



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102716140 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201210100801. 6

(22) 申请日 2010. 01. 14

(62) 分案原申请数据

201010001173. 7 2010. 01. 14

(71) 申请人 北京联合大学应用文理学院

地址 100191 北京市海淀区北土城西路 197
号北京联合大学应用文理学院

(72) 发明人 孙雅煊 刘婷 戴雪伶 高兆兰

张静 王振华 郑秋生 姜招峰
王志斌

(51) Int. Cl.

A61K 31/7048(2006. 01)

A61P 7/02(2006. 01)

A61P 9/10(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页

(54) 发明名称

甘草苷在制备防治脑血栓疾病药物中的应用

(57) 摘要

本发明属于医药技术领域,具体涉及甘草苷在制备防治心脑血管疾病药物中的应用,特别涉及甘草苷在制备防治脑血管疾病药物中的应用。本发明的药理实验结果表明,甘草苷具有明显的抗脑缺血、抗脑缺氧、抗脑血栓、改善记忆力作用,用药剂量低,安全性高,有广泛的应用前景。

1. 甘草苷在制备防治心脑血管疾病药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征是甘草苷在制备防治脑血栓疾病药物中的应用。

甘草苷在制备防治脑血栓疾病药物中的应用

技术领域

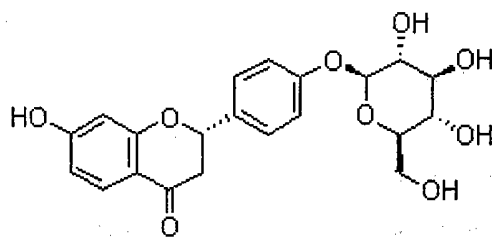
[0001] 本发明属于医药技术领域,具体涉及甘草苷在制备治疗心脑血管疾病药物中的应用,特别涉及甘草苷在制备防治脑血栓疾病药物中的应用。

背景技术

[0002] 随着生活水平的提高和生活节奏的加快,心脑血管疾病已成为威胁中老年人健康和长寿的第一号杀手。其中,脑血管疾病是人类三大致死原因之一,其致使患者出现严重的肢体残疾,造成患者言语障碍,更严重的是造成患者血管性痴呆,给个人、家庭和社会带来了种种不变。因此,寻找脑血管疾病防治方法成为当前研究的热点。

[0003] 甘草为豆科植物乌拉尔甘草、胀果甘草或光果甘草的根及根茎。甘草性平,味甘,归十二经。在中医上,甘草补脾益气,滋咳润肺,缓急解毒,调和百药。甘草苷(Liquiritin)是甘草根茎中的药效成分,化学结构式如下所示,为白色粒状结晶,能溶于甲醇、乙醇和乙酸乙酯,紫外吸收特征峰波长为 249nm,具有抗氧化、抗炎、神经保护、抗抑郁及抗肿瘤等广泛的作用。但有关甘草苷防治脑血管疾病的研究还未见相关文献报道(芮春兰.国内对甘草化学成分的研究进展[J].中国校医,2006,20(1):105-106;杨云,卞广兴,吕秋军.甘草苷对原代海马神经细胞的保护和营养作用[J].中国中药杂志,2008,33(8):931-935;赵志宇,王卫星,郭洪祝,等.甘草苷对抑郁模型大鼠体重及行为学的影响[J].中国心理卫生杂志,2006,20(12):787-790;刘睿婷,卞广兴,邹莉波,等.甘草苷的神经保护及对胆碱酯酶的抑制作用[J].中国新药杂志,2008,17(7):574-580;王建国,周忠,刘海峰,等.甘草的活性成分及其在化妆品中的应用[J].日用化学工业,2004,34((4):249-251)。

[0004]



发明内容

[0005] 本发明提供了甘草苷的新用途,即甘草苷在制备防治心脑血管疾病的药物中的应用,特别是甘草苷在制备防治脑血管疾病药物中的应用,包括但不限于脑缺血、脑缺氧、脑血栓、记忆功能障碍等脑血管疾病。

