



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111358832 A

(43)申请公布日 2020.07.03

(21)申请号 202010406999.5

A61P 25/28(2006.01)

(22)申请日 2013.08.09

A61K 31/216(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 31/192(2006.01)

61/681,414 2012.08.09 US

A61K 36/53(2006.01)

(62)分案原申请数据

201380051858.4 2013.08.09

(71)申请人 凯敏工业公司

地址 美国衣阿华

(72)发明人 M·切迪亚 K·赫林格尔

B·刘易斯 H·冯

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 刘鸿林 张晓威

(51)Int.Cl.

A61K 36/534(2006.01)

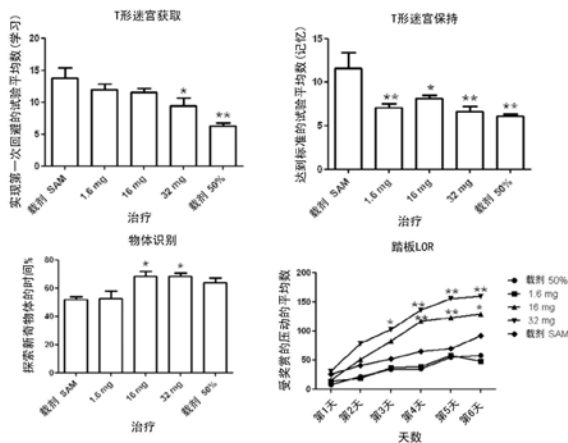
权利要求书1页 说明书19页 附图12页

(54)发明名称

用于改善认知健康和认知功能的植物提取物

(57)摘要

本申请涉及用于改善认知健康和认知功能的植物提取物,更具体地涉及用于改善学习、记忆、注意、警觉、执行功能、语言流畅、加工速度和/或认知灵活性及相关行为的鼠尾草酸和/或迷迭香酸的给药。



\*表示P<0.05并且\*\*表示P<0.01

1. 包含迷迭香酸的留兰香提取物在制备用于增强、改善或维持哺乳动物的陈述性学习的口服药物中的用途。
2. 如权利要求1所述的用途,其中所述留兰香提取物含有5%的迷迭香酸。
3. 如权利要求1所述的用途,其中所述哺乳动物选自人类和伴侣动物。
4. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物用于给药以提供0.01mg/kg/天至50mg/kg/天的有效量的所述提取物。
5. 如权利要求1所述的用途,其中所述陈述性学习是指通过改善集中、注意和警觉进行的陈述性学习。
6. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物用于给药以预防或治疗与正常衰老过程相关的陈述性学习障碍或缺陷。
7. 包含鼠尾草酸和迷迭香酸的植物提取物在制备用于增强、改善或维持哺乳动物的陈述性学习的口服药物中的用途。
8. 如权利要求7所述的用途,其中所述药物用于给药以进一步增强、改善和维持程序性学习。
9. 如权利要求7所述的用途,其中所述植物是留兰香和迷迭香。
10. 如权利要求9所述的用途,其中所述迷迭香酸包含在留兰香提取物中,所述留兰香提取物包含5%的迷迭香酸。
11. 如权利要求9或10所述的用途,其中所述鼠尾草酸包含在迷迭香提取物中,所述迷迭香提取物包含10%或60%的鼠尾草酸。
12. 如权利要求7所述的用途,其中所述哺乳动物选自人类和伴侣动物。
13. 如权利要求7所述的用途,其中所述药物用于给药以预防或治疗与正常衰老过程相关的陈述性学习障碍或缺陷。

## 用于改善认知健康和认知功能的植物提取物

[0001] 本申请是2013年8月9日提交的发明名称为“用于改善认知健康和认知功能的植物提取物”的中国专利申请201380051858.4的分案申请。

### [0002] 发明背景

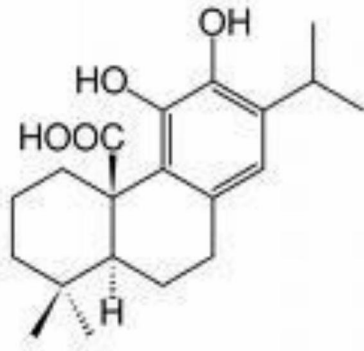
[0003] 本发明一般涉及增强、改善或维持认知健康和认知功能的植物提取物,更具体地,涉及用于改善学习、记忆、注意、警觉、执行功能、语言流畅、加工速度和/或认知灵活性及相关行为的鼠尾草酸和/或迷迭香酸的给药。

[0004] 尽管存在不利的经济压力,仍然强烈需求能够改善认知健康或认知功能的产品,并且这些产品的市场近年来持续增长。这种增长中的一部分可以归因于老龄人口的增长,这在亚洲和美国是尤其真实的。在世界范围内,认知健康成分的销售为约45.5亿美元。Frost and Sullivan已预计从2016年到2019年,在该区域内的年增长率达到12%。

[0005] 用于认知健康的主要成分目前包括磷脂酰丝氨酸(PS)、CoQ10、 $\Omega$ -3(水产动物油(marine oils)/海藻油)、胞磷胆碱、银杏和人参。在最多的认知健康成分中,磷脂酰丝氨酸是符合FDA批准合格声明的唯一一个。随着支持该声明的科学证据越来越多,所述成分的销售正在得到两位数增长。在2010年,DHA和EPA脑功能、心脏健康和视觉的健康声明获得了来自欧洲的EFSA的正面意见。胞磷胆碱被晋升为预防神经元变性并改善记忆的成分。

[0006] 鼠尾草酸(CA)是在迷迭香(*Rosmarinus officinalis*) (迷迭香(rosemary))和鼠尾草(*Salvia officinalis*) (鼠尾草(sage))中存在的最丰富的多酚化合物之一。目前,CA已经在市场上以成分形式或以成品膳食补充剂形式获得。这些产品的纯度在25%至60%之间变化,并且一种HPLC级产品登录为98%。此外,存在被标准化为CA的迷迭香提取物,以粉末形式(被标准化为5-30%CA)或以膳食补充剂形式(300mg胶囊被标准化为6%CA,并且推荐剂量为每日三个胶囊)获得。CA在这些迷迭香提取物中的百分比为5-60%。迷迭香具有酚二萜(鼠尾草酸和鼠尾草酚)、酚酸(咖啡酸和迷迭香酸)及类黄酮的组合。二萜是4个异戊二烯单元的组合,并且已知是抗微生物且抗炎的(Bisio等人, *Antimicrobial activity of the ornamental species Salvia corrugata, a potential new crop for extractive purposes. J Agric Food Chem* 56:10468-10472, 2008; Sato等人, *Antibacterial novel phenolic diterpenes from Podocarpus macrophyllus D. Don. Chem Pharm Bull (Tokyo)* 56:1691-1697, 2008; Su et al. *Anti-inflammatory activities of furanoditerpenoids and other constituents from Fibraurea tinctoria. Bioorg Med Chem* 16:9603-9609, 2008; Wang等人, *Triptolide inhibits the differentiation of Th17 cells and suppresses collagen-induced arthritis. Scand J Immunol* 68:383-390, 2008)。这些异戊二烯单元可以一起连接成直链或布置成环构造。CA连同其衍生物鼠尾草酚被认为是迷迭香中的主要活性成分。

[0007]



### 鼠尾草酸(CA)

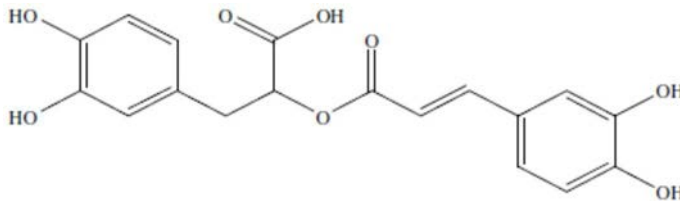
[0008] 大部分现有的体外研究评价了CA的抗氧化保护。实际上,迷迭香的抗氧化活性主要归因于CA(Aruoma等人,An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provençal herbs.Food and Chemical Toxicology 34: 449-456,1996;Pérez-Fons等人,Rosemary (Rosmarinus officinalis) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes.Archives of Biochemistry and Biophysics 453:224-236,2006;Wang等人,Augmentation by Carnosic Acid of Apoptosis in Human Leukaemia Cells Induced by Arsenic Trioxide via Upregulation of the Tumour Suppressor PTEN.The Journal of International Medical Research 36:682-690,2008)。使用氧化应激的谷氨酸盐模型来评估CA的神经元保护作用。该研究证明CA在体内和体外均保护神经元免于严重的谷氨酸盐损伤(Sato等人,Carnosic acid,a electrophilic compound,protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via alkylation of targeted cysteines on Keap1.Journal of Neurochemistry 104:1116-1131,2008)。关于CA的较新的文献讨论了其潜在的抗炎性。除了表明CA由于下调NF-κB转录因子而具有抗炎活性的工作之外,其他研究已评价了CA的抗炎性的其他机制(Laughton等人,Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives:Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability.Biochemical Pharmacology 42:1673-1681,1991;Poeckel等人,Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes.Biochem Pharmacol 76:91-97,2008;Rau等人,Carnosic Acid and Carnosol,Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma.Planta Med 72:881-887,2006)。

[0009] 以上的体外数据得到了关于CA抗氧化能力的体内数据的支持。最近的体内文献指出CA的抗肥胖和抗糖化作用(Alarcon-Aguilar等人,Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice.Phytother Res 16:383-386,2002;Hsieh等人,Low-density lipoprotein,collagen,and thrombin models reveal that Rosemarinus officinalis

L.exhibits potent antiglycative effects.J Agric Food Chem 55:2884-2891,2007; Ninomiya等人,Carnosic acid,a new class of lipid absorption inhibitor from sage.Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters 14:1943-1946,2004;Takahashi等人,Carnosic acid and carnosol inhibit adipocyte differentiation in mouse 3T3-L1 cells through induction of phase 2enzymes and activation of glutathione metabolism.Biochem Biophys Res Commun 382:549-554,2009)。

[0010] 迷迭香酸(RA)是在留兰香中发现的主要组分之一,并且是其抗氧化能力的重要贡献者(Fletcher等人,Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint(*Mentha spicata* L).Journal of the Science of Food and Agriculture 85:2429-2436,2005)。RA,即天然存在的酚化合物,是咖啡酸和3,4-二羟基苯基乳酸的酯。其结构由羰基、不饱和双键以及在两个酚环之间的羧酸构成。RA已表现出多种生物活性,例如抗炎、抗诱变、抗菌、抗抑郁、HIV-1抑制、抗氧化和抗病毒性质。这些性质已使RA成为对医药和化妆品工业有吸引力的成分。在欧洲,RA已作为非甾体抗炎药物局部使用(Ritschel等人,Percutaneous absorption of rosmarinic acid in the rat.Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 11:345-352,1989)。由于其在食品工业中广泛用作调味剂和防腐剂,因此RA被认为是日常消耗安全的成分(Alkam等人,A natural scavenger of peroxy-nitrites, rosmarinic acid,protects against impairment of memory induced by A $\beta$ 25-35.Behavioural Brain Research 180:139-145,2007)。

[0011]



迷迭香酸

[0012] 在脑部内已经发现RA的非特异保护性质的证据。在衰老小鼠的RA给药之后,证明了改善的脑部抗氧化活性,所述RA给药导致超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)在脑部中的活性增加,同时减少了丙二醛(MDA)(Shou等人,Rosmarinic acid attenuates D-galactose induced behavior impairment in mice and its mechanism.2010,p.1723-1726)。这些数据证明RA作为抗氧化剂的非特异保护性质,然而,先前没有数据证明RA影响脑部的特性区域或特定临床结果的能力。

[0013] 在体内,三种研究已经评价了RA的给药。这些研究已经在用于代表特定认知疾病状态的颅内损伤模型或应激模型中口服给药RA或腹腔内给药RA(Alkam等人,A natural scavenger of peroxy-nitrites,rosmarinic acid,protects against impairment of memory induced by A $\beta$ 25-35.Behavioural Brain Research 180:139-145,2007;Park等人,Subchronic administration of rosmarinic acid,a natural prolyl oligopeptidase inhibitor,enhances cognitive performances.Fitoterapia 81:644-648,2010;Zhou等人,Rosmarinic acid attenuates D-galactose induced behavior impairment in mice and its mechanism.Intl Conf BMEI 4:1723-1726,2010)。尽管RA

在这些模型中表现出益处,但是它们不是用于评价正常衰老认知变化(例如在SAMP8中)的经过验证的模型。此外,由于抗氧化作用,该作用机制是否是特异性或非特异性的仍是未知的。目前还没有评价单独RA补充或通过使用留兰香提取物的公开的人类研究。

[0014] 学习和记忆可以分为两个主要类别,陈述性的和程序性的。陈述性的具有暂时的、立体的和联想的记忆部分。这涉及具有需要注意和警觉的意识部分的学习和记忆。在人类中,这涉及离散的事件、位置、人物和事实的获取、识别和记忆。在目前描述的动物研究中通过T形迷宫获取、T形迷宫保持和物体识别来测量陈述性学习和记忆。当陈述性记忆任务变为常规或习惯性时可以形成程序性学习和记忆,并且在目前的动物研究中通过踏板 (lever press) 来测量。这涉及不具有意识部分的学习和记忆,其在人类中是习惯或技能,例如骑车。陈述性任务被认为是海马引发的,而程序性任务主要与脑部的尾状区域有关。

