥型、抑郁或狂燥交替发作型。

6. 根据权利要求 1-3 任一项所述的用途,其特征在于:所述抑郁症的症状涉及昼夜节

律紊乱、睡眠障碍、慢性应激、焦虑症、急性应激损伤或认知功能损伤或障碍。

7. 根据权利要求 1-3 任一项所述的用途,其特征在于:所述功能食品是指日常食品或饮料中添加 5-甲基-1,3 苯二酚或其衍生物或含有它们的药物组合物实现上述的疾病治疗和预防。

8. 一种抗抑郁症的药物,其特征在于:它是以式 I 所示的 5-甲基-1,3 苯二酚或其衍生物或含有它们的药物组合物为活性成分加入药用载体或赋形剂制成的制剂,

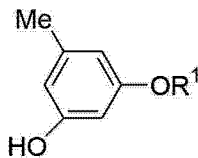


I

其中, R¹ 为氢、β-D-葡萄糖基、β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基、2,3,4,6-四乙酰基-β-D-葡萄糖基或乙酰基;

R² 为氢、β-D-葡萄糖基、β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基、2,3,4,6-四乙酰基-β-D-葡萄糖基或乙酰基。

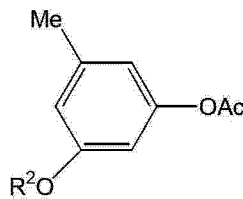
9. 一种抗抑郁症的药物,其特征在于:它是以式 II 所示的 5-甲基-1,3 苯二酚或其衍生物或含有它们的药物组合物为活性成分加入药用载体或赋形剂制成的制剂,



II

其中, R¹ 为氢、β-D-葡萄糖基或 β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基。

10. 一种抗抑郁症的药物,其特征在于:它是以式 IV 所示的 5-甲基-1,3 苯二酚衍生物或含有它们的药物组合物为活性成分加入药用载体或赋形剂制成的制剂,



IV

R² 为 2,3,4,6-四乙酰基-β-D-葡萄糖基或乙酰基,即所述的 5-甲基-1,3 苯二酚衍生物是指:1,3-二乙酰基苕黑酚或 3-氧-乙酰-苕黑酚-1-氧-(2,3,4,6-四乙酰基)-β-D-葡萄糖吡喃苷。

11. 根据权利要求 8~10 任一项所述的抗抑郁症的药物,其特征在于:在制备治疗或预防抑郁症的药物中,活性成分 5-甲基-1,3 苯二酚或其衍生物的有效剂量为:0.1mg-12g/成年人/天。

12. 根据权利要求 11 所述的抗抑郁症的药物,其特征在于:在制备治疗或预防抑郁症的药物中,活性成分 5-甲基-1,3 苯二酚或其衍生物的有效剂量为:50-200mg/成年人/天。

## 5-甲基-1,3-苯二酚或其衍生物用于制备治疗或预防抑郁症的药物或功能食品中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及 5-甲基-1,3-苯二酚或其衍生物或含有它们的药物组合物用于制备药物和功能食品,属于医药领域。

### 背景技术

[0002] 抑郁症是一种常见精神疾病,影响到 20% 的人口。抑郁症患者表现为持续的或反复发作的情绪低落、焦虑或激越、睡眠障碍、应激反应异常和认知功能损伤等系列症状。

[0003] 几十年来神经药理学的推动下,发展出了评价抗抑郁症药物活性的许多公认的动物模型,其中最广泛使用的有强迫游泳测试 (FST)、悬尾测试 (TST) 啮齿类动物模型。近年来有许多研究报道表明,昼/夜持续黑暗 (Darkness/darkness, DD)、睡眠剥夺 (Sleep deprivation, SD) 和慢性不可预知温和应激 (Chronic unpredictable mild stress, CMS) 是抑郁症发生的病因学模型。这些模型为抗抑郁症的药物研究奠定了基础。尽管抑郁症的发病机理仍然不完全清楚,海马突触可塑性 (如 long-term potentiation, LTP) 和认知功能可能也是抑郁症发生的关键机理之一。

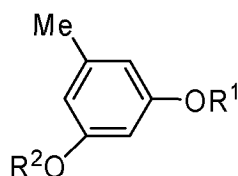
[0004] 5-甲基-1,3-苯二酚 (俗称苔黑酚) 通常在有机合成处理裂解中间体时作为热聚合抑制剂,并在定量测定 RNA 中用作专一试剂;5-甲基-1,3-苯二酚及其衍生物也常作为抗氧化剂被使用,有一定的抗菌活性。到目前为止,还未见将其应用于抗抑郁症、进一步地应用于抗焦虑、抗激越、抗睡眠障碍、抗应激反应异常或抗认知功能损伤等神经功能损伤方面的报道。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供化合物 5-甲基-1,3-苯二酚或其衍生物或含有它们的药物组合物在制备治疗或预防抑郁症的药物或功能食品中的用途。涉及这些化合物用于治疗抑郁症及其相关的疾病症状和发病病因。

[0006] 本发明所述的 5-甲基-1,3-苯二酚或其衍生物如式 I 所示:

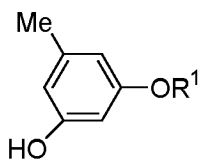
[0007]



[0008] 其中,  $R^1$ 、 $R^2$  分别为氢、 $\beta$ -D-葡萄糖基、 $\beta$ -D-葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖基、甘露糖基、2,3,4,6-四乙酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基、阿洛糖基、半乳糖基、鼠李糖基、岩藻糖基、木糖基、阿拉伯糖基、乙酰基、丙酰基、苯甲酰基、桂皮酰基、琥珀酰基、甲基、乙基、丙基、丁基或卞基;

[0009] 进一步的,所述的 5-甲基-1,3-苯二酚或其衍生物的化学通式如式 II 所示:

[0010]



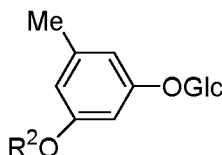
II

[0011] 其中, R¹ 为氢、β-D-葡萄糖基、β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基、甘露糖基、2,3,4,6-四乙酰基-β-D-葡萄糖基、阿洛糖基、半乳糖基、鼠李糖基、岩藻糖基、木糖基、阿拉伯糖基、乙酰基、丙酰基、苯甲酰基、桂皮酰基、琥珀酰基、甲基、乙基、丙基、丁基或卞基。

[0012] 优选的, R¹ 为氢、β-D-葡萄糖基或 β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基,即所述的 5-甲基-1,3-苯二酚或其衍生物是指: 苕黑酚、苕黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖苷或苕黑酚-1-O-[β-D-葡萄糖基-(1→6)]-β-D-葡萄糖苷。

[0013] 进一步的,所述的 5-甲基-1,3-苯二酚衍生物如式 III 所示:

[0014]

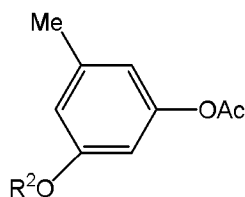


III

[0015] R² 为 β-D-葡萄糖基、β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基、2,3,4,6-四乙酰基-β-D-葡萄糖基、甘露糖基、阿洛糖基、半乳糖基、鼠李糖基、岩藻糖基、木糖基、阿拉伯糖基、乙酰基、丙酰基、苯甲酰基、桂皮酰基、琥珀酰基、甲基、乙基、丙基、丁基或卞基。优选的, R² 为 β-D-葡萄糖基、β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基或鼠李糖基。

[0016] 进一步的,所述的 5-甲基-1,3-苯二酚衍生物如式 IV 所示:

[0017]



IV

[0018] R² 为 β-D-葡萄糖基、β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖基、2,3,4,6-四乙酰基-β-D-葡萄糖基、甘露糖基、阿洛糖基、半乳糖基、鼠李糖基、岩藻糖基、木糖基、阿拉伯糖基、乙酰基、丙酰基、苯甲酰基、桂皮酰基、琥珀酰基、甲基、乙基、丙基、丁基或卞基。优选的, R² 为 2,3,4,6-四乙酰基-β-D-葡萄糖基或乙酰基。

[0019] 其中,所述的“抑郁症”是根据美国精神病学会出版的《精神疾病的诊断和统计手册第四版》(DSM-IV) 或国际疾病分类第 10 版 (ICD-10),包括了不同亚型的精神疾病或障碍:1)、抑郁症 (Depression) 和情感障碍 (Mood disorders) 类型如抑郁型、狂躁型、抑郁和狂躁混合型、轻微狂躁型;2)、抑郁症样障碍 (Depressive disorders) 如抑郁样障碍、心情恶劣;3)、其它情感障碍如身体健康状态导致的情感障碍包括具有抑郁症样特征的各种精

神疾病或障碍的亚型和由于物质（如成瘾性药物）或治疗（如手术、放疗或化了等）等导致的情感障碍；4）、双相抑郁症或双相情感障碍包括反复发作的抑郁型和轻微狂燥型、抑郁和狂燥交替发作型。

[0020] 本发明所述抑郁症的症状除《精神疾病的诊断和统计手册第四版》(DSM-IV) 或国际疾病分类第 10 版 (ICD-10) 所描述的症状外, 还涉及昼夜节律紊乱、睡眠障碍、慢性应激、焦虑症、急性应激损伤或认知功能损伤或障碍等的治疗和预防用途。

[0021] 所述的抑郁症除未知病因外, 还包括对发病病因涉及昼夜节律紊乱、睡眠障碍、慢性应激、焦虑症、急性应激损伤或认知功能损伤或障碍等的治疗和预防用途。此外, 还包括对抑郁症的疾病诊断症状 (DSM-IV 或 ICD-10) 如抑郁症状或绝望（如自杀念头或行为）、情绪障碍、昼夜节律紊乱、睡眠紊乱或睡眠障碍、焦虑、急性应激反应异常（如过高）、认知功能损伤或障碍等的预防和治疗。

[0022] 睡眠障碍和昼夜节律紊乱: 睡眠障碍在抑郁症患者中非常常见, 也是抑郁症疾病程度评定量表的内容之一。所述昼夜节律紊乱 (Circadian rhythm disorders) 涉及最基本的生理功能, 大致可分为 12 小时日照 (Lightness) 和 12 小时黑暗 (Darkness)。由于时差、季节、生活习惯或遗传等因素导致昼夜节律紊乱, 可进而导致系列脑高级功能的损伤其中包括抑郁症、认知功能损伤等。根据美国精神病学会出版的《精神疾病的诊断和统计手册第四版》(DSM-IV) 或国际疾病分类第 10 版 (ICD-10), 睡眠障碍 (Sleep disorders) 主要包括: 1) 多梦症 (Dyssomnias) 或失眠症 (Insomnia)、嗜睡症 (Hypersomnia)、嗜眠症 (Narcolepsy)、呼吸相关的睡眠障碍、昼夜节律相关的睡眠障碍; 2)、异常睡眠如恶梦、睡眠恐惧、梦游; 3)、身体健康状态相关的睡眠障碍和由于物质（如成瘾性药物）或治疗（如手术、放疗或化了等）相关的睡眠障碍。