[0006] 本发明提供了一种包含甘草苷及常规药用载体的药物组合物,其特征是所述药物组合物是采用常规或特殊制剂工艺制备而成的口服或非口服途径方式给药的制剂。

[0007] 本发明提供了预防或治疗心脑血管疾病的方法,包括向心脑血管疾病患者给予甘草苷或前面所述药物组合物。

[0008] 本发明提供的甘草苷可以长期应用,具有明显的预防或改善心脑血管损伤的功效,无

明显不良反应,成本低廉。

具体实施方式

[0009] 心脑血管疾病是心血管病和脑血管病的总称。常见的心血管病包括但不限于高血压、高血压性心脏病、冠心病、心绞痛、心肌梗塞、心肌缺血、心率失常、肺心病及高脂血症等;常见的脑血管疾病包括但不限于脑血栓、脑栓塞、脑中风及脑溢血等。

[0010] 本发明提供了甘草苷在制备防治心脑血管疾病的药物中的应用,特别是甘草苷在制备防治脑血管疾病药物中的应用,包括但不限于脑缺血、脑缺氧、脑血栓、记忆功能障碍等脑血管疾病。

[0011] 本发明所述的甘草苷可以根据临床需要,加入相应药用载体,以片剂、丸剂、颗粒剂、胶囊、悬浮液、溶液、糖浆、注射剂、霜剂、软膏、凝胶剂、喷雾剂、口嚼剂或贴剂等制剂形式存在。

[0012] 本发明所述的甘草苷可根据临床需要,采用口服或非口服方式用药,优选口服给药方式。

[0013] 本发明所述的甘草苷制剂采用口服方式用药时,人用剂量优选 1-1000mg/人/日,其中更优选为 10-500mg/人/日,最优选为 50-100mg/人/日。

[0014] 本发明所述的甘草苷是从中药甘草中提取分离获得,可采用任何已公开文献或专利方法提取制备(赵伟镭,师清芝,唐星.甘草中甘草酸和甘草苷的提取纯化工艺研究[J].中国药房,2009,20(6):426-429)。采用各种不同方法制备的甘草苷对本发明的用途没有影响。

[0015] 以下结合实验例对本发明进行说明,但本发明并不受限于该实施例。

[0016] 实施例 1 甘草苷抗单纯性脑缺血作用

[0017] 1. 材料和方法

[0018] 1.1 实验动物

[0019] 健康成年雄性 ICR 小鼠,清洁级,体重 25 ~ 30g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验前在北京联合大学应用文理保健食品功能检测中心 SPF 级实验动物房适应环境一周。

[0020] 1.2 试剂

[0021] 甘草苷标准品:天津尖峰天然产物公司(纯度 $\geq 98\%$);依达拉奉:南京先声东元制药有限公司;红四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium, TTC):Sigma 公司。

[0022] 1.3 仪器

[0023] AR-2140 型万分之一电子天平:梅特勒-托利多仪器有限公司;电热恒温水浴锅:北京市长风仪器仪表公司。

[0024] 1.4 采用线栓法制备小鼠永久性脑缺血模型

[0025] ICR 小鼠被随机分为六组,假手术组、模型组、依达拉奉组、甘草苷高、中、低剂量组,每组动物 9 只,给药剂量见表 1。术前给药 3d,每天一次。假手术组及模型组灌胃给予溶剂 0.5%羧甲基纤维素钠溶液作为对照。

[0026] ICR 小鼠术前 24h 禁食,自由饮水。用 4%水合氯醛(400mg/kg, ip)麻醉。将麻醉后的小鼠仰卧固定,颈部备皮,消毒皮肤,沿颈部中线切开皮肤,分离皮下筋膜及肌肉组织。

