

度洛西汀抗抑郁活性评价及毒性研究

薛 瑞,徐晓丹,李诺敏,张有志,李云峰

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

中国图书分类号:R-332;R 363-332;R 749.420.5;R 971.43

文献标识码:A 文章编号:1001-1978(2010)11-1471-05

摘要:目的 评价 5-HT/NE 双重重摄取抑制剂度洛西汀的抗抑郁活性及毒性作用,为抗抑郁剂阳性药剂量选择及同靶标新药研发提供实验依据。方法 采用小鼠悬尾和小鼠强迫游泳两个经典的行为绝望模型,对灌胃和腹腔注射两种途径给予度洛西汀的抗抑郁活性进行评价;采用小鼠急性毒性试验评价灌胃和腹腔注射两种途径给予度洛西汀的毒性;采用 CCK-8 试剂盒比色法检测度洛西汀对 HepG₂ 细胞存活的影响。结果 灌胃或腹腔注射给予度洛西汀均可剂量依赖性缩短小鼠悬尾和游泳不动时间,有效剂量范围内无中枢兴奋作用;急性毒性试验结果表明,灌胃或腹腔注射给予度洛西汀的 LD₅₀ 值分别为 177.1 mg·kg⁻¹ 和 75.5 mg·kg⁻¹;细胞毒性结果表明,度洛西汀可浓度依赖性降低 HepG₂ 细胞的存活率,IC₅₀ 为 68.8 μmol·L⁻¹。结论 度洛西汀抗抑郁作用明确而稳定,急性毒性主要与中枢神经系统药理作用有关,对胃肠道可能存在潜在不良反应。

关键词:度洛西汀;抗抑郁剂;行为绝望模型;急性毒性;HepG₂ 细胞;细胞毒性

抑郁症 (depression) 属于情感性精神障碍 (mood disorders), 是一种以显著而持久的心境低落为主要特征的综合征, 其高发率、高复发率和高自杀率对社会造成了极大危害^[1]。度洛西汀 (duloxetine, 商品名“Cymbalta”) 是 5-HT/NE 双重重摄取抑制剂 (serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors, SNRIs), 是美国礼来公司继氟西汀之后又一主打产品, 2004 年被美国 FDA 批准用于成人重症抑郁症治疗。度洛西汀抑制 5-HT 和 NE 的重摄取能力强, 且作用均衡, 抗抑郁治疗有效率和起效速度优于选择性 5-HT 重摄取抑制剂 (SSRIs), 不良反应远低于三环类抗抑郁剂 (TCAs)^[2-3], 目前已经成为临床一线抗抑郁药物, 其市场占有率高, 2009 年销售额达 30.7 亿美元^[4]。本实验对度洛西汀抗抑郁活性及毒性作用进行评价, 旨在为抗抑郁剂阳性药剂量选择及同靶标新药研发提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物 ICR 小鼠, ♂, 18~20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: SCXK (京) 2007-0001, 用于药效学试验。ICR 小鼠, ♂ ♀

收稿日期:2010-08-18, 修回日期:2010-09-06

基金项目:国家自然科学基金面上项目 (No 30973516), 国家科技重大专项新药创制专项 (No 2009ZX09103-025)

作者简介:薛 瑞 (1983-), 女, 硕士, 助理实验师, 研究方向:精神药理学, Tel: 010-66931619, E-mail: hly19830718@sina.com;

张有志 (1971-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向:精神药理学, Tel: 010-66874606, E-mail: zhyouzhi@yahoo.com.cn

phology and synapse plasticity in hippocampus CA1 area of male offspring. **Methods** From the 11th gestation day (GD11) to the 7th postnatal day (PND7), pregnant rats were subcutaneously injected with 3 doses of BPA (10, 100, 1 000 μg·kg⁻¹ per day as low, middle, and high dosage group) respectively, and with cooking oil alone as control group. The number of neonatal rats and the phenomenon of eating offspring in each group were recorded. The brains of male offsprings (after the PND21) were cut in slices and collected for HE staining or extracellular recording to detect rates of long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD). **Results** The rate of eating neonatal rats in high-dosage group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). The HE staining results

