



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102883716 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201180011122. 5

(22) 申请日 2011. 02. 25

(30) 优先权数据

2010-042819 2010. 02. 26 JP

2010-126717 2010. 06. 02 JP

2010-270578 2010. 12. 03 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 08. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2011/054358 2011. 02. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/105568 JA 2011. 09. 01

(73) 专利权人 小太郎汉方制药株式会社

地址 日本大阪府大阪市

专利权人 国立大学法人东北大学

(72) 发明人 大泉康 山国彻 川畑伊知郎

吉田雅昭

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 孔青 庞立志

(51) Int. Cl.

A61K 31/352(2006. 01)

A23L 1/30(2006. 01)

A61K 31/7048(2006. 01)

A61K 36/00(2006. 01)

A61K 36/75(2006. 01)

A61P 25/16(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

A61P 43/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 02053152 A1, 2002. 07. 11, 权利要求 1、3-4、8-9.

JP 2008127325 A, 2008. 06. 05, 全文.

审查员 庄崧

权利要求书3页 说明书26页 附图23页

(54) 发明名称

改善伴有学习 / 记忆障碍和运动障碍等的中枢神经变性疾病的干燥植物组织和植物组织提取物以及含有它们的药品和食品

(57) 摘要

本发明的课题在于:开发具有中枢神经变性疾病、特别是阿尔茨海默病和帕金森病的前所未有的显著的改善效果的干燥植物组织或植物组织提取物。本发明提供具有前所未有的显著的抗阿尔茨海默病活性和 / 或抗帕金森病活性的干燥植物组织和植物组织提取物。本发明还提供含有上述干燥植物组织或植物组织提取物的用于改善中枢神经变性疾病、特别是增强记忆的获得、保持和记起能力的药品和食品。

1. 用于改善中枢神经变性疾病的柑橘类果皮的干燥植物组织,其中,相对于100重量%的干燥植物组织,含有0.4重量%以上的川陈皮素,川陈皮素/芸香柚皮苷的含有重量比为1.0以上。

2. 用于改善中枢神经变性疾病的柑橘类叶的干燥植物组织,其中,相对于100重量%的干燥植物组织,含有0.3重量%以上的川陈皮素,川陈皮素/芸香柚皮苷的含有重量比为1.0以上。

3. 权利要求1或2中任一项所述的干燥植物组织,其中,中枢神经变性疾病为阿尔茨海默病和/或帕金森病。

4. 权利要求1所述的干燥植物组织,其中,相对于100重量%的干燥植物组织,含有0.4~2.0重量%的川陈皮素,并且川陈皮素/芸香柚皮苷的含有重量比为1.0~23.0。

5. 权利要求2所述的干燥植物组织,其中,相对于100重量%的干燥植物组织,含有0.3~2.0重量%的川陈皮素,并且川陈皮素/芸香柚皮苷的含有重量比为1.0~23.0。

6. 权利要求1或2中任一项所述的干燥植物组织,其中,中枢神经变性疾病的改善是通过提高cAMP应答序列依赖性转录活性、增强记忆的获得、保持和记起能力、促进酪氨酸羟化酶转录活性、提高酪氨酸羟化酶表达量、促进多巴胺合成能力或促进多巴胺分泌来实现的。

7. 用于改善中枢神经变性疾病的柑橘类的植物组织提取物,其中,相对于100重量%的植物组织提取物,含有0.6重量%以上的川陈皮素,川陈皮素/芸香柚皮苷的含有重量比为2.0以上。

8. 权利要求7所述的植物组织提取物,该提取物是由权利要求1或2中任一项所述的干燥植物组织通过水提取而得到的。

9. 权利要求7所述的植物组织提取物,其中,中枢神经变性疾病为阿尔茨海默病和/或帕金森病。

10. 权利要求9所述的植物组织提取物,其中,相对于100重量%的植物组织提取物,含有0.6~3.0重量%的川陈皮素,并且川陈皮素/芸香柚皮苷的含有重量比为2.0~14.0。

11. 权利要求7所述的植物组织提取物,其中,中枢神经变性疾病的改善是通过提高cAMP应答序列依赖性转录活性、增强记忆的获得、保持和记起能力、促进酪氨酸羟化酶转录活性、提高酪氨酸羟化酶表达量、促进多巴胺合成能力或促进多巴胺分泌来实现的。

12. 权利要求1或2中任一项所述的干燥植物组织,其中,柑橘类为芸香科桔(*Citrus reticulata* Blanco, Rutaceae)、立花桔或大红桔。

13. 权利要求7所述的植物组织提取物,其中,柑橘类为芸香科桔(*Citrus reticulata* Blanco, Rutaceae)、立花桔或大红桔。

14. 阿尔茨海默病治疗用药品,其中,相对于100重量%的药品,以10~100重量%的权利要求1或2中任一项所述的干燥植物组织或10~90重量%的权利要求7所述的植物组织提取物作为有效成分。

15. 帕金森病治疗用药品,其中,相对于100重量%的药品,以10~100重量%的权利要求1或2中任一项所述的干燥植物组织或10~90重量%的权利要求7所述的植物组织提取物作为有效成分。

16. 中枢神经变性疾病的治疗用药品,该药品以由混合物通过水提取得到的提取物作

为有效成分,所述混合物是将权利要求 1 或 2 中任一项所述的干燥植物组织和医药上可接受的生药成分以 1:5 ~ 1:10 的重量比率混合而得到的。

17. 权利要求 16 所述的药品,其中,提取物为权利要求 7 ~ 11 或 13 中任一项所述的植物组织提取物。

18. 权利要求 16 所述的药品,其中,生药成分为选自威灵仙、乌药、延胡索、黄芪、黄芩、黄柏、远志、藿香、葛根、干姜、甘草、桔梗、菊花、枳实、杏仁、桂皮、红花、香附子、厚朴、牛膝、吴茱萸、五味子、柴胡、山栀子、地黄、芍药、生姜、升麻、神麴、石膏、川芎、前胡、苍术、苏木、紫苏叶、大黄、大枣、大腹皮、泽泻、竹茹、知母、钩藤、天麻、天门冬、当归、桃仁、人参、麦芽、麦冬、半夏、白芷、白术、槟榔子、茯苓、防己、芒硝、防风、牡丹皮、麻黄、木通、木香、益母草、龙胆和羌活的一种以上的生药成分。

19. 权利要求 14 ~ 18 中任一项所述的药品,其中:

干燥植物组织为柑橘类的干燥植物组织,其中,相对于 100 重量%的干燥植物组织,含有 0.3 ~ 2.0 重量%的川陈皮素,含有 0.4 重量%以下的芸香柚皮苷,含有 0.1 ~ 0.8 重量%的橘皮素,含有 0.4 ~ 12 重量%的橘皮苷,川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 1.0 ~ 23.0;

提取物为柑橘类的植物组织提取物,其中,相对于 100 重量%的植物组织提取物,含有 0.6 ~ 3.0 重量%的川陈皮素,含有 0.4 重量%以下的芸香柚皮苷,含有 0.1 ~ 1.0 重量%的橘皮素,含有 1.8 ~ 6.0 重量%的橘皮苷,川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 2.0 ~ 14.0;

柑橘类为芸香科桔 (*Citrus reticulata* Blanco, Rutaceae)、立花桔或大红桔。

20. 权利要求 14 ~ 18 中任一项所述的药品,其特征在于:促进突触可塑性、抑制 PKA/ERK 信号传递、增强记忆的获得或保持能力、提高 GTP 环化水解酶 I 量、促进多巴胺合成能力、提高多巴胺含量或促进多巴胺分泌。

21. 权利要求 20 所述的药品,该药品为茶剂、煎剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂、凝胶剂、散剂、液剂、糖浆剂或提取物制剂的形态。

22. 权利要求 21 所述的药品,该药品为细粒剂的形态。

23. 用于改善中枢神经变性疾病的药品,该药品以柑橘类的植物组织提取物作为有效成分,其中,相对于 100 重量%的植物组织提取物,含有 0.6 ~ 3.0 重量%的川陈皮素,含有 0.4 重量%以下的芸香柚皮苷,含有 0.1 ~ 1.0 重量%的橘皮素,含有 1.8 ~ 6.0 重量%的橘皮苷,川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 2.0 ~ 14.0;

柑橘类为芸香科桔 (*Citrus reticulata* Blanco, Rutaceae)、立花桔或大红桔;

中枢神经变性疾病的改善是指促进突触可塑性、抑制 PKA/ERK 信号传递、增强记忆的获得或保持能力、提高 GTP 环化水解酶 I 量、促进多巴胺合成能力、提高多巴胺含量或促进多巴胺分泌。

24. 权利要求 23 所述的药品,其中,植物组织提取物是由混合物通过水提取而得到的,所述混合物是将干燥植物组织和医药上可接受的生药成分以 1:5 ~ 1:10 的重量比率混合而得到的;

干燥植物组织为柑橘类的干燥植物组织,其中,相对于 100 重量%的干燥植物组织,含有 0.3 ~ 2.0 重量%的川陈皮素,含有 0.4 重量%以下的芸香柚皮苷,含有 0.1 ~ 0.8 重量%

的橘皮素,含有 0.4 ~ 12 重量%的橘皮苷,川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 1.0 ~ 23.0。

25. 权利要求 23 所述的药品,该药品为茶剂、煎剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂、凝胶剂、散剂、液剂、糖浆剂或提取物制剂的形态。

26. 权利要求 25 所述的药品,该药品为细粒剂的形态。

27. 权利要求 23 ~ 26 中任一项所述的药品,其中,生药成分为选自威灵仙、乌药、延胡索、黄芪、黄芩、黄柏、远志、藿香、葛根、干姜、甘草、桔梗、菊花、枳实、杏仁、桂皮、红花、香附子、厚朴、牛膝、吴茱萸、五味子、柴胡、山梔子、地黄、芍药、生姜、升麻、神麴、石膏、川芎、前胡、苍术、苏木、紫苏叶、大黄、大枣、大腹皮、泽泻、竹茹、知母、钩藤、天麻、天门冬、当归、桃仁、人参、麦芽、麦冬、半夏、白芷、白术、槟榔子、茯苓、防己、芒硝、防风、牡丹皮、麻黄、木通、木香、益母草、龙胆和羌活的一种以上的生药成分。

28. 用于改善中枢神经变性疾病的食品,其中,相对于 100 重量%的食品,含有 10 ~ 100 重量%的权利要求 1 或 2 中任一项所述的干燥植物组织或 10 ~ 90 重量%的权利要求 7 所述的植物组织提取物。

29. 权利要求 28 所述的食品,其中,中枢神经变性疾病为阿尔茨海默病和 / 或帕金森病。

30. 权利要求 28 所述的食品,其中,中枢神经变性疾病的改善是通过增强记忆的获得、保持和记起能力的机理来实现的。

31. 权利要求 28 ~ 30 中任一项所述的食品,其中:

干燥植物组织为柑橘类的干燥植物组织,其中,相对于 100 重量%的干燥植物组织,含有 0.3 ~ 2.0 重量%的川陈皮素,含有 0.4 重量%以下的芸香柚皮苷,含有 0.1 ~ 0.8 重量%的橘皮素,含有 0.4 ~ 12 重量%的橘皮苷,川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 1.0 ~ 23.0 ;

植物组织提取物为柑橘类的植物组织提取物,其中,相对于 100 重量%的植物组织提取物,含有 0.6 ~ 3.0 重量%的川陈皮素,含有 0.4 重量%以下的芸香柚皮苷,含有 0.1 ~ 1.0 重量%的橘皮素,含有 1.8 ~ 6.0 重量%的橘皮苷,川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 2.0 ~ 14.0 ;

柑橘类为芸香科桔 (*Citrus reticulata* Blanco, *Rutaceae*)、立花桔或大红桔。

改善伴有学习 / 记忆障碍和运动障碍等的中枢神经变性疾病的干燥植物组织和植物组织提取物以及含有它们的药品和食品

技术领域

[0001] 本发明涉及改善伴有学习 / 记忆障碍和运动障碍等的中枢神经变性疾病的干燥植物组织和植物组织提取物。本发明还涉及含有上述干燥植物组织或植物组织提取物的药品和食品。

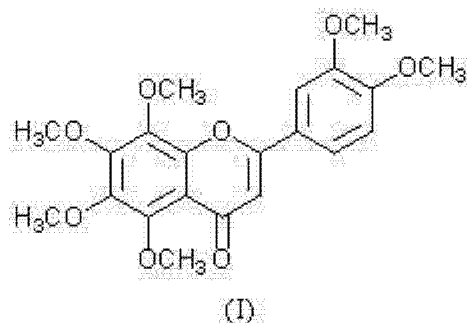
背景技术

[0002] 在现代的高龄化社会中,阿尔茨海默病和帕金森病等中枢神经变性疾病的患者增多,已成为社会问题。其中,阿尔茨海默病是一种伴有认知功能障碍、学习 / 记忆障碍等的进行性中枢神经变性疾病,认为其原因在于:由降低对学习 / 记忆重要的 N- 甲基 -D- 天冬氨酸 (NMDA) 受体功能的 β - 淀粉状蛋白肽的聚合和蓄积引起的神经变性 (参照非专利文献 1)。

[0003] 通常,记忆包括三个过程、即记忆的获得 (encoding)、保持 (retention) 和记起 (recall) 的过程,认为这三个过程的机理不同。在作为阿尔茨海默病的核心症状的学习 / 记忆障碍中,可理解为特别是在记忆的保持和记起过程中产生明显的障碍。其中,作为具有改善记起能力的作用的天然黄酮类之一,已知有式 (I) :

[0004] [化学式 1]

[0005]



[0006] 所表示的川陈皮素 (参照专利文献 1 或非专利文献 1 或 2), 已知川陈皮素还对神经细胞具有伸长神经突起的作用 (参照专利文献 2)。川陈皮素包含在各种柑橘类植物的果皮等中,但通常只是极微量的。因此,作为来自柑橘类植物的果皮的生药之一的陈皮通常显示出健胃作用、去痰作用或镇咳作用等,认为川陈皮素并不参与这些作用。迄今为止,凌驾于川陈皮素特有的药效之上、即显示出超过川陈皮素的中枢神经变性疾病改善作用的柑橘类的干燥植物组织及其提取物还是未知的。

[0007] 另外,还已知有含有来自柑橘类的全果的榨汁液或其提取物、且显示出学习 / 记忆障碍改善作用的功能性食品 (参照专利文献 3), 其中使用的柑橘类的全果中仅含有微量的川陈皮素,其药效并没有超过川陈皮素单体的增强记起能力的效果。

[0008] 另一方面,作为中枢神经变性疾病之一的帕金森病以震颤、动作缓慢、肌肉僵硬、

姿势反射障碍等四大运动症候为特征,是由于多巴胺动作性神经系统因为某种要因发生变性脱落而引起的运动领域的功能障碍。作为其治疗方法之一,目前在施行多巴胺补充疗法等。已知有多种提高多巴胺生物合成路径中酶的转录活性、即其 mRNA 的表达量的药物,但增加多巴胺自身的生成量的药物几乎还未知。另外,显示出多巴胺合成能力促进作用和多巴胺分泌促进作用的柑橘类的干燥植物组织及其提取物也还未知。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献 1:国际公开 2005/082351 号公报;

[0012] 专利文献 2:日本特开 2002-60340 号公报;

[0013] 专利文献 3:日本特开 2007-61028 号公报;

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献 1:日药理志 (Folia Pharmacol. Jpn.) 132, 155-159 (2008);

[0016] 非专利文献 2:The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2007, 第 321 卷, No. 2, 第 784-790 页。

发明内容

[0017] 发明所要解决的课题

[0018] 在这种状况下,若开发出具有中枢神经变性疾病、特别是阿尔茨海默病和帕金森病的改善效果的干燥植物组织或植物组织提取物,则可以期待实现中枢神经变性疾病中有望的根治性治疗药(根本治療薬)的开发。其结果,可以朝向我国所面临的克服高龄化社会中的认知症等难治进行性神经疾病或解决医疗保险制度的问题大幅前进。而且,若开发出不仅增强学习/记忆障碍中的记忆的记起能力、还增强记忆的获得和保持能力的干燥植物组织或植物组织提取物,则在药品和食品中的应用更为有效。

[0019] 解决课题的方法

[0020] 本发明人等深入研究的结果,发现了具有显著的中枢神经变性疾病改善效果的柑橘类的干燥植物组织和植物组织提取物。特别是本发明人等发现了可以用作中枢神经变性疾病中的阿尔茨海默病和帕金森病的根治性治疗药的柑橘类的干燥植物组织和植物组织提取物。本发明人等进一步发现了在作为阿尔茨海默病的核心症状的记忆障碍中不仅增强记忆的记起能力、还增强记忆的获得和保持能力的柑橘类的干燥植物组织和植物组织提取物。

[0021] 具体而言,本发明包括以下方案:

[0022] (1) 用于改善中枢神经变性疾病的柑橘类的果皮的干燥植物组织,其中,相对于 100 重量%的干燥植物组织,含有 0.4 重量%以上的川陈皮素;

[0023] (2) 用于改善中枢神经变性疾病的柑橘类的叶的干燥植物组织,其中,相对于 100 重量%的干燥植物组织,含有 0.3 重量%以上的川陈皮素;

[0024] (3) (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织,其中,川陈皮素/芸香柚皮苷的含有重量比为 1.0 以上;

[0025] (4) (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织,其中,中枢神经变性疾病为阿尔茨海默病和/或帕金森病;

[0026] (5) (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织, 其中, 中枢神经变性疾病的改善是通过提高 cAMP 应答序列 (CRE) 依赖性转录活性、增强记忆的获得、保持和记起能力、促进酪氨酸羟化酶 (TH) 转录活性、提高 TH 表达量、促进多巴胺合成能力或促进多巴胺分泌来实现的;

[0027] (6) 用于改善中枢神经变性疾病的柑橘类的植物组织提取物, 其中, 相对于 100 重量 % 的植物组织提取物, 含有 0.6 重量 % 以上的川陈皮素;

[0028] (7) (6) 所述的植物组织提取物, 其中, 川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 2.0 以上;

[0029] (8) (6) 所述的植物组织提取物, 是由 (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织通过水提取、优选 60 ~ 100°C 的水提取而得到的;

[0030] (9) (6) 所述的植物组织提取物, 其中, 中枢神经变性疾病为阿尔茨海默病和 / 或帕金森病;

[0031] (10) (6) 所述的植物组织提取物, 其中, 中枢神经变性疾病的改善是通过提高 CRE 依赖性转录活性、增强记忆的获得、保持和记起能力、促进 TH 转录活性、提高 TH 表达量、促进多巴胺合成能力或促进多巴胺分泌来实现的;

[0032] (11) (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织, 其中, 柑橘类为芸香科桔 (*Citrus reticulata* Blanco, *Rutaceae*);