手术显微镜下分离左侧颈总动脉（CCA）及其颈内动脉（ICA）和颈外动脉（ECA）分枝。根部结扎 ECA。夹闭 CCA 和 ICA。在 CCA 上开一小口，将鱼线沿着 CCA，穿过 ICA 和 ECA 分叉处进入 ICA。松开 ICA，继续将鱼线插入到 ICA 颅内段。自 ICA 起始部的插入长度约为 1.3cm，表明线的头端已穿过大脑中动脉起始部。结扎 CCA 和 ICA。术中白炽灯加温，维持小鼠肛温约 37℃。术后缝合伤口，动物回笼。假手术组小鼠仅施行手术而不插入鱼线。

[0027] 1.5 神经功能缺陷评分

[0028] 脑缺血 24h 后，参照 Longa 的五分制评分标准进行神经功能缺陷评分：0 分：正常，无神经损伤症状；1 分：不能完全伸展对侧前爪；2 分：提尾后向外侧转圈；3 分：行走时向对侧倾倒；4 分：不能自发行走或意识丧失。

[0029] 1.6 脑梗死范围测定

[0030] 采用 TTC 染色法测定脑梗死范围。将动物断头后迅速取出完整大脑，冠状切成 1.5mm 的脑片，于 0.5% TTC 溶液中（以磷酸缓冲盐溶液配制）37℃水浴中孵育 30min。梗死组织呈白色，而周围正常组织呈玫瑰红色。然后在 10%的中性甲醛溶液中固定。对每脑片正反两面进行扫描，用图像分析软件积分求出梗死区和非梗死区面积。

[0031] 1.7 脑含水量的测定

[0032] 缺血 24h 后，将小鼠迅速断头取脑，用干湿法测脑组织含水量，在冰块上迅速取脑，将取出的脑组织放在一个内有生理盐水湿润的定性滤纸的培养皿中，以防水分蒸发，同时快速去掉脑皮质表面的软脑膜和凝血块。用千分之一天平准确称取脑重量，然后置于 100℃烘箱 24h 后，再次称重，以 $(1 - \text{干重} / \text{湿重}) \times 100\%$ 即为相对含水量。

[0033] 1.8 统计学处理

[0034] 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析进行组间显著性比较，样本均数间比较采用 t 检验。* 表示 $P < 0.05$ ，表明给药组与模型组比较有显著性差异；** 表示 $P < 0.01$ ，表明给药组与模型组比较有极显著性差异。

[0035] 2 结果

[0036] 2.1 甘草苷对小鼠神经功能缺陷、脑梗死范围、脑含水量的影响

[0037] 表 1 甘草苷对小鼠神经功能缺陷、脑梗死范围、脑含水量的影响（ $\bar{x} \pm s$ ，n=9）

[0038]

| 组 别 | 神经功能缺陷评分 | 脑梗死范围 (%) | 脑含水量 (%) |
|---------------|-------------|--------------|--------------|
| 假手术 | 0** | 0** | 75.60±0.49** |
| 模 型 | 2.44±0.53 | 33.92±5.42 | 82.90±0.72 |
| 依达拉奉 3 mg/kg | 1.67±0.50** | 25.77±5.24** | 80.21±0.80** |
| 甘草苷 0.2 mg/kg | 1.89±0.78 | 30.86±4.23 | 82.44±0.97 |
| 甘草苷 10 mg/kg | 1.78±0.67* | 28.11±4.17* | 82.14±0.73* |
| 甘草苷 200 mg/kg | 1.56±0.53** | 23.35±3.83** | 79.44±0.93** |

[0039] 与模型组相比较，* 表示 $P < 0.05$ ** 表示 $P < 0.01$

[0040] 从小鼠神经功能缺陷评分可见，假手术组小鼠神经功能缺陷评分为 0，说明其脑功

能完全正常,脑片 TTC 染色也显示两侧大脑半球大小均一,无水肿现象。当小鼠经受 24h 缺血后,缺血侧大脑出现明显的梗死,神经功能缺陷评分为 2.44 ± 0.53 ;脑梗死范围为达 $(33.92 \pm 5.42)\%$;脑含水量达 $(82.90 \pm 0.72)\%$ 。

