



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101744828 A

(43) 申请公布日 2010.06.23

(21) 申请号 200810183208.6

(22) 申请日 2008.12.16

(71) 申请人 中国医学科学院药用植物研究所
地址 100193 北京市海淀区马连洼北路 151 号

(72) 发明人 王忆杭 潘瑞乐 刘新民 肖培根
王立为 赵晓宏 斯建勇 常琪

(51) Int. Cl.

A61K 31/7028 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

连翘酯苷用于制备治疗老年性痴呆药物的用途

(57) 摘要

本发明公开了连翘酯苷在制备具有促进神经细胞增殖并具有神经细胞保护功效的药物中的应用。连翘酯苷在制备具有改善被动回避反应及空间学习记忆障碍,提高学习记忆功能功效的药物中的应用。连翘酯苷在制备具有提高大脑皮层脑组织总蛋白含量功效的药物中的应用。连翘酯苷在制备具有降低大脑皮层及海马脑组织乙酰胆碱酯酶活性功效的药物中的应用。连翘酯苷在制备具有提高大脑皮层及海马脑组织超氧化物歧化酶活力、降低大脑皮层及海马脑组织丙二醛含量及单胺氧化酶活力功效的药物中的应用。连翘酯苷在制备具有降低大脑皮层脑组织炎症因子 TNF- α 及 IL-6 含量功效的药物中的应用。连翘酯苷用于制备治疗轻度认知功能损害疾病尤其是治疗老年性痴呆药物的应用。

1. 连翘酯苷在制备具有促进神经细胞增殖并具有神经细胞保护功效的药物中的应用。
2. 连翘酯苷在制备具有改善被动回避反应及空间学习记忆障碍,提高学习记忆功能功效的药物中的应用。
3. 连翘酯苷在制备具有提高大脑皮层脑组织总蛋白含量功效的药物中的应用。
4. 连翘酯苷在制备具有降低大脑皮层及海马脑组织乙酰胆碱酯酶活性功效的药物中的应用。
5. 连翘酯苷在制备具有提高大脑皮层及海马脑组织超氧化物歧化酶活力、降低大脑皮层及海马脑组织丙二醛含量及单胺氧化酶活力功效的药物中的应用。
6. 连翘酯苷在制备具有降低大脑皮层脑组织炎症因子 TNF- α 及 IL-6 含量功效的药物中的应用。
7. 根据权利要求 1-6 中任何一项所述的应用,其中所述的药物为治疗轻度认知功能损害疾病的药物。
8. 根据权利要求 7 所述的用途,其中所述的药物为治疗老年性痴呆的药物。

连翘酯苷用于制备治疗老年性痴呆药物的用途

发明领域：

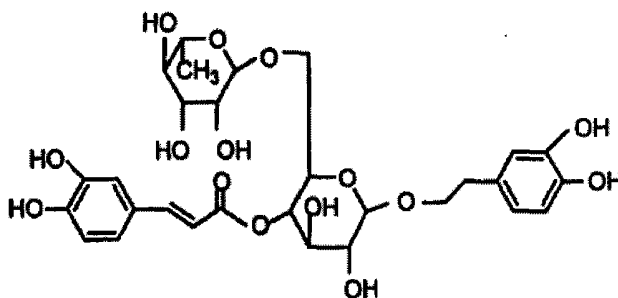
[0001] 本发明涉及医药技术领域，具体来说是连翘酯苷用于制备治疗老年性痴呆药物的用途。

背景技术：

[0002] 老年痴呆是人类进入老年化社会后所面临的最棘手的问题之一，其中以老年性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 和血管性痴呆 (VaD) 最为多见，老年性痴呆约占 63%，其次是血管性痴呆，约占 27%。老年性痴呆又称阿尔茨海默病 (AD)，是一种中枢神经系统退行性疾病。患者病理表现为脑萎缩，中枢神经区域神经元和神经突触明显减少或消失，并伴有大量神经纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT) 和老年斑 (senile plaque, SP) 等特征性病理变化。老年性痴呆致病过程是一个多机制、多因素的复杂过程包括：神经细胞凋亡，胆碱能缺失、氧化应激、炎症反应等多种假说。有资料显示，老年性痴呆的患病率随年龄的增长而增加，已成为继心血管疾病，癌症、中风之后的第 4 大死亡原因。因此，攻克老年性痴呆、提高老年人的生命质量是目前生物医学研究的重要领域。

[0003] 连翘 (Forsythia) 为木犀科连翘属植物连翘的干燥果实，是 2005 年版《中华人民共和国药典》一部收载的常用中药之一，具有清热解毒、消肿散结之功效。连翘酯苷 (Forsythiaside) 是药材连翘中的主要活性成分，化学名为 3,4-二羟基苯乙基-O- α -鼠李糖基 (1-6)-4-O-咖啡酰基- β -葡萄糖苷，属于苯乙醇苷类化合物，其化学结构式如下：

[0004]



[0005] 分别参见梁文藻，傅小勇，涂国土．连翘成分分析 -VI，连翘酯苷的分离、鉴定和测定 [J]．药物分析杂志，1986，6 (5)，第 263-266 页或张立伟，赵春贵，杨频．连翘酯苷分离提取及抑制弹性蛋白酶活性研究 [J]．化学研究与应用，2002，14 (2)，第 219-221 页。它具有抗菌、抗炎及体外抗氧化等药理作用。但迄今为止尚未见将连翘酯苷用于治疗神经系统疾病尤其是治疗老年性痴呆的报道。