[0033] (12) (6) 所述的植物组织提取物, 其中, 柑橘类为芸香科桔 (*Citrus reticulata* Blanco, *Rutaceae*);

[0034] (13) (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织, 其中, 柑橘类为立花桔、优选日本立花桔;

[0035] (14) (6) 所述的植物组织提取物, 其中, 柑橘类为立花桔、优选日本立花桔;

[0036] (15) (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织, 其中, 柑橘类为大红桔;

[0037] (16) (6) 所述的植物组织提取物, 其中, 柑橘类为大红桔;

[0038] (17) 阿尔茨海默病治疗用药品, 其中, 相对于 100 重量 % 的药品, 以 10 ~ 100 重量 % 的 (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织或 10 ~ 90 重量 % 的 (6) 所述的植物组织提取物作为有效成分;

[0039] (18) 帕金森病治疗用药品, 其中, 相对于 100 重量 % 的药品, 以 10 ~ 100 重量 % 的 (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织或 10 ~ 90 重量 % 的 (6) 所述的植物组织提取物作为有效成分;

[0040] (19) 中枢神经变性疾病的治疗用药品, 该药品以由混合物通过水提取、优选 60 ~ 100°C 的水提取得到的提取物作为有效成分, 所述混合物是将 (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织与医药上可接受的生药成分以 1:5 ~ 1:10 的重量比率混合而得到的;

[0041] (20) 用于改善中枢神经变性疾病的食品, 其中, 相对于 100 重量 % 的食品, 含有 10 ~ 100 重量 % 的 (1) 或 (2) 中任一项所述的干燥植物组织或 10 ~ 90 重量 % 的 (6) 所述的植物组织提取物;

[0042] (21) (20) 所述的食品, 其中, 中枢神经变性疾病为阿尔茨海默病和 / 或帕金森病;

[0043] (22) (20) 所述的食品, 其中, 中枢神经变性疾病的改善是通过增强记忆的获得、

保持和记起能力的机理来实现的；

[0044] (23) (4) 所述的干燥植物组织,其中,相对于 100 重量%的干燥植物组织,含有 0.3 ~ 2.0 重量%的川陈皮素,并且川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 1.0 ~ 23.0 ;

[0045] (24) (4) 所述的干燥植物组织,其是将柑橘类的植物组织在 50 ~ 100℃下加热干燥 1 ~ 3 小时而得到的,且收率为 20 ~ 50% ;

[0046] (25) (9) 所述的植物组织提取物,其中,相对于 100 重量%的植物组织提取物含有 0.6 ~ 3.0 重量%的川陈皮素,并且川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 2.0 ~ 14.0 ;

[0047] (26) (19) 所述的药品,该药品为细粒剂、茶剂、煎剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂、凝胶剂、散剂、液剂、糖浆剂或提取物制剂的形态。

[0048] 发明效果

[0049] 与现有的柑橘类的干燥植物组织相比,本发明的柑橘类的干燥植物组织和植物组织提取物显示出显著的中枢神经变性疾病改善效果。

[0050] 本发明的干燥植物组织和植物组织提取物还具有活化 PKA/ERK/CREB 信号传递、改善阿尔茨海默病的症状之一即学习 / 记忆障碍的效果。本发明的干燥植物组织和植物组织提取物特别是在学习 / 记忆障碍改善效果中显示出增强记忆的获得、保持和记起能力的效果。本发明的干燥植物组织和植物组织提取物与其中所含的川陈皮素含量等量的川陈皮素单体相比还具有强效的磷酸化促进作用和 PKA/ERK 信号传递促进效果。除此之外,本发明的干燥植物组织和植物组织提取物还通过提高 CRE 转录活性、TH 转录活性和 TH 表达量的作用、或者多巴胺合成能力促进作用或多巴胺分泌促进作用而显示出帕金森病的改善效果。

[0051] 而且,本发明的干燥植物组织和植物组织提取物不仅显示出超过由其川陈皮素含有浓度预测的效果的中枢神经变性疾病改善效果、特别是提高 CRE 依赖性转录活性的效果、增强记忆的获得、保持和记起能力的效果、促进 TH 转录活性的效果以及提高 TH 表达量的作用,还显示出促进多巴胺生物合成的效果或促进多巴胺分泌的效果。认为上述效果来源于该干燥植物组织和植物组织提取物中所含的川陈皮素与其他成分的协同效果。

[0052] 使用川陈皮素单体时,在上述增强记忆的获得、保持和记起能力的效果中没有确认到增强记忆的获得和保持能力的效果,因此认为本发明的干燥植物组织和植物组织提取物是通过与川陈皮素单体完全不同的新的机理来发挥上述效果。

附图说明

[0053] 图 1A 显示本发明的陈皮中所含的黄酮类的三维色谱图；

[0054] 图 1B 显示现有陈皮中所含的黄酮类的三维色谱图。

[0055] 图 2A 显示海马神经细胞中陈皮提取物的 CREB 磷酸化促进活性；

[0056] 图 2B 显示海马神经细胞中陈皮提取物的 PKA 底物磷酸化促进活性；

[0057] 图 2C 显示海马神经细胞中陈皮提取物的 ERK1/2 磷酸化促进活性；

[0058] 图 2D 显示海马神经细胞中陈皮提取物的 PKA 信号传递促进效果；

[0059] 图 2E 显示海马神经细胞中陈皮提取物的 ERK 信号传递促进效果；

[0060] 图 2F 显示海马神经细胞中来自本发明的陈皮 1 和现有陈皮 7 的提取物以及川陈皮素的 CRE 依赖性转录活性；

[0061] 图 2G 显示海马神经细胞中来自本发明的陈皮 2 ~ 4 和现有陈皮 8 ~ 10 的提取物以及川陈皮素的 CRE 依赖性转录活性。

[0062] 图 3A 显示陈皮提取物的学习 / 记忆障碍改善效果、即增强记忆的获得、保持和记起能力的效果；

[0063] 图 3B 显示川陈皮素对 MK801 诱发性学习 / 记忆障碍的作用。

[0064] 图 4A 显示 PC12D 细胞中陈皮提取物的 TH 转录活性促进效果；

[0065] 图 4B 显示 PC12D 细胞中陈皮提取物的提高 TH 表达量的效果；

[0066] 图 4C 显示 PC12D 细胞中陈皮提取物的提高多巴胺含量的效果。

[0067] 图 5A 显示海马神经细胞中橘皮提取物的 CRE 转录活性；

[0068] 图 5B 显示橘皮提取物的改善学习障碍的效果。对于学习促进效果的所有对,进行包含 post Bonferroni 试验在内的双因素方差分析 (two-way ANOVA)。附图中的数值表示平均值 ± 标准偏差 ; 整个试验中 n = 5。与对照 (■) 相比, ** p<0.01、*** p<0.001 ; 与 MK-801 (▲) 相比, ###p<0.01、★ p<0.05 ;

[0069] 图 5C 显示橘皮提取物的改善记忆障碍的效果。关于记忆改善效果的所有对,包括 post Tukey 试验在内的单因素方差分析。附图中的数值表示平均值 ± 标准偏差 ; 在整个试验中 n = 5。与对照相比, *** p<0.001 ; 与 MK-801 相比, #p<0.05、###p<0.01 ;

[0070] 图 5D 显示 PC12D 细胞中橘皮提取物的 CRE 转录活性；

[0071] 图 5E 显示 PC12D 细胞中橘皮提取物的 TH 转录活性；

[0072] 图 5F 显示 PC12D 细胞中橘皮提取物的提高 GCH I 表达量的效果。对于所有对,进行包括 post Tukey 试验在内的单因素方差分析 (one-way ANOVA)。附图中的数值表示平均值 ± 标准偏差 ; 在整个试验中 n = 3。与对照相比, * p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。与陈皮提取物相比, # p<0.05、## p<0.01、### p<0.001。

[0073] 图 6A 显示海马神经细胞中来自立花桔叶的提取物的 CRE 转录活性；

[0074] 图 6B 显示 PC12D 细胞中来自立花桔叶的提取物的 CRE 转录活性。

[0075] 图 7A 显示海马神经细胞中来自大红桔果皮的提取物的 CRE 转录活性；

[0076] 图 7B 显示 PC12D 细胞中来自大红桔果皮的提取物的 CRE 转录活性；

[0077] 图 7C 显示 PC12D 细胞中来自大红桔果皮的提取物的 TH 转录活性。

具体实施方式

[0078] 本发明中使用的柑橘类是指选自日本立花桔 (*Citrus tachibana*)、高丽立花桔 (*C. nipponokoreana*)、花柚、四季橘、枳实、酸橙、地中海柑、丹西红桔、大红桔、小红桔、无核纪州蜜柑、福克雷蜜柑、卡蒲橘、太田椪柑、乳桔、酸橘、印度酸橘、柑子、奇利蜜柑、宜昌柠檬、温州蜜柑 (*Citrus unshiu Markovich*)、芸香科桔 (*Citrus reticulata Blanco, Rutaceae*)、扁平橘、香橙、文旦、日向夏、椪柑、夏蜜柑、脐橙、八朔、伊予柑和卡抱斯的植物中川陈皮素含量高的物质,优选为芸香科桔 (*Citrus reticulata Blanco, Rutaceae*)、日本立花桔 (*Citrus tachibana*)、高丽立花桔 (*C. nipponokoreana*) 或大红桔。在本说明书中,“立花桔”一词是指日本立花桔或高丽立花桔。

[0079] 本发明的干燥植物组织是指,将上述柑橘类的果皮在收率 (干燥后质量 / 干燥前质量的比例) 达到 20 ~ 50% 的条件下、或者将上述柑橘类的叶在收率 (干燥后质量 / 干燥

前质量的比例)达到 20 ~ 50% 的条件下干燥而得到的物质。作为加热干燥条件,可以列举在温度 50 ~ 100℃ 下加热干燥 1 ~ 3 小时,优选在温度 60℃ 下加热干燥 2 小时。本发明的优选的干燥植物组织为陈皮、橘皮和立花桔叶。陈皮是指柑橘类植物(例如芸香科桔(*Citrus reticulata* Blanco, Rutaceae)、大红桔等)的成熟果皮,橘皮特别是指日本立花桔或高丽立花桔等立花桔的成熟果皮,立花桔叶是指日本立花桔或高丽立花桔等立花桔的叶。

[0080] 本发明的植物组织提取物是指来自上述干燥植物组织的提取物,优选为通过水提取得到的提取物。本说明书中优选的水提取是指在 60 ~ 100℃ 下利用水进行的提取。

[0081] 作为本发明的干燥植物组织和植物组织提取物中所含的成分,可以列举黄酮类、例如川陈皮素、芸香柚皮苷、橘皮素和橘皮苷等。关于本发明的干燥植物组织和植物组织提取物的活性,由于其中所含的成分的含量和含有比率产生的协同效果,因此与川陈皮素单体的药效相比显著。

[0082] 本发明的干燥植物组织,相对于总重量含有 0.3 或 0.4 重量%以上、优选 0.3 ~ 2.0 重量%、更优选 0.4 ~ 2.0 重量%的川陈皮素;0.7 重量%以下、优选 0.4 重量%以下的芸香柚皮苷;0.1 ~ 0.8 重量%的橘皮素和 0.4 ~ 12 重量%的橘皮苷。本发明的干燥植物组织中,川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 1.0 以上、优选 1.5 ~ 23.0、更优选 2.0 ~ 15.0、进一步优选为 5.0 ~ 15.0。

[0083] 本发明的干燥植物组织,当其中所含的各成分的比例为上述范围内时,即使是来自任一种植物的组织,也显示出本发明的药效、即中枢神经变性疾病改善效果(抗阿尔茨海默病活性、抗帕金森病活性等)、学习 / 记忆障碍改善效果、磷酸化促进作用和 PKA/ERK 信号传递促进效果、提高 CRE 转录活性、TH 转录活性和 TH 表达量的作用、多巴胺合成能力促进作用或多巴胺分泌促进作用。

[0084] 本发明的植物组织提取物,相对于总重量含有 0.6 ~ 2.0 重量%以上、优选 0.6 ~ 3.0 重量%的川陈皮素;0.7 重量%以下、优选 0.4 重量%以下的芸香柚皮苷;0.1 ~ 1.0 重量%的橘皮素和 1.8 ~ 6.0 重量%的橘皮苷。本发明的植物组织提取物中,川陈皮素 / 芸香柚皮苷的含有重量比为 2.0 以上、优选 2.0 ~ 14.0、更优选为 2.5 ~ 10.0。

[0085] 本发明的植物组织提取物,当其中所含的各成分的比例为上述范围内时,即使是来自任一种植物的提取物,也显示出本发明的药效、即中枢神经变性疾病改善效果(抗阿尔茨海默病活性、抗帕金森病活性等)、学习 / 记忆障碍改善效果、磷酸化促进作用和 PKA/ERK 信号传递促进效果、提高 CRE 转录活性、TH 转录活性和 TH 表达量的作用、多巴胺合成能力促进作用或多巴胺分泌促进作用。

[0086] 在本说明书中,作为“中枢神经变性疾病”一词,可以列举阿尔茨海默病、特别是学习 / 记忆障碍和帕金森病。

[0087] 作为本发明的干燥植物组织和植物组织提取物的抗阿尔茨海默病活性和 / 或抗帕金森病活性,可以列举与中枢神经变性疾病的发病机理有关的改善学习 / 记忆障碍或促进多巴胺合成。具体而言,是指促进突触可塑性的活性和促进 CRE(cAMP 应答序列)依赖性转录活性或酪氨酸羟化酶(TH)转录活性的活性、提高 TH 表达量的活性、提高多巴胺含量的活性、促进多巴胺分泌的活性等。

[0088] 更详细而言,本发明的干燥植物组织和植物组织提取物根据植物组织的种类可以

显示出不同的活性。例如,关于与多巴胺有关的活性,陈皮或陈皮提取物能够显示出提高多巴胺含量的活性,而橘皮或橘皮提取物能够显示出促进多巴胺分泌的活性。

[0089] 在本说明书中,学习/记忆障碍是指降低记忆过程中的以下三种能力的障碍:记忆的获得(encoding)、保持(retention)和记起(recall)能力。在本说明书中,“获得”一词是指将信息输入记忆中,“保持”是指保存所输入的信息,“记起”是指想起所保存的信息。

[0090] 通过按照本领域中通常使用的方法处理本发明的干燥植物组织或植物组织提取物,可以制备中枢神经变性疾病用治疗药。在本说明书中,作为中枢神经变性疾病用治疗药,可以列举抗阿尔茨海默病药和/或抗帕金森病药、即具有抗阿尔茨海默病活性和/或抗帕金森病活性的药品。

[0091] 在本说明书中,“药品”一词是指用于人和动物的疾病的诊断、治疗或预防的物质,包括含生药的药品、例如生药制剂和中药。优选的药品为口服给药形态,更优选为细粒剂、茶剂、煎剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂、凝胶剂、散剂、液剂、糖浆剂或提取物制剂。

[0092] 在本说明书中,“生药”一词是指,不必从天然存在的具有药效的产物中纯化有效成分、而用于改善对象的体质的物质的总称,包含一种以上的生药成分。在本说明书中,“中药”一词是指根据中医学理论进行配方的药品。

[0093] 在本说明书中,“食品”一词包含所谓的健康食品和根据是否具有当局的许可等或食品的目的、功能等的不同进行区分的特定保健用食品和营养功能食品等保健功能食品。本说明书中优选的食品为细粒、凝胶材料(ゼリーの素)、皮(ピール)、果子酱或茶,更优选为细粒或茶。

[0094] 本说明书中的药品和食品中各成分的混和量可以根据对象的使用目的、性别、症状等适当调整,例如10~100重量%的本发明的干燥植物组织或10~90重量%的植物组织提取物、以及0~90重量%的其他载体或添加剂。本发明的干燥植物组织或植物组织提取物的成人每天的摄取量分别优选为3~50g或1~20g,更优选为5~30g或2~10g。

[0095] 作为本说明书中的其他载体和添加物,可以列举本领域中通常使用的物质,例如有药品或食品卫生上可接受的生药成分、抗坏血酸、阿斯巴甜、苹果香料、橙子香料、卡拉胶、焦糖、巴西棕榈蜡、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙、还原麦芽糖液糖、还原麦芽糖糖稀、含水二氧化硅、木糖醇、枸橼酸、枸橼酸三钠、白砂糖、轻质硅酸酐、凝胶化剂(FG-2266、新田ゼラチン株式会社)、合成硅酸铝/羟丙基淀粉/结晶纤维素、白蜡、氧化钛、食盐、蔗糖脂肪酸酯、硬脂酸镁、纤维素、滑石粉、糊精、玉米淀粉、乳糖、蜂蜜、羟丙基甲基纤维素、微粒二氧化硅、普鲁兰、果胶、麦芽糖、硅铝酸镁、甲基纤维素、卵磷脂和刺槐豆胶。

[0096] 作为本说明书中的药品或食品卫生上可接受的生药成分,可以列举本领域中通常使用的成分,例如有威灵仙、乌药、延胡索、黄芪、黄芩、黄柏、远志、藿香、葛根、干姜、甘草、桔梗、菊花、枳实、杏仁、桂皮、红花、香附子、厚朴、牛膝、吴茱萸、五味子、柴胡、山栀子、地黄、芍药、生姜、升麻、神麴、石膏、川芎、前胡、苍术、苏木、紫苏叶、大黄、大枣、大腹皮、泽泻、竹茹、知母、钩藤、天麻、天门冬、当归、桃仁、人参、麦芽、麦冬、半夏、白芷、白术、槟榔子、茯苓、防己、芒硝、防风、牡丹皮、麻黄、木通、木香、益母草、龙胆和羌活。

实施例

[0097] 在以下的实施例中,陈皮1~6、橘皮1~6、橘叶1~3和大红桔1(果皮)是本

发明的干燥植物组织,陈皮 7 ~ 12 是现有物质。另外,下述实施例中使用的样品和从含有成分的角度考虑为相同程度的植物组织可以从小太郎汉方制药株式会社获取。

[0098] [实施例 1] 干燥植物组织的制备

[0099] 在本实施例中,将从各种柑橘类中采集的果皮和叶阴干、晒干或加热干燥,由此制备陈皮、橘皮、立花桔叶和大红桔的果皮的干燥物。进行加热干燥直至达到以下收率(干燥后质量/干燥前质量的比例):陈皮和橘皮的收率为 20 ~ 50%、立花桔叶的收率为 20 ~ 50%、大红桔的果皮的收率为 20 ~ 50%,具体而言,在温度 60℃ 下加热干燥 2 小时。