showed that the male offsprings in high-dosage group have karyopyknosis in pyramidal cells of hippocampus CA1 area, and more abnormal pyramidal cells than that in control group ($P < 0.05$). The male offsprings in low-dosage group showed lower inducing rate of LTP ($P < 0.05$), but higher inducing rate of LTD ($P < 0.05$) in hippocampus CA1 area than that in control group. **Conclusions** Perinatal BPA exposure may have adverse effect on neuronal morphology and synapse plasticity in hippocampus CA1 area of male offspring in rats.

Key words: bisphenol A; long-term potentiation; long-term depression; brain development; hippocampus; estrogens

各半,体质量 18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2007-0001,用于急性毒性试验。饲养温度 20℃~23℃,相对湿度 50%~60%。实验前适应性饲养 1 周。

1.2 药品与试剂 度洛西汀盐酸盐(Duloxetine Hydrochloride, DLX),北京阜康仁生物制药科技有限公司,批号:071025;CCK-8 试剂盒,日本同仁化学研究所;DMEM(H)培养基,美国 Gibco 公司;特级胎牛血清,美国 Gibco 公司;胰蛋白酶,德国 Merck 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器 超净工作台(北京昌平半导体设备仪器厂),CO₂ 培养箱(美国 Napco 公司),倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),电子天平(德国 Sartorius 公司),96 孔扫描分光光度计(美国 Molecular 公司)。

2 方法

2.1 小鼠悬尾试验 参照 Steru 等^[5]建立的方法并进行改进:悬尾箱为(25×25×35) cm,顶板中心绳连一个小夹子,将胶布粘在小鼠尾端 2 cm 处,用夹子夹住胶布,使小鼠呈倒悬体位,头部离悬尾箱底面约 5 cm,观察 6 min,记录后 4 min 的累计不动时间。判定不动的标准是动物停止挣扎,身体呈垂直倒悬状态,静止不动。小鼠给予不同剂量的度洛西汀(2.5~40 mg·kg⁻¹)1 h(灌胃给药,ig)或 0.5 h(腹腔注射,ip)后进行试验。

2.2 小鼠强迫游泳试验 参照 Porsolt^[6]建立的方法,将小鼠放入高 20 cm,直径 12 cm,水深 10 cm 的圆形玻璃容器中,水温 25℃,观察 6 min,记录后 4 min 的累计不动时间。判定不动的标准是动物在水中停止挣扎,呈漂浮状态,仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面。小鼠给予不同剂量的度洛西汀(2.5~40 mg·kg⁻¹)1 h(ig)或 0.5 h(ip)后进行试验。

2.3 小鼠急性毒性试验 按照国家食品药品监督管理局《化学药物急性毒性研究技术指导原则》半数致死量(LD₅₀)测定的要求进行。小鼠按体重均衡随机分组,试验当日各组小鼠单次 ig 或 ip 不同剂量的度洛西汀,给药后立即观察受试动物的毒性反应及持续时间,连续 14 d 观察并记录动物毒性反应情况及死亡分布,Bliss 法计算 LD₅₀ 值及 95% 可信限。本试验所用剂量均为游离碱剂量。

小鼠急性经口毒性试验剂量:根据预试验确定起始剂量为 144.5 mg·kg⁻¹,相邻剂量间比值为 1.08:1,试验前用蒸馏水配制所需浓度溶液,给药容积为 30 ml·kg⁻¹。

小鼠急性腹腔注射毒性试验剂量:根据预试验确定起始剂量为 71.4 mg·kg⁻¹,相邻剂量间比值为 1.08:1,试验前用 10% DMSO 配制为所需浓度溶液,给药容积为 10 ml·kg⁻¹。

2.4 HepG₂ 细胞毒性试验

2.4.1 细胞培养 人肝肿瘤细胞(HepG₂)培养于 DMEM(H)培养基(含 10% 胎牛血清)中,于含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。