发明内容：

[0006] 本发明目的是提供连翘酯苷的新制药用途。

[0007] 具体来说，本发明的连翘酯苷的新制药用途分别是：

[0008] 连翘酯苷在制备具有促进神经细胞增殖并具有神经细胞保护功效的药物中的应用。

[0009] 连翘酯苷在制备具有改善被动回避反应及空间学习记忆障碍,提高学习记忆功能功效的药物中的应用。

[0010] 连翘酯苷在制备具有提高大脑皮层脑组织总蛋白含量功效的药物中的应用。

[0011] 连翘酯苷在制备具有降低大脑皮层及海马脑组织乙酰胆碱酯酶活性功效的药物中的应用。

[0012] 连翘酯苷在制备具有提高大脑皮层及海马脑组织超氧化物歧化酶活力、降低大脑皮层及海马脑组织丙二醛含量及单胺氧化酶活力功效的药物中的应用。

[0013] 连翘酯苷在制备具有降低大脑皮层脑组织炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 及 IL-6 含量功效的药物中的应用。

[0014] 连翘酯苷用于制备治疗轻度认知功能损害疾病尤其是治疗老年性痴呆药物的应用。

[0015] 本发明人分别通过连翘酯苷的细胞实验、行为学实验和作用机制实验对上述新制药用途加以证实。

[0016] 1. 细胞实验:在正常培养的 PC12 细胞中加入连翘酯苷后与正常对照相比,连翘酯苷能显著提高 PC12 细胞的生存率;在谷氨酸、 β -淀粉样蛋白、低糖低血清培养液诱导 PC12 细胞损伤实验中,预先用连翘酯苷处理后,给药组和模型组相比能显著提高 PC12 细胞的生存率。这些结果表明连翘酯苷可以促进神经细胞增殖并具有神经细胞保护作用。

[0017] 2. 行为学实验:采用的东莨菪碱致老年小鼠损伤模型是一种集衰老和胆碱能损害为一体的多因素致病 AD 动物模型。给药组用连翘酯苷预处理后,与模型组相比较能显著增加老年小鼠被动回避反应实验(跳台实验)的安全期时间比率,显著降低 Morris 水迷宫试验中老年小鼠的逃避潜伏期;用连翘酯苷与阳性药多奈哌齐预处理后,和模型组相比较能显著降低 Morris 水迷宫试验中老年小鼠的逃避潜伏期,且连翘酯苷组与阳性药多奈哌齐组相比 Morris 水迷宫试验中老年小鼠的逃避潜伏期无显著性差异。这些结果说明连翘酯苷对东莨菪碱所致的老年小鼠被动回避反应及空间学习记忆障碍具有明显的改善作用,具提高学习记忆功能的作用。

[0018] 3. 作用机制研究:采用的东莨菪碱致老年小鼠损伤模型是一种集衰老和胆碱能损害为一体的多因素致病 AD 动物模型。给药组用连翘酯苷预处理后,与东莨菪碱模型组相比较能显著提高老年小鼠的大脑皮层脑组织总蛋白含量,显著抑制老年小鼠大脑皮层脑组织乙酰胆碱酯酶(AChE)活性升高,显著提高老年小鼠大脑皮层脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活力,显著降低老年小鼠大脑皮层脑组织单胺氧化酶(MAO)活力及丙二醛(MDA)含量。用连翘酯苷与阳性药多奈哌齐预处理后,和模型组相比较能显著抑制老年小鼠大脑皮层及海马脑组织 AChE 活性升高,且连翘酯苷组与阳性药多奈哌齐组相比 AChE 活性无显著性差异;用连翘酯苷与阳性药维生素 E 预处理后,和模型组相比能显著提高老年小鼠大脑皮层及海马脑组织 SOD 活力,显著降低老年小鼠大脑皮层及海马脑组织 MDA 含量及 MAO 活力,且连翘酯苷组与阳性药维生素 E 组相比 SOD 活力及 MDA 含量无显著性差异;用连翘酯苷与阳性药布洛芬预处理后,和模型组相比较能显著降低老年小鼠大脑皮层脑组织炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 及 IL-6 含量,且连翘酯苷组与阳性药布洛芬组相比炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 及 IL-6 含量无显著性差异。上述实验结果表明连翘酯苷在行为学实验中的提高学习记忆功能效应和提高东莨菪碱损伤的老年小鼠的大脑皮层脑组织总蛋白含量,降低炎症因子表达;降低大脑皮

层及海马脑组织 AChE 活性,提高抗氧化能力有关。

[0019] 正因为连翘酯苷具有上述药理功效,因此,连翘酯苷可以制备治疗轻度认知功能损害疾病尤其是治疗老年性痴呆的药物。

[0020] 下述进一步详细说明上述提到的药理实验。

[0021] 实验例 1:连翘酯苷抗 PC12 细胞损伤模型的神经保护作用研究

[0022] 1. 材料

[0023] 1.1 药物

[0024] 连翘酯苷由中国医学科学院药用植物研究所化学室制备。

[0025] 1.2 细胞

[0026] PC12 细胞由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。

[0027] 1.3 主要试剂和仪器

[0028] DMEM 培养基购自 GIBCO 公司,胎牛血清 (FBS) 为四季青优级产品,马血清 (HS) 为 Hyclone 公司产品,噻唑蓝 (MTT) 购自 Amresco 公司。L- 谷氨酸、 β - 淀粉样蛋白为 Sigma 公司产品。

[0029] 一次性细胞培养材料均购自 Costar 公司, MolecularDevice 公司 SpectraMax190 型 酶联免疫检测仪。

[0030] 2. 方法

[0031] 2.1MTT 比色法检测 PC12 细胞生存率

[0032] 在接种 PC12 细胞的 96 孔培养板中,每孔加入终浓度为 5mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ l,继续培养 4h 后终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜 (DMSO),37 $^{\circ}$ C 孵育 10min,振荡 10min。待孔内颗粒完全溶解后,用酶联免疫检测仪,选择波长 570nm,测定各孔吸光度 (A)。按下式计算 PC12 细胞生长的生存率:

[0033] 生存率 = [含药培养液 A/ 无药培养液对照 A] \times 100 %

[0034] 2.2PC12 细胞的培养

[0035] PC12 细胞由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。冻存于液氮中的 PC12 细胞株取出后,迅速投至 37 $^{\circ}$ C 的水浴中,不断振摇,使其在 30s 内融化。1000r/min,5min 离心。用 75% 酒精擦洗消毒冻存管,将冻存管移至超净工作台中,弃上清,加入 PBS 重悬细胞。重复上述离心步骤。在超净工作台中,弃上清,加入 DMEM 完全培养液重悬细胞。将细胞悬液移入盛有 DMEM 完全培养液的培养瓶中,5% CO_2 ,37 $^{\circ}$ C 培养。

[0036] 2.3PC12 细胞生存率测定

[0037] 待 PC12 细胞在培养瓶中培养至铺满单层后,消化、吹打,形成单细胞悬液,倒置显微镜下计数,用培养液将细胞稀释为 10^5 个 /ml。将细胞接种在 96 孔板中,100 μ l 孔。24h 后,分别加入各组含药培养液,终浓度分别为 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-6} mol/L、 5×10^{-6} mol/L,每个浓度分设 6 个复孔。对照组同样设 6 个复孔,加入 DMEM 完全培养液。5% CO_2 ,37 $^{\circ}$ C 条件下培养 24h 后 MTT 比色法检测 PC12 细胞生存率。

[0038] 2.4 谷氨酸损伤后 PC12 细胞生存率测定

[0039] 待 PC12 细胞在培养瓶中培养至铺满单层后,消化、吹打,形成单细胞悬液,倒置显微镜下计数,用培养液将细胞稀释为 10^5 个 /ml。将细胞接种在 96 孔板中,100 μ l 孔。24h 后,在生长状态良好的 PC12 细胞中加入终浓度为 20mmol/L 的谷氨酸,5% CO_2 ,37 $^{\circ}$ C 作用

24h, 建立谷氨酸损伤 PC12 细胞模型。给药组在加入谷氨酸之前 1h 预先加入含药培养液替换原培养液, 终浓度分别为 $1 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 。对照组加入 DMEM 完全培养液。5% CO_2 , 37℃ 培养 24h 后 MTT 比色法检测 PC12 细胞生存率。

[0040] 2.5 β 淀粉样蛋白损伤后 PC12 细胞生存率测定

[0041] 待 PC12 细胞在培养瓶中培养至铺满单层后, 消化、吹打, 形成单细胞悬液, 倒置显微镜下计数, 用培养液将细胞稀释为 10^5 个 /ml。将细胞接种在 96 孔板中, 100 μL 1 孔。24h 后, 在培养的生长状态良好的 PC12 细胞中加入终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 β 淀粉样蛋白, 5% CO_2 , 37℃ 作用 24h, 建立 β 淀粉样蛋白损伤 PC12 细胞模型。给药组在加入 β 淀粉样蛋白之前 1h 预先加入含药培养液替换原培养液, 终浓度分别为 $1 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, 对照组加入 DMEM 完全培养液。5% CO_2 , 37℃ 培养 24h 后 MTT 比色法检测 PC12 细胞生存率。

[0042] 2.6 低糖低血清损伤后 PC 12 细胞生存率测定

[0043] 待 PC12 细胞在培养瓶中培养至铺满单层后, 消化、吹打, 形成单细胞悬液, 倒置显微镜下计数, 用培养液将细胞稀释为 10^5 个 /ml。将细胞接种在 96 孔板中, 100 μL 1 孔。24h 后, 在培养的生长状态良好的 PC12 细胞中以含低糖低血清培养液替换原培养液, 各给药组加入含药低糖低血清培养液, 药物终浓度分别为 $1 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{mol/L}$, 对照组加入 DMEM 完全培养液, 5% CO_2 , 37℃ 作用 24h, 建立低糖低血清损伤 PC12 细胞模型。5% CO_2 , 37℃ 培养 24h 后 MTT 比色法检测 PC12 细胞生存率。

[0044] 2.7 统计学处理

[0045] 所有数据均以均值 \pm 标准差表示, 各组间差异显著性统计采用 SPSS 13.0 for windows 统计软件进行分析, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 时有统计学意义。

[0046] 3. 结果

[0047] 连翘酯苷对 PC12 细胞生存率影响的 MTT 比色实验结果见表 1。结果表明连翘酯苷 $1 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 给药组均能够显著提高 PC12 细胞生存率 ($P < 0.01$)。连翘酯苷对谷氨酸、 β -淀粉样蛋白、低糖低血清培养液诱导损伤的 PC12 细胞生存率影响的 MTT 比色实验结果见表 2、3 和 4。谷氨酸、 β -淀粉样蛋白、低糖低血清培养液模型组与对照组相比 PC12 细胞生存率明显降低 ($P < 0.01$)。用连翘酯苷预处理后, $1 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 给药组与模型组相比能明显增加 PC12 细胞生存率 ($P < 0.01$)。

[0048] 表 1 连翘酯苷对 PC12 细胞生存率的影响

[0049]

组别	OD值	生存率
对照组	0.4703 \pm 0.0059	100%
连翘酯苷 $1 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 组	0.4814 \pm 0.0137*	102.3%*
连翘酯苷 $1 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 组	0.5044 \pm 0.0436*	107.4%*
连翘酯苷 $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 组	0.5792 \pm 0.0209*	123.2%*

[0050] 注 :n = 6 ;与对照组比较 :* $P < 0.01$

[0051] 表 2 连翘酯苷对谷氨酸致损伤 PC12 细胞生存率的影响

[0052]

组别	OD值	生存率
对照组	0.4703±0.0059	100%
谷氨酸组	0.2605±0.0168#	55.3%#
连翘酯苷1×10 ⁻⁷ mol/L组	0.2967±0.0111*	63.2%*
连翘酯苷1×10 ⁻⁶ mol/L组	0.3169±0.0365*	67.4%*
连翘酯苷5×10 ⁻⁶ mol/L组	0.3765±0.0243*	80.1%*