[0100] [实施例 2] 植物组织提取物的制备

[0101] 将实施例 1 中得到的陈皮、橘皮、立花桔叶或大红桔的果皮细切,向约 10g 的细切物中加入 400mL 纯水后加热(对于橘皮 6,是向约 20g 的细切物中加入 1000mL 纯水后加热)。混合物沸腾后,在 100℃ 下用 1 小时进行提取。然后,通过两块纱布进行过滤,将滤液冷冻干燥,得到植物组织提取物。植物组织提取物的制备结果见以下的表 1。

[0102] [表 1]

[0103]

样品名	收量 (g)	收率 (%)
陈皮 1	1.9	19.0
陈皮 2	3.6	36.0
陈皮 3	3.9	39.0
陈皮 4	3.7	37.0
陈皮 5	3.9	39.0
陈皮 6	3.7	37.0
陈皮 7	2.45	24.5
陈皮 8	4.1	41.0
陈皮 9	4.5	45.0
陈皮 10	4.1	41.0
陈皮 11	4.1	41.0
陈皮 12	4.3	43.0
橘皮 1	4.1	41.0
橘皮 2	2.6	26.0
橘皮 3	4.0	40.0
橘皮 4	3.1	31.0
橘皮 5	3.4	34.0
橘皮 6	8.76	43.8
立花桔叶 1	2.4	24.0
立花桔叶 2	2.5	25.0
立花桔叶 3	2.3	23.0
大红桔 1	2.27	22.7

[0104] [实施例 3] 含有成分的分析

[0105] 如下测定实施例 1 和 2 中得到的干燥植物组织和植物组织提取物的含有成分。以下给出陈皮和陈皮提取物的分析方法。

[0106] (川陈皮素和橘皮素的定量)

[0107] 如下制备用于川陈皮素和橘皮素的定量的标准溶液。使用干燥器(硅胶)将川陈皮素(和光纯药工业株式会社)干燥 24 小时以上。将约 5mg 的干燥川陈皮素溶解于甲醇/水混合液(7:3)中使达到 100mL,作为川陈皮素标准溶液。另外,使用干燥器(硅胶)将橘皮素(和光纯药工业株式会社)干燥 24 小时以上。将约 3mg 的干燥橘皮素溶解于甲醇/水混合液(7:3)中使达到 100mL,作为橘皮素标准溶液。

[0108] 作为陈皮的试样溶液,将约 0.3g 的陈皮粉末装入 50mL 的共栓离心沉淀管中,向其中加入 50mL 甲醇。向混合物照射超声波(UT-305HS、シャープ株式会社)以进行提取,之后进行离心分离(KUBOTA KN-70、株式会社久保田制作所)。之后,过滤,作为陈皮的试样溶

液。

[0109] 作为陈皮提取物的试样溶液,将约 0.3g 的陈皮提取物装入 50mL 的共栓离心沉淀管中,向其中加入 50mL 甲醇 / 水混合液 (7:3)。向混合物照射超声波 (UT-305HS、シヤープ株式会社) 以进行提取,之后进行离心分离 (KUBOTA KN-70、株式会社久保田制作所)。之后,过滤,作为陈皮提取物的试样溶液。

[0110] 在以下的分析条件下,对如上制备的标准溶液和试样溶液进行定量。

[0111] 检测器:紫外吸光光度计 (测定波长:338nm);

[0112] 柱:Mightysil RP-18 4.6mm×15cm (关东化学株式会社);

[0113] 流动相:水 / 乙腈混合液 (3:2);

[0114] 流速:1.0mL / 分钟 (川陈皮素的保留时间为约 10 分钟);

[0115] 柱温:40℃;

[0116] 注入量:10 μ L。

[0117] (橘皮苷和芸香柚皮苷的定量)

[0118] 如下制备用于橘皮苷和芸香柚皮苷的定量的标准溶液。使用干燥器 (硅胶) 将橘皮苷 (和光纯药工业株式会社) 干燥 24 小时以上。将约 10mg 的干燥橘皮苷溶解于 50% 的甲醇中使达到 50mL,作为橘皮苷标准溶液。另外,使用干燥器 (硅胶) 将芸香柚皮苷 (和光纯药工业株式会社) 干燥 24 小时以上。将约 10mg 的干燥芸香柚皮苷溶解于 50% 的甲醇中使达到 500mL,作为芸香柚皮苷标准溶液。

[0119] 作为陈皮的试样溶液,向约 0.1g 的陈皮粉末中加入 30mL 甲醇。向混合物照射超声波 20 分钟 (UT-305HS、シヤープ株式会社) 以进行提取,之后进行离心分离 (KUBOTA KN-70、株式会社久保田制作所),分离收集上清。向残留物中加入 20mL 甲醇,再照射超声波 20 分钟以进行提取,之后进行离心分离。将其与分离收集的上清合并,作为陈皮的试样溶液。

[0120] 作为陈皮提取物的试样溶液,将约 0.1g 的陈皮提取物装入 50mL 的共栓离心沉淀管中,向其中加入 50mL 甲醇 / 水混合液 (1:1)。向混合物照射超声波 (UT-305HS、シヤープ株式会社) 以进行提取,之后进行离心分离 (KUBOTA KN-70、株式会社久保田制作所)。之后,进行过滤,作为陈皮提取物的试样溶液。

[0121] 在以下的分析条件下对如上制备的标准溶液和试样溶液进行定量。

[0122] 检测器:紫外吸光光度计 (测定波长:285nm);

[0123] 柱:L-column2 ODS 4.6mm×25cm (化学物质评价研究机构);

[0124] 流动相:水 / 乙腈 / 乙酸混合液 (40:10:1);

[0125] 流速:0.8mL / 分钟 (橘皮苷的保留时间为约 15 分钟);

[0126] 柱温:30℃;

[0127] 注入量:10 μ L。

[0128] 实施例 1 和 2 中得到的陈皮、橘皮、立花桔叶和大红桔的果皮的分析结果见以下的表 2,上述植物组织提取物的分析结果见表 3。另外,本发明的陈皮和现有陈皮中所含的黄酮类的三维色谱图分别见图 1A 和 1B。

[0129] [表 2]

[0130]

干燥植物组织的成分含量(重量%)和含有比率*					
样品名	川陈皮素	芸香 柚皮苷	橘皮素	橘皮苷	川陈皮素/ 芸香柚皮苷 含有比率
陈皮 1	0.44	0.11	0.24	4.58	4.00
陈皮 2	0.58	0.32	0.32	5.89	1.81
陈皮 3	0.67	0.27	0.28	7.15	2.48
陈皮 4	0.68	0.26	0.32	7.50	2.62
陈皮 5	0.67	0.32	0.27	6.13	2.09
陈皮 6	0.61	0.26	0.18	6.33	2.35
陈皮 7	0.041	1.44	0.035	5.53	0.03
陈皮 8	0.037	1.37	0.017	5.93	0.03
陈皮 9	0.038	1.41	0.016	6.13	0.03
陈皮 10	0.038	1.49	0.018	6.33	0.03
陈皮 11	0.324	0.74	0.172	4.92	0.44
陈皮 12	0.086	0.98	0.049	4.64	0.09
橘皮 1	0.96	0.09	0.64	2.20	10.7
橘皮 2	1.05	0.18	0.70	3.15	5.8
橘皮 3	1.03	0.08	0.48	2.12	12.9
橘皮 4	1.31	0.09	0.68	2.02	14.6
橘皮 5	0.38	0.026	0.22	1.77	14.6
橘皮 6	1.11	0.15	0.52	2.99	7.4
立花桔叶 1	0.33	0.032	0.26	0.59	10.3
立花桔叶 2	0.46	0.041	0.36	0.72	11.2
立花桔叶 3	0.34	0.028	0.24	0.64	12.1
大红桔 1	0.59	0.24	0.28	10.05	2.46

[0131] *:各成分的含量有时会根据使用的柑橘类植物体的采集场所或采集时期等发生变化。例如,在橘皮的青色果皮中川陈皮素含量为约 1.60 重量%,但若变成黄色果皮则川陈皮素含量为约 1.1 重量%。

[0132] [表 3]

[0133]

植物组织提取物的成分含量(重量%)和含有比率*					
样品名	川陈皮素	芸香柚皮苷	橘皮素	橘皮苷	川陈皮素/ 芸香柚皮苷 含有比率
陈皮 1	0.68	0.31	0.20	1.93	2.19
陈皮 2	1.00	0.37	0.19	2.67	2.70
陈皮 3	0.82	0.23	0.30	2.58	3.57
陈皮 4	0.83	0.35	0.30	2.73	2.37
陈皮 5	0.75	0.26	0.18	2.42	2.88
陈皮 6	0.81	0.35	0.28	2.50	2.31
陈皮 7	0.060	1.32	0.034	2.83	0.05
陈皮 8	0.047	1.54	0.019	2.54	0.03
陈皮 9	0.050	2.32	0.020	2.73	0.02
陈皮 10	0.050	2.55	0.021	2.95	0.02
陈皮 11	0.425	0.87	0.191	2.69	0.49
陈皮 12	0.101	1.01	0.045	2.27	0.10
橘皮 1	1.35	0.18	0.64	2.50	7.50
橘皮 2	1.95	0.69	0.92	5.10	2.83
橘皮 3	1.26	0.18	0.42	2.36	7.00
橘皮 4	1.94	0.22	0.66	2.93	8.82
橘皮 5	0.78	0.13	0.30	3.19	6.00
橘皮 6	1.34	0.32	0.46	3.80	4.19
立花桔叶 1	0.66	0.26	0.42	3.21	2.54
立花桔叶 2	1.14	0.35	0.61	3.65	3.26
立花桔叶 3	0.93	0.19	0.68	3.31	4.89
大红桔 1	1.36	0.261	0.526	3.61	5.21

[0134] * :各成分的含量有时会根据使用的柑橘类植物体的采集场所或采集时期等发生变化。

[0135] [试验例]

[0136] 针对上述实施例得到的陈皮提取物,进行以下的体外和体内试验。

[0137] [一般的试验步骤 1]

[0138] 下述试验例 1 采用的一般的试验步骤如下。

[0139] (大鼠胎仔初代海马神经细胞的培养)

[0140] 对于妊娠 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,以 12 小时周期的明暗循环喂食、喂水进行饲养。将妊娠第 18 天的大鼠 (E18) 在乙醚深度麻醉下切开腹部正中,在无菌下取出子宫。在实体显微镜下、在冰冷的磷酸缓冲生理盐水 (PBS) 中取出胎仔的海马,使用木瓜蛋白酶

(SUMILON) 使组织分散,再以 1000rpm 的转速离心分离 4 分钟,之后除去上清。然后,将细胞颗粒 (pellet) 分散在分散液 (SUMILON) 中,再通过移液使其充分分散,向所得的细胞中加入除去液 (SUMILON),以 900rpm 的转速离心分离 5 分钟,之后除去上清。

[0141] 接下来,使用 Neurobasal 培养基 (Neurobasal Medium 500mL/ 不含酚红、10ml 50×B27 的补充物、0.5mM 的 L- 谷氨酰胺、0.005% 的青霉素 - 链霉素) 使颗粒悬浮,并接种在用聚-L- 赖氨酸包被的皿或板上。培养 1 天后交换培养基,之后每 3 ~ 4 天交换半量的培养基,在含有 10 μM AraC 的培养基中、于 37°C 下在 5% CO₂ 培养箱内培养 14 天。

[0142] 需要说明的是,药物处置实验用试验培养基使用含有 10 μM AraC 的 Neurobasal 培养基。

[0143] (SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析 1)

[0144] 将大鼠胎仔初代海马神经细胞以 1×10⁶ 个细胞 / 皿接种在 35mm 的皿中,使用 5% CO₂ 培养箱在生长培养基中培养 14 天,之后用药物处置 10 分钟。

[0145] 对各细胞进行药物处置,之后用冰冷的 PBS 清洗。然后,用细胞增溶液 (1mM 的 EDTA、1% 的 SDS、10mM 的 NaF、10nM 的花萼海绵诱癌素、320nM 的黑海绵酸、1mM 的原钒酸钠、1mM 的 p-APMSF、10 μg/mL 的胃酶抑素 A、10 μg/mL 的抗蛋白酶、10 μg/mL 的亮肽素、10 μg/mL 的胰凝乳蛋白酶抑制剂、10 μg/mL 的磷酸阿米酮、10mM 的 HEPES、pH7.5) 回收。之后,迅速地在 95°C 下煮沸 5 分钟,使蛋白变性,之后将 DNA 进行超声波破碎,制备 SDS-PAGE 用样品。

[0146] 使用 12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶作为 SDS-PAGE 的分离凝胶,在 35V、10mA 下泳动,之后将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上,使用含有 5% 脱脂乳的 TBST (10mM 的 Tris-HCl、100mM 的 NaCl、0.05% 的 Tween 20、pH7.4; 以下称作封闭缓冲液) 在室温下封闭 1 或 2 小时。然后,用 TBST 清洗样品,与用封闭缓冲液稀释至 1000 倍的一次抗体在 4°C 下培育一夜。再用 TBST 清洗样品,与用封闭缓冲液稀释至 2000 倍的 HRP 标记 IgG 抗体在室温下培育 2 小时,用 TBST 清洗。在抗体阳性谱带的检测中采用 ECL 法。重探测如下进行:将 PVDF 膜放入预先加热至 50°C 的剥离缓冲液 (62.5mM 的 Tris-HCl、2% 的 SDS、100mM 的 β- 巯基乙醇、pH7.4) 中,在 50°C 下培育 30 分钟,剥离抗体,用 TBST 清洗。之后,通过重探测来检测内部标准蛋白。

[0147] (统计学分析 1)

[0148] 通过单因素方差分析 (Student-Newman-Keuls) 评价实验结果。在两侧 5% 下检验显著水平,以 p < 0.05 为显著。

[0149] [试验例 1] 陈皮提取物的学习·记忆障碍改善作用 (体外试验)

[0150] 在本试验例中,研究本发明的陈皮提取物对学习 / 记忆障碍的作用。在体外试验中,研究陈皮提取物在海马神经元中的核内蛋白 CREB 的磷酸化促进作用,研究初代培养海马神经细胞中陈皮提取物对 NMDA 受体阻断药 (MK801) 引起的 PKA/ERK 信号传递抑制的影响。

[0151] 需要说明的是,本说明书中使用的 MK801 是作为谷氨酸受体的亚型之一的 NMDA 受体的非选择性拮抗剂,还称作地佐环平 (dizocilpine)。

[0152] 本试验例中使用的陈皮提取物如下制备。即,在体外试验中,称量 7.2g 来自陈皮 1 的陈皮提取物,将其放入 50ml 的离心管中,再向其中加入二甲基亚砜 (DMSO) 使达到 30mL。之后,进行 30 分钟的超声波处理,以 3000rpm 的转速进行 10 分钟离心分离,回收上清,将其

用作陈皮提取物。

[0153] [试验例 1-1] 初代培养海马神经细胞中陈皮提取物的 CREB 磷酸化促进效果

[0154] 关于各种浓度的陈皮提取物对 CREB 磷酸化的效果,利用蛋白质印迹法进行研究。培养以 1×10^6 个细胞 /35-mm 塑料皿的密度增殖的 E18 大鼠海马神经细胞 14 天。用陈皮提取物 (30、60、120、240 和 $480 \mu\text{g/ml}$) 处理细胞 10 分钟。使用抗磷酸化 CREB 抗体进行蛋白质印迹法。然后,剥下印迹,对抗 14-3-3- β 抗体再次进行试验,确认使等量的蛋白在各泳道中电泳。

[0155] 如图 2A 所示,陈皮提取物浓度依赖性地促进 CREB 磷酸化。

[0156] [试验例 1-2] 初代培养海马神经细胞中陈皮提取物的 PKA 底物磷酸化促进效果

[0157] 关于各种浓度的陈皮提取物对 PKA 底物磷酸化的效果,利用蛋白质印迹法进行研究。培养以 1×10^6 个细胞 /35-mm 塑料皿的密度接种的 E18 大鼠海马神经细胞 14 天。用不同浓度的陈皮提取物处理细胞 10 分钟。使用抗磷酸化 PKA 底物抗体进行蛋白质印迹法。然后,剥下印迹,对抗 14-3-3- β 抗体再次进行试验,确认使等量的蛋白在各泳道中电泳。

[0158] 如图 2B 所示,陈皮提取物浓度依赖性地促进 PKA 底物磷酸化。

[0159] [试验例 1-3] 初代培养海马神经细胞中陈皮提取物的细胞外信号调节激酶 (ERK) 1/2 磷酸化促进效果

[0160] 关于各种浓度的陈皮提取物或川陈皮素对 ERK1/2 磷酸化的效果,利用蛋白质印迹法进行研究 ($60 \mu\text{g/ml}$ 的陈皮提取物中含有 $1 \mu\text{M}$ 的川陈皮素)。培养以 1×10^6 个细胞 /35-mm 塑料皿的密度增殖的 E18 大鼠海马神经细胞 14 天。以陈皮提取物 (30、60、120、240 和 $480 \mu\text{g/ml}$) 或川陈皮素 (4、8 和 $30 \mu\text{M}$) 处理细胞 10 分钟。使用抗磷酸化 ERK1/2 抗体进行蛋白质印迹法。然后,剥下印迹,对抗 ERK1/2 抗体再次进行试验,确认使等量的蛋白在各泳道中电泳。

[0161] 如图 2C 所示,陈皮提取物浓度依赖性地促进 ERK1/2 磷酸化。另外,与川陈皮素相比,陈皮提取物显示出强的作用。即,根据印迹的大小,暗示含有 $4 \mu\text{M}$ 川陈皮素的发明的 $240 \mu\text{g/ml}$ 陈皮提取物的磷酸化促进效果较 $4 \mu\text{M}$ 的川陈皮素的效果强。

[0162] [试验例 1-4] 初代培养海马神经细胞中陈皮提取物的 PKA/ERK 信号传递促进效果

[0163] 研究在初代培养大鼠海马神经细胞中陈皮提取物对 MK801 引起的 PKA/ERK 信号传递抑制带来的影响。使用陈皮提取物或川陈皮素对初代培养大鼠海马神经细胞进行 1 小时的前处置,之后用 MK801 处置 30 分钟,再用 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 处置 15 分钟。使用抗磷酸化 PKA 底物抗体进行蛋白质印迹法。然后,剥下印迹,对抗 14-3-3- β 抗体再次进行试验,确认使等量的蛋白在各泳道中电泳 (参照图 2D)。另外,使用抗磷酸化 ERK1/2 抗体进行蛋白质印迹法。然后,剥下印迹,对抗 ERK1/2 抗体再次进行试验,确认使等量的蛋白在各泳道中电泳 (参照图 2E)。