2.4.2 CCK-8 试剂盒比色法测定细胞活力 取对数生长期的 HepG₂ 细胞,调整细胞密度为 1×10⁸·L⁻¹,接种在 96 孔培养板中(弃去 4 周边孔),每孔 100 μl,四周边孔每孔加入 100 μl D-Hank's 液。预培养 24 h 后,加入溶剂对照及不同浓度的 DLX 溶液(DLX 终浓度分别为 25、50、75、100、125、150、175、200 μmol·L⁻¹),每组 3 孔,每孔 100 μl。37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后,倒置显微镜下观察细胞形态的改变。每孔加入 10 μl CCK-8,置培养箱中孵育 1 h,利用 96 孔扫描分光光度计在 450 nm 波长下测定各孔吸光度值(OD 值),计算细胞存活率/%。相同条件下重复实验 3 次,Bliss 法计算半数抑制浓度(IC₅₀, μmol·L⁻¹)和 95% 可信限。细胞存活率/%=(加药孔吸光度-调零孔吸光度)×100%(对照组吸光度-调零孔吸光度)。

2.5 数据统计 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),Post hoc test 采用 Dunnett's *t*-test 进行统计分析。采用 SAS 统计软件 Bliss 法计算 LD₅₀ 和 IC₅₀。

3 结果

3.1 度洛西汀对小鼠悬尾不动时间的影响 如 Fig 1 所示,单次 ig 及 ip 度洛西汀(5~40 mg·kg⁻¹)可剂量依赖性缩短小鼠悬尾不动时间,与溶剂对照组相比差异有显著性。与溶剂对照组相比,ig 度洛西汀 5~40 mg·kg⁻¹,小鼠悬尾不动时间分别缩短了 36%、37%、59% 和 85%;ip 度洛西汀 5~40 mg·kg⁻¹,小鼠悬尾不动时间分别缩短了 51%、49%、82% 和 84%。

3.2 度洛西汀对小鼠游泳不动时间的影响 如 Fig 2 所示,单次 ig 及 ip 度洛西汀 40 mg·kg⁻¹可缩短小鼠游泳不动时间,与溶剂对照组相比差异有显著性。与溶剂对照组相比,ig 或 ip 度洛西汀 40 mg·kg⁻¹,小鼠游泳不动时间分别缩短了 47% 和 49%。

3.3 小鼠急性毒性试验结果 小鼠单次 ig 或 ip 不同剂量的度洛西汀,连续 14 d 观察并记录动物毒性反应情况及死亡分布,并利用 Bliss 法求得小鼠腹腔