[0053] 注:n=6;与对照组比较:#P<0.01;与谷氨酸组比较:*P<0.01

[0054] 表3 连翘酯苷对β淀粉样蛋白致损伤PC12细胞生存率的影响

组别	OD值	生存率
对照组	0.4638±0.0214	100%
β淀粉样蛋白组	0.3832±0.0007#	82.6%#
连翘酯苷1×10 ⁻⁷ mol/L组	0.4025±0.0082	86.8%*
连翘酯苷1×10 ⁻⁶ mol/L组	0.4681±0.0006*	100.9%*
连翘酯苷5×10 ⁻⁶ mol/L组	0.4988±0.0091*	107.6%*

[0056] 注:n=3;与对照组比较:#P<0.01;与β淀粉样蛋白组比较:*P<0.01

[0057] 表4 连翘酯苷对低糖低血清培养液致损伤PC12细胞生存率的影响

组别	OD值	生存率
对照组	0.6761±0.0208	100%
低糖低血清组	0.5291±0.0242#	78.3%#
连翘酯苷1×10 ⁻⁷ mol/L组	0.5670±0.0037*	83.9%*
连翘酯苷1×10 ⁻⁶ mol/L组	0.7492±0.0323*	110.7%*
连翘酯苷1×10 ⁻⁵ mol/L组	1.2120±0.0127*	179.1%*

[0059] 注:n=3;与对照组比较:#P<0.01;与低糖低氧培养液组比较:*P<0.01。

[0060] 上述实验结果表明连翘酯苷可以促进神经细胞增殖并具有神经细胞保护作用。

[0061] 实验例2:连翘酯苷抗老年性痴呆作用的行为学研究

[0062] 1. 材料

[0063] 1.1 动物

[0064] 昆明种小鼠,10月龄,雌性,体重35~40g,BALB/C小鼠,12月龄,雌性,体重28~32g,均由中国医学科学院动物中心提供,合格证号:SCXK(京)2004-0001。置于SPF环境中饲养。实验过程中动物自由摄食和饮水。

[0065] 1.2 试剂

[0066] 连翘酯苷由中国医学科学院药用植物研究所化学室制备,纯度达到95%以上;东莨菪碱(scopolaminium bromide),Merck出品,批号No.K26208347 912;安理申(盐酸多奈哌齐),PFIZER PGM公司制造,批号No.6109803。

[0067] 1.3 仪器

[0068] 小鼠跳台测试仪、小鼠水迷宫测试仪由中国医学科学院药用植物研究所与航天医学工程研究所联合研制开发。

[0069] 2. 方法

[0070] 2.1 动物模型的选择

[0071] 老年性痴呆(Alzheimer's disease,AD)是中枢神经系统的一种慢性、进行性变性

疾病,迄今为止发病机制尚不清楚,尚不能全面再现、模拟老年性痴呆病理、生化、行为学等方面的全部特征的AD动物模型。原因之一乃由于AD是一种多因素损伤引起的疾病。现在,有学者提出,集多种因素于一体的复合式动物模型可能会表现出更为典型老年性痴呆的病理及行为学表现。

[0072] 因此,我们所构建的东莨菪碱致老年小鼠损伤模型是一种集衰老和胆碱能损害为一体的多因素致病的AD动物模型,它比传统的东莨菪碱模型和自然衰老模型更贴近AD复杂的病因、病理和生化变化过程,可作为研究AD的发病机制和药物开发的理想实验模型。

[0073] 2.2 跳台实验

[0074] 跳台实验共测试两天。每天实验开始前60min. 各组分别灌胃给予相应药物和蒸馏水,开始前30min,空白对照组小鼠腹腔注射生理盐水20ml/kg,其余各组则腹腔注射东莨菪碱3mg/kg。第一天进行获得试验时,先将小鼠轻轻放在跳台上使熟悉箱内环境3min,然后给予25V电压5min。第二天进行巩固(consolidation)试验,方法同前。以动物站于台上时间为安全期时间(Ts),安全期时间比率=(安全期时间/总实验时间)×100%。

[0075] 2.3 Morris 水迷宫实验

[0076] Morris 水迷宫实验共测试五天。每天实验开始前50min. 各组分别灌胃给予相应药物和蒸馏水。30min后,空白对照组小鼠腹腔注射生理盐水20ml/kg,其余各组则腹腔注射东莨菪碱3mg/kg。20min后开始水迷宫测试,120s/次,记录其在120s内寻找到平台的时间,即为逃避潜伏期(escape latency),120s内没游出者按120s计。以逃避潜伏期作为反应小鼠学习记忆障碍的指标。

[0077] 2.4 给药方案

[0078] 2.4.1 连翘酯苷对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型被动回避反应的影响

[0079] 48只10月龄雌性昆明种小鼠(35~40g)随机分为4组(空白对照组、模型组、连翘酯苷高、低剂量组),每组12只。连翘酯苷高、低剂量组分别灌胃给予连翘酯苷200、100mg/kg/d,空白对照和模型组则给予相等体积的蒸馏水。连续给药14d后开始跳台试验。

[0080] 2.4.2 连翘酯苷对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型空间学习记忆障碍的影响

[0081] 40只12月龄雌性BALB/C小鼠(28~32g)随机分为4组(空白对照组、模型组、连翘酯苷高、低剂量组),每组10只。连翘酯苷高、低剂量组分别灌胃给予连翘酯苷200、100mg/kg/d,空白对照和模型组则给予相等体积的蒸馏水。连续给药14d后开始进行Morris迷宫训练。

[0082] 2.4.3 连翘酯苷与多奈哌齐对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型空间学习记忆障碍的影响

[0083] 48只12月龄雌性BALB/C小鼠(28~32g)随机分为4组(对照组、模型组、多奈哌齐组和连翘酯苷组),每组12只。连翘酯苷组灌胃给予连翘酯苷200mg/kg/d,多奈哌齐组灌胃给予多奈哌齐3mg/kg,空白对照和模型组则给予相等体积的蒸馏水。连续给药14d后开始进行Morris迷宫训练。