[0015] 为了评价由衰老造成的认知影响,衰老加速倾向小鼠8 (SAMP8) 是经证实的加速衰老的模型,其到8月龄时出现学习和记忆的缺陷 (Yagi H, Katoh S, Akiguchi I, Takeda T (1988) Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Neurosci Biobehav Rev.* 474, 86-93; Flood JF, Morley JE (1998) Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neurosci Biobehav Rev.* 22, 1-20)。SAMP8小鼠具有天然突变,所述天然突变导致脑部中淀粉样前体蛋白 (A $\beta$ PP) 和淀粉样 $\beta$  (A $\beta$ ) 的年龄相关性增加以及导致学习和记忆缺陷的中枢神经系统中自由基产生增加 (Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Akkebl KL, Carney JM (1997) Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron. *Prac Natl Acad Sci USA.* 94, 674-678; Sato E, Kurokawa T, Oda N, Ishibashi S (1996) Early appearance of abnormality of microperoxisomal enzymes in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing Dev.* 92, 175-184)。已经在评价各种营养成分、补充剂和药物的认知益处的文献中使用SAMP8模型。多个实例是 $\alpha$ -硫辛酸、n-乙酰半胱氨酸 (Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyeran E, Butterfield DA, Morley JE (2003) The antioxidants  $\alpha$ -lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochemistry.* 84, 1173-1183)、多不饱和脂肪酸 (Petursdottir AL, Farr SA, Morley JE, Banks WA, Skuladottir GV (2008) Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on brain lipid fatty acid composition, learning ability, and memory of senescence-accelerated mouse. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63, 1153-1160) 以及美金刚 (Zhou, M., Wang, M.-., & Wang, X.-. (2010). Effects of memantine combined with enriched environment therapy on learning and memory abilities and the mental behavior in senescence accelerated mouse. *Journal of Clinical Neurology*, 23 (6), 438-441), 所有这些均被证明在随后的人类临床试验中有正面认知益处 (Volchegorskii, I. A., Rassokhina, L. M., Kolyadich, M. I., & Alekseev, M. N. (2011). Comparative study of alpha-lipoic acid and mexidol effects on affective status, cognitive functions and quality of life in diabetes mellitus patients. *Eksperimental'Naya i Klinicheskaya*

Farmakologiya,74(11),17-23;Chan,A.,Remington,R.,Kotyla,E.,Lepore,A.,Zemianek,J.,&Shea,T.B.(2010).A Vitamin/nutriceutical formulation improves memory and cognitive performance in community-dwelling adults without dementia.Journal of Nutrition,Health and Aging,14(3),224-230;Small,G.W.,Silverman,D.H.S.,Siddarth,P.,Ercoli,L.M.,Miller,K.J.,Lavretsky,H.,Phelps,M.E.(2006).Effects of a 14-day healthy longevity lifestyle program on cognition and brain function.American Journal of Geriatric Psychiatry,14(6),538-545;Litvinenko,I.V.,Odinak,M.M.,Mogil'Naya,V.I.,&Perstnev,S.V.(2010).Use of memantine (akatinol)for the correction of cognitive impairments in Parkinson's disease complicated by dementia.Neuroscience and Behavioral Physiology,40(2),149-155)。评价认知成分和/或药物的神经科学家认识到SAMP8是已经成功用于预测它们在随后的人类临床试验中的效力的有效动物模型。

#### [0016] 发明概述

[0017] 本发明包括提取自植物的鼠尾草酸和/或迷迭香酸的给药,其用于改善学习、记忆、执行功能(即,工作记忆、任务转换、计划、灵活性、视觉注意、数学技能以及个体识别并适应新的和变化的条件、环境和情形的能力)、以及认知相关行为(即,集中、注意、警觉、探索、动机等)。具有鼠尾草酸的迷迭香提取物表现出改善的陈述性记忆以及程序性学习和记忆。在哺乳动物中,这可以表现为对离散的事件、位置、人物和事实的增强、改善或持久的记忆。此外,可以观察到学习和记住惯常的信息或技能的能力得到改善,或许是因为产生关联的能力得到改善。具有迷迭香酸的留兰香提取物表现出陈述性学习和记忆的改善。在哺乳动物中,这可以表现为对离散的事件、位置、人物和事实的增强或改善的学习连同对这些事情的增强和持久的记忆。

[0018] 氧化损伤被认为是这些衰老过程的标志之一。在与衰老相关的认知损害中存在的神经元功能障碍被认为很大程度上是由于氧化应激引起的。在诸如阿尔茨海默病的认知障碍中存在对线粒体的结构和功能损伤,表明渗透细胞和线粒体的抗氧化剂会提供最大的保护以免于氧化应激。设计了目前的研究,以试验两种新颖的有专利权的基于抗氧化剂的成分,即迷迭香提取物和留兰香提取物(分别被标准化成鼠尾草酸和迷迭香酸)是否能在加速衰老的SAMP8小鼠模型中改善学习和记忆。我们先前表明了抗氧化剂改善SAMP8小鼠的学习和记忆缺陷并逆转氧化损伤的标志的能力;因此SAMP8小鼠是用于试验这些抗氧化剂化合物的优异模型。SAMP8小鼠被放置在三种提取物中的一种上。两种迷迭香提取物包含鼠尾草酸(60%鼠尾草酸和10%鼠尾草酸),并且一种留兰香提取物包含5%迷迭香酸。试验了每一种提取物的三种剂量:32mg/kg、16mg/kg、1.6mg/kg的活性物(对于迷迭香和留兰香提取物分别为CA或RA),以及载剂对照。50%SAMP8回交品系用作同样接受载剂的对照。在90天治疗之后,在3个行为试验,即T形迷宫足部电击回避、物体识别和踏板中测试了小鼠。包含60%鼠尾草酸的迷迭香提取物在T形迷宫足部电击回避中于32mg/kg CA下改善了获取并在活性物的所有三个剂量下改善了保持,并且能够在16mg/kg CA和32mg/kg CA下改善物体识别和踏板。具有10%鼠尾草酸的迷迭香提取物在T形迷宫足部电击回避中改善了保持(16mg/kg CA),并在16mg/kg CA和32mg/kg CA下改善踏板。具有5%迷迭香酸的留兰香在T形迷宫中改善了获取(16mg/kg RA和32mg/kg RA)和保持(在所有剂量的RA下)。此外,具有5%迷迭香酸

的留兰香在16mg/kg RA和32mg/kg RA下改善了物体识别。与载剂治疗的SAMP8相比,在用所有三种提取物治疗之后,在脑皮质中降低了4-羟基壬烯醛(HNE)。在给药具有10%鼠尾草酸的迷迭香和含5%迷迭香酸的留兰香之后,在海马中降低了蛋白羰基。当前的结果表明来自留兰香(迷迭香酸)和迷迭香(鼠尾草酸)的提取物在SAMP8小鼠中对学习和记忆以及随着年龄而出现的氧化的脑组织标记具有有益的作用。

[0019] 附图简述

[0020] 图1示出60%鼠尾草酸对T形迷宫获取、T形迷宫保持、物体识别和踏板的作用的图表。

[0021] 图2示出在给药含60%鼠尾草酸的迷迭香提取物之后脑皮质中的氧化应激标记的图表;结果以与SAMP8载剂对照的变化百分比形式表示;\*表示 $P<0.05$ 并且\*\*表示 $P<0.01$ 。

[0022] 图3示出在给药含60%鼠尾草酸的迷迭香提取物之后脑纹状体中的氧化应激标记的图表;结果以与SAMP8载剂对照的变化百分比形式表示;\*表示 $P<0.05$ 并且\*\*表示 $P<0.01$ 。

[0023] 图4示出在给药含60%鼠尾草酸的迷迭香提取物之后脑海马中的氧化应激标记的图表;结果以与SAMP8载剂对照的变化百分比形式表示;\*表示 $P<0.05$ 并且\*\*表示 $P<0.01$ 。

[0024] 图5示出10%鼠尾草酸对T形迷宫获取、T形迷宫保持、物体识别和踏板的作用的图表。

[0025] 图6示出在给药含10%鼠尾草酸的迷迭香提取物之后脑皮质中的氧化应激标记的图表;结果以与SAMP8载剂对照的变化百分比形式表示;\*表示 $P<0.05$ 并且\*\*表示 $P<0.01$ 。

[0026] 图7示出在给药含10%鼠尾草酸的迷迭香提取物之后脑纹状体中的氧化应激标记的图表;结果以与SAMP8载剂对照的变化百分比形式表示;\*表示 $P<0.05$ 并且\*\*表示 $P<0.01$ 。

[0027] 图8示出在给药含10%鼠尾草酸的迷迭香提取物之后脑海马中的氧化应激标记的图表;结果以与SAMP8载剂对照的变化百分比形式表示;\*表示 $P<0.05$ 并且\*\*表示 $P<0.01$ 。

[0028] 图9示出5%迷迭香酸对T形迷宫获取、T形迷宫保持、物体识别和踏板的作用的图表。

[0029] 图10示出在给药含5%迷迭香酸的迷迭香提取物之后脑皮质中的氧化应激标记的图表;结果以与SAMP8载剂对照的变化百分比形式表示;\*表示 $P<0.05$ 并且\*\*表示 $P<0.01$ 。

[0030] 图11示出在给药含5%迷迭香酸的迷迭香提取物之后脑纹状体中的氧化应激标记的图表;结果以与SAMP8载剂对照的变化百分比形式表示;\*表示 $P<0.05$ 并且\*\*表示 $P<0.01$ 。

[0031] 图12示出在给药含5%迷迭香酸的迷迭香提取物之后脑海马中的氧化应激标记的图表;结果以与SAMP8载剂对照的变化百分比形式表示;\*表示 $P<0.05$ 并且\*\*表示 $P<0.01$ 。

## 发明内容

[0032] 设计了目前的研究,以试验迷迭香提取物(具有CA)和留兰香提取物(具有RA)是否能改善认知健康和/或认识功能的所有方面,包括但不限于:注意、警觉、识别、回忆、反应时间、集中、动机、行为、执行功能、学习和记忆。特别地选择CA和RA分子是由于其独特的性质:1) 这些分子穿过血脑屏障的能力;2) 不同的溶解度(油对比水);以及3) 增强的抗氧化能力。在SAMP8小鼠品系(衰老加速小鼠模型)中试验所述两种提取物。SAMP8小鼠品系呈现出由痴呆导致的学习和记忆缺陷的早发,所述痴呆是由 $\beta$ 淀粉样斑块形成和氧化应激造成的。50% SAM小鼠用作对照。



[0033] 定义

[0034] 如本申请所用的,以下术语具有下文所述的含义。

[0035] 警觉:以下状态,即密切且连续地注意、警惕且迅速的应对危险或紧急情况、或快速地感知和行动。

[0036] 认知健康:认知健康是指整个脑部、组织和血液供给的健康以及其在各种条件下适当地发挥作用的能力。良好的认知健康对于脑部进行所有心理过程而言是至关重要的;统称为认知,包括但不限于学习、直觉、判断、语言、注意、警觉、集中和记忆(长期和短期);处于最佳性能。由衰老、疾病和/或其他认知损害导致的不良的认知健康降低了脑部适当发挥作用的能力,导致认知功能和认知性能(cognitive performance)的显著下降。

[0037] 认知功能:涉及神经学或符号运算的任何心理或智力过程,包括但不限于沟通、洞察、理解、推理、记忆、思考、意识、集中、注意、警觉、动机、做出结论、执行功能、建立意象以及判断能力。在动物模型体系中,可以本领域已知的多种常规方式来测量认知功能,包括使用Morris水迷宫(MWM)、Barnes圆形迷宫、高架放射臂迷宫、T形迷宫或其中动物使用空间信息的任何其他迷宫。本领域已知的其他试验也可用于评价认知功能,例如新物体识别和气味识别任务。

[0038] 执行功能:调节、控制和管理其他认知过程的认知过程,所述其他认知过程例如计划、工作记忆、注意、解决问题、文字推理、数学能力、抑制、心理灵活性、任务转换、起始、灵活性、视觉注意、数学技能、对新的和变化的环境的适应性、以及行动监控。

[0039] 学习:获得知识或技能的行动、过程或经历;尤其通过经历或条件作用(conditioning)的心理或行为改变。

[0040] 记忆:从储存在人脑海中的过去的学习或经历获得的信息的集合。一条信息,例如储存在记忆中的经历的心智图像。记得过去的经历或学习过的信息的能力,涉及高级心理过程(如学习、保持、回忆和识别)并且是由包括海马在内的脑的几个不同区域中的神经元之间的化学变化造成的。包括:(1)陈述性学习或记忆,其是指可以有意识地回忆诸如事实和知识,(2)工作记忆,其是指将多条暂时信息积极地保持在脑海中,其中可以对它们进行操作,(3)参考回忆,其是指从先前的经历(最近的或遥远的)获得的信息,(4)认知记忆,其是认知先前遇到的事件、物体或人物的能力,以及(5)联想记忆,其是学习和记得不相关项目之间的关系的能力。这些中的每一个均具有即刻的、短期的和长期的部分。即刻记忆仅持续数秒。短期记忆储存经最低限度地加工的信息并且仅可用数分钟,例如记得手机号仅长到将其使用。仅当重复使用的信息促进使其得到保留的神经化学变化时,短期记忆才被转成长期记忆,其可以持续多年。

[0041] 治疗有效量:本发明的化合物、组合物或其衍生物的量是当向个体给药时会具有预期的治疗效力的量。全部的治疗效力不一定通过给药一个剂量就出现,其可能仅在给药一系列剂量之后出现。因此,可以在一次或多次给药中给予治疗有效量。个体所需的精确有效量会取决于例如个体的大小、健康和年龄,认知损害的性质和程度,以及为了给药而选择的疗法或疗法联用,以及给药方式。本领域技术人员可以通过常规实验容易地确定给定情形下的有效量。在一个实施方案中,本文所述的唇形科的植物的至少一种提取物(例如CA、RA或其多种组合)用于以每日一次的频率或每日多于一次(例如每日2、3或4次)给药。

