



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102908572 A

(43) 申请公布日 2013.02.06

(21) 申请号 201210303750.7

(22) 申请日 2012.08.24

(71) 申请人 甘肃奇正藏药有限公司

地址 730000 甘肃省兰州市高新开发区张苏
滩 808 号

(72) 发明人 陈维武 吴岫 陈丽娟 张国霞

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理
有限公司 11006

代理人 黄韧敏

(51) Int. Cl.

A61K 36/9064 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 35/56 (2006.01)

A61K 35/413 (2006.01)

A61K 35/32 (2006.01)

A61K 33/06 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页

(54) 发明名称

如意珍宝丸 / 片在治疗血管性痴呆中的应用

(57) 摘要

本发明提供了藏药如意珍宝丸 / 片在治疗血管性痴呆中的应用, 其中所述藏药由如下原料制成: 珍珠母、沉香、石灰华、金礞石、红花、螃蟹、丁香、去核的毛诃子、肉豆蔻、豆蔻、余甘子、草果、香旱芹、檀香、黑种草子、降香、荜茇、去核的诃子、高良姜、甘草膏、肉桂、乳香、木香、决明子、水牛角或水牛角浓缩粉、黄葵子、短穗兔耳草、藏木香、人工麝香、人工牛黄或体外培育牛黄。

1. 藏药在制备治疗血管性痴呆药物中的用途,所述藏药由如下原料制成:

珍珠母 22.69 重量份、沉香 22.69 重量份、石灰华 22.69 重量份、金礞石 6.81 重量份、红花 22.69 重量份、螃蟹 11.34 重量份、丁香 9.07 重量份、去核的毛诃子 22.69 重量份、肉豆蔻 9.07 重量份、豆蔻 9.07 重量份、余甘子 29.49 重量份、草果 6.81 重量份、香早芹 9.07 重量份、檀香 18.15 重量份、黑种草子 9.07 重量份、降香 74.86 重量份、荜茇 6.81 重量份、去核的诃子 29.49 重量份、高良姜 18.15 重量份、甘草膏 9.07 重量份、肉桂 11.34 重量份、乳香 13.61 重量份、木香 18.15 重量份、决明子 13.61 重量份、水牛角或水牛角浓缩粉 9.07 重量份、黄葵子 11.34 重量份、短穗兔耳草 34.03 重量份、藏木香 18.15 重量份、人工麝香 0.45 重量份、人工牛黄或体外培育牛黄 0.45 重量份。

2. 权利要求 1 所述的用途,其中所述藏药为选自丸剂、胶囊剂、片剂、散剂和颗粒剂的任一种口服剂型。

3. 权利要求 2 所述的用途,其中所述藏药为如意珍宝丸。

4. 权利要求 2 所述的用途,其中所述藏药为如意珍宝片。

如意珍宝丸 / 片在治疗血管性痴呆中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,具体涉及藏药如意珍宝丸 / 片的新用途。

背景技术

[0002] 血管性痴呆 (vascular dementias, VD), 又称为多发梗塞性痴呆, 是引起老年期痴呆的第二大病因, 在痴呆中占 10%~50%。VD 是一个综合征, 而不是一个单一的疾病, 不同的血管病理变化均可引起 VD 症状, 包括大、小动脉病变, 弥漫性缺血性白质病变, 心脏脱落栓子的栓塞, 血液动力学改变, 出血, 血液学因素和遗传性疾病等。与 VD 有关的病理生理机制包括局灶性缺血性损害、白质病变、其它与缺血有关的因子、功能因素。总之, 是长期高血压、动脉硬化、反复发生腔隙性梗塞、或其他原因的多发性梗塞, 导致脑室扩大, 皮质萎缩, 使相应的传导束破坏, 逐渐出现的皮质下痴呆。

[0003] 目前, 血管性痴呆的诊断标准是采用美国神经病学会《神经病诊断和统计手册》第四版 (DSM-IV), 具体为: (1) 发生多方面认知缺陷, 表现为以下二者: 记忆缺陷 (不能学习新资料或不能回忆所学到的资料); 至少有下列认知障碍之一: 失语、失用 (虽然运动功能没有问题, 但不能执行动作)、失认 (虽然感觉功能没有问题, 但不能认识或识别物体)、执行管理功能的障碍 (即计划、组织、安排次序、抽象等); (2) 以上认知缺陷导致社交或职业功能缺陷, 并可发现这些功能明显不如以前; (3) 存在局限性神经系统体征与症状 (例如: 深腱反射亢进、伸趾反射、假性球麻痹、步态障碍、某一肢体软弱); 或有提示脑血管疾病的实验室依据 (例如, 涉及皮层及白质的多梗塞) 并可认为是此障碍的病因; (4) 这些缺陷并非由于谵妄所致。

