

本文引用: 龙伽雯, 侯凤飞, 曾贵荣, 戴鑫汶, 周融融, 徐琳本, 李跃辉. 不同工艺的银苓通脉健脑颗粒对大鼠血管性痴呆模型定位航行的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(2): 220–227.

## 不同工艺的银苓通脉健脑颗粒对大鼠血管性痴呆模型定位航行的影响

龙伽雯<sup>1,2</sup>, 侯凤飞<sup>3</sup>, 曾贵荣<sup>4</sup>, 戴鑫汶<sup>3</sup>, 周融融<sup>2</sup>, 徐琳本<sup>2</sup>, 李跃辉<sup>1,2\*</sup>

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013; 3. 湖南补天药业股份有限公司, 湖南 怀化 418400; 4. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司, 湖南 长沙 410003

**〔摘要〕** **目的** 本实验采用改良双血管阻断法建立大鼠血管性痴呆(VD)模型, 比较不同提取工艺银苓通脉健脑颗粒对 VD 模型大鼠的治疗作用, 筛选出更佳药效作用的提取工艺路线, 为新药研发提供依据。**方法** 采用 HPLC 建立莫诺昔、马钱苷含量测定方法, 检测样品中莫诺昔、马钱苷含量。采用大鼠双侧颈部血管结扎法(2-VO)建立 VD 模型, 分别设置正常对照组、假手术组、模型对照组、多奈哌齐组以及 3 个不同工艺样品组。采用 Morris 水迷宫实验观察各组定位航行潜伏期、穿越平台次数; 采用 HE 染色与尼氏染色观察大鼠海马组织病理形态学变化。**结果** 莫诺昔、马钱苷的回归方程分别为  $Y=17.431X+5.369$ ,  $r=1$ ;  $Y=16.035X+9.730$ ,  $r=0.999$ 。分别在 18.55~185.47  $\mu\text{g/mL}$ 、19.38~193.84  $\mu\text{g/mL}$  范围内具有良好的线性关系。精密度、重复性、加样回收率均较好(RSD 均小于 3%), 阴性样品无干扰, 3 个样品莫诺昔、马钱苷含量之和分别为: 6.93、6.87、5.96 mg/g。Morris 水迷宫实验结果显示, 与模型对照组比较, 工艺②、③号样组大鼠定位航行第 3、第 4 天潜伏期增加( $P\leq 0.05$ ), 工艺②号样能显著增加大鼠穿越平台次数; HE 染色结果显示工艺②号样组大鼠海马组织部分海马锥体细胞排列紧密; 少量细胞间质水肿; 尼氏染色结果显示, 与模型对照组比较, 工艺②号样组大鼠海马组织 CA1 区尼氏小体数量明显增加。**结论** 工艺②号样的药效最佳, 为银苓通脉健脑颗粒新药研发的制备工艺提供了实验数据。

**〔关键词〕** 银苓通脉健脑颗粒; 提取工艺; 血管性痴呆; 莫诺昔; 马钱苷

**〔中图分类号〕** R285.5

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.02.005

## Effects of Yinling Tongmai Jiannao Granule prepared by different processes on spatial navigation ability in rat models of vascular dementia

LONG Jiawen<sup>1,2</sup>, HOU Fengfei<sup>3</sup>, ZENG Guirong<sup>4</sup>, DAI Xinwen<sup>3</sup>, ZHOU Rongrong<sup>2</sup>, XU Linben<sup>2</sup>, LI Yuehui<sup>1,2\*</sup>

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410013, China; 3. Hunan Butian Pharmaceutical Co., LTD., Huaihua, Hunan 418400, China; 4. Hunan Prima Pharmaceutical Research Center Co., LTD., Changsha, Hunan 410003, China

**〔Abstract〕** **Objective** To compare the therapeutic effects of Yinling Tongmai Jiannao Granule prepared by different extraction processes on rat models of vascular dementia (VD) established by modified two-vessel occlusion method, and identify the optimal extraction process route with better pharmacological efficacy, so as to provide a basis for new drug development. **Methods** An HPLC method was established for the determination of morroniside and loganin content in the samples. The VD model was