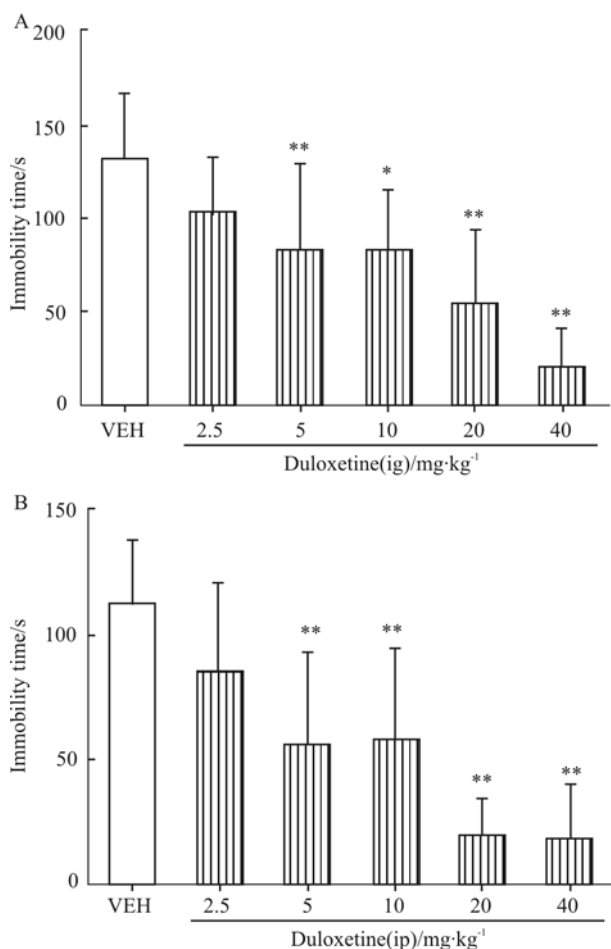


Fig 1 Effect of duloxetine on the immobility time in the tail suspension test in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Duloxetine was administered orally (A) or intraperitoneally (B) 60 min or 30 min prior to testing. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle (VEH)

注射给药 LD₅₀值和95%置信区间。度洛西汀灌胃给药 LD₅₀值为 177.1 mg · kg⁻¹,95% 置信区间为 142.0 ~ 198.9 mg · kg⁻¹,结果见 Tab 1;度洛西汀腹腔注射给药 LD₅₀值为 75.5 mg · kg⁻¹,95% 置信区间为 62.8 ~ 80.9 mg · kg⁻¹,结果见 Tab 2。急性给药后,动物出现间歇性震颤、爬行姿势异常、前肢踏步样运动、后肢外展、竖尾等 5-HT 综合征症状,四肢无力,流涎,死亡前出现震挛性惊厥,呼吸困难等症状,高剂量组动物还出现严重的撕咬尖叫等攻击行为,导致部分动物耳部、尾尖、甚至嘴部出血。迟发性死亡动物死前腹部膨大,爬行缓慢,毛不顺,尸检结果表明濒死动物消化系统异常,胃、肠管胀大,其他主要脏器肉眼未见明显病变。

3.4 度洛西汀对 HepG₂ 细胞的毒性 采用 CCK-8 试剂盒比色法检测度洛西汀对 HepG₂ 细胞的毒性,如 Fig 3 所示,度洛西汀可浓度依赖性降低 HepG₂

细胞的存活率,IC₅₀为 68.8 μmol · L⁻¹,95% 置信区间 62.7 ~ 72.5 μmol · L⁻¹。

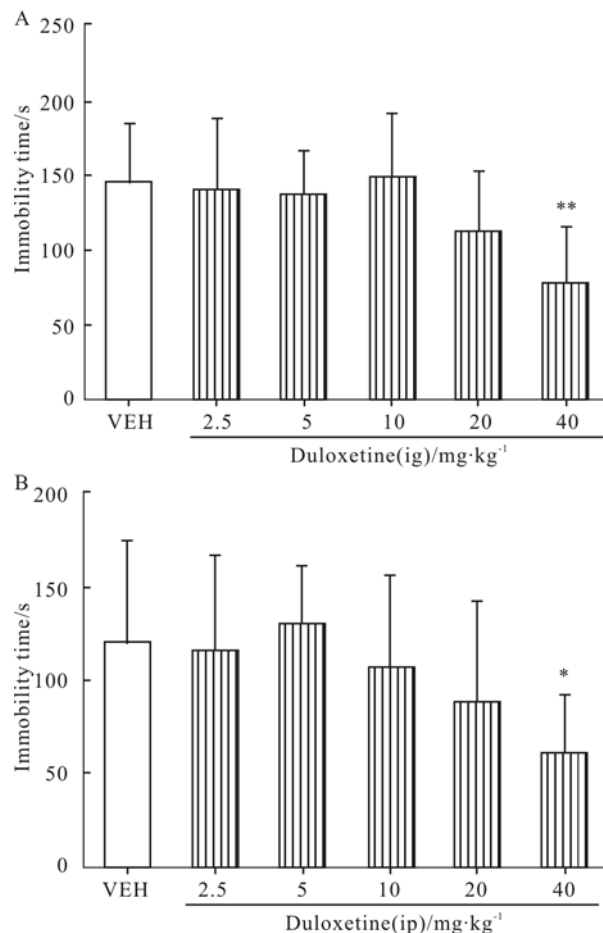


Fig 2 Effect of duloxetine on the immobility time in the forced swimming test in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Duloxetine was administered orally (A) or intraperitoneally (B) 60 min or 30 min prior to testing. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle (VEH)

