



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113226343 B

(45) 授权公告日 2022.08.16

(21) 申请号 201980075381.0

(22) 申请日 2019.11.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113226343 A

(43) 申请公布日 2021.08.06

(30) 优先权数据
10-2018-0140505 2018.11.15 KR(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.05.14(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/015688 2019.11.15(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/101442 KO 2020.05.22(73) 专利权人 乡村振兴厅
地址 韩国全罗北道
专利权人 QBM有限公司(72) 发明人 池相德 金基荣 金南淑 赵柳英
金秀倍 金省完 金钟吉 金永国
高暎昊 金炯漠 崔宝兮 阮方
朴贤雨 徐胄源 金辉 宋美庚

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所(普通合伙) 31219

专利代理师 余明伟

(51) Int.Cl.

A61K 36/232 (2006.01)

A61K 35/64 (2015.01)

A23L 33/10 (2016.01)

A23L 33/17 (2016.01)

A23L 33/105 (2016.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

审查员 刘阳

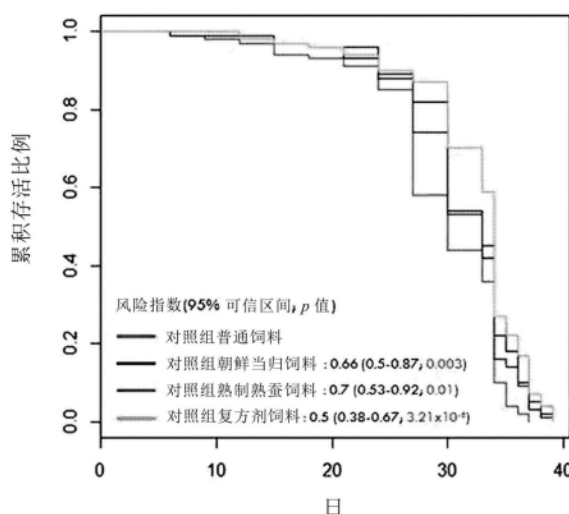
权利要求书1页 说明书24页 附图9页

(54) 发明名称

包含具有丝蛋白的熟制蚕加工物及当归提取物的用于改善记忆力的组合物或用于预防及治疗阿尔茨海默氏痴呆的组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于改善记忆力的组合物或用于预防及治疗阿尔茨海默氏痴呆的组合物或者上述组合物的制备方法或治疗方法,其特征在于,包含熟制蚕加工物及当归提取物作为有效成分。根据本发明,提供通过使用包含大量的丝蛋白和源自桑叶的功能性物质的熟制蚕加工物及当归提取物来改善记忆力及预防或治疗阿尔茨海默氏痴呆的组合物,由此,研发利用本发明的各种保健食品或医药品并商业化,从而可期待,可根本上预防及治疗成为现代社会一个重要问题的高龄化和高龄化引起的痴呆,同时,有助于改善学生、准备考试的人员、上班族等的各种国民的记忆力。



1. 一种用于改善记忆力的药学组合物, 其特征在于, 有效成分由熟制蚕加工物及当归提取物组成; 上述熟制蚕加工物与上述当归提取物的重量比为1:0.1~1:1; 上述当归提取物通过利用水、甲醇、乙醇或其组合处理当归来获取。

2. 根据权利要求1所述的用于改善记忆力的药学组合物, 其特征在于, 利用80℃~125℃的蒸汽的热量将整个蚕蒸熟100分钟~150分钟, 由此, 在包含丝蛋白的状态下, 能够食用摄取上述熟制蚕加工物。

3. 根据权利要求1所述的用于改善记忆力的药学组合物, 其特征在于, 上述蚕加工物的蚕品种为家蚕品种。

4. 一种用于预防或治疗阿尔茨海默氏痴呆的药学组合物, 其特征在于, 有效成分由熟制蚕加工物及当归提取物组成; 上述熟制蚕加工物与上述当归提取物的重量比为1:0.1~1:1; 上述当归提取物通过利用水、甲醇、乙醇或其组合处理当归来获取。

5. 根据权利要求4所述的用于预防或治疗阿尔茨海默氏痴呆的药学组合物, 其特征在于, 利用80℃~125℃的蒸汽的热量将整个蚕蒸熟100分钟~150分钟, 由此, 在包含丝蛋白的状态下, 能够食用摄取上述熟制蚕加工物。

6. 根据权利要求4所述的用于预防或治疗阿尔茨海默氏痴呆的药学组合物, 其特征在于, 上述蚕加工物的蚕品种为家蚕品种。

7. 一种如权利要求1至3中任一项所述的药学组合物在制备改善记忆力的药物或保健品中的应用。

8. 一种如权利要求4至6中任一项所述的药学组合物在制备预防或治疗阿尔茨海默氏痴呆的药物中的应用。

9. 一种如权利要求1至3中任一项所述的用于改善记忆力的药学组合物的制备方法, 其特征在于, 包括混合熟制蚕加工物与当归提取物的步骤。

10. 根据权利要求9所述的用于改善记忆力的药学组合物的制备方法, 其特征在于, 上述熟制蚕加工物通过利用80℃~125℃的蒸汽的热量将整个蚕蒸熟100分钟~150分钟的步骤制备。

11. 一种如权利要求4至6中任一项所述的用于预防或治疗阿尔茨海默氏痴呆的药学组合物的制备方法, 其特征在于, 包括混合熟制蚕加工物与当归提取物的步骤。

12. 根据权利要求11所述的用于预防或治疗阿尔茨海默氏痴呆的药学组合物的制备方法, 其特征在于,

上述熟制蚕加工物通过利用80℃~125℃的蒸汽的热量将整个蚕蒸熟100分钟~150分钟的步骤制备。

包含具有丝蛋白的熟制蚕加工物及当归提取物的用于改善记忆力的组合物或用于预防及治疗阿尔茨海默氏痴呆的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含具有丝蛋白的熟制蚕加工物及当归提取物的用于改善记忆力的组合物或用于预防及治疗阿尔茨海默氏痴呆的组合物,更详细地,提供如下的包含具有丝蛋白的熟制蚕加工物及当归提取物的用于改善记忆力的组合物或用于预防及治疗阿尔茨海默氏痴呆的组合物:随着结合示出记忆力改善及阿尔茨海默氏痴呆预防功效的两种物质,相对于单独物质,示出更明显的功效。

背景技术

[0002] 韩国的年生育率迅速下降。2017年,该指数创下1.05的历史最低值,这相比于经济合作与发展组织会员国2015年的平均值1.68低0.53。2017年12月的新生儿数为25000名,少于26900名的死亡人数,2018年,新生儿出生数进一步减少,1月~4月所出生的新生儿数减少至117300名,经预测,出生率减少至小于1.0。经预测,这种低生育率将韩国总人口减少的时间从2031年提前至2027年,由此,老年人人口比例也急速增加。

[0003] 2017年统计的韩国的65岁以上的老年人人口为14%的700万名,当如上所述的生育率减少和老龄化趋势持续时,在2060年将急速增加至总人口的41.0%左右,问题在于,65岁以上的老人在剩余的人生中遭受一种以上的慢性疾病的痛苦。其中,老年人最害怕的疾病为到目前为止尚未研发根治方法的痴呆。痴呆大致分为阿尔茨海默氏痴呆、血管性痴呆、帕金森痴呆等,其中,60%以上患有阿尔茨海默氏痴呆(Alzheimer's disease, AD),但是,尚未研发可预防或根治阿尔茨海默氏痴呆的治疗药或方法。

[0004] 根据中央痴呆中心的分析资料,2017年的痴呆患者数达到724000名,经预测,2040年达到168万名、2050年达到2127000名。由此,痴呆管理费用也将急速增加,2012年,已投入10兆3千亿韩元的管理费用,经预测,痴呆管理费用在2040年将急速增加至78兆4千亿韩元、2050年将急速增加至投入134兆6千亿韩元。由此,根据首尔大学医院在2008年实施的痴呆患病率调查结果报告,若氧痴呆发病延迟2年,则经预测,患病率将在40年后减少20%,若以2040年为基准换算,则经预测,将减少15兆6千亿韩元的全韩国痴呆管理费用。

[0005] 但是,当前,痴呆的治疗方法为以缓解症状为目的的治疗,而不是根治痴呆,因此,需要研发用于抑制、延迟发病或治疗痴呆的物质。

[0006] 并且,在韩国,2015年的学龄人口达到7559000名,因此,很多人致力于学习。除这些学生之外,大学毕业生和上班族也为了准备各种考试而继续学习,若他们可有效增进记忆力,则学习成果上升,由此,能够激励他们实现目标。由此,推出了各种用于改善记忆力的产品,但效果甚微,几乎没有完美满足消费者需求的产品。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明的目的在于,提供进一步提高预防痴呆或改善记忆力功效的包含具有丝蛋

白的熟制蚕加工物及当归提取物的用于改善记忆力的组合物或用于预防及治疗阿尔茨海默氏痴呆的组合物。

[0009] 技术方案

[0010] 用于实现上述目的的本发明的用于改善记忆力、用于预防及改善阿尔茨海默氏痴呆的药学组合物或食品组合物的特征在于,包含熟制蚕加工物及当归提取物。

[0011] 本发明的特征在于,利用80℃~125℃的蒸汽的热量将具有丝蛋白的整个蚕蒸熟100分钟~150分钟,由此,在包含丝蛋白的状态下,能够食用摄取上述熟制蚕加工物

[0012] 本发明的特征在于,以1:0.1~1:1的重量比包含上述熟制蚕加工物与上述当归提取物。

[0013] 本发明所要实现的技术目的并不局限于以上所提及的技术目的,本发明所属技术领域的普通技术人员可通过下述记载明确理解未提及的其他技术目的。

[0014] 发明的效果

[0015] 根据本发明,提供通过使用包含大量的丝蛋白和源自桑叶的功能性物质的熟制蚕加工物及当归提取物来改善记忆力及预防或治疗阿尔茨海默氏痴呆的组合物,由此,研发利用本发明的各种保健食品或医药品并商业化,从而可期待,可根本上预防及治疗成为现代社会一个重要问题的高龄化和高龄化引起的痴呆,同时,有助于改善学生、准备考试的人员、上班族等的各种国民的记忆力。

附图说明

[0016] 图1为示出利用作为本发明的组合物的熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的正常组果蝇的预期寿命增加效果的图。

[0017] 图2为示出利用作为本发明的组合物的熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的阿尔茨海默氏痴呆(AD)模型果蝇的预期寿命增加效果的图。

[0018] 图3为示出利用作为本发明的作为组合物的熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的神经连接结构改善效果的图。

[0019] 图4为示出利用作为本发明的组合物的熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的神经细胞保护活性的图。

[0020] 图5为示出利用作为本发明的组合物的熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的线粒体复合物1~线粒体复合物4的活性度上升效果的图。

[0021] 图6为示出利用作为本发明的组合物的熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的三磷酸腺苷(ATP)生成能力增强效果的图。

[0022] 图7为示出利用作为本发明的组合物的熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理单侧失忆实际处理小鼠的记忆力增强效果的图。

[0023] 图8为示出Y-迷宫测试(Y-maze test)中的利用作为本发明的组合物的熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的比较空间记忆力增强效果的图。

[0024] 数据表示平均±S.E.M(N=6)。

[0025] (#:p<0.05Control vs Con+Sco

[0026] *:p<0.05Con+Sco vs SW+Sco or CDG+Sco or COM+Sco or RG+Sco or DO+Sco)

[0027] (SW:熟制熟蚕粉末,CDG:朝鲜当归,COM:熟制熟蚕及朝鲜当归复方剂,RG:改善记

忆力的红参产品,D0:多奈哌齐(Donepezil),SC0:东莨菪碱(scopolamine))

[0028] 图9为示出莫里斯水迷宫测试(morris water maze test)中的利用作为本发明的组合物的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂的比较空间记忆力增强效果的图。

[0029] 数据表示平均 $\pm$ S.E.M(N=5)。

[0030] (##:p<0.01Control vs Con+Sco

[0031] *:p<0.05Con+Sco vs SW+Sco or CDG+Sco or COM+Sco or RG+Sco or D0+Sco

[0032] **:p<0.01Con+Sco vs SW+Sco or CDG+Sco or COM+Sco or RG+Sco or D0+Sco

[0033] ***:p<0.001Con+Sco vs SW+Sco or CDG+Sco or COM+Sco or RG+Sco or D0+Sco)

[0034] (SW:熟制熟蚕粉末,CDG:朝鲜当归,COM:熟制熟蚕及朝鲜当归组合,RG:改善记忆力的红参产品,D0:多奈哌齐,SC0:东莨菪碱)

[0035] 图10为示出利用作为本发明的组合物的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的3xTG痴呆小鼠的自控能力增强效果的图。

[0036] 图11为示出利用作为本发明的组合物的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的3xTG痴呆小鼠的对于新事物的认知能力增强效果的图。

[0037] 图12为示出利用作为本发明的组合物的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的3xTG痴呆小鼠的社会性增强效果的图。

具体实施方式

[0038] 以下,详细说明本发明,将省略与不必要地混淆本发明的主旨的公知功能及结构有关的详细说明。

[0039] 根据本发明的一实施方式,本发明提供包含熟制蚕加工物及当归提取物的用于改善记忆力的组合物或食品组合物以及用于预防或治疗阿尔茨海默性痴呆的组合物或者用于预防或改善阿尔茨海默性痴呆的食品组合物,上述熟制蚕加工物包含丝蛋白和源自桑叶的功能性物质。

[0040] 即,本发明的特征在于,涉及包含丝蛋白和源自桑叶的功能性物质的熟制蚕加工物及当归提取物的记忆力改善用途或者阿尔茨海默性痴呆预防及治疗用途。

[0041] 换言之,包含上述丝蛋白的熟制蚕加工物是指通过熟制过程制备的三眠蚕、四眠蚕等的具有丝蛋白的所有蚕,在本说明书中,与熟制熟蚕或弘蚕混合使用。

[0042] 即,优选地,具有丝蛋白的蚕可选自四眠蚕中的5龄3日之后的蚕至熟蚕期为止的蚕中。在此情况下,作为5龄3日之后的蚕,优选地,可从5龄4日的蚕开始使用,更优选地,使用熟蚕期的蚕为最佳。这是因为,即使还可使用5龄3日的蚕,但是,相比于5龄4日之后的蚕,蚕所具有的丝蛋白少且蚕粪便的含量更多。另一方面,熟蚕期的蚕为蚕体内充满丝蛋白的蚕,是指形成茧之前的蚕,熟蚕期的蚕已排出大部分的蚕粪便,因此,最适合用作药组合物或食品组合物(保健功能食品)的有效成分。并且,作为上述熟制蚕加工物的蚕品种使用任意品种的蚕也无妨,其中,使用白娟品种、家蚕品种(金丝蚕)、浅绿娟品种、浅红娟品种中的一种,更优选地,家蚕品种的恢复效果最为优秀,适用其为最优。