[0042] 治疗(Treatment)或治疗(Treating):企图改变正在治疗的个体、动物或细胞的自

然进程的临床介入,并且可以为了预防临床疾病或在临床疾病的过程中进行。期望的作用包括防止疾病的出现或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接的病理学结果、降低疾病进展的速度、改善或减轻疾病状态、以及缓解或改善预后。条件或主题是指采取步骤以获得有益的或期望的结果,包括临床结果。有益的或期望的临床结果包括但不限于增强、改善或维持认知健康和/或功能,减轻或改善与轻度认知损害或年龄相关性认知损害相关的一种或多种症状,延迟或减缓该损害,改善、减轻或稳定该损害,以及其他优异结果,例如改善认知功能或者降低患有年龄相关性认知损害或处于其风险的个体的认知功能下降的速度。在优选的实施方案中,这些术语包括预防或治疗认知障碍,例如诵读困难、失用症(aspraxia)、注意缺陷多动障碍、注意缺陷障碍、自闭症、阿尔茨海默病、帕金森病或卒中,或其他执行功能障碍。

[0043] 实施例1

[0044] 氧化损伤被认为是衰老过程的标志之一[Harman D(2002) Alzheimer's disease: role of aging in pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 959,384-395]。在与诸如阿尔茨海默病的衰老相关的疾病中存在的神经元功能障碍被认为很大程度上是由于氧化应激[Markesbery WR(1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 23,134-147; Polidori MC, Griffiths HR, Mariani E, Mecocci P(2007) Hallmarks of protein oxidative damage in neurodegenerative diseases: focus on Alzheimer's disease. *Amino Acids.* 32,553-559]。阿尔茨海默病存在对线粒体的结构和功能损伤,表明易于渗透细胞和线粒体的抗氧化剂会提供最大保护以免于氧化应激[Skulachev VP, Anisimov VN, Antonenko YN, Bakeeva LE, Chernyak BV, Erichev VP, Filendo OF, Kalinia NI, Kapelko VI, Kolosova NG, Kopin BP, Korshunova GA, Lichinitser MR, Obukhova LA, Pasyukova EG, Pisarenko OI, Roginsky VA, Ruuge EK, Senin II, Severina II, Skulachev MV, Spivak IM, Tashlitsky VN, Tkachuk VA, Vyssokikh MY, Yaguzhinsky LS, Zorov DB(2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochim Biophys Acta.* 1787,437-461; Suh JH, Shigeno ET, Morrow JD, Cox B, Rocha AE, Frei B, Hagen TM(2001) Oxidative stress in the aging rat heart is reversed by dietary supplementation with (R)-(alpha)-lipoic acid. *FASEB J.* 15,700-706]。衰老加速倾向小鼠8(SAMP8)是加速衰老的模型,其到8月龄时出现学习和记忆的缺陷[Yagi等人,1988; Flood等人,1998]。SAMP8小鼠具有天然突变,其导致脑部中的淀粉样前体蛋白(ABPP)和淀粉样 $\beta$ (A $\beta$ )的年龄相关性增加、学习和记忆缺陷以及氧化应激。此外,对A $\beta$ PP的反义增强了这些小鼠的记忆和学习[Morley JE, Farr SA, Flood JF(2002) Antibody to amyloid beta protein alleviates impaired acquisition, retention, and memory processing in SAMP8 mice. *Neurobiol Learn Mem.* 78,125-38; Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamelesh V, Franko M, Banks WA, Morley JE(2000) Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides.* 21,1769-1775]。此外,SAMP8小鼠在中枢神经系统中的自由基产生增加[Butterfield等人,1997; Sato, et al., 1996],其与线粒体功能障碍有关[Fujibayashi Y, Yamamoto S, Waki A, Jibusgu Hm Yonekura Y(1998) Increased

mitochondrial DNA deletion in the brain of SAMP8, a mouse model for spontaneous oxidative stress brain. *Neurosci Lett.* 254, 109-112]。

[0045] 已经发现抗氧化剂逆转SAMP8小鼠的学习和记忆缺陷。 $\alpha$ -硫辛酸和n-乙酰半胱氨酸增强记忆并逆转这些小鼠中氧化应激的指标。 $\alpha$ -硫辛酸显著降低乳酸脱氢酶B、二氢嘧啶酶样蛋白和 $\alpha$ 烯醇化酶的羧基水平[Poon HF, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA, Morley JE, Klein JB, Butterfield DA (2005) Proteomic analysis of specific brain proteins in aged SAMP8 mice treated with alpha-lipoic acid: implications for aging and age-related neurodegenerative disorders. *Neurochem Int.* 45, 159-68]。已经发现多酚抗氧化剂改善SAMP8小鼠的学习和记忆,并逆转氧化应激的指标[Farr SA, Price TO, Domnguez LJ, Motisi A, Saiano F, Niehoff ML, Morley JE, Banks WA, Ercal N, Barbagallo M (2012) Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *J Alzheimer's Dis* 28, 81-92]。

[0046] 已经发现鼠尾草酸(CA)和迷迭香酸(RA)是神经保护和预防氧化应激的[Fadel O, El Kirat K, Morandat S (2011) The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochim Biophys Acta* 1808, 2973-2980; Fallarini S, Miglio G, Paoletti T, Minassi A, Amoroso A, Bardelli C, Brunelleschi S, Lombardi G (2009) Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in invitro models of neuronal death. *Br J Pharmacol* 157, 1072-1084; Hou CW, Lin YT, Chen YL, Wang YH, Chou JL, Ping LY, Jeng KC (2012) Neuroprotective effects of carnosic acid on neuronal cells under ischemic and hypoxic stress. *Nutr Neurosci* [Epub]]。鼠尾草酸在LPS给药之后还具有抗炎作用[19]。对氧化应激和炎症的保护与在衰老疾病中的改善的记忆相关[Farr 等人, 2012]。迷迭香酸在Morris水迷宫空间任务中改善记忆[Park DH, Park SJ, Kim JM, Jung WY, Ryu JH (2010) Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performance. *Fitoterapia* 81, 644-648]。

[0047] 记忆被分成两个主要类别, 陈述性(或外显记忆)和程序性(或内隐记忆)。陈述性记忆还被分成语义的(事实或含义)和情节的(具体经历)。语义记忆通常衍生自情节记忆。陈述性记忆被认为由海马编码, 而程序性记忆被认为由纹状体内的结构尾状核(caudate)编码。程序性记忆或内隐记忆来自对反应与奖赏之间的关联的学习。程序性记忆通常以陈述性记忆开始, 直至它们变得根深蒂固或成为习惯。

[0048] T形迷宫足部电击回避任务代表了陈述性情节记忆。其具有暂时的、立体的和联想的记忆部分。小鼠必须学习以使蜂鸣器和开门与电击开始相关联[Farr SA, Banks WA, La Scola ME, Flood JF, Morley JE (2000) Permanent and temporary inactivation of the hippocampus impairs T-maze footshock avoidance acquisition and retention. *Brain Res.* 872, 242-249]。它们还必须学习它们是否左转或右转以逃避或避免电击。最终, 其具有暂时部分, 因为它们学习了当门打开并同时蜂鸣器启动时, 它们有5秒来跑至目标箱(在走廊末端的左边或右边)以避免电击。

[0049] 物体识别记忆是陈述性或外显记忆的形式。其是识别先前遇到的事件、物体或人

物的能力[Medina JH,Bekinschtein P,Commarota M,Izquierdo I(2008) Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate?Behav Br Res 192:61-69]。在该任务中,记得它们先前所见的物体的小鼠会花费更多的时间来探索保持试验中的新鲜或新奇的物体。该测试也是海马试验。研究已表明海马内的损伤在首次暴露后24小时导致记忆缺陷[Hammond RS,Tull LE,Stachman RW(2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition.Neurbiol Learn Mem 82, 26-34]。评价认知的人类试验向个体显示词汇表或对象(objects),然后当保持试验时,转换词汇或对象中的一些,并且要求个体确定他们先前所遇到的词汇或对象。

[0050] 踏板是操作式任务。小鼠学习将踏板与食物奖赏相关联。最初,该试验利用陈述性记忆来形成关联,但当已经形成关联之后,其变成主要涉及脑部的尾状区域的程序性任务[Beninger RJ,Ranaldi R(1993) Microinjection of flupenthixol into the caudate-putamen but not the nucleus accumbens, amygdala or frontal cortex of rats produce intra-session declines in food-rewarded operant responding Behav Brain Res 55,203-212]。有时,踏板以其发明人的名字被称为Skinner箱。

[0051] 设计了目前的研究,以试验在迷迭香提取物和留兰香提取物中发现的两种新颖的抗氧化剂(分别为鼠尾草酸和迷迭香酸)是否能在加速衰老的SAMP8小鼠模型中改善学习和记忆。我们先前表明了抗氧化剂在SAMP8小鼠中改善学习和记忆缺陷并逆转氧化损伤的标志的能力[Farr等人,2003;Morley JE,Armbrecht HJ,Farr SA,Kumar VB(2012) The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease.Biochim Biophys Acta 1822];因此,SAMP8小鼠是用于试验这些抗氧化剂化合物的优异模型[Farr SA,Yamada KA,Butterfield DA,Abdul HM,Xu L,Miller NE,Banks WA,Morley JE(2008) Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment.Endocrinology 149,2628-2636]。

[0052] 材料和方法

[0053] 小鼠

[0054] 在治疗开始时,用于实验的个体是9月龄SAMP8小鼠。对照组是9月龄50%SAM小鼠,即雄性SAMP8与雌性CD-1小鼠之间的杂交,其不会表现出学习和记忆的年龄相关性损害。这些研究在VA Medical Center,St.Louis,MO的动物饲养和使用委员会(Animal Care and Use Committee)的许可下进行。

[0055] 治疗

[0056] 通过每天一次管喂,9月龄SAMP8小鼠接受包含60%或10%CA的迷迭香提取物(在葵花油中)或包含5%RA的留兰香提取物(在水中),持续12周。

[0057] 将小鼠设定成7组:

[0058] 1. 给药含60%CA的迷迭香提取物(CA60)的SAMP8;

[0059] 2. 给药含10%CA的迷迭香提取物(CA10)的SAMP8;

[0060] 3. 给药含5%RA的留兰香提取物(RA5)的SAMP8;

[0061] 4. 给药作为组1和组2的负对照的葵花油的SAMP8;

[0062] 5. 给药作为组3的负对照的水的SAMP8;

[0063] 6. 给药作为组1和组2的正对照的葵花油的SAMP 50%回交;以及

[0064] 7. 给药作为组3的正对照的水的SAMP 50%回交。

[0065] 对每一受试的提取物进行剂量-反应曲线。所评价的剂量为1.6mg/kg、16mg/kg、32mg/kg的活性物(CA或RA,分别来自迷迭香和留兰香),以及对于上文所列的三种提取物的每一种设载剂组。在整个研究中每周记录体重,并且在喂食的第12周开始行为试验。

[0066] 行为试验

[0067] 在治疗的第12周开始行为试验。在第12周内首先将小鼠在T形迷宫足部电击回避中进行训练(T形迷宫获取),并在第13周内试验该任务的T形迷宫保持,然后在第13周内测试物体识别。在第14和15周内进行踏板。

[0068] T形迷宫训练和试验程序

[0069] T形迷宫是基于工作记忆的学习任务和陈述性参照记忆任务。T形迷宫由在T形臂的一端具有起点箱且在另一端具有两个目标箱的黑色塑料路径构成。起点箱通过塑料闸门与路径分开,所述闸门阻止沿路径向下移动,直至其在开始训练时升起为止。不锈钢棒的可起电地板贯穿该迷宫以递送轻微的乱序足部电击。

[0070] 小鼠不允许在训练之前探索该迷宫。当小鼠被放置在起点箱中时开始训练试验,闸门升起并且同时提示蜂鸣器发声;5秒后施加足部电击。小鼠在第一次训练时进入的迷宫臂被指定为“不正确”箱,并且持续轻微足部电击直至小鼠进入另一目标箱。在所有后续试验中对于该特定小鼠而言,该目标箱被指定为“正确的”。在每次试验结束时,使小鼠返回其居住笼,直至下次试验。

[0071] 对小鼠进行训练,直至它们完成一次回避(T形迷宫获取)。在试验之间以35秒间隔进行训练,并且蜂鸣器具有55dB发出的门铃型声音,并且电击设定为0.35mA(Coulbourn Instruments乱序格板电击器E13-08型)。通过连续试验,在一周后测试T形迷宫保持。该结果表示为达到保持试验的标准的试验次数。标准定义为在6次连续尝试中5次避免轻微足部电击。

[0072] 物体-位置识别

[0073] 物体-位置识别是陈述性记忆任务,其涉及海马,当在此处进行时,在初始暴露于物体之后,保持暴露间隔为24小时[Farr等人,2012]。在进入物体之前,每天5分钟使小鼠习惯空的设备,持续3天。在训练课程期间,使小鼠暴露于两个相似的物体(塑料青蛙),允许小鼠对其检查5分钟。在每一小鼠之间清洁设备和物体。24小时之后,将小鼠暴露于一个原始物体以及新位置的新奇物体。记录检查物体所消耗的时间的百分数。新奇物体由与原始物体相同的材料制成并具有相同的尺寸,但具有不同的形状。这消除了与特定物体相关的气味成为混淆因素的可能。该任务的基本概念是基于小鼠花费更多时间来探索新鲜的新奇物体而非熟悉物体的癖好。因此,24小时的保持/记忆越多,对新物体花费的时间越多。

[0074] 牛奶增强的踏板

[0075] 踏板是程序性(操作式)联想学习和记忆任务。将小鼠放入完全自动化的踏板室内。压动在隔室的一个壁上的板引发轻的液体长柄勺,使100 $\mu$ l牛奶出现在对面的壁上。在第1天,小鼠有11秒来获得奖赏;在所有随后天数内,小鼠有6秒获得奖赏。在周一、周三和周五给小鼠40分钟训练课程,持续2周。在试验开始之前使小鼠禁食16小时,从而提供进行该任务的动机。在完成课程时,立即将食物返回。以奖赏踏板的次数来测量获取[Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, Abdul HM, Xu L, Miller NE, Banks WA, Morley JE(2008)

Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* 149, 2628-2636]。

[0076] 脑部氧化应激

[0077] 样品制备

[0078] 脑部样品暂短地用Wheaton组织均化器于冰冷的细胞溶解缓冲剂(pH 7.4)中均质化,所述细胞溶解缓冲剂包含320mM蔗糖、1% mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.098mM MgCl<sub>2</sub>、0.076mM EDTA和蛋白酶抑制剂亮抑酶肽(0.5mg/mL)、胃酶抑素(0.7μg/ml)、抑肽酶(0.5mg/ml)和PMSF(40μg/ml)以及磷酸酶抑制剂混合物。然后用细胞溶解缓冲剂将均质化的样品稀释2倍。在均质化之后,用Fisher 550Sonic Dismembrator (Pittsburgh, PA, USA)在20%功率下超声处理小等份的均质化样品,并将其冷冻。剩下的均浆以3000g离心5分钟,并且将上清液细胞溶质和膜质部分转移出,放入另外一套管内。在添加400μl细胞溶解缓冲剂之后,将剩余的团块细胞核部分以3000g离心5分钟,并且去除上清液。将团块悬浮在20μl细胞溶解缓冲剂和抑制剂中。将上清液细胞溶质和膜质部分以10000g离心10分钟,并且将所得的上清液细胞溶质部分转移出,并放入另一套管内,留下团块膜质部分。所有超声处理的样品和部分在-70℃储存,直至用于其他实验。通过Pierce Bicinchoninic Acid (BCA) 来测量蛋白浓度。

[0079] 狭缝印迹分析

[0080] 蛋白羰基

[0081] 对于蛋白羰基检测,采用羰基的2,4-二硝基苯基脲(DNP)席夫碱加合物的狭缝印迹分析。在室温下将5μl样品等份与5μl的12%月桂基硫酸钠和10μl的2,4-二硝基苯基脲(来自OxyBlot™ Protein氧化试剂盒,Chemicon-millipore, Billerica, MA, USA)一起孵育20分钟,然后向每一样品添加包含在30%甘油中的Tris (2M)的7.5μl中和溶液。在衍生化之后,使用包含氯化钠、磷酸二氢钠和磷酸氢钠的1×磷酸盐缓冲液(PBS)将衍生化样品稀释至1μg/mL。将相应的样品溶液(250μl)一式两份地通过水真空压而迅速装载到硝化纤维素膜上。然后用新鲜的阻断液阻断所得的与蛋白结合的硝化纤维素膜90分钟,所述阻断液包含在25ml的含35.2g氯化钠、1.77g磷酸二氢钠、9.61g磷酸氢钠和1.6mL TWEEN的洗涤印迹(wash blot)中的750mg牛血清白蛋白(BSA),并用去离子水稀释至4L。然后将膜与在洗涤印迹中的多克隆RbxDNP(来自OxyBlot™ Protein氧化试剂盒,Chemicon-millipore, Billerica, MA, USA, 稀释1:100)一起孵育2小时。在三次用新鲜的洗涤印迹进行5分钟洗涤之后,然后将膜与多克隆抗兔IgG碱性磷酸酶(Chemicon, Temecula, CA, USA, 稀释1:8000)一起孵育1小时,并且用新鲜的洗涤印迹以5、10和10分钟三个增量来洗涤。在洗涤之后,使用用于碱性磷酸酶二次抗体的5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐/氮蓝四唑试剂溶液来比色地显影该膜。在显影之后,将印迹干燥并在CanoScan8800F (Canon)扫描仪上使用Adobe Photoshop来扫描,并且使用Scion Image软件(Scion Corporation)来分析。

[0082] 4-羟基-2-反式-壬烯醛(HNE)

[0083] 与蛋白结合的HNE的水平用作脂质过氧化反应的标记,并且如先前所述那样来测定[29]。对于与蛋白结合的HNE检测的狭缝印迹分析,将5μl样品等份在室温下与5μl 12%月桂基硫酸钠和10μl Laemmli缓冲剂一起孵育20分钟,然后使用包含氯化钠、磷酸二氢钠和磷酸氢钠的1×磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至1μg/ml。将相应的样品溶液(250μl)一式两份

地通过水真空压而迅速装载到硝化纤维素膜上。然后用新鲜的阻断液将所得的与蛋白结合的硝化纤维素膜阻断90分钟。然后将该膜与在洗涤印迹中的多克隆抗-HNE (Alpha diagnostic, San Antonio, TX, USA, 稀释1:5000) 一起孵育2小时。在用新鲜的洗涤印迹进行三次5分钟洗涤之后,然后将膜与多克隆抗兔IgG碱性磷酸盐 (Chemicon, Temecula, CA, USA, 稀释1:8000) 一起孵育1小时,并且用新鲜的洗涤印迹以5、10和10分钟三个增量来洗涤。在洗涤之后,使用用于碱性磷酸酶二次抗体的5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐/氮蓝四唑试剂溶液来比色地显影该膜。在显影之后,将印迹干燥并在CanoScan8800F (Canon) 扫描仪上使用Adobe Photoshop来扫描,并且使用Scion Image软件 (Scion Corporation) 来分析。

[0084] 3-硝基酪氨酸 (3-NT)

[0085] 3-NT水平用作蛋白氧化损伤的额外标记 [Suh等人, 2001; Butterfield DA, Stadtman ER (1997) Protein oxidation processes in aging brain. *Adv Cell Aging Gerontol* 2, 161-191]。样品 (5 $\mu$ L) 在室温下于5 $\mu$ L 12% SDS和10 $\mu$ L Laemmli缓冲剂 (0.125M Trizma碱, 4% SDS, 20% 甘油) 中孵育20分钟。将每个狭缝的样品 (250ng蛋白) 点在硝化纤维素膜上。使用对3-NT有特异性的一次兔抗体 (Sigma-Aldrich) (1:1000)。然后,将相同的二次山羊抗兔抗体 (Sigma-Aldrich) 用于检测每一个一次抗体。将印迹如上文对蛋白羰基所述的那样来显影和量化。如上文对蛋白羰基所述的那样来进行显影和检测。

[0086] 甘油三酯

[0087] 使用来自Pointe Scientific, Inc. (Canton, MI) 的包含线性端点显色反应的酶测定系统来量化血清甘油三酯。样品中的甘油三酯被脂肪酶水解成甘油。然后,甘油被甘油激酶和ATP磷酸化成甘油-3-磷酸酯 (G<sub>3</sub>P) 和ADP。将G<sub>3</sub>P转化成二羟基丙酮磷酸酯 (DAP) 和过氧化氢。在由过氧化物酶催化的反应中过氧化氢与4-氨基安替比林 (4-AAP) 和3-羟基-2,4,6-三溴苯甲酸 (TBHB) 反应以产生红色的醌亚胺染料。使用Bio-Rad微板读数器 (Hercules, CA) 在540nm测量产生的颜色的强度。

[0088] 统计

[0089] 使用方差分析 (ANOVA) 来分析结果以检查组间差异。在T形迷宫中的获取和保持的测量值是达到标准的试验数。物体认识的结果以探索新奇物体所花费的时间除以探索总时间的百分数形式表示。踏板通过二因子重复测量ANOVA来分析。结果以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示。Tukey或Bonferroni事后分析用于比较组间平均值。Dunnett用于与SAMP8载剂对照组进行比较。使用Mann-Whitney U检验来分析脑组织氧化应激参数。

[0090] 结果

[0091] 含60%CA的迷迭香提取物 (CA60): 以下讨论的结果在图1中示出。

[0092] 行为试验

[0093] T形迷宫: 达到T形迷宫获取试验的标准的试验的单因子ANOVA表明显著的治疗效力 $F(4, 48) = 8.98, p < 0.001$ 。Bonferroni事后检验表明接受32mg/kg CA的SAMP8小鼠与接受载剂的小鼠相比采用显著更少的试验来达到标准。此外,接受32mg/kg CA的小鼠与50% SAM对照小鼠没有显著性差异。达到T形迷宫保持试验的标准的试验的单因子方差分析表明显著的治疗效力 $F(4, 47) = 7.25, p < 0.001$ 。Bonferroni事后分析表明接受32、16和1.6mg/kg CA的SAMP8小鼠与接受载剂的SAMP8小鼠相比采用显著更少的试验来达到标准。接受32、16和1.6mg/kg CA的小鼠与50% SAM小鼠没有显著性差异。

[0094] 物体识别:在24小时保持试验上探索新奇物体所花费的时间的单因子方差分析产生了显著的治疗效力 $F(4,46) = 4.88, p < 0.003$ 。Bonferroni事后检验表明接受32和16mg/kg CA的SAMP8小鼠与接受载剂的SAMP8小鼠相比花费显著更多的时间来探索新奇物体。接受32和16mg/kg CA的SAMP8小鼠与50%SAM对照没有显著性差异。

[0095] 踏板:治疗和天数的二因子重复测量方差分析(评价受奖赏的踏板的次数)产生了治疗的显著效力 $F(4,257) = 17.27, P < 0.001$ 和天数的显著效应 $F(5,257) = 15.31, P < 0.001$ 。相互作用治疗 $\times$ 天数是非显著的 $F(20,257) = 3.78, NS$ 。Tukey事后分析表明在第3、4、5和6天,接受32mg/kg CA的SAMP8小鼠与接受载剂对照的SAMP8小鼠相比收到了显著更多的奖赏。在第4、5和6天,接受16mg/kg CA的SAMP8小鼠与接受载剂对照的SAMP8小鼠相比受到了显著更多的奖赏。

[0096] 甘油三酯水平

[0097] 给药CA60的小鼠的甘油三酯水平的单因子方差分析是非显著的 $F(4,50) = 2.42$ 。

[0098] 脑部氧化应激

[0099] Mann-Whitney U检验表明与给药作为载剂对照的葵花油的SAMP8相比,CA60在1.6和32mg/kg CA下显著减少了皮质中的4-羟基壬烯醛(HNE)。CA60对皮质内的3-硝基酪氨酸(3-NT)或蛋白羰基没有显著的作用(参见图2)。CA60在16mg/kg CA下显著增加纹状体中的蛋白羰基,但对HNE或3-NT没有作用(参见图3)。CA60在16mg/kg CA下显著增加了海马中的蛋白羰基。CA60对海马中的3-NT没有作用(参见图4)。

[0100] 含10%CA的迷迭香提取物(CA10):以下讨论的结果在图2中示出。

[0101] 行为试验

[0102] T形迷宫:达到T形迷宫获取期间的标准的试验的单因子方差分析表明组的显著效力 $F(4,44) F = 5.914, p < 0.001$ 。Bonferroni事后检验表明接受载剂的50%SAM小鼠与接受32、1.6mg/kg CA或载剂的SAMP8小鼠相比花费显著更少的试验来达到标准。接受16mg/kg CA的小鼠与接受载剂的50%SAM或接受载剂的SAMP8小鼠没有显著性差异。达到T形迷宫保持试验的标准的试验的方差分析表明显著的治疗效力 $F(4,44) = 4.04, p < 0.007$ 。Dunnett事后检验表明接受16mg/kg CA的小鼠与接受载剂的SAMP8小鼠相比采用显著更少的试验来达到标准。

[0103] 物体识别:探索新奇物体所消耗的时间的单因子方差分析是非显著的 $F(4,44) = 2.249; p < 0.08$ 。

[0104] 踏板:治疗和天数的二因子重复测量方差分析(用于评价受奖赏的踏板的次数)产生了治疗的显著效力 $F(4,253) = 6.74, P < 0.001$ 和天数的显著效应 $F(5,253) = 7.53, P < 0.001$ 。相互作用治疗 $\times$ 天数是非显著的 $F(20,253) = 1.83$ 。Tukey事后分析表明在第3、4、5和6天,受收32mg/kg CA和16mg/kg CA的小鼠与接受载剂的小鼠相比受到了显著更多的奖赏。

[0105] 甘油三酯水平

[0106] 在给药CA10之后,甘油三酯水平的单因子方差分析表明显著的效力 $F(4,47) = 3.11, P < 0.02$ 。Tukey事后检验表明50%SAM小鼠与接收1.6mg/kg CA的SAMP8小鼠相比具有显著更高的甘油三酯水平。在任何其他组之间没有其他的显著性差异。

[0107] 脑部氧化应激



[0108] Mann-Whitney U检验表明与SAMP8载剂治疗对照相比,CA10在32mg/kg CA下显著减少皮质中的HNE,在16mg/kg CA下显著减少皮质的3-NT并且在16和32mg/kg CA下显著增加蛋白羰基(参见图6)。此外,CA10对纹状体中HNE、3-NT或蛋白羰基没有作用(参见图7)。最后,与载剂治疗的SAMP8相比,CA10于16mg/kg CA下显著减少了海马中3-NT和蛋白羰基(参见图8)。

[0109] 含5%RA的留兰香提取物(RA5):以下讨论的结果在图3中示出。

[0110] 行为试验

[0111] T形迷宫:达到T形迷宫获取试验的标准的试验的单因子方差分析表明显著的治疗效力 $F(4, 52) = 6.38, p < 0.001$ 。Bonferroni事后检验表明接受32和16mg/kg RA的SAMP8小鼠与接受载剂的小鼠相比采用显著更少的试验来达到标准。达到T形迷宫保持试验的标准的试验的单因子方差分析表明显著的治疗效力 $F(4, 50) = 12.77, p < 0.001$ 。Bonferroni事后分析表明接受32、16和1.6mg/kg RA的SAMP8小鼠与接受载剂的SAMP8小鼠相比采用显著更少的试验来达到标准。接受32、16和1.6mg/kg RA的小鼠与50%SAM对照小鼠没有显著性差异。