[0041] 依达拉奉和甘草苷均具有改善神经功能缺陷、缩小脑梗死面积和减少脑含水量作用,与模型组比较,具有显著性差异。甘草苷高剂量组与模型组比较具有极显著差异。上述实验表明甘草苷对单纯性脑缺血具有明显保护作用。

[0042] 实施例 2 甘草苷抗脑缺血再灌注作用

[0043] 1. 材料和方法

[0044] 1.1 实验动物

[0045] 健康成年雄性 Wistar 大鼠,清洁级,体重 $200 \sim 250\text{g}$,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验前在北京联合大学应用文理保健食品功能检测中心 SPF 级实验动物房适应环境一周。

[0046] 1.2 试剂

[0047] 甘草苷标准品:天津尖峰天然产物公司(纯度 $\geq 98\%$);依达拉奉:南京先声东元制药有限公司;MDA、MPO、SOD、考马斯亮蓝试剂盒:南京建成生物工程研究所。

[0048] 1.3 仪器

[0049] AR-2140 型万分之一电子天平:梅特勒-托利多仪器有限公司;电热恒温水浴锅:北京市长风仪器仪表公司;TGL 16M 离心机:湖南凯达科学仪器有限公司;MH-2 微量振荡器:江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司;DY89-II 型电动玻璃匀浆机:宁波新芝生物科技股份有限公司;酶标仪:美国 Thermo 公司。

[0050] 1.4 采用线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型

[0051] Wistar 大鼠被随机分为六组,假手术组、模型组、依达拉奉组、甘草苷高、中、低剂量组,每组动物 9 只,给药剂量见表 2。术前给药 5d,每天 1 次。假手术组及模型组灌胃给予溶剂 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液作为对照。

[0052] 用 10% 水合氯醛 (350mg/kg , ip) 麻醉 Wistar 大鼠。将动物体温维持在 37°C 。让动物仰卧固定,沿颈部中线切开皮肤及皮下组织。手术显微镜下分离左侧颈总动脉及其颈内和颈外动脉分枝。结扎颈外动脉的小分枝及终末枝。夹闭颈总和颈内动脉。将预先用硅橡胶包裹的、直径为 0.238mm 的鱼线插入颈外动脉,穿过颈内和颈外动脉分叉处进入颈内动脉。松开颈内动脉,继续将鱼线插入到颈内动脉颅内段。当感到明显的插入阻力时,此时自颈内动脉起始部的插入长度约为 $1.8 \sim 2\text{cm}$,表明线的头端已穿过大脑中动脉起始部。将颈外动脉残端用丝线结扎,以防插线脱落。2h 后抽出鱼线予以再灌注 22h。假手术组进线深度 10mm 左右,不阻塞大脑中动脉。

[0053] 1.5 脑组织 MDA 含量、MPO 及 SOD 活性测定

[0054] 大鼠在脑缺血 2h 再灌注 22h 后断头处死,在冰盘上快速取脑。称重,按 $1:9(\text{W/V})$ 加入冰冷生理盐水,制成 10% 的脑组织匀浆。将匀浆液以 3000r/min 离心 10min ,取上清液,在 -70°C 超低温冰箱保存待测。按试剂盒说明书测定 MDA 含量、MPO 活性以及 SOD 活性。蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法。

[0055] 1.6 统计学处理

[0056] 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间显著性比较,样本均数

间比较采用 t 检验。* 表示 $P < 0.05$, 表明给药组与模型组比较有显著性差异; ** 表示 $P < 0.01$, 表明给药组与模型组比较有极显著性差异。

[0057] 2. 结果

[0058] 2.1 甘草苷对大鼠脑组织 MPO、SOD 活性及 MDA 含量的影响

[0059] 表 2 甘草苷对大鼠脑组织 MPO、SOD 活性及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