[0043] 在本发明中,为了将如上所述的蚕中所包含的丝蛋白也均摄取,对上述蚕进行加工并制备为加工物形态,由此,用作药组合物或食品组合物(包括保健功能食品)的有效

成分,在此情况下,利用蒸汽的热量蒸熟上述蚕来使用,优选地,利用温度为80℃~125℃的蒸汽热量蒸熟100分钟~150分钟,来以均包含丝蛋白的方式制备。即,在利用温度低于80℃的蒸汽热量蒸熟150分钟以上来制备的情况下,制备时间过长,反而具有包含丝蛋白的蚕本身所具有的有效成分被破坏的忧虑,在高于125℃的温度下以低于100分钟的时间制备的情况下,由于温度过高,也具有对于包含丝蛋白的蚕本身所具有的有效成分产生不利影响的忧虑。

[0044] 在如上所述的上述熟制过程之后,可通过常规方法进行干燥并制备为粉末形态来使用,优选地,可通过选自热风干燥或真空冻结干燥中的一种来进行干燥并粉末化,为了使有效成分的损失最小化,真空冻结干燥方法最为适合。

[0045] 上述粉末化使用家用搅拌机、锤式粉碎机、辊式粉碎机、冻结粉碎机等任意粉碎机也无妨,为了使试样流失的最小化、成分歪曲现象防止及微细粉末化,使用通过滚碎机或冻结粉碎的方法为佳。若通过常规家用粉碎机或锤式粉碎机粉碎,则粉末粒子的大小为0.1mm以下,非常难以粉碎,与之相比,若利用滚碎机反复粉碎数次,则粉末化的粒子的大小能够以平均10μm左右为止进行微细粉末化,可预测,将有利于摄取和产品。

[0046] 并且,在上述粉末形态制备后,能够以提取物形态制备上述熟制蚕加工物粉末,在此情况下,可利用水、碳数为1个至4个的低级醇或它们的混合溶剂提取并制备。上述碳数为1个至4个的低级醇可选自由甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇及异丁醇组成的组中。以熟制蚕加工物粉末的重量为基准,可使用1倍~40倍体积(以1kg为基准,为1l~40l)的上述水、碳数为1个至4个的低级醇或它们的混合溶液,优选地,可使用5倍~40倍体积。上述提取物的提取条件如下,即,在20℃~100℃的温度下进行1小时~48小时,上述过程可吩咐1次~4次为止。

[0047] 作为另一方法,向利用水、碳数为1个至4个的低级醇或它们的混合溶剂提取浓缩上述熟制蚕加工物粉末来获取的提取物添加水并悬浮后,优选地,添加提取物的重量的1倍~1000倍,更优选地,添加提取物的重量的1倍~500倍,最优选地,添加提取物的重量的1倍~50倍的水并悬浮后,可利用通过向上述悬浮物添加选自己烷、氯仿、乙酸乙酯及丁醇组成的组中的溶剂来获取的分馏物制备。

[0048] 上述提取物或其分馏物的制备温度可以为20℃至100℃,但并不局限于此。提取或分馏时间并无特殊限制,但优选地,在10分钟至2日以内提取,作为提取用设备可利用常规的提取设备、超声波粉碎提取机或分馏机。可对通过上述方式制备的提取物或分馏物进行热风干燥、减压干燥或冻结干燥来去除溶剂。并且,上述提取物或分馏物还可利用柱色谱法纯化并使用。上述色谱法可选自硅胶柱色谱法(silica gel column chromatography)、LH-20柱色谱法(LH-20column chromatography)、离子交换树脂色谱法(ion exchange resin chromatography)、中压液相色谱(medium pressure liquid chromatography)、薄层色谱法(TLC;thin layer chromatography)、硅胶真空液相色谱法(silica gel vacuum liquid chromatography)及高效液相色谱法(high performance liquid chromatography)中。

[0049] 并且,作为本发明的有效成分中的一种的当归(*Anegolica gigas* Nakai)为伞形科(Apiaceae)当归属(genus *Angelica* Linnaeus)的多年生草本植物,据报告,具有贫血恢复效果、免疫增强作用,对于活血作用,具有对于血管收缩抑制效果及血小板凝聚抑制、血管生成促进、抗氧化作用、血液酒精浓度降低、抗氧化能力及抗血栓功能、阵痛作用、肝功能

保护作用、抗癌作用、中枢抑制作用、血管舒张效果、美白效果的研究。作为这种上述当归可使用朝鲜当归(*Angelica gigas* Nakai)、东当归(*Angelica acutiloba* Kitagawa)或中国当归(*Angelica sinensis* Diels),优选地,使用朝鲜当归为最优。

[0050] 这种当归的特征在于,为了获取本发明所目标的功效,以提取物形态制备并使用,可通过本领域公知的常规方法分离这种上述提取物。

[0051] 在利用提取溶剂处理当归来获取用于本发明的当归提取物的情况下,可利用各种提取溶剂。优选地,可利用极性溶剂或非极性溶剂。适合用作极性溶剂的有(i)水;(ii)醇(优选为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、1-戊醇、2-丁氧基乙醇或乙二醇);(iii)乙酸;(iv)二甲基甲酰胺(DMF0,dimethyl-formamide);以及(v)二甲基亚砜(DMSO,dimethyl sulfoxide)。适合用作非极性溶剂的有丙酮、乙腈、乙酸乙酯、乙酸甲酯、氟代烷、戊烷、己烷、2,2,4-三甲基戊烷、癸烷、环己烷、环戊烷、二异丁烯、1-戊烯、1-氯丁烷、1-氯戊烷、邻二甲苯、二异丙醚、2-氯丙烷、甲苯、1-氯丙烷、氯苯、苯、二乙醚、二乙硫醚、氯仿、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、苯胺、二乙胺、醚、四氯化碳及四氢呋喃(THF)。

[0052] 更优选地,在本发明中利用的提取溶剂包括(a)水;(b)碳数为1~4的无水或含水低级醇(甲醇、乙醇、丙醇、丁醇等);(c)上述低级醇与水的混合溶剂;(d)丙酮;(e)乙酸乙酯;(f)氯仿;(g)醋酸丁酯;(h)1,3-丁二醇;(i)己烷;以及(j)二乙醚。最优选地,利用水、甲醇、乙醇或其组合处理当归来获取本发明的提取物。

[0053] 在本说明书中使用的术语“提取物”具有如上所述的在本领域通常用作粗提物(crude extract)的含义,广义上包括对提取物进行追加分馏(fractionation)而获取的分馏物。即,不仅包括利用如上所述的提取溶剂获取的当归提取物,还包括对其追加适用纯化过程来获取的当归提取物。例如,将上述提取物通过具有规定的分子量截留值的超滤膜来获取的分馏、通过各种色谱法(为了根据大小、电荷、疏水性或亲和性的分离而制备)的分离等通过追加实施的各种纯化方法获取的分馏也包括在本发明的当归提取物。

[0054] 在本发明中利用的当归提取物可通过减压蒸馏及冻结干燥或喷雾干燥等的追加郭恒制备为粉末状态。

[0055] 在本发明的一实施例中,向当归的根茎添加如甲醇、乙醇的低级醇,优选地,添加95%的乙醇,在5℃至80℃的温度下,优选地,在30℃至55℃的温度下,提取15分钟至48小时,优选地,提取30分钟至12小时,之后,可进行减压干燥来获取。

[0056] 在本发明中,经确认,提供将通过上述方法制备的上述熟制蚕加工物与上述当归提取物一同混合的组合物,相对于各个上述单独物质的适用,当混合使用时,均增加正常对照组动物模型和阿尔茨海默性痴呆模型的预期寿命和健康寿命,预防记忆力丧失,改善神经连接结构,保护神经细胞,增加线粒体的活性,由此,具有优秀的增加三磷酸腺苷的生成、增强空间记忆力、增强姿势调节能力、增强对于新事物的好奇心、增强社会性的效果,因此,对于预防阿尔茨海默性痴呆并改善记忆力示出更显著的功效,本发明的特征在于,为了改善记忆力或预防及治疗阿尔茨海默性痴呆,将两种上述物质一同使用作为药学组合物或食品组合物(保健功能食品)的有效成分,更优选地,以1:0.1~1:1的重量比混合上述熟制蚕加工物与上述当归提取物,其中,以上述熟制蚕加工物的重量为基准,在混合小于0.1重量比的上述当归提取物的情况下,难以实现本发明所要目标的显著效果,在混合大于1重量比的上述当归提取物的情况下,因超出的含量无法获取到提高的功效。

[0057] 在本说明书中,在提及“一同混合熟制蚕加工物与当归提取物的组合物”的同时使用的术语“熟制熟蚕粉末+朝鲜当归提取物混合物”及“组合”是指本发明的有效成分,且混合使用。

[0058] 并且,在上述本发明的药学组合物中,可向本发明的药学组合物添加0.001重量百分比~100重量百分比的混合上述熟制蚕加工物与上述当归提取物的混合物。分别根据常规方法,上述药学组合物能够以散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、悬浮液、乳剂、糖浆、气雾剂等口服剂型、外用制剂、栓剂及灭菌注射溶液的形态剂型化并使用。作为可包含在上述药学组合物的载体、赋形剂及稀释剂可例举乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、海藻酸、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟苯甲酯、羟苯丙酯、滑石粉、硬脂酸镁及矿物油。在制剂化的情况下,通过使用通常使用的填充剂、增亮剂、结合剂、湿润剂、崩解剂、表面活性剂等等的稀释剂或赋形剂来制备。用于口服给药的固体制剂包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂等,这种固体制剂通过向本发明的混合物混合至少一种赋形剂,如淀粉、碳酸钙、蔗糖或乳糖、明胶等来制备。并且,除简单的赋形剂之外,还是用如硬脂酸镁、滑石粉的润滑剂。用于口服的液体制剂有悬浮剂、内用液剂、乳剂、糖浆剂等,除经常使用的作为简单稀释剂的水、液体石蜡之外,可包括各种赋形剂,如湿润剂、甜味剂、芳香剂、保存剂等。用于非口服给药的制剂包括灭菌的水溶液、非水性溶剂、悬浮剂、乳剂、冻结干燥制剂、栓剂。作为非水性溶剂、悬浮剂可使用如丙二醇、聚乙二醇、橄榄油的植物性油、如油酸乙酯的可注射的酯等。作为栓剂的基质,可使用witepsol、聚乙二醇(Macrogol)吐温(tween) 61、可可脂、月桂酸酯、明胶甘油等。

[0059] 本发明的药学组合物的剂量根据所要治疗的对象的年龄、性别、体重和所要治疗的特定疾病或病理状态、疾病或病理状态的严重程度、给药凸镜及开处方的人员的判断不同。基于这种因素的剂量确定在普通技术人员的水平内,通常,剂量在100mg/kg/日至5000mg/kg/日的范围内。更优选的剂量为1000mg/kg/日至3000mg/kg/日。可一日给药一次,或者一日分为数次给药。在任何方面,上述剂量并不限定本发明的范围。

[0060] 本发明的药学组合物可通过各种途径向鼠、家畜、人等的哺乳动物给药。可预测给药的所有方式,例如,可通过口服、直肠或静脉、肌肉、皮下、子宫内硬膜或脑血管内注射给药。本发明的混合物几乎没有毒性及副作用,因此,当以预防为目的长时间服用时,可安心使用的药剂。

[0061] 在此情况下,作为用于示出本发明所目标的功效的有效含量,在粉末重量方面,相对于组合物的总重量,优选地,1重量百分比~100重量百分比的由包含上述熟制蚕加工物及当归提取物组成的混合物,更优选地,包含10重量百分比~90重量百分比。

[0062] 并且,本发明还可包含由上述熟制蚕加工物及当归提取物组成的混合物来提供用于记忆力改善或阿尔茨海默性痴呆预防及改善效果的食物组合物。在此情况下,还能够以本发明的食物组合物的1重量百分比~100重量百分比使用由上述熟制蚕加工物及当归提取物组成的混合物。本发明的食物组合物包括片剂、胶囊剂、丸剂或液剂等形态,有各种饮剂、肉类、香肠、面包、糖类、小吃类、面类、冰淇淋、乳制品、汤、离子饮料、饮料、酒精饮料、口香糖、茶及复方维生素等。

[0063] 并且,根据本发明的再一实施方式,本发明提供记忆力改善方法,其包括向对象给

药包含如上所述的熟制蚕加工物及当归提取物的组合物的步骤。

[0064] 并且,根据本发明的另一实施方式,本发明提供阿尔茨海默性痴呆的预防或治疗方法,其包括向对象给药包含如上所述的熟制蚕加工物及当归提取物的组合物的步骤。

[0065] 并且,根据本发明的还有一实施方式,本发明提供用于改善记忆力的组合物的制备方法,其包括混合如上所述的熟制蚕加工物及当归提取物的步骤。

[0066] 并且,根据本发明的又一实施方式,本发明提供用于预防或治疗阿尔茨海默性痴呆的组合物的制备方法,其包括混合熟制蚕加工物及当归提取物的步骤。

[0067] 本发明的方法利用如上所述的组合物,因此,为了避免本说明书的过于复杂,将省略关于重复内容的记载。

[0068] 如上所述,本发明改善承受学习压力的各级学校的学生以及包括青壮年和老年人在内的所有国民的脑功能,由此,可期待有助于记忆力改善,同时,有效减少包括阿尔茨海默性痴呆在内的神经系统疾病的发病,大大有助于老龄化时代的国民的生活质量的改善,进而,对于韩国国家痴呆管理费用节减作出大的贡献。

[0069] 以下,例举实施例来更加详细地说明本发明,这些实施例仅用于说明本发明,并不限制本发明的保护范围。

[0070] 实施例1.制备由熟制蚕加工物和当归提取物构成的混合物

[0071] 1)制备熟制蚕加工物(熟制熟蚕;弘蚕)

[0072] 繁育具有黄色丝蛋白的金丝蚕(交配日本种系原种蚕311和中国种系原种蚕312来繁育的交配种),在5龄7日前后,即,若成为熟蚕,则利用温度为100℃的水蒸气蒸煮120分钟~130分钟来制备家蚕品种熟制蚕加工物(steamed mature silkworm product或boiled mature silkworm product)后,将上述家蚕品种熟制蚕加工物真空冻结干燥24小时来制备为粉末形态。

[0073] 2)制备当归乙醇提取物

[0074] 使用韩国产朝鲜当归,对原材料称量后,利用相对于原物的10倍数的70%(v/v)酒精在85℃的温度下以1次4小时的时间连续提取共2次后,对提取物进行过滤及浓缩工序,配合40%(w/w,以总重量为基准)糊精并通过喷雾干燥制备为粉末形态。