[0023] 抑郁症患者中焦虑症状是非常常见的, 它也是评定抑郁症疾病严重程度的指标之一。焦虑症 (Anxiety disorders) 包括: 1)、恐慌症 (Panic disorders) 如陌生环境恐惧 (Agoraphobia)、恐慌症伴随陌生环境恐惧症、特殊恐惧症（如对特殊动物、环境、输血等的恐惧）、社交恐惧症、强迫症 (Obsessive-compulsive disorder)、创伤后应激综合症 (Posttraumatic stress disorder)、急性应激异常、广泛性焦虑障碍; 2)、身体健康状态相关的焦虑症和由于物质（如成瘾性药物）或治疗（如手术、放疗或化了等）相关的焦虑症。评价药物的抗焦虑活性常见的啮齿类动物模型有: (1) 高台十字迷宫 (Elevated plusmaze)。 (2) 僵立行为 (Freezing behavior)。

[0024] 应激 (Stress) 是指环境因素严重扰乱了生物体的生理和心理稳态。应激被认为是导致或恶化许多疾病的主要因素之一, 例如精神疾病和认知功能障碍。应激事件可包括许多日常生活事件, 并且因人而异。服用一些物质如成瘾性药物或经历治疗如手术等也导致异常的应激反应。评价应激的常见生物学指标有皮质激素（如啮齿类动物的皮质酮和人类的皮质醇）水平, 可导致相应的急性应激损伤如海马突触可塑性 (Hippocampal synaptic plasticity) 和学习记忆的损伤。动物实验中, 常见的应激方法有足底电刺激应激 (Foot shock stress) 和高台应激 (Elevated platform stress)。

[0025] 认知功能是最重要的脑高级功能之一, 涉及学习、记忆、语言、思维、情绪等。抑郁症被认为是一种认知障碍 (Cognitive disorder), 患者表现为自动负性思维和自动负性情绪反应。1949 年 Hebb 提出突触修饰是学习记忆的理论假说。该假说在 1973 年 Bliss 等发

现海马 long-term potentiation (LTP) 得到了实验验证。但是, 至今还没有直接调控 LTP 的新药应用于抑郁症的治疗。发展针对突触可塑性 LTP 的直接调控药物, 治疗抑郁症及其相关的疾病症状和发病病因, 可能会起到更好、更快的治疗效果。

[0026] 5-甲基-1,3-苯二酚及其衍生物可以直接使用或者以药物组合物的形式使用。所述药物组合物为含有 0.1-99% 的 5-甲基-1,3-苯二酚及其衍生物的化合物, 其余为药学上可接受的, 对人和动物无毒、无惰性的药用载体和 / 或赋形剂。

[0027] 所述的药用载体或赋形剂是一种或多种固体、半固体和液体稀释剂、填料以及药物制品辅料。5-甲基-1,3-苯二酚或其衍生物的药物组合物采用制药和食品领域公认的方法制备成各种剂型: 喷剂, 气雾剂, 液体制剂如注射剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂等, 固体制剂如片剂、胶囊剂、颗粒剂、冲剂等。

[0028] 本发明的药物给药途径为注射 (静脉注射、静脉滴注、肌肉注射、腹腔注射、皮下注射) 和口服、舌下给药、粘膜透析等。

[0029] 5-甲基-1,3-苯二酚及其衍生物的有效剂量在 0.1mg-12g/ 成年人 / 天 (优选为 50-200mg/ 成年人 / 天) 范围内和药学可接受的制剂形式用于治疗 and 预防上述疾病、疾病病因和症状。

[0030] 本发明提供了 5-甲基-1,3-苯二酚及其衍生物或含有它们的药物组合物用于制备抗抑郁症的药物和功能食品, 为预防和治疗抑郁症、抑郁症发生病因、抑郁症的疾病症状和其它疾病的类似症状, 以及焦虑、应激、认知功能损伤等其它疾病的治疗提供了一种新的选择。

## 具体实施方式

[0031] 下面结合实例进一步对本发明实质内容进行说明, 但以下实施例中所用的化合物和方法仅仅是帮助对本发明的理解与补充, 本发明的内容并不局限于此, 采用任何其它方法得到本发明中申请保护的化合物和这些化合物在抗抑郁症和治疗抑郁症相关的疾病症状或发病病因的应用均在本发明包含之内。

[0032] 其中, 荜黑酚 (Orcinol, OR) 可从仙茅根 (*Curculigo orchioides* Garr.) 中提取得到。

[0033] 荜黑酚-1-氧- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃苷 (Orcinol-1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, ORG)、荜黑酚-1-O-[ $\beta$ -D-葡萄糖吡喃基-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃苷 [Orcinol-1-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-glucopyranoside, ORGG] 也是从仙茅根中提取得到。其它荜黑酚衍生物可采用公认技术制备, 具体如下:

[0034] 1. 当  $R^1$  和  $R^2$  为  $\beta$ -D-葡萄糖基、 $\beta$ -D-葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖基、甘露糖基、阿洛糖基、半乳糖基、鼠李糖基、岩藻糖基、木糖基或阿拉伯糖基时, 可采用相应糖的乙酰化产物与荜黑酚在甲醇溶液中, 避光, 加入氢溴酸 / 醋酸溶液, 室温搅拌 1-5 小时, 分离获得相应的荜黑酚乙酰化糖苷。相应的荜黑酚乙酰化糖苷在甲醇溶液中加入甲醇钠室温搅拌 1-5 小时, 去乙酰基, 获得相应荜黑酚糖苷。

[0035] 2. 当  $R^1$  和  $R^2$  为酰基时, 可分别将荜黑酚、荜黑酚糖苷溶解于吡啶中, 加入相应的酸酐或酰氯, 以及 10-20% 的 4-N, N-二甲基吡啶, 加热 (60-120 $^{\circ}$ C) 反应 3-5 小时, 加入水后用氯仿萃取, 分离纯化可的相应的酰化产物。

[0036] 3. 当  $R^1$  和  $R^2$  为烷基时, 可采用荜黑酚、荜黑酚糖苷溶解在四氢呋喃或二甲亚砜中, 加入氢氧化钠, 搅拌 30-60min, 加入相应的卤代烷, 反应 3-5 小时, 加入水后用氯仿萃取, 分离纯化可的相应的烷基化产物。

[0037] 实施例 1 荜黑酚-1-氧- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃苷 (ORG)、荜黑酚 (OR), 荜黑酚-1-0-[ $\beta$ -D-葡萄糖吡喃基-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃苷 (ORGG) 的提取分离。

[0038] 采集仙茅根, 阴干、晒干、粉碎。取 20kg 仙茅根粉, 用 200kg 90%乙醇回流提取 3 次, 每次 2 小时, 合并提取液并浓缩至无乙醇味的小体积 (约 30kg), 放置 12 小时后过滤, 用 20kg 的 D<sub>101</sub> 大孔 (吸附树脂进行柱层析, 依次用 100kg 水、60kg 70%乙醇、60kg 90%乙醇进行洗脱, 分别收集 70%和 90%乙醇洗脱液, 减压回收, 得 70%乙醇洗脱部份 340g 和 90%乙醇洗脱部份 60g。

[0039] 70%乙醇洗脱部份 340g 用甲醇溶解, 吸附于 400g 硅胶, 室温挥发至干, 过筛, 经柱层析硅胶 (2.1kg 硅胶, 200-300 目), 氯仿-甲醇-水 (90:10:1~70:30:3, v/v/v) 洗脱, 每 1500ml 洗脱液作为一个流份收集, 第 2-3 流份合并, 减压回收至干, 乙醇重结晶得荜黑酚 5g, 第 9-15 流份合并, 减压回收至干, 用乙醇重结晶得化合物荜黑酚-1-氧- $\beta$ -D-葡萄糖苷 50g, 第 22-26 流份合并并减压浓缩至干, 乙醇重结晶得化合物荜黑酚-1-0-[ $\beta$ -D-葡萄糖吡喃基-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃苷]10g。

[0040] 结构测定: 旋光用 SEPA-300 测定, 紫外光谱 (UV) 用 UV-210A 仪测定, 红外光谱 (IR) 用 Bio-Rad FTS-135 型分光光度计测定, KBr 压片。质谱 (MS) 用 Auto SPEC3000 型质谱仪测定。核磁共振谱 ( $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR) 用 Bruker DRX-500 超导核磁共振仪测定, TMS 作内标,  $\text{CDCl}_3$  作溶剂。柱层析材料和薄层层析用硅胶为青岛美高集团有限公司的产品。

[0041] 荜黑酚-1-氧- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃苷 (ORG)

[0042] 英文名称: Orcinol 1-0- $\beta$ -D-glycopyranoside

[0043] 分子式:  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_7$

[0044] 分子量: 286

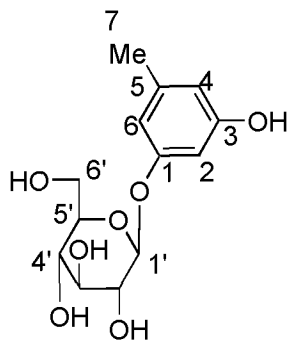
[0045] 性状: 淡黄色粉末。

[0046]  $[\alpha]_D^{25} -63.03^\circ$  (c 5.95, 甲醇)。

[0047] UV (甲醇):  $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 279(3.19), 273(3.21), 219(3.99), 203(4.58)$ 。

[0048] IR (溴化钾):  $\nu_{\max} = 3495\text{cm}^{-1}, 3385\text{cm}^{-1}, 1620\text{cm}^{-1}, 1596\text{cm}^{-1}, 1175\text{cm}^{-1}, 1076\text{cm}^{-1}, 1032\text{cm}^{-1}$ 。

[0049]



[0050] FAB-MS (-):  $m/z = 285[(M-1)^-], 100], 123[(M-1-glc)^-, 87]$ 。

[0051]  $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, 400\text{MHz}) \delta_{\text{H}}: 6.41(1\text{H}, \text{s}, \text{H}-2), 6.36(1\text{H}, \text{s}, \text{H}-6), 6.29(1\text{H}, \text{s}, \text{H}-4),$