[0084] 2.5 统计方法:各项数据以均值±标准误表示,各组间差异显著性统计采用SPSS13.0 for windows统计软件进行分析,采用t-检验和双因素ANOVA,以P<0.05为显著性差异水平。

[0085] 3. 结果

[0086] 连翘酯苷对抗东莨菪碱所致老年小鼠损伤模型的被动回避反应实验结果见表 5。

[0087] 在获得阶段东莨菪碱组与对照组相比跳台实验安全期时间比率显著下降（对照组 92.82 ± 2.57 ，东莨菪碱组 16.02 ± 6.11 ， $P < 0.05$ ）；用连翘酯苷预处理后，和东莨菪碱组相比能明显增加跳台实验安全期时间比率，连翘酯苷 200、100mg/ml 组安全期时间比率分别为 42.01 ± 6.11 和 24.41 ± 6.26 。

[0088] 在巩固阶段东莨菪碱组与对照组相比跳台实验安全期时间比率显著下降（对照组 92.52 ± 3.92 ，东莨菪碱组 59.19 ± 6.17 ， $P < 0.05$ ）；用连翘酯苷预处理后，和东莨菪碱组相比能显著增加跳台实验安全期时间比率（连翘酯苷 200mg/ml 组 88.03 ± 3.95 ，连翘酯苷 200mg/ml 组 78.64 ± 5.39 ， $P < 0.05$ ）。

[0089] 结果表明，连翘酯苷对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型的被动回避反应障碍具有显著改善作用。

[0090] 表 5 连翘酯苷对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型的被动回避反应实验安全期时间比率的影响

[0091]

组别	剂量	获得阶段安全期时间比率	巩固阶段安全期时间比率
	mg/kg	%	%
对照	-	92.82 ± 2.57	92.52 ± 3.92
东莨菪碱	3	$16.02 \pm 6.11\#$	$59.19 \pm 6.17\#$
连翘酯苷	200	42.01 ± 6.11	$88.03 \pm 3.95^*$
连翘酯苷	100	24.41 ± 6.26	$78.64 \pm 5.39^*$

[0092] 注： $n = 12$ ；与对照组比较： $\#P < 0.05$ ；与模型组比较： $*P < 0.05$

[0093] 连翘酯苷对抗东莨菪碱致老年小鼠损伤模型的 Morris 水迷宫实验结果见表 6。在实验中，应用 Morris 水迷宫对动物进行了 5 天的测试。东莨菪碱组与对照组相比逃避潜伏期显著延长；用连翘酯苷预处理后，和东莨菪碱组相比能明显缩短逃避潜伏期，其中连翘酯苷 200mg/kg 组与东莨菪碱组比较有显著性差异（双因素 ANOVA， $P < 0.05$ ）。结果表明连翘酯苷对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型的空间学习记忆障碍具有明显的改善作用。

[0094] 表 6 连翘酯苷对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型的 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期的影响

[0095]

组别	剂量	逃避潜伏期(s)				
	mg/kg	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
对照组	-	50.61 ± 6.61	45.27 ± 6.01	41.50 ± 6.77	38.16 ± 6.64	30.84 ± 5.77
东莨菪碱组	3	$85.02 \pm 6.89\#$	$82.61 \pm 7.02\#$	$77.08 \pm 7.41\#$	$75.74 \pm 6.92\#$	$51.87 \pm 7.11\#$
连翘酯苷	100	60.73 ± 7.20	76.59 ± 5.88	58.32 ± 6.53	58.86 ± 6.13	43.41 ± 6.77
连翘酯苷	200	$61.60 \pm 6.24^*$	$53.93 \pm 6.66^*$	$49.99 \pm 6.64^*$	$52.12 \pm 6.29^*$	$37.74 \pm 5.93^*$

[0096] 注： $n = 10$ ；与对照组比较： $\#P < 0.05$ ；与模型组比较： $*P < 0.05$

[0097] 连翘酯苷与多奈哌齐对抗东莨菪碱所致老年小鼠 Morris 水迷宫实验结果见表 7。在实验中，应用 Morris 水迷宫对动物进行了 5 天的测试。结果表明，东莨菪碱组与对照组相比逃避潜伏期显著延长；用连翘酯苷与多奈哌齐预处理后，和东莨菪碱组相比能显著缩短逃避潜伏期（ $P < 0.05$ ），且连翘酯苷组与阳性药多奈哌齐组相比逃避潜伏期无显著性差

异。这些结果说明连翘酯苷对东莨菪碱所致的老年小鼠及空间学习记忆障碍具有明显的改善作用,且其改善程度与阳性药多奈哌齐相当。

[0098] 表 7 连翘酯苷与多奈哌齐对东莨菪碱所致小鼠空间学习障碍游泳时间的影响

[0099]

组别	剂量 mg/kg	逃避潜伏期 (s)				
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
对照组		53.84±5.55	38.90±5.32	29.42±6.10	20.89±3.96	24.17±3.82
东莨菪碱组	3	86.28±5.25#	67.01±4.71#	57.32±6.27#	42.09±5.01#	35.32±5.66#
多奈哌齐	3	80.67±4.77*	43.97±5.71*	35.78±5.84*	19.40±3.01*	16.84±3.32*
连翘酯苷	200	76.95±5.35*	49.29±6.05*	40.29±6.39*	29.02±5.84*	12.85±2.59*

[0100] 注 :n = 12 ;与对照组比较 :#P < 0. 05 ;与模型组比较 :*P < 0. 05

[0101] 这些结果说明连翘酯苷对东莨菪碱所致的老年小鼠被动回避反应及空间学习记忆障碍具有明显的改善作用,具提高学习记忆功能的作用。

[0102] 实验例 3 :连翘酯苷抗老年性痴呆的作用机制研究

[0103] 1. 1 动物

[0104] BALB/C 小鼠,12 月龄,雌性,体重 28 ~ 32g,均由中国医学科学院动物中心提供,合格证号 :SCXK(京)2004-0001。置于 SPF 环境中饲养。实验过程中动物自由摄食和饮水。