[0112] 物体识别:探索新奇物体所消耗的时间的单因子方差分析产生显著的治疗效力 $F(4, 47) = 2.79; p < 0.03$ 。Dunnett事后检验表明接受32和16mg/kg RA的小鼠与接受载剂的SAMP8小鼠相比花费显著更多的时间来探索新奇的物体。

[0113] 踏板:治疗和天数的二因子重复测量方差分析(用于评价受奖赏的踏板的次数)产生了治疗的显著效力 $F(4, 257) = 6.18, P < 0.001$ 和天数的显著效应 $F(5, 257) = 40.98, P < 0.001$ 。相互作用治疗 $\times$ 天数是非显著的 $F(20, 257) = 2.44$ 。Tukey事后分析表明在接受RA5的SAMP8小鼠与接受载剂的SAMP8小鼠之间没有显著差异。

[0114] 甘油三酯水平

[0115] 治疗后的甘油三酯水平的单因子方差分析产生显著的效力 $F(4, 44) = 4.06, P < 0.006$ 。Tukey事后分析表明与接受载剂的SAMP8小鼠和接受1.6mg/kg RA的SAMP8小鼠相比,50%SAM对照小鼠具有显著更高的甘油三酯水平。没有其他组间差异。

[0116] 脑部氧化应激

[0117] Mann-Whitney U检验表明RA5显著减少了接受16和32mg/kg RA的小鼠的皮质中的HNE,并在32mg/kg RA下减少了3-NT。RA5对皮质中蛋白羰基没有作用(参见图10)。此外,RA5对纹状体内HNE或3-NT没有作用。在纹状体内,与载剂治疗的对照SAMP8小鼠相比,接受RA5的小鼠在1.6和16mg/kg RA下具有显著更高的蛋白羰基水平。RA5在16mg/kg RA下显著降低了海马中的3-NT和蛋白羰基的水平(参见图12)。

[0118] 讨论

[0119] 在当前的研究中,包含CA或RA的提取物改善了学习和记忆。总之,CA对陈述性记忆和程序性记忆具有效力。T形迷宫和物体认识均测试了陈述性记忆,而操作式踏板测试了程序性学习和记忆。我们发现含60%CA的迷迭香提取物改善了陈述性学习和记忆以及程序性学习和记忆。具有10%CA的迷迭香提取物改善了陈述性记忆以及程序性学习和记忆,如在踏板操作式任务中所评价的。具有5%RA的留兰香提取物改善了陈述性学习和记忆。没有一种化合物对体重具有作用。

[0120] CA和RA以剂量-反应方式起作用。这并不令人惊讶,因为大部分记忆增强化合物显示毒物兴奋效应,在该现象中存在记忆增强的最佳剂量,低于该剂量时该化合物是无效的,

而高于该剂量时化合物产生损害,因此产生了所谓的“反U”型剂量-反应曲线。这先前在使用迷迭香酸的水迷宫试验中有所报道,并且在抗焦虑能力中有所报道,如在高架十字迷宫中所试验的[Park等人,2010;Butterfield等人,1997]。这种先前的研究使用了在正常健康、未衰老大鼠模型中的“应激”条件并且发现认知增强能力。迷迭香酸在用A $\beta$ 注射的小鼠中保护免于A $\beta$ 毒性[Pereira P,Tysca D,Oliveria P,da Silva Brum LF,Picada JN,Ardenghi P(2005)Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid.Pharmacol Res 52,199-203]。在当前的研究中,我们发现迷迭香酸在天然过度产生A $\beta$ 的小鼠模型中保护记忆。

[0121] 在当前研究中的发现与先前在SAMP8小鼠中补充抗氧化剂之后的发现类似。 $\alpha$ 硫辛酸仅在一周治疗之后在12月龄的SAMP8小鼠中改善了学习和记忆,并且仅在2周之后在18月龄的SAMP8小鼠中改善了学习和记忆[Farr等人,2003;Pereira等人,2005]。在鱼油中发现的抗氧化剂二十二碳六烯酸在SAMP8小鼠中还改善了学习和记忆[Alkam等人,2007]。富含抗氧化剂花青素的桑椹提取物的补充导致回避学习和记忆改善,胆固醇降低和SAMP8小鼠中氧化应激的指标降低[Farr SA,Price TO,Banks WA,Ercal N,Morley JE(2012)Effect of Alpha-Lipoic Acid on Memory,Oxidation and Lifespan in SAMP8 Mice.J Alzheimer's Dis(In Press)]。此外,这些发现是令人鼓舞的,因为上文提及的分子/提取物中的几个已经在随后的人类临床试验中显示对认知的正面作用,表明该模型从啮齿动物到人类的可预测和可转移的性质[Petursdottir等人,2008;Shih PH,Chan YC,Liao JW,Wang MF,Yen GC(2010)Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease.J Nutr Biochem 21,598-605]。

[0122] 蛋白和脂质氧化在SAMP8小鼠脑部中随着年龄而出现[Butterfield等人,1997;Poon等人,2005;Pereira等人,2005]。蛋白和脂质在细胞的正常结构和功能中发挥重要作用[Butterfield DA,Reed T,Sultana R(2011)Roles of 3-nitrotyrosine-and 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease.Free Radic Res 45,59-72]。异常细胞功能和最终的细胞死亡可以通过细胞中蛋白的氧化修饰而出现[Lee HC,Wei YH(2012)Mitochondria and aging.Adv Exp Med Biol 942,311-327]。在当前的研究中,灵敏的免疫化学方法用于测定使用抗氧化剂的治疗是否对蛋白羰基水平具有作用。我们的结果表明海马中的蛋白氧化降低(在给药具有10%CA的迷迭香提取物或具有5%RA的留兰香提取物之后)以及皮质中的脂质氧化降低(在给药所有提取物之后)。已经发现海马和皮质对于T形迷宫学习和记忆是重要的区域[Farr SA,Banks WA,La Scola ME,Flood JF,Morley JE(2000)Permanent and temporary inactivation of the hippocampus impairs T-maze footshock avoidance acquisition and retention.Brain Res 872,242-249;Farr SA,Uezu K,Creonte TA,Flood JF,Morley JE(2000)Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice.Pharmacol Biochem Behav 65,363-368]。此外,研究已经发现,当使用24小时保持延迟时,海马对物体识别中的记忆是重要的[Hammond等人,2004]。我们的数据表明,具有鼠尾草酸的迷迭香提取物和具有迷迭香酸的留兰香提取物可有助于逆转随着SAMP8小鼠衰老和认知下降而出现的氧化变化。

[0123] 在当前研究中,口服补充抗氧化剂,即具有鼠尾草酸的迷迭香提取物和具有迷迭香酸的留兰香提取物,以测定它们是或否在认知功能障碍的SAMP8小鼠模型中对学习和记忆具有有益的作用。所述提取物产生大部分记忆增强化合物所显示的反U形剂量-反应曲线,并且确定了两种提取物的有效剂量。所试验的提取物在据报道受衰老和疾病的影响的陈述性记忆和程序性记忆两方面均显示有益作用。据我们所知,这是表明在给药具有鼠尾草酸的迷迭香提取物或具有迷迭香酸的留兰香提取物之后在由于加速衰老而导致的认知下降的小鼠模型中预防认知下降的首次研究。这些发现表明,具有鼠尾草酸的迷迭香提取物和具有迷迭香酸的留兰香提取物是用于年龄相关性认知下降的潜在治疗。

[0124] 所有三种提取物在三个任务中的至少两个任务中改善了学习和记忆。迷迭香提取物(具有CA)对陈述性记忆和程序性记忆具有作用。T形迷宫和物体识别测试了陈述性记忆。操作式踏板测试了程序性学习和记忆。留兰香提取物(具有RA)改善了所测试的所有陈述性记忆任务(T形迷宫获取和学习以及物体识别),但对程序性操作式学习和记忆没有作用。没有一种化合物对体重具有作用。目前CA和/或RA的使用与认知的结果测量直接相关。存在讨论能量和认知的迷迭香补充剂,但没有一个得到科学研究的支持,并且没有一个直接将原因与鼠尾草酸关联起来。这在我们的研究中显示出来,因为增加鼠尾草酸的含量增加了提取物的效力。

[0125] 与学习或记忆相关的认知行为结果测量未与CA关联,此外,学习结果测量未与RA关联。

[0126] 这些结果是令人惊讶的,这是因为具有不同化学结构和极性的两种完全不同的分子如何能够穿过血脑屏障并渗透脑部的不同区域的性质。一旦这些化合物渗透脑部的不同区域,它们导致认知性能的显著性能变化。在该研究之前,认为这些分子仅在脑部中具有一般的非特异性抗氧化作用。这些分子先前未与由脑部的不同区域产生的特定认知功能作用关联。该研究首次表明它们可以影响行为认知性能结果。此外,两种化合物不同地影响不同的性能结果,证明与导致那些认知结果的某些脑部区域的非常特异性的相互作用。这些结果证明这些分子以与由其他分子产生的一般非特异性抗氧化作用无关的方式发挥作用的特异性。

[0127] 实施例2

[0128] 鼠尾草酸的90天毒性研究

[0129] 该研究的目的是当每天管饲给药大鼠一次或两次并持续至少90天时,评价试样的毒性,所述试样为包含约10%鼠尾草酸(活性成分)的迷迭香提取物的悬浮液(在葵花油中)。

[0130] 将雄性和雌性Hsd:Sprague Dawley SD大鼠分配成组,并且如下表所示那样来给予剂量。动物管饲给药。

组	动物编号 a CA 剂量水平 a				CA 剂量浓度 b
	雄性	雌性	(mg/kg/剂)	(mg/kg/天)	(mg/mL)
1 (对照, BID 给药) <sup>c</sup>	10	10	0	0	0
[0131] 2 (低, BID 给药)	10	10	32.5	65	6.5
3 (中, BID 给药)	10	10	65	130	13.0
4 (中, SID 给药)	10	10	130	130	13.0
5 (高, BID 给药)	10	10	90	180	18.0

[0132] CA=鼠尾草酸;在试样中的活性成分。

[0133] BID=每天两次;每一天的剂量以约6小时间隔来给药(基于最后给药的动物/性别/组)

[0134] SID=每天一次。

[0135] <sup>a</sup>动物以10mL/kg/天给药;BID给药的动物的剂量以5mL/kg/剂来给药。

[0136] <sup>b</sup>对于批次特定的CA含量,对浓度进行修正。

[0137] <sup>c</sup>组1仅接受载剂对照样品(葵花油)。

[0138] 毒性的评估基于死亡率、临床征象、体重、体重变化、食物消耗、眼睛检查、功能观察组合试验(functional observation battery)(FOB)以及临床病理学和组织病理学。

[0139] 在葵花油中的包含约10%鼠尾草酸的迷迭香提取物向Sprague Dawley大鼠的口服给药在180mg/kg/天的剂量水平下是完全耐受的。在动物中规定130mg/kg/天的给药频率(SID或BID)不能对作用的性质或大小具有任何实质性差异。>65mg/kg/天的剂量导致对血液学和临床化学参数、器官重量变化、以及肝脏、肾脏、非腺胃、结肠和盲肠中的微观调查结果的非负面试样相关性作用。基于这种发现模式,180mg鼠尾草酸/kg/天当规定口服连续90天时被认为是未观察到副作用水平(NOEL)。通过180mg/kg/天的鼠尾草酸的NOEL以及提取物内精确为11.55%的CA浓度,NOEL会转换成1558mg/kg/天的迷迭香提取物。使用100倍安全系数,这会转换为15.58mg/kg/天人类当量剂量,或对于70kg的人类为1091mg。

[0140] 实施例3

[0141] 迷迭香酸的90天毒性研究

[0142] 该研究的目的是当每天管饲给药大鼠一次并持续至少90天时,评价试样的毒性,所述试样为包含约15%(w/w)迷迭香酸(活性成分)的迷迭香的干燥提取物,将其溶解在蒸馏水中。

[0143] 将雄性和雌性Hsd:Sprague Dawley SD大鼠分配成组,并且如下表所示那样来给予剂量。动物管饲给药。

组	动物编号		a RA 计量水平	a RA 剂量浓度
	雄性	雌性	(mg/kg/天)	(mg/mL)
[0144] 1 (对照) <sup>b</sup>	10	10	0	0
2 (低)	10	10	65	6.5
3 (中)	10	10	130	13
5 (高)	10	10	300	30