[0164] 其结果, MK801 抑制由 NMDA 介导的 PKA/ERK 信号传递。但是,陈皮提取物浓度依赖性地对 MK801 所产生的信号传递抑制显示出拮抗作用,陈皮提取物 ($480 \mu\text{g/ml}$ 的陈皮提取物中含有 $8 \mu\text{M}$ 的川陈皮素) 的作用较 $8 \mu\text{M}$ 的川陈皮素的作用强。

[0165] (考察 1)

[0166] 由上述试验例的结果可知:在已知与突触形成和长期记忆的形成密切相关的核内

蛋白即 CREB、以及位于其上流的 PKA 底物和 ERK1/2 的磷酸化中,本发明的陈皮提取物具有显著的磷酸化促进作用。另外,本发明的陈皮提取物在 ERK1/2 中显示出较川陈皮素强的磷酸化促进作用。

[0167] 并且,本发明的陈皮提取物对 MK801 所产生的 PKA/ERK 信号传递抑制明显显示出拮抗作用,其作用较川陈皮素强。由此显示:本发明的陈皮提取物与其中所含的川陈皮素和川陈皮素以外的成分具有协同作用。

[0168] [试验例 2] 海马神经细胞中陈皮提取物的 CRE 依赖性转录活性(体外试验)

[0169] 在本试验例中,比较本发明的陈皮提取物的 CRE 依赖性转录活性作用与现有的陈皮提取物和川陈皮素的转录活性作用。

[0170] 如上述一般的试验步骤 1 所述,将大鼠海马神经细胞进行初代培养,之后进行报告基因测试。将海马神经细胞以 8×10^4 个细胞/孔接种在 48 孔板上,用 Neurobasal 培养基培养 10 ~ 14 天。利用脂质转染法转染报告基因质粒 ($0.1 \mu\text{g}/\text{孔}$)、海肾 pRG-TK 质粒 ($0.01 \mu\text{g}/\text{孔}$),之后培养 16 小时。用未添加 AraC 的 Neurobasal 培养基(含有 B-27 补充物、L-谷氨酰胺、青霉素-链霉素)稀释,之后用 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的陈皮提取物处置 8 小时。需要说明的是,以 $150\text{mg}/\text{ml}$ 的 DMSO 溶液作为储备溶液,分别注入陈皮提取物中,在 -20°C 下保存。转录活性的测定使用 Promega 公司制的双色荧光素酶(注册商标)报道测定系统来进行。用被动裂解缓冲液(Promega)增溶海马神经细胞,之后混和荧光素酶测定试剂 II(Promega)和 Stop & Glo(注册商标)Reagent(Promega),使用照度计测定荧光值。

[0171] 为了进行统计学分析,通过报告基因测试、RT-PCR 得到的结果利用单因素方差分析(Tukey)进行评价。以两侧 5% 检验显著水平,以 $p < 0.05$ 为显著。

[0172] (考察 2)

[0173] 如图 2F 和 2G 所示,本试验例中使用的陈皮提取物中川陈皮素浓度为 $2.5 \mu\text{M}$,尽管这是 $30 \mu\text{M}$ 川陈皮素的十二分之一的浓度,但其 CRE 依赖性转录活性超过 $30 \mu\text{M}$ 的川陈皮素的转录活性。即,判明在多成分系统的本发明的陈皮提取物中,由于川陈皮素以外的成分的存在,川陈皮素的 CRE 依赖性转录促进活性较由川陈皮素单体预想的活性显著且协同性地增大。而且,在本发明的陈皮提取物中确认到较现有的陈皮提取物强的 CRE 依赖性转录活性,由此显示出学习/记忆障碍改善作用,还显示出更有效地改善阿尔茨海默病的认知功能。

[0174] [试验例 3] 陈皮提取物的学习/记忆障碍改善作用(体内试验)

[0175] 接下来,在体内试验中,使用 MK801 诱发性记忆障碍模型小鼠,研究本发明的陈皮提取物在行动药理学方面对学习/记忆障碍的作用。

[0176] 本试验例中使用的陈皮提取物如下制备。即,称量 5.54g 来自陈皮 1 的陈皮提取物,将其放入 50ml 的离心管中,向其中加入生理盐水使达到 30mL。之后,进行 30 分钟的超声波处理。

[0177] 根据川陈皮素含量来调整陈皮提取物对小鼠的给药量。这里,川陈皮素含量预先通过使用川陈皮素标准物质的 HPLC 法的绝对标准曲线法进行测定。

[0178] 研究陈皮提取物的慢性给药对 MK801 诱发性学习/记忆障碍的作用。将小鼠分成 4 组,对每一组分别以 $1.48\text{g}/\text{kg}$ 或 $3.69\text{g}/\text{kg}$ (以川陈皮素含量计:分别为 $10\text{mg}/\text{kg}$ 或 $25\text{mg}/\text{kg}$) 给予陈皮提取物,对两组连续 7 天经口给予生理盐水。在第 7 天给予上述物质的 90 分

钟后皮下给予 MK801 (0.08mg/kg) 或生理盐水。在其 30 分钟后进行带有恐怖条件的学习试验。

[0179] 在带有恐怖的学习试验中,将小鼠放入透明盒内,使其自由探索 2 分钟,之后给予 0.7mA、2 秒的电刺激。重复刺激 3 次,进行学习试行,评价记忆的获得和保持能力。24 小时后,将小鼠再次放入透明盒内,以小鼠的畏缩行为、即停止呼吸以外的所有行为的状态为指标进行确认试行,作为学习 / 记忆行为,通过 5 分钟的测定来评价保持和记起能力。结果见图 3A。

[0180] [比较试验 1] 研究川陈皮素的学习 / 记忆障碍改善作用

[0181] 在上述试验例 1-1 中,将经口给予陈皮提取物改成腹腔内给予川陈皮素 (10、50mg/kg),进行比较试验。结果见图 3B。

[0182] 如图 3A 和 3B 所示,通过 MK801 的处置,畏缩行为明显减少,但通过给予陈皮提取物,在学习试行和确认试行时均确认到有关该减少的用量依赖性的改善效果。特别是在学习试行中,给予了本发明的陈皮提取物的小鼠通过接受 MK801 的处置,其学习 / 记忆功能被抑制而容易忘记,但第 3 次的带有条件的记忆时间相对于对照小鼠为约 1.5 倍、相对于 MK801 处置的未给予陈皮提取物的小鼠为约 4.4 倍 (图 3A)。给予川陈皮素时并没有确认到这样的结果 (比较试验 1、图 3B)。即,判明本发明的陈皮提取物具有只给予川陈皮素时没有确认到的增强记忆的获得和保持能力的效果。

[0183] 而且,在确认试行中,在本发明的陈皮提取物的试验中,尽管是经口给药,但与腹腔内给予川陈皮素的结果相比并没有确认到显著差异。

[0184] (考察 3)

[0185] 由上述试验例的结果可知:即使在体内,通过本发明的陈皮提取物的慢性给药,也明显改善学习 / 记忆障碍,而且还增强给予川陈皮素时没有确认到的记忆的获得和保持能力。

[0186] 上述结果显示:本发明的陈皮提取物利用突触可塑性促进作用和 PKA/ERK 保护作用,改善学习 / 记忆障碍,而且还增强记忆的获得能力。即,以上显示:本发明的陈皮提取物较川陈皮素更改善阿尔茨海默病的核心症状即学习 / 记忆障碍,特别是增强和 / 或改善在川陈皮素中没有确认到的记忆的获得和保持能力。

[0187] [一般的试验步骤 2]

[0188] 下述试验例 4 中使用的一般的试验步骤如下。

[0189] (PC12D 细胞的培养)

[0190] 将 9.5g Dulbecco's Modified Eagle 培养基 (DMEM) 溶解于 800mL MilliQ 水中,向其中加入 3.5g 葡萄糖,用 MilliQ 水定容至 1L。取 830mL 经高压釜灭菌的溶液,加入 17mL 10% 的碳酸氢钠水溶液和 16.5mL 3% 的 L-谷氨酰胺水溶液。然后,加入马血清 (HS) 使达到 10%、加入胎牛血清 (FCS) 使达到 5%,以制得的溶液作为成长培养基,在 37°C 下、在 5% CO₂ 培养箱内培养。

[0191] 试验培养基使用含有 2% HS、1% FCS 的 hDMEM。

[0192] (质粒的导入和报告基因测试)

[0193] 将 PC12D 细胞以 8×10^4 个细胞 / 孔接种在 48 孔板上,用成长培养基培养 24 小时,之后将 pRTH 质粒以 0.1 μ g / 孔、将海肾 pRG-TK 质粒以 0.01 μ g / 孔进行脂质转染。转染 19

小时后使用溶解有化合物的试验培养基进行培养基交换。培养 24 小时后吸引培养基,用被动裂解缓冲液回收。

[0194] 关于萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶,使用双色荧光素酶报道测定系统 (Promega),利用照度计来测定。

[0195] (SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析 2)

[0196] 将 PC12D 细胞以 0.67×10^6 个细胞 / 皿接种在 35mm 的皿中,在成长培养基中使用 5% CO_2 培养箱培养 2 天,之后用药物处置 24 小时。

[0197] 将各细胞处置后用冰冷的 PBS 清洗。然后,用细胞增溶液 (1mM 的 EDTA、1% 的 SDS、10mM 的 NaF、10nM 的花萼海绵诱癌素、320nM 的黑海绵酸、1mM 的原钒酸钠、1mM 的 p-APMSF、 $10 \mu\text{g/mL}$ 的胃酶抑素 A、 $10 \mu\text{g/mL}$ 的抗蛋白酶、 $10 \mu\text{g/mL}$ 的亮肽素、 $10 \mu\text{g/mL}$ 的胰凝乳蛋白酶抑制剂、 $10 \mu\text{g/mL}$ 的磷酸阿米酮、10mM 的 HEPES、pH7.5) 回收。之后,迅速地在 95°C 下煮沸 5 分钟使蛋白变性,之后将 DNA 进行超声波破碎,制得离心上清作为 SDS-PAGE 用样品。

[0198] 使用 12.5% 的凝胶作为 SDS-PAGE 的分离凝胶,在 35V、10mA 下泳动,之后将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上,使用含有 5% 脱脂乳的 TBST (10mM 的 Tris-HCl、100mM 的 NaCl、0.05% 的 Tween 20、pH7.4; 以下称作封闭缓冲液) 在室温下封闭 1 小时。然后,用 TBST 清洗样品,与用封闭缓冲液稀释至 1000 倍的一次抗体在 4°C 下培育一夜。再用 TBST 清洗样品,与用封闭缓冲液稀释至 2000 倍的 HRP 标记 IgG 抗体在室温下培育 1 小时,用 TBST 清洗。抗体阳性谱带的检测采用 ECL 法。重探测如下:使用剥离缓冲液 (62.5mM 的 Tris-HCl、2% 的 SDS、100mM 的 β -巯基乙醇、pH7.4) 剥下抗体,用 TBST 清洗印迹,之后检测内部标准蛋白。

[0199] (统计学分析 2)

[0200] 使用单因素方差分析 (Bonferroni) 来评价实验结果。以两侧 5% 来检验显著水平,以 $p < 0.05$ 为显著。

[0201] [试验例 4] 陈皮提取物的多巴胺合成促进作用

[0202] 在本试验例中,作为本发明的陈皮提取物对帕金森病的症状改善作用,以对多巴胺生物合成系统的影响为指标进行研究。具体而言,关于陈皮提取物对酪氨酸羟化酶 (TH) 转录活性的影响,在作为产生多巴胺的细胞的 PC12D 细胞中导入 TH 基因启动子区 DNA 报道基因,测定荧光素酶活性来进行研究。另外,为了研究对 TH 蛋白的影响,利用蛋白质印迹法研究用陈皮提取物处置的 PC12D 细胞中 TH 蛋白的表达。而且,为了在帕金森病模型小鼠中研究陈皮提取物或川陈皮素对黑质-纹状体多巴胺神经变性引起的纹状体中的多巴胺含量降低的药效,在给予陈皮提取物或川陈皮素后测定多巴胺含量。

[0203] [试验例 4-1] PC12D 细胞中的陈皮提取物的 TH 转录活性促进作用

[0204] 培养以 8×10^4 个细胞 / 48 孔板的密度增殖的 PC12D 细胞 24 小时。使用荧光素酶报道构建体转染细胞 19 小时,然后用对照、来自陈皮 1 的本发明的陈皮提取物 (30、60 和 $120 \mu\text{g/mL}$) 和现有的陈皮 7 的提取物 ($120 \mu\text{g/mL}$) 或川陈皮素 (2、10 和 $30 \mu\text{M}$) 处理 24 小时。

[0205] 如图 4A 所示,在 PC12D 细胞中,与对照和现有的陈皮 7 的提取物相比,本发明的陈皮 1 的提取物的 TH 转录活性显著上升。此外还显示:以川陈皮素换算计为 $2 \mu\text{M}$ 的 $120 \mu\text{g/mL}$ 陈皮 1 的提取物较 $2 \mu\text{M}$ 和 $10 \mu\text{M}$ 的川陈皮素强效地促进 TH 转录活性。

[0206] [试验例 4-2] PC12D 细胞中陈皮提取物的 TH 表达量上升作用

[0207] 在 PC12D 细胞中研究 TH 蛋白的表达促进作用。培养以 0.67×10^6 个细胞 / 皿的密度增殖的 PC12D 细胞 48 小时。用对照或来自陈皮 1 的陈皮提取物 (60、120、240 和 $480 \mu\text{g}/\text{ml}$) 处理细胞 24 小时。使用抗 TH 和抗 PKA α 抗体进行蛋白质印迹分析。最初对抗 TH 抗体进行研究,之后剥下印迹,用抗 PKA α 抗体再次进行试验,确认使等量的蛋白在各泳道中电泳。

[0208] 如图 4B 所示,在 PC12D 细胞中,陈皮提取物浓度依赖性地提高 TH 蛋白的表达。

[0209] [试验例 4-3] 在 PC12D 细胞中陈皮提取物提高多巴胺含量的作用

[0210] 由于 TH 是多巴胺合成的限速酶、而 PC12D 细胞是多巴胺合成分泌细胞,因此研究提高多巴胺的作用。

[0211] 将 PC12D 细胞以 1.0×10^6 个细胞 / 皿接种在 35mm 皿中,在增殖培养基上、在 5% CO_2 培养箱中培养 24 小时,之后进一步培养添加有陈皮 1 和陈皮 7 的细胞培养液 24 小时。之后,用加热至 37°C 的低 K^+ 缓冲液 (140mM 的 NaCl、4.7mM 的 KCl、1.2mM 的 KH_2PO_4 、2.5mM 的 CaCl_2 、1.2mM 的 MgSO_4 、11mM 葡萄糖和 15mM 的 HEPES-Tris、pH7.4) 清洗细胞,加入高氯酸溶液使最终浓度达到 0.4N,用超声波破碎细胞达 1 分钟。离心分离所得的溶液,通过使用电化学检测器的高效液相色谱法分离定量多巴胺。

[0212] 如图 4C 所示,与对照和现有的陈皮 7 的提取物相比,本发明的陈皮 1 的提取物在 24 小时和 48 小时的处置中均使多巴胺含量增加。

[0213] (考察 4)

[0214] 在上述试验例中,本发明的陈皮提取物在 PC12D 细胞中浓度依赖性地使 TH 转录活性、TH 表达量和多巴胺含量均增加,与等浓度的川陈皮素相比,该作用出乎意料且格外强。

[0215] 即,可知本发明的陈皮提取物较川陈皮素显著地显示出多巴胺合成促进活性。在现有的来自陈皮的提取物中并没有确认到该活性,由此认为:本发明的陈皮提取物通过高含量的川陈皮素与川陈皮素以外的其他成分的协同效果显示出多巴胺合成促进活性。根据以上结果,本发明的陈皮提取物被期待作为帕金森病治疗药的药效。

[0216] [试验例 5] 海马神经细胞中橘皮提取物的 CRE 转录活性

[0217] 使用根据本说明书中记载的方法从实施例 2 中得到的橘皮 3 中提取的提取物,就海马神经细胞中的 CRE 转录活性与对照和川陈皮素进行比较研究。试验步骤与试验例 2 相同。结果见图 5A。

[0218] 需要说明的是,本试验例中使用的 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的橘皮 3 提取物中含有约 $9.4 \mu\text{M}$ 的川陈皮素。

[0219] 如图 5A 所示,与对照和川陈皮素相比,橘皮 3 的提取物在海马神经细胞中显示出显著的 CRE 转录活性。由此期待着本发明的橘皮提取物作为阿尔茨海默病治疗药的药效。

[0220] [试验例 6] 橘皮提取物的学习 / 记忆障碍改善作用 (体内试验)

[0221] 使用根据本说明书中记载的方法从实施例 2 中得到的橘皮 6 中提取的提取物,研究本发明的橘皮提取物对学习 / 记忆障碍的作用。试验步骤与试验例 3 相同。结果见图 5B 和图 5C。

[0222] 需要说明的是,对每 1 组连续 7 天以 $1.87\text{g}/\text{kg}$ 或 $3.73\text{g}/\text{kg}$ (以川陈皮素含量计 : 分别为 $25\text{mg}/\text{kg}$ 或 $50\text{mg}/\text{kg}$) 经口给予橘皮提取物。

[0223] 如图 5B 和图 5C 所示可知 :通过慢性给予本发明的橘皮提取物,显著改善学习 / 记

忆障碍,而且还增强在川陈皮素中没有确认到的记忆的获得和保持能力。

[0224] (考察 5)

[0225] 由上述试验例的结果,期待着本发明的橘皮提取物作为阿尔茨海默病治疗药的药效。

[0226] [试验例 7] PC12D 细胞中的橘皮提取物的 CRE 转录活性

[0227] 使用根据本说明书中记载的方法从实施例 2 中得到的橘皮 3 中提取的提取物,就 PC12D 细胞中的 CRE 转录活性,与对照和川陈皮素进行比较研究。试验步骤与试验例 2 相同。结果见图 5D。

[0228] 需要说明的是,本试验例中使用的 $300\mu\text{g/mL}$ 的橘皮 3 提取物中含有约 $9.4\mu\text{M}$ 的川陈皮素。

[0229] 如图 5D 所示,与对照和川陈皮素相比,橘皮 3 的提取物在 PC12D 细胞中显示出显著的 CRE 转录活性。

[0230] [试验例 8] PC12D 细胞中的橘皮提取物的 TH 转录活性

[0231] 使用根据本说明书记载的方法从实施例 2 中得到的橘皮 3 中提取的提取物,就 PC12D 细胞中的 TH 转录活性,与对照和川陈皮素进行比较研究。试验步骤与试验例 4-1 相同。结果见图 5E。