[0105] 1. 2 试剂

[0106] 连翘酯苷由中国医学科学院药用植物研究所化学室制备,纯度达到 95% 以上 ;东莨菪碱 (scopolaminium bromide), Merck 制造,批号 No. K26208347 912 ;安理申 (盐酸多奈哌齐), PFIZER PGM 公司制造,批号 No. 6109803 ;布洛芬,上海强生制药有限公司制造,批号 No. 071106279 ;维生素 E,北京双鹤药业制造,批号 No. 080107。

[0107] 脑组织 AChE、SOD、MAO 活性及 MDA 含量测定所采用试剂盒由南京建成生物研究所提供。TNF-α 及 IL-6 测定所采用试剂盒由北京普尔伟业生物科技有限公司提供。

[0108] 2. 方法

[0109] 2. 1 小鼠脑组织总蛋白含量、MDA 含量、AChE、SOD、MAO 活性的测定 :

[0110] 实验进行第 20d 灌胃后 30min 断颈处死小鼠,立即取脑,置于冰上迅速分离海马和皮层,分别用冰冷生理盐水冲洗后称重,于 0. 9% 冰冷生理盐水中进行匀浆,制成 10% 脑组织匀浆液。4℃ 3 000 转离心 10min,取上清液,用化学比色法测定脑组织总蛋白含量、MDA 含量、AChE、SOD、MAO 活性,测定方法按南京建成生物研究所试剂盒说明操作。蛋白定量采用 Bradford 法。

[0111] 2. 2 小鼠大脑皮层脑组织 TNF-α 及 IL-6 的测定 :

[0112] 实验进行第 20d 灌胃后 30min 断颈处死小鼠,立即取脑组织,置于冰上迅速分离皮层,分别用冰冷生理盐水冲洗后称重,于 0. 9% 冰冷生理盐水中进行冰浴匀浆,制成 30% 脑匀浆液。4℃,3000 转,离心 10min,取上清液,用放射免疫分析法测定脑组织 TNF-α、IL-6,测定方法按北京普尔伟业生物科技有限公司试剂盒说明操作。

[0113] 测定原理 :利用液相竞争抑制原理,采用平衡法对样品进行测定。待测样品或标准与限量的抗血清及标记抗原加在一起进行竞争性结合反应,反应完全后,加入免疫分离剂,分离出抗原-抗体复合物,测定复合物的放射性 (B),计算各标准管的结合率 (B/B0%)。作

出标准曲线,计算出样品浓度。

[0114] 2.3 给药方案

[0115] 2.3.1 连翘酯苷对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层及海马脑组织总蛋白含量、MDA 含量、AChE、SOD、MAO 活性的影响

[0116] 12 月龄雌性 BALB/C 小鼠 (28 ~ 32g) 随机分 4 组 (空白对照组、模型组、连翘酯苷高、低剂量组), 每组 6 只。连翘酯苷高、低剂量组分别灌胃给予连翘酯苷 200、100mg/kg/d, 空白对照和模型组则给予相等体积的蒸馏水, 连续灌胃 20d。

[0117] 2.3.2 连翘酯苷与多奈哌齐对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层及海马脑组织 AChE 活性的影响

[0118] 12 月龄雌性 BALB/C 小鼠 (28 ~ 32g) 随机分为 4 组 (空白对照组, 模型组, 连翘酯苷组, 多奈哌齐组) 每组 6 只。连翘酯苷组灌胃给予连翘酯苷 200mg/kg/d, 多奈哌齐组灌胃给予多奈哌齐 3mg/kg/d, 空白对照和模型组则给予相等体积的蒸馏水, 连续灌胃 20d。

[0119] 2.3.3 连翘酯苷与维生素 E 对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层及海马脑组织 MDA 含量、SOD、MAO 活性的影响

[0120] 12 月龄雌性 BALB/C 小鼠 (28 ~ 32g) 随机分为 4 组 (空白对照组, 模型组, 连翘酯苷组, 维生素 E 组) 每组 6 只。连翘酯苷组灌胃给予连翘酯苷 200mg/kg/d, 维生素 E 组灌胃给予维生素 E 100mg/kg/d, 空白对照和模型组则给予相等体积的蒸馏水, 连续灌胃 20d。

[0121] 2.3.4 连翘酯苷与布洛芬对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层脑组织炎症因子表达的影响

[0122] 12 月龄雌性 BALB/C 小鼠 (28 ~ 32g) 随机分为 4 组 (空白对照组, 模型组, 连翘酯苷组, 布洛芬组) 每组 6 只。连翘酯苷组灌胃给予连翘酯苷 200mg/kg/d, 布洛芬组灌胃给予布洛芬 62.5mg/kg/d, 空白对照和模型组则给予相等体积的蒸馏水, 连续灌胃 20d。

[0123] 2.4 统计方法: 所有数据均以 均值 \pm 标准差 表示, 各组间差异显著性统计采用 SPSS 13.0 for windows 统计软件进行分析, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异水平。