[0075] 3)制备混合物

[0076] 混合0.2g/kg的上述1)的熟制蚕加工物粉末和0.16g/kg的上述2)的当归乙醇提取物来制备混合物,并适用为下述实验的试样。

[0077] 实验例1.熟制之前的熟蚕及熟制蚕加工物或各个品种的熟制蚕加工物的成分分析比较

[0078] 1)熟制之前的熟蚕及熟制蚕加工物的成分分析比较

[0079] 对于熟制之前的熟蚕及熟制蚕加工物,分别通过具有0.1mm粒子大小的锤式粉碎机粉碎物来实施主要成分分析,并在下述表1及表2示出。

[0080] 表1

[0081]	区分		熟制蚕加工物 (白娟)	熟制之前的熟蚕 (白娟)
	组成成分 (g/100g)	水分	2.85	4.15
		粗蛋白	68.86	62.43
		粗脂肪	10.99	11.66

[0082]

	粗灰分	3.26	3.63
氨基酸 (%)	半胱氨酸 (CYS)	0.427	0.463
	甲硫氨酸 (MET)	0.644	0.756
	丝氨酸 (SER)	6.757	6.194
	谷氨酸 (GLU)	3.824	4.071
	甘氨酸 (GLY)	12.335	9.265
	丙氨酸 (ALA)	9.778	7.460
	亮氨酸 (Leu)	1.983	2.114
	赖氨酸 (Lys)	2.193	2.396
	组氨酸 (His)	1.083	1.160
	精氨酸 (Arg)	1.958	2.123
	脯氨酸 (Pro)	1.148	1.217
	色氨酸 (Trp)	0.425	0.437

[0083] 表2

[0084]

	区分	熟制蚕加工物 (白娟)	熟制之前的熟蚕 (白娟)
脂肪酸 (%)	十八烯酸 (Oleic acid (C18:1Ω9))	31.22	31.13
	二十烯酸 (Eicosenoic acid) (C20:1Ω9))	0.23	0.28
	不饱和脂肪酸	66.79	67.49
	-单价脂肪酸	32.31	32.23
无机成分 (mg/100g)	钙 (Ca)	198.90	197.83
	铁 (Fe)	3.17	8.49
	钾 (K)	1045.44	1176.37
	镁 (Mg)	199.25	211.94
	锰 (Mn)	1.60	1.70
	磷 (P)	688.27	749.79

[0085] 通过上述结果确认,熟制之前的熟蚕中的各种组成成分的含量,当成为熟制蚕加工物时发生各种变化,由于这种熟制蚕加工物的成分变化,还改变上述熟制蚕加工物所具有的药理学效果。

[0086] 2) 各个蚕品种的通过滚碎机粉碎法的成分分析比较

[0087] 通过作为原料流失少且成分变化少的粉碎方法的滚碎机粉碎法比较各个蚕品种的熟制蚕加工物的成分分析。

[0088] 结果如下述表3至表8所示。

[0089] 表3

[0090]

熟制蚕加工物的各个蚕品种的一般成分含量 (单位: g/100g)				
区分	白玉蚕	金丝蚕	浅绿蚕	红娟种
水分	4.29±0.03c	2.31±0.05b	2.34±0.02b	1.71±0.08a

[0091]

粗蛋白	71.92±0.34bc	69.36±0.23a	73.13±0.5c	70.89±0.055b
粗脂肪	13.57±0.11a	15.59±1.005a	14.05±0.065a	15.21±0.925a
粗灰分	3.48±0.235a	3.43±0.06a	3.50±0.13a	3.97±0.16b
粗纤维	2.96±0.05ab	3.10±0.03ab	2.78±0.03a	3.50±0.01b
通过单向方差分析和邓肯测试分析样品 (Sample were analyzed by one-way ANOVA followed by DUNKAN test) a、b、c 等不同字母表示 $p<0.05$ 时有显著差异 (a.b.c Different letters indicate significant differences at $p<0.05$)				

[0092] 表4

[0093]

熟制蚕加工物的各个蚕品种的氨基酸含量 (单位: g/100g)				
区分	白玉蚕	金丝蚕	浅绿蚕	红娟种
半胱氨酸	0.424±0.002 ^a	0.442±0 ^b	0.433±0.001 ^{ab}	0.437±0.005 ^b
甲硫氨酸	0.690±0.005a	0.778±0.006c	0.725±0.004b	0.730±0.006b
天冬氨酸 (ASP)	5.129±0.035b	5.092±0.046b	5.299±0.059c	4.871±0.02a
苏氨酸 (THR)	2.489±0.015b	2.492±0.019b	2.503±0.03b	2.407±0.005a
丝氨酸	7.707±0.029b	6.946±0.106a	7.548±0.059b	7.024±0.046a
谷氨酸	4.759±0.05ab	4.858±0.043b	4.869±0.067b	4.641±0.009a
甘氨酸	12.810±0.017b	11.353±0.238a	12.438±0.044b	11.842±0.091a
丙氨酸	12.220±0.021b	9.342±0.181a	10.177±0.025b	9.687±0.068a
缬氨酸 (VAL)	2.248±0.017a	2.345±0.018b	2.275±0.006a	2.233±0.002a
异亮氨酸 (Ile)	1.064±0.007a	1.145±0.006b	1.082±0.013a	1.080±0.006a
亮氨酸	1.814±0.02a	1.992±0.018c	1.888±0.016b	1.816±0.007a
酪氨酸 (Tyr)	4.830±0.013b	4.563±0.074a	4.781±0.015b	4.443±0.067a
苯丙氨酸 (Phe)	1.942±0.029a	2.061±0.017b	1.977±0.024ab	1.937±0.016a
赖氨酸	2.544±0.01a	2.669±0.037b	2.621±0.016ab	2.536±0.013a
组氨酸	1.151±0.005a	1.182±0.012a	1.138±0.012a	1.235±0.012b
精氨酸	2.118±0.006a	2.171±0.035a	2.134±0.006a	2.108±0.005a
脯氨酸	1.606±0.014a	1.884±0.043b	1.788±0.008b	1.805±0.018b
色氨酸	0.506±0.008a	0.532±0.005ab	0.542±0.007b	0.517±0.001ab
通过单向方差分析和邓肯测试分析样品 a、b、c 等不同字母表示 $p<0.05$ 时有显著差异				

[0094] 表5

[0095]

熟制蚕加工物的各个蚕品种的脂肪酸含量 (%)				
区分	白玉蚕	金丝蚕	浅绿蚕	红娟品种
肉豆蔻酸 (Myristic acid) (C14:0)	0.15±0.01a	0.14±0.01a	0.15±0.00a	0.20±0.01b
棕榈酸 (Palmitic acid) (C16:0)	21.87±0.77a	24.24±0.53a	22.03±1.24a	24.94±1.24a
棕榈烯酸 (Palmitoleic)	0.74±0.09a	0.83±0.01a	0.73±0.01a	0.73±0.01a

[0096]

acid) (C16:1n7)				
硬脂酸 (Stearic acid) (C18:0)	7.38±0.22a	8.05±0.05ab	7.73±0.36a	8.60±0.36b
十八烯酸 (C18:1n9)	25.95±1.82a	25.60±0.38a	25.39±2.37a	26.19±2.37a
亚油酸 (Linoleic acid) (C18:2n6)	8.16±0.16bc	7.65±0.52b	9.03±0.30c	5.66±0.30a
γ-亚油酸 (C28:3n6)	0.11±0.0ab	0.16±0.02bc	0.08±0.01a	0.17±0.01c
亚油酸 (C28:3n3)	35.55±0.91a	33.29±1.85a	34.77±0.21a	33.45±0.21a
二十烯酸 (C20:1n9)	0.11±0.01b	0.06±0.01a	0.10±0.00b	0.06±0.00a
不饱和脂肪酸	70.62	67.59	70.10	66.26
饱和脂肪酸	29.38	32.41	29.90	33.74
通过单向方差分析和邓肯测试分析样品 a、b、c 等不同字母表示 p<0.05 时有显著差异				

[0097] 表6

[0098]

熟制蚕加工物的各个蚕品种的无机成分含量				
区分	白玉蚕	金丝蚕	浅绿蚕	红娟种
Ca (mg/100g)	190.01±6.85b	168.75±1.90a	180.69±1.13ab	203.73±7.76c
Cu (mg/100g)	0.59±0.03b	0.49±0.01a	0.48±0.01a	0.50±0.02a
Fe (mg/100g)	2.64±0.09b	1.94±0.03a	1.97±0.04a	3.91±0.48c
K (mg/100g)	608.90±17.48a	586.00±51.24a	650.12±14.75a	647.93±13.19a
Mg (mg/100g)	183.34±4.02ab	189.22±2.84b	172.69±2.09a	176.90±3.53a
Mn (mg/100g)	1.36±0.01a	1.35±0.01a	1.22±0.01b	1.35±0.03a
Na (mg/100g)	34.83±2.11a	39.54±1.69a	35.75±1.49a	39.50±1.65a
P (mg/100g)	388.73±5.86a	405.47±6.89a	388.68±3.28a	386.61±8.47a
Zn (mg/100g)	6.36±0.18c	5.05±0.09a	5.64±0.06b	5.32±0.16ab
S (mg/kg)	4171.63±18.55 a	4652.50±21.79 b	4318.63±18.54 c	4557.00±69.90 d
通过单向方差分析和邓肯测试分析样品 a、b、c 等不同字母表示 p<0.05 时有显著差异				

[0099] 表7

[0100]

熟制蚕加工物的各个蚕品种的维生素含量				
区分	白玉蚕	金丝蚕	浅绿蚕	红娟种
β-胡萝卜素 (ug/100g)	1107.24±69.48a	4026.07±100.52b	1188.98±19.95a	7304.22±157.50c
维生素 B1 (mg/100g)	0.57±0.01ab	0.59±0.01b	0.54±0.00a	0.63±0.02c
维生素 B2 (mg/100g)	5.95±0.15b	4.63±0.09a	5.36±0.05a	6.04±0.1c
维生素 B3 (mg/100g)	4.15±0.05a	4.94±0.12b	4.06±0.05a	4.73±0.16b

[0101]

维生素 B6 (mg/100g)	0.55±0.01a	0.52±0.01a	0.51±0.01a	0.67±0.01b
叶酸 (Folic acid) (mg/100g)	0.46±0.01a	0.72±0.01d	0.52±0.01b	0.59±0.01c
维生素 C (mg/100g)	10.19±0.11b	11.63±0.14c	9.26±0.11a	12.33±0.05d
通过单向方差分析和邓肯测试分析样品 a、b、c 等不同字母表示 $p<0.05$ 时有显著差异				

[0102] 表8

[0103]

熟制蚕加工物的各个蚕品种的功能成分含量				
区分	白玉蚕	金丝蚕	浅绿蚕	红娟种
总 多酚 (mg/100g)	773.43±11.91ab	744.45±15.06a	881.01±18.09c	822.10±26.83b
总 类黄酮 (mg/10 0g)	452.60±13.79a b	423.59±3.63a	552.64±21.69c	494.46±16.07b
伽马氨基丁酸 (GABA) (mg/100g)	2.28±0.06b	1.96±0.008a	2.51±0.10c	4.59±0.06b
通过单向方差分析和邓肯测试分析样品 a、b、c 等不同字母表示 $p<0.05$ 时有显著差异				

[0104] 上述实验结果,可预测,各个蚕品种的熟制蚕粉末中所包含的成分具有差异,以此为基础,各个品种的如下的效果也不同。换言之,对于熟制蚕加工物,分析各个蚕品种的成分的结果,熟制蚕加工物中包含大量的包括粗蛋白和甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸等的氨基酸以及亚油酸在内的不饱和脂肪酸及 β -胡萝卜素等的维生素等,未检测出对人体有害的反式脂肪、水银等的重金属及蔗糖(Sucrose)等的糖类。并且,相比于5龄3日的干燥蚕及未熟制的熟蚕,熟制熟蚕包含大量的粗蛋白以及甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸等的氨基酸。按照蚕品种,白玉蚕、金丝蚕、浅绿蚕及红娟种等所有品种中均检测出相同的所有成分,在各个成分的含量比较中,各个品种的含量互不相同,经预测,各个蚕品种的功能性具有差异。

[0105] 实验例2. 确认通过本发明实施例1的混合物处理的正常组果蝇地预期寿命增加效果

[0106] 1. 实验方法

[0107] 据报告,若患上阿尔茨海默性痴呆,则预期寿命大大减少,对于未患上痴呆的正常对照组和患上阿尔茨海默性痴呆的试验组,利用果蝇模型实施与熟制熟蚕粉末、朝鲜当归提取物及实施例1的熟制熟蚕粉末+朝鲜当归提取物混合物(以下,称为复方剂)有关的试验。

[0108] 首先,相对于未患上阿尔茨海默性痴呆的正常组(对照组),进行用于确认熟蚕粉末和朝鲜当归提取物的复方剂(实施例)所具有的对于预期寿命增加的上升作用的研究。

[0109] 2. 实验结果

[0110] 上述实验结果如图1及下述表9所示。

[0111] 表9

[0112]	处理组	平均寿命(日)	比例
	普通饲料	29.29	--
	朝鲜当归提取物	31.18	增加 6.8%
	熟制熟蚕粉末	31.02	增加 5.9%
	熟制熟蚕 / 朝鲜当归复方剂 (实施例)	32.32	增加 10.3%

[0113] 如上述表9及图1所示,经确认,相比于仅单独处理熟制熟蚕粉末或朝鲜当归提取物的实验组的预期寿命增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)以1.5倍~1.7倍(3.5%p~4.4%p)显著增加。

[0114] 具体说明如下,在仅摄取普通饲料的正常果蝇的情况下,预期寿命为29.29日,在摄取朝鲜当归提取物的试验组的情况下,预期寿命为31.18日,增加6.8%,风险指数为0.66(95%的可信区间(CI):0.5~0.87,p值(p value)=0.003),统计学上显著减少。在摄取熟制熟蚕粉末的试验组的情况下,预期寿命为31.02日,相比于普通饲料,增加5.9%,风险指数为0.7(95%的可信区间:0.53~0.92,p值=0.01),相比于普通饲料,统计学上显著减少。与之相比,在摄取包含熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的饲料的动物的情况下,预期寿命为32.32日,增加10.3%,风险指数减少至0.5(95%的可信区间:0.38~0.67,p值=3.21×10⁻⁶)。本结果示出,相比于单独处理熟制熟蚕粉末或朝鲜当归提取物,在利用复方剂(实施例1)处理的情况下,由于相互上升作用,相比于仅处理各个单独物质的试验组的预期寿命增加率,具有增加1.5倍~1.7倍(3.5%p~4.4%p)的显著的预期寿命的增加和进一步减少的风险指数。

[0115] 实验例3. 确认通过本发明实施例1的混合物处理的阿尔茨海默痴呆(AD)模型果蝇地预期寿命增加效果

[0116] 1. 实验方法

[0117] 阿尔茨海默痴呆为导致记忆力和思维力等的智力能力丧失引起的行为变化的疾病,占据总痴呆病例的60%以上而周知。据报告,阿尔茨海默痴呆直接或间接减少预期寿命,利用表达导致人阿尔茨海默痴呆的3个基因的阿尔茨海默痴呆模型果蝇来进行研究。