[0232] 如图 5E 所示,与对照和川陈皮素相比,橘皮 3 的提取物在 PC12D 细胞中显示出显著的 TH 转录活性。

[0233] [试验例 9] PC12D 细胞中橘皮提取物的提高三磷酸鸟苷环化水解酶 I (GTP 环化水解酶 I ;GCH I) 量的作用

[0234] 在 PC12D 细胞中,研究提高 GCH I 量的作用。GCH I 是 TH 所必须的辅酶四氢生物蝶呤 (BH_4) 的生物合成中的限速酶。

[0235] 将 PC12D 细胞用 $120\mu\text{g/mL}$ 浓度的橘皮提取物、陈皮提取物和 DMSO (对照) 处理 48 小时,之后用 PBS 清洗,在细胞溶解液 (1mM 的 EDTA、 1% 的 SDS、 10mM 的 HEPES、 10mM 的 NaF、 1mM 的 p-APMSF、 1mM 的原钒酸钠、 10nM 的花萼海绵诱癌素 (calyculin)、 $320\mu\text{M}$ 的黑海绵酸、 $10\mu\text{g/mL}$ 的胃酶抑素 (pepstatin)、 $10\mu\text{g/mL}$ 的抗蛋白酶、 $10\mu\text{g/mL}$ 的亮肽素、 $10\mu\text{g/mL}$ 的抑糜蛋白酶素 (chymostatin)、 $10\mu\text{g/mL}$ 的磷酸阿米酮、 240pM 的氯氰菊酯) 中溶解。之后,在 95°C 下煮沸 5 分钟,超声后以 $10000\times\text{g}$ 的离心力离心 10 分钟,使用上清进行 SDS-PAGE。将 $10\mu\text{g}$ 样品添加到凝胶浓度为 12.5% 的凝胶中。之后,以 36V 、用 2 小时转录到 PVDF 膜上,膜用 5% 脱脂乳封闭 1 小时。之后,使用 GCH I 抗体 (ABBIOTEC、稀释 1000 倍),分别在 4°C 下反应一夜,清洗后再与过氧化物酶标记抗兔 2 次抗体 (CST、稀释 2000 倍) 反应,利用 ECL 法检测谱带。将结果与陈皮提取物进行比较,见图 5F。

[0236] 需要说明的是,在本试验例中使用的 $120\mu\text{g/mL}$ 的橘皮提取物中含有约 $3.76\mu\text{M}$ 的川陈皮素,在 $120\mu\text{g/mL}$ 的陈皮提取物中含有约 $2.02\mu\text{M}$ 的川陈皮素。

[0237] 如图 5F 所示,在 PC12D 细胞中,与对照相比,橘皮提取物和陈皮提取物使 GCH I 的表达量显著上升。而且,即使与陈皮提取物相比,橘皮提取物也使 GCH I 的表达量显著上升。

[0238] (考察 6)

[0239] 关于 TH 的活性表达所必须的辅酶 BH_4 ,若细胞内的 BH_4 量变得较米氏常数所表示的量高,则 TH 蛋白量增加,TH 的酶活性增大,促进多巴胺的合成。

[0240] 根据上述试验例的结果,由于本发明的橘皮提取物使GCH I的表达量显著上升,因此通过增加TH的活性表达所必须的辅酶BH4合成的限速酶即GCH I量,使TH活性增大,其结果,推测促进多巴胺的产生和分泌,期待着作为帕金森病治疗药的药效。

[0241] [试验例 10] 海马神经细胞中来自立花桔叶的提取物的 CRE 转录活性

[0242] 使用根据本说明书记载的方法从实施例 2 得到的立花桔叶 1~3 中提取的提取物,就海马神经细胞中的 CRE 转录活性,与对照和川陈皮素进行比较研究。试验步骤与试验例 2 相同。结果见图 6A。

[0243] 需要说明的是,本试验例中使用的来自立花桔叶 1 的 300 μ g/mL 的提取物中含有约 4.9 μ M 的川陈皮素,来自立花桔叶 2 的 300 μ g/mL 的提取物中含有约 8.5 μ M 的川陈皮素,来自立花桔叶 3 的 300 μ g/mL 的提取物中含有约 6.9 μ M 的川陈皮素。

[0244] 如图 6A 所示,与对照和川陈皮素相比,来自立花桔叶的提取物在海马神经细胞中显示出显著的 CRE 转录活性。

[0245] [试验例 11] PC12D 细胞中的来自立花桔叶的提取物的 CRE 转录活性

[0246] 使用根据本说明书记载的方法从实施例 2 得到的立花桔叶 1~3 中提取的提取物,就 PC12D 细胞中的 CRE 转录活性,与对照和川陈皮素进行比较研究。试验步骤与试验例 2 相同。结果见图 6B。

[0247] 需要说明的是,本试验例中使用的来自立花桔叶 1 的 300 μ g/mL 的提取物中含有约 4.9 μ M 的川陈皮素、来自立花桔叶 2 的 300 μ g/mL 的提取物中含有约 8.5 μ M 的川陈皮素、来自立花桔叶 3 的 300 μ g/mL 的提取物中含有约 6.9 μ M 的川陈皮素。

[0248] 如图 6B 所示,与对照和川陈皮素相比,来自立花桔叶的提取物在 PC12D 细胞中显示出显著的 CRE 转录活性。

[0249] (考察 7)

[0250] 根据上述试验例的结果,本发明的来自立花桔叶的提取物显示出超过由川陈皮素含量预测的活性的显著的 CRE 转录活性,被期待着作为阿尔茨海默病治疗药和帕金森病治疗药的药效。

[0251] [试验例 12] 海马神经细胞中来自大红桔果皮的提取物的 CRE 转录活性

[0252] 使用根据本说明书记载的方法从实施例 2 得到的大红桔 1 中提取的提取物,就海马神经细胞中的 CRE 转录活性,与对照和川陈皮素进行比较研究。试验步骤与试验例 2 相同。结果见图 7A。

[0253] 需要说明的是,本试验例中使用的来自大红桔 1 果皮的 100 μ g/mL 的提取物中含有约 3.4 μ M 的川陈皮素、300 μ g/mL 的提取物中含有约 10.1 μ M 的川陈皮素。

[0254] 如图 7A 所示,与对照和川陈皮素相比,来自大红桔果皮的提取物在海马神经细胞中显示出显著的 CRE 转录活性。

[0255] (考察 6)

[0256] 根据上述试验例的结果,本发明的来自大红桔果皮的提取物显示出超过由川陈皮素含量预测的活性的显著的 CRE 转录活性,被期待着作为阿尔茨海默病治疗药的药效。

[0257] [试验例 13] PC12D 细胞中来自大红桔果皮的提取物的 CRE 转录活性

[0258] 使用根据本说明书记载的方法从实施例 2 得到的大红桔 1 中提取的提取物,就 PC12D 细胞中的 CRE 转录活性,与对照和川陈皮素进行比较研究。试验步骤与试验例 2 相

同。结果见图 7B。

[0259] 需要说明的是,本试验例中使用的来自大红桔果皮的 $100\mu\text{g/mL}$ 的提取物中含有约 $3.4\mu\text{M}$ 的川陈皮素。

[0260] 如图 7B 所示,与对照和川陈皮素相比,来自大红桔果皮的提取物在 PC12D 细胞中显示出显著的 CRE 转录活性。

[0261] [试验例 14] PC12D 细胞中来自大红桔果皮的提取物的 TH 转录活性

[0262] 使用根据本说明书记载的方法从实施例 2 得到的大红桔 1 中提取的提取物,就 PC12D 细胞中的 TH 转录活性,与对照和川陈皮素进行比较研究。试验步骤与试验例 4-1 相同。结果见图 7C。

[0263] 需要说明的是,本试验例中使用的来自大红桔果皮的 $100\mu\text{g/mL}$ 的提取物中含有约 $3.4\mu\text{M}$ 的川陈皮素。

[0264] 如图 7C 所示,与对照和川陈皮素相比,来自大红桔果皮的提取物在 PC12D 细胞中显示出显著的 TH 转录活性。

[0265] (考察 7)

[0266] 根据上述试验例的结果,本发明的来自大红桔果皮的提取物显示出超过由川陈皮素含量预测的活性的显著的 CRE 转录活性和 TH 转录活性,被期待着作为帕金森病治疗药的药效。

[0267] [制备例] 本发明的药品和食品的制备

[0268] 按照以下的步骤,制备本发明的含有陈皮、橘皮或立花桔叶的药品或食品。

[0269] [制备例 1] 细粒剂 A

[0270] 以 3.0g 陈皮、3.0g 当归、3.0g 钩藤、3.0g 川芎、4.0g 白术、4.0g 茯苓、2.0g 柴胡、1.5g 甘草和 5.0g 半夏 (总计 28.5 g) 的比率混合生药使总量达到 200 ~ 800kg, 使用 2000 ~ 8000L 水在 60 ~ 100℃ 下提取 (提取罐) 30 ~ 180 分钟。以 1000 ~ 5000rpm 的转数过滤 (离心分离机) 以进行固液分离,之后在 8kPa 以下的减压下浓缩 (螺旋旋转型浓缩机) 直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥 (喷雾干燥机), 得到提取物制剂 (抑肝散加陈皮半夏提取物)。相对于得到的 6.1g 抑肝散加陈皮半夏提取物,以 2.9g 由硬脂酸镁、玉米淀粉、乳糖、普鲁兰和硅铝酸镁构成的添加物的比率,在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合,以 4rpm 的转速混合 (容器旋转型混合机) 20 分钟,以 490 ~ 2500Pa 的辊压成型,整粒 (干式造粒装置), 在筛 30 号 ~ 50 号间进行粒子分级 (盒式筛选, cassette screen), 得到细粒剂 A。

[0271] 在得到的 9.0g 细粒剂 A 中含有 6.1g 混合有 3.0g 陈皮和其他生药的抑肝散加陈皮半夏提取物,作为标准,成人每天分 2 ~ 3 次服用 9.0g 细粒剂 A。

[0272] [制备例 2] 细粒剂 B

[0273] 以 3.0g 橘皮、4.0g 槟榔子、3.0g 厚朴、3.0g 桂皮、1.5g 紫苏叶、1.0g 甘草、1.0g 大黄、1.0g 生姜、1.0g 木香、1.0g 吴茱萸和 3.0g 茯苓 (总计 22.5g) 的比率混合生药使总量达到 200 ~ 800kg, 使用 2000 ~ 8000L 水在 60 ~ 100℃ 下提取 (提取罐) 30 ~ 180 分钟。以 1000 ~ 5000rpm 的转数过滤 (离心分离机) 以进行固液分离,之后在 8kPa 以下的减压下浓缩 (螺旋旋转型浓缩机) 直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥 (喷雾干燥机), 得到提取物制剂

(九味槟榔汤提取物)。相对于 3.7g 得到的九味槟榔汤提取物,以 2.3g 由硬脂酸镁、玉米淀粉、乳糖、普鲁兰和硅铝酸镁构成的添加物的比率,在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合,以 4rpm 的转速混合(容器旋转型混合机)20 分钟,以 490 ~ 2500Pa 的辊压成型,整粒(干式造粒装置),在筛 30 号 ~ 50 号间进行粒子分级(盒式筛选),得到细粒剂 B。

[0274] 在得到的 6.0g 细粒剂 B 中含有 3.7g 混合有 3.0g 橘皮和其他生药的九味槟榔汤提取物,作为标准,成人每天分 2 ~ 3 次服用 6.0g 细粒剂 B。

[0275] [制备例 3] 细粒剂 C

[0276] 以 2.4g 陈皮、2.4g 钩藤、2.4g 半夏、2.4g 麦冬、2.4g 茯苓、1.6g 人参、1.6g 防风、1.6g 菊花、0.8g 甘草、0.8g 生姜和 4.0g 石膏(总计 22.4g)的比率混合生药使总量达到 200 ~ 800kg,使用 2000 ~ 8000L 水在 60 ~ 100℃ 下提取(提取罐)30 ~ 180 分钟。以 1000 ~ 5000rpm 的转数过滤(离心分离机)以进行固液分离,之后在 8kPa 以下的减压下浓缩(螺旋旋转型浓缩机)直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥(喷雾干燥机),得到提取物制剂(钩藤散提取物)。相对于得到的 4.48g 钩藤散提取物,以 1.52g 由含水二氧化硅、硬脂酸镁和玉米淀粉构成的添加物的比率,在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合,以 4rpm 的转速混合(容器旋转型混合机)20 分钟,以 490 ~ 2500 Pa 的辊压成型,整粒(干式造粒装置),在筛 30 号 ~ 50 号间进行粒子分级(盒式筛选),得到细粒剂 C。

[0277] 在得到的 6.0g 细粒剂 C 中含有 4.48g 混合有 2.4g 陈皮和其他生药的钩藤散提取物,作为标准,成人每天分 3 次服用 6.0g 细粒剂 C。

[0278] [制备例 4] 茶剂

[0279] 将陈皮或橘皮切成 850 ~ 4750 μ m 的四方形,将 3 ~ 7g 切断的陈皮或橘皮装入纸袋或布袋中,作为茶剂。

[0280] 成人每天按 3 次(1 袋/次)将所得的茶剂浸出后服用。

[0281] [制备例 5] 生药末 - 细粒剂 D

[0282] 将陈皮或橘皮以转数 2000 ~ 3500rpm、网孔 0.5 ~ 3.0mm 粗碎(粉碎机),再以转数 5000 ~ 8000rpm、网孔 150 μ m 粉碎(制粉机),作为生药末。相对于得到的 10g 陈皮或橘皮的生药末,以 9.2g 由含水二氧化硅、硬脂酸镁和玉米淀粉构成的添加物的比率,在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合,以 4rpm 的转数混合(容器旋转型混合机)20 分钟,以辊压 490 ~ 2500Pa 成型,整粒(干式造粒装置),在筛 30 号 ~ 42 号间进行粒子分级(盒式筛选),得到细粒剂 D。

[0283] 在得到的 19.2g 细粒剂 D 中含有 10g 陈皮或橘皮,作为标准,成人每天分 2 ~ 3 次服用 19.2 ~ 38.4g 细粒剂 D。

[0284] [制备例 6] 煎剂

[0285] 将 10 ~ 30g 陈皮或橘皮用 20 倍量的 200 ~ 600mL 水在 100℃ 下煎煮 1 小时使水达到半量,过滤,作为煎剂。

[0286] 在得到的 100 ~ 300 mL 煎剂中含有 10 ~ 30g 陈皮或橘皮,作为标准,成人每天分 3 次服用 100 ~ 300mL 煎剂。

[0287] [制备例 7] 细粒剂 E

[0288] 将 50kg 陈皮或橘皮在 500 ~ 2000 L 水中、于 60 ~ 100℃ 下提取(提取罐)30 ~

180 分钟。以 1000 ~ 2500rpm 的转数过滤（离心分离机）以进行固液分离，之后在 8kPa 以下的减压下浓缩（螺旋旋转型浓缩机）直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥（喷雾干燥机），得到陈皮或橘皮的提取物。相对于得到的 7.2g 提取物，以 1.8g 由微粒二氧化硅和蔗糖脂肪酸酯构成的添加物的比率，在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合，以 4rpm 的转数混合（容器旋转型混合机）20 分钟，在辊压 490 ~ 2500Pa 下成型，整粒（干式造粒装置），在筛 30 号 ~ 42 号间进行粒子分级（盒式筛选），得到细粒剂 E。

[0289] 在得到的 9.0g 细粒剂 E 中，含有相当于 20g 陈皮或橘皮的 7.2g 陈皮提取物或橘皮提取物，作为标准，成人每天分 2 ~ 3 次服用 9.0g 细粒剂 E。

[0290] [制备例 8] 胶囊剂

[0291] 将 50kg 陈皮或橘皮在 500 ~ 2000L 水中、于 60 ~ 100℃ 下提取（提取罐）30 ~ 180 分钟。以 1000 ~ 2500rpm 的转数过滤（离心分离机）以进行固液分离，之后在 8kPa 以下的减压下浓缩（螺旋旋转型浓缩机）直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥（喷雾干燥机），得到陈皮或橘皮的提取物。相对于得到的 10g 提取物，以 4.75g 由硅铝酸镁、合成硅酸铝 / 羟丙基淀粉 / 结晶纤维素、玉米淀粉、轻质硅酸酐、硬脂酸镁和羧甲基纤维素钙构成的添加物的比率，在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合，以 4rpm 的转数混合（容器旋转型混合机）20 分钟，在辊压 490 ~ 2500 Pa 下成型，整粒（干式造粒装置），在筛 30 号 ~ 42 号间进行粒子分级（盒式筛选），得到细粒。将 400mg 该细粒填充（胶囊充填机）在本领域通常使用的市售胶囊中，得到胶囊剂。

[0292] 在得到的 13 个（470 ~ 480mg/个）胶囊剂中，含有相当于 10g 陈皮或橘皮的 3.6g 陈皮提取物或橘皮提取物，作为标准，成人每天分 2 ~ 3 次服用 13 ~ 26 个胶囊剂。

[0293] [制备例 9] 包衣片剂

[0294] 将 50kg 陈皮或橘皮在 500 ~ 2000L 水中、在 60 ~ 100℃ 下提取（提取罐）30 ~ 180 分钟。以 1000 ~ 2500rpm 的转数过滤（离心分离机）以进行固液分离，之后在 8kPa 以下的减压下浓缩（螺旋旋转型浓缩机）直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥（喷雾干燥机），得到陈皮或橘皮的提取物。相对于得到的 10g 提取物，以 9.1g 由麦芽糖、乳糖、硅铝酸镁和硬脂酸镁构成的添加物的比率，在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合，以 4rpm 的转数混合（容器旋转型混合机）20 分钟，以转数 20 ~ 55rpm、一次压缩 0.6mm 以上、二次压缩 0.4mm 以上进行压片（高速旋转式压片机），得到每片为 350mg 的素片。将 1.1g 由羟丙基甲基纤维素、滑石粉、氧化钛和焦糖构成的包衣剂溶解或悬浮于水 / 乙醇混合液（3:7 ~ 10:0）中，在排气温 40 ~ 55℃、流量 200 ~ 400g/mL、转数 4 ~ 6rpm 下包衣（包衣机），使用微量的巴西棕榈蜡和白蜡，在转数 1rpm、排气温 20 ~ 30℃ 下进行抛光（包衣机），得到每片为 370mg 的包衣片剂。

[0295] 在得到的 20 片包衣片剂中含有相当于 10g 陈皮或橘皮的 3.6g 陈皮提取物或橘皮提取物，作为标准，成人每天分 2 ~ 3 次服用 20 ~ 40 片包衣片剂。

