

淫羊藿和三七提取物组合活血化瘀作用及对东莨菪碱造模小鼠被动回避的影响

肖幸丰, 瞿林海, 郑明, 楼宜嘉* (浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要:目的 考察淫羊藿 (Herba Epimedii, HE) 和三七 (Radix Notoginseng, RN) 乙醇提取物组合对大鼠的活血化瘀作用及对东莨菪碱造模智障小鼠被动回避的影响, 为该组合物治疗老年性痴呆提供实验依据。方法 大鼠连续 ig HE 和 RN 提取物组合 (1, 3.1 g/kg) 7d, 采用试剂盒测定该组合物对大鼠血清凝血酶原时间 (PT)、部分凝血活酶时间 (KPTT) 的影响, 用下腔静脉结扎法考察其对大鼠下腔静脉血栓形成的影响。此外, 采用相同剂量及给药方法考察了 HE 和 RN 提取物组合对东莨菪碱造模智障小鼠被动回避的影响。结果 连续 ig HE 和 RN 提取物组合 (1, 3.1 g/kg) 可显著延长 KPTT ($P < 0.05$), 而对 PT 无显著性影响 ($P > 0.05$); 能显著预防下腔静脉血栓的形成 ($P < 0.01$); 在活血化瘀作用剂量下 HE 和 RN 提取物组合对东莨菪碱造模小鼠被动回避无显著性影响 ($P > 0.05$)。结论 HE 和 RN 提取物组合具有显著的活血化瘀作用, 但对东莨菪碱造模智障小鼠被动回避无显著影响。

关键词:淫羊藿; 三七; 活血化瘀作用; 东莨菪碱; 被动回避

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)05-0352-03

"Huoxuehuayu" effects of Herba Epimedii combined with Radix Notoginseng extracts combination and effects of the combination on passive avoidance of amnesic mice model induced by scopolamine

XIAO Xing-feng, QU Lin-hai, ZHENG Ming, LOU Yi-jia* (College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate "Huoxuehuayu" (activating blood flow and removing blood stasis) effects of Herba Epimedii (HE) combined with Radix Notoginseng (RN) extracts in rats and the effects of the combination on passive avoidance of amnesic mice model induced by scopolamine. **METHODS** The PT and KPTT in rat blood serum were determined after the continuous 7-day administration of the extract combination (HE + RN 1, 3.1 g/kg), and the anti-thrombosis effect was observed in the inferior vena cava Ligature model by administration at the same dose of the extracts combination. In addition, it was investigated that the effects of the extracts combination on passive avoidance of the amnesic mice model induced by scopolamine. **RESULTS** The KPTT in rat blood serum was prolonged after continuous 7-day ig administration of the extracts combination (HE + RN 3.1 g/kg) ($P < 0.05$) and the PT could not be prolonged by administration in same way ($P > 0.05$). The extracts combination (HE + RN 1, 3.1 g/kg) showed significantly anti-thrombosis effect, however, the passive avoidance behavior of amnesic mice could not be improved at a dose of "Huoxuehuayu" effects ($P > 0.05$). **CONCLUSION** The extracts of HE combined with RN have "Huoxuehuayu" effects, but fail to improve passive avoidance behavior of amnesic mice induced by scopolamine.

KEY WORDS: Herba Epimedii; Radix Notoginseng; "Huoxuehuayu" effects; scopolamine; passive avoidance

老年性痴呆是一种严重威胁老年人健康的常见疾病。传统中医学认为其发病机制主要和肾精亏损、气血不足、痰

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 30472112); 浙江省中医药管理局重点资助项目 (No. 2003KF001); 浙江省科技厅计划项目 (No. 2004C33106)