[0060]

| 组 别 | MPO (U/g) | SOD 活性 (U/mgProt) | MDA 含量 (nmol/mgProt) |
|---------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术 | $0.13 \pm 0.01^{**}$ | $190.04 \pm 14.63^{**}$ | $1.92 \pm 0.51^{**}$ |
| 模 型 | 0.42 ± 0.03 | 138.99 ± 18.97 | 3.58 ± 0.85 |
| 依达拉奉 3 mg/kg | $0.31 \pm 0.03^{**}$ | $179.75 \pm 17.36^{**}$ | $2.58 \pm 0.52^{**}$ |
| 甘草苷 0.2 mg/kg | $0.39 \pm 0.03^{*}$ | 156.59 ± 16.32 | 3.27 ± 0.55 |
| 甘草苷 10 mg/kg | $0.35 \pm 0.02^{**}$ | $163.67 \pm 13.54^{**}$ | $2.59 \pm 0.56^{**}$ |
| 甘草苷 200 mg/kg | $0.32 \pm 0.02^{**}$ | $175.84 \pm 13.01^{**}$ | $2.35 \pm 0.54^{**}$ |

[0061] 与模型组比较, * 表示 $P < 0.05$ ** 表示 $P < 0.01$

[0062] 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 MPO 和 SOD 酶活性明显降低, MDA 含量明显升高。甘草苷能增强脑缺血再灌注大鼠脑组织 MPO 和 SOD 酶活性, 降低脑组织 MDA 含量, 表明甘草苷具有抗脑缺血再灌注损伤作用, 可能与其抗炎和抗氧化活性有关。

[0063] 实施例 3 甘草苷抗脑缺氧作用

[0064] 1. 材料和方法

[0065] 1.1 实验动物

[0066] 健康成年雄性 ICR 小鼠, 清洁级, 体重 $18 \sim 20g$, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验前在北京联合大学应用文理保健食品功能检测中心 SPF 级实验动物房适应环境一周。

[0067] 1.2 试剂

[0068] 甘草苷标准品: 天津尖峰天然产物公司 (纯度 $\geq 98\%$); 依达拉奉: 南京先声东元制药有限公司; 亚硝酸钠, 西安化学试剂厂。

[0069] 1.3 仪器

[0070] AR-2140 型万分之一电子天平: 梅特勒-托利多仪器有限公司。

[0071] 1.4 急性脑缺血缺氧实验

[0072] 取禁食 12h, 受试 ICR 小鼠 45 只, 随机分为阴性对照 (0.5% 羧甲基纤维素钠) 组、依达拉奉、甘草苷高、中、低剂量组, 每组 9 只。小鼠腹腔注射给药 2h 后, 各组动物自颈部逐只断头, 立即按秒表计时, 纪录各组动物断头后至呼吸停止后的时间及张口呼吸次数。

[0073] 1.5 亚硝酸钠中毒存活实验

[0074] 取禁食 12h, 受试 ICR 小鼠 45 只, 随机分为阴性对照 (0.5% 羧甲基纤维素钠) 组、依达拉奉组、甘草苷高、中、低剂量组, 每组 9 只。小鼠腹腔注射给药 2h 后, 各组小鼠按 $240mg/kg$ 剂量腹腔注射亚硝酸钠 (浓度为 $24mg/ml$), 以呼吸停止为指标, 分别记录小鼠存

活时间。

[0075] 1.6 统计学处理

[0076] 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行组间显著性比较, 样本均数间比较采用 t 检验。* 表示 $P < 0.05$, 表明给药组与模型组比较有显著性差异; ** 表示 $P < 0.01$, 表明给药组与模型组比较有极显著性差异。