[0296] [制备例 10] 细粒剂 F

[0297] 将 50kg 陈皮或橘皮在 500 ~ 2000L 水中、在 60 ~ 100℃ 下提取（提取罐）30 ~

180 分钟。以 1000 ~ 2500rpm 转数过滤（离心分离机）以进行固液分离，之后在 8kPa 以下的减压下浓缩（螺旋旋转型浓缩机）直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥（喷雾干燥机），得到陈皮或橘皮的提取物。相对于得到的 10g 提取物，以 15g 由玉米淀粉、麦芽糖、含水二氧化硅和硬脂酸镁构成的添加物的比率，在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合，以 4rpm 的转数混合（容器旋转型混合机）20 分钟，在辊压 490 ~ 2500Pa 下成型，整粒（干式造粒装置），在筛 30 号 ~ 42 号间进行粒子分级（盒式筛选），得到细粒剂 F。

[0298] 在得到的 4.5g 细粒剂 F 中含有相当于 5g 陈皮或橘皮的 1.8g 陈皮提取物或橘皮提取物，作为标准，成人每天分 2 ~ 3 次服用 4.5 ~ 9.0g 细粒剂 F。

[0299] [制备例 11] 颗粒剂

[0300] 将 50kg 陈皮或橘皮在 500 ~ 2000L 水中、在 60 ~ 100℃ 下提取（提取罐）30 ~ 180 分钟。以 1000 ~ 2500rpm 的转数过滤（离心分离机）以进行固液分离，之后在 8kPa 以下的减压下浓缩（螺旋旋转型浓缩机）直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥（喷雾干燥机），得到陈皮或橘皮的提取物。相对于得到的 10g 提取物，以 40g 由羧甲基纤维素钙、含水二氧化硅、硅铝酸镁和硬脂酸镁构成的添加物的比率，在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合，以 4rpm 的转数混合（容器旋转型混合机）20 分钟，以 490 ~ 2500Pa 的辊压成型，整粒（干式造粒装置），在筛 12 号 ~ 42 号间进行粒子分级（盒式筛选），得到颗粒剂。

[0301] 在得到的 18g 颗粒剂中含有相当于 10g 陈皮或橘皮的 3.6g 陈皮提取物或橘皮提取物，作为标准，成人每天分 2 ~ 3 次服用 18 ~ 36g 颗粒剂。

[0302] [制备例 12] 凝胶剂

[0303] 将 50kg 陈皮或橘皮在 500 ~ 2000L 水中、在 60 ~ 100℃ 下提取（提取罐）30 ~ 180 分钟。以 1000 ~ 2500rpm 的转数过滤（离心分离机）以进行固液分离，之后在 8kPa 以下的减压下浓缩（螺旋旋转型浓缩机）直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥（喷雾干燥机），得到陈皮或橘皮的提取物。相对于得到的 10g 提取物，以 40g 由卡拉胶、刺槐豆胶、还原麦芽糖液糖、木糖醇、苹果香料、卵磷脂和枸橼酸构成的添加物的比率，在总量为 10 ~ 30kg 的范围内混合，以 50 ~ 150rpm 的转数混合（混合搅拌机），边搅拌边加入等量的 80℃ 以上的热水，再冷却至 15℃ 以下，作为凝胶剂。

[0304] 在得到的 18g 凝胶剂中含有相当于 10g 陈皮或橘皮的 3.6g 陈皮提取物或橘皮提取物，作为标准，成人每天分 2 ~ 3 次服用 18 ~ 36g 凝胶剂。

[0305] [制备例 13] 细粒

[0306] 将 50kg 陈皮或橘皮在 500 ~ 2000L 水中、在 60 ~ 100℃ 下提取（提取罐）30 ~ 180 分钟。以 1000 ~ 2500rpm 的转数过滤（离心分离机）以进行固液分离，之后在 8kPa 以下的减压下浓缩（螺旋旋转型浓缩机）直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥（喷雾干燥机），得到陈皮或橘皮的提取物。相对于得到的 3.6g 提取物，以 0.9g 由微粒二氧化硅和蔗糖脂肪酸酯构成的添加物的比率，在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合，以 4rpm 的转数混合（容器旋转型混合机）20 分钟，以 490 ~ 2500Pa 的辊压成型，整粒（干式造粒装置），在筛 30 号 ~ 42

号间进行粒子分级（盒式筛选），得到细粒。

[0307] 在得到的 4.5g 细粒中含有相当于 10g 陈皮或橘皮的 3.6g 陈皮提取物或橘皮提取物，作为标准，成人每天摄取 4.5g 细粒。

[0308] [制备例 14] 凝胶材料

[0309] 将 50kg 陈皮或橘皮在 500 ~ 2000L 水中、在 60 ~ 100℃ 下提取（提取罐）30 ~ 180 分钟。以 1000 ~ 2500rpm 的转数过滤（离心分离机）以进行固液分离，之后在 8kPa 以下的减压下浓缩（螺旋旋转型浓缩机）直至浓度为约 10 ~ 40%。将浓缩液在转数 10000 ~ 20000rpm、供气温度 130 ~ 180℃、排气温度 60 ~ 120℃ 下喷雾干燥（喷雾干燥机），得到陈皮或橘皮的提取物。相对于得到的 10g 提取物，以 15.9g 由卵磷脂、还原麦芽糖糖稀、阿斯巴甜、抗坏血酸、枸橼酸三钠、凝胶化剂（FG-2266、新田ゼラチン株式会社）和橙子香料构成的添加物的比率，在总量为 50 ~ 400kg 的范围内混合，以 4rpm 的转数混合（容器旋转型混合机）20 分钟，作为凝胶材料。

[0310] 在得到的 9.3g 凝胶材料中含有相当于 10g 陈皮或橘皮的 3.6g 陈皮提取物或橘皮提取物，作为标准，成人每天摄取 9.3 ~ 18.6g 凝胶材料。

[0311] [制备例 15] 茶

[0312] 将立花桔叶切成 850 ~ 4750 μ m 的四方形，将 3 ~ 7g 切断的立花桔叶装入纸袋或布袋中、或者以其原来的状态作为茶。

[0313] 作为标准，成人每天以 3 次 ~ 5 次（1 袋或 3 ~ 7g/ 次）用热水浸泡所得的茶后摄取。

[0314] [制备例 16] 皮

[0315] 将 200g 陈皮或橘皮和 2g 食盐放入足以浸没的程度的水中，盖上盖，沸腾 15 分钟，之后舍去热水，浸入冷水中。将滤干水分的上述陈皮或橘皮放入混合 200g 白砂糖和 100mL 水并沸腾的混合溶液中，边不时混合边煮至皮中出现透明感。不用盖盖，用极弱的火边不时混合边煮 40 ~ 50 分钟使不变焦。除去煮汁，充分滤干水分，之后趁热取出，铺展晾干。向得到的皮上撒入 20g 白砂糖，制成皮。

[0316] 在得到的 21.1g 皮中含有 10g 陈皮或橘皮，作为标准，成人每天摄取 21.1 ~ 42.2g 皮。

[0317] [制备例 17] 果子酱

[0318] 向 100g 陈皮或橘皮中加入 100mL 100℃ 的热水，放入容器内蒸一夜，用混合器粉碎。加入 1L 水，用强火煮 1 小时 30 分钟。加入 25 ~ 30g 白砂糖，用中火煮 10 ~ 15 分钟，之后改成弱火，加入 25 ~ 30g 白砂糖并溶解。再加入 25 ~ 30g 白砂糖并溶解，冷却至 70℃ 以下，之后加入 60g 蜂蜜、1.7g 果胶和 1.7g 抗坏血酸，搅拌，制成果子酱。

[0319] 在得到的 100g 果子酱中含有 20g 陈皮或橘皮，作为标准，成人每天摄取 25 ~ 50g 果子酱。

[0320] [制备例 18] 茶

[0321] 将 30kg 立花桔叶在 300L 水中、在 60 ~ 100℃ 下提取（提取罐）5 ~ 30 分钟。以 1000 ~ 2500rpm 的转数过滤（离心分离机）进行固液分离，向滤液中添加 0.2g/L 的抗坏血酸，制成茶。

[0322] 在得到的 500mL 茶中含有 5g 立花桔叶，作为标准，成人每天摄取 500mL 茶。

[0323] 产业实用性

[0324] 本发明的干燥植物组织或植物组织提取物作为改善阿尔茨海默病和帕金森病等中枢神经变性疾病的药品或食品有效,还可用作该疾病的有望的根治性治疗药的含有成分。本发明的干燥植物组织或植物组织提取物特别是对增强记忆的获得、保持和记起能力有效。