作者简介:肖幸丰,男,27岁,硕士研究生,研究方向:中药药理学。

通讯作者:楼宜嘉, Tel/Fax: 86-571-88208403, E-mail: yijialou@zju.edu.cn

滞血瘀和气滞血瘀等有关^[1],因而活血化瘀常作为治疗老年性痴呆的基本治则。淫羊藿 (Herba Epimedii, HE)系我国传统补益中药,具有补肾壮阳的功效^[2]。三七 (Radix Notoginseng, RN)亦为我国传统的补益中药,其活血化瘀作用疗效确切^[3]。这两药伍用从补肾和活血化瘀的角度治疗老年性痴呆提供了充分的理论依据。本课题前期研究表明, HE和 RN提取物组合具有改善 β -淀粉样肽₂₅₋₃₅ (beta-amyloid peptide₂₅₋₃₅, β -AP₂₅₋₃₅) 侧脑室注射造模 AD大鼠空间学习记忆能力下降的疗效^[4]。本研究旨在验证 HE和 RN提取物组合是否具有活血化瘀作用并考察其对小鼠被动回避的影响,为该组合防治老年性痴呆提供进一步的实验依据。

1 材料

1.1 药物

HE和 RN药材分别购自四川新荷花中药饮片有限公司 (批号: 0508060)和云南特安呐三七产业股份有限公司 (批号: 0311010),两药材参考 2005版中国药典临床生药剂量和动物体表面积折算结果,依据文献方法分别进行提取后组合^[5-6],最终制得 4g/mL的生药浸膏,其中含 HE: 2.50g/mL, RN: 1.50g/mL。

1.2 动物

Sprague-Dawley (SD)大鼠,雌雄各半,体重 200 ~ 250g; ICR小鼠,雌雄各半,体重 18 ~ 20 g。以上动物规格均为二级,由浙江省医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号: SCXK(浙) 2003-0001。

1.3 试剂和设备

凝血酶原 (PT) 部分凝血活酶 (KPTT) 试剂盒 (上海荣盛生物技术有限公司,批号分别为: 20040302, 20040223), 肝素钠注射液 (上海生物化学制药厂,批号: 040108), 止血敏 (扬州中宝制药有限公司,批号: 307261), 氢溴酸东莨菪碱 (上海禾丰制药有限公司,批号: 040108), 吡拉西坦 (脑复康,杭州赛诺菲民生制药有限公司,批号 030803), 乌拉坦 (上海曹扬第二中学化工厂,批号: 040210), YLS-3T跳台仪 (山东医学科学院设备站), 50L多功能提取罐 (杭州轻工设备厂), TGL-168台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), WS2-261-79型恒温水浴锅 (上海医疗器械七厂)。

2 方法

2.1 抗凝血酶原时间 (PT) 和部分凝血活酶时间 (KPTT) 试验

参考 2005版中国药典临床生药剂量,经动物体表面积折算以及前期预试验结果,剂量设置如下:大鼠随机分成溶剂对照, HE和 RN提取物组合低剂量 1 g/kg,高剂量 3.1 g/kg及阳性对照肝素钠 (1000 u/kg, ip), 每组 10只。除阳性对照外,其他各组连续 ig给药 7d,给药容量 10 mL/kg,期间阳性对照肝素钠 ig 10 mL/kg蒸馏水。末次给药前禁饲 12h。末次给药后 1 h (阳性对照肝素钠为取血前 30 min, ip), 用乌拉坦 (1 g/kg) 麻醉固定大鼠,打开腹腔分离下腔静脉取血。参考文献及试剂盒说明测定大鼠血清 PT及 KPTT^[7],比较用药组和对照组差异。

2.2 预防大鼠血栓形成试验

动物分组、剂量设置及给药同大鼠血清 PT、KPTT测定试验,参考文献方法采用下腔静脉结扎法进行大鼠血栓形成试验^[8],测定血栓重量,比较用药组和对照组差异。

2.3 HE和 RN提取物组合对东莨菪碱造模智障小鼠被动回避的影响

参考上述活血化瘀试验,剂量设置如下:小鼠随机分成溶剂组,模型组, HE和 RN提取物组合低剂量 1 g/kg,高剂量 3.1 g/kg及阳性对照脑复康组 (0.420 g/kg) 5组,每组 12个动物。给药容量为 20 mL/kg,连续给药 7d,其中溶剂组和模型组灌喂蒸馏水。第 7天正式实验前禁饲 12 h。第 7天给药 50 min后,除溶剂对照 ip等容积 0.9%氯化钠外,其余组 ip 1.5 mg/kg的东莨菪碱造模。参考文献方法对各组小鼠跳台学习和记忆成绩进行测定^[9],比较各组差异。