**〔收稿日期〕** 2024-07-08

**〔基金项目〕** 湖南省自然科学基金项目(2024JJ7292); 湖南省科技厅科技创新引领计划(2020SK2051); 湘卫函[2024]43 号(青年骨干人才); 湘中医药[2024]3 号(骨干人才)。

**〔通信作者〕** \*李跃辉, 女, 研究员, 硕士研究生导师, E-mail: 410256518@qq.com。

established using the two-vessel occlusion (2-VO) method in rats. Groups were set up including a normal control group, a sham-operated group, a model control group, a donepezil group, and three groups receiving different processing samples (sample 1 group, sample 2 group, and sample 3 group). The Morris water maze test was employed to observe the latency to find the platform and the number of platform crossings in each group. Additionally, HE staining and Nissl staining were performed to observe the histopathological changes in hippocampal tissue of rats. **Results** The regression equations for morroniside and loganin were  $Y=17.431X+5.3694$ ,  $r=1$ , and  $Y=16.035X+9.7304$ ,  $r=0.9999$ , respectively, demonstrating good linearity within the ranges of 18.55–185.47  $\mu\text{g/ml}$  and 19.38–193.84  $\mu\text{g/mL}$ . The precision, repeatability, and recovery rates were good ( $\text{RSD}<3\%$  for all), with no interference from negative samples. The total content of morroniside and loganin in the three samples was 6.93 mg/g, 6.87 mg/g, and 5.96 mg/g, respectively. The results of Morris water maze test showed that compared with the model control group, the latency to locate the platform on the third and fourth days increased in rats of sample 2 and sample 3 groups ( $P\leq 0.05$ ), with sample 2 group showing a notable increase in the number of platform crossings. HE staining showed that some hippocampal pyramidal cells in the hippocampus of rats of sample 2 group were tightly arranged with slight interstitial edema. Nissl staining revealed a significant increase in the number of Nissl bodies in the CA1 region of the hippocampus in rats of sample 2 group compared with the model control group. **Conclusion** The processed sample 2 exhibited the best therapeutic effects, providing experimental data for the preparation process of Yinling Tongmai Jiannao Granule in new drug research and development.

〔**Keywords**〕 Yinling Tongmai Jiannao Granule; extraction process; vascular dementia; morroniside; loganin

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是指各种类型的脑血管疾病及其相关风险因素导致的且以痴呆为主要临床表现的重度认知障碍综合征, 被认为是年龄相关性痴呆的第二种常见形式, 在 60 岁以上人群中, VD 患病率为 1.26%~2.40%, 占所有痴呆病因的 12%~20%, 症状主要是由脑血流不足导致的脑损伤引起<sup>[1-5]</sup>。近年来, 中医药治疗 VD 备受关注, 《中成药治疗血管性痴呆临床应用指南 (2020 年)》指出: “中成药已成为我国治疗血管性痴呆的选择之一。”<sup>[6]</sup>

银苓通脉健脑是在公司独家专利药品“复方银杏通脉口服液”处方基础上进行药味加减, 所组成新的处方, 由酒山茱萸、银杏叶、女贞子、丹参、姜黄、石菖蒲、川芎、山腊梅叶、当归等 12 味中药组成。全方诸药相合, 共奏补肾养肝、健脑益智、化瘀通脉之效, 适用于 VD 肝肾亏虚、瘀血阻络证者。中医学认为, VD 发病部位在脑, 且与心、肝、肾等脏器密切相关。脑为髓海, 为肾精所化生, 肾为先天之本, 主藏精生髓, 精气充足则可髓足脑充, 脑功能才得以正常运转<sup>[7-8]</sup>。VD 的核心病机是肾精不足、痰浊内阻、瘀血阻滞, 日久损髓伤脑, 可通过补肾法改善脑血流动力学、保护及修复神经、抗氧化应激和炎症反应来治疗 VD<sup>[9]</sup>。方中的君药酒山茱萸作为山茱萸的炮制品,

药典规定含量测定的指标成分为莫诺昔、马钱昔, 并有研究发现该两种成分能改善 VD 大鼠的学习记忆能力和病理损伤, 降低脑组织细胞凋亡率和自由基水平, 抑制线粒体凋亡通路蛋白表达<sup>[10]</sup>。处方中的莫诺昔和马钱昔作为主要的药效物质基础, 并作为指标考察银苓通脉健脑颗粒的提取工艺。

清代徐灵胎在《医学源流论》中曰: “煎药之法, 最宜深讲, 药之效不效, 全在乎此。”中药复方的疗效与其提取方法密切相关, 不同的提取工艺, 其有效成分组成亦会不同, 可能会呈现不一样的药效作用<sup>[11]</sup>。因此, 为了筛选出更佳药效作用的提取工艺, 本实验拟采用大鼠双侧颈部血管结扎 (two-vessel occlusion, 2-VO) 建立 VD 模型, 研究不同提取工艺下银苓通脉健脑颗粒对该模型的治疗作用, 为银苓通脉健脑颗粒的制备工艺以及临床研究提供实验依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 80 只, 雄性, 体质量 180~220 g, 购于长沙市天勤生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (湘) 2019-0014; 质量合格证: 430726221100014685, 在湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏障环境 D 区饲养, 实验动物使用许可证

号:SYXK(湘)2020-0015。

## 1.2 试药

异氟烷(批号:20201201,山东安特牧业科技有限公司产品)。注射用青霉素钠(批号:F0042309,规格:160 万 U/瓶,性状:白色粉剂,华北制药股份有限公司产品)。盐酸多奈哌齐片(批号:20210204,浙江华海药业股份有限公司产品)。莫诺昔对照品(批号:111998-202104,中国食品药品检定研究院提供),马钱苷对照品(批号:111640-201804,中国食品药品检定研究院提供)。

## 1.3 仪器

Morris 水迷宫(成都泰盟科技有限公司产品);EG1150H+C 型组织包埋机、RM2235 型石蜡切片机、DM2000 型生物显微镜均购自 Leica 公司;UltiMate 3000-DAD 型高效液相色谱仪(赛默飞);XPE105 型电子分析天平(METTLER TOLEDO)。

# 2 方法

## 2.1 样品制备

本品处方由酒山茱萸、银杏叶、女贞子、丹参、姜黄、石菖蒲、川芎、山腊梅叶、当归等 12 味组成,按 5 倍日用处方量称取各饮片,按以下工艺制备样品(各工艺处方药味及剂量完全一致)。