4.84(1H, d,  $J = 7.3\text{Hz}$ , H-1'), 2.22(3H, s, H-7)。

[0052]  $^{13}\text{C}$ -NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 160.1(s, C-1), 111.4(d, C-2), 159.2(s, C-3), 102.4(s, C-4), 141.3(s, C-5), 110.0(d, C-6), 21.6(q, C-7), 102.5(d, C-1'), 75.0(d, C-2'), 78.1(d, C-3'), 71.6(d, C-4'), 78.2(d, C-5'), 62.7(t, C-6')。

[0053] 荅黑酚 (OR)

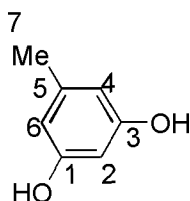
[0054] 英文名称: Orcinol

[0055] 分子式:  $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$

[0056] 分子量: 124

[0057] 性状: 淡黄色至白色粉末

[0058]



[0059] UV(甲醇):  $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon) = 281(3.20), 275(3.22), 204(4.59)$ 。

[0060] IR(溴化钾):  $\nu_{\text{max}} = 3313\text{cm}^{-1}, 1629\text{cm}^{-1}, 1601\text{cm}^{-1}, 1512\text{cm}^{-1}, 1477\text{cm}^{-1}, 1332\text{cm}^{-1}, 1208\text{cm}^{-1}, 1148\text{cm}^{-1}, 1032\text{cm}^{-1}, 973\text{cm}^{-1}$ 。

[0061] EI-MS(70eV):  $m/z = 125[(M+1)^+, 8], 124[M^+, 100], 123[(M-1)^+, 55], 107[(M+1-18)^+, 7], 95(12), 77(8)$ 。

[0062]  $^1\text{H}$ -NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6.14(2H, brs, H-2, 6), 6.10(1H, brs, H-4), 2.16(3H, s, H-7)。

[0063]  $^{13}\text{C}$ -NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.2( $s \times 2$ , C-1, 3), 108.7( $d \times 2$ , C-2, 6), 108.7(s, C-4), 141.2(s, C-5), 21.5(q, C-7)。

[0064] 荅黑酚-1-O-[ $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (ORGG)

[0065] 英文名称: Orcinol 1-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopyranoside

[0066] 分子式:  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$

[0067] 分子量: 448

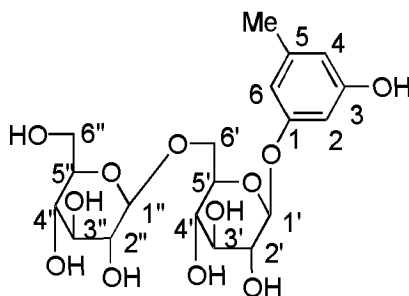
[0068] 性状: 白色无定形粉末

[0069] m. p.: 117-119 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0070] FAB-MS(-) ( $m/z$ ): 447 $[M-1]^-$ , 123 $[M-1-2\text{glc}]^-$ 。

[0071]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.43(1H, brs, H-2), 6.40(1H, brs, H-4), 6.28(1H, brs, H-6), 4.82(1H, d,  $J = 7.30\text{Hz}$ , H-1'), 4.40(1H, d,  $J = 7.73\text{Hz}$ , H-1''), 2.21(3H, s, H-7)。

[0072]



[0073]  $^{13}\text{C}$ NMR (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{c}}$ : 160.0 (s, C-1), 102.0 (d, C-2), 159.2 (s, C-3), 111.2 (d, C-4), 141.3 (s, C-5), 109.8 (d, C-6), 21.7 (s, C-7), 102.1 (d, C-1'), 74.8 (d, C-2'), 77.7 (d, C-3'), 71.3 (s, C-4'), 77.5 (d, C-5), 69.6 (t, C-6'), 104.6 (d, C-1''), 75.2 (d, C-2''), 77.8 (d, C-3''), 71.5 (d, C-4''), 77.9 (d, C-5''), 62.6 (t, C-6'').

[0074] 实施例 2 1,3-二乙酰基苕黑酚 (OR-2Ac) 的制备

[0075] 于 100ml 圆底烧瓶中加入 40ml 吡啶和 0.01mol (1.24g) 苕黑酚, 室温搅拌下滴加醋酸酐 0.05mol (5.1g), 室温搅拌 24 小时至反应完毕。将反应液倒入 200ml 冰水中, 乙酸乙酯萃取三次, 每次 50ml, 合并有机相, 5% 盐酸洗涤三次, 饱和碳酸氢钠洗涤三次, 饱和食盐水洗涤三次后, 有机相用无水硫酸钠干燥。减压回收溶剂得到的粗产品经硅胶柱层析 (石油醚 / 丙酮, 90 : 10) 后得到 1,3-二乙酰基苕黑酚 (1.87g, 得率 90%)。

[0076] 1,3-二乙酰基苕黑酚 (OR-2Ac) 结构数据

[0077] 中文名称: 1,3-氧-二乙酰基苕黑酚

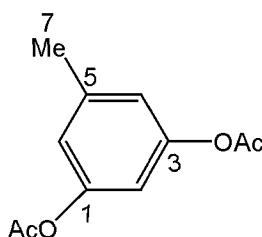
[0078] 英文名称: 1,3-O-Diacetylorsinol

[0079] 分子式:  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$

[0080] 分子量: 208

[0081] 性状: 无色油状物。

[0082]



[0083] ESI-MS (+)  $m/z$ : 231  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

[0084] IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 1769, 1602, 1592, 1466, 1434, 1369, 1292, 1198, 1124, 1036  $\text{cm}^{-1}$ .

[0085]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.78 (2H, s,  $J = 1.9\text{Hz}$ , H-4, 6), 6.71 (1H, d,  $J = 1.9\text{Hz}$ , H-2), 2.30 (3H, s, H-7), 2.19 (s, 6H);

[0086]  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{c}}$ : 169.0 (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 169.0 (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 150.9 (s, C-1), 150.9 (s, C-3), 140.3 (s, C-5), 119.7 (d, C-4), 119.7 (d, C-6), 112.5 (d, C-2), 21.2 (q, C-7), 20.9 (q,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 20.9 (q,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

[0087] 实施例 3 3-氧-乙酰-苕黑酚-1-氧-(2,3,4,6-四乙酰基)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃苷 (ORG-5Ac) 的合成

[0088] 取苕黑酚 (286mg), 溶解于 20ml 吡啶中, 室温搅拌下滴加醋酸酐 25mmol (2.5g), 室温搅拌 24 小时至反应完毕。将反应液倒入 50ml 冰水中, 乙酸乙酯萃取三次, 每次 20ml, 合

并有机相,依次用 5% 盐酸、饱和碳酸氢钠和饱和食盐水洗涤三次后,有机相用无水硫酸钠干燥。减压回收溶剂得到固体经硅胶柱层析后得到 3-氧-乙酰-荜黑酚-1-氧-(2,3,4,6-四乙酰基)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃苷 (ORG-5Ac) (421mg),得率 85%。

[0089] 3-氧-乙酰-荜黑酚-1-氧-(2,3,4,6-四乙酰基)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃苷 (ORG-5Ac)

[0090] 英文名称:3-O-Acetyl-orcinol-1-O-(2,3,4,6-tetraacetyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside

[0091] 分子式: $C_{23}H_{28}O_{12}$

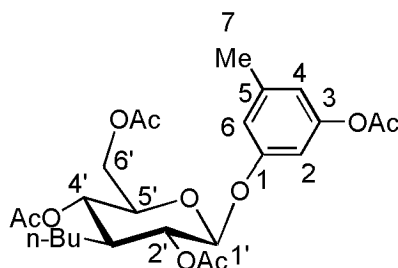
[0092] 分子量:496

[0093] 性状:白色无定型粉末。

[0094] ESI-MS(+) $m/z$ :519[M+Na]<sup>+</sup>.

[0095] IR(KBr)  $\nu_{\max}$ :1759,1625,1590,1373,1241,1211 $cm^{-1}$ .

[0096]



[0097]  $^1H$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta_H$ :6.68(1H, s,  $J = 1.9Hz$ ),6.63(1H, s,  $J = 1.9Hz$ ),6.54(1H, s,  $J = 1.9Hz$ ),5.30-5.22(m,2H),5.14(t,1H,  $J = 9.7Hz$ ),5.06(1H, d,  $J = 7.5Hz$ ),4.28-4.14(m,2H),3.89-3.85(m,1H),2.31(s,3H),2.27(s,3H),2.08(s,3H),2.05(s,3H),2.04(s,3H),2.03(s,3H).

[0098]  $^{13}C$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta_C$ :170.6(s,  $CH_3CO$ ),170.2(s,  $CH_3CO$ ),169.4(s,  $CH_3CO$ ),169.3(s,  $CH_3CO$ ),169.3(s,  $CH_3CO$ ),157.2(s, C-3),151.1(s, C-1),140.6(s, C-5),117.2(d, C-6),115.1(d, C-4),107.6(d, C-2),98.8(s, C-1'),72.6(d, C-3'),72.0(d, C-5'),71.0(d, C-2'),68.2(d, C-4'),62.0(t, C-6'),21.5(q, C-7),21.1(q,  $CH_3CO$ ),20.6(q,  $CH_3CO \times 4$ ).

