

# 大孔吸附树脂法富集钩藤散中抗老年痴呆有效成分实验研究

郑肖熠<sup>1</sup>, 范征吟<sup>2</sup>

1. 宁波市镇海区招宝山街道社区卫生服务中心, 浙江 宁波 315200

2. 上海市中医医院内分泌科, 上海 200040

**[摘要]** 目的: 探讨钩藤散大孔吸附树脂法不同洗脱物抗老年痴呆(AD)的作用。方法: 采用大孔吸附树脂方法, 水、20%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇作为流动相依次对钩藤浸膏进行洗脱富集。60只大鼠中取10只设为对照组, 剩余大鼠通过A $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ <sub>1-40</sub>)注入大鼠脑室, 建立AD大鼠模型。将成功造模的大鼠分为水洗脱物组、20%乙醇洗脱物组、50%乙醇洗脱物组、70%乙醇洗脱物组、90%乙醇洗脱物组各10只, 将不同洗脱物分别予不同组AD大鼠给药, 给药20天后, 测定其电迷宫法行为学指标, 考察各洗脱物对AD大鼠的记忆改善情况。结果: 70%乙醇洗脱物组测试成绩与对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 提示钩藤70%乙醇洗脱物可以提升记忆能力, 具有治疗老年痴呆的作用; 其它洗脱物组大鼠行为测试成绩分别与对照组比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 提示其它洗脱物均不具有改善记忆的能力。结论: 大孔吸附树脂法可有效分离富集钩藤的抗老年痴呆成分, 70%乙醇洗脱物可有效改善记忆, 具有潜在的抗老年痴呆作用。

**[关键词]** 钩藤散; 老年痴呆症; 大孔吸附树脂

**[中图分类号]** R284

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0256-7415(2016)12-0214-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.12.090

## Experiment Study on Enrichment of Anti-AD Effective Component in Gouteng San with Macroporous Resin

ZHENG Xiaoyi, FAN Zhengyin

**Abstract:** Objective: To discuss the effect of different components in Gouteng san on resisting Alzheimer's disease(AD). Methods: By adopting the method of macroporous resin, water, 20% ethanol, 50% ethanol, 70% ethanol, 90% ethanol as mobile phase, elution and enrichment of Gouteng san were carried out in sequence.  $\beta$ -amyloid protein(A $\beta$ <sub>1-40</sub>) was injected into ventricles of rats, and the AD rat model was established. Rats in different groups were given extractions of each component. Another ten rats were set as the blank group without any treatment. After giving medicine for 20 days, determined their behavior indexes in the electric maze and inspected the effect of each component on improving AD rats' memory. Results: Experiment suggested that in the 70% of ethanol extraction group, compared test performance of the blank group, there were no significant difference( $P > 0.05$ ), which showed that Gouteng san extraction of 70% of ethanol can improve memory ability effectively and have an effect in treating AD. Rats' test performances in other groups were lower than those of normal rats ( $P < 0.05$ ), indicating that ethanol extractions of other gradients can not improve memory. Conclusion: Macroporous resin can effectively separate the anti-AD component in enriched Gouteng san. 70% of ethanol extraction can improve memory effectively and have the potential for resisting AD.

**Keywords:** Gouteng san; Alzheimer's disease; Macroporous resin

钩藤散是我国传统的中药复方, 君药为钩藤<sup>[1]</sup>。钩藤散有降低血压, 可治疗晕眩、头疼、脑梗死等疾病<sup>[2]</sup>。近年来, 研究证实钩藤散有治疗老年痴呆症的作用。在日本, 钩藤散已被用作老年痴呆常用治疗方剂<sup>[3]</sup>。目前研究认为, 发挥治疗老年

痴呆症的主要药物为其君药钩藤<sup>[3]</sup>。本研究通过大孔吸附树脂方法分离富集不同组分, 考察各个组分的抗老年痴呆作用<sup>[4]</sup>。

### 1 材料

1.1 中药 钩藤散由钩藤、麦冬、陈皮、半夏、茯苓、防风、

**[收稿日期]** 2016-06-25

**[作者简介]** 郑肖熠(1982-), 女, 主管中药师, 主要从事中医中药研究工作。

人参、生姜、甘草、石膏组成。本实验将主药钩藤用95%乙醇进行提取,过滤,蒸干溶剂,得钩藤浸膏,备用。将浸膏依次用水、20%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇洗脱,洗脱液蒸干,供药效选用。

1.2 动物 SD大鼠(220~240 g),共60只,雌雄各半,由上海中医药大学实验动物中心提供。适应饲养5天,供试。

1.3 试剂及仪器 兔抗A $\beta$ -淀粉样蛋白单克隆抗体,乙醇(分析纯,国药集团),水,AB-8型大孔吸附树脂(国药集团)。真空旋转蒸发器,恒温水浴锅,分析天平,注射器,医用型净化工作台,鼠脑立体定位仪。