工艺①号样:酒山茱萸、银杏叶等 12 味药全部水煮两次,第 1 次加适量水,煎煮 2 h;第 2 次加适量水,煎煮 1.5 h,合并煎煮液,浓缩至约 1.2 以上密度的稠膏。每 1 g 稠膏相当于生药 1.9738 g。

工艺②号样:处方 12 味药,其中石菖蒲、姜黄、川芎加适量水,蒸馏提取挥发油 5 h,收集油, $\beta$ -CD 包合,包合物碾细,备用;药液滤过,滤液备用,药渣再加适量水煮 0.5 h,滤过,合并滤液备用;其余酒山茱萸肉、银杏叶等 9 味加水煎煮两次,第 1 次加适量水,煎煮 2 h;第 2 次加适量水,煎煮 1.5 h,滤过,滤液与提取挥发油后的滤液合并,浓缩至约 1.2 以上密度的稠膏,加入  $\beta$ -CD 包合物。每 1 g 稠膏相当于生药 2.0206 g。

工艺③号样:处方 12 味药,其中银杏叶、女贞子、丹参、姜黄加 70%乙醇提两次,第 1 次加适量水,回流 2 h;第 2 次加适量水,回流 1.5 h,合并,回收乙醇,酒山茱萸等其余 8 味水煮两次,第 1 次加适

量水煎煮 2 h,第 2 次加入醇提后药渣,加适量水煎煮 1 次,浓缩,与醇浸膏合并,浓缩至约 1.2 以上密度的稠膏。每 1 g 稠膏相当于生药 1.907 3 g。

## 2.2 动物分组及模型建立

选取检疫合格的雄性 SD 大鼠 80 只,体质量 220~250 g,随机选取 8 只大鼠作为正常对照组,8 只作为假手术组,其余大鼠采用改良 2-VO 法建立大鼠 VD 模型。具体方法为:大鼠采用异氟烷吸入麻醉后,分离右侧颈总动脉,于近心端和远心端血管两端结扎,从结扎中心剪断颈总动脉,分层缝合并以青霉素 40 万 U/只肌肉注射预防感染,6 d 后以同样方法处理左侧颈总动脉。假手术组大鼠不结扎及剪断颈总动脉,其余操作步骤同手术造模。模型建立 6 周后选取存活的造模大鼠 40 只随机分为:模型对照组、多奈哌齐组(0.9 mg/kg)、工艺①号样组(4.95 g 生药/kg)、工艺②号样组(4.95 g 生药/kg)、工艺③号样组(4.95 g 生药/kg),每组 8 只。正常对照组和假手术组分别灌胃给予纯水,其余各组分别灌胃给予相应药液,给药体积为 10 mL/kg,1 次/d,连续给药 6 周,大鼠全部存活,大鼠毛发及体重变化不显著。

## 2.3 水迷宫实验

末次给药后各组大鼠分别进行水迷宫检测,首先进行定位航行训练,历时 4 d。将平台固定于第 2 象限的中央,水池中注入自来水,倒入白色染料使平台不可见,水位高于平台 1.0 cm。水温稳定在(25 $\pm$ 1)  $^{\circ}$ C。每天每只动物测试 1 次,测试前先将动物放在平台上适应 10 s,随机选取 3 个入水点,检测 60 s,若成功找到平台则让其在平台上停留 10 s 再归笼,若未找到平台则引导动物至平台,停留 10 s。记录动物找到平台的时间(逃避潜伏期/总时间)、游泳总路程、平均速度等指标评价大鼠学习记忆能力。第 5 天进行空间探索,检测动物穿过平台次数等指标。

## 2.4 HE 染色和尼氏染色检测

各组大鼠异氟烷麻醉,解剖取脑组织置于 10% 福尔马林中固定,进行 HE 染色和尼氏染色,观察皮质和海马 CA1 区神经细胞形态、排列、凋亡及微血管等形态学特征。

## 2.5 含量测定方法建立

2.5.1 色谱条件 色谱柱:Sepax Bio-C<sub>18</sub>(250 mm $\times$

4.6 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱; 流动相: 乙腈-0.3% 磷酸溶液, 进行梯度洗脱(0~20 min, 7% 乙腈; 20~50 min, 7%→20% 乙腈); 检测波长: 240 nm; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10  $\mu$ L; 柱温: 35  $^{\circ}$ C。

2.5.2 对照品溶液制备 取莫诺苷对照品、马钱苷对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇制成每 1 mL 各含 50  $\mu$ g 的混合对照品溶液, 即得。