[0099] 实施例 4 荜黑酚-1-四乙酰基鼠李糖的制备

[0100] 向 100ml 氢溴酸/醋酸溶液加入 36 克四乙酰基鼠李糖,避光室温搅拌,5 小时室温搅拌小时,加入冰水 500ml,用乙酸乙酯萃取 3 次 (500ml $\times$ 3),萃取液依次用水、5%碳酸氢钠水溶液、饱和食盐水洗涤,洗涤后的萃取液用无水硫酸钠干燥,蒸干后得到 1-溴代四乙酰鼠李糖。

[0101] 取荜黑酚 (12.4 克) 溶于 20ml 氯仿中,搅拌下加入 5%氢氧化钠溶液 (20ml),升温至 50 $^{\circ}C$ ,滴加 1-溴代四乙酰鼠李糖的氯仿溶液 (0.12mol),50 $^{\circ}C$ 下继续搅拌至反应完全为止。将反应液倒入 150ml 冰水中,5%盐酸调节 pH 至 7 左右,乙酸乙酯萃取,萃取液用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥后蒸干得到粗产品,粗产品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯/石油醚 = 5 : 1) 得到荜黑酚-1-四乙酰基鼠李糖。

[0102] 实施例 5 荜黑酚-1-鼠李糖的制备

[0103] 取苔黑酚-1-四乙酰基鼠李糖 4.14 克,溶解于甲醇 20ml 中,加入 0.18 克甲醇钠,室温搅拌 2 小时,用 5% 盐酸水溶液中中和,加入蒸馏水 50ml,减压除去甲醇,用正丁醇萃取 3 次 (50ml×3),回收溶剂,乙醇重结晶得苔黑酚-1-鼠李糖。

[0104] 实施例 6

[0105] 按实施例 1 的方法先制得苔黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖苷,按常规加注射用水,精滤,灌封灭菌制成注射液。

[0106] 实施例 7

[0107] 按实施例 1 的方法先制得苔黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖吡喃苷,将其溶于无菌注射用水中,搅拌使溶,用无菌抽滤漏斗过滤,再无菌精滤,分装于安瓿中,低温冷冻干燥后无菌熔封得粉针剂。

[0108] 实施例 8

[0109] 将所分离得到的苔黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖吡喃苷与赋形剂重量比为 9 : 1 的比例加入赋形剂,制成粉剂。

[0110] 实施例 9

[0111] 按实施例 1 的方法先制得苔黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖吡喃苷,按其与赋形剂重量比为 1 : 5-1 : 10 的比例加入赋形剂,制成片剂、胶囊、颗粒剂或冲剂。

[0112] 实施例 10

[0113] 按实施例 1 的方法先制得苔黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖吡喃苷,按常规口服液制法制成口服液。

[0114] 实施例 11

[0115] 按实施例 1 的方法先制得苔黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖吡喃苷,按其与赋形剂重量比为 5 : 1 的比例加入赋形剂,制成胶囊、颗粒剂或冲剂。

[0116] 实施例 12

[0117] 取按实施例 1 的方法先制得苔黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖吡喃苷 12.4 克,加入淀粉 600 克,乳糖 200 克,薄荷醇 5 克,羧甲基淀粉钠 183 克,制成含片,作为功能食品。

[0118] 为了更好地理解本发明的实质,下面用苔黑酚及其衍生物与药用载体或赋形剂组成的药物组合物的药理作用结果来说明本发明的实质,但本发明的内容并不局限于此。

[0119] 试验例一苔黑酚 (OR)、苔黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖吡喃苷 (ORG) 的抗抑郁症药效学研究

[0120] (一)ORG 和 OR 在大、小鼠 FST 和 TST 模型中的抗抑郁症量效研究

[0121] 1、实验方法

[0122] 四川省人民医院实验动物研究所提供实验动物用昆明品系小鼠,3-4 周龄,雌雄各半,体重 25-30g ;SD 品系大鼠,雌雄各半,体重 250-300g,合格证号为 A4CXK(川)2003-16。每组动物数见表 1~5。受试物苔黑酚、苔黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖苷、苔黑酚-1-0-[β-D-葡萄糖基-(1→6)]-β-D-葡萄糖苷、1,3-二乙酰基苔黑酚、3-氧-乙酰-苔黑酚-1-氧-(2,3,4,6-四乙酰基)-β-D-葡萄糖吡喃苷为实施例 1,2,3 制得。实验设置不同剂量的实验组、溶剂对照组以及丙咪嗪 (Sigma 公司,批号 106k1588) 和文拉发辛 (武汉远诚科技公司,批号 200701001) 阳性对照药物组。

[0123] 给药方式:按设定剂量组分别称取本发明药溶解于生理盐水中,充分混匀。丙咪

嗪和文拉发辛用生理盐水溶解和羧甲基纤维素钠助溶,超声波混匀,剂量为 15mg/kg。灌胃给药体积小鼠为 0.1ml/10g,大鼠为 1ml/100g;腹腔给药体积小鼠为 0.1ml/10g,大鼠为 0.1ml/100g。

[0124] 小鼠强迫游泳方案:玻璃缸高 24cm,直径 15cm,水深 17cm,水温  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 。测试前 24h 和 5h 给药,测试时将小鼠放入玻璃缸内观察 6 分钟。人工观测并用秒表记录后 4 分钟内小鼠累计不动时间 (Immobility time)。

[0125] 大鼠强迫游泳方案:实验分为两天进行。第一天将大鼠置于水缸中训练 15min,记录前 5min 的累计不动时间。剔除训练中不动时间过短或过长的大鼠。训练后 0h 和 19h 后给药。第二天 (训练后 24h),进行测试,人工观察并用秒表记录 5min 内累积不动时间。

[0126] 小鼠悬尾实验方案:测试前 24h 和 5h 给药,测试时用粘膏条将小鼠尾在距尾尖 2cm 处粘在小鼠悬尾支架的悬棒下端。悬棒离支架底部 50cm。人工观测并用秒表记录 6 分钟内小鼠累计不动时间。

[0127] 数据分析:实验结果表示为平均值  $\pm$  标准误 (秒)。统计采用 one-way ANOVA followed by least significant difference (LSD) test (SPSS 11)。显著差异设置为  $P < 0.05$ 。所有半数有效剂量  $ED_{50}$  (Median effective dose) 的计算采用 Prism 软件。

[0128] 2、实验结果

[0129] 2.1、ORG 灌胃给药在大鼠 FST 中的抗抑郁症药效结果

[0130] 表 1 ORG 灌胃给药在大鼠 FST 中的剂量 - 不动时间关系

| 组别         | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只)              | 不动时间(秒) (平均值 $\pm$ 标准误) | p 值    |
|------------|------------|----------------------|-------------------------|--------|
| 生理盐水       | 1ml/100g   | 30                   | 179.50 $\pm$ 5.32       |        |
| [0131] ORG | 0.0625     | 10                   | 187.20 $\pm$ 11.97      | 0.60   |
|            | 0.125      | 20                   | 181.50 $\pm$ 8.19       | 0.86   |
|            | 0.1875     | 20                   | 138.90 $\pm$ 13.31 *    | 0.006  |
|            | 0.25       | 20                   | 121.05 $\pm$ 9.44 *     | <0.001 |
|            | 0.5        | 20                   | 113.70 $\pm$ 6.74 *     | <0.001 |
|            | 1          | 20                   | 96.87 $\pm$ 7.40 *      | <0.001 |
|            | 2          | 20                   | 91.60 $\pm$ 7.06 *      | <0.001 |
|            | 4          | 20                   | 84.40 $\pm$ 9.20 *      | <0.001 |
|            | 8          | 20                   | 94.30 $\pm$ 9.86 *      | <0.001 |
|            | 16         | 20                   | 91.40 $\pm$ 11.36 *     | <0.001 |
|            | 32         | 19                   | 107.26 $\pm$ 10.74 *    | <0.001 |
|            | 64         | 20                   | 105.90 $\pm$ 19.77 *    | <0.001 |
| 128        | 20         | 103.00 $\pm$ 17.42 * | <0.001                  |        |
| 文拉发辛       | 15         | 10                   | 100.80 $\pm$ 9.84 *     | <0.001 |
| 丙咪嗪        | 15         | 29                   | 92.72 $\pm$ 7.09 *      | <0.001 |

[0132] \* $P < 0.05$  (one way ANOVA followed by LSD)

[0133] 在第一次训练结束后立即和 19 小时后灌胃给予 ORG,显著地降低了大鼠在 FST 模型中的不动时间,具有显著的剂量效应关系。最佳效应剂量为 4mg/kg,  $ED_{50}$  约为 0.22mg/kg。

[0134] 2. 2、ORG 灌胃给药在小鼠 FST 中的抗抑郁症药效结果

[0135] 表 2 ORG 灌胃给药在小鼠 FST 中的剂量 - 不动时间关系

[0136]

| 组别   | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只)       | 不动时间(秒) (平均值±标准误) | p 值    |
|------|------------|---------------|-------------------|--------|
| 生理盐水 | 0.1ml/10g  | 108           | 178.50±3.04       |        |
| ORG  | 0.093      | 40            | 169.35±4.32       | 0.26   |
|      | 0.186      | 30            | 155.30±9.19 *     | 0.01   |
|      | 0.3725     | 30            | 137.57±6.41 *     | <0.001 |
|      | 0.75       | 60            | 139.45±7.04 *     | <0.001 |
|      | 1.5        | 60            | 127.23±6.63 *     | <0.001 |
|      | 3          | 78            | 114.41±6.23 *     | <0.001 |
|      | 6          | 70            | 129.76±5.99 *     | <0.001 |
|      | 12         | 70            | 122.71±5.56 *     | <0.001 |
|      | 24         | 70            | 121.57±6.13 *     | <0.001 |
|      | 48         | 69            | 135.36±4.60 *     | <0.001 |
| 96   | 50         | 145.34±5.39 * | <0.001            |        |
| 文拉发辛 | 15         | 78            | 134.28±3.76 *     | <0.001 |
| 丙咪嗪  | 15         | 79            | 131.20±3.91 *     | <0.001 |

[0137] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0138] 在测试前 24 和 5 小时灌胃给予 ORG, 显著地降低了小鼠在 FST 模型中的不动时间, 具有显著的剂量效应关系。最佳效应剂量为 3mg/kg, ED<sub>50</sub> 约为 0.22mg/kg。

[0139] 2. 3、ORG 灌胃给药在小鼠 TST 中的抗抑郁症药效结果

[0140] 表 3 ORG 灌胃给药在小鼠 TST 中的剂量 - 不动时间关系

| 组别   | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 不动时间 (秒) (平均值±标准误) | p 值    |
|------|------------|---------|--------------------|--------|
| 生理盐水 | 0.1ml/10g  | 38      | 161.18±5.47        |        |
| ORG  | 0.1875     | 40      | 161.70±6.89        | 0.95   |
|      | 0.375      | 40      | 155.68±6.77        | 0.52   |
|      | 0.5        | 30      | 125.30±6.93 *      | <0.001 |
|      | 0.75       | 30      | 117.33±6.56 *      | <0.001 |
|      | 1.5        | 30      | 109.27±6.81 *      | <0.001 |
|      | 3          | 30      | 98.07±5.95 *       | <0.001 |
|      | 6          | 30      | 89.73±5.02 *       | <0.001 |
|      | 12         | 30      | 77.67±5.33 *       | <0.001 |
|      | 24         | 30      | 91.03±7.44 *       | <0.001 |
|      | 48         | 20      | 100.20±10.46 *     | <0.001 |
|      | 96         | 19      | 107.68±8.85 *      | <0.001 |
| 文拉发辛 | 15         | 20      | 102.85±9.34 *      | <0.001 |
| 丙咪嗪  | 15         | 40      | 105.65±5.71 *      | <0.001 |

[0142] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0143] 在测试前 24 和 5 小时灌胃给予 ORG, 显著地降低了小鼠在 TST 模型中的不动时间, 具有显著的剂量效应关系。最佳效应剂量为 12mg/kg, ED<sub>50</sub> 约为 0.73mg/kg。