[0004] 血管性痴呆为一种多因素疾病, 是现今唯一可以防治的痴呆类型, VD 诊断一旦确立立即适合开始药物治疗认知症状。临床常用的治疗药物包括脑循环促进剂、作用于神经递质的药物、神经元保护剂以及中药疗法, 其中, 中药疗法多为辨证论治。

[0005] 脑循环促进剂包括: 氢麦角碱 (Hydergine, 二氢麦角碱, 喜得镇, 舒脑宁), 可直接作用于 DA 和 5-HT 受体, 降低脑血管阻力, 增加脑血流量及脑对氧的利用率, 改善突触神经传递功能; 阿司匹林 (Aspirin), 抗血小板聚集药, 广泛应用于心脑血管病的防治; 尼麦角林 (Nicergoline, 脑通) 具有 α 受体阻滞的扩张血管作用, 增加脑血流量, 加强脑细胞的新陈代谢、增加血氧和葡萄糖的利用, 此外, 尚有促进多巴胺的代谢、促进脑部蛋白质的合成, 抑制血小板聚集和抗血栓等作用; 萘呋胺酯 (Naftidrofuryl, 克拉瑞啉, 脑加强), 是 5-HT 受体拮抗剂, 通过抗 5-HT 而减少缺血所致的神经元坏死, 易透过血脑屏障可直接扩张脑血管和外周血管, 增加红细胞的变形性和降低血液稠度并能促进细胞代谢, 对细胞缺氧也有保护作用; 己酮可可碱 (Pentoxifylline), 具有扩张脑及外周血管的作用, 还可能通过影响红细胞的变形性、血小板粘附及血小板聚集性而发挥作用, 临床用于各种脑血管血流障碍性疾病; 长春西汀 (Vinpocetine), 能增加脑血流量、改善大脑氧供给、降低血液粘稠度, 对脑血管有较高的选择。

[0006] 作用于神经递质的药物包括: 多奈哌齐 (Donepezil, 安理申): 可逆性地抑制

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 引起的乙酰胆碱水解而增加受体部位的乙酰胆碱含量,多奈哌齐可能还有其他机制,包括对肽的处置、神经递质受体或 Ca^{2+} 通道的直接作用;哈伯因 (huperzine):其主要成分是从天然植物千层塔中提取的一种生物碱(石杉碱甲),属于可逆性胆碱酯酶抑制剂,易透过血脑屏障,有促进记忆再现和增强记忆保持的作用。

[0007] 神经元保护剂包括:美金刚 (Memantine):脑部缺血缺氧可导致突触前兴奋性氨基酸释放和再摄取减少,过量的 EAA 可激活突触后 EAA 受体(主要是 NMDA 受体和 AMPA 受体),加重神经细胞损害,美金刚作为非竞争性 NMDA 受体拮抗剂,能够减轻大脑缺血缺氧过程中的神经损伤;尼莫地平 (Nimodipine):为钙通道阻断剂,能有效调节细胞内钙水平,抑制钙超载造成的神经细胞损伤,促进受损神经元的再生。

[0008] 如意珍宝丸为传统藏药,成方于公元 13 世纪,载于藏医药学家仁青坚赞所著的《秘诀珍珠串》一书中。其组方根据藏医学原理,选用生长在世界屋脊特殊生态环境的天然、珍贵、稀有藏药材,并以现代科学方法与传统工艺相结合精制而成。主要由珍珠母、沉香、石灰华、金礞石、红花、螃蟹、丁香、毛诃子(去核)、肉豆蔻、豆蔻、余甘子、草果、香早芹、檀香、黑种草子、降香、荜茇、诃子、高良姜、甘草膏、肉桂、乳香、木香、决明子、水牛角、黄葵子、短穗兔耳草、藏木香、人工麝香、牛黄珍珠母、沉香、甘草等 30 种药材组成,其功能主治为清热,醒脑开窍,舒筋通络,用于瘟热、陈旧热症、白脉病、四肢麻木、瘫痪、口眼歪斜、神志不清、肢体僵直、关节不利。

[0009] 如意珍宝片为如意珍宝丸的改进剂型,参照如意珍宝丸的制备标准,以片剂的方式提供,方便服用。目前尚无关于如意珍宝丸/片治疗血管性痴呆或相关疾病的报道。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于提供藏药的新医药用途,即提供如意珍宝丸/片在治疗血管性痴呆 (Vascular Dementia, VD) 中的应用。所述藏药由下述原料制成:

[0011] 珍珠母 22.69 重量份、沉香 22.69 重量份、石灰华 22.69 重量份、金礞石 6.81 重量份、红花 22.69 重量份、螃蟹 11.34 重量份、丁香 9.07 重量份、去核的毛诃子 22.69 重量份、肉豆蔻 9.07 重量份、豆蔻 9.07 重量份、余甘子 29.49 重量份、草果 6.81 重量份、香早芹 9.07 重量份、檀香 18.15 重量份、黑种草子 9.07 重量份、降香 74.86 重量份、荜茇 6.81 重量份、去核的诃子 29.49 重量份、高良姜 18.15 重量份、甘草膏 9.07 重量份、肉桂 11.34 重量份、乳香 13.61 重量份、木香 18.15 重量份、决明子 13.61 重量份、水牛角或水牛角浓缩粉 9.07 重量份、黄葵子 11.34 重量份、短穗兔耳草 34.03 重量份、藏木香 18.15 重量份、人工麝香 0.45 重量份、人工牛黄或体外培育牛黄 0.45 重量份。