2.5.3 供试品溶液制备 取本品约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 80% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.5.4 方法学考察 (1) 专属性实验: 精密供试品溶液、阴性样品溶液、对照品溶液各 10  $\mu$ L, 分别注入液相色谱仪中测定, 阴性样品在与对照品色谱峰相应位置无相应的峰, 说明阴性无干扰。(2) 精密度: 取本品适量(批号: 20220801), 研细, 取约 1 g, 精密称定, 同供试品溶液制备方法制备, 精密吸取同一份供试品溶液 10  $\mu$ L, 色谱条件下进样, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算 RSD 值。(3) 线性范围: 将对照品溶液分别稀释到相应的浓度, 色谱条件下进样测定, 记录色谱峰面积, 以各对照品的峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X)进行线性回归。(4) 重复性: 取同一批号样品适量(批号: 20220801), 研细, 取 6 份, 每份取约 1 g, 精密称定, 同供试品溶液制备方法制备, 色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算含量并计算 RSD 值。(5) 稳定性: 取本品适量(批号: 20220801), 研细, 取约 1 g, 精密称定, 同供试品溶液制备方法制备, 分别于 0、4、8、12、16、20、24、30、36、42、48 h 进样 10  $\mu$ L, 测定峰面积并计算 RSD 值。(6) 加样回收率: 取同一批(已知莫诺苷、马钱苷含量)样品, 共 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 每份分别加入适量的莫诺苷、马钱苷对照品, 按供试品制备方法制备供试品溶液, 按色谱条件进样, 计算加样回收率。(7) 3 批样品含量测定: 按照供试品溶液的制备方法处理, 测定 3 批成品中莫诺苷、马钱苷的含量。

## 2.6 统计学分析

本试验数据有效数字修约按照四舍五入进行, 数据分析采用统计学软件 SPSS 23.0。计量资料以

“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 用 *Leven's test* 方法检验正态性和方差齐性。统计结果以  $\alpha=0.05$  为检验界限, 其中以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 不同提取工艺样品莫诺苷、马钱苷含量

为比较 3 种不同制备工艺中莫诺苷、马钱苷的含量, 对其进行测定, 按上述条件进行方法学考察, 其专属性结果表明, 阴性样品在与对照品色谱峰相应位置无相应的峰, 说明阴性无干扰。精密度结果表明, 莫诺苷、马钱苷的 RSD 值均小于 3%, 表明精密度良好。莫诺苷、马钱苷的回归方程分别为  $Y=17.431X+5.3694$ ,  $r=1$ 。  $Y=16.035X+9.7304$ ,  $r=0.9999$ , 结果表明莫诺苷、马钱苷分别在 18.55~185.47  $\mu$ g/mL、19.38~193.84  $\mu$ g/mL 范围内具有良好的线性关系。重复性结果表明, 6 份样品莫诺苷含量平均值为 1.94 mg/g, 马钱苷含量平均值为 1.16 mg/g, RSD 为 1.03%, 说明方法重复性较好。稳定性结果表明, 莫诺苷 RSD 为 0.25%, 马钱苷 RSD 为 0.18%, 表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。加样回收率结果表明, 莫诺苷平均回收率为 101.99%, RSD 为 2.9%; 马钱苷平均回收率为 101%, RSD 为 1.69%, RSD 均小于 3%, 说明本方法加样回收率较好, 详见图 1。含量测定结果如图 2 所示, 工艺①、②号样品较工艺③样品较高。通过含量测定法测定 3 种不同提取工艺中莫诺苷、马钱苷的含量, 结果显示①、②号样品的提取工艺更优, 旨在说明工艺不同的制备工艺对莫诺苷、马钱苷的含量有差异。

### 3.2 不同工艺的银苓通脉健脑颗粒对大鼠 VD 模型定位航行的影响

与正常对照组比较, 模型对照组大鼠定位航行第 1、第 2 天潜伏期无显著差异, 定位航行第 3、第 4 天潜伏期显著增加( $P<0.01$ ); 与模型对照组比较, 工艺②、③号样组大鼠定位航行第 3、第 4 天潜伏期显著减少( $P<0.05$ ), 盐酸多奈哌齐组大鼠定位航行第 3、第 4 天潜伏期减少( $P<0.01$ )。详见图 3 和表 1。