[0124] 4. 结果

[0125] 连翘酯苷对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层脑组织总蛋白含量、MDA 含量、AChE、SOD、MAO 活性的影响实验结果见表 8。结果表明东莨菪碱组与对照组相比显著降低老年小鼠的大脑皮层 10% 脑组织匀浆总蛋白含量 (对照组 3.61 ± 0.29 mgprot/ml, 东莨菪碱组 2.95 ± 0.59 mgprot/ml, $P < 0.05$), 显著升高老年小鼠大脑皮层脑组织 AChE 活性 (对照组 0.52 ± 0.02 U/mgprot, 东莨菪碱组 0.67 ± 0.08 U/mgprot, $P < 0.05$), 显著降低老年小鼠大脑皮层脑组织 SOD 活力 (对照组 149.50 ± 14.99 U/mgprot, 东莨菪碱组 135.09 ± 5.58 U/mgprot, $P < 0.05$), 显著提高老年小鼠大脑皮层脑组织 MAO 活力 (对照组 7.81 ± 1.07 U/mgprot, 东莨菪碱组 10.45 ± 1.75 U/mgprot, $P < 0.05$) 及 MDA 含量 (对照组 1.88 ± 0.24 nmol/mgprot, 东莨菪碱组 2.28 ± 0.20 U/nmol/mgprot, $P < 0.05$)。用连翘酯苷预处理后, 连翘酯苷 200、100mg/ml 组与东莨菪碱模型组相比均能显著提高老年小鼠的大脑皮层 10% 脑组织匀浆总蛋白含量 (连翘酯苷 100mg/ml 组 3.72 ± 0.37 mgprot/ml, 连翘酯苷 200mg/ml 组 3.72 ± 0.32 mgprot/ml, $P < 0.05$), 显著改善老年小鼠大脑皮层脑组织 AChE 活性升高 (连翘酯苷 100mg/ml 组 0.50 ± 0.09 U/mgprot, 连翘酯苷 200mg/ml 组 0.42 ± 0.15 U/mgprot, $P < 0.05$), 显著提高老年小鼠大脑皮层脑组织 SOD 活力

(连翘酯苷 100mg/ml 162.99±30.13U/mgprot,连翘酯苷 200mg/ml 组 171.84±17.80U/mgprot,P<0.05),显著降低高老年小鼠大脑皮层脑组织 MAO 活力(连翘酯苷 100mg/ml 组 4.55±0.30U/mgprot,连翘酯苷 200mg/ml 组 8.40±0.61U/mgprot, P<0.05) 及 MDA 含量(连翘酯苷 100mg/ml 组 1.68±0.51nmol/mgprot,连翘酯苷 200mg/ml 组 1.60±0.23nmol/mgprot, P<0.05)。

[0126] 表 8 连翘酯苷对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层脑组织总蛋白含量、MDA 含量、AChE、SOD、MAO 活性的影响

[0127]

组别	剂量 mg/kg	10%脑组织匀浆蛋 白含量 mgprot/ml	SOD U/mgprot	AChE U/mgprot	MDA nmol/mgprot	MAO U/mgprot
对照组		3.61±0.29	149.50±14.99	0.52±0.02	1.88±0.24	7.81±1.07
东莨菪碱	3	2.95±0.59#	135.09±5.58#	0.67±0.08#	2.28±0.20#	10.45±1.75#
连翘酯苷	100	3.72±0.37*	162.99±30.13*	0.50±0.09*	1.68±0.51*	4.55±0.30*
连翘酯苷	200	3.72±0.32*	171.84±17.80*	0.42±0.15*	1.60±0.23*	8.40±0.61*

[0128] 注 :n = 6 ;与对照组比较 :#P<0.05 ;与模型组比较 :*P<0.05

[0129] 连翘酯苷与多奈哌齐对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层 AChE 活性的影响实验结果见表 9(1)。结果表明东莨菪碱组与对照组相比显著升高老年小鼠大脑皮层脑组织 AChE 活性(对照组 0.51±0.05U/mgprot,东莨菪碱组 0.65±0.12U/mgprot,P<0.05)。用连翘酯苷与多奈哌齐预处理后,与东莨菪碱模型组相比均能显著降低老年小鼠大脑皮层脑组织 AChE 活性(连翘酯苷组 0.43±0.04U/mgprot,多奈哌齐组 0.45±0.04U/mgprot, P<0.05),且连翘酯苷组与阳性药多奈哌齐组相比逃避潜伏期无显著性差异。

[0130] 表 9(1) 连翘酯苷与多奈哌齐对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层脑组织 AChE 活性的影响

[0131]

组别	剂量 mg/kg	AChE U/mgprot
对照组	-	0.51±0.05
东莨菪碱	3	0.65±0.12#
多奈哌齐	3	0.43±0.04*
连翘酯苷	200	0.45±0.04*

[0132] 注 :n = 6 ;与对照组比较 :#P<0.05 ;与模型组比较 :*P<0.05

[0133] 连翘酯苷与多奈哌齐对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型海马脑组织 AChE 活性的影响实验结果见表 9(2)。结果表明东莨菪碱组与对照组相比显著升高老年小鼠大脑皮层脑组织 AChE 活性(对照组 0.61±0.04U/mgprot,东莨菪碱组 0.85±0.05U/mgprot,P<0.05)。用连翘酯苷与多奈哌齐预处理后,与东莨菪碱组相比均能显著降低老年小鼠大脑皮层脑组织 AChE 活性(连翘酯苷组 0.69±0.06U/mgprot,多奈哌齐组 0.67±0.05U/mgprot, P<0.05),且连翘酯苷组与阳性药多奈哌齐组相比逃避潜伏期无显著性差异。

[0134] 表 9(2) 连翘酯苷与多奈哌齐对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型海马脑组织 AChE 活性的影响

[0135]

组别	剂量 mg/kg	AChE U/mgprot
对照组	-	0.61±0.04
东莨菪碱	3	0.85±0.05#
多奈哌齐	3	0.67±0.05*
连翘酯苷	200	0.69±0.06*

[0136] 注 :n = 6 ;与对照组比较 :#P < 0.05 ;与模型组比较 :*P < 0.05

[0137] 连翘酯苷与维生素 E 对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层脑组织 SOD、MDA、MAO 活性的影响实验结果见表 10(1)。结果表明东莨菪碱组与对照组相比显著降低老年小鼠大脑皮层脑组织 SOD 活力 (对照组 265.25±25.81U/mgprot, 东莨菪碱组 213.24±29.54U/mgprot, P < 0.05), 显著提高老年小鼠大脑皮层脑组织 MAO 活力 (对照组 8.53±0.24U/mgprot, 东莨菪碱组 12.47±2.82U/mgprot, P < 0.05) 及 MDA 含量 (对照组 3.26±0.97nmol/mgprot, 东莨菪碱组 5.26±1.00nmol/mgprot, P < 0.05)。用连翘酯苷预与维生素 E 处理后, 与东莨菪碱模型组相比均能显著提高老年小鼠大脑皮层脑组织 SOD 活力 (连翘酯苷组 255.42±23.31U/mgprot, 维生素 E 组 262.20±18.03U/mgprot, P < 0.05), 显著降低高老年小鼠大脑皮层脑组织 MAO 活力 (连翘酯苷组 6.97±1.47U/mgprot, 维生素 E 组 3.07±0.52U/mgprot, P < 0.05) 及 MDA 含量 (连翘酯苷组 2.66±0.40nmol/mgprot, 维生素 E 组 2.61±0.29nmol/mgprot, P < 0.05), 且连翘酯苷组与阳性药维生素 E 组相比 SOD 活力及 MDA 含量无显著性差异。