[0012] 本发明所述的藏药可以以任何适宜服用的口服剂型提供,例如丸剂、胶囊剂、片剂、散剂和颗粒剂,优选的剂型为丸剂或片剂,如意珍宝丸/片可以为传统的如意珍宝丸,也可以为改进的以片剂形式提供的如意珍宝片。

[0013] 通过对患血管性痴呆的大鼠模型 (VD 大鼠) 施用高、中、低剂量的如意珍宝片,通过动物行为学实验、递质含量测定实验和大鼠脑血流量观察证明,如意珍宝片能显著的提高 VD 大鼠空间和条件性刺激的学习记忆能力和改善 VD 大鼠的协调能力;对脑内递质 NE、DA、5-HT、ASP 有非常好的保护作用,对血清内 GABA 也有保护作用;能显著增加 VD 大鼠脑血流量,从而改善因脑供血不足引起的脑损伤。因此如意珍宝丸/片临床上可用于治疗血管

性痴呆。

具体实施方式

[0014] 下面通过对本发明较佳实施方式的描述,详细说明但不限制本发明。

[0015] 1、实验材料

[0016] 1.1 供试品:如意珍宝片由甘肃奇正藏药有限公司提供。

[0017] 处方和制备方法:

[0018] 取以重量计的以下成分:珍珠母 22.69g、沉香 22.69g、石灰华 22.69g、金礞石 6.81g、红花 22.69g、螃蟹 11.34g、丁香 9.07g、去核的毛诃子 22.69g、肉豆蔻 9.07g、豆蔻 9.07g、余甘子 29.49g、草果 6.81g、香旱芹 9.07g、檀香 18.15g、黑种草子 9.07g、降香 74.86g、萆薢 6.81g、去核的诃子 29.49g、高良姜 18.15g、甘草膏 9.07g、肉桂 11.34g、乳香 13.61g、木香 18.15g、决明子 13.61g、水牛角或水牛角浓缩粉 9.07g、黄葵子 11.34g、短穗兔耳草 34.03g、藏木香 18.15g、人工麝香 0.45g、人工牛黄或体外培育牛黄 0.45g;

[0019] 将除人工牛黄或体外培育牛黄、水牛角或水牛角浓缩粉、人工麝香、甘草膏外的其它成份粉碎成细粉或超微粉碎,加入人工牛黄或体外培育牛黄、水牛角细粉或水牛角浓缩粉、人工麝香,过筛,混匀,用甘草膏加适量水制粒、干燥,压片,包衣,即得。