### 3.3 银苓通脉健脑颗粒不同工艺对大鼠 VD 模型空间探索的影响

与正常对照组比较, 模型对照组大鼠穿越平台

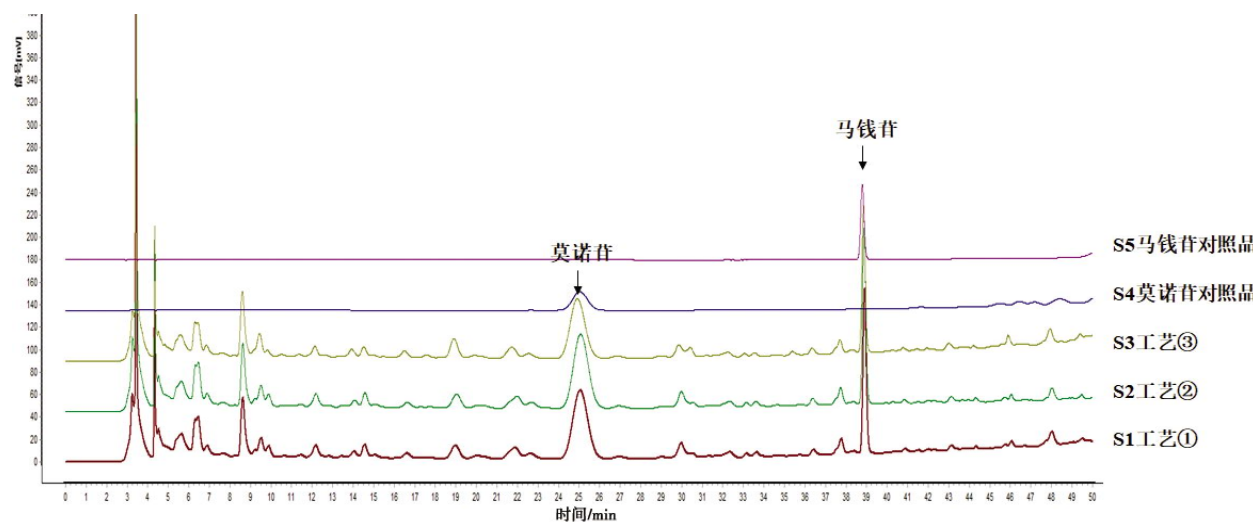


图 1 不同制备工艺银苓通脉健脑颗粒 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatograms of Yinling Tongmai Jiannao Granule prepared by different processes

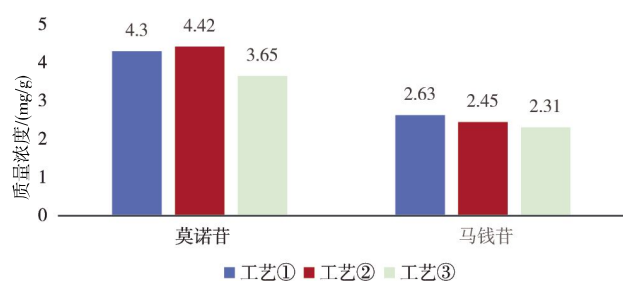


图 2 不同工艺提取样品中莫诺昔、马钱苷含量

Fig.2 Content of morroniside and logenin in samples extracted using different processes

次数显著减少( $P<0.01$ )。与模型对照组比较,工艺②号样组大鼠穿越平台次数显著增加( $P<0.01$ ),盐酸多奈哌齐组大鼠穿越平台次数显著增加 ( $P<0.01$ )。详见表 2。

表 1 不同工艺的银苓通脉健脑颗粒对大鼠 VD 模型定位航行的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 1 Effects of Yinling Tongmai Jiannao Granule prepared by different processes on spatial navigation ability in rat models of VD ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

| 组别      | 剂量/<br>(g·kg <sup>-1</sup> ) | 潜伏期/s    |          |                         |                         |
|---------|------------------------------|----------|----------|-------------------------|-------------------------|
|         |                              | 第 1 天    | 第 2 天    | 第 3 天                   | 第 4 天                   |
| 正常对照组   | —                            | 54.2±2.1 | 25.1±4.3 | 19.8±3.6                | 17.9±3.0                |
| 假手术组    | —                            | 49.6±3.0 | 25.0±4.2 | 17.7±3.0                | 17.9±2.7                |
| 模型对照组   | —                            | 48.4±3.8 | 32.2±4.3 | 36.0±4.2 <sup>###</sup> | 40.2±4.3 <sup>###</sup> |
| 盐酸多奈哌齐组 | 0.000 9                      | 48.7±4.0 | 26.8±4.3 | 16.0±2.4*               | 21.8±3.2 <sup>###</sup> |
| 工艺①号样组  | 4.95                         | 46.7±3.5 | 24.1±3.7 | 27.9±4.5                | 29.8±4.6                |
| 工艺②号样组  | 4.95                         | 45.6±3.1 | 29.7±4.2 | 25.8±4.4*               | 26.4±3.5*               |
| 工艺③号样组  | 4.95                         | 53.4±2.9 | 31.0±4.6 | 21.0±3.1*               | 26.6±4.4*               |

注:与正常对照组比较,\* $P<0.01$ ;与假手术组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型对照组比较,\* $P<0.05$ 。

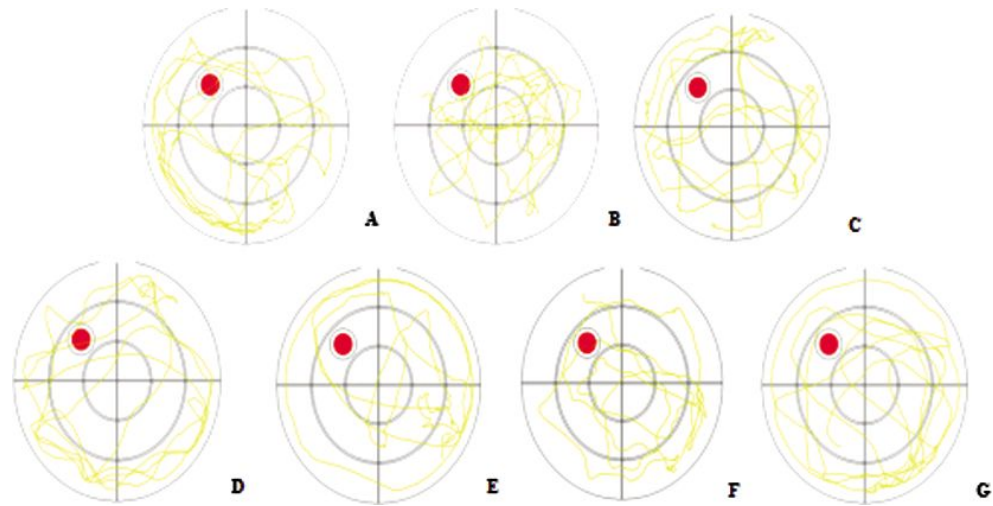


图 3 Morris 水迷宫轨迹图

Fig.3 Trajectory diagram of Morris water maze

注:A.正常对照组;B.假手术组;C.模型对照组;D.多奈哌齐组;E.工艺①号样组;F.工艺②号样组;G.工艺③号样组。

表 2 银苓通脉健脑颗粒不同工艺对大鼠 VD 模型空间探索的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