[0077] 2 结果

[0078] 2.1 甘草苷对小鼠急性脑缺血缺氧时间的影响

[0079] 表 3 甘草苷对小鼠急性脑缺血缺氧时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

[0080]

| 组别 | 呼吸时间 (s) | 呼吸次数 |
|---------------|---------------|----------------|
| 阴性对照 | 25.7 ± 4.01 | 9.82 ± 1.88 |
| 依达拉奉 3 mg/kg | 34.8 ± 3.86** | 13.98 ± 1.56** |
| 甘草苷 0.2 mg/kg | 27.6 ± 3.03* | 10.25 ± 1.23 |
| 甘草苷 10 mg/kg | 30.8 ± 3.66** | 11.56 ± 1.17* |
| 甘草苷 200 mg/kg | 35.3 ± 3.35** | 13.63 ± 1.61** |

[0081] 与阴性对照组比较, * 表示 $P < 0.05$ ** 表示 $P < 0.01$

[0082] 2.2 甘草苷对小鼠亚硝酸钠中毒存活时间的影响

[0083] 表 4 甘草苷对小鼠亚硝酸钠中毒存活时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

[0084]

| 组别 | 存活时间 (min) |
|---------------|----------------|
| 阴性对照 | 11.98 ± 1.78 |
| 依达拉奉 3 mg/kg | 14.51 ± 1.56** |
| 甘草苷 0.2 mg/kg | 12.88 ± 1.68* |
| 甘草苷 10 mg/kg | 13.31 ± 1.49** |
| 甘草苷 200 mg/kg | 14.23 ± 1.65** |

[0085] 与阴性对照组比较, * 表示 $P < 0.05$ ** 表示 $P < 0.01$

[0086] 表 3 中数据显示甘草苷显著延长断头引起的全脑缺血小鼠的张口呼吸时间, 增加小鼠断头后的呼吸次数, 说明甘草苷能降低大脑耗氧量, 提高脑组织对氧的利用率。表 4 中结果表明甘草苷能显著延长亚硝酸钠致死小鼠存活时间, 表明甘草苷可增强脑组织耐缺氧能力。

[0087] 实施例 4 甘草苷抗脑血栓作用

[0088] 1. 材料和方法

[0089] 1.1 实验动物

[0090] 健康成年雄性 Wistar 大鼠, 清洁级, 体重 250 ~ 300g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验前在北京联合大学应用文理保健食品功能检测中心 SPF 级实验动物房适应环境一周。

[0091] 1.2 试剂

[0092] 甘草苷标准品：天津尖峰天然产物公司（纯度 $\geq 98\%$ ）；依达拉奉：南京先声东元制药有限公司。

[0093] 1.3 仪器

[0094] AR-2140 型万分之一电子天平：梅特勒-托利多仪器有限公司。

[0095] 1.4 血栓形成实验

[0096] Wistar 大鼠被随机分为五组，模型组、依达拉奉组、甘草苷高、中、低剂量组，每组动物 9 只，给药剂量见表 5。术前给药 14d，每天 1 次。假手术组及模型组灌胃给予溶剂 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液作为对照。

[0097] 用 10% 水合氯醛 (350mg/kg, ip) 麻醉 Wistar 大鼠。将动物体温维持在 37℃。让动物仰卧固定，沿颈部中线切开皮肤及皮下组织。手术显微镜下分离右侧颈总动脉和左侧颈外静脉。两端进行插管，形成大鼠颈动-静脉旁路 15min 后，取出 4 号丝线，在滤纸上除去浮血后称重，即得到血栓湿重。将称重后血栓置于烘干箱中，在 60℃，干燥 4h 后取出称重，即为血栓干重。

[0098] 1.5 统计学处理

[0099] 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析进行组间显著性比较，样本均数间比较采用 t 检验。* 表示 $P < 0.05$ ，表明给药组与模型组比较有显著性差异；** 表示 $P < 0.01$ ，表明给药组与模型组比较有极显著性差异。

[0100] 2. 结果

[0101] 2.1 甘草苷对大鼠颈动静脉血栓重量的影响

[0102] 表 5 甘草苷对大鼠颈动静脉血栓重量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=9)