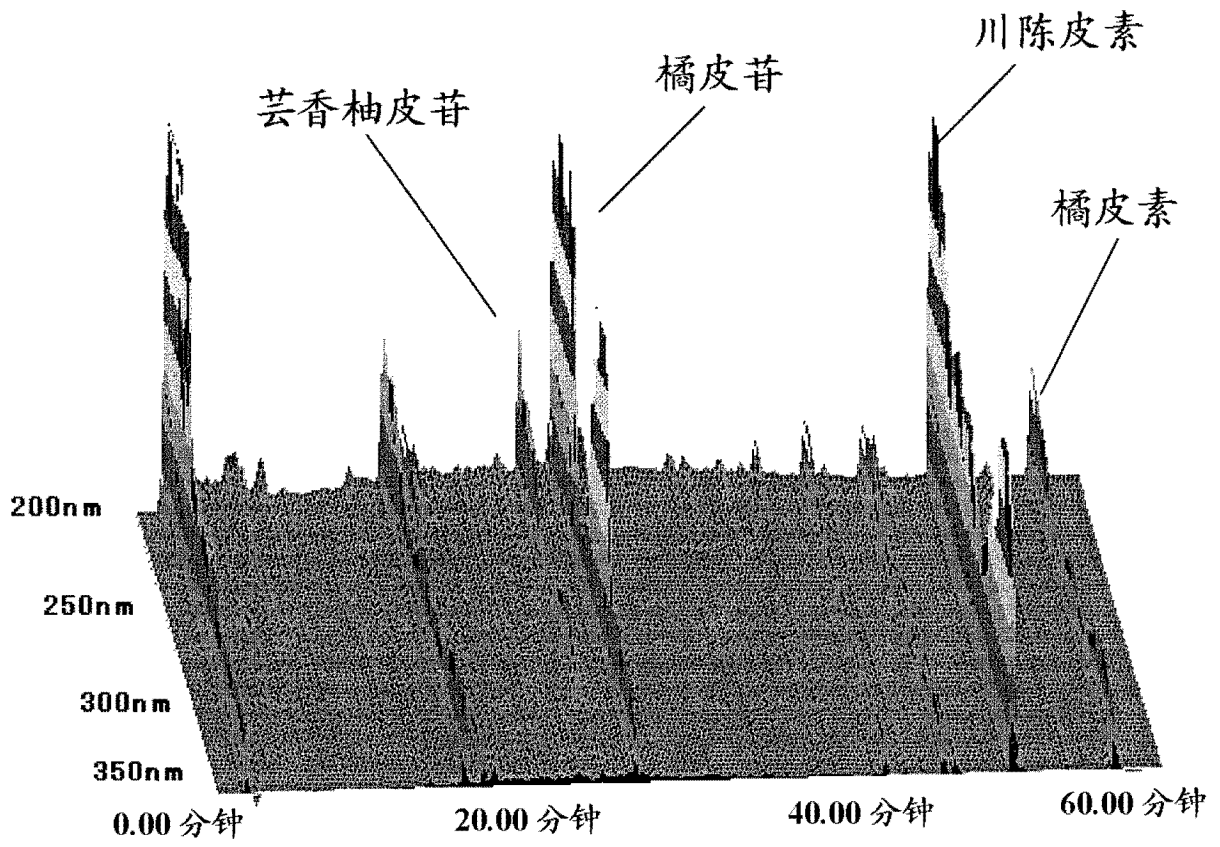


图 1A

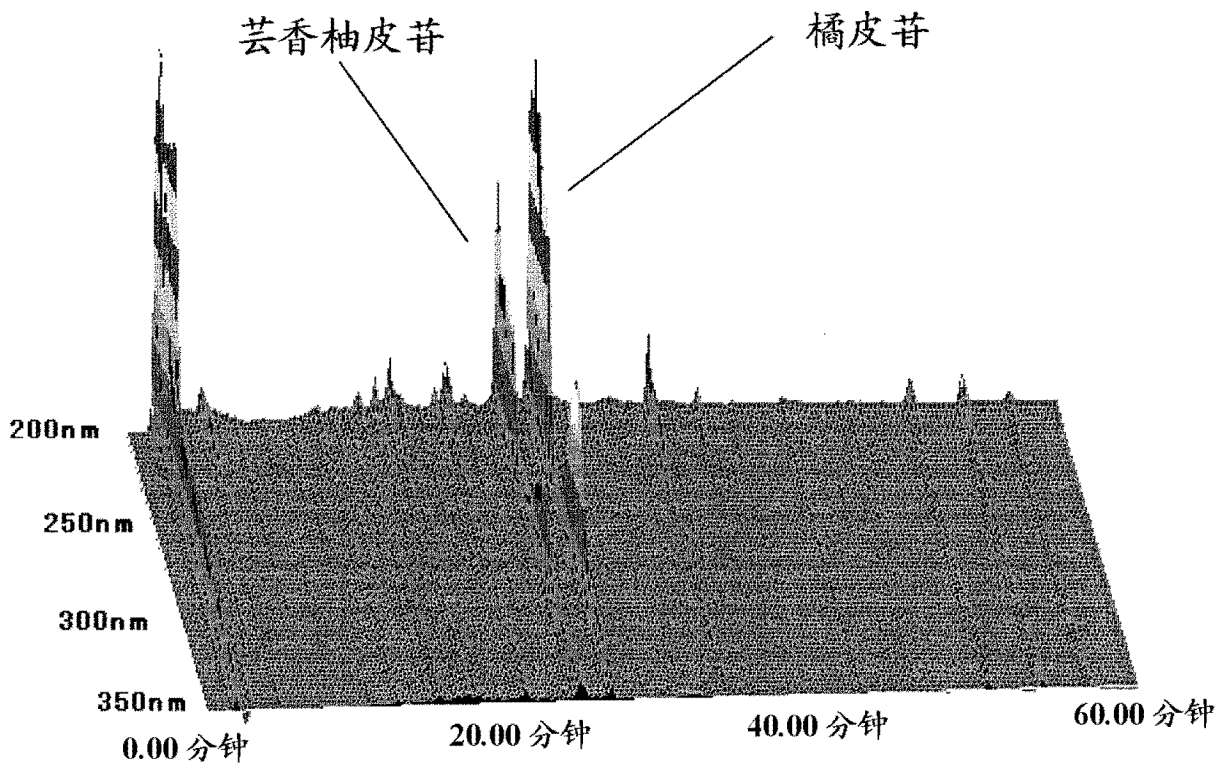


图 1B

陈皮提取物对初代培养大鼠海马神经细胞中的 CREB 磷酸化的作用

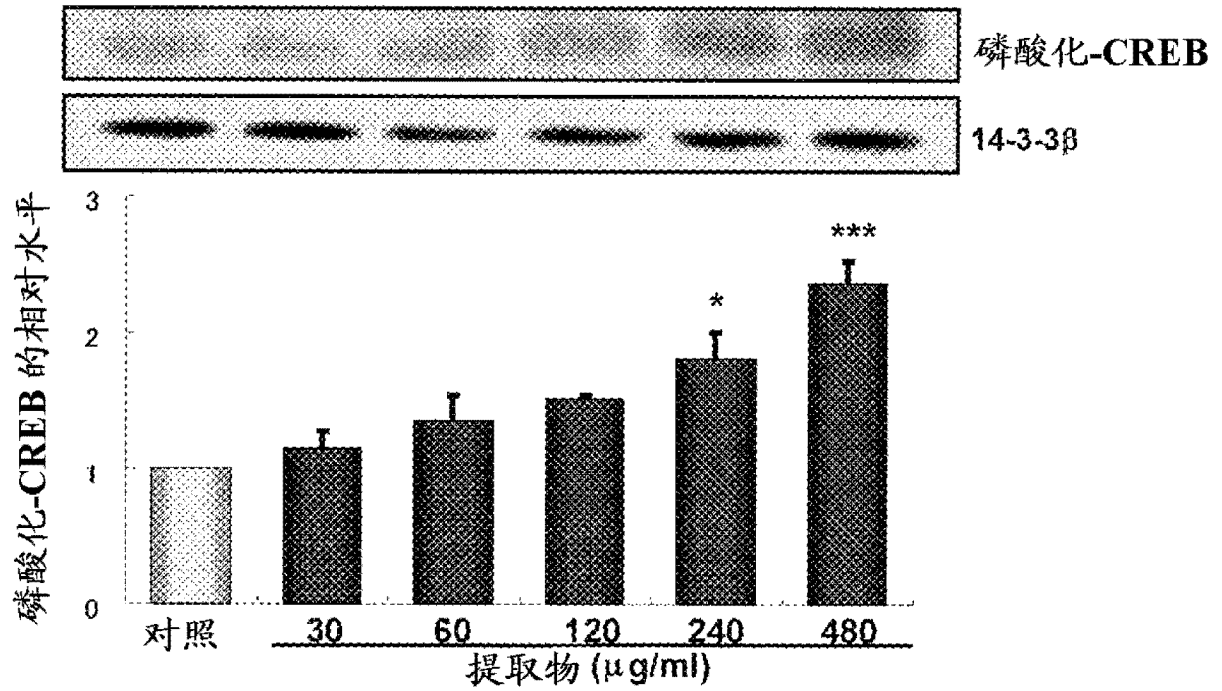


图 2A

陈皮提取物对初代培养大鼠海马神经细胞中的 PKA 底物磷酸化的作用

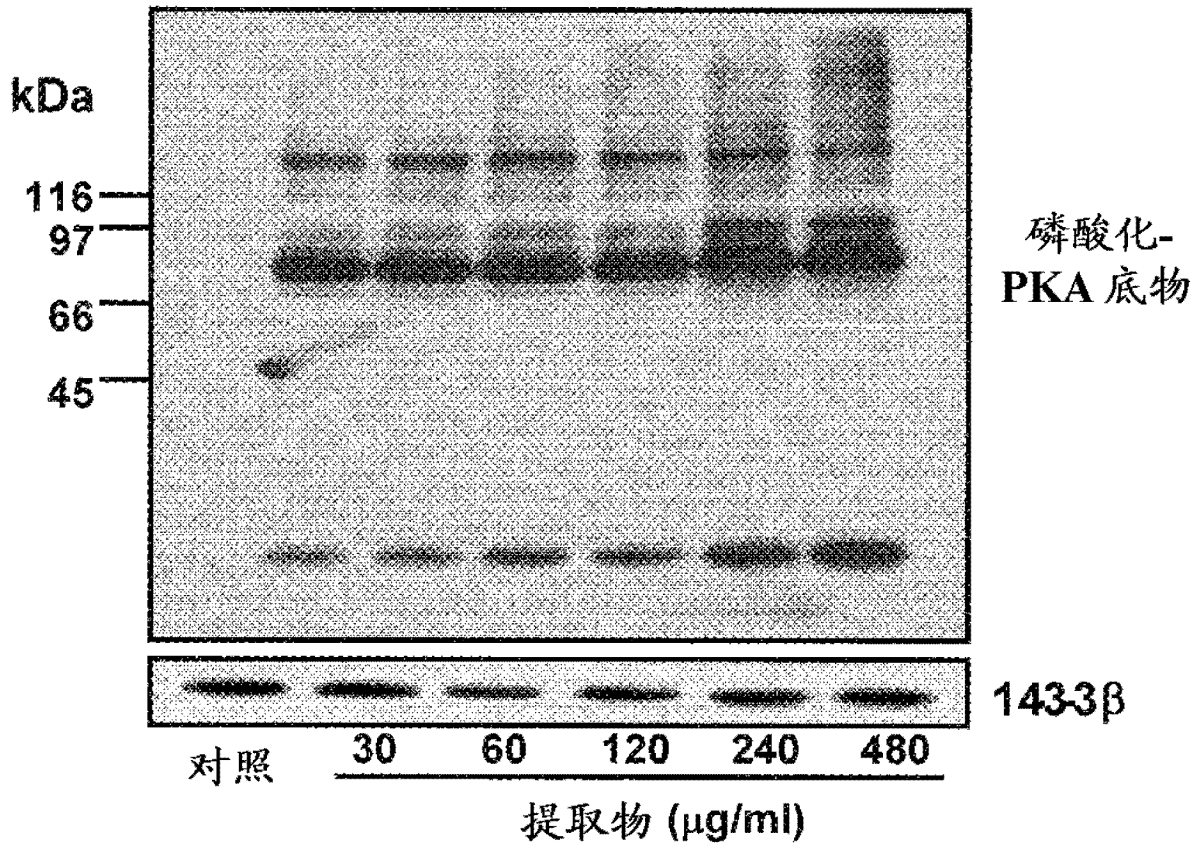


图 2B

陈皮提取物对初代培养大鼠海马神经细胞中的 ERK1/2 磷酸化的作用

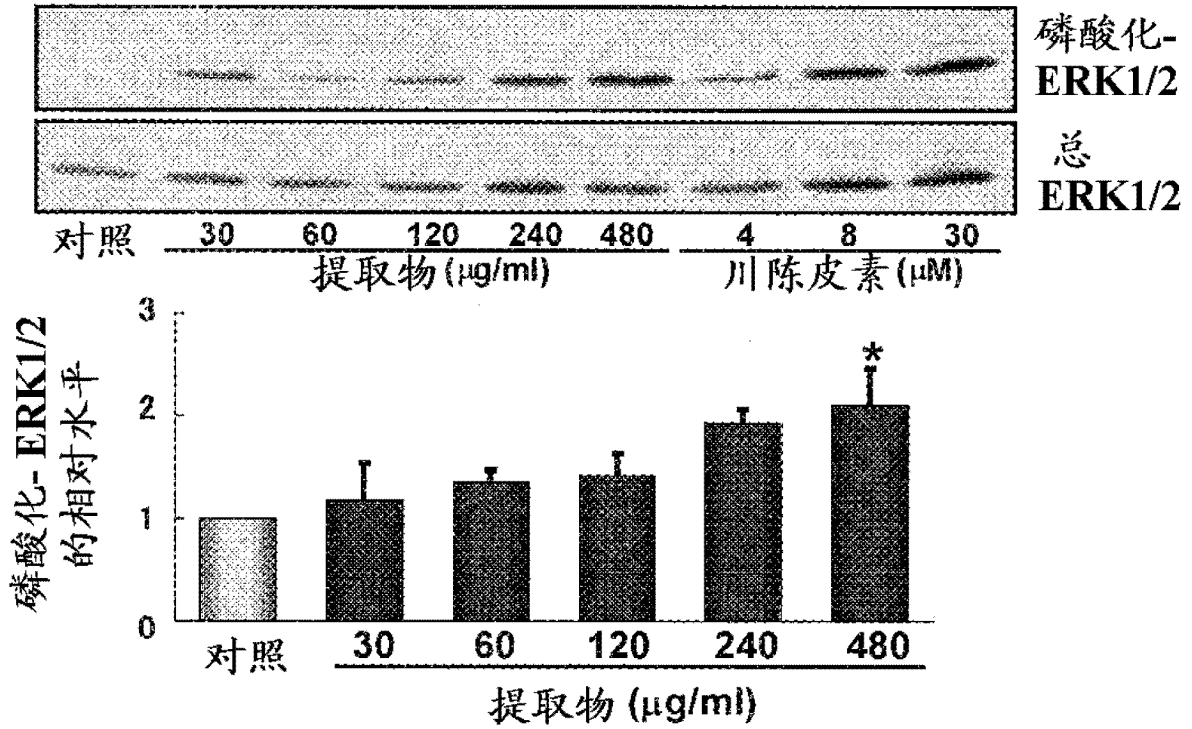


图 2C

陈皮提取物对初代培养大鼠海马神经细胞中的 MK801 介导的 PKA 信号传递抑制的作用

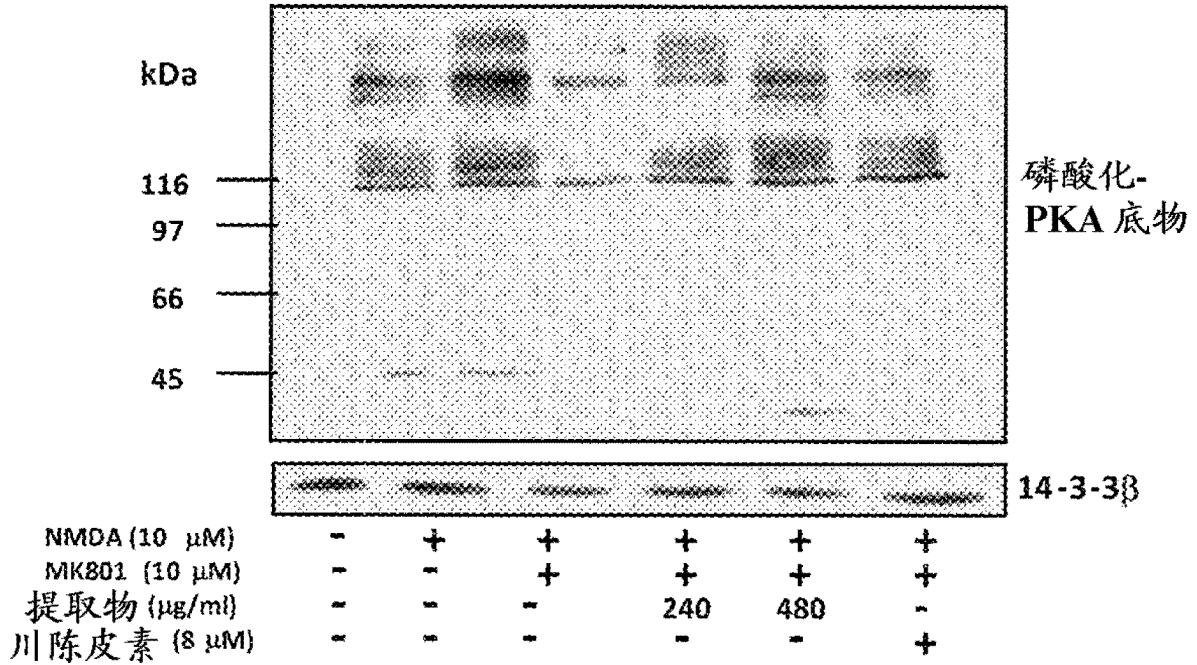


图 2D

陈皮提取物对初代培养大鼠海马神经细胞中的 MK801 介导的 ERK 信号传递抑制的作用

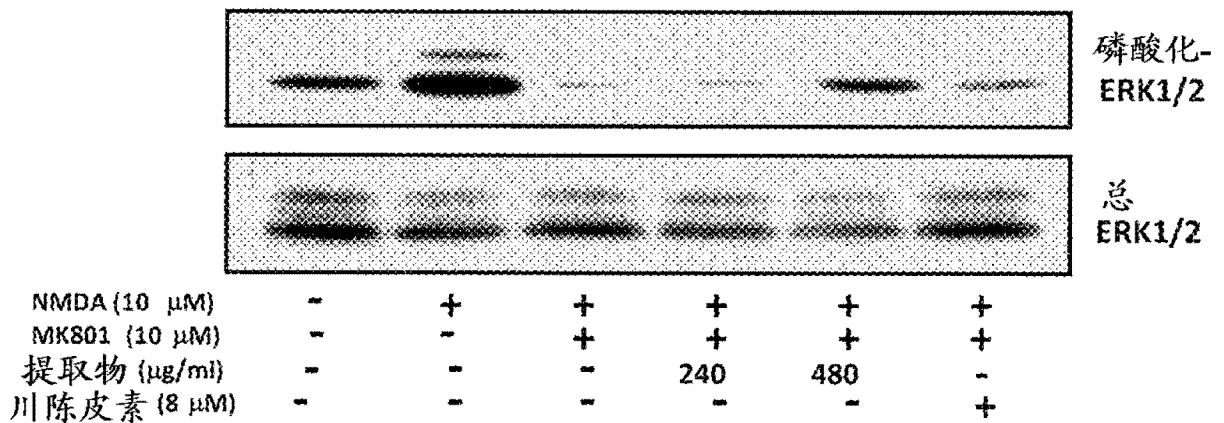


图 2E

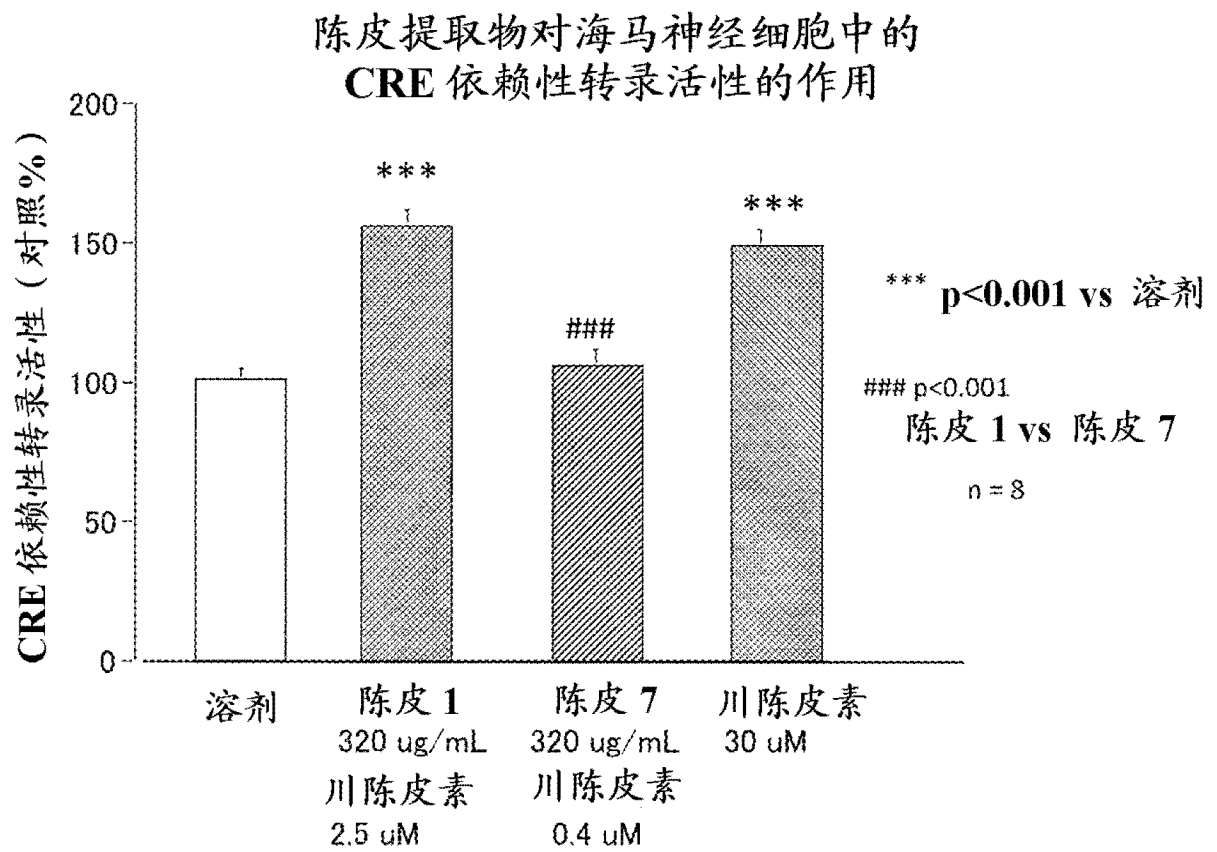


图 2F

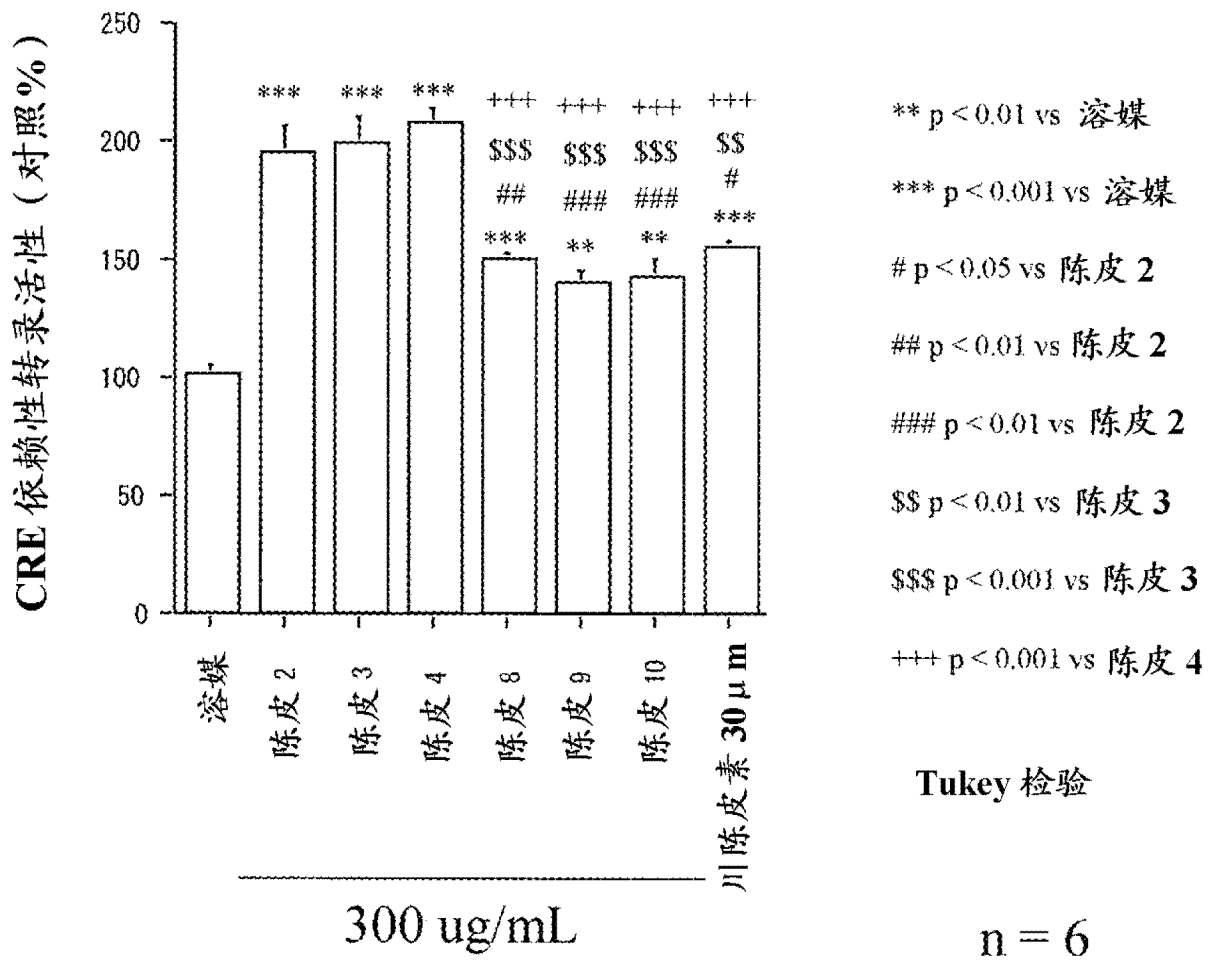