**Table 2** Effects of different preparation processes of Yinling Tongmai Jiannao Granule on spatial exploration in rat models of VD ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

| 组别      | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | 穿越平台次数/次                 |
|---------|--------------------------|--------------------------|
| 正常对照组   | —                        | 1.38±0.50                |
| 假手术组    | —                        | 1.88±0.48                |
| 模型对照组   | —                        | 0.25±0.16 <sup>***</sup> |
| 盐酸多奈哌齐组 | 0.000 9                  | 1.38±0.26**              |
| 工艺①号样组  | 4.95                     | 0.63±0.26                |
| 工艺②号样组  | 4.95                     | 1.25±0.71**              |
| 工艺③号样组  | 4.95                     | 0.75±0.31                |

注:与正常对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与假手术组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型对照组比较,\*\* $P<0.01$ 。

3.4 银苓通脉健脑颗粒不同工艺对大鼠皮质和海马组织病理学的影响

正常对照组、假手术组大鼠海马组织可见神经

元形态、胶质细胞、海马锥体细胞未见异常;模型对照组大鼠海马组织可见部分锥体细胞排列稀疏紊乱、部分锥体细胞坏死、间质水肿。工艺①、③号样组大鼠海马组织可见部分锥体细胞排列紊乱、间质水肿;工艺②号样组大鼠海马组织部分海马锥体细胞排列紧密;少量胞间质水肿。盐酸多奈哌齐组大鼠海马组织可见海马锥体细胞排列紧密,少量胞间质水肿。详见图 4。

正常对照组、假手术组大鼠海马 CA1 区神经细胞排列紧密,神经元胞内尼氏体染色清晰,且数量较多。模型组小鼠海马 CA1 区神经细胞排列疏松且部分神经元胞内尼氏体减少或消失。与模型对照组比较,工艺②号样组大鼠海马组织 CA1 区尼氏小体数量明显增加。详见图 5。

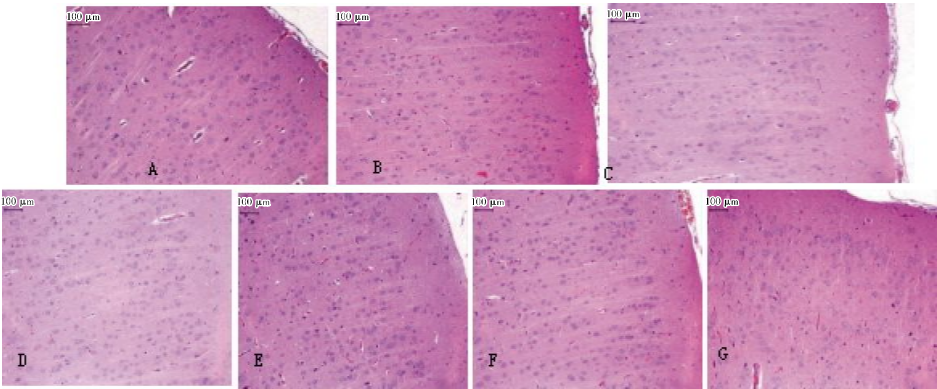


图 4 银苓通脉健脑颗粒不同工艺对大鼠皮质组织病理学检查(HE,×100)

**Fig.4** Histopathological examination of rat cortical tissue following administration of Yinling Tongmai Jiannao Granule prepared by different processes (HE,×100)

注:A.正常对照组;B.假手术组;C.模型对照组;D.多奈哌齐组;E.工艺①号样组;F.工艺②号样组;G.工艺③号样组。

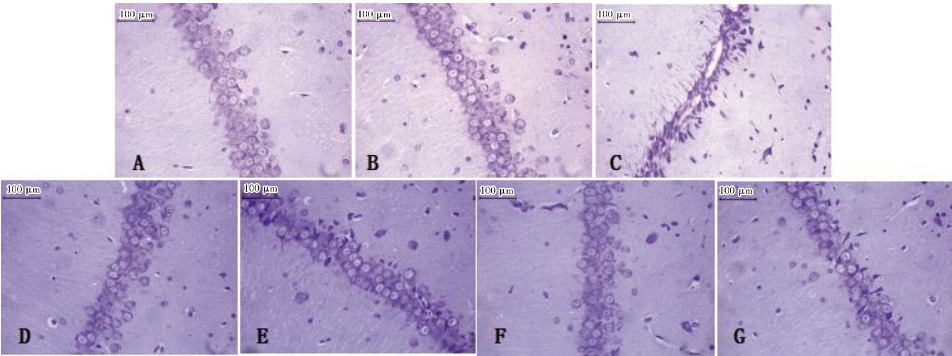


图 5 银苓通脉健脑颗粒不同工艺对大鼠海马组织病理学检查(尼氏,×100)