[0118] 说明如下,对于同时表达作为诱发人阿尔茨海默疾病的基因的淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein,APP)、β位点淀粉样前体蛋白裂解酶(Beta site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1,BACE1)及微管相关蛋白tau(Microtubule associated protein tau,MAPT)的果蝇模型,利用正常饲料或熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物的复方剂(实施例)10%饲料来培养。将所培养的100只以上的成虫果蝇,以每一小瓶10只的量分入后,以3日间隔到所有果蝇灭绝为止,确认活着的果蝇的数量。果蝇在28℃的温度、60%的相对湿度条件下饲养。通过kaplan meier生存分析执行统计分析来确认统计学差异。

[0119] 由此,试验了患有阿尔茨海默性痴呆的试验组的预期寿命增加效果。在此情况下,通过与上述实验例2相同的实验方法确认果蝇的预期寿命增加效果,代替正常组果蝇,以阿尔茨海默性痴呆模型果蝇为对象确认预期寿命增加效果。

[0120] 2. 实验结果

[0121] 上述实验结果如图2及下述表10所示。

[0122] 表10

[0123]	处理组	平均寿命(日)	比例
	普通饲料	25.22	--
	朝鲜当归提取物	26.01	增加 3.1%
	熟制熟蚕粉末	26.58	增加 5.4%
	熟制熟蚕 / 朝鲜当归复方剂 (实施例)	28.49	增加 13.0%

[0124] 如上述表10及图2所示,经确认,在阿尔茨海默痴呆模型果蝇的情况下,相比于正常对照组(29.29日),预期寿命为25.22,减少13.9%,减少的阿尔茨海默痴呆模型果蝇的预期寿命通过朝鲜当归提取物单独处理、熟制熟蚕粉末单独处理或熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)处理增加,尤其,相比于单独物质给药试验组的预期寿命增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)增加2.4倍~4.2倍,这为接近正常组的预期寿命的惊人的上升效果。

[0125] 具体说明如下,相比于仅摄取普通饲料的阿尔茨海默痴呆模型果蝇的预期寿命为25.22日,摄取添加有朝鲜当归提取物的阿尔茨海默痴呆模型果蝇的预期寿命为26.01日,增加3.1%,风险指数为0.6(95%的可信区间=0.46~0.8, p 值=0.0004),统计学上显著减少。并且,摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的阿尔茨海默痴呆模型果蝇的预期寿命为26.58日,增加5.4%,风险指数为0.57(95%的可信区间=0.57~1.0, p 值=0.05),统计学上显著减少。与之相比,在摄取添加有熟制熟蚕粉末/朝鲜当归组合的饲料的阿尔茨海默痴呆模型果蝇的情况下,预期寿命为28.49日,相比于仅摄取普通饲料的阿尔茨海默痴呆模型果蝇,增加13.0%,风险指数为0.48(95%的可信区间=0.36~0.64, p 值= 7.6×10^{-7}),示出统计学上显著减少的上升效果。

[0126] 总结结果如下,在摄取添加有熟制熟蚕/朝鲜当归复方剂的饲料的阿尔茨海默痴呆模型果蝇的情况下,相比于仅单独摄取添加有朝鲜当归提取物(增加3.1%)或熟制熟蚕粉末(增加5.4%)的饲料的阿尔茨海默痴呆模型果蝇的预期寿命增加率,示出预期寿命上升2.4倍~4.2倍(7.6%p~9.9%p)的惊人效果,该结果示出,在向阿尔茨海默痴呆模型果蝇给药熟制熟蚕/朝鲜当归复方剂(实施例)的情况下,示出接近正常组的预期寿命,由于熟制熟蚕粉末与朝鲜当归提取物之间的相互上升作用,相比于单独添加各个物质的饲料,诱导显著增加的预期寿命和减少的风险指数。

[0127] 实验例4. 确认通过本发明实施例1的混合物处理的神经连接的结构变化

[0128] 1. 实验方法

[0129] 阿尔茨海默痴呆以由人脑的神经连接结构异常引起而周知,进行对于正常对照组果蝇和阿尔茨海默痴呆模型果蝇的神经连接结构变化的研究。

[0130] 首先,试验了未患有尔茨海默痴呆的正常对照组果蝇模型的神经连接结构变化。在此情况下,将达到正常饲料的组成成分中的作为主蛋白质源的酵母总量的10%的量的实施例1的混合物添加至正常饲料来饲养正常对照组果蝇。在成为成虫之前的幼虫阶段中,在没有 Ca^{2+} 的解剖溶液中解剖3龄老熟幼虫后,利用包含4%的多聚甲醛的酸度为7.2的0.1M的磷酸缓冲溶液固定。利用包含0.1%的聚乙二醇辛基苯基醚的0.01M的磷酸缓冲液以10分钟为间隔清洗3次所固定的试样,之后,利用抗-HRP-FITC染色神经连接后,通过荧光显微镜确认神经连接的数。

[0131] 并且,通过适用上述实验方法来试验了患有阿尔茨海默性痴呆的果蝇模型的神经

连接结构变化。

[0132] 2. 实验结果

[0133] 上述实验结果,如图3所示,将仅摄取普通饲料的正常对照组果蝇的神经连接结构作为100%来换算的结果,在仅摄取向普通饲料添加朝鲜当归提取物的饲料的试验组的情况下,具有增加7.2%的神经连接的数,在仅摄取向普通饲料添加熟制熟蚕粉末的饲料的试验组的情况下,具有增加9.3%的神经连接的数。与之相比,在摄取向普通饲料添加熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物的复方剂(实施例1)饲料的果蝇的情况下,具有增加11.7%的神经连接的数,相比于仅摄取朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末的试验组的神经连接增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)具有示出1.3倍~1.6倍(2.4%p~4.5%p)的增加率的显著上升效果。

[0134] 接着,经确认,试验患有阿尔茨海默氏痴呆的果蝇模型的神经连接结构变化的结果,相比于上述正常对照组,仅摄取普通饲料的阿尔茨海默氏痴呆模型果蝇具有少47.9%的神经连接。

[0135] 由此,向阿尔茨海默氏痴呆模型果蝇摄取添加有鲜当归提取物的饲料的结果,相比于仅摄取普通饲料的果蝇,可知神经连接的数增加12.7%,在摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的结果中,具有增加16.5%的神经连接。与之相比,相比于仅摄取普通饲料的试验组,在向阿尔茨海默氏痴呆模型果蝇摄取熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)饲料的试验组中,具有增加22.1%的神经连接数,这示出,相比于单独摄取朝鲜当归提取物和熟制熟蚕粉末的试验组的神经连接增加率,示出高1.3倍~1.7倍(5.6%p~9.4%p)的显著上升的神经连接的增加率。

[0136] 这种结果示出,相比于单独处理朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末的情况下,在正常对照组或阿尔茨海默氏痴呆模型均处理熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的情况下,具有相互作用引起的上升效果。

[0137] 实验例5. 确认通过本发明实施例1的混合物处理的神经细胞保护活性

[0138] 为了研究通过本发明实施例1的混合物处理的神经细胞保护效果,在利用L-谷氨酸(L-glutamate)诱导的HT22细胞损伤模型中,确认了单独的熟制熟蚕(SW)、单独的朝鲜当归提取物(AG)及熟制熟蚕/朝鲜当归提取物复方剂(SWA-1)的神经细胞保护活性。

[0139] 利用噻唑蓝(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay)测定细胞存活率。利用活细胞的线粒体脱氢酶(mitochondria dehydrogenase)的能力且通过将作为黄色水溶性基质的噻唑蓝转化为深青色的非水溶性甲瓚(formazan)的方法生成的甲瓚的量与活细胞数成比。

[0140] 在37℃的温度、5%的CO₂条件下,在96孔板恒温培养HT22细胞24小时,之后,按照各个浓度处理SW、AG以及SWA-1,利用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗培养24小时的细胞,添加噻唑蓝溶液(5mg/ml)并反应4小时后,将所生成的甲瓚溶解于二甲基亚砷并在570nm中测定。

[0141] 2. 实验结果

[0142] 上述实验结果,可确认,如图4所示,相比于对照组,当利用50ug/mL、100ug/mL的单独的熟制熟蚕(SW)处理时,细胞生存率分别增加5.33%、17.49%,当利用50ug/mL、100ug/mL的单独的朝鲜当归提取物(AG)处理时,细胞生存率分别增加12.55%、17.23%,当利用50ug/mL、100ug/mL的熟制熟蚕/朝鲜当归提取物复方剂(SWA-1)处理时,细胞生存率分别增

加25.99%、35.84%。

[0143] 这种结果示出,在神经细胞损伤模型中,相比于单独处理朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末的情况,在处理熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的情况下,具有相互作用引起的上升效果。

[0144] 实验例6.确认通过本发明实施例1的混合物处理的线粒体复合物1~4的活性上升效果

[0145] 1.实验方法

[0146] 即使老化正常进行,三磷酸腺苷生成能力因线粒体的活性降低而降低。更重要的是,在阿尔茨海默痴呆患者中通常观察到的分子细胞水平的病因是线粒体功能异常的出现早于正常人。

[0147] 因此,在正常对照组果蝇和阿尔茨海默痴呆模型果蝇分别摄取普通饲料来饲养的情况、在摄取向普通饲料添加朝鲜当归提取物的饲料来饲养的情况、在摄取向普通饲料添加熟制熟蚕粉末的饲料来饲养的情况以及在摄取向普通饲料添加熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂的饲料来饲养的情况下,比较变化的线粒体复合物1~4为止的活性。

[0148] 具体说明如下,在摄取实施例1的混合物同时利用正常果蝇和阿尔茨海默性痴呆果蝇确认了线粒体复合物I至线粒体复合物IV为止的功能。线粒体的主要功能为生成作为细胞的主要能源物质的三磷酸腺苷,通过在线粒体的内膜中存在的5个呼吸链复合物(respiratory complex)生成。复合物(Complex)至I复合物IV为止,通过氧化磷酸化过程(Oxidative phosphorylation)在线粒体内膜生成电位差,复合物V实际生成三磷酸腺苷。因此,进行了比较线粒体组合物1至4为止的活性的研究。

[0149] 为了验证线粒体组合物I的活性,将从果蝇成虫的脑中提取的10ml的线粒体与182ml的活性验证用缓冲溶液(25mM的聚丁烯(PB)、0.35%的牛血清蛋白(BSA)、0.06mM的二氯靛酚钠(DCIP)、0.07mM的癸基泛醌(decylubiquinone)、1mM的丙烯酸(AA))混合后,在于8ml的5mM烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)混合后在37℃的温度下反应30分钟后,在600nm中以30秒钟为间隔以4分钟的时间测定吸光度变化,从而在5个反复试样中测定活性。为了验证线粒体组合物II的活性,向184ml的活性验证用缓冲溶液(80mM的聚丁烯,pH值为7.8,0.1%的牛血清蛋白,2mM的乙二胺四乙酸(EDTA),0.2mM的三磷酸腺苷,80mM的二氯靛酚钠,50mM的癸基泛醌,1mM的丙烯酸,3mM的毒鱼藤(rotenone)添加1ml的丙二酸盐(malونات)和10ml的线粒体提取液后,在37℃的温度下反应30分钟后,在600nm中以30秒钟为间隔以4分钟的时间测定吸光度变化,在5个反复试样中测定活性。为了验证线粒体组合物III的活性,向80ml的活性验证用缓冲溶液(50mM的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl),pH值为7.5,4mM的NaN₃,0.1mM的癸基泛醌,80mM的琥珀酸(Succinate),2mM的氰化钾(KCN),3mM的毒鱼藤,40mM的细胞色素C(Cytochrome C))添加10ml的线粒体提取液和10ml的酵素反应液后,在25℃的温度下,在550nm中以30秒钟为间隔测定3分钟。为了验证线粒体组合物IV的活性,向188ml的活性验证用缓冲溶液(10mM的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐,pH值为7.0,120mM的氯化钾(KCl))添加10ml的铁细胞色素C底物(Ferrocycytochrome C substrate)(0.22mM的亚铁细胞色素(Ferrocycytochrome)和0.5mM的二硫苏糖醇(DTT))、2ml的酵素反应液和2ml的线粒体提取液后,在25℃的温度下,在550nm中以10秒钟的间隔测定1分钟。在5个反复试样中测定。利用方差分析(ANOVA)确认群组之间的差异后,实施Tukey-Kramer post hoc分析。

[0150] 2.实验结果

[0151] 上述实验结果,如图5所示,可确认,摄取向普通饲料仅单独添加朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末或者摄取熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的结果,在正常对照组果蝇和阿尔茨海默痴呆模型果蝇均确认线粒体复合物1~4的活性增加,尤其,摄取熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的果蝇模型的活性显著增加。

[0152] 1) 首先,对于未患有阿尔茨海默性痴呆的正常对照组的线粒体复合物活性的详细说明如下。

[0153] 在正常对照组的线粒体复合物1活性的情况下,相比于仅摄取普通饲料的试验组,在摄取添加有朝鲜当归提取物的饲料的试验组的果蝇中,增加20.5%,在摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的情况下,增加33.7%。与之相比,在摄取添加有熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的饲料的果蝇的情况下,增加45.5%,这示出,相比于朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末单独处理试验组的线粒体复合物1的活性增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂以1.4倍~2.2倍(11.8%p~25.0%p)显著增加的高活性,此结果为在熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂中,熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物相互弥补线粒体复合物1的活性来起到上升作用。

[0154] 并且,在正常对照组的线粒体复合物2活性的情况下,相比于仅摄取普通饲料的试验组,在摄取添加有朝鲜当归提取物的饲料的试验组的果蝇中,增加45.9%,在摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的试验组的情况下,增加23.1%。与之相比,在摄取添加有熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的饲料的试验组中,增加100.9%,这表示,相比于朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末单独处理试验组的线粒体复合物2活性增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂示出增加2.2倍~4.4倍(77.8%p~55.0%p)的惊人的活性增加率,此结果为在熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂中,熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物相互弥补线粒体复合物2活性来起到上升作用。

[0155] 并且,在正常对照组的线粒体复合物3活性的情况下,相比于仅摄取普通饲料的试验组,在摄取添加有朝鲜当归提取物的饲料的试验组的果蝇中,增加29.0%,在摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的试验组的情况下,增加57.7%。与之相比,在摄取添加有熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂的饲料的试验组中,增加111.2%,这表示,相比于朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末单独处理试验组的线粒体复合物3活性增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)示出增加1.9倍~3.8倍(53.5%p~82.2%p)的显著的活性增加率,此结果为在熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂中,熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物相互弥补线粒体复合物3活性来起到上升作用。

[0156] 并且,在正常对照组的线粒体复合物4活性的情况下,相比于仅摄取普通饲料的试验组,在摄取添加有朝鲜当归提取物的饲料的试验组的果蝇中,增加24.1%,在摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的试验组的情况下,增加43.7%。与之相比,在摄取添加有熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的饲料的试验组中,增加81.3%,这表示,相比于朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末单独处理试验组的线粒体复合物4的活性增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂示出增加1.9倍~3.4倍(37.6%p~57.2%p)的显著的活性增加率,此结果为在熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂中,熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物相互弥补线粒体复合物4活性来起到上升作用。