[0144] 2.4、OR 腹腔注射在小鼠 FST 中的抗抑郁症药效结果

[0145] 表 4OR 腹腔注射在小鼠 FST 中对不动时间的影响

[0146]

| 组别   | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 不动时间 (秒) (平均值 ± 标准误) | p 值   |
|------|------------|---------|----------------------|-------|
| 生理盐水 | 0.1ml/10g  | 9       | 156.56 ± 19.78       |       |
| OR   | 10         | 10      | 82.40 ± 10.64*       | 0.005 |
| 丙咪嗪  | 15         | 13      | 96.38 ± 12.04        | 0.15  |

[0147] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0148] 在测试前 24 和 5 小时腹腔注射 OR, 显著地降低了小鼠在 FST 模型中的不动时间。

[0149] 2.5、ORG 的衍生物腹腔注射在小鼠 FST 中的抗抑郁症药效结果

[0150] 表 5ORG 的衍生物腹腔注射在小鼠 FST 中对不动时间的影响

[0151]

| 组别      | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 不动时间 (秒) (平均值 ± 标准误) | p 值     |
|---------|------------|---------|----------------------|---------|
| 生理盐水    | 0.1ml/10g  | 10      | 213.60 ± 3.77        |         |
| ORGG    | 10         | 10      | 184.20 ± 11.29*      | 0.012   |
| OR-2Ac  | 10         | 10      | 170.10 ± 6.37*       | < 0.001 |
| ORG-5Ac | 10         | 10      | 178.90 ± 9.61*       | 0.003   |
| 丙咪嗪     | 15         | 10      | 146.00 ± 6.46*       | < 0.001 |

[0152] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0153] 在测试前 24 和 5 小时腹腔注射 ORG 的衍生物 ORGG、OR-2Ac、ORG-5Ac, 均能显著地降低小鼠在 FST 模型中的不动时间。

[0154] 3、ORG 的抗抑郁治疗指数 (Therapeutic Index, TI)

[0155] 在急性毒性实验中, 由于 ORG 低毒, 1750mg/kg 时已达到饱和溶解浓度, 但在行为和病理切片中均未观测到任何异常。因此, 半数毒性剂量 TD<sub>50</sub> (Median toxic dose) 肯定远远大于 1750mg/kg。

[0156] ORG 在小鼠 FST 的  $TI = TD_{50} \div ED_{50} = > 1750\text{mg/kg} \div 0.22\text{mg/kg} = > 7955$

[0157] ORG 在小鼠 TST 的  $TI = TD_{50} \div ED_{50} = > 1750\text{mg/kg} \div 0.73\text{mg/kg} = > 2397$

[0158] (二) ORG 在小鼠 FST 中的抗抑郁症时效关系研究

[0159] 1、实验方法

[0160] 四川省人民医院实验动物研究所提供实验动物用昆明品系小鼠, 3-4 周龄, 雌雄各半, 体重 25-30g。合格证号为 A4CXK(川)2003-16。每组动物数见表 6、7、8。受试物 ORG 由

实施例 1 制得。实验设置不同剂量的实验组、溶剂对照组。

[0161] 给药方式和实验设计：按设定剂量组分别称取受试物 ORG 溶解于生理盐水中，充分混匀。灌胃给药体积为 0.1ml/10g。

[0162] 1) 给药次数。在 24 小时内用 ORG (3mg/kg) 或生理盐水给予小鼠灌胃 1-5 次，最后一次给药后 5 小时在 FST 中检测小鼠的不动时间。设定相应对照生理盐水组的不动时间为 100%，以计算不同给药次数导致的药效。

[0163] 2) 给药剂量和次数的比较。在 24 小时内用 ORG (6mg/kg) 给予小鼠灌胃 1 次，或用 ORG (3mg/kg) 给予小鼠灌胃 2 次。最后 1 次给药后 5 小时在 FST 中检测小鼠不动时间。设定相应对照生理盐水组的不动时间为 100%，以计算不同给药次数导致的药效。

[0164] 3) 起效时间和维持时间。灌胃给予小鼠 ORG (3mg/kg)，19 小时后第 2 次给药 ORG (3mg/kg)，分别在第 2 次给药后 2.5h、5h、24h、72h 和 2 周检测在 FST 中小鼠不动时间。设定相应对照生理盐水组的不动时间为 100%，以计算不同给药次数导致的药效。

[0165] 数据分析：实验结果表示为平均值 ± 标准误 (%)，以生理盐水的结果为 100%，计算 ORG 的药效，抗抑郁症的药效越强，其百分率越小。这种归一化处理以增强实验组间的可比性。统计采用 one-way ANOVA followed by least significant difference (LSD) test (SPSS 11)。显著差异设置为  $P < 0.05$ 。

[0166] 2、实验结果

[0167] 2.1、24h 内 ORG 给药次数在 FST 中的抗抑郁症药效结果

[0168] 表 6 在 FST 中 ORG 灌胃给药次数 - 效应关系

| 组别         | 剂量 (mg/kg) | 24 小时内给药次数 | 动物数 (只) | 不动时间 (%生理盐水) (平均值±标准误) | p 值   |
|------------|------------|------------|---------|------------------------|-------|
| 生理盐水       |            |            | 10      | 100                    |       |
| [0169] ORG | 3          | 1          | 10      | 83.57±6.66             | 0.098 |
|            | 3          | 2          | 10      | 64.98±5.96 *           | 0.001 |
|            | 3          | 3          | 10      | 65.65±9.67 *           | 0.001 |
|            | 3          | 4          | 10      | 89.81±6.50             | 0.302 |
|            | 3          | 5          | 10      | 91.26±5.93             | 0.375 |

[0170] \* $P < 0.05$  (one way ANOVA followed by LSD)。

[0171] 在 24 小时内，分别给予 ORG (3mg/kg) 1-5 次，最后 1 次给药后 5h 在 FST 中检测小鼠的不动时间并通过生理盐水的结果换算成百分数 (%)。2 次和 3 次灌胃给药显著缩短 FST 中小鼠不动时间，表明 2-3 次的给药具有最好的药物药效。

[0172] 2.2、24 小时内 ORG 给药次数达到剂量匹配的抗抑郁症药效结果

[0173] 表 7 24h 内同样剂量下两次灌胃给药的药效好于单次灌胃给药的药效



| 组别          | 剂量<br>(mg/kg) | 24 小时内<br>给药次数 | 动物数<br>(只) | 不动时间 (%生理盐水)<br>(平均值±标准误) | p 值    |
|-------------|---------------|----------------|------------|---------------------------|--------|
| [0174] 生理盐水 |               |                | 31         | 100                       |        |
| ORG         | 3             | 2              | 9          | 64.03±7.20*               | <0.001 |
| ORG         | 6             | 1              | 30         | 80.70±4.64*               | =0.002 |

[0175] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0176] 在 24 小时内,分别灌胃给予小鼠 ORG 单次 (6mg/kg) 或两次 (3mg/kg),最终当天的总剂量相同。两次给药能显著缩短 FST 中小鼠不动时间,表明 2 次给药具有更好的药物药效。

[0177] 2.3、ORG 在 FST 中抗抑郁症的起效时间和维持时间

[0178] 表 8 灌胃给予 ORG 后在 FST 中的时间 - 效应关系

| 组别          | 剂量<br>(mg/kg) | 末次给药后<br>检测时间点 | 动物数<br>(只) | 不动时间 (%生理盐水)<br>(平均值±标准误) | p 值    |
|-------------|---------------|----------------|------------|---------------------------|--------|
| [0179] 生理盐水 |               |                | 50         | 100                       |        |
| ORG         | 6             | 2.5 小时         | 20         | 73.63±4.21*               | <0.001 |
|             | 6             | 5 小时           | 20         | 71.92±6.05*               | =0.001 |
|             | 6             | 24 小时          | 20         | 62.83±6.59*               | <0.001 |
|             | 6             | 72 小时          | 20         | 77.33±6.07*               | =0.002 |
|             | 6             | 2 周            | 20         | 99.54±5.54                | 0.954  |

[0180] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0181] 灌胃给予小鼠 ORG (3mg/kg), 19 小时后第 2 次给药 ORG (3mg/kg), 分别第 2 次给药后 2.5h、5h、24h、72h 和 2 周检测在 FST 中小鼠不动时间,最短起效时间为 2.5h,最佳效应时间是 24h,在 72 小时内均有药效。因此,ORG 的时效可维持 72h。结果表明 ORG 起效快,药效维持时间较长。

[0182] (三) ORG 在小鼠经历 CMS 后的抗抑郁症活性研究

[0183] 慢性不可预知温和应激动物模型 (CMS) 被认为是很好地模拟了人类因慢性应激而导致的或恶化的抑郁症。多种不可预知的温和应激有不定期的禁水、禁食、束缚、游泳等,导致动物对奖励刺激的反应缺乏 (如对糖水失去偏爱)。经历 CMS 的动物,在 FST 和 TST 实验中的不动时间显著延长,表明增加了抑郁症的程度。因此,CMS 被用于评价抗抑郁症药物的疗效以及评价对抗抑郁症发生的应激病因的药效。

[0184] 1、实验方法

[0185] 四川省人民医院实验动物研究所提供实验动物用昆明小鼠,3-4 周龄,雌雄各半,体重 25-30g。合格证号为 A4CXK(川)2003-16)。每组动物数见表 9、10。受试物 ORG 为实施例 1 制得。实验设置不同剂量的实验组、溶剂对照组以及丙咪嗪 (Sigma 公司,批号 106k1588) 阳性对照药物组。

[0186] CMS 模型:昆明小鼠经历的应激因子包括:颠倒昼夜节律、持续光照、冷应激、潮湿垫料、倾斜笼具、取食困难、取水困难、束缚应激。以上 8 个应激因子随机穿插,每日一种,同种应激不连续出现,连续应激 8 周。制造模型的最后一周起灌胃给药,连续一周,1 次/天。

最后一次给药 30 分钟后进行行为学测试。测试指标 :CMS 小鼠在强迫游泳和悬尾测试模型中的不动时间。检测方法和数据分析如上所述。

[0187] 2、实验结果

[0188] 2. 1、ORG 在小鼠经历 CMS 后在 FST 中的抗抑郁症药效结果

[0189] 表 90RG 灌胃给予 CMS 小鼠后在 FST 中的剂量 - 不动时间关系

| 组别         | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 不动时间 (秒) (平均值±标准误) | p 值    |
|------------|------------|---------|--------------------|--------|
| 生理盐水       | 0.1ml/10g  | 28      | 208.00±5.57        |        |
| [0190] ORG | 1.25       | 10      | 190.90±12.94       | 0.255  |
|            | 2.5        | 11      | 177.00±11.78*      | 0.033  |
|            | 5          | 10      | 177.50±12.39*      | 0.043  |
|            | 10         | 19      | 170.84±10.48*      | 0.002  |
|            | 20         | 20      | 164.95±11.36*      | <0.001 |
| 丙咪嗪        | 15         | 10      | 166.00±13.84*      | 0.005  |