**Fig.5** Histopathological examination of rat hippocampal tissue following administration of Yinling Tongmai Jiannao Granule prepared by different processes (Nissl, ×100)

注:A.正常对照组;B.假手术组;C.模型对照组;D.多奈哌齐组;E.工艺①号样组;F.工艺②号样组;G.工艺③号样组。

## 4 讨论

VD 大鼠模型构建多采用脑血管阻断减少脑血流的方法制备动物模型,其中永久性 2-VO 法是大鼠慢性低灌注引起 VD 可靠的动物模型,是目前最为常用的制作大鼠慢性全脑缺血的经典方法,并被广泛应用于 VD 研究中,其行为学特征主要表现出学习障碍和记忆损伤<sup>[12-16]</sup>。在中枢神经系统中,海马是边缘系统内的一个与情感、学习及记忆等高级认知功能紧密相关的重要脑区,它参与情感和记忆,有研究表明,VD 引起大鼠海马神经元损伤<sup>[17-18]</sup>。本研究发现,VD 大鼠模型大鼠海马组织部分锥体细胞排列稀疏紊乱、部分锥体细胞坏死、间质水肿,且尼氏小体数量明显减少,工艺②能明显增加大鼠海马组织尼氏小体数量。综上所述,工艺②号样能明显改善 VD 记忆损伤。

在中药新药工艺研究的过程中,提取路线的选择是最为重要的环节之一,与治疗效果密切相关。本实验结果显示,工艺②号样能明显改善 VD 记忆损伤,由于工艺②号样在提取过程中是将含挥发油成分的石菖蒲、川芎、姜黄采用水蒸气蒸馏法进行提取,能够高效提取挥发油成分,而工艺①号样是将处方全部药味按传统水煎煮方式进行提取,工艺③则是先将银杏叶、丹参、姜黄加 70%乙醇提取两次,其余药味煎煮,以上 3 种不同提取工艺对治疗 VD 均有效果,但工艺②号样较工艺③、④号样改善 VD 记忆损伤更明显,与其提取方式相关。现代亦有研究表明中药挥发油成分对于认知功能障碍具有一定的改善作用<sup>[9]</sup>。石菖蒲-川芎药对及其有效组分可通过调节与 VD 相关的多个信号转导通路,改善 VD、延缓其进展,能通过大脑皮质乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)/乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)途径、减轻过氧化损伤、调节海马神经递质,及提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性来降低丙二醛(alondialdehyde, MDA)含量,从而改善学习记忆能力、保护血管内皮进而改善 VD<sup>[20-22]</sup>。山蜡梅叶挥发油可以升高血清中 SOD 活性,降低 MDA 含量,以减轻氧化应激反应对机体的损

伤,保护大鼠脑海马 CA1 区的神经元细胞,从而改善大鼠的认知功能障碍<sup>[23]</sup>。石菖蒲挥发油能显著减少  $\beta$ -淀粉样肽 40( $A\beta_{1-40}$ )和 GFAP 在海马中的含量,挥发油及水煎液均能降低大脑和海马内一氧化氮合酶(NOS)活性,显著改善  $\beta$ -淀粉样肽 42( $A\beta_{1-42}$ )致阿尔茨海默病模型小鼠的学习记忆能力<sup>[24-25]</sup>。当归挥发油可缩短小鼠的逃避潜伏期,显著增加穿越平台次数,下调 MAOA、DRD2 蛋白表达,通过多巴胺能突触、钙离子信号通路、MAPK 信号通路等多条信号通路来以有效改善 VD 小鼠的认知功能<sup>[26]</sup>。赵秀茹等<sup>[27]</sup>发现莫诺苷能改善 VD 大鼠学习记忆能力和病理损伤,抑制脑组织细胞凋亡和自由基水平,通过调控 SOD、MDA 和 LDH 血清水平,下调 Bax/Bcl-2 比率、cyto 胞质水平、裂解形式 Caspase-9、Caspase-3 及 p53 蛋白表达水平,从而实现对 VD 大鼠的治疗作用。本实验评价了不同提取工艺下银苓通脉健脑颗粒的药效差异,证明了筛选的工艺能显著减少大鼠定位航行第 3、第 4 天潜伏期,增加大鼠穿越平台次数,改善痴呆大鼠海马和皮质组织病理变化,增加大鼠海马、皮质组织尼氏小体数量。本研究中,筛选的工艺为部分药味采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,其余药味水提,所得样品中含有挥发油、较多的莫诺苷等水溶性成分,表明这些物质可能跟银苓通脉健脑颗粒改善 VD 记忆损伤等活性相关。

综上所述,本实验以模型定位航行潜伏期、穿越平台次数及对大鼠皮质和海马组织病理学影响为考查指标,并以莫诺苷和马钱苷为含测指标,比较水提、醇提、是否提挥发油的不同工艺对 VD 大鼠的影响,选择合适的提取路线,有利于银苓通脉健脑颗粒更好地发挥补肾养肝、健脑益智、化痰通脉之功效,对其临床上更好地发挥治疗 VD 的药效具有较大的参考意义,为该药的新药开发及临床应用提供依据。

## 参考文献

- [1] YANG Y, ZHAO X Y, ZHU Z R, et al. Vascular dementia: A microglia's perspective[J]. Ageing Research Reviews, 2022, 81: 101734.
- [2] BIR S C, KHAN M W, JAVALKAR V, et al. Emerging concepts in vascular dementia: A review[J]. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2021, 30(8): 105864.