[0020] 性状:本品为薄膜衣片,除去薄膜衣后显棕色至红棕色;气微香,味苦、甘。

[0021] 规格:每片重 0.5g。

[0022] 批号:20101113。

[0023] 1.2 阳性对照药品

[0024] 1.2.1 盐酸多奈哌齐片(安理申),卫材(中国)药业有限公司制造,批号:110110A,

[0025] 生产日期:2011 年 1 月,有效期至 2013 年 12 月,规格:5mg/片。保存条件:常温。

[0026] 1.2.2 甲磺酸双氢麦角碱(喜得镇),天津华津制药有限公司,批号:9M862T,

[0027] 生产日期:2009 年 12 月,有效期至 2012 年 11 月,规格:1mg/片。保存条件:常温。

[0028] 1.3 试剂

[0029] 1.3.1 戊巴比妥钠:中国医药(集团)上海化学试剂公司,批号:100808。

[0030] 1.3.2 生理盐水:山东齐都药业有限公司,批号:20041208。

[0031] 1.3.3 磷酸二氢钾:天津市化学试剂三厂,批号:20041208。

[0032] 1.3.4 甲醇:天津市康科德科技有限公司,批号:20111209。

[0033] 1.3.5 醋酸钠:天津市化学试剂三厂,批号:20090926。

[0034] 1.3.6 硼酸钠:,天津市化学试剂三厂,批号:20100120。

[0035] 1.3.7 二巯基乙醇:北京鼎国生物技术,批号:20111203。

[0036] 1.3.8 天冬氨酸:上海源叶生物科技有限公司,批号:20110503。

[0037] 1.3.9r-氨基丁酸:上海源叶生物科技有限公司,批号:20110503。

[0038] 1.3.10 去甲肾上腺素:中国食品药品检定研究所,批号:100169-201103。

[0039] 1.3.11 多巴胺:Augsburg, C13082000,批号:00714。

[0040] 1.3.125-羟色胺:Sigma, H9523,批号:1001156278。

[0041] 1.3.13 美托洛尔:阿斯利康制药有限公司,批号:1108091。

- [0042] 1. 3. 14 青霉素钠 :哈药集团制药总厂,批号 :101214706,80 万单位 /0. 5g/ 支。
- [0043] 1. 4 仪器与耗材
- [0044] 1. 4. 1MG-3 型迷宫刺激器,河南省原阳县振华教学仪器厂。
- [0045] 1. 4. 2PB-203 型电子天平, METTLER-TOLEDO GROUP 生产。
- [0046] 1. 4. 31200series 高效液相色谱仪, Agilent Technologies co。
- [0047] 1. 4. 413300 型低温离心机, Thermo science co。
- [0048] 1. 4. 5G&G T2000 型电子天平,美国双杰兄弟(集团)有限公司。
- [0049] 1. 5 实验动物
- [0050] 1. 5. 1SD 大鼠
- [0051] 250 只 SPF 级雄性大鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司(生产许可证号 : SCXK(京)2006-0009),动物质量合格证号 :0247353。
- [0052] 2. 给药途径、方法、剂量、频率和用药期限的确定
- [0053] 给药途径 :口服。
- [0054] 给药方式 :灌胃。
- [0055] 给药体积 :大鼠 :10ml/kg。
- [0056] 剂量设计依据 :
- [0057] 如意珍宝片 :口服一次 4-5 片,一日 2 次,每片重 0. 5g。人以 70kg 体重计,大鼠体表等效剂量为 0. 419g/kg,根据血瘀实验结果 1. 6g/kg 才有显著的活血化瘀作用,故药效实验剂量为 :
- [0058] 大鼠 :1. 6g 生药 /kg、0. 8g 生药 /kg、0. 4g 生药 /kg。
- [0059] 多奈哌齐 :临床用量,每日剂量为 5mg/ 人,5mg/ 人 / 天相当于大鼠体表等效剂量为 0. 419mg/kg,剂量设定为 :大鼠 :0. 4mg/kg。
- [0060] 甲磺酸双氢麦角碱 :临床用量,每日最大剂量为 6mg/ 人,6mg/ 人 / 天相当于大鼠体表等效剂量为 0. 502mg/kg,剂量设定为 :大鼠 :0. 5mg/kg。
- [0061] 3. 药物配制方法及给药浓度
- [0062] 3. 1 如意珍宝片
- [0063] 取如意珍宝片 64 片,加少量去离子水研磨均匀后,去离子水定容至 200ml,为高剂量药液,浓度为 0. 16g/ml。用去离子水将高剂量药液等比稀释,配制中 (0. 08g/ml)、低 (0. 04g/ml) 剂量药液。
- [0064] 3. 2 多奈哌齐
- [0065] 取多奈哌齐片 2 片 (5mg/ 片),加少量去离子水研磨均匀后,去离子水定容至 250ml,剂量为 0. 04mg/ml。
- [0066] 3. 3 甲磺酸双氢麦角碱
- [0067] 取甲磺酸双氢麦角碱片 13 片 (1mg/ 片),加少量去离子水研磨均匀后,去离子水定容至 260ml,剂量为 0. 5mg/ml。
- [0068] 4. 数据处理与分析
- [0069] 采用 SPSS11. 0One-Way ANOVA(单因素方差分析)对数据进行方差分析后,采用 t 检验进行组间比较。
- [0070] 【实施例 1】VD 大鼠模型的制作及实验动物分组

[0071] 250 只成年健康雄性 SD 大鼠,先经 MG-3 型 Y 型迷宫训练,淘汰反应过于迟钝或对电刺激特别敏感的大鼠(淘汰 31 只大鼠)。随机挑选 20 只大鼠作为假手术组,剩余 199 只大鼠采用改良双侧颈总动脉永久性结扎法制作 VD 动物模型。大鼠术前 12h 禁食,大鼠称重,灌胃给予美托洛尔(0.5mg/kg),半小时后腹腔注射 1%戊巴比妥钠(4.5ml/kg)麻醉,术前眼眶放血 3ml,大鼠仰卧固定,备皮,消毒,颈部正中切口,钝性分离胸骨舌骨肌和胸锁乳突肌后便可见到颈总动脉搏动,钝性分离双侧颈总动脉,0 号线结扎其远近心端,并从中间剪断,缝合切口,放回笼中保温饲养,术后及次日注射 1%青霉素钠 4ml/kg(剂量为 6.4 万单位/kg),术后灌胃给予美托洛尔(0.5mg/kg)每日一次,连续给予 1 周,加强 VD 大鼠脑缺血效果(手术过程中死亡 28 只)。假手术组大鼠分离颈总动脉后缝合切口。