[0191] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0192] ORG 显著地降低了小鼠在 FST 中的不动时间, 具有显著的剂量 - 效应关系。其最佳效应剂量为 20mg/kg, ED<sub>50</sub> 约为 0.81mg/kg。

[0193] 2. 2、ORG 在小鼠经历 CMS 后在 TST 中的抗抑郁症药效结果

[0194] 表 100RG 灌胃给予 CMS 小鼠后在悬尾测试中的剂量 - 不动时间关系

| 组别         | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 不动时间 (秒) (平均值±标准误) | p 值   |
|------------|------------|---------|--------------------|-------|
| 生理盐水       | 0.1ml/10g  | 16      | 185.25±6.66        |       |
| [0195] ORG | 1.25       | 10      | 171.20±13.02       | 0.392 |
|            | 5          | 10      | 146.30±11.66*      | 0.018 |
|            | 10         | 16      | 145.31±12.41*      | 0.006 |
|            | 20         | 16      | 140.69±14.14*      | 0.002 |
| 丙咪嗪        | 15         | 9       | 131.22±10.61*      | 0.002 |

[0196] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0197] ORG 显著地降低了小鼠在 TST 中的不动时间, 具有显著的剂量 - 效应关系。其最佳效应剂量为 20mg/kg, ED<sub>50</sub> 约为 4.22mg/kg。

[0198] 3、ORG 在小鼠经历 CMS 后的抗抑郁 TI

[0199] 半数毒性剂量 TD<sub>50</sub> > 1750mg/kg (参见上述 ORG 的量效章节)。

[0200] ORG 在 CMS 小鼠 FST 中的 TI = TD<sub>50</sub> ÷ ED<sub>50</sub> = > 1750mg/kg ÷ 0.81mg/kg = > 2160

[0201] ORG 在 CMS 小鼠 TST 中的 TI = TD<sub>50</sub> ÷ ED<sub>50</sub> = > 1750mg/kg ÷ 4.22mg/kg = > 415

[0202] (四) ORG 在小鼠经历 DD 暴露后的抗抑郁症活性研究

[0203] 昼/夜持续黑暗 (Darkness/darkness, DD) 模型是通过持续黑暗的饲养环境, 改变动物的昼夜节律。由于动物昼夜节律紊乱, 导致或恶化抑郁症。因此, 动物经历 DD 暴露后可通过抑郁症的 FST 和 TST 模型研究 ORG 对抗因昼夜节律紊乱而导致的或恶化的抑郁症的药效。这是近年来报道的一种研究抑郁症发生的昼夜节律紊乱病因学模型。

[0204] 1、实验方法

[0205] 四川省人民医院实验动物研究所提供实验动物用昆明小鼠,3-4 周龄,雌雄各半,体重 25-30g。合格证号为 A4CXK(川)2003-16)。每组动物数见表 11、12。受试物 ORG 由本发明的申请人提供。实验设置不同剂量的实验组、溶剂对照组以及丙咪嗪 (Sigma 公司,批号 106k1588) 阳性对照药物组。

[0206] DD 暴露:将小鼠置于 24h 持续黑暗的条件下饲养。换料、添食物、水等操作在红光 < 1.0Lux 下进行,连续饲养 28 天。制造模型的最后 1 周开始灌胃给药,连续 1 周,1 次/天。最后一次给药 30 分钟后进行 FST 和 TST 实验,其中检测方法和数据分析如上所述。

[0207] 2、实验结果

[0208] 2.1、ORG 在小鼠经历 DD 暴露后 FST 中的抗抑郁症药效结果

[0209] 表 11 ORG 灌胃给予 DD 小鼠在 FST 中的剂量 - 不动时间关系

| 组别         | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 不动时间 (秒) (平均值±标准误) | p 值    |
|------------|------------|---------|--------------------|--------|
| 生理盐水       | 0.1ml/10g  | 32      | 193.13±5.57        |        |
| [0210] ORG | 1.25       | 11      | 180.27±10.36       | 0.306  |
|            | 2.5        | 11      | 174.27±11.89       | 0.134  |
|            | 5          | 10      | 161.70±14.89*      | 0.016  |
|            | 10         | 21      | 151.86±8.89*       | <0.001 |
|            | 40         | 10      | 156.60±13.86*      | 0.005  |
| 丙咪嗪        | 15         | 11      | 161.22±13.08*      | 0.019  |

[0211] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0212] ORG 显著地降低了小鼠在 FST 中的不动时间,呈显著的剂量 - 效应关系。最佳效应剂量是 10mg/kg ;ED<sub>50</sub> 约为 1.48mg/kg。

[0213] 2.2、ORG 在小鼠经历 DD 暴露后 TST 中的抗抑郁症药效结果

[0214] 表 12 ORG 灌胃给予 DD 小鼠在 TST 中的剂量 - 不动时间关系

| 组别         | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 不动时间 (秒) (平均值±标准误) | p 值   |
|------------|------------|---------|--------------------|-------|
| 生理盐水       | 0.1ml/10g  | 16      | 185.25±6.66        |       |
| [0215] ORG | 1.25       | 10      | 171.20±13.02       | 0.392 |
|            | 5          | 10      | 146.30±11.66*      | 0.018 |
|            | 10         | 16      | 145.31±12.41*      | 0.006 |
|            | 20         | 16      | 140.69±14.138*     | 0.002 |
| 丙咪嗪        | 15         | 9       | 131.22±10.61*      | 0.002 |

[0216] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0217] ORG 显著地降低了小鼠在 TST 中的不动时间,呈显著的剂量 - 效应关系。最佳效应剂量是 20mg/kg ;ED<sub>50</sub> 约为 1.75mg/kg。

[0218] (五) ORG 在小鼠经历睡眠剥夺 (Sleep deprivation, SD) 后的抗抑郁症活性研究  
睡眠障碍是抑郁症的症状之一,也可能是导致抑郁症发生或恶化抑郁症的病理因素。通过睡眠剥夺 (Sleep deprivation, SD) 模型可增强动物的抑郁症样行为,此时利用 FST 模型,可检测 ORG 对抗这种病因导致的抑郁症的药效。

## [0219] 1、实验方法

[0220] 四川省人民医院实验动物研究所提供实验动物昆明小鼠,3-4 周龄,雌雄各半,体重 25-30g。合格证号为 A4CXK(川)2003-16)。每组动物数见表 13。受试物 ORG 为实施例 1 制得。实验设置不同剂量的实验组、溶剂对照组以及丙咪嗪 (Sigma 公司,批号 106k1588) 阳性对照药物组。

[0221] SD 模型:采用改良的多平台水环境法建立小鼠睡眠剥夺模型。小鼠在平台上可自由进食进水,但如果发生睡眠,会因肌张力松弛而落入水中。掉入水中的动物可通过支撑平台的斜杆再次爬上平台。连续进行剥夺睡眠 72 小时。制造模型的最后 1 天开始(测试前 24 小时和 5 小时)灌胃给药。最后测试动物在 FST 中的不动时间,其中检测方法和数据分析如上所述。

## [0222] 2、实验结果

## [0223] 2.1、ORG 在小鼠经历 SD 后 FST 中的抗抑郁症药效结果

[0224] 表 13 ORG 灌胃给予 SD 小鼠在 FST 中的剂量 - 不动时间关系

## [0225]

| 组别   | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 不动时间 (秒) (平均值 ± 标准误差) | p 值   |
|------|------------|---------|-----------------------|-------|
| 生理盐水 | 0.1ml/10g  | 26      | 189.27 ± 9.67         |       |
| ORG  | 1.25       | 10      | 198.00 ± 11.43        | 0.570 |
| ORG  | 2.5        | 12      | 177.67 ± 15.95        | 0.421 |
| ORG  | 5          | 10      | 160.80 ± 11.64        | 0.064 |
| ORG  | 7.5        | 10      | 153.00 ± 11.83*       | 0.019 |
| ORG  | 10         | 22      | 148.23 ± 7.80*        | 0.001 |
| ORG  | 20         | 21      | 162.67 ± 9.27*        | 0.029 |
| 丙咪嗪  | 7.5        | 11      | 150.27 ± 13.17*       | 0.009 |

[0226] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0227] 睡眠剥夺 3 天,最后 1 天灌胃给药,早晚各 1 次,分别为测试前 24h 和 5h。ORG 显著地降低小鼠在 FST 中的不动时间,呈显著的剂量 - 效应关系。最佳效应剂量为 10mg/kg; ED<sub>50</sub> 约为 3.79mg/kg。

## [0228] 3、ORG 在小鼠经历 DD 和 SD 后的抗抑郁症 TI

[0229] 半数毒性剂量 TD<sub>50</sub> > 1750mg/kg (参见上述 ORG 的量效章节)。

[0230] DD 暴露后:ORG 在小鼠 FST 中的 TI = TD<sub>50</sub> ÷ ED<sub>50</sub> = > 1750mg/kg ÷ 1.48mg/kg = > 1182  
ORG 在小鼠 TST 中的 TI = TD<sub>50</sub> ÷ ED<sub>50</sub> = > 1750mg/kg ÷ 1.75mg/kg = > 1000。

[0231] SD 后:ORG 在小鼠 FST 的 TI = TD<sub>50</sub> ÷ ED<sub>50</sub> = > 1750mg/kg ÷ 3.79mg/kg = > 462。

[0232] 试验例二 苕黑酚 -1- 氧 -β -D- 葡萄糖苷 (ORG) 的抗焦虑药效学研究

[0233] 使用足部电击引起动物的僵立行为 (Foot shock induced freezing behavior) 和条件恐惧引起动物的僵立行为 (Conditioned fear stress induced freezing behavior) 是广泛应用的动物模型检测恐惧类型的焦虑行为, 在抗焦虑的药物实验室得到广泛地认同。啮齿类动物在遭受与厌恶事件有关的刺激时会产生僵立行为 (Freezing behavior)。僵立行为的判别标准是动物除了呼吸以外停止任何活动或者动物保持刻板的蜷伏姿势, 是啮齿动物对恐惧性刺激的本能反应。抗焦虑药可使僵立行为减少。此外, 高台十字迷宫 (Elevated plus maze) 是目前公认的评价抗焦虑药物的动物模型。高台十字迷宫是利用动物对新异环境的探究特性, 小鼠会主动探索迷宫开臂, 但又恐惧高悬的敞臂, 本能地在闭合臂有更多地停留时间。抗焦虑药物增加动物在开臂的探究活动, 致焦虑药物则相反。