- [3] WOLTERS F J, ARFAN IKRAM M. Epidemiology of vascular dementia[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2019, 39(8): 1542–1549.
- [4] 杜若飞, 江始源, 王文彬. 中医治疗血管性痴呆研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2022, 20(3): 193–196.
- [5] 张泽涵, 张翼飞, 厉 赢, 等. 中医治疗血管性痴呆的文献计量与可视化分析[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(1): 32–39.
- [6] 《中成药治疗血管性痴呆临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗血管性痴呆临床应用指南(2020年)[J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41(3): 273–279.
- [7] 蒋思佳, 顾 耘. 从心肾论治血管性痴呆[J]. *中医学报*, 2024, 39(11): 2370–2375.
- [8] 石星月, 周小莉. 基于“心脑同治”理论探讨血管性痴呆中医辨治[J]. *中医临床研究*, 2024, 16(32): 57–60.
- [9] 李伟峰, 秦合伟, 姬令山, 等. 痴呆健脑方调控 NEK7/NLRP3 炎症小体通路防治血管性痴呆[J]. *安徽中医药大学学报*, 2024, 43(1): 94–100.
- [10] 姚佳霖, 白绿峰, 关运祥, 等. 山茱萸及其有效成分防治神经退行性疾病研究进展[J/OL]. *中国中医药信息杂志*, 1–6. [2024–06–10]. <https://doi.org/hnucm.opac.vip/10.19879/j.cnki.1005-5304.202404510>.
- [11] 王凤霞, 陈芳雯, 沈成英, 等. 中药汤剂煎法的科学内涵研究进展[J/OL]. *中国中药杂志*, 1–7[2024–12–19]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20241031.301>.
- [12] 李 姿, 李方存, 苏梓健, 等. 中医治疗血管性痴呆作用机制研究进展[J]. *内蒙古中医药*, 2024, 43(10): 153–156.
- [13] 宋征宇, 王嘉南, 张 颖, 等. 胡黄连苷 II 调节 JAK2/STAT3 信号通路对血管性痴呆大鼠的神经保护作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(12): 1851–1857.
- [14] 张 明, 马卫成, 曹伟娟, 等. 虾青素提高血管性痴呆小鼠学习记忆能力[J]. *解剖学报*, 2022, 53(1): 5–10.
- [15] 孙晓丽, 张锴铤, 郭淑贞, 等. 龙生蛭胶囊对血管痴呆大鼠认知功能的影响及作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(9): 72–79.
- [16] 贾瑞敏, 麻 莉, 麻晓玲, 等. 姜黄素对血管性痴呆大鼠肠道菌群代谢及记忆功能障碍改善的作用机制分析[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(9): 174–178.
- [17] TOPUZ R D, GUNDUZ O, TASTEKIN E, et al. Effects of hippocampal histone acetylation and HDAC inhibition on spatial learning and memory in the Morris water maze in rats[J]. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2020, 34(2): 222–228.
- [18] 李相华, 谭 双, 刘春芹, 等. 姜黄素对血管性痴呆大鼠认知和记忆功能障碍及海马神经再生的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(24): 5752–5754.
- [19] 邱守昊, 张依倩, 赵俊赫, 等. 水蒸气蒸馏法提取中药挥发油的研究进展[J]. *天津药学*, 2023, 35(4): 63–68.
- [20] 严强东, 彭 蓓, 马岱朝, 等. 石菖蒲-川芎药对改善血管性痴呆机制研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2024, 26(11): 153–157.
- [21] 叶 鑫, 徐丽洁, 田 静, 等. 风药开玄在血管性痴呆中的应用[J]. *河南中医*, 2024, 44(3): 343–346.
- [22] 蒲艳华, 莫雪妮, 钟 洁, 等. 石菖蒲防治脑血管疾病作用机制的药理研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2024, 26(4): 216–220.
- [23] 王 延, 伍沙沙, 徐 婷, 等. 山腊梅叶挥发油对血管性痴呆大鼠认知障碍的改善作用[J]. *安徽农业科学*, 2021, 49(2): 170–174.
- [24] 邓敏贞, 黄丽平, 马阮昕, 等. 石菖蒲挥发油联合人参总皂苷通过调节 PI3K/Akt/mTOR 通路对痴呆模型 APP/PS1 双转基因小鼠的 A $\beta_{40}$  和 GFAP 的影响[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(4): 92–95.
- [25] 田素民, 马宇昕, 孙灵芝, 等. 石菖蒲不同药效部位改善阿尔茨海默病模型小鼠的认知功能[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(1): 159–162, 167.
- [26] 范月盈, 邓翠莉, 张力升, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨当归挥发油改善血管性痴呆的作用机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(8): 1117–1128.
- [27] 赵秀茹, 于 靖, 王 滢. 莫诺苷对血管性痴呆大鼠的治疗作用研究[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2019, 37(6): 650–655.

(本文编辑 苏 维)