[0138] 表 10(1) 连翘酯苷与维生素 E 对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层脑组织 MDA 含量、SOD、MAO 活性的影响

[0139]

组别	剂量 mg/kg	SOD U/mgprot	MDA nmol/mgprot	MAO U/mgprot
对照组	-	265.25±25.81	3.26±0.97	8.53±0.24
东莨菪碱	3	213.24±29.54#	5.26±1.00#	12.47±2.82#
维生素 E	100	262.20±18.03*	2.61±0.29*	3.07±0.52*
连翘酯苷	200	255.42±23.31*	2.66±0.40*	6.97±1.47*

[0140] 注 :n = 6 ;与对照组比较 :#P < 0.05 ;与模型组比较 :*P < 0.05

[0141] 连翘酯苷与维生素 E 对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型海马脑组织 SOD、MDA、MAO 活性的影响实验结果见表 10(2)。结果表明东莨菪碱组与对照组相比显著降低老年小鼠大脑皮层脑组织 SOD 活力 (对照组 247.78±28.14U/mgprot, 东莨菪碱组 193.25±13.55U/mgprot, P < 0.05), 显著提高老年小鼠大脑皮层脑组织 MAO 活力 (对照组 6.91±0.49U/mgprot, 东莨菪碱组 8.89±1.70U/mgprot, P < 0.05) 及 MDA 含量 (对照组 1.50±0.17nmol/mgprot, 东莨菪碱组 2.37±0.45nmol/mgprot, P < 0.05)。用连翘酯苷预与维生素 E 处理后, 与东莨菪碱模型组相比均能显著提高老年小鼠大脑皮层脑组织 SOD 活力 (连翘酯苷组 240.34±26.25U/mgprot, 维生素 E 组 232.17±16.62U/mgprot, P < 0.05), 显著降低高老年小鼠大脑皮层脑组织 MAO 活力 (连翘酯苷组 6.33±1.41U/mgprot, 维生素 E 组 3.73±0.91U/mgprot, P < 0.05) 及 MDA 含量 (连翘酯苷组 1.51±0.35nmol/mgprot, 维生素 E 组 1.40±0.26nmol/mgprot, P < 0.05), 且连翘酯苷组与阳性药维生素 E 组相比 SOD 活

力及 MDA 含量无显著性差异。

[0142] 表 10(2) 连翘酯苷与维生素 E 对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型海马脑组织 MDA 含量、SOD、MAO 活性的影响

[0143]

组别	剂量 mg/kg	SOD U/mgprot	MDA nmol/mgprot	MAO U/mgprot
对照组	-	247.78±28.14	1.50±0.17	6.91±0.49
东莨菪碱	3	193.25±13.55#	2.37±0.45#	8.89±1.70#
维生素 E	100	232.17±16.62*	1.40±0.26*	3.73±0.91*
连翘酯苷	200	240.34±26.25*	1.51±0.35*	6.33±1.41*

[0144] 注 :n = 6 ;与对照组比较 :#P < 0.05 ;与模型组比较 :*P < 0.05

[0145] 连翘酯苷与布洛芬对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层脑组织 TNF-α 及 IL-6 的影响实验结果见表 11。结果表明东莨菪碱组与对照组相比显著提高老年小鼠大脑皮层脑组织炎症因子 TNF-α (对照组 1272.86±110.91pg/ml, 东莨菪碱组 1577.14±260.38pg/ml, P < 0.05) 及 IL-6 含量 (对照组 399.68±38.85pg/ml, 东莨菪碱组 502.06±19.84pg/ml, P < 0.05)。用连翘酯苷与阳性药布洛芬预处理后,和东莨菪碱模型组相比能显著降低老年小鼠大脑皮层脑组织炎症因子 TNF-α (连翘酯苷组 1079.14±97.13pg/ml, 布洛芬组 1230.86±264.06pg/ml, P < 0.05) 及 IL-6 含量 (连翘酯苷组 444.41±30.98pg/ml, 布洛芬组 422.61±51.47pg/ml, P < 0.05), 且连翘酯苷组与阳性药布洛芬组相比炎症因子 TNF-α 及 IL-6 含量无显著性差异。

[0146] 表 11 连翘酯苷与布洛芬对东莨菪碱致老年小鼠损伤模型大脑皮层脑组织 TNF-α 及 IL-6 的影响

[0147]

组别	剂量 mg/kg	IL-6 pg/ml	TNF-α pg/ml
对照		399.68±38.85	1272.86±110.91
东莨菪碱	3	502.06±19.84#	1577.14±260.38#
布洛芬	62.5	422.61±51.47*	1230.86±264.06*
连翘酯苷	200	444.41±30.98*	1079.14±97.13*

[0148] 注 :n = 6 ;与对照组比较 :#P < 0.05 ;与模型组比较 :*P < 0.05

[0149] 上述实验结果表明连翘酯苷显著改善东莨菪碱致老年小鼠损伤模型的被动回避反应障碍及空间学习记忆障碍作用 (提高学习记忆功能的作用) 和提高其的大脑皮层脑组织总蛋白含量,降低炎症因子表达,降低大脑皮层及海马脑组织 AChE 活性,提高抗氧化能力有关。