#### [0234] 1、实验方法

[0235] 四川省人民医院实验动物研究所提供实验动物昆明小鼠, 3-4 周龄, 雌雄各半, 体重 25-30g; 雄性 SD 大鼠, 体重 250-300g。合格证号为 A4CXK(川)2003-16)。每组动物数见表 14、15、16、17。受试物 ORG 由本发明的申请人提供。实验设置不同剂量的实验组、溶剂对照组以及地西洋 (天津金耀氨基酸有限公司, 批号 0701291) 阳性对照药物组。

[0236] 僵立行为: 实验用标准条件操作箱 (Med associates, USA), 底部为不锈钢栅栏。SD 大鼠给药 (腹腔给药, 实验前 24h 和 5h 分别给予 2 次 ORG) 后置于箱内, 实验时间为 10min, 实验开始后 2min, 4min, 6min, 8min 和 10min 分别给予一次电击 (0.8mA, 2s), 观察最后 5min (即第三次电击后) 大鼠的僵立时间, 即保持固定体位不动。24 小时后, 将动物重新放入实验箱但不给电击, 观察此时大鼠的僵立时间。

[0237] 高台十字迷宫: 高架十字迷宫包括两个 30cm×5cm 开臂 (Open arms) 和两个 30cm×5cm×15cm 的闭臂 (Closed arms), 闭臂上部敞开, 中央有一 5cm×5cm 的开阔部。迷宫离地面 35cm。灌胃给予小鼠 ORG (实验前 24h 和 5h), 将小鼠置于中央开阔部, 头朝闭臂。通过摄像头记录 5min 内小鼠进入开放臂和闭臂的次数及在两臂滞留时间 (进出臂标准界定: 以四肢全部入臂和出臂为准)。记录小鼠进入开臂次数和在开臂滞留时间, 以此作为评价焦虑的指标, 次数越多, 时间越长表明动物的焦虑水平越低。

[0238] 数据分析: 实验结果表示为平均值 ± 标准误。统计采用 one-way ANOVA followed by least significant difference (LSD) test (SPSS 11)。显著差异设置为  $P < 0.05$ 。

#### [0239] 2、实验结果

##### [0240] 2.1、腹腔注射 ORG 对抗电刺激导致的大鼠僵立行为的药效结果

[0241] 表 14 ORG 在电刺激导致的大鼠僵立行为中的剂量 - 效应关系

| 组别     | 剂量 (mg/kg) | 大鼠数 (只) | 僵住时间 (秒) (平均值±标准误) | p 值   |
|--------|------------|---------|--------------------|-------|
| [0242] | 生理盐水       | 10      | 227.90±20.70       |       |
|        | ORG        | 5       | 203.90±34.09       | 0.523 |
|        |            | 20      | 100.70±21.78*      | 0.002 |

[0243] \* $P < 0.05$  (one way ANOVA followed by LSD)。

[0244] 在足底电刺激前 24 和 5 小时, 腹腔注射给予 ORG, 显著地缩短了大鼠的僵立行为时间。

##### [0245] 2.2、腹腔注射 ORG 对抗条件性恐惧导致的大鼠僵立行为的药效结果

[0246] 表 15 腹腔注射 ORG 在恐惧记忆提取时的大鼠僵立行为中的剂量 - 效应关系

| 组别          | 剂量 (mg/kg) | 大鼠数 (只) | 僵住时间 (秒) (平均值±标准误) | p 值   |
|-------------|------------|---------|--------------------|-------|
| [0247] 生理盐水 | 0.1ml/100g | 10      | 285.40±47.91       |       |
| ORG         | 5          | 10      | 310.30±66.19       | 0.776 |
|             | 20         | 10      | 95.00±17.73*       | 0.004 |

[0248] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0249] 在足底电刺激前 24 和 5 小时,腹腔注射给予 ORG,进行足底电刺激。24 小时后把动物再暴露于足底电刺激的环境。由于环境线索导致恐惧记忆的提取,导致动物恐惧类型的僵立行为,ORG 显著地缩短了大鼠的僵立行为时间。

[0250] 2.3、腹腔注射 ORG 在高台十字迷宫模型中的抗焦虑结果

[0251] 表 16 腹腔注射 ORG 增加小鼠的开放臂的滞留时间

| 组别         | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 开臂滞留时间 (秒) (平均值±标准误) | p 值   |
|------------|------------|---------|----------------------|-------|
| 生理盐水       | 0.1ml/10g  | 10      | 32.50±8.93           |       |
| [0252] ORG | 5          | 10      | 50.00±8.99           | 0.151 |
|            | 20         | 10      | 16.50±3.60           | 0.188 |
|            | 100        | 10      | 70.60±11.56*         | 0.003 |
| 地西洋        | 2          | 10      | 46.90±7.19           | 0.236 |

[0253] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0254] 实验前 24 和 5 小时灌胃给予小鼠 ORG。ORG 显著地增加了动物在开放臂中的滞留时间,表明具有显著的抗焦虑活性。

[0255] 表 17 腹腔注射 ORG 可增加小鼠进入开臂的次数。

| 组别         | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 进入开臂次数 (次) (平均值±标准误) | p 值   |
|------------|------------|---------|----------------------|-------|
| 生理盐水       | 0.1ml/10g  | 10      | 3.50±0.87            |       |
| [0256] ORG | 5          | 10      | 4.50±0.58            | 0.279 |
|            | 20         | 10      | 1.80±0.79            | 0.069 |
|            | 100        | 10      | 5.90±0.57*           | 0.012 |
| 地西洋        | 2          | 10      | 4.80±0.77            | 0.161 |

[0257] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0258] 实验前 24 和 5 小时灌胃给予小鼠 ORG,ORG 显著地增加了动物进入开放臂的次数,表明具有显著的抗焦虑活性。

[0259] 试验例三 苔黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖苷 (ORG) 抗急性应激的药效学研究

[0260] 应激是指环境因素严重扰乱了生物体的生理和心理稳态,与许多疾病的发生和恶化存在密切关系。近年来,应激被认为是抑郁症发生的病因之一。大脑海马结构不仅在学习记忆中起着重要的作用,在应激调控中也起着重要作用。应激损伤学习记忆,损伤海马神经可塑性 LTP。血清皮质酮含量是评价应激水平的一个常用指标。

[0261] 1、实验方法

[0262] 四川省人民医院实验动物研究所提供实验动物 SD 大鼠,雌雄各半,体重 250-300g。合格证号为 A4CXK(川)2003-16)。每组动物数见表 18、19。受试物 ORG 为实施

例 1 制得。抗抑郁药物氟西汀,武汉远诚科技公司批号:1004-0801002。

[0263] 血清皮质酮检测方法:采用放免法(RIA;DSL 80100;Texas)检测 ORG 对血清皮质酮的影响。非应激动物药物注射 ORG 1h 后乙醚麻醉心脏取血;应激动物 ORG 注射 1 小时后高台应激 30 分钟后乙醚麻醉心脏取血。血液在室温下静置 4 个小时后 3000r. p. m, 15 分钟离心,取上清(血清), $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

[0264] 海马 LTP 记录方法:ORG 的抗应激作用还在海马脑片的兴奋性突触后电位(EPSP)上进一步检测。应激损伤大鼠海马 CA1 区 EPSP 的长时程增强(Long term potentiation, LTP)现象。而抗应激药物可以恢复或逆转应激带来的 LTP 损伤。采用 250g SD 大鼠,足部电击(1mA, 2s, 5 次,间隔 2min)后立即麻醉,制备海马脑片。脑片在  $34-36^{\circ}\text{C}$  孵育 1h,孵育液内加入 ORG。然后在常温下放置 1h。在海马 CA1 区记录 NMDA 和 AMPA 受体介导的兴奋性突触后膜电位(Excitatory postsynaptic potentials, EPSP),先记录 20min 基线,等稳定后高频电刺激(100Hz, 100pulses, 3 串,间隔 20s)诱导 LTP。诱导后再记录 1h。

[0265] 数据分析:数据用平均值  $\pm$  标准误表示。其中 LTP 表示为最后 10min 的幅度占基线幅度的%。统计采用 one-way ANOVA followed by least significant difference(LSD) test(SPSS 11)。显著差异设置为  $P < 0.05$ 。

[0266] 2 实验结果

[0267] 2.1、腹腔注射 ORG 对抗急性应激引起的血清皮质酮升高

[0268] 表 18 腹腔注射 ORG 抗应激的剂量 - 血清皮质酮水平关系

[0269]

| 组别       | 剂量(mg/kg)  | 动物数(只) | 皮质酮含量(ng/ml)(平均值 $\pm$ 标准误) | p 值   |
|----------|------------|--------|-----------------------------|-------|
| 非应激+生理盐水 | 0.1ml/100g | 16     | 116.06 $\pm$ 27.84          |       |
| 非应激+ORG  | 0.875      | 8      | 209.02 $\pm$ 52.77          | 0.197 |
|          | 3.5        | 8      | 166.06 $\pm$ 41.90          | 0.649 |
|          | 14         | 16     | 70.04 $\pm$ 14.75           | 0.084 |
|          | 28         | 8      | 63.13 $\pm$ 22.21           | 0.122 |
| 非应激+氟西汀  | 15         | 16     | 167.20 $\pm$ 31.35          | 0.559 |
|          | 30         | 8      | 178.14 $\pm$ 38.77          | 0.490 |
| 应激+生理盐水  | 0.1ml/100g | 16     | 324.30 $\pm$ 48.81          |       |
| 应激+ORG   | 0.875      | 8      | 349.85 $\pm$ 61.75          | 0.706 |
|          | 3.5        | 8      | 263.63 $\pm$ 49.14          | 0.372 |
|          | 14         | 16     | 237.63 $\pm$ 32.45          | 0.120 |
|          | 28         | 8      | 137.41 $\pm$ 26.84 *        | 0.007 |
| 应激+氟西汀   | 15         | 16     | 331.35 $\pm$ 46.43          | 0.899 |
|          | 30         | 8      | 324.58 $\pm$ 58.63          | 0.997 |

[0270] \* $P < 0.05$ (one way ANOVA followed by LSD)。

[0271] 腹腔注射 ORG 1h 后直接心脏取血或再经历 30min 高台应激再心脏取血。ORG 显著地降低血清皮质酮和高台应激增加的血清皮质酮,具有显著地剂量效应关系。