Tab 1 Results of acute toxicity of duloxetine (ig) in mice (n = 10)

Dose /mg · kg ⁻¹	Death rate/%	LD ₅₀ /mg · kg ⁻¹	95% confidence limit /mg · kg ⁻¹
325.7	100		
276.8	90		
235.2	90	177.1	142.0 ~ 198.9
200.0	60		
170.0	50		
144.5	20		

Tab 2 Results of acute toxicity of duloxetine (ip) in mice (n = 10)

Dose /mg · kg ⁻¹	Death rate/%	LD ₅₀ /mg · kg ⁻¹	95% confidence limit /mg · kg ⁻¹
97.2	90		
90.0	90		
83.3	70	75.5	62.8 ~ 80.9
77.2	50		
71.4	40		

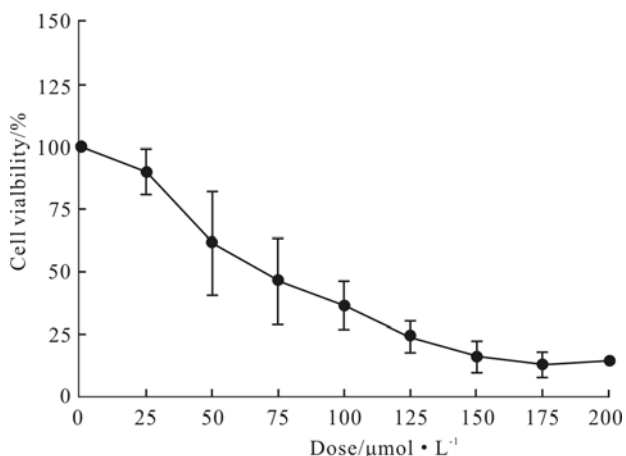


Fig 3 Cytotoxic effect of duloxetine on HepG₂ cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

HepG₂ cell were cultured with various doses of duloxetine for 48 h. Cell viability was examined by CCK-8 assays and the results were expressed as percentage of surviving cells.

4 讨论

抑郁症发病机制复杂,涉及多种神经递质和受体,因此多靶标抗抑郁药物的研发成为了近年来乃至未来抗抑郁剂研发的重点方向。5-HT 与 NE 被认为是与抑郁症关系最为密切的神经递质。5-HT、NE 能神经投射几乎遍布各个脑区,且二者及其受体间存在着紧密联系,5-HT/NE 双重重摄取抑制剂已成为临床一线抗抑郁药^[7-8]。度洛西汀是 5-HT/NE 双重重摄取抑制剂的代表药物,2004 年上市至今已成为全美乃至世界临床一线抗抑郁药,市场占有率高,新型 5-HT/NE 双重重摄取抑制剂也成为国内外抗抑郁药研发热点。无论是开展 5-HT/NE 双重重摄取抑制剂一类新药的研究,还是其仿制药的研究,与一线用药度洛西汀进行药效学和毒理学平行比较和优势分析是非常必要的。本研究希望能为新型抗抑郁药物研发提供研究思路和比较依据,也为阳性药在不同动物模型中的剂量选择提供参考。

小鼠悬尾试验、小鼠强迫游泳试验是经典的行为绝望模型,因其具有简单、快速、敏感等优点,是目前抗抑郁药物评价最常用的行为检测模型。本试验首次对度洛西汀单次给药在小鼠悬尾试验和强迫游泳试验中的抗抑郁活性及量效关系进行了研究,结果表明,度洛西汀急性给药在小鼠悬尾和强迫游泳实验中最低起效剂量分别为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。为保证结果的稳定性,建议选择 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为小鼠悬尾试验和强迫游泳试验的阳性药剂量。此外,国内外研究表明,多数 5-HT 重摄取抑制剂(SSRIs)在强迫游泳实验中效果不佳,氟西汀 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 在此模型中才显示抗抑郁作