## 2 方法

2.1 样品溶液的制备 称取钩藤粗粉1000 g,加入2000 mL的95%乙醇,回流提取2 h,提取液过滤,滤液减压蒸馏,蒸干溶剂,真空干燥箱内干燥12 h,备用。

2.2 大孔吸附树脂预处理 AB-8型大孔吸附树脂加水漂洗,洗去白色浑浊物,加入95%乙醇浸泡24 h,使其充分溶胀,装柱,以蒸馏水作为流动相,持续冲洗,至流出液无醇味为止,用5%氢氧化钠溶液洗至弱碱性,浸泡5 h,以蒸馏水洗至中性,再用5%盐酸溶液洗至酸性,浸泡5 h,蒸馏水洗至中性。

2.3 吸附洗脱 样品钩藤浸膏用水溶解,湿法上样。分别用水、20%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇洗脱,每一组份以半个柱体积为一瓶,洗4个柱体积为止。分别收集洗脱液,减压蒸馏,得各个组分粗提物。

2.4 动物分组 将SD大鼠随机分为6组,每组10只,雌雄各半,5组设为模型组,1组设为空白对照组。

2.5 A $\beta$ <sub>1-40</sub>的孵育 A $\beta$ <sub>1-40</sub>使用生理盐水稀释至2 mg/L,37℃下孵育5天,使其成为凝聚态。

2.6 老年痴呆模型的复制 将模型组大鼠麻醉后固定于鼠脑立体定位仪,向大鼠左侧海马区注入凝聚态A $\beta$ <sub>1-40</sub> 5  $\mu$ L,留针5 min,使其充分弥散,然后缓慢撤针,封好颅骨,消炎,缝合伤口。空白对照组采用同样方法,注入等量生理盐水。术后动物单笼饲养,连续4天肌注青霉素,防止感染。

2.7 动物给药 大鼠造模1周后,开始给药,将模型组大鼠分为水洗脱组,20%乙醇洗脱组,50%乙醇洗脱组,70%乙醇洗脱组,90%乙醇洗脱组。不同模型组大鼠采用粗提物(5 g/kg)给药,空白对照组每天给等体积的蒸馏水,每天1次,每次20 mL/kg,给药20天。

2.8 电迷宫法行为学测试 给药20天后,进行电迷宫法行为学实验。首先,将大鼠放入臂起步区停留3 min后给予电击(35V),按→→→连续训练。a项:大鼠到达安全区停留1 min,然后取出放回臂,1.5 min后给予电击,达到连续2次直接逃至安全区后,以逃入的安全区作为起步区进行电击训练。当大鼠在臂可以到连续2次直接逃至安全区后,进行b项试验。b项:大鼠在臂起步区停留1.5 min后给予

电击,逃至安全区停留1 min,再以此区作为起步区予以电击,连续循环电击训练(每2次电击之间休息1.5 min),以大鼠连续10次(或9/10)正确反应(直接逃入安全区)作为空间辨别记忆指标,每回连续学习的电击总次数一般不超过30次。最后将a项和b项相加作为训练成绩,统计学习成绩。

## 3 统计学方法

所有数据均采用SPSS18.0软件统计工具进行处理。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )进行表示,各组间比较采用成组设计比较t检验。

## 4 结果

对照组测试成绩最优(24.85 $\pm$ 6.23)次,记忆能力最好;在实验组中,70%乙醇洗脱组(27.23 $\pm$ 5.12)次与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),提示70%洗脱组的钩藤组分可以有效抑制老年痴呆症状,具有一定的改善记忆能力和抗痴呆的作用。

在其它组分中,与对照组比较,测试成绩差距较大,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示在此洗脱剂中的钩藤组分不具有或者较差的抗老年痴呆的作用。

表1 钩藤不同洗脱物对老年痴呆大鼠的记忆影响作用

组别	动物数(只)	剂量(g/kg)	测试成绩(次)	P值
水洗脱组	10	5	34.84 $\pm$ 5.23	0.0011
20%乙醇洗脱组	10	5	35.33 $\pm$ 4.87	0.0005
50%乙醇洗脱组	10	5	33.89 $\pm$ 6.12	0.0026
70%乙醇洗脱组	10	5	27.23 $\pm$ 5.12	0.3500
90%乙醇洗脱组	10	5	32.57 $\pm$ 4.98	0.0090
对照组	10	20 mL	24.85 $\pm$ 6.23	

注:P值均为与对照组比较数据

## 5 讨论

中草药提取有效组分的常用方法有醇提水沉法、溶剂萃取法、大孔吸附树脂吸附法、聚酰胺柱层析,制备液相分离法等<sup>[5]</sup>。其中大孔吸附树脂吸附方法优势较为明显,大孔吸附树脂成本较低,操作简单,污染较小,溶剂可以回收套用,不吸潮,易制成各种剂型<sup>[6]</sup>。在本课题研究中,采用AB-8型大孔吸附树脂对钩藤的醇提物进行初步分离,进行抗老年痴呆作用的研究<sup>[7]</sup>。该型树脂主要成分为聚苯乙烯,比表面积较大,孔径较大,洗脱容易。对有机溶剂耐受较好,在弱酸和弱碱中稳定,可重复循环使用。在洗脱液选择上,用水和乙醇不同比例配比洗脱,从极性较大,洗脱能力弱的水开始洗脱,最后使用极性小,洗脱能力强的90%乙醇进行洗脱<sup>[8]</sup>。研究发现,此种洗脱方法的设定,可以将钩藤中不同的化学成分进行较好的分离,达到理想的效果。