[0145] RA=迷迭香酸;在试样中的活性成分。

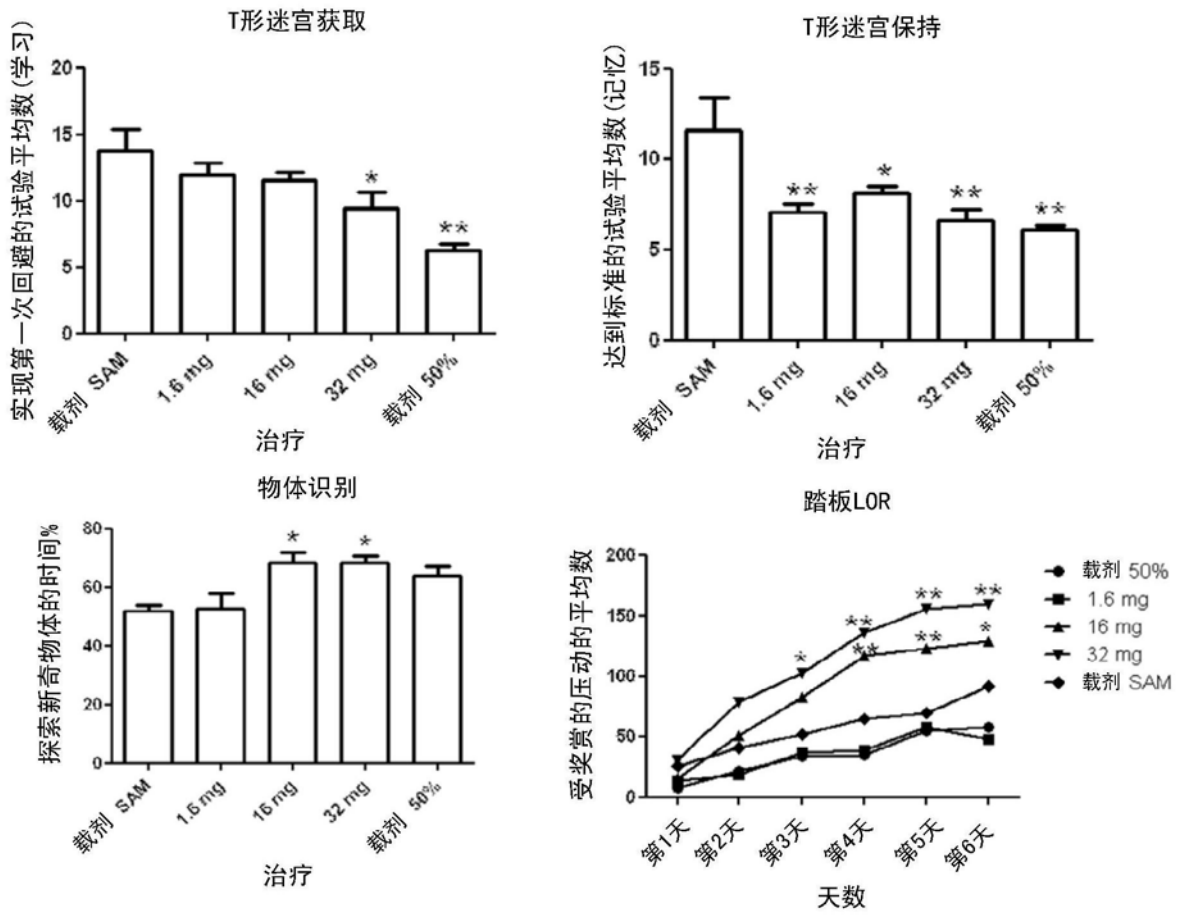
[0146] <sup>a</sup>以10mL/kg/天给药动物。

[0147] <sup>b</sup>组1仅接受载剂对照样品(蒸馏水)。

[0148] 毒性的评估基于死亡率、临床体征、体重、体重变化、食物消耗、眼睛检查、功能观察组合试验(FOB)以及临床病理学和组织病理学。

[0149] 持续90天的以高达300mg RA/kg体重/天的剂量的干燥留兰香提取物(包含约15%的作为活性成分的RA)向雄性和雌性Sprague Dawley大鼠的每日口服给药是完全耐受的。在所研究的任何参数中未观察到治疗相关的临床征象或副作用,所述参数包括体重、食物消耗、神经学参数、血液学、临床化学、大体病理学和组织病理学(gross and histopathology)。在脑垂体和甲状腺(thyroid lands)中观察到体重增加,然而在年龄和品系的历史规范之内,并且没有相应的组织病理学变化。因此发现,在所采用的试验条件和剂量下试验项目的“未观察到副作用水平(NOEL)”为300mg RA/kg体重/天(对应于1948.2mg/kg体重/天的干燥留兰香提取物)。使用100倍安全系数,这会对应于19.48mg/kg/天的干燥留兰香提取物的NOEL(对于人类当量剂量而言),其对于70kg人类会相当于1363.74mg/天。

[0150] 前面的描述和附图包括本发明的示例性实施方案。前面的实施方案和本文所述的方法可以根据本领域技术人员的能力、经验和偏好而变化。仅以某一顺序所列举的方法步骤不对该方法的步骤顺序构成任何限制。前面的描述和附图仅解释和例示本发明,而本发明不限于此,除非如此限定权利要求。已获得公开内容的本领域技术人员能够在不背离本发明的范围的情况下做出修改和改变。