[0072] 手术结束后,大鼠恢复 2 天后检测造模是否成功,171 只手术大鼠进行 Y 迷宫检测,筛选原则为正确次数大于 10 次以上淘汰。其中合格大鼠为 122 只,随机分为 6 组,除模型组 22 只外,其余各组每组 20 只,各组大鼠每日上午灌胃给药一次,连续给药 3 周,模型组与假手术组给予同体积去离子水。每组随机挑选 10 只大鼠做行为学实验,末次给药结束后,注射 1%戊巴比妥钠(4.5ml/kg)麻醉大鼠进行脑血流量检测,检测结束后直接断头取脑进行脑内单胺类递质和氨基酸类递质指标检测。其余各组大鼠,给药结束后立即腹主动脉取血,离心取上清液进行血清内氨基酸类递质指标检测、取脑进行组织病理检测。

[0073] 【实施例 2】行为学实验

[0074] 1 如意珍宝片对 VD 大鼠学习记忆的影响

[0075] 各组大鼠应用 MG-3 型 Y-型迷宫测试其记忆成绩。Y 迷宫由三个相同的臂组成,分别称为 I 臂、II 臂、III 臂。迷宫底铺设直径 0.2cm,长 14cm,间距 1cm 的电栅,可以通电刺激。三臂顶端各装有 15W 信号灯,灯光作为电击的信号,以训练大鼠辨别灯光刺激及安全方位的能力。实验时其中有一条臂尽头的灯发出亮光,此时该臂底部电栅无电流通过为安全区,另两臂的灯不亮,底部电网通电,为非安全区。安全区与非安全区随机改变。实验前先将大鼠放入迷宫,让其自由活动,适应 5min,训练日大鼠在起步区予以电击致其逃至安全区,灯光持续 10s,然后熄灯休息 5s,开始下一次操作,一共测试 15 次。次日为测试日同训练日操作,记录 15 次测试中正确反应次数进行统计分析。实验在黑暗、安静环境下进行。规定大鼠受电击后从起步区直接逃至安全区的反应称为“正确反应”,否则为“错误反应”。结果见表 1。

[0076] 结果显示,与假手术组比较,给药前模型动物正确次数非常显著的减少,表明 VD 模型制作成功。给药 2 周和给药 3 周模型组正确次数均非常显著的减少,VD 大鼠的学习记忆能力显著下降,其中给药 2 周 $P < 0.001$,给药 3 周显著性为 $P < 0.01$ 。与模型组比较,给药 2 周,多奈哌齐、如意珍宝片高剂量均能非常显著的增加正确次数(显著性分别为 $P < 0.01$, $P < 0.001$),给药 3 周,多奈哌齐、如意珍宝片高、中剂量也均能显著的增加正确次数(显著性分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。喜得镇组各项指标均无显著性差异。实验结果表明如意珍宝片能显著的提高 VD 大鼠空间和条件性刺激的学习记忆能力。

[0077] 表 1 如意珍宝片对 VD 大鼠 Y 迷宫实验的影响

分组	剂量	动物数	给药前	给药 2 周	给药 3 周
	(g/kg)	(只)	(正确次数)	(正确次数)	(正确次数)
假手术组	-	10	12.7±1.0	13.0±1.5	14.1±1.1
模型组	-	10	6.0±1.6***	8.3±1.5***	10.4±3.1**
[0078] 多奈哌齐	0.4mg/kg	10	6.0±1.9	11.6±2.4##	12.7±1.6#
喜得镇	0.5mg/kg	10	6.2±1.8	10.3±3.4	11.8±4.0
如意珍宝片	1.6	10	6.1±1.8	12.9±1.4###	14.0±1.1##
如意珍宝片	0.8	10	6.0±1.8	8.4±2.1	13.3±2.2#
如意珍宝片	0.4	10	5.9±1.8	9.4±3.8	12.1±2.1

[0079] *P 与假手术组比, **P < 0.01, ***P < 0.001 ;#P 与模型组比, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001

[0080] Y- 迷宫实验结果显示, 给药 2 周, 如意珍宝片高剂量组能非常显著的增加逃避电刺激反应的正确次数, 给药 3 周, 如意珍宝片高、中剂量也均能显著的提高正确次数。实验表明, 如意珍宝片能改善 VD 大鼠空间和条件性刺激的学习记忆能力。

[0081] 2 如意珍宝片对 VD 大鼠握绳时间的影响

[0082] 给药 3 周, 对各组大鼠进行握绳实验, 检测实验大鼠的协调能力。将一根直径为 5mm 的尼龙绳水平方向系在离地面 1m 处, 垂直下方地面上垫海绵软垫。将实验大鼠双前爪放在尼龙绳上, 然后松手, 记录松手到大鼠掉落之间的时间 t。

[0083] 结果见表 2。

[0084] 结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠握绳时间非常显著的降低。与模型组比较, 多奈哌齐组、如意珍宝片组高、中、低剂量均能显著的延长握绳时间。实验结果表明如意珍宝片能显著的延长 VD 大鼠握绳时间, 显著改善 VD 大鼠协调能力。