[0157] 并且,若综合整理正常对照组果蝇中的线粒体复合物活性,则在向正常果蝇单独摄取熟制熟蚕粉末或朝鲜当归提取物的情况下,线粒体复合物1~4的活性大大增加,但是,在利用熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)处理的情况下,相比于仅处理单独试样的试验组,起到线粒体复合物1~4的活性显著增加的上升作用,在老化进行的过程中,对于预防阿尔茨海默性痴呆具有大的贡献。

[0158] 2) 接着,以单独或组合形态制备朝鲜当归提取物和熟制熟蚕粉末,向阿尔茨海默痴呆模型果蝇摄取后,比较线粒体复合物1~4的活性(图5)。

[0159] 结果,经确认,利用单独或以复方剂包含朝鲜当归提取物和熟制熟蚕粉末的饲料培养的阿尔茨海默痴呆模型果蝇的线粒体复合物1~4的活性增加,在组合的情况下,相比于单独试样,示出显著上升的增加率。

[0160] 详细说明如下,在阿尔茨海默痴呆模型果蝇的线粒体复合物1活性的情况下,相比于仅摄取普通饲料的试验组,在摄取添加有朝鲜当归提取物的饲料的试验组的情况下,增加76.8%,在摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的试验组的情况下,增加70.2%。与之相比,在摄取添加有熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的饲料的试验组中,增加155.3%,这表示,相比于朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末单独处理试验组的线粒体复合物1的活性增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂示出增加2.0倍~2.2倍(78.5%p~85.1%p)的显著的活性增加率,此结果为在熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂中,熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物相互弥补线粒体复合物1活性来起到上升作用。

[0161] 并且,在阿尔茨海默痴呆模型果蝇的线粒体复合物2活性的情况下,相比于仅摄取普通饲料的试验组,在摄取添加有朝鲜当归提取物的饲料的试验组的情况下,增加100.0%,在摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的试验组的情况下,增加106.9%。与之相比,在摄取添加有熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的饲料的试验组中,增加214.0%,这表示,相比于朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末单独处理试验组的线粒体复合物2的活性增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂示出增加2.0倍~2.1倍(107.1%p~114.0%p)的显著的活性增加率,此结果为在熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂中,熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物相互弥补线粒体复合物2活性来起到上升作用。

[0162] 并且,在阿尔茨海默痴呆模型果蝇的线粒体复合物3活性的情况下,相比于仅摄取普通饲料的试验组,在摄取添加有朝鲜当归提取物的饲料的试验组的情况下,增加168.1%,在摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的试验组的情况下,增加263.0%。与之相比,在摄取添加有熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的饲料的试验组中,增加324.1%,这表示,相比于朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末单独处理试验组的线粒体复合物3的活性增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂示出增加1.2倍~1.9倍(61.1%p~156.0%p)的显著的活性增加率,此结果为在熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂中,熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物相互弥补线粒体复合物3活性来起到上升作用。

[0163] 并且,在阿尔茨海默痴呆模型果蝇的线粒体复合物4活性的情况下,相比于仅摄取普通饲料的试验组,在摄取添加有朝鲜当归提取物的饲料的试验组的情况下,增加187.6%,在摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的试验组的情况下,增加126.6%。与之相比,在摄取添加有熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的饲料的试验组中,增加270.4%,这表示,相比于朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末单独处理试验组的线粒体复合物

4的活性增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂示出增加1.4倍~2.1倍(82.8%p~143.8%p)的显著的活性增加率,此结果为在熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂中,熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物相互弥补线粒体组合物4活性来起到上升作用。

[0164] 如上所述,综合整理阿尔茨海默痴呆模型果蝇中的线粒体复合物活性如下,在将熟制熟蚕粉末或朝鲜当归提取物以单独试样向正常果蝇摄取的情况下,正常对照组和阿尔茨海默性痴呆试验组的线粒体复合物1~4的活性均大大增加,而且,在利用熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂处理的情况下,起到线粒体复合物1~4的活性与熟制熟蚕粉末或朝鲜当归提取物单独处理相比显著增加(最小61.14%p~最大156.0%p)的惊人的上升作用,从而,可对于阿尔茨海默性痴呆的预防及治疗具有大贡献。

[0165] 实验例7. 确认通过本发明实施例1的混合物处理的三磷酸腺苷生成能力增强效果

[0166] 1. 实验方法

[0167] 为了确认在上文中说明的线粒体复合物的活性增加对于三磷酸腺苷生成的影响,对仅摄取普通饲料的果蝇脑的三磷酸腺苷量于单独摄取朝鲜当归提取物和熟制熟蚕粉末的或摄取朝鲜当归提取物和熟制熟蚕粉末组合的果蝇脑的三磷酸腺苷量进行比较。若老化进行,则三磷酸腺苷的生成减少,比较分析成虫羽化后7日的年轻果蝇和20日的老化的果蝇的三磷酸腺苷量。

[0168] 2. 实验结果

[0169] 上述实验结果可确认,如图6所示,在朝鲜当归提取物和熟制熟蚕粉末单独处理的试验组的情况下,相比于仅摄取普通饲料的果蝇,20日的老化果蝇的三磷酸腺苷量增加43.9%~52.5%,即使老化进行,示出与7日的年轻果蝇相似的活力,而且,在处理熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的试验组的情况下,进一步增加,增加至59.9%(1.1倍~1.4倍),由此,示出高于7日的年轻果蝇的活力的显著的上升效果。

[0170] 详细说明如下,仅摄取普通饲料的20日的果蝇进行老化,相比于7日的果蝇,三磷酸腺苷生成减少31.0%,但是,在摄取添加有朝鲜当归提取物的饲料的果蝇中,相比于仅摄取普通饲料的果蝇,增加43.9%,在摄取添加有熟制熟蚕粉末的饲料的果蝇中,增加52.5%。与之相比,在摄取添加有熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的饲料的果蝇中,增加59.9%,这表示,相比于朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末单独处理试验组的三磷酸腺苷生成增加率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)示出增加1.1倍~1.4倍(7.4%p~16.0%p)的显著增加的增加率,此结果为对于随着老化的进行而示出的三磷酸腺苷生成抑制,相比于单独摄取熟制熟蚕粉末或朝鲜当归提取物,当利用熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)处理时起到进一步抑制的上升作用。

[0171] 实验例8. 确认通过本发明实施例1的组合服用的短期记忆力丧失的记忆力增强效果

[0172] 1. 实验方法

[0173] 为了确认对于作为初期阿尔茨海默性痴呆的特征的短期记忆力丧失的记忆力增强效果,在使实验用小鼠摄取实施例1的混合物的同时利用作为短期记忆力丧失药剂的东莨菪碱来进行实验。向出生后4周的雄性小鼠,以1.0g/Kg体重的比例给药3周的混合物中的家蚕品种熟制蚕加工物。在3周的给药结束后,小鼠在实验第1日,在进行实验的30分钟前将小鼠搬运至实验室,经过适应过程后,在被动回避(Passive avoidance)实验设备的明亮的

房间中适应2分钟。在实验第2日,在开始实验的30分钟之前,以0.75mg/Kg体重比例向小鼠注射溶解于盐水的东莨菪碱。对照组注射相同量的盐水。向被动回避设备的明亮的房间中放入小鼠后,30秒钟后,开启进入暗的房间的通道,若进入小鼠的尾巴为止,则施加4秒钟的0.4mA的电冲击。之后,测定进入暗的房间的时间。在实验第3日,将小鼠移动至明亮的房间后,开启朝向暗的房间的通道,测定尾巴为止进入的时间。实验结束后,通过执行方差分析和T-检验来统计分析对照组与实验组之间的差异。

[0174] 2. 实验结果

[0175] 上述实验结果表示,如图7所示,在仅摄取普通饲料的对照组小鼠的情况下,在实验第2日,盐水或盐水+东莨菪碱给药组均进入暗的房间,为 20.2 ± 5.13 秒钟和 13.1 ± 2.06 秒钟,没有大的差异,但是,在作为受到电冲击的24小时后的第3日,仅处理盐水的小鼠进入暗的房间的时间为 284.6 ± 11.69 秒钟,具有对于电冲击的记忆力。

[0176] 与之相比,在给药东莨菪碱的小鼠的情况下,在 50.1 ± 11.9 秒钟后移动至暗的房间,示出已丧失对于电冲击的记忆。

[0177] 与之相比,在摄取熟制熟蚕粉末的小鼠的情况下,仅给药盐水的试验组停留在有照明的房间的时间在第2日为 22.1 ± 5.88 秒钟、在第3日为 267.6 ± 20.5 秒钟,相比于仅摄取普通饲料的对照组,没有大的差异。

[0178] 与之相比,在给药东莨菪碱的试验组的情况下,在第2日为 22.2 ± 4.1 秒钟,没有差异,但是,在电冲击后的第3日为 90.7 ± 17.4 秒钟,相比于仅摄取普通饲料的对照组,示出增加81.3%的记忆力。

[0179] 在摄取朝鲜当归提取物的试验组的情况下,仅给药盐水的试验组停留在有照明的房间中的时间在第2日为 18.8 ± 4.2 秒钟,在受到电冲击后的第3日为 218.2 ± 33.4 秒钟,与仅摄取普通饲料的对照组及熟制熟蚕给药组相比没有大的差异。

[0180] 但是,在摄取东莨菪碱的短期记忆丧失诱导组的情况下,第2日为 17.0 ± 4.8 秒钟,在受到电冲击后的第3日为 90.3 ± 27.7 秒钟,相比于仅摄取普通饲料的对照组,记忆力增加80.6%。

[0181] 与之相比,在给药熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的实验组的情况下,仅处理盐水的试验组停留在有照明的房间的时间在第2日为 30.3 ± 8.7 秒钟,相比于对照组或其他实验组,在统计学上没有差异,但是,在受到电冲击后,不进入暗的房间,停留在有照明的房间的时间增加至 297.5 ± 2.5 秒钟。

[0182] 并且,在摄取东莨菪碱来诱导短期记忆力丧失的试验组的情况下,停留在有照明的房间的时间在第2日为 17.4 ± 3.3 秒钟,相比于对照组或其他实验组,没有差异或更短,在受到电冲击后的第3日为 130.1 ± 25.4 秒钟,记忆力增加159.7%。

[0183] 这表示,相比于朝鲜当归提取物或熟制熟蚕粉末单独处理试验组的短期记忆力上升率,熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)示出增加2.0倍($76.6\% \sim 79.1\%$)的显著的记忆力恢复效果,此结果为在熟制熟蚕粉末/朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)中,熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物起到相互弥补作用来对于短期记忆力改善起到上升作用。

[0184] 实验例9. 确认通过本发明实施例1的组合服用的空间记忆力增强效果

[0185] 1) 比较Y-迷宫试验(Y-maze test)中的通过本发明实施例1的熟制熟蚕和朝鲜当

归提取物复方剂的处理的空间记忆力增强效果

[0186] 1. 实验方法

[0187] 实验动物从实验动物供应企业 (Orient, Ga-Pyung, Korea) 购入8周龄的C57BL/6N 雄性小鼠并给出了7日的环境适应时间。所有实验动物分为4只/笼cage, 维持升温 ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) 和相对湿度 (50%~55%), 在以12小时为间隔昼夜交替的实验室环境中饲养, 供给足够的饮水和饲料。

[0188] 组分离及试样处理如下。

[0189] 1) 对照组 (0.25%的甲基纤维素 (methyl cellulose)); 2) 作为短期记忆力丧失药剂的东莨菪碱处理组 (东莨菪碱注射+盐水管理组 (scopolamine-injection+saline administration group)); 3) 205mg/kg的熟制熟蚕单独处理组 (东莨菪碱注射+205mg/kg的 b.w. 熟制熟蚕管理组 (scopolamine-injection+205mg/kg b.w. 熟制熟蚕 administration group)); 4) 165mg/kg的朝鲜当归单独处理组 (东莨菪碱注射+165mg/kg b.w. 朝鲜当归管理组 (scopolamine-injection+165mg/kg b.w. 朝鲜当归 administration group)); 5) 205mg/kg+164mg/kg的熟制熟蚕及朝鲜当归处理组 (东莨菪碱注射+205mg/kg+164mg/kg b.w. (scopolamine-injection+205+164mg/kg b.w.)); 6) 红参处理组 (308mg/kg的东莨菪碱注射+红参 (308mg/kg scopolamine-injection+Red ginseng); 和/或7) 作为阿尔茨海默型痴呆治疗剂的多奈哌齐 (donepezil) 处理组 (东莨菪碱注射+1mg/kg的 b.w. 多奈哌齐管理组 (scopolamine injection+1mg/kg b.w. donepezil administration group))。

[0190] 对于上述组, 以24日的时间每个24小时以205mg/kg b.w.、165mg/kg b.w.、205mg/kg+164 308mg/kg b.w.、2mg/kg b.w.的浓度对熟制熟蚕、朝鲜当归、熟制熟蚕及朝鲜当归组合、红参、多奈哌齐进行预处理 (口服给药)。在进行行为实验的30分钟前, 腹腔给药东莨菪碱 (1mg/kg b.w.), 在给药东莨菪碱后的30分钟后, 实施Y-迷宫试验及行为评价。通过如上所述的方式共执行7日的行为评价。

[0191] 用于Y-迷宫试验的Y-迷宫由3个臂构成, 各个臂 (arm) 的长度为42cm、宽度为3cm、高度为12cm, 三个臂之间相接触的角度为120度。所有实验装置由黑色聚乙烯塑料 (polyvinyl plastic) 构成。将各个臂设置为A、B、C后, 在一侧臂放入小鼠, 使其自由移动8分钟后, 记录小鼠所进入的臂。在此情况下, 仅限于尾巴为止完全进入的情况, 再次进入之前进入过的臂也记录。在依次进入三个互不相同的臂的情况下, 赋予1分 (实际变更, actual alternation)。变更行为力 (alternation behavior) 是指依次进入所有三个臂, 通过下述数学式计算。

[0192] 变更行为力 (%) = 实际变更/最大变更 $\times 100$ (最大变更: 总进入次数-2)

[0193] 2. 实验结果

[0194] 上述实验结果表示, 如图8所示, 东莨菪碱 (1mg/kg, i.p.) 的给药引起的自发变换行为 (spontaneous alternation) 与对照组相比统计学上显著减少 ($p < 0.05$)。相反, 熟制熟蚕和朝鲜当归提取物给药引起的自发变换行为呈与东莨菪碱给药组相比增加的形态。并且, 熟制熟蚕及组合给药组显著增加。这种自发变换行为增加是指学习及记忆力恢复。

[0195] 2) 莫里斯水迷宫测试 (Morris water maze test) 中的根据本发明实施例1的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂的处理的空间记忆力增强效果比较