\*表示P<0.05并且\*\*表示P<0.01

图1

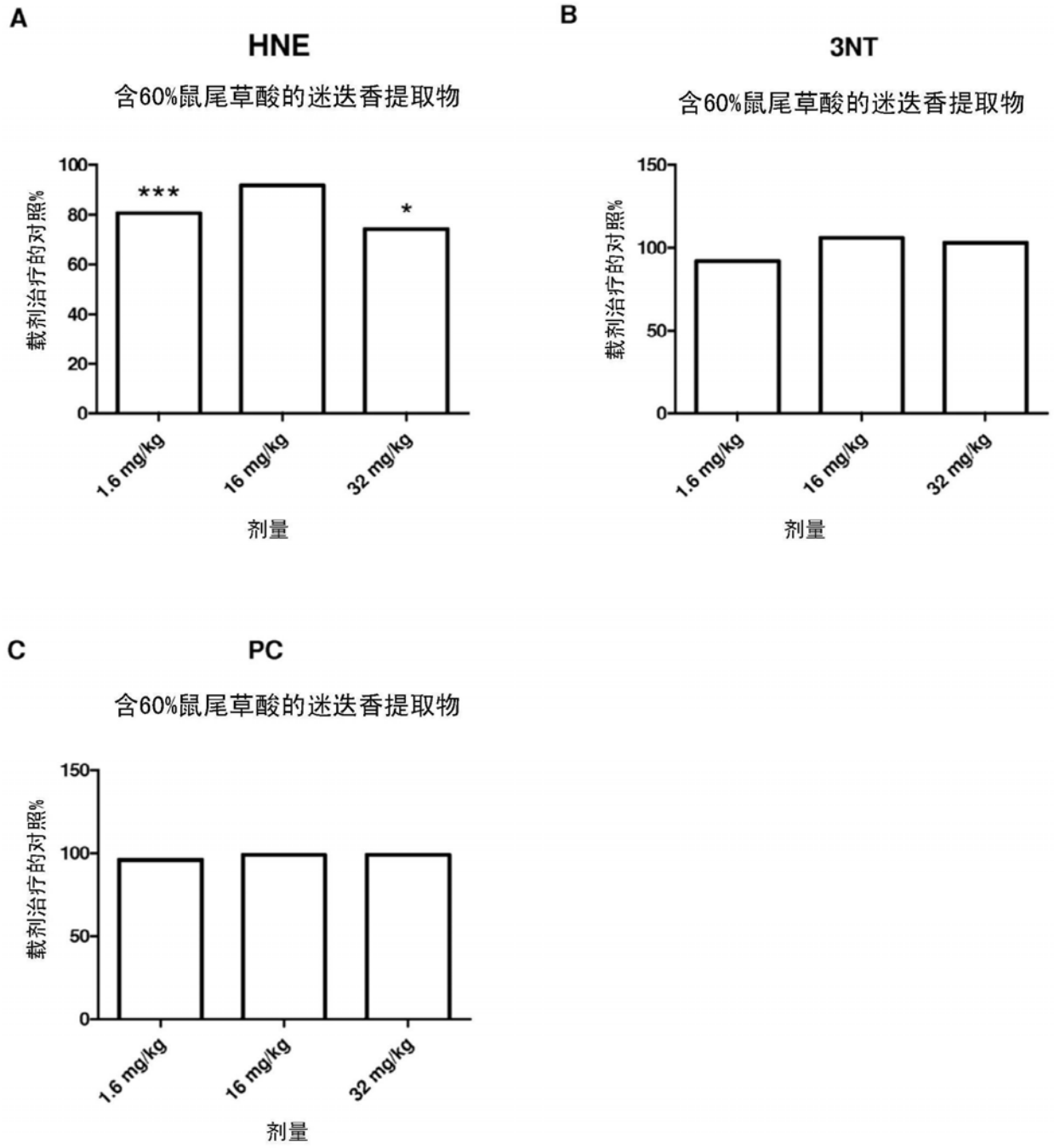


图2

纹状体

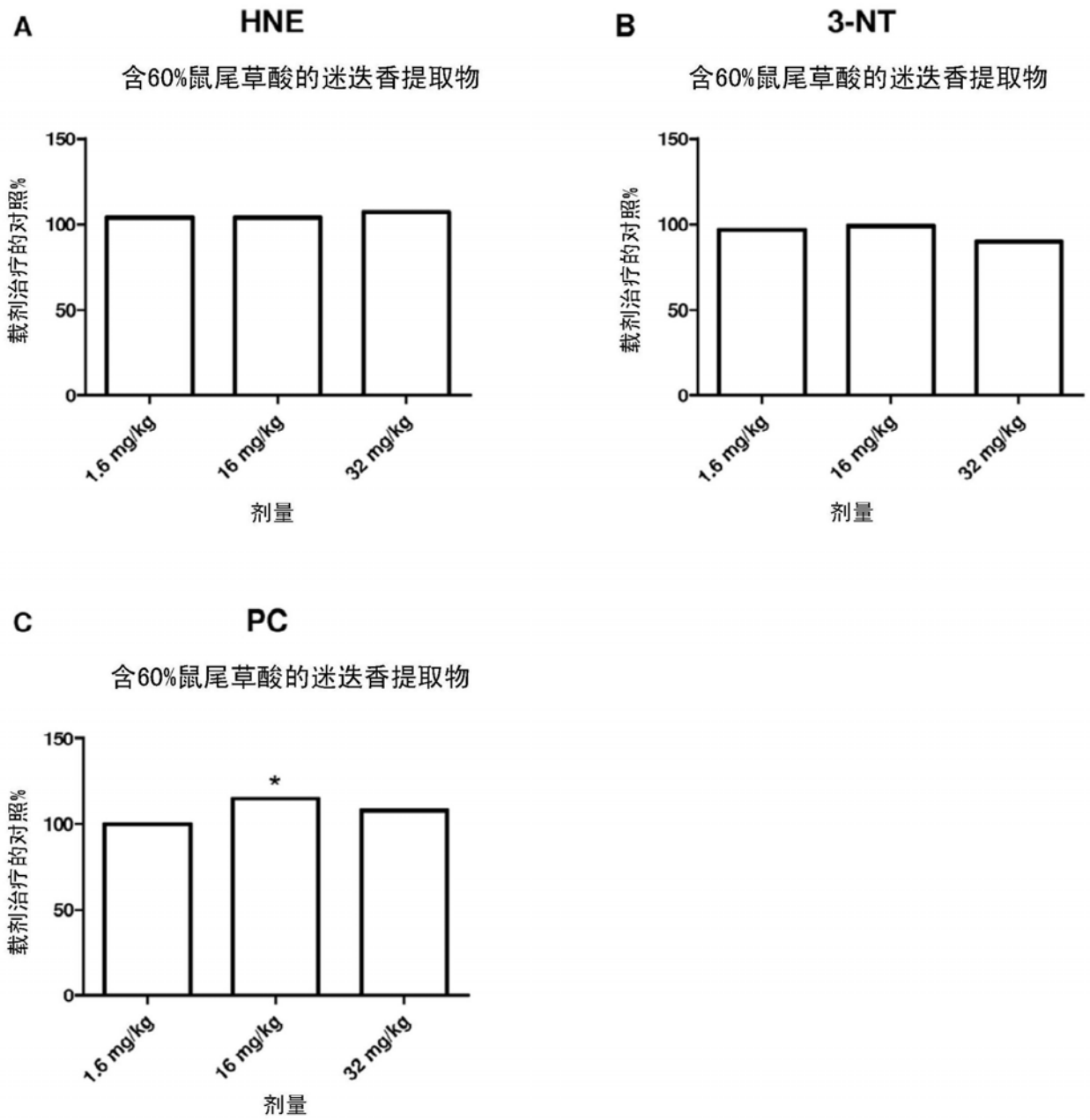


图3



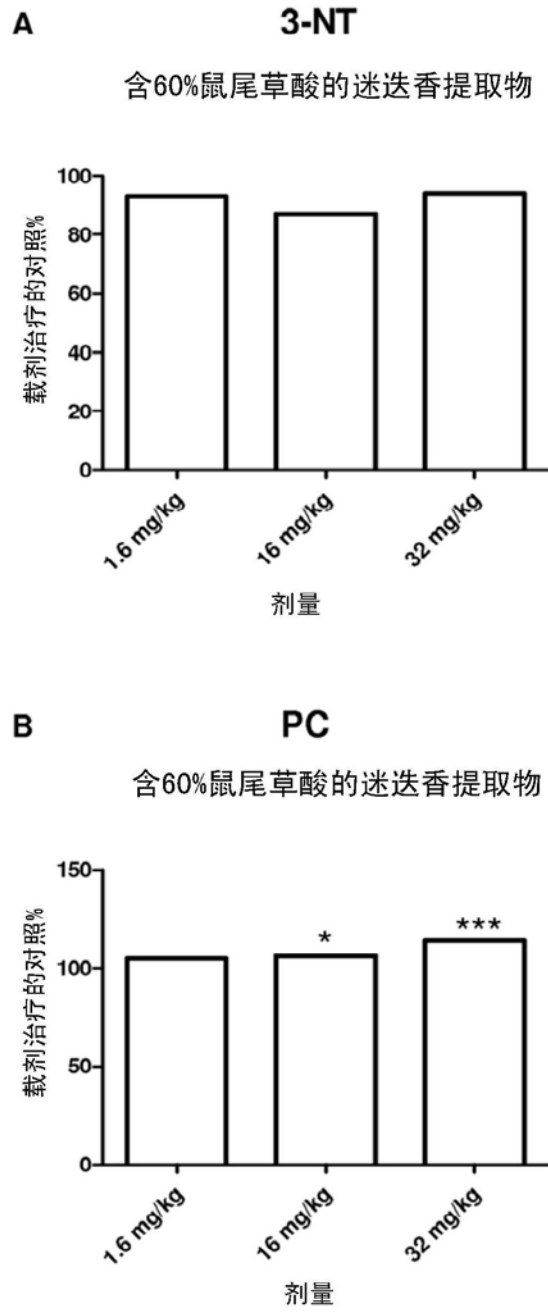
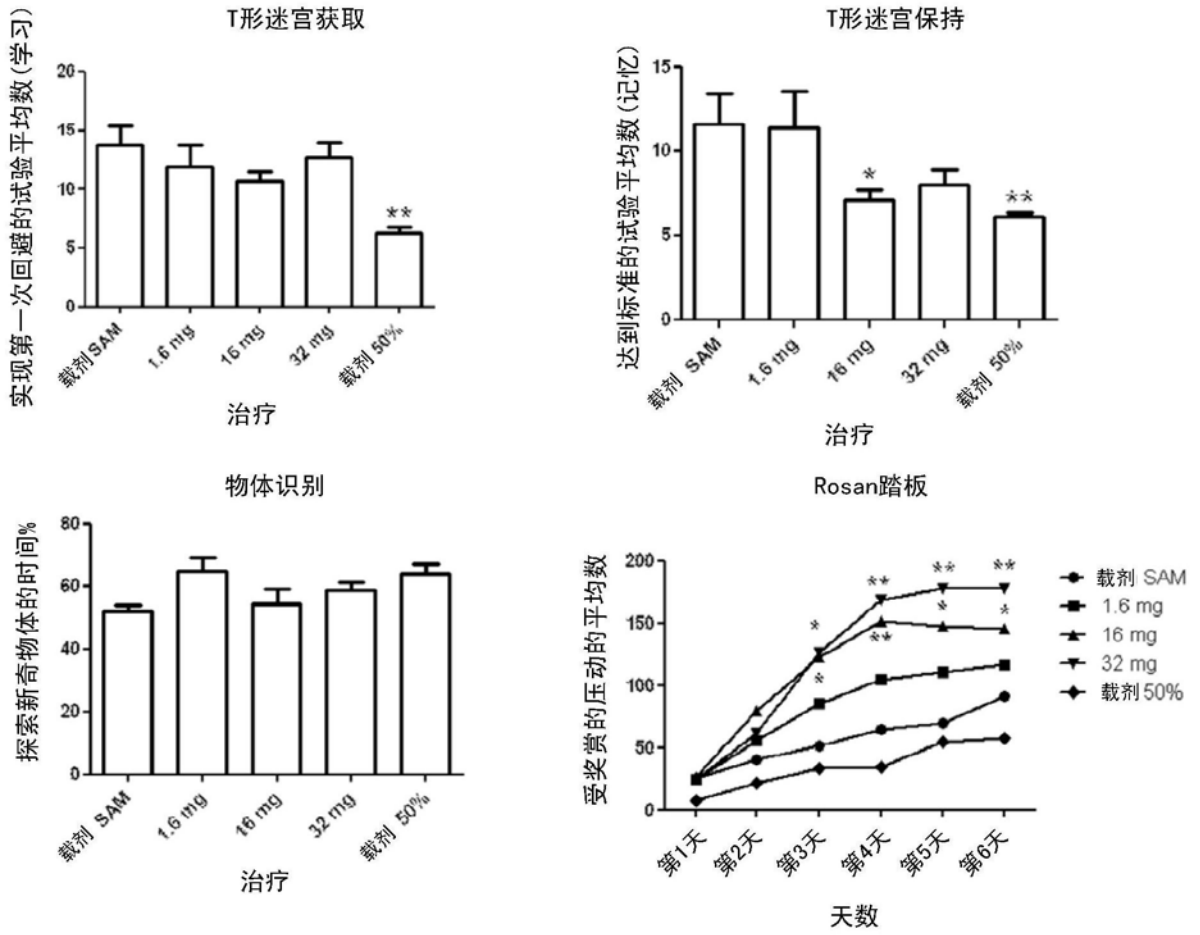