[0103]

| 组 别 | 血栓重量 (mg) | |
|---------------|--------------------|-------------------|
| | 湿重 | 干重 |
| 模 型 | 24.34 \pm 6.08 | 4.86 \pm 2.13 |
| 依达拉奉 3 mg/kg | 14.58 \pm 4.32* | 3.28 \pm 0.90 |
| 甘草苷 0.2 mg/kg | 21.97 \pm 4.19 | 3.51 \pm 1.48 |
| 甘草苷 10 mg/kg | 13.65 \pm 3.62* | 3.09 \pm 1.13* |
| 甘草苷 200 mg/kg | 12.87 \pm 3.15** | 1.92 \pm 0.94** |

[0104] 注：与模型组比较，* 表示 $P < 0.05$ ** 表示 $P < 0.01$

[0105] 与模型组相比较，甘草苷对大鼠颈动-静脉旁路血栓形成有明显的抑制作用，表明甘草苷具有抗脑血栓作用。

[0106] 实施例 5 甘草苷抗血管性痴呆作用

[0107] 1. 材料和方法

[0108] 1.1 实验动物

[0109] 健康成年雄性 ICR 小鼠，清洁级，体重 18 ~ 20g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，实验前在北京联合大学应用文理保健食品功能检测中心 SPF 级实验动物房适

应环境一周。

[0110] 1.2 试剂

[0111] 甘草苷标准品：天津尖峰天然产物公司（纯度 $\geq 98\%$ ）；依达拉奉：南京先声东元制药有限公司。

[0112] 1.3 仪器

[0113] 水迷宫：安徽省淮北正华生物仪器设备有限公司；小鼠避暗仪：中国医学科学院药物研究所。

[0114] 1.4 建立血管性痴呆模型

[0115] ICR 小鼠术前 24h 禁食，自由饮水。用 4% 水合氯醛（400mg/kg, ip）麻醉。将麻醉后的小鼠仰卧固定，颈部备皮，消毒皮肤，沿颈部中线切开皮肤，分离左、右侧颈总动脉，用动脉夹夹闭血管，阻断双侧颈总动脉血流 30min。撤掉动脉夹再灌注，缝合皮肤。假手术组不予夹闭血管，其余步骤同上。再灌注 2h 后，小鼠清醒状态下灌胃给药，连续灌胃 25d。

[0116] 1.5 小鼠水迷宫实验

[0117] 实验前，给水迷宫中注水，水深没过站台 2cm 水温 23 ~ 25℃。在训练的第 1d 小鼠被置于站台上 10s，使其熟悉安全岛，然后将小鼠按顺序头朝水槽依次从 4 个象限放入水中，计时 2min，小鼠找到站台并在其上停留 10s 后，计时自动停止。第 5d 去掉站台，小鼠的游泳起点为远离站台的 2 个象限点，纪录 2min 内小鼠站台的潜伏期并纪录穿台次数。

[0118] 1.6 小鼠避暗实验

[0119] 将小鼠放入明室背向暗室，当小鼠走入暗室四足接触铜栅时会受到电击，其正常反应为马上退出暗室。第 1 天适应训练时，记录小鼠在 3min 内进入暗室的次数及第 1 次进入暗箱的时间；适应训练后，开通电源装置，将小鼠放入明室并背向暗室，小鼠进入暗室接触铜栅受到电击，小鼠立即取出。24h 后再次实验，观察 3min 内小鼠首次进入暗箱的时间即潜伏期，小鼠进入暗箱的次数即错误次数。

[0120] 1.7 统计学处理

[0121] 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析进行组间显著性比较，样本均数间比较采用 t 检验。* 表示 $P < 0.05$ ，表明给药组与模型组比较有显著性差异；** 表示 $P < 0.01$ ，表明给药组与模型组比较有极显著性差异。

[0122] 2. 结果

[0123] 2.1 甘草苷对小鼠水迷宫实验逃避潜伏期和穿台次数的影响

[0124] 表 6 甘草苷对小鼠水迷宫实验逃避潜伏期和穿台次数的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=9)