2.4 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 ANOVA进行组间比较。

3 结果

3.1 HE和 RN提取物组合对大鼠血清 PT、KPTT的影响

大鼠连续 ig HE和 RN提取物组合高剂量 3.1 g/kg 7d 能延长血清 KPTT ($P < 0.05$); 连续 ig该组合 1, 3.1 g/kg 7d 均不能延长血清 PT和 KPTT ($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 HE和 RN提取物组合对大鼠血清 PT和 KPTT的影响 ($n=10$)

Tab 1 Effects of the extract of Herba Epimedii (HE) combined with Radix Notoginseng (RN) on the PT, KPTT in serum of rat ($n=10$)

组别	剂量 (g/kg, ig)	PT (s)	KPTT (s)
溶剂组	-	1.26 $\pm$ 0.04	1.45 $\pm$ 0.04
HE + RN	1	1.27 $\pm$ 0.03	1.50 $\pm$ 0.08
	3.1	1.28 $\pm$ 0.07	1.53 $\pm$ 0.04*
肝素钠	1000 u/kg	1.39 $\pm$ 0.07**	2.11 $\pm$ 0.06**

注: 通过 Log(s)变换后方差分析: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ Vs溶剂组

Note: ANOVA via Log(s) transformation: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ Vs control

3.2 HE和 RN提取物组合抗大鼠血栓形成作用

大鼠连续 ig HE和 RN提取物组合 1, 3.1 g/kg 7d,均能显著抑制下腔静脉结扎引起的血栓形成 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 1。

3.3 HE和 RN提取物组合对东莨菪碱造模智障小鼠被动回避的影响

小鼠单次 ip 东莨菪碱能显著降低跳台实验学习和记忆能力 ($P < 0.05$); 连续 ig HE和 RN提取物组合 1 g/kg不能显著改善东莨菪碱造模小鼠跳台学习和记忆能力下降 ($P > 0.05$),并且在 3.1 g/kg剂量下有降低小鼠跳台学习和记忆能力的趋势 ($P > 0.05$)。结果见表 2。

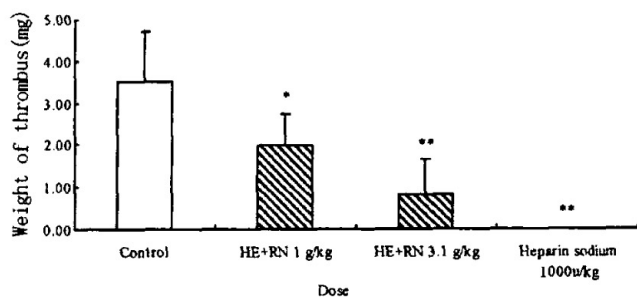


图 1 HE 和 RN 提取物组合抗下腔静脉血栓形成作用 ($n = 10$)

Fig 1 Anti-thrombosis effect of the extracts of *Herba Epimedium* (HE) combined with *Radix Notoginseng* (RN) on ligation of inferior vena cava model in rat ($n = 10$)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ Vs 溶剂组

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ Vs control

表 2 HE 和 RN 提取物组合对东莨菪碱造模小鼠被动回避的影响 (跳台法, $n = 10 \sim 12$)

Tab 2 Effect of the extracts of *Herba Epimedium* (HE) combined with *Radix Notoginseng* (RN) on passive avoidance of amnesic mouse model induced by scopolamine hydrobromide injection (Step-down passive avoidance test $n = 10 \sim 12$)

组 别	剂量 (g/kg)	学习错误次数	记忆错误次数
溶剂组	-	1.8 ± 0.7	0.7 ± 0.6
模型组	-	2.7 ± 1.0 [#]	1.3 ± 0.7 [#]
HE+ RN	1	2.4 ± 0.8	0.8 ± 0.5
	3.1	3.2 ± 1.2	1.5 ± 0.7
脑复康	0.420	1.6 ± 1.0 [*]	0.3 ± 0.5 [*]

注: 通过 $\sqrt{x}$ 变换后方差分析: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ Vs 溶剂组; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ Vs 模型组

Note ANOVA via $\sqrt{x}$ transformation [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ Vs control ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ Vs model