[0085] 表 2 如意珍宝片对 VD 大鼠握绳时间的影响

分组	剂量	动物数	握绳时间
	(g/kg)	(只)	(s)
[0086] 假手术组	-	10	8.5±1.5
模型组	-	10	5.2±2.8**
多奈哌齐	0.4mg/kg	10	11.1±6.5#

[0087]	喜得镇	0.5mg/kg	10	11.5±12.8
	如意珍宝片	1.6	10	10.3±6.0#
	如意珍宝片	0.8	10	11.8±5.9#
	如意珍宝片	0.4	10	9.6±5.6#

[0088] *P 与假手术组比, **P < 0.01 ;#P 与模型组比, #P < 0.05,

[0089] 握绳实验结果显示,如意珍宝片高、中、低剂量组对 VD 大鼠握绳时间均有显著的延长,表明如意珍宝片能显著改善 VD 大鼠运动协调性。

[0090] 【实施例 3】递质含量测定实验

[0091] 1 如意珍宝片对 VD 大鼠脑内单胺类递质的影响

[0092] 脑匀浆样品的制备:

[0093] 实验结束后大鼠直接断头,在冰台上剥离出大鼠全脑(保留大脑及间脑),称重。按 0.1g 脑(湿重)加入 1ml 5%高氯酸的比例加入高氯酸,放入玻璃匀浆管内,冰浴下匀浆。将匀浆液收集于 1.5ml 离心管中,于 12000r/min, -4℃ 离心 20min,取上清液进样检测。

[0094] 色谱条件:

[0095] 色谱柱:ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈, 150×4.6mm, 5 μm。

[0096] 流动相为 0.1mol/L 的 KH₂PO₄ 缓冲液-甲醇(体积比 9:1)。流速为 0.7ml/min, 进样体积为 20ul,柱温为 35℃,荧光检测器的激发波长为 254nm,发射波长为 338nm。

[0097] 线性范围:

[0098] 采用外标法,以不同浓度的标准液进样测定,以峰面积 Y 为纵坐标,进样浓度 X 为横坐标作图,计算出线性回归方程,见表 3。

[0099] 表 3NE, DA 和 5-HT 的线性回归方程

	递质	浓度范围 (ug/ml)	回归方程	r
[0100]	NE	0.5-8	Y=15.93X+0.15	0.9999
	DA	0.5-8	Y=12.91X-0.49	0.9999
	5-HT	1-16	Y=6.02X-0.06	0.9999

[0101] 表 4 结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑内三种单胺类递质 NE、DA、5-HT 含量均非常显著的减少(显著性均为 P < 0.001)。与模型组比较,多奈哌齐、喜得镇均能显著的抑制三种单胺类递质的减少(显著性均为 P < 0.001)。如意珍宝片组高、中、低剂量均能抑制脑内三种单胺类递质减少(其中 DA 高剂量组显著性 P < 0.05,其余显著性均为 P < 0.001)。实验结果表明如意珍宝片对脑内三种单胺类递质 NE、DA、5-HT 有非常好的保护作用。

[0102] 表 4 如意珍宝片对 VD 大鼠脑内三种单胺类递质含量的影响

[0103]

分组	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	NE (ug/ml)	DA (ug/ml)	5-HT (ug/ml)
假手术组	-	8	0.99±0.10	2.64±0.20	2.92±0.21
模型组	-	8	0.73±0.02***	1.96±0.03***	2.44±0.10***
多奈哌齐	0.4mg/kg	8	1.07±0.04###	2.19±0.02###	3.04±0.08###
喜得镇	0.5mg/kg	10	1.27±0.07###	2.38±0.10###	4.20±0.15###
如意珍宝片	1.6	10	0.96±0.03###	2.09±0.14#	4.97±0.17###
如意珍宝片	0.8	10	1.20±0.07###	2.35±0.11###	4.19±0.21###
如意珍宝片	0.4	10	1.00±0.03###	2.36±0.04###	3.12±0.07###

- [0104] *P 与假手术组比, ***P < 0.001 ;#P 与模型组比, #P < 0.05, ###P < 0.001
- [0105] 备注 :实验前模型组大鼠死亡 2 只,多奈哌齐组大鼠死亡 2 只、递质测定过程中假手术组损失 2 个样品。
- [0106] 2 如意珍宝片对 VD 大鼠脑内氨基酸类递质的影响
- [0107] 脑匀浆样品的制备 :
- [0108] 大鼠直接断头,在冰台上剥离出大鼠全脑 (保留大脑及间脑),称重。按 0.1g 脑 (湿重) 加入 1ml 5%高氯酸的比例加入高氯酸,放入玻璃匀浆管内,冰浴下匀浆。将匀浆液收集于 1.5ml 离心管中,于 12000r/min, -4℃ 离心 20min,取上清液进样检测。
- [0109] 色谱条件 :
- [0110] 色谱柱 :ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈, 150×4.6mm, 5 μ m。
- [0111] 流动相 :1) 水相 :0.05M 醋酸钠溶液,用醋酸调溶液的 pH 值为 6.7。
- [0112] 2) 有机相 :97.5% 甲醇与 2.5% 的四氢呋喃混合溶液。
- [0113] 各流动相使用前均用 G₆ 垂熔漏斗过滤。
- [0114] 流速 :1.0ml/min。
- [0115] 荧光检测器波长设定 :激发波长 :340nm,发射波长 :450nm。
- [0116] 衍生化试剂的配制 :
- [0117] 将 9mg OPA 溶于 167 μ l 的甲醇中,再加入 1.5ml 0.4M 的硼酸钠与 7 μ l 的二巯基乙醇,混合均匀,此溶液在 4℃ 避光保存,每周重配一次。
- [0118] 检测 :
- [0119] 精确吸取样品 20 μ l,加入 40 μ l 衍生化试剂进行柱前衍生化后注入液相系统,采用高压梯度洗脱,对相关的氨基酸进行分离,以荧光检测器检测。