A $\beta$ -淀粉样蛋白是氨基酸残基短肽,是造成老年痴呆的关键因素<sup>[9]</sup>。研究证实,侧脑室注射大剂量的A $\beta$ 会引起学习记忆功能的下降。使用A $\beta$ 进行老年痴呆症动物模型的建立,具有周期短,操作性强等特点,逐步受到国内外抗老年痴呆研

究人员的青睐<sup>[10]</sup>。其主要注射在动物脑部的海马, 脑室两处。其中, 本文选择将抗体直接注入大鼠脑室中, 经脑室弥漫至整个脑部, 更接近于实际作用过程, 是抗老年痴呆药物临床前评价的重要手段<sup>[11]</sup>。

钩藤散是由多种中药组成的复方制剂, 具有清热平肝, 熄风止痉等作用, 临床上主要用头晕、中风、癫痫等疾病。近年来, 大量研究证实钩藤散具有抗老年痴呆的作用。其可以提高脑脂数和抗氧化酶能力, 有效清除脂质过氧化物和其代谢产物, 抑制单胺氧化酶, 维持一氧化氮正常水平, 能够改善脑血流量, 以抗高血压, 消除自由基和抗兴奋性中毒等途径发挥抗老年痴呆作用<sup>[12-13]</sup>。目前研究认为, 在钩藤散复方制剂中, 发挥抗老年痴呆作用的主要物质是其君药钩藤。因此, 本研究通过大孔吸附树脂方法对钩藤浸膏进行分离, 富集。实验表明, 在 70% 的乙醇洗脱的提取物实验组与正常大鼠的对照组相比, 差异有统计学意义( $P>0.05$ ), 对大鼠记忆能力改善效果较好; 在其它实验组中, 与对照组比较, 大鼠的记忆能力较差, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 提示其它梯度的乙醇提取液中没有抗老年痴呆的有效成分。这提示大孔吸附树脂可以富集抗老年痴呆的有效成分。

本课题表明钩藤的 70% 乙醇提取物具有一定改善记忆能力和抗老年痴呆作用, 但其具体的化学成分以及抗老年痴呆的分子机制仍需进一步探讨。

#### [参考文献]

- [1] 齐元富. 钩藤散研究进展[J]. 国外医学: 中医中药分册, 1998(6): 8- 11.
- [2] 黄厚才. 钩藤散浸膏治疗鼠实验性老年痴呆及作用机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [3] 黄厚才, 胡元亮, 胡春萍, 等. 钩藤散对 D- 半乳糖所致衰老模型小鼠相关指标的影响[J]. 畜牧与兽医, 2007, 39(1): 44- 46.
- [4] 李厚兵, 任爱农, 邹义芳. 大孔吸附树脂纯化野菊花多糖工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 49- 53.
- [5] 高萍, 杨国林. 大孔吸附树脂在天然药物分离纯化中的应用[J]. 天津药学, 2006, 18(2): 63- 66.
- [6] 徐先祥, 夏伦祝. 大孔吸附树脂分离纯化威灵仙总皂苷的工艺研究[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1): 57- 59.
- [7] 郭丽冰, 王蕾. 常用大孔吸附树脂的主要参数和应用情况[J]. 中国现代中药, 2006, 8(4): 26- 32.
- [8] 何彦峰, 杨仁明, 胡娜, 等. 大孔吸附树脂纯化枸杞总黄酮的研究[J]. 食品工业科技, 2012(18): 274- 278.
- [9] Bin ZA, Mikheev A, Srivatsa N, et al. Accelerated Brain Atrophy on Serial Computed Tomography: Potential Marker of the Progression of Alzheimer Disease [J]. J Comput Assist Tomogr, 2016, 40 (5): 827- 832.
- [10] Pistollato F, Ohayon EL, Lam A, et al. Alzheimer disease research in the 21st century: past and current failures, new perspectives and funding priorities [J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 38999- 39016.
- [11] Kim MJ, Seo SW, Kim ST, et al. Diffusion Tensor Changes According to Age at Onset and Apolipoprotein E Genotype in Alzheimer Disease [J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2016, 34(7): 6523- 6640.
- [12] 黄厚才, 钟荣玲, 曹鹏, 等. 钩藤散对 Aβ1-3 所致老年痴呆模型鼠的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(5): 553- 556.
- [13] 黄厚才, 彭蕴茹, 丁永芳, 等. 钩藤散对麻醉犬脑血流量的影响[J]. 实验动物科学, 2007, 24(3): 17- 19.

(责任编辑: 刘淑婷)