图4



\*表示P<0.05并且\*\*表示P<0.01

图5

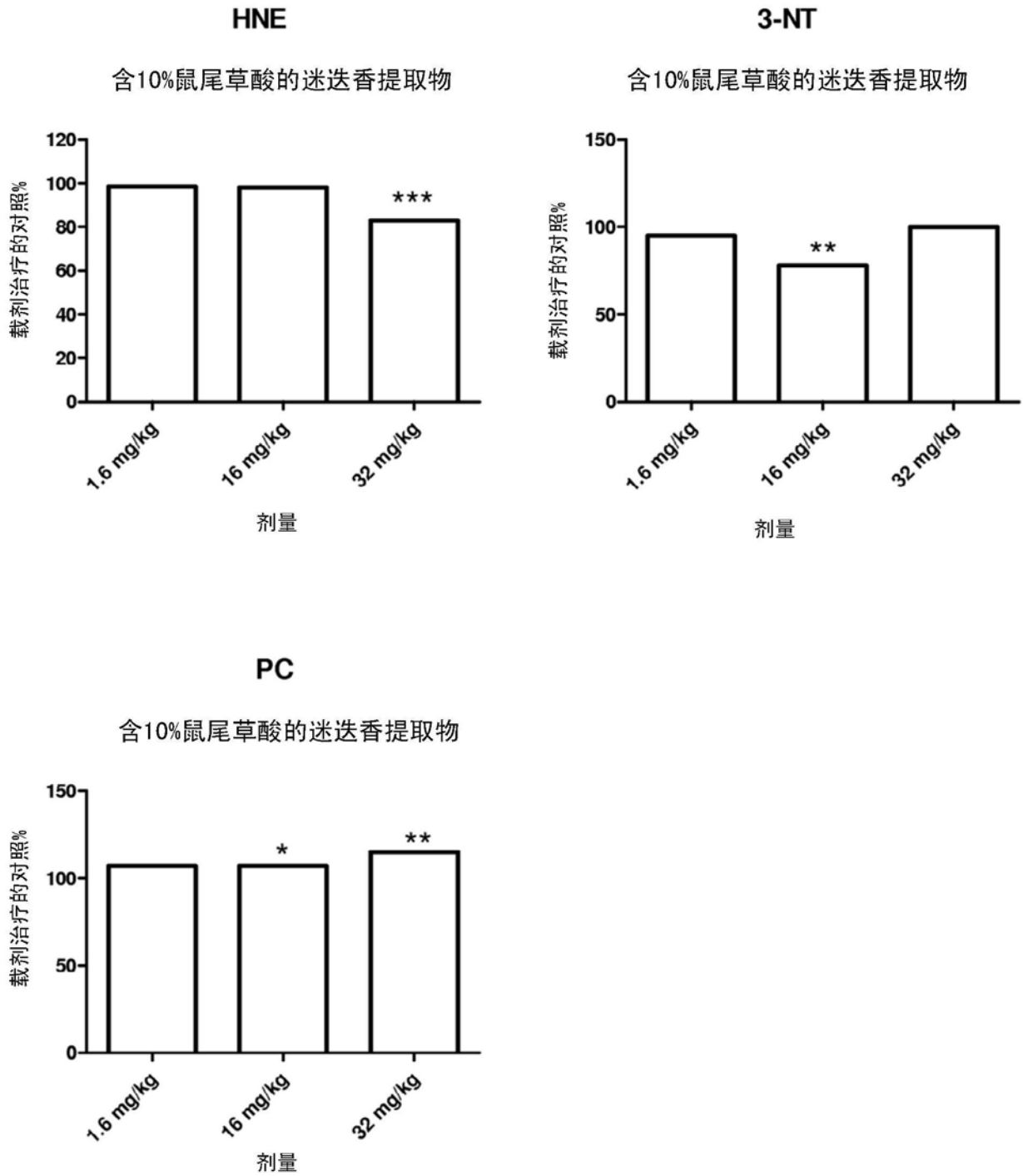


图6

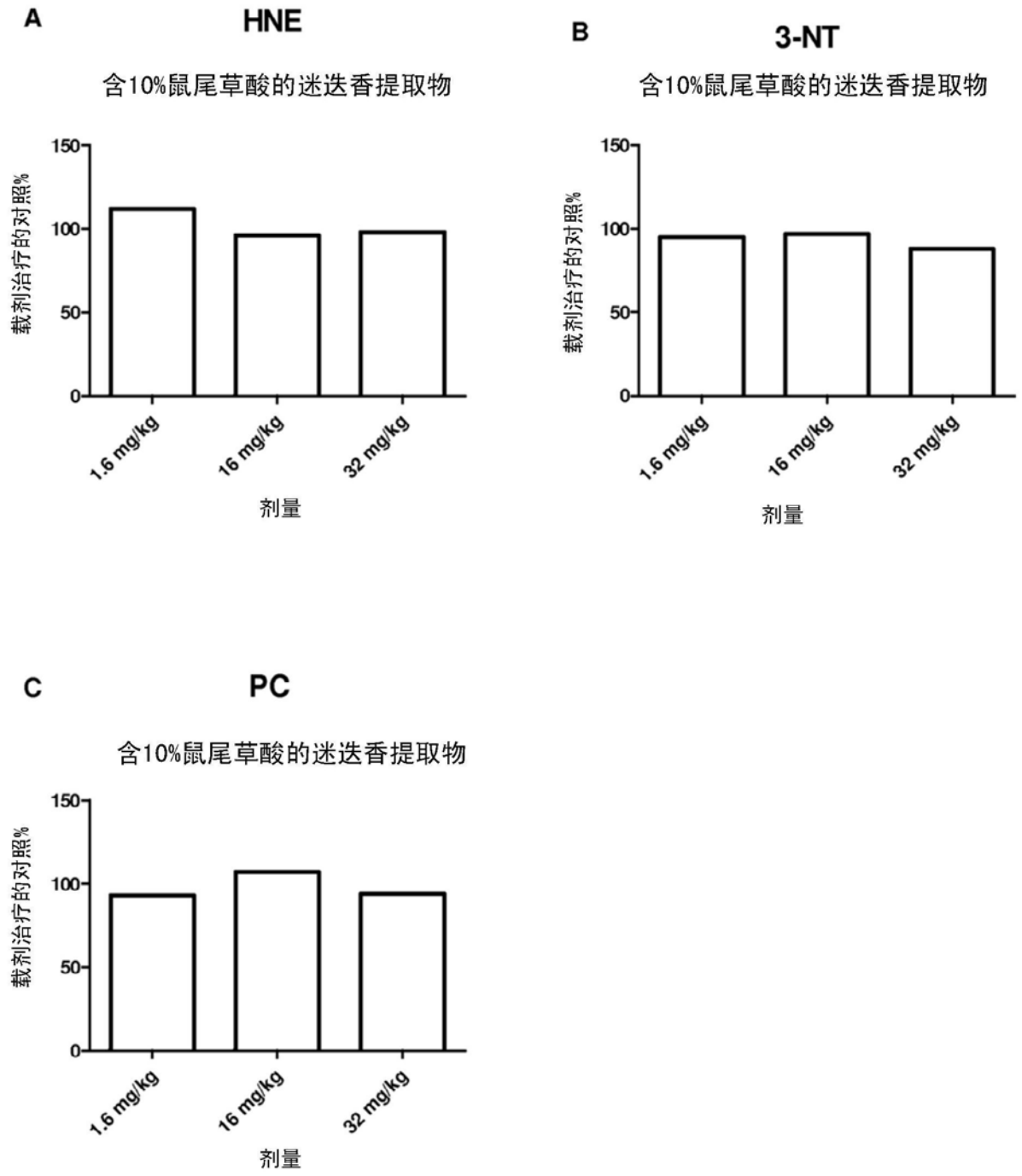


图7

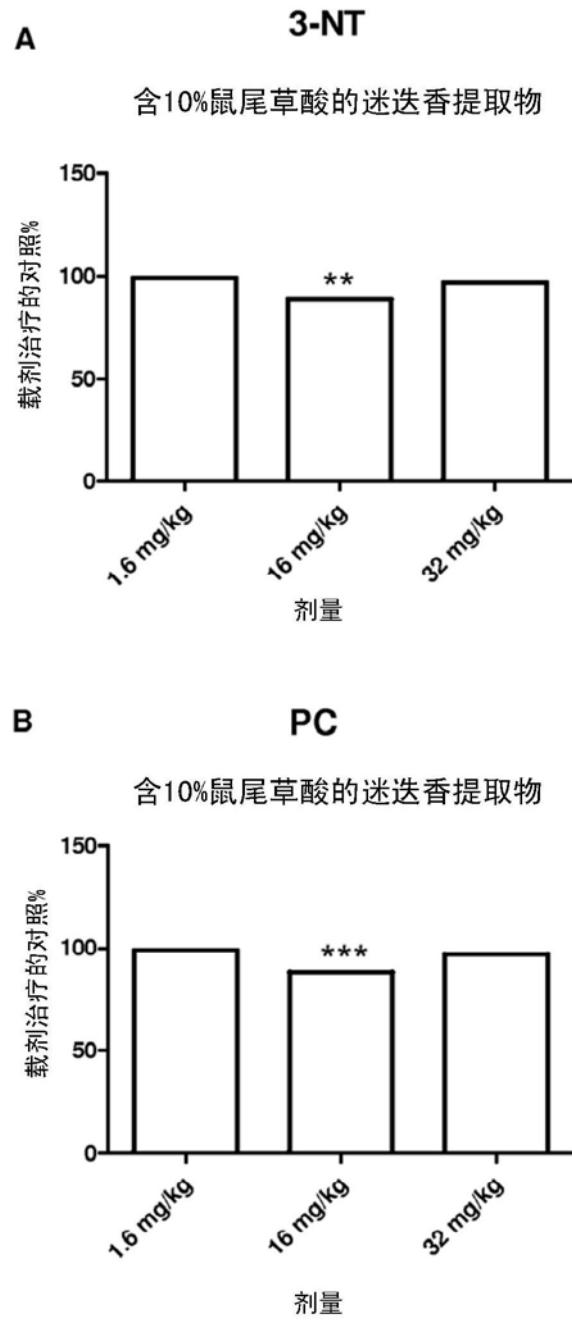
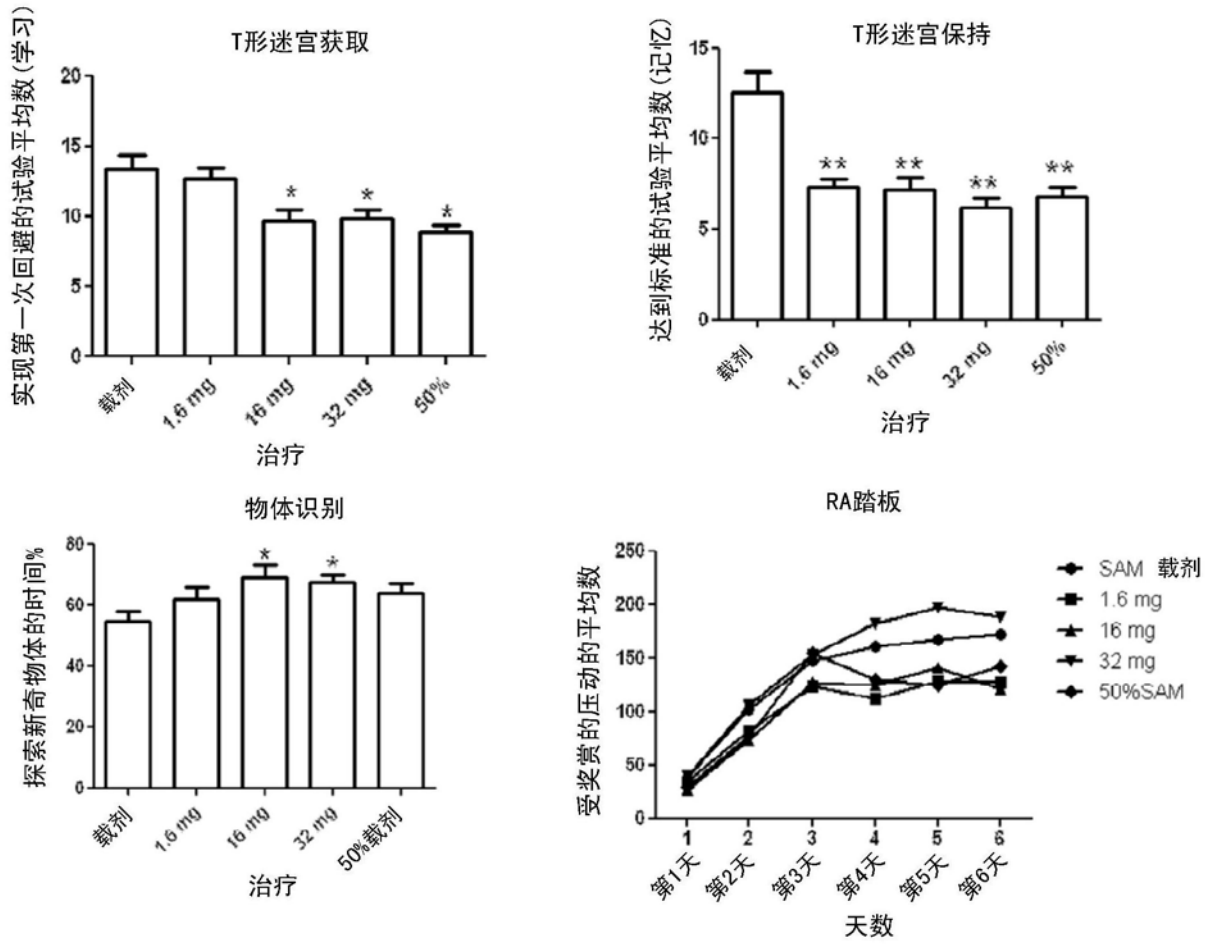


图8



\*表示P<0.05并且\*\*表示P<0.01

图9

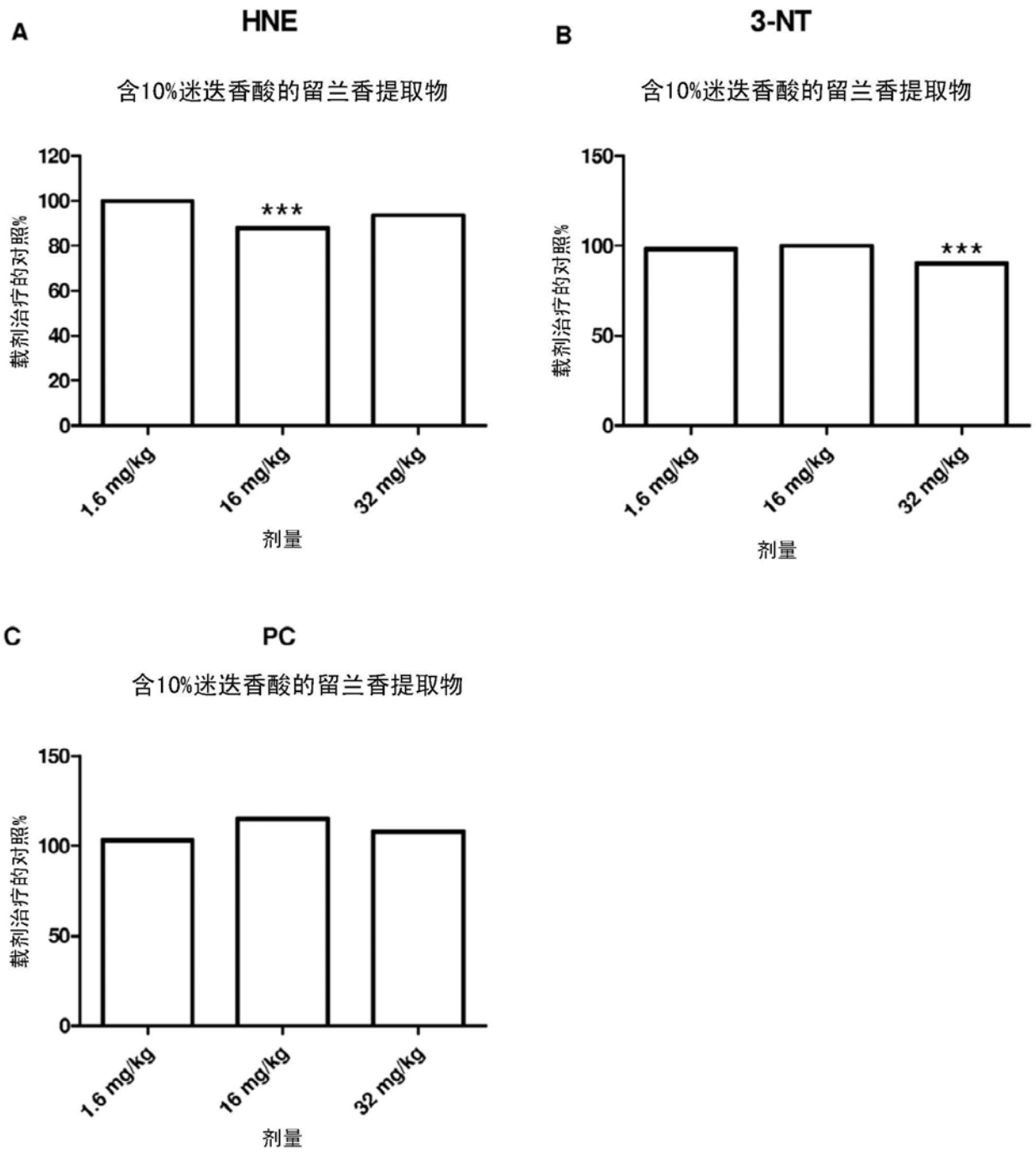


图10

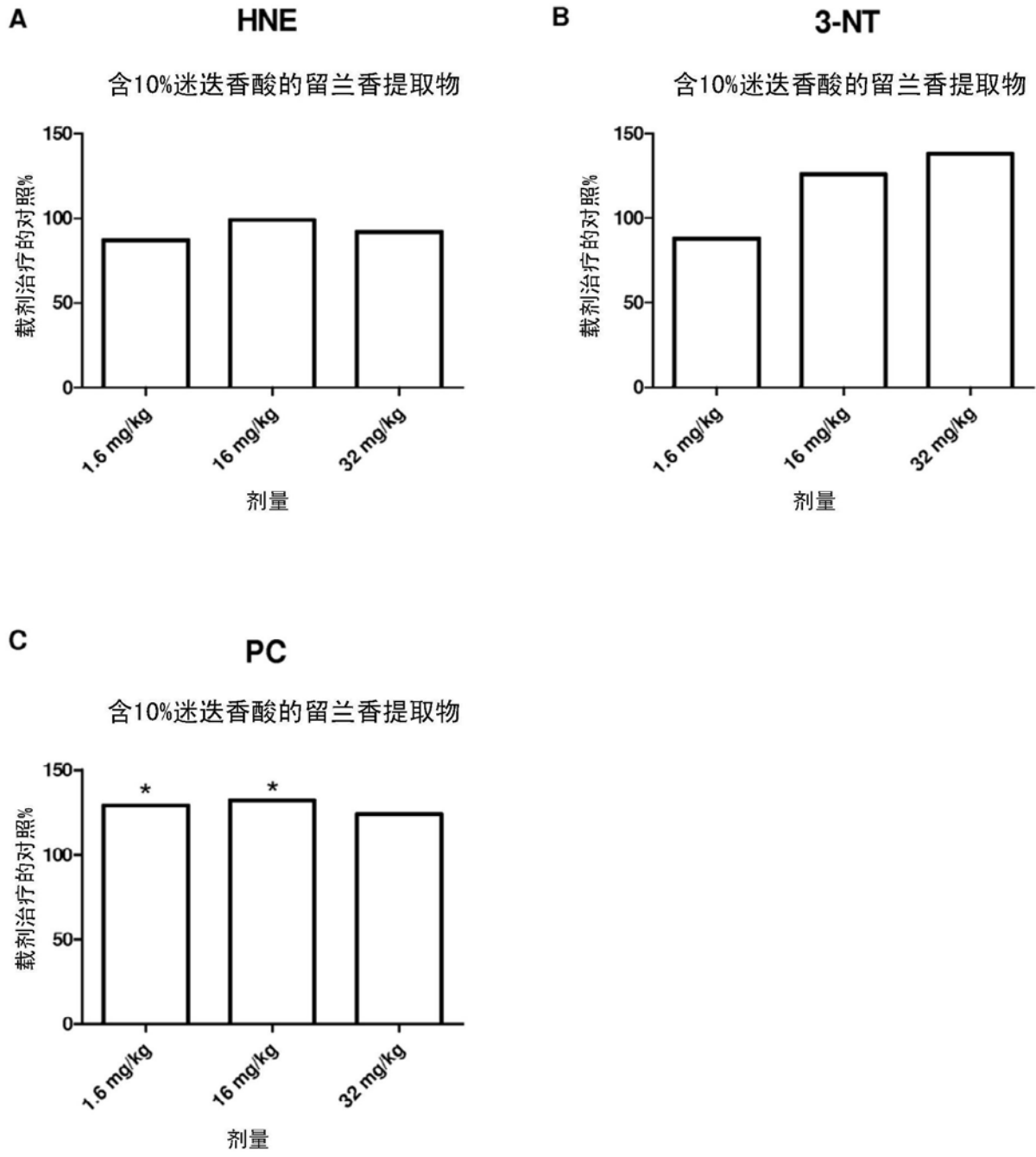


图11



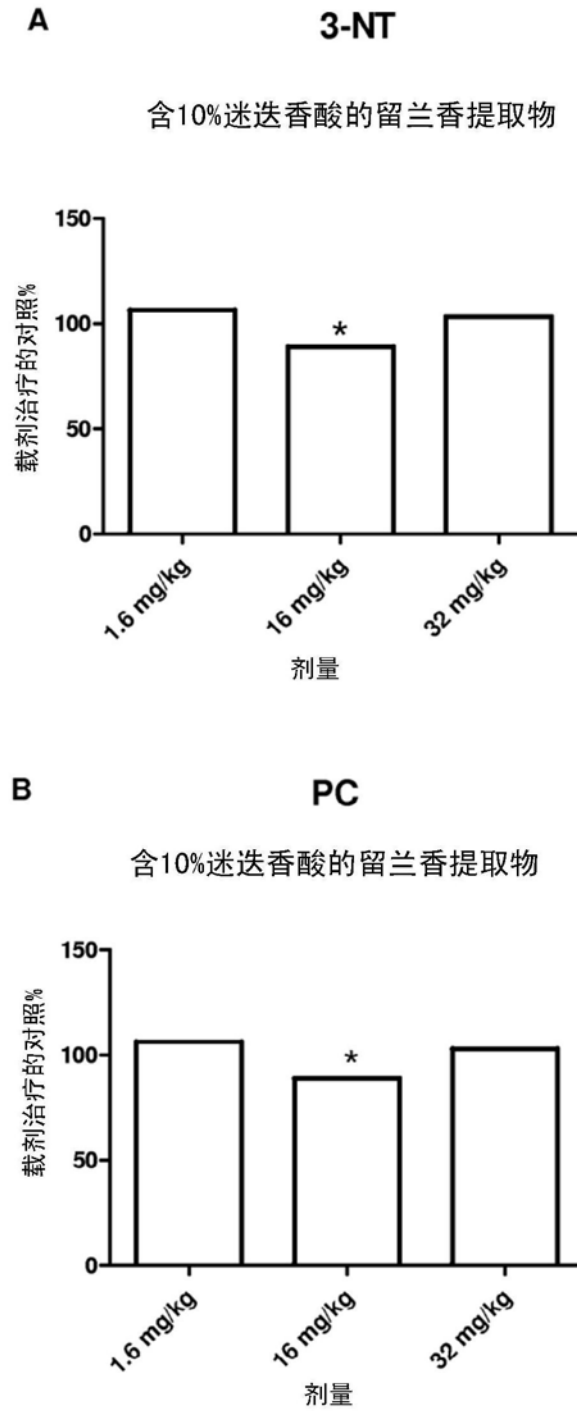


图12