	Time(min)	A%	B%
[0120]	0.0	70	30
	7.0	35	65
	14.0	70	30

- [0121] 线性范围 :
- [0122] 采用外标法,以不同浓度的标准液进样测定,以峰面积 Y 为纵坐标,进样浓度 X 为

横坐标作图,计算出线性回归方程。

[0123] 表 5ASP 和 GABA 的线性回归方程

递质	浓度范围 (ug/ml)	回归方程	r
ASP	0.00625-0.1	$Y=332.81X+1.25$	0.9989
GABA	0.125-2	$Y=288.35X+20.61$	0.9999

[0125] 结果 (见表 6) 显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑内 ASP 递质含量显著的减少 (显著性为 $P < 0.05$),GABA 无显著性变化。与模型组比较,多奈哌齐能显著抑制 ASP 的减少 (显著性为 $P < 0.05$),喜得镇对 ASP 无显著性影响。如意珍宝片组高、中剂量均能显著的抑制 ASP 减少 (显著性分别为 $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$),低剂量 ASP 亦有一定的升高。实验结果表明如意珍宝片对脑内 ASP 递质有显著的保护作用。

[0126] 表 6 如意珍宝片对 VD 大鼠脑内 2 种氨基酸类递质含量的影响

	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	ASP (ug/ml)	GABA (ug/ml)
假手术组	-	8	0.0084±0.0070	0.13±0.08
模型组	-	8	0.0025±0.0006*	0.08±0.03
多奈哌齐	0.4mg/kg	8	0.0041±0.0013#	0.11±0.05
喜得镇	0.5mg/kg	10	0.0032±0.0009	0.22±0.07###
如意珍宝片	1.6	10	0.0032±0.0004#	0.11±0.03#
如意珍宝片	0.8	10	0.0041±0.0009###	0.11±0.05
如意珍宝片	0.4	10	0.0050±0.0034	0.15±0.06##

[0128] *P 与假手术组比,* $P < 0.05$;#P 与模型组比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$

[0129] 备注:实验前模型组大鼠死亡 2 只,多奈哌齐组大鼠死亡 2 只、递质测定过程中假手术组损失 2 个样品。

[0130] 3 如意珍宝片对 VD 大鼠血清内氨基酸类递质的影响

[0131] 血清样品的制备:

[0132] 实验结束后大鼠腹主动脉取血 2ml,于 3000r/min,离心 10min,取上清。取上清 100ul,按 1 : 1 比例加入 5%高氯酸,于 1.5ml 离心管中震荡 2min,静置 2min,于 12000r/min, -4℃离心 20min,取上清液进样检测。

[0133] 色谱条件:

[0134] 色谱柱:ZORBAX Eclipse Plus- C_{18} ,200×4.6mm。

[0135] 流动相:1) 水相:0.05M 醋酸钠溶液,用醋酸调溶液的 pH 值为 6.7。

[0136] 2) 有机相:97.5%甲醇与 2.5%的四氢呋喃混合溶液。

- [0137] 各流动相使用前均用 G₆ 垂熔漏斗过滤。
- [0138] 流速 :1.0ml/min。
- [0139] 荧光检测器波长设定 :激发波长 :340nm,发射波长 :450nm。
- [0140] 衍生化试剂的配制 :
- [0141] 将 9mg OPA 溶于 167 μ l 的甲醇中,再加入 1.5ml 0.4M 的硼酸钠与 7 μ l 的二巯基乙醇,混合均匀,此溶液在 4℃ 避光保存,每周重配一次。检测 :
- [0142] 精确吸取透析液 20 μ l,加入 40 μ l 衍生化试剂进行柱前衍生化后注入液相系统,采用高压梯度洗脱,对相关的氨基酸进行分离,以荧光检测器检测。

	Time(min)	A%	B%
[0143]	0.0	70	30
	7.0	35	65
	14.0	70	30

- [0144] 线性范围 :
- [0145] 采用外标法,以不同浓度的标准液进样测定,以峰面积 Y 为纵坐标,进样浓度 X 为横坐标作图,计算出线性回归方程。
- [0146] 表 7ASP 和 GABA 的线性回归方程