[0196] 1. 实验方法

[0197] 在本领域中,通过莫里斯水迷宫测试的对于空间学习及认知力改善的实验作为痴呆改善药物的少选的一方法而周知。本迷宫的材料直径为90cm、高度为45cm,平台(white platform)的直径为6cm。在水迷宫的周围中,与摄像机连接的计算机系统和水温调节用装置等空间线索一直恒定维持。作为实验方法,向迷宫填充水来使水的高度成为30cm,将平台设置于水的高度以下1cm的位置,使得小鼠无法看到平台。在迷宫中,使用4个标记(marker)将迷宫分为4个部分,分为北东(NE)、北西(NW)、南东(SE)、南西(SW),在迷宫的一个限象设置平台。

[0198] 莫里斯水迷宫测试进行6日,在第一日,使各个小鼠在迷宫内自由有用1分钟,使得小鼠适应水,自此情况下,未设置平台,从第2日至5日为止,使各个小鼠在1日4次的频率在迷宫游泳1分钟,每次间隔10分钟。在从第2日至第5日为止的为期4日的1次的实验方法中,对于在一分钟之内在已设置于迷宫内的平台停留10秒钟的小鼠,将在实验结束之后的1分钟之内未找到平台或未在平台停留10秒钟的小鼠在实验结束后使其在平台人为停留10秒钟,之后,结束实验,在此情况下,将平台的为止固定在相同的位置。在第6日,从迷宫去除平台后,测定小鼠停留在之前平台所在的位置的时间。使用东莨菪碱作为健忘症诱发物质,在每日第一次入水的30分钟之前腹腔给药1mg/kg,利用Smart3.0 program(Noldus, Netherlands)记录及测定所有实验数据。

[0199] 2. 实验结果

[0200] 上述实验结果表示,如图9所示,莫里斯水迷宫测试结果,在第6日去除平台后,在迷宫释放1分钟后,当按照比例测定之前平台所在的目标区域(target zone)的时间时,对照组(Control)示出26.87%,对照组+东莨菪碱组(Con+Sco)示出14.81%,东莨菪碱+熟制熟蚕(SW+Sco)给药组示出43.03%,东莨菪碱+朝鲜当归(CDG+Sco)给药组示出40.28%,东莨菪碱+熟制熟蚕及朝鲜当归复方剂(COM+Sco)给药组示出43.66%,东莨菪碱+红参记忆力改善产品(RG+Sco)给药组示出44.67%,经确认,本发明的熟制熟蚕及朝鲜当归组合(COM)组的效果显著佳。

[0201] 实验例10. 比较通过本发明实施例1的组合服用的痴呆小鼠模型(3xTG-AD)中的改善效果

[0202] 1) 3xTG痴呆小鼠模型中的通过本发明实施例1的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂的处理的姿势调节能力增强效果比较

[0203] 1. 实验方法

[0204] 3xTG痴呆小鼠模型为在表达作为家族性阿尔茨海默痴呆相关突变的APP-swedish突变、PSEN1 M146V突变的同时表达作为额叶痴呆相关突变的MAPT P301L突变的转化小鼠模型。

[0205] 为了比较对于作为阿尔茨海默性痴呆的异常行为中的一种的姿势调节能力丧失的效果,利用在之前的实验例中示出优秀的效果的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂,向作为痴呆-诱发转化小鼠模型的3xTG痴呆小鼠摄取包含熟制熟蚕和朝鲜当归提取物的饲料后,进行空间记忆力实验。痴呆小鼠以0.2g/Kg体重的比例摄取熟制熟蚕、以0.16g/Kg体重的比例摄取朝鲜当归提取物后,对于出生后24周的小鼠实施姿势调节能力实验(mouse clasping test)。

[0206] 在姿势调节能力实验中,握住实验对象小鼠的尾巴后,录制10秒钟的视频,之后,

两名研究员分别观察视频,根据可延伸的腿数给出0至4的分数。若4个腿均无法延伸,则给出4分,若4个腿可均延伸,则给出0分。对于两名分析结果,取平均值。姿势调节能力越佳,则得到接近0的低分。

[0207] 2. 实验结果

[0208] 上述实验结果表明,如图10所示,摄取普通饲料的3xTG痴呆小鼠的姿势调节能力为 0.733 ± 0.1532 ,70%以上的3xTG小鼠不能很好地延伸腿。但是,摄取熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂饲料的24周龄3xTG痴呆小鼠的姿势调节能力为 0.375 ± 0.1829 ,具有48.8%的改善效果。

[0209] 2) 3xTG痴呆小鼠模型中的通过本发明实施例1的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的对于新事物的认知能力增强效果比较

[0210] 1. 实验方法

[0211] 向痴呆小鼠摄取熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂饲料后,实施对于新事物的认知能力确认研究(Novel objective recognition assay),从而确认在之前的实验例中示出优秀的效果的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂是否能够抑制对于3xTG痴呆小鼠的异常行为中的一种的对于新事物的认知能力恶化的研究。

[0212] 在第1日和第2日,使实验小鼠在空着的宽度为50cm、长度为50cm、高度为50cm的实验空间自由移动10分钟。在第3日,放入相同的两个物品后,录制10分钟的小鼠的移动,之后,测定停留在各个物品的时间。最后一天,分别放入旧物品和新物品后,录制10分钟,并测定停留在旧物品和新物品的时间。

[0213] 2. 实验结果

[0214] 上述实验结果表明,如图11所示,相比于摄取普通饲料的3xTG痴呆小鼠,摄取熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂的3xTG痴呆小鼠对于新物品具有优秀的认知能力。

[0215] 在22周的普通饲料摄取3xTG痴呆小鼠的情况下,在训练日,停留在相同的物品附近的时间分别为 $42.30 \pm 7.843\%$ 和 $57.69 \pm 7.843\%$,没有统计学($p > 0.05$)差异,若在试验日将其中一个替换为新形状的物品,则停留在新物品附近的时间为 $53.89 \pm 11.089\%$,停留在旧物品的时间为 $46.10 \pm 11.089\%$,停留的时间没有统计学差异。但是,在摄取熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂的痴呆小鼠的情况下,在训练日停留在相同的两个物品附近的时间分别为 $41.03 \pm 7.758\%$ 和 $58.96 \pm 7.758\%$,没有统计学差异,但在试验日的对于新物品或旧物品的关注度分别为 $67.46 \pm 3.819\%$ 和 $32.54 \pm 3.810\%$,具有统计学上显著差异。此结果表明熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂的摄取抑制在痴呆小鼠中出现的对于新物品的好奇心的减少。

[0216] 3) 3xTG痴呆小鼠模型中的通过本发明实施例1的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂处理的社会性增强效果比较

[0217] 1. 实验方法

[0218] 为了利用在之前的实验例中示出优秀的效果的熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂来比较对于作为阿尔茨海默性痴呆的特征的社会性丧失的效果,使3xTG痴呆小鼠摄取组合后进行社会性(Social interaction assay)变化实验。

[0219] 利用分为3个空间的小鼠社会性分析装置(宽度为60cm,长度为40cm,高度为40cm)执行社会性分析。利用两个具有小鼠可通过的孔的透明亚克力板分隔三个空间。两侧空间

具有可放入小鼠的由铁网形成的直径为10cm且高度为6cm的笼。首先,在两侧笼中没有小鼠的情况下,放入实验小鼠并使其自由适应5分钟。若适应结束,则向一侧笼放入一次也未见过的小鼠,在另一侧笼空着的状态下,将小鼠放入中间的空间后,录制10分钟的行为。最后,将新的小鼠放入空的笼后,录制10分钟的行为。分析所录制的行为来测定各个实验小鼠停留在具有空的笼的空间或小鼠停留在笼内的时间和已经见过的小鼠和新的小鼠停留在空间的时间。

[0220] 2. 实验结果

[0221] 上述实验结果表示,如图12所示,相比于摄取普通饲料的3xTG痴呆小鼠,摄取熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂的3xTG痴呆小鼠具有优秀的社会性。

[0222] 23周的普通饲料摄取3xTG痴呆小鼠停留在无处理空间的比例为 $8.75 \pm 5.772\%$,新见面的小鼠停留在空间的时间的比例为 $51.24 \pm 5.772\%$,没有差异。并且,翌日,停留在放入新小鼠的空间的时间的比例为 $46.71 \pm 6.683\%$,停留在已见过一次的小鼠所在的空间的时间的比例为 $53.28 \pm 6.683\%$,没有差异。但是,在熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂摄取3xTG痴呆小鼠的情况下,停留在新小鼠所在的空间的时间比例为 $68.82 \pm 5.907\%$,相比于 $31.17 \pm 5.907\%$ 的停留在空的笼所在的空间的时间的比例,停留时间在统计学上显著久,翌日,停留在新小鼠所在的空间的时间比例为 $70.55 \pm 6.341\%$,相比于 $29.44 \pm 6.341\%$ 的停留在已见过一次的小鼠所在的空间的时间,统计学上显著高。此结果表示熟制熟蚕和朝鲜当归提取物复方剂的摄取可改善3xTG痴呆小鼠的社会性缺乏。

[0223] 如上所述,本发明表示,在摄取作为新形态的饮食药用原料的熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物复方剂(实施例1)的情况下,示出优秀的记忆力改善效果和阿尔茨海默痴呆的预防及治疗效果,相比于单独摄取熟制熟蚕粉末或朝鲜当归提取物,示出进一步得到提高的效果。这表示,熟制熟蚕粉末和朝鲜当归提取物具有互不相同的神经系统作用机制,在以混合它们的复方剂形态制备的情况下,相互之间起到弥补作用来发挥上升效果。

[0224] 由于上述结果,可期待,可根本上预防及治疗成为现代社会的重要问题的老龄化和老龄化引起的痴呆,同时,有助于改善学生、考试准备人员、上班族等各种国民的改善,研发并售卖利用本发明的用于记忆力改善和预防及治疗痴呆的保健功能食品及医药品,通过熟制熟蚕和当归的新的利用率创造及高附加价值化,对于保健功能食品生产行业和养蚕行业、当归生产行业的法阵和农业发展的作出贡献。

[0225] 制剂例1. 药学制备

[0226] 将200g的实施例1的混合物与175.9g的乳糖、180g的马铃薯淀粉及32g的胶态硅酸相混合。向该混合物添加10%的明胶溶液后,粉碎并通过14目筛。干燥其并添加160g的马铃薯淀粉、50g的滑石及5g的硬脂酸镁来获取混合物,将上述混合物制备为片剂。

[0227] 制剂例2. 食品制备

[0228] 制剂例2-1. 烹饪用调料的制备

[0229] 将1重量百分比的实施例1的混合物添加至烹饪用调料来制备保健增强用调料。

[0230] 制剂例2-2. 乳制品(dairy products)的制备

[0231] 将0.1重量百分比的实施例1的混合物添加至牛乳,利用上述牛乳制备如黄油及冰淇淋的各种乳制品。

[0232] 制剂例2-3. 蔬菜汁制备

[0233] 将实施例1的混合物添加至番茄汁或胡萝卜汁来制备保健增强用蔬菜汁。

[0234] 以优选实施例为中心说明上述本发明,本发明所属技术领域的普通技术人员可在本发明的本质技术范围内体现与上述本发明的详细说明不同形态的实施例。其中,在发明要求保护范围中示出本发明的本质技术范围,属于与其等同范围内的所有差异均包含在本发明。