用,提示 SSRIs 类药物在强迫游泳模型中并不敏感^[9]。我们在试验中也发现,度洛西汀单次给药对小鼠悬尾模型敏感,结果稳定;而在强迫游泳模型中敏感性相对较差,提示 SNRIs 类药物可能在强迫游泳模型中也并不敏感。Katoh 等^[10]研究发现,小鼠预游 15 min,24 h 内连续给药 3 次,度洛西汀在小鼠强迫游泳试验中最低起效剂量为 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,提示选择 SNRIs 作为强迫游泳试验的阳性药时,可采用预游或增加给药次数以提高结果的稳定性。

急性毒性试验是药物安全性评价的第一步,代表了整体动物毒性,为药物安全性评价提供重要信息。本试验发现,急性给予度洛西汀,中毒症状主要为中枢神经系统相关反应,可能与 5-HT 和 NE 等中枢神经递质含量急剧增高呈正相关;多数动物给药当天死亡,但个别动物出现迟发性死亡。迟发性死亡动物腹部膨大,爬行缓慢,尸检发现其胃和肠管膨大,提示度洛西汀可能对消化系统存在潜在毒性,与临床主要不良反应一致^[2]。

肝脏是药物毒副作用的主要靶器官,肝毒性也是制约药物开发和临床应用的主要障碍。HepG₂ 细胞是人肝肿瘤细胞,具有正常人肝实质细胞的大部分特征,含有较完整的生物代谢酶系,可以在药物研发早期对受试物潜在的靶器官毒性进行预测,也可用于先导化合物的优化和筛选^[11]。细胞毒性的检测方法较多,本试验采用 CCK-8 (Cell counting kit-8) 比色法进行检测。CCK-8 比色法利用同仁化学研究所(Dojindo)开发的一种四唑盐(WST[®]-8)进行检测,WST[®]-8 可被脱氢酶还原成可溶性橙色甲臜,其数量与活细胞数量成正比,可用于细胞增殖和毒性测试。本法结果灵敏度高,稳定性好,无放射性^[12]。本试验首次在小鼠悬尾试验和强迫游泳试验中评价了度洛西汀的细胞毒性,结果表明,度洛西汀可浓度依赖性降低 HepG₂ 细胞的存活率,IC₅₀ 为 $68.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,远低于本课题组在研药物(数据未附),提示度洛西汀对肝脏可能具有潜在毒性。由于本试验仅检测一种毒性终点,尚需结合其他检测方法和试验手段对度洛西汀肝毒性进行全面评价。

随着氟西汀、文拉法新等一线抗抑郁药物专利保护期的结束,开发商或是借助手性拆分、改变剂型以及增加新适应症延长药物的专利期,或是大力研发单胺类新型抗抑郁剂。新药研发过程中,阳性药的选择十分关键。本课题组近年来研究发现,三环类抗抑郁剂作为阳性药结果稳定性差,且长期给药动物出现撕咬和心脏毒性等明显的不良反应,严重限制了其应用;而 SSRIs 类药物在强迫游泳试验中

极不敏感,代表药物氟西汀长期使用会导致动物出现流涎和激惹等反应,从而对试验结果造成影响。本试验结果表明,度洛西汀抗抑郁作用明确且稳定,有效剂量下无论急性给药还是长期给药(结果未列出)均未见不良反应,是抗抑郁剂临床前评价阳性药的合适选择;此外,本试验首次在 HepG₂ 细胞上评价了度洛西汀的细胞毒性,为新型抗抑郁药物研发及比较优势的确定提供新的思路和试验依据。

参考文献:

- [1] World Health Organization: Annual report. Metal health: new hopes, new perspectives[C]. Geneva, Switzerland: WHO, 2001.
- [2] Bymaster F P, Lee T C, Knadler M P, et al. The dual transporter inhibitor duloxetine: a review of its preclinical pharmacology, pharmacokinetic profile, and clinical results in depression[J]. *Curr Pharm Des*, 2005, **11**(12): 1475-93.
- [3] Müller N, Schennach R, Riedel M, Möller H J. Duloxetine in the treatment of major psychiatric and neuropathic disorders[J]. *Expert Rev Neurother*, 2008, **8**(4): 527-36.
- [4] Eli Lilly and Company. Eli Lilly and Company 2009 Annual Report[R]. Eli Lilly and Company, 2010.
- [5] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, **85**(3): 367-70.
- [6] Porsolt R D, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants[J]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1977, **229**(2): 327-36.
- [7] 薛瑞,张有志,邹莉波.快速起效抗抑郁药物的研究进展[J].中国药理学通报,2008, **24**(12):1558-60.
- [7] Xue R, Zhang Y Z, Zou L B. Progress in the development of early-onset antidepressants[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2008, **24**(12): 1558-60.
- [8] 楼剑书,李昌煜.抑郁症受体机制研究进展[J].中国药理学通报,2006, **22**(10):1157-60.
- [8] Lou J S, Li C Y. Progress of receptors mechanism on depression[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2006, **22**(10):1157-60.
- [9] Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs[J]. *Behav Pharmacol*, 1997, **8**(6-7): 523-32.
- [10] Katoh A, Eigyo M, Ishibashi C, et al. Behavioral and electroencephalographic properties of duloxetine (LY248686), a reuptake inhibitor of norepinephrine and serotonin, in mice and rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, **272**(3):1067-75.
- [11] Miranda S R, Meyer S A. Cytotoxicity of chloroacetanilide herbicide alachlor in HepG2 cells independent of CYP3A4 and CYP3A7[J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, **45**(5): 871-7.
- [12] 陈红霞,张有志,袁莉,等.胍丁胺对体外培养海马神经前体细胞增殖的影响及作用机制[J].中国药理学通报,2008, **24**(5):583-7.
- [12] Chen H X, Zhang Y Z, Yuan L, et al. Effects of agmatine on the proliferation of neural progenitor cells from hippocampus *in vitro* [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2008, **24**(5): 583-7.

Pharmacodynamic and toxicological evaluation of duloxetine

XUE Rui, XU Xiao-dan, LI Nuo-min, ZHANG You-zhi, LI Yun-feng

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract; Aim To evaluate the antidepressant activity and toxicity of duloxetine, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor. **Methods** Tail suspension test and forced swimming test in mice were used to evaluate the antidepressant activity of duloxetine, and acute toxicity test in mice and CCK-8 chromatometry were applied to investigate the general toxicity and cytotoxicity of duloxetine. **Results** In the tail suspension test and forced swimming test in mice, both oral and intraperitoneal administration of duloxetine reduced the immobility time in a dose-dependent manner, without a

stimulant effect on the locomotor activity. The medial lethal dose of acute oral or intraperitoneal administration of duloxetine was 177.1 mg · kg⁻¹ and 75.5 mg · kg⁻¹, respectively, and the *in vitro* IC₅₀ to HepG₂ cell was 68.8 μmol · L⁻¹. **Conclusion** Duloxetine exerted an excellent antidepressant effect, and the acute toxicity response was mainly related to CNS, with potential side effect on the gastrointestinal tract.

Key words: duloxetine; antidepressants; behavioral despair models; acute toxicity; HepG₂ cell; cytotoxicity

《中国药理学通报》投稿与阅读须知补充:

我国法定计量单位及常见使用错误

☆道尔顿 Da, D 用 u 表示, 1D = 1u, 当表示相对分子(或原子)质量时删去 D, 如 3 kD, 应为 3 × 10³。

☆浓度是物质的量浓度的简称, 其单位为 mol · m⁻³ 或 mol · L⁻¹。单位为 g · L⁻¹ 的应称质量浓度; 单位为 1 的质量(体积)百分比浓度应称质量(体积)分数; 单位为 mol · kg⁻¹ 的应称溶质 B 的质量摩尔浓度。