[0272] 3、ORG 恢复应激损伤的海马 LTP

[0273] 表 19 离体脑片 ORG 孵育对抗应激损伤的海马 LTP 的剂量 -LTP 幅度关系

[0274]

| 组别       | 剂量        | 脑片数 (片) | 诱导后最后 10 分钟平均值 (平均值 ± 标准误差) | p 值   |
|----------|-----------|---------|-----------------------------|-------|
| 对照       |           | 9       | 134.52 ± 10.71              |       |
| 对照 + ORG | 5 μM      | 11      | 122.93 ± 3.75               | 0.453 |
| FS+ 生理盐水 | 0.1ml/10g | 11      | 113.22 ± 6.77               | 0.234 |
| FS+ORG   | 50nM      | 9       | 128.99 ± 7.30               | 0.732 |
| FS+ORG   | 5 μM      | 8       | 189.56 ± 23.6*              | 0.002 |

[0275] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0276] 动物经历足底电刺激 (foot shock, FS) 后, 切成海马脑片。这是已知的应激方案损伤海马 LTP。ORG 在海马脑片中孵育 1h 后, 记录基线 20min, 应激损伤的 LTP 被 ORG 很好地逆转, 在 5μM/L 时还极大地增加了 LTP 幅度, 呈显著地剂量效应 - 关系。



[0277] 以上实验结果证明了 ORG 具有很好的抗应激作用,对治疗抑郁症发生的应激病因具有重要的临床价值。

[0278] 试验例四 荅黑酚-1-氧-β-D-葡萄糖苷(ORG)增强学习记忆的药效学研究

[0279] Morris 水迷宫广泛地应用于研究海马依赖性的学习记忆及其细胞分子机理。在增强学习记忆的药理学实验中, Morris 水迷宫对增强学习记忆的药效学评价也得到广泛的认同。该动物模型可定量观察并记录动物入水后逃生到隐藏平台所需时间(逃生潜伏期)、采用策略和游泳轨迹,以此分析和推断动物的学习能力。动物学会在短时间内逃生后,撤去隐藏平台,检测动物在平台象限所占有的时间来判断动物的记忆能力以及药效。在固定时间内动物在平台象限所游泳的时间越长说明记忆提取越好。

[0280] 1、实验方法

[0281] 四川省人民医院实验动物研究所提供实验动物昆明小鼠,3-4 周龄,雌雄各半,体重 25-30g。合格证号为 A4CXK(川)2003-16)。每组动物数见表 20、21。受试物 ORG 为实施例 1 制得。实验设置不同剂量的实验组、溶剂对照组,给药方式为腹腔注射,分别为 ORG 1.75 和 3.5mg/kg 组。每天训练结束后立即注射药物或生理盐水;或者测试前 30min 注射药物或生理盐水。

[0282] 水迷宫:圆形水池直径 100cm,深 36cm,隐藏平台 10×10cm,低于水表面 1cm。水池四周用黄色窗帘包围,窗帘上四个方向各悬挂一个不同形状的标志物。隐藏平台用透明有机玻璃制成。用电脑记录动物的运动轨迹,寻找平台的时间等。第 0 天,水环境适应。第 1-7 天,学习任务训练,每天 4 次训练,分别从不同象限将动物面朝池壁放入水中,平台位置不变,让动物根据标志物找到隐藏平台。第 8 天,撤去隐藏平台后,让动物在水池中游泳 1min,记录小鼠在平台象限的游泳时间。

[0283] 数据分析:数据表示为平均值±标准误(秒)。统计采用 one-way ANOVA followed by least significant difference(LSD) test (SPSS 11)。显著差异设置为  $P < 0.05$ 。

[0284] 2、实验结果

[0285] 2.1、训练后腹腔注射 ORG 对小鼠记忆能力的药效

[0286] 表 20 每天训练后立即腹腔注射 ORG 增强小鼠的空间记忆

[0287]

| 组别   | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 平台象限时间 (秒) (平均值 ± 标准误) | p 值  |
|------|------------|---------|------------------------|------|
| 生理盐水 | 0.1ml/10g  | 10      | 27.10±2.79             |      |
| ORG  | 1.75       | 10      | 28.18±1.70             | 0.74 |
| ORG  | 3.5        | 10      | 34.24±2.01*            | 0.03 |
| 氟西汀  | 15         | 9       | 32.61±2.20             | 0.11 |

[0288] \* $P < 0.05$  (one way ANOVA followed by LSD)。

[0289] 每天学习任务结束后,腹腔注射 ORG,此时通过影响记忆的巩固,从而增强了小鼠的空间记忆提取。

[0290] 2.2、记忆提取前腹腔注射 ORG 对小鼠记忆能力的药效

[0291] 表 21 提取测试前 30min 腹腔注射 ORG 增强小鼠的空间记忆

| 组别         | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 平台象限时间 (秒) (平均值±标准误) | p 值  |
|------------|------------|---------|----------------------|------|
| 生理盐水       | 0.1ml/10g  | 10      | 27.95±2.19           |      |
| [0292] ORG | 1.75       | 10      | 29.38±2.16           | 0.65 |
|            | 3.5        | 10      | 35.52±2.43 *         | 0.02 |
| 氟西汀        | 15         | 9       | 29.44±2.14           | 0.65 |

[0293] \*P < 0.05 (one way ANOVA followed by LSD)。

[0294] 7 天的学习任务训练结束后,第 8 天进行记忆提取实验。在记忆提取实验前 30min 腹腔注射 ORG 能显著地增强小鼠对空间记忆的提取。

[0295] 试验例五 荅黑酚 -1- 氧 -β-D- 葡萄糖苷 (ORG) 毒性实验。

[0296] 1. ORG 急性毒性实验 (小鼠):按 1750mg/kg 给小鼠一次腹腔注射。

[0297] 四川省人民医院实验动物研究所提供实验动物昆明小鼠,3-4 周龄,雌雄各半,体重 25-30g。合格证号为 A4CXK(川)2003-16)。受试物 ORG 为实施例 1 制得。称取 ORG 样品 1750mg 溶于 10ml 生理盐水中,混合均匀即成浓度为 175mg/ml 的透明液体。选取体重为 18-21g 的小鼠 20 只,雌雄各半,按性别和体重随机分为 2 组:空白对照组;ORG 组。给药组小鼠按 1750mg/kg 的浓度,0.1ml/10g 的体积一次腹腔给予 ORG,空白对照组给予同体积的生理盐水。

[0298] 实验结果:ORG 对小鼠的急性毒性使用 1750mg/kg 时,相当于小鼠 FST 中 ED<sub>50</sub> 剂量的 7955 倍和小鼠 TST 中 ED<sub>50</sub> 剂量的 2397 倍,连续观察 14 天,所有动物给药后其外观、行为活动、精神状态、食欲、大小便、皮毛、肤色及呼吸等均未见明显异常。动物全部健康存活,体重明显增加,两组比较无显著差异。观察 14 天后处死解剖动物,病理切片后观察心、肝、脾、肺、肾、胰腺、卵巢、睾丸、小肠等内脏组织,亦未见明显异常。

[0299] 2. ORG 亚急性毒性实验 (大鼠):采用同样剂量的 ORG(1750mg/kg)。

[0300] 四川省人民医院实验动物研究所提供实验动物 SD 大鼠,雌雄各半,体重 250-300g。合格证号为 A4CXK(川)2003-16)。受试物 ORG 为实施例 1 制得。

[0301] 实验结果:灌胃给予大鼠 ORG(1750mg/kg),连续每天灌胃给药 14 天。所有动物给药后其外观、行为活动、精神状态、食欲、大小便、皮毛、肤色及呼吸等均未见明显异常。动物全部健康存活,体重明显增加,两组比较无显著差异。观察 14 天后处死解剖动物,病理切片后观察心、肝、脾、肺、肾、胰腺、卵巢、睾丸、小肠等内脏组织,亦未见明显异常。

[0302] 5- 甲基 -1,3- 苯二酚 (OR) 及其衍生物的药理药效学结论

[0303] 本发明采用了研究评价抗抑郁症药物活性的常见模型 FST 和 TST,以及常见抑郁症发生的病因学模型 DD、SD 和 CMS,对 OR、ORG 及其衍生物的抗抑郁症活性进行了剂量-效应和时间-效应研究。结果发现 OR、ORG 及其衍生物具有显著的活性可用于治疗和预防抗抑郁症,呈显著的剂量-效应和时间-效应关系。药理学研究表明,OR、ORG 及其衍生物还具有治疗和预防以昼夜节律紊乱、睡眠障碍、慢性应激为病因的抑郁症的通路。针对抑郁症的疾病症状和发生机理的研究表明,OR、ORG 及其衍生物具有治疗和预防抑郁症相关的疾病症状如抗焦虑、抗急性应激、修复应激损伤的海马 LTP 和增强海马依赖的学习记忆。由于众所周知的海马突触可塑性 LTP 的机理主要涉及 NMDA 和 AMPA 受体以其细胞内分子信号通路,上述实验例子表明 OR、ORG 及其衍生物可能是这些靶点的调节剂,影响海马突触可塑性

LTP 实现其治疗和预防疾病的作用。由于海马突触可塑性 LTP 涉及最基本的神经信息加工处理, OR、ORG 及其衍生物用途并不局限于治疗和预防抑郁症、抑郁症发生的病因和疾病症状, 还可能应用于其它疾病的预防和治疗或辅助预防和治疗如老年痴呆症 (Alzheimer's disease)、幼儿多动症、孤独症、精神分裂症等。由于应激可能恶化或导致 90% 以上的所有疾病, 而海马的应激调控功能涉及海马突触可塑性 LTP, OR、ORG 及其衍生物可能对临床许多疾病的预防和治疗以及康复具有很好的用途, 例如毒品成瘾者在戒断期间经历极度的应激、癌症患者或心脑血管疾病患者的过度应激或焦虑反应等。结合初步的毒性实验结果, 这些发现表明, 中药单体成分 OR、ORG 及其衍生物具有突出的治疗和预防抑郁症的新用途, 具有高效、低毒副作用的特征, 而且还对抑郁症发生的多种病因有显著的治疗和预防作用。另一新用途是对抑郁症的或抑郁症相关的疾病症状如焦虑、急性应激等有治疗和预防作用。其机理涉及 OR、ORG 及其衍生物对血清皮质激素、海马突触可塑性包括 NMDA 和 AMPA 受体以其细胞内分子信号通路和学习记忆的调控作用。因此, 本发明中 OR、ORG 及其衍生物的治疗用途涉及突出的有益效果: 1)、对抑郁症的治疗用途; 2)、对抑郁症发生病因的治疗用途; 3)、对抑郁症的疾病症状和其它疾病的类似症状的治疗用途; 4)、其潜在的用途并不局限于治疗和预防抑郁症, 还可能涉及焦虑、应激、认知功能损伤等的其它疾病的治疗用途。