[0125]

| 组 别 | 水迷宫潜伏期 (s) | 水迷宫穿台次数 |
|---------------|--------------|-------------|
| 假手术 | 46.00±5.22** | 9.78±1.56** |
| 模 型 | 66.02±5.79 | 4.56±2.01 |
| 依达拉奉 3 mg/kg | 53.17±5.80** | 8.22±1.64** |
| 甘草苷 0.2 mg/kg | 61.93±5.65 | 6.55±1.67* |
| 甘草苷 10 mg/kg | 59.88±5.68* | 7.00±1.73* |
| 甘草苷 200 mg/kg | 55.42±5.52** | 7.56±1.94** |

[0126] 与模型组比较,*表示 $P < 0.05$ **表示 $P < 0.01$

[0127] 2.2 甘草苷对小鼠避暗实验避暗潜伏期和穿箱次数的影响

[0128] 表 7 甘草苷对小鼠避暗实验避暗潜伏期和穿箱次数的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=9)

[0129]

| 组 别 | 避暗潜伏期 (s) | 避暗穿箱次数 |
|---------------|--------------|--------------|
| 假手术 | 17.08±1.28** | 23.00±6.06** |
| 模 型 | 7.20±2.28 | 52.89±7.79 |
| 依达拉奉 3 mg/kg | 12.46±1.88** | 39.67±6.61** |
| 甘草苷 0.2 mg/kg | 8.54±1.47 | 47.11±6.43 |
| 甘草苷 10 mg/kg | 10.01±2.16* | 43.67±7.55* |
| 甘草苷 200 mg/kg | 11.55±1.29** | 41.44±6.54** |

[0130] 与模型组比较,*表示 $P < 0.05$ **表示 $P < 0.01$

[0131] 水迷宫实验结果显示模型组小鼠受训第 5d 水迷宫逃避潜伏期时间显著增加,穿台次数显著减少,学习记忆功能受损。甘草苷显著减少水迷宫逃避潜伏期时间,增加穿台次数,与模型组比较具有显著性差异。

[0132] 与假手术组相比,模型组小鼠被动避暗潜伏期显著缩短,避暗穿箱次数明显增加。甘草苷可显著增加小鼠被动避暗潜伏期,减少避暗穿箱次数,并具有剂量依赖性。

[0133] 实施例 6 甘草苷的安全性评价

[0134] 1. 材料和方法

[0135] 1.1 实验动物

[0136] 健康成年 ICR 小鼠,清洁级,体重 18 ~ 22g,雌雄各半;健康成年 Wistar 大鼠,清洁级,体重 250 ~ 300g,雌雄各半,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验前在北京联合大学应用文理保健食品功能检测中心 SPF 级实验动物房适应环境一周。

[0137] 1.2 试剂

[0138] 甘草苷标准品:天津尖峰天然产物公司(纯度 $\geq 98\%$)。

[0139] 1.3 方法

[0140] 小鼠 20 只,随机取 10 只作为正常对照,每日灌胃给予 0.5%羧甲基纤维素钠;余 10 只每日灌胃给予甘草苷 2g/kg 体重,连续灌胃 2 周,每日观察小鼠一般状态,进食量,称体重。末次给药后 24 小时脱颈椎处死小鼠,解剖后肉眼观察其内脏外观改变情况。

[0141] 大鼠 20 只,随机取 10 只作为正常对照,每日灌胃给予 0.5%羧甲基纤维素钠;余 10 只每日灌胃给予甘草苷 1g/kg 体重,连续灌胃 2 周,每日观察大鼠一般状态,进食量,称体重。末次给药后 24 小时脱颈椎处死动物,解剖后肉眼观察其内脏外观改变情况。

[0142] 2. 结果

[0143] 结果表明,小鼠连续两周给予甘草苷 2g/kg(相当于最低有效剂量 10000 倍),小鼠一般状态,摄食量、体重和内脏器官未见明显异常。大鼠给予甘草苷后也未见明显异常。表明甘草苷安全性较高。