	递质	浓度范围 (ug/ml)	回归方程	r
[0147]	ASP	0.12-10	Y=23.3X+10.76	0.9978
	GABA	0.37-30	Y=19.26X+7.34	0.9977

[0148] 结果 (见表 8) 显示,与假手术组比较,模型组大鼠外周血内递质 GABA 含量显著的减少 (显著性为 $P < 0.05$), ASP 含量无显著性变化。与模型组比较,多奈哌齐、喜得镇对 GABA 均无显著性影响。如意珍宝片高、中、低剂量均能显著的抑制 GABA 递质减少 (显著性分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。实验结果表明如意珍宝片对血清内 GABA 递质有保护作用。

[0149] 表 8 如意珍宝片对 VD 大鼠外周血中 2 种氨基酸类递质含量的影响

	分组	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	ASP (ug/ml)	GABA (ug/ml)
[0150]	假手术组	-	8	17.94±10.46	328.44±160.54
	模型组	-	7	8.74±12.03	144.95±154.96*
	多奈哌齐组	0.4mg/kg	8	7.78±6.64	178.21±129.49
	喜得镇组	0.5mg/kg	10	8.53±5.37	167.34±126.11
	如意珍宝片	1.6	9	28.29±9.60##	381.03±80.70##
	如意珍宝片	0.8	7	30.29±16.83##	414.66±141.33##
	如意珍宝片	0.4	10	28.67±18.00#	336.16±119.67#

[0151] *P 与假手术组比, *P < 0. 05 ;#P 与模型组比, #P < 0. 05, ##P < 0. 01

[0152] 备注 :实验前假手术组大鼠死亡 2 只、模型组大鼠死亡 4 只、多奈哌齐组大鼠死亡 2 只。血清内氨基酸递质测定过程中模型组 4 号样品、如意珍宝片高剂量组 3 号样品、如意珍宝片中剂量组 1、5、7 号样品处理过程中损失。

[0153] 脑组织递质含量结果显示,如意珍宝片组高、中、低剂量均能抑制脑内 NE、DA、5-HT 3 种单胺类递质减少,如意珍宝片组高、中剂量均能显著的抑制 ASP 递质减少,血清内递质含量结果显示,如意珍宝片组高、中、低剂量均能显著的抑制 GABA 递质减少,实验结果表明,对脑内 NE、DA、5-HT、ASP 递质有非常好的保护作用,对血清内 GABA 递质也有保护作用。

[0154] 【实施例 4】如意珍宝片对 VD 大鼠脑血流量的影响

[0155] 实验结束后,各组大鼠进行多普勒超声检测,检测大鼠脑血流动力学的变化。检测结果(见表 9)显示,与假手术组比,脑血流量收缩期峰值血流速度、舒张末期血流速度、平均血流速度均非常显著的低于假手术组,反映脑血流灌注和供血严重不足,与模型组比,多奈哌齐组、如意珍宝片组中脑血流量收缩期峰值血流速度、舒张末期血流速度、平均血流速度均非常显著的升高,实验结果表明,如意珍宝片能显著性增加大鼠脑血流量,从而改善供血不足引起的脑损伤。

[0156] 表 9 如意珍宝片对 VD 大鼠脑血流量的影响

[0157]

分组	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	Mean (BPM)	Max (BPM)	Min (BPM)
假手术组	-	10	440.9±196.1	536.9±207.9	360.5±170.8
模型组	-	10	223.5±68.7**	271.9±82.0**	181.8±59.4**
多奈哌齐组	0. 4mg/kg	8	441.0±175.1##	536.9±196.9##	371.6±168.7#
喜得镇组	0. 5mg/kg	10	351.1±194.7	473.7±245.8#	269.0±166.7
如意珍宝片	1.6	10	513.0±184.6###	654.7±300.1##	387.8±101.3###
如意珍宝片	0.8	10	455.3±132.8###	635.6±244.3##	343.9±104.3##
如意珍宝片	0.4	10	380.2±124.5##	491.8±150.6##	311.7±120.4##

[0158] *P 与假手术组比, **P < 0. 01 ;#P 与模型组比, #P < 0. 05, ##P < 0. 01, ###P < 0. 001

[0159] 备注 :脑血流量测定实验前多奈哌齐组大鼠死亡 2 只

[0160] 脑血流量检测实验结果显示,如意珍宝片高、中、低剂量对脑血流量收缩期峰值血流速度、舒张末期血流速度、平均血流速度均能非常显著的升高。实验结果表明,如意珍宝片能通过增加 VD 大鼠脑血流量从而改善脑供血不足引起的脑损伤。

[0161] 以上对本发明的详细描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明做出各种改变和变形,只要不脱离本发明的精神,均应属于本发明所附权利要求书所限定的范围。