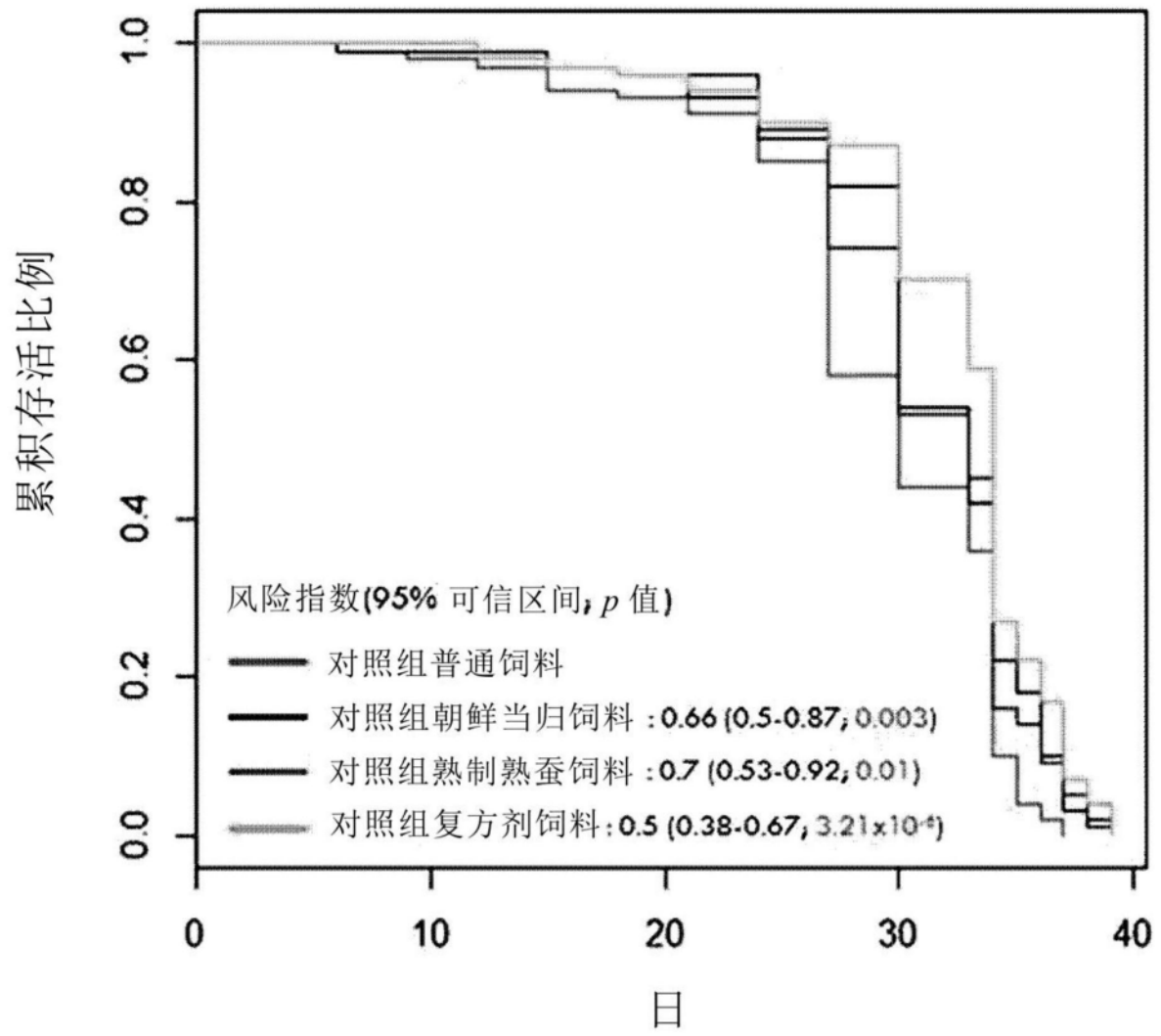


图1

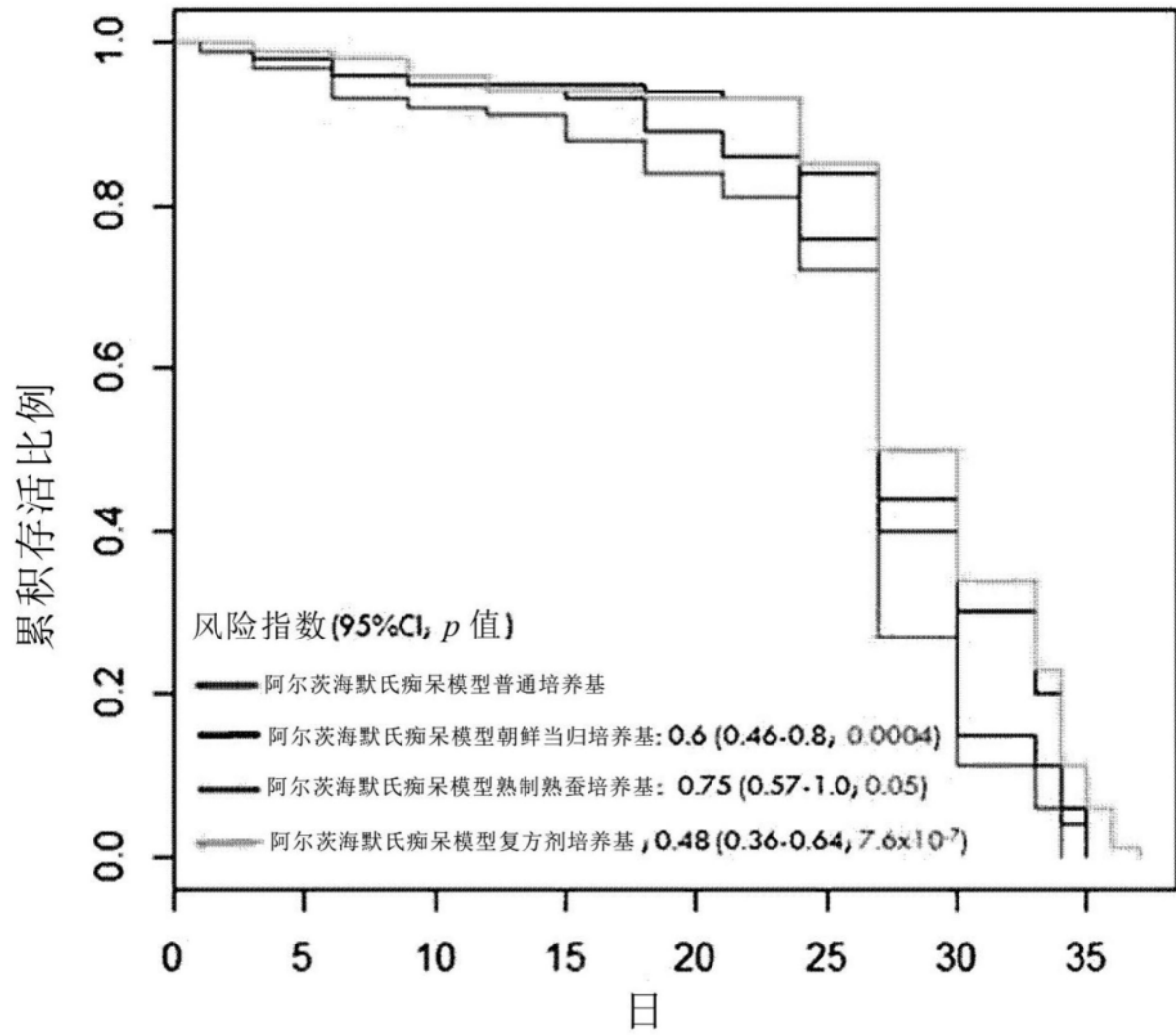


图2

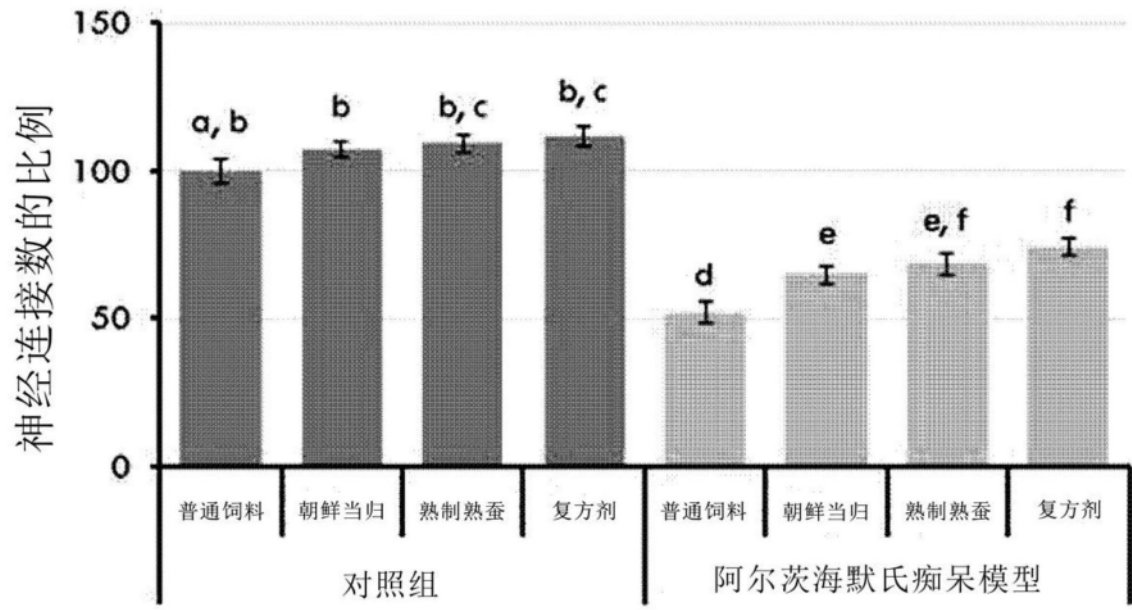


图3

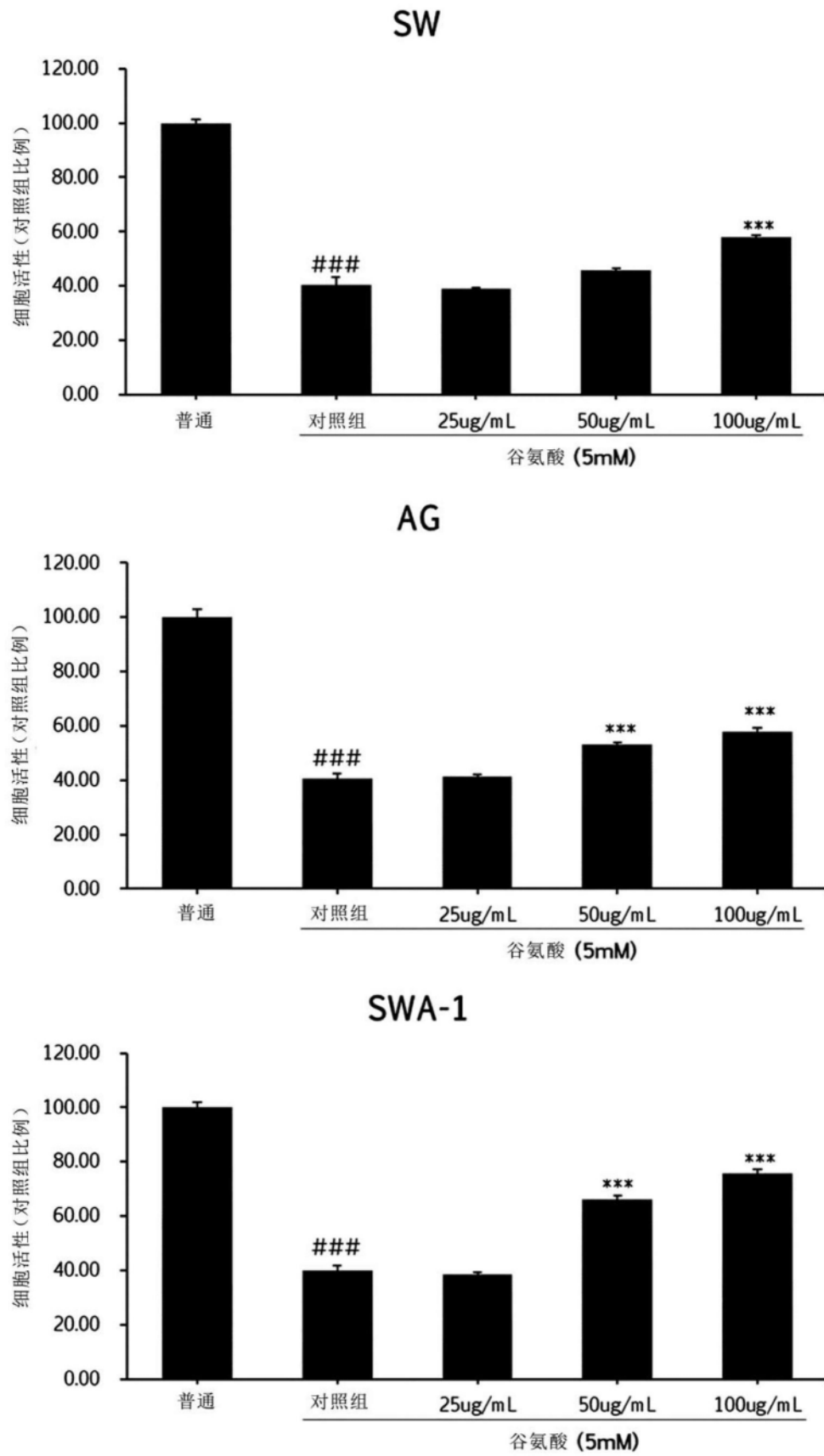
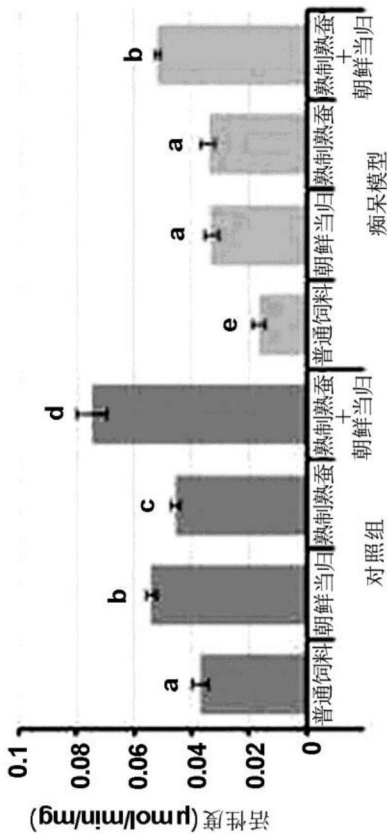
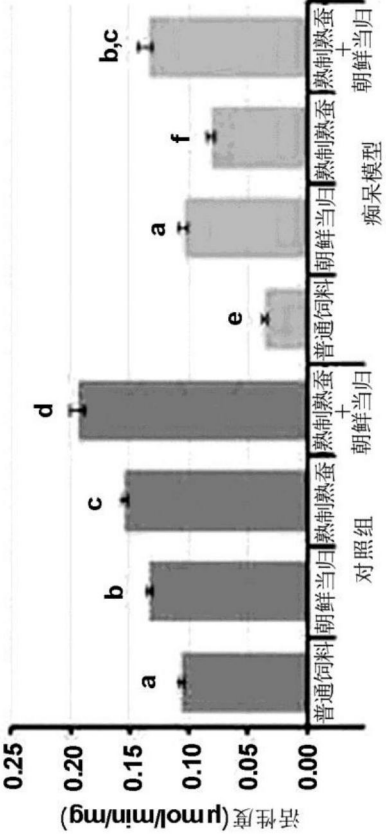