4 讨论

根据传统中医理论及实践,老年性痴呆的病机是本虚标实。本虚主要为肾精亏损和气血不足,标实主要表现为痰滞血瘀,气滞血瘀。其中,气血不足是形成痰滞血瘀的病因,痰滞血瘀又使脏腑功能紊乱,加速气血亏虚的进程,以此本虚和标实相互影响,相互转化,形成恶性循环的过程。因此,临床上老年性痴呆呈进行性加重的特征,而且单纯用补益或单纯逐瘀化痰的方剂不如标本兼顾的方剂更为有效^[1]。本研究采用补肾良药 HE 和活血化痰的 RN 配伍,既补益又逐瘀化痰,符合传统中医理论对老年性痴呆标本兼治的观点。研究结果表明,HE 和 RN 药材经乙醇提取其有效成分后配伍,保留了其原有的活血化痰功效,提示该作用可能与前期研究 HE、RN 有效成分组合改善 β -AP₂₅₋₃₅侧脑室注射所致大鼠阿尔茨海默病模型空间学习和记忆障碍有关^[4]。但尚不明确是否也可改善东莨菪碱造模智障动物的学习记忆能力。

本研究结果表明,HE 和 RN 提取物组合能通过选择性抑制内源性凝血酶原和抑制血栓形成而发挥活血化痰作用,

但对东莨菪碱造模小鼠被动回避行为障碍无明显改善作用。东莨菪碱是一种胆碱受体阻断药,能与胆碱受体结合而阻断中枢 ACh 与受体的结合,从而能模拟老年性痴呆病人胆碱功能低下的病理状态。该模型作用靶点在病理过程较下游的胆碱能神经递质和突触后膜,与本课题前期研究发现^[4], HE 和 RN 提取物组合可显著改善 β -AP 动物模型空间学习记忆能力的作用有所不同,推测这与 β -AP 造模靶点在引发病理过程的上游相关神经损伤环节有关,提示 HE 和 RN 提取物组合改善 β -AP 动物模型空间学习记忆能力的作用在病理过程早期,当病理过程进入胆碱功能低下阶段时,作用就不能显著体现。给予该组合高剂量治疗后有引起东莨菪碱造模小鼠被动回避学习和记忆能力的下降的趋势,这可能和 RN 所含人参皂苷对学习记忆的双向调节作用有关^[10]。

参考文献

- [1] SHENG S. Alzheimer's disease: from molecular biology to clinical diagnosis and cure (老年性痴呆: 从分子生物学到临床诊治) [M]. Beijing: Scientific and Technical Documents Publishing House, 1998: 127-128.
- [2] RAN X D. China Drug Encyclopaedia (中华药海) [M]. Harbin: Harbin Press, 1998: 1714-1718.
- [3] LI J S. Identification and Assessment of TCD (中药鉴定学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1998: 132.
- [4] XIAO X F, ZHENG M, QU L H, *et al*. Effects of icariin combined with the Panax notoginseng saponins on behavior and acetylcholinesterase activity induced by β -amyloid peptide 25-35 lateral ventricle injection in rats [J]. The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy (中国现代应用药理学), 2005, 22(3): 178-181.
- [5] SHEN Q L. Extraction conditions study of *Herba Epimedium* by orthogonal design [J]. Chinese Traditional Patent Medicine (中成药), 2001, 23(5): 377-378.
- [6] QU L H, ZHENG M, LOU Y J. Studies on extraction of panax notoginseng saponins [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials (中药材), 2006 待发表.
- [7] SHI X L, LIU J T, LI X K, *et al*. Studies on anticoagulant actions and mechanism of non-heating leech extract [J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine (山东中医杂志), 2003, 22(11): 687-690.
- [8] HAN G Z, LI X Y, LV L J, *et al*. Antithrombotic effects of *Veratrum nigrum* var. *ussuriense* alkaloids [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 1107-1110.
- [9] ZHANG C B, LI Z R, SHEN M H. Mechanisms of acupuncture-moxibustion combined with medicine improves learning and memory ability of dementia rat [J]. Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine (江苏中医药), 2003, 24(2): 51-52.
- [10] MA T C, YU Q H. Pharmacological effects of *Radix Ginseng* on learning and memory ability [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 1990, 21(7): 38-40.

收稿日期: 2005-06-14