图4

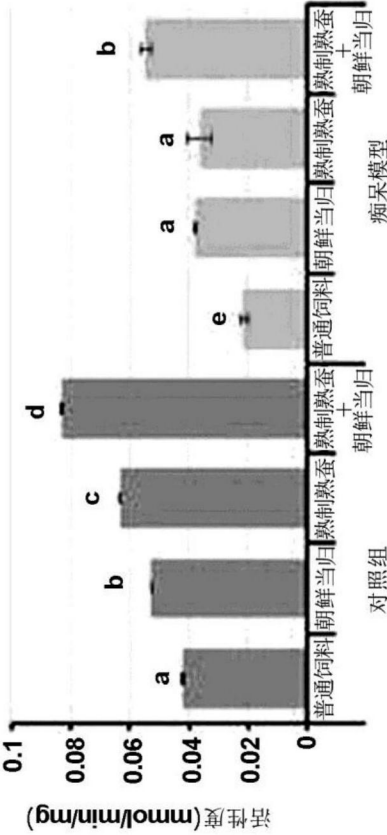
线粒体组合物 2



线粒体组合物 4



线粒体组合物 1



线粒体组合物 3

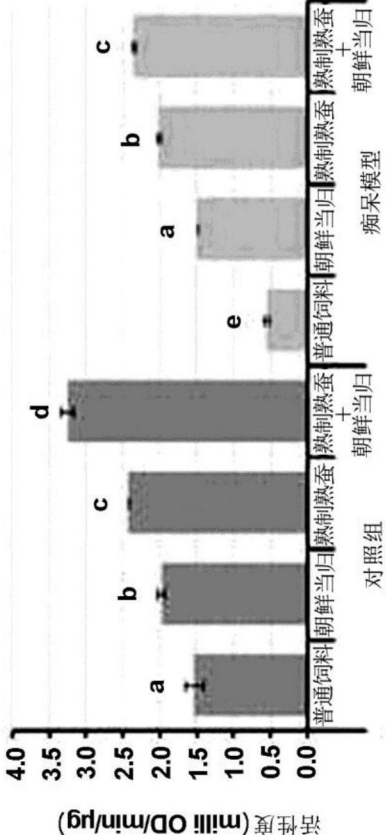


图5

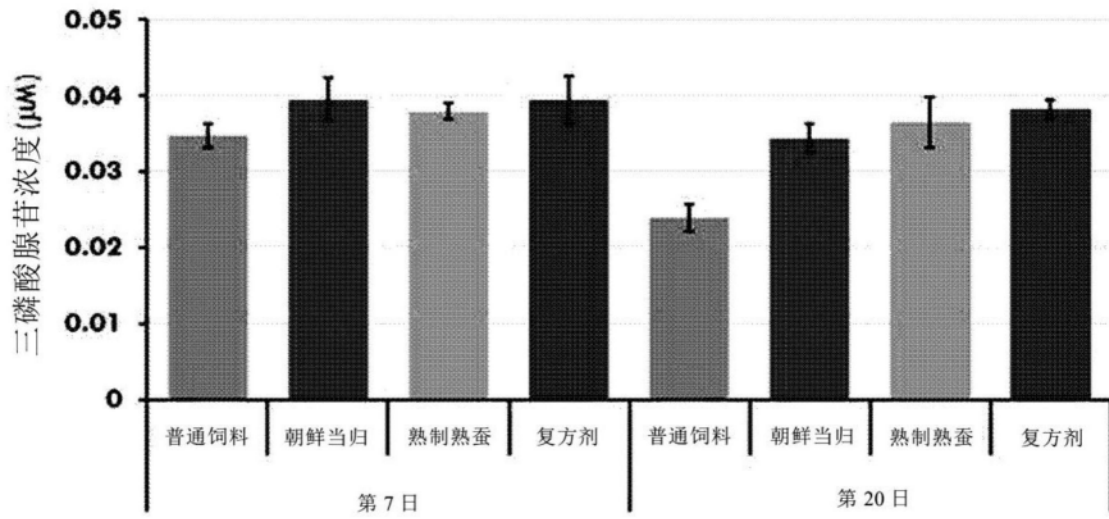


图6

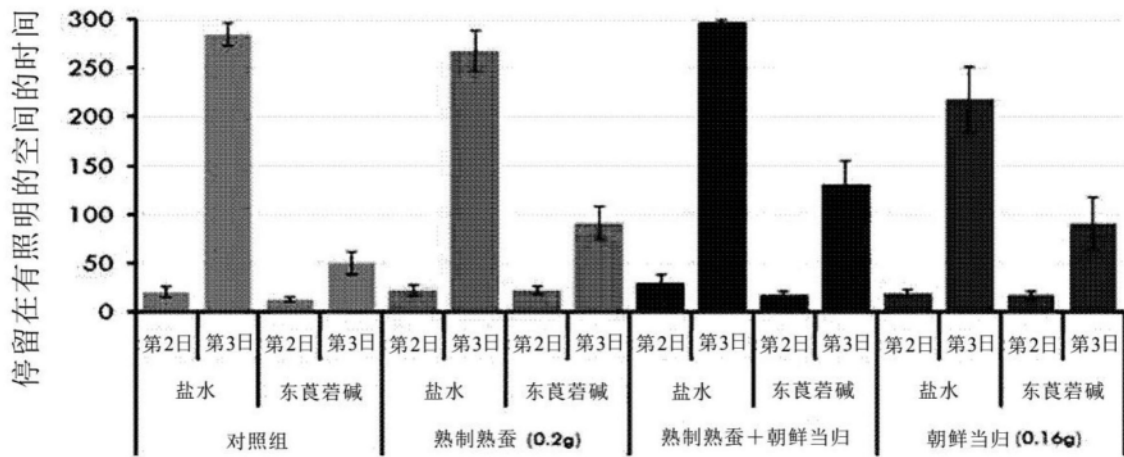


图7

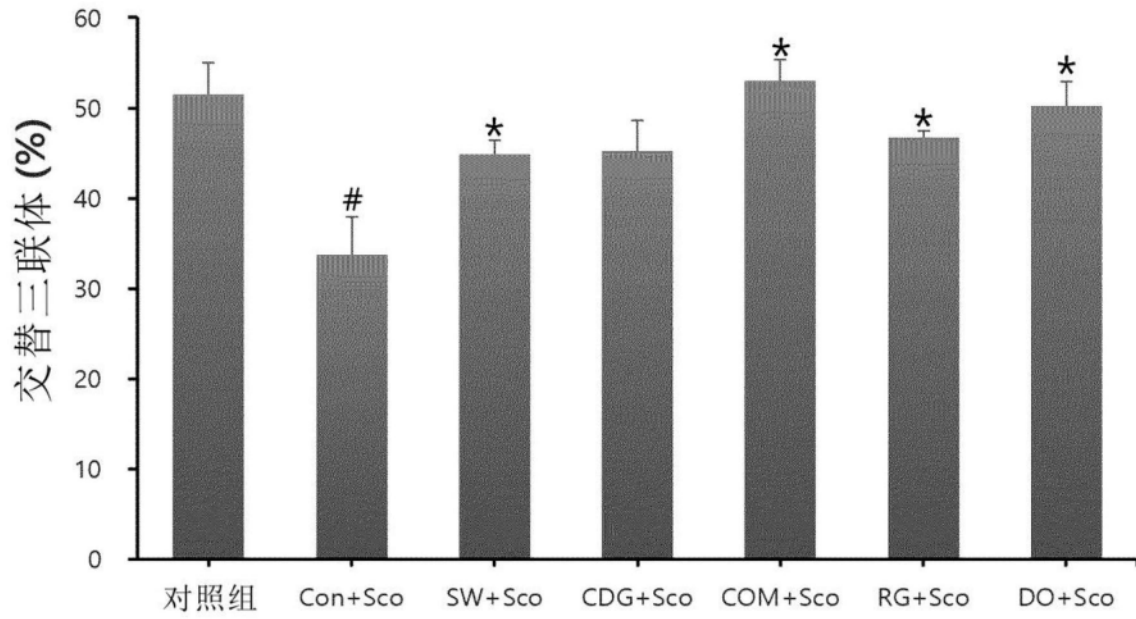


图8

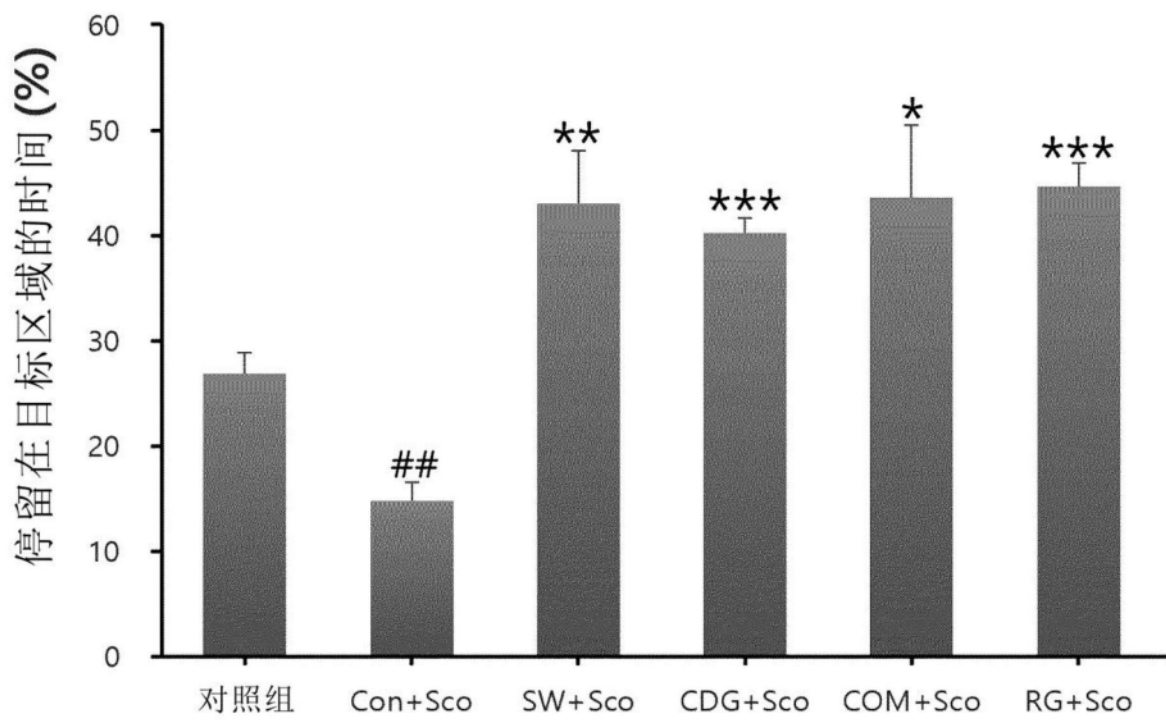


图9

姿势调节能力测试

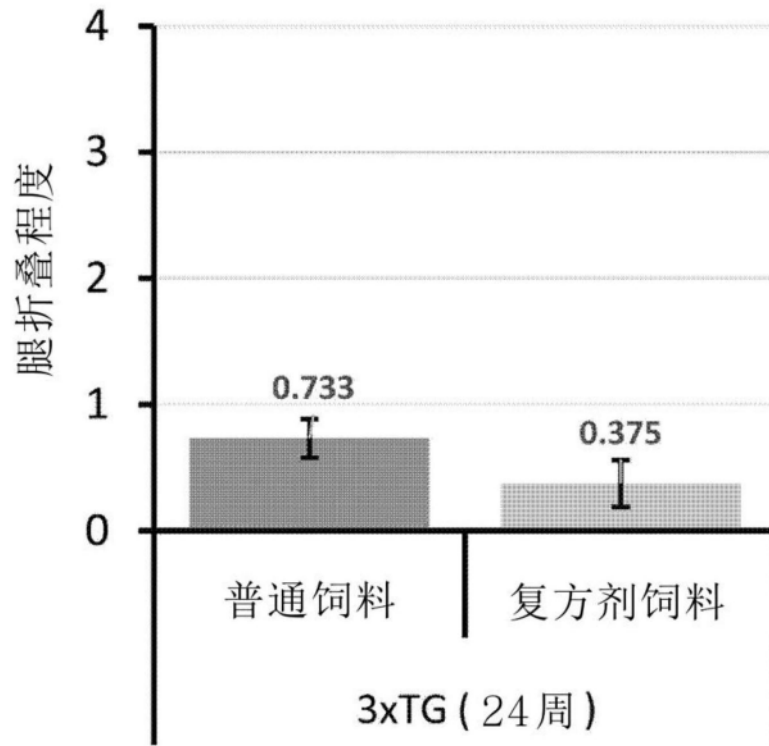


图10

对于新物品的认知能力比较

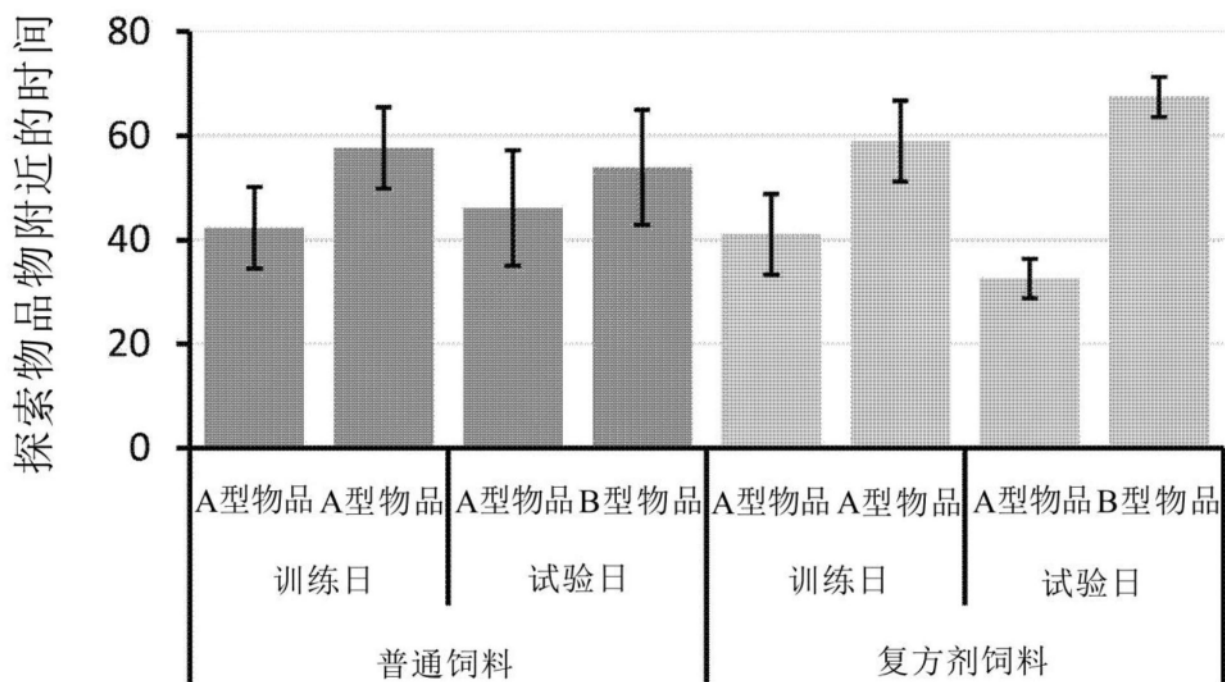


图11

社会性增强效果试验

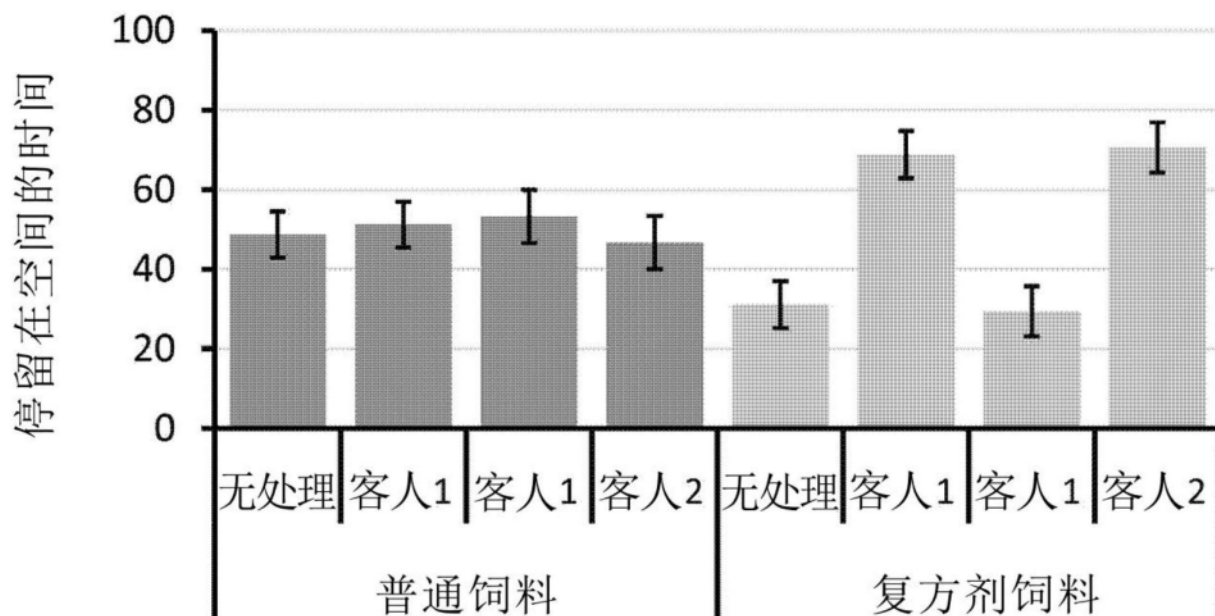


图12