图 2G

慢性给予陈皮提取物对 MK801 诱发性记忆·学习障碍的作用

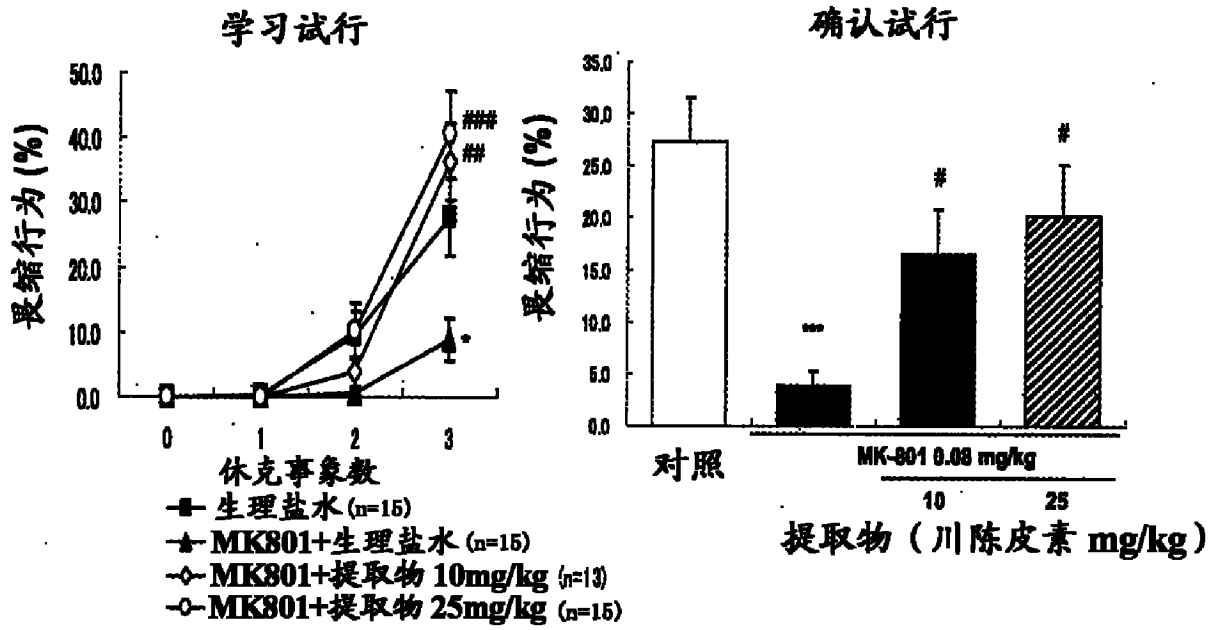


图 3A

慢性给予川陈皮素对 MK801 诱发性记忆·学习功能的作用

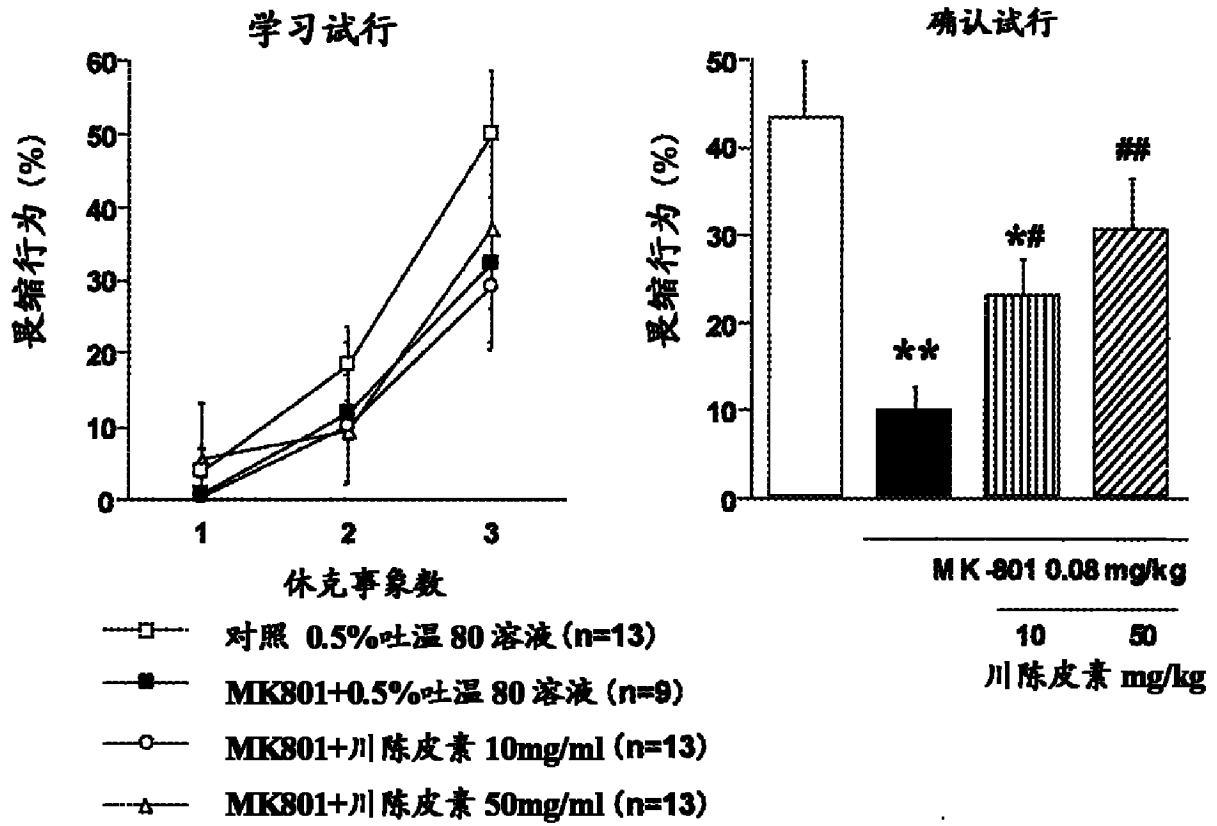


图 3B

陈皮提取物的促进 PC12D 细胞的 TH 转录活性的作用

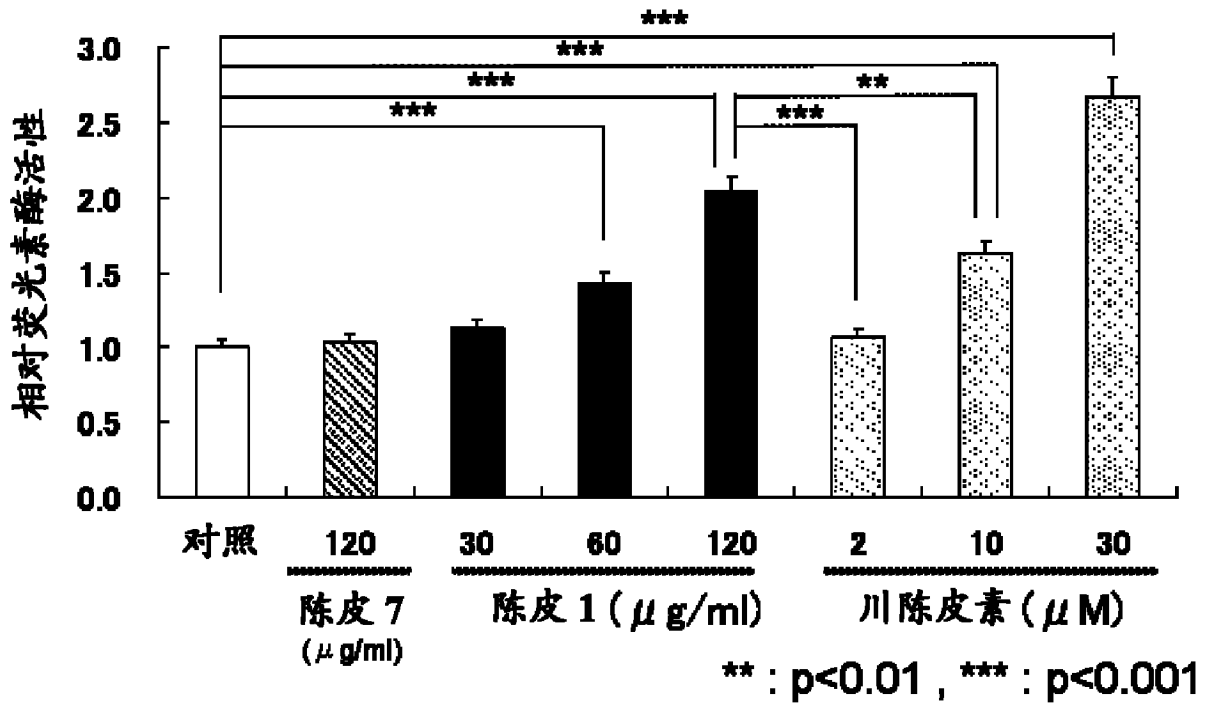


图 4A

陈皮提取物的提高 PC12D 细胞的 TH 表达量的作用

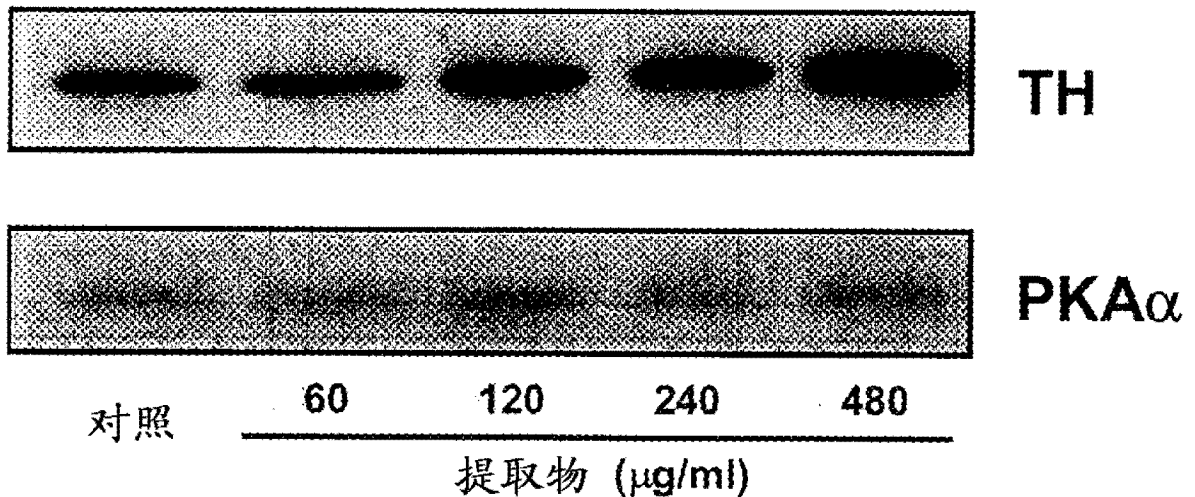


图 4B

陈皮提取物的提高 PC12D 细胞的多巴胺含量的作用

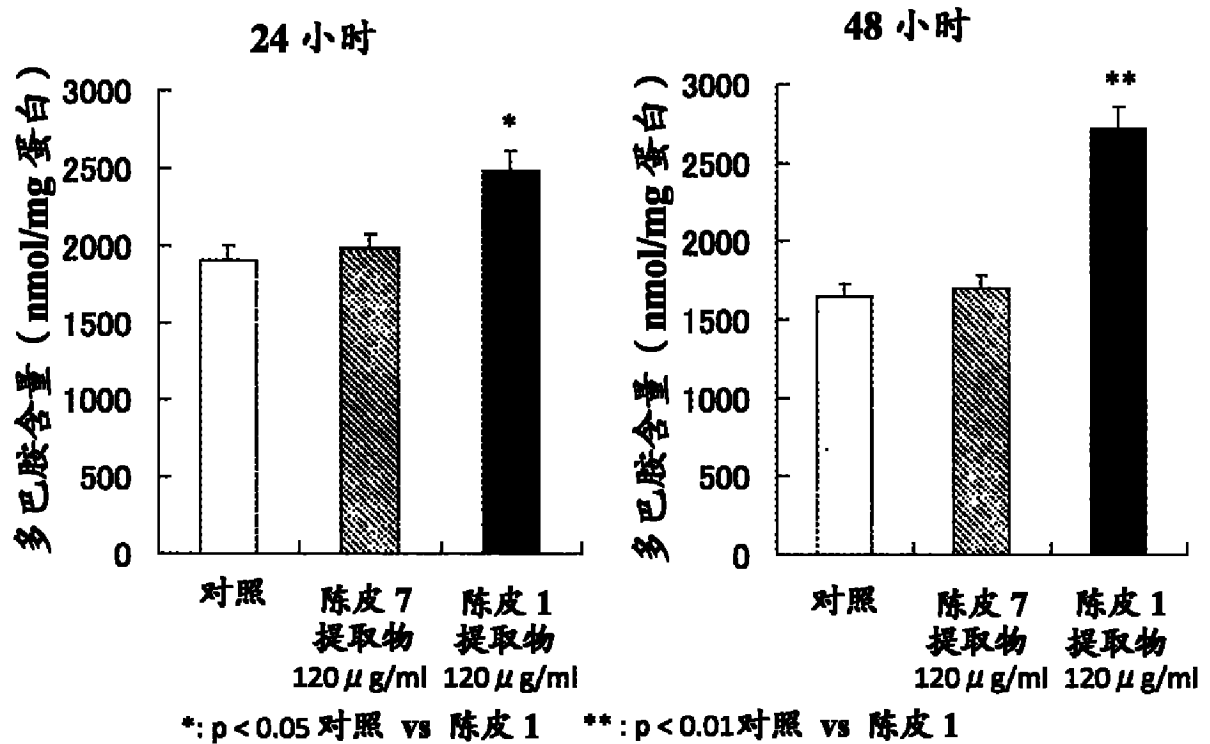
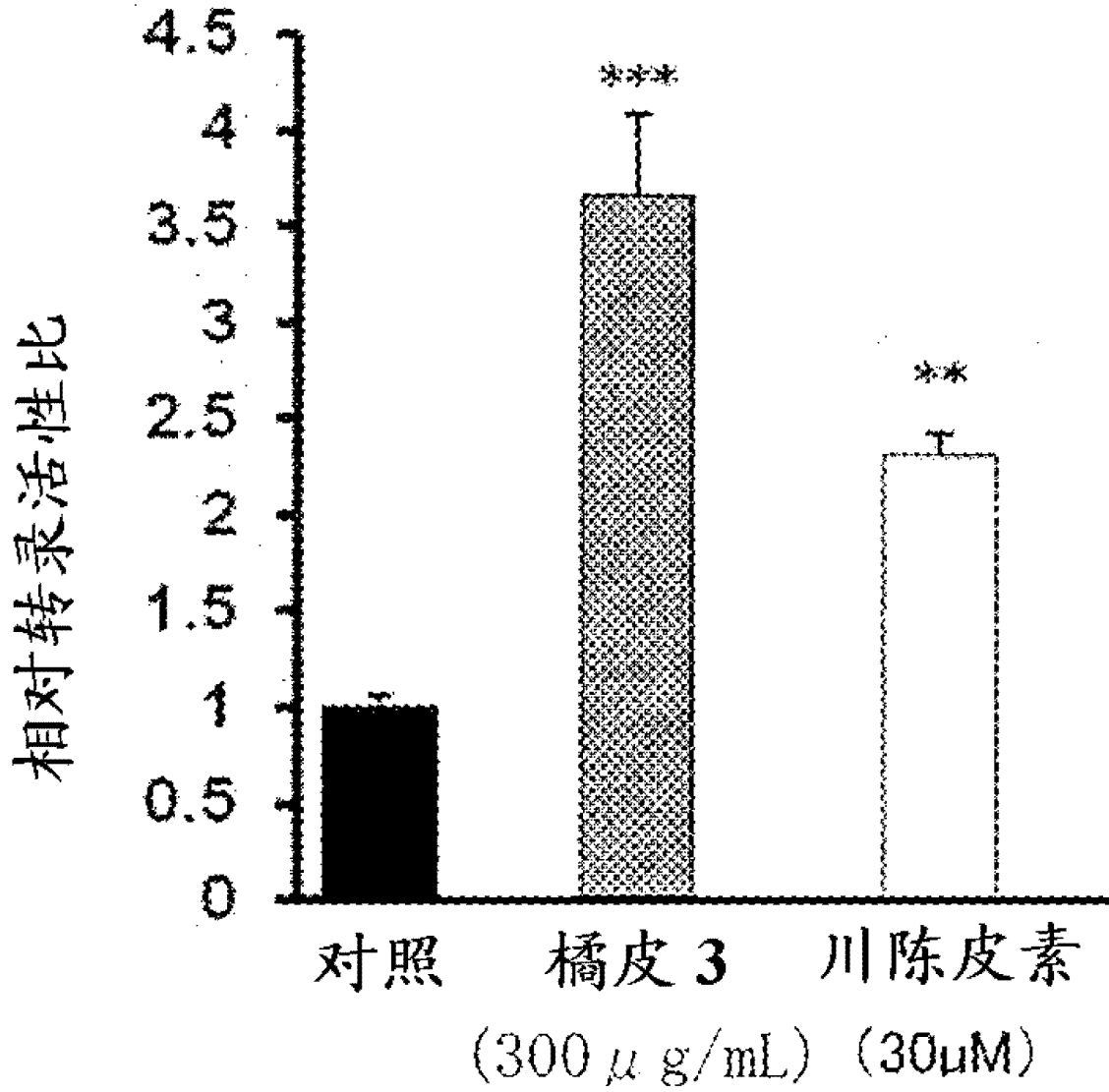


图 4C

海马细胞中橘皮提取物的 CRE 转录活性



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (对照和比较)

图 5A

橘皮提取物的学习促进效果

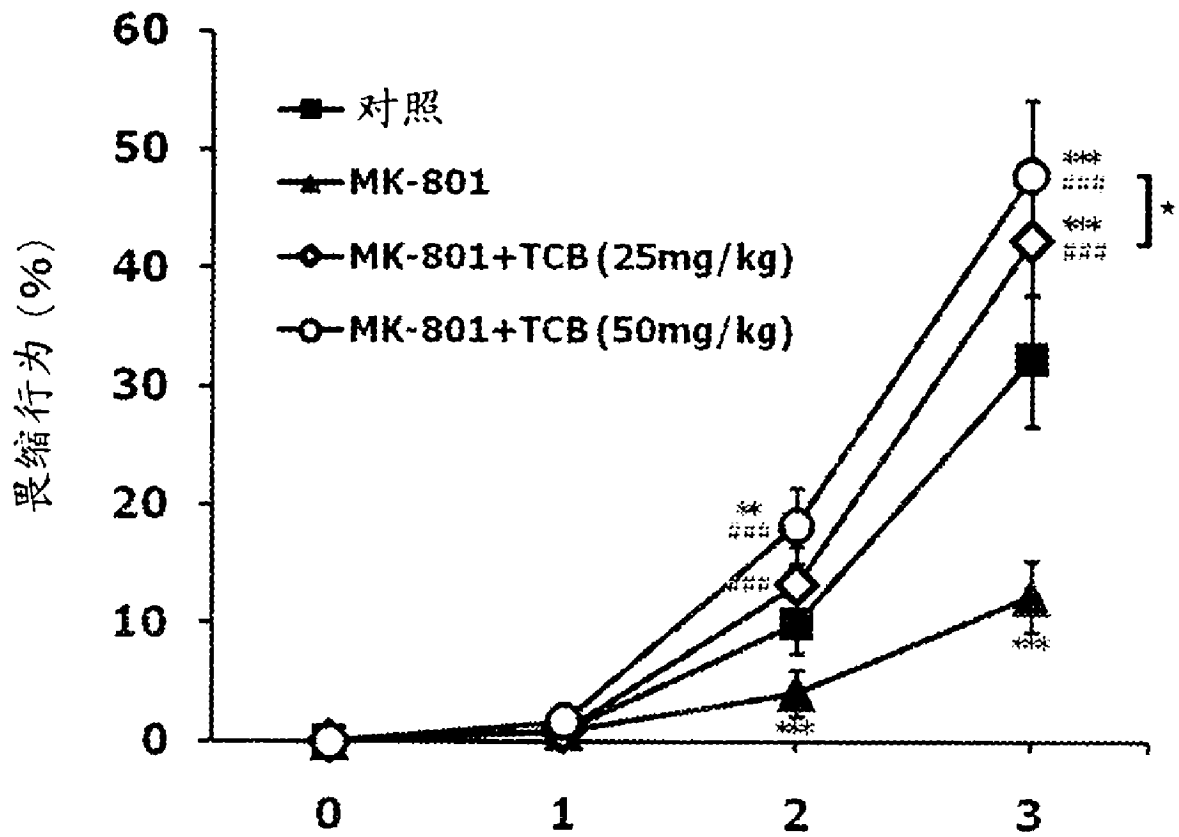


图 5B

橘皮提取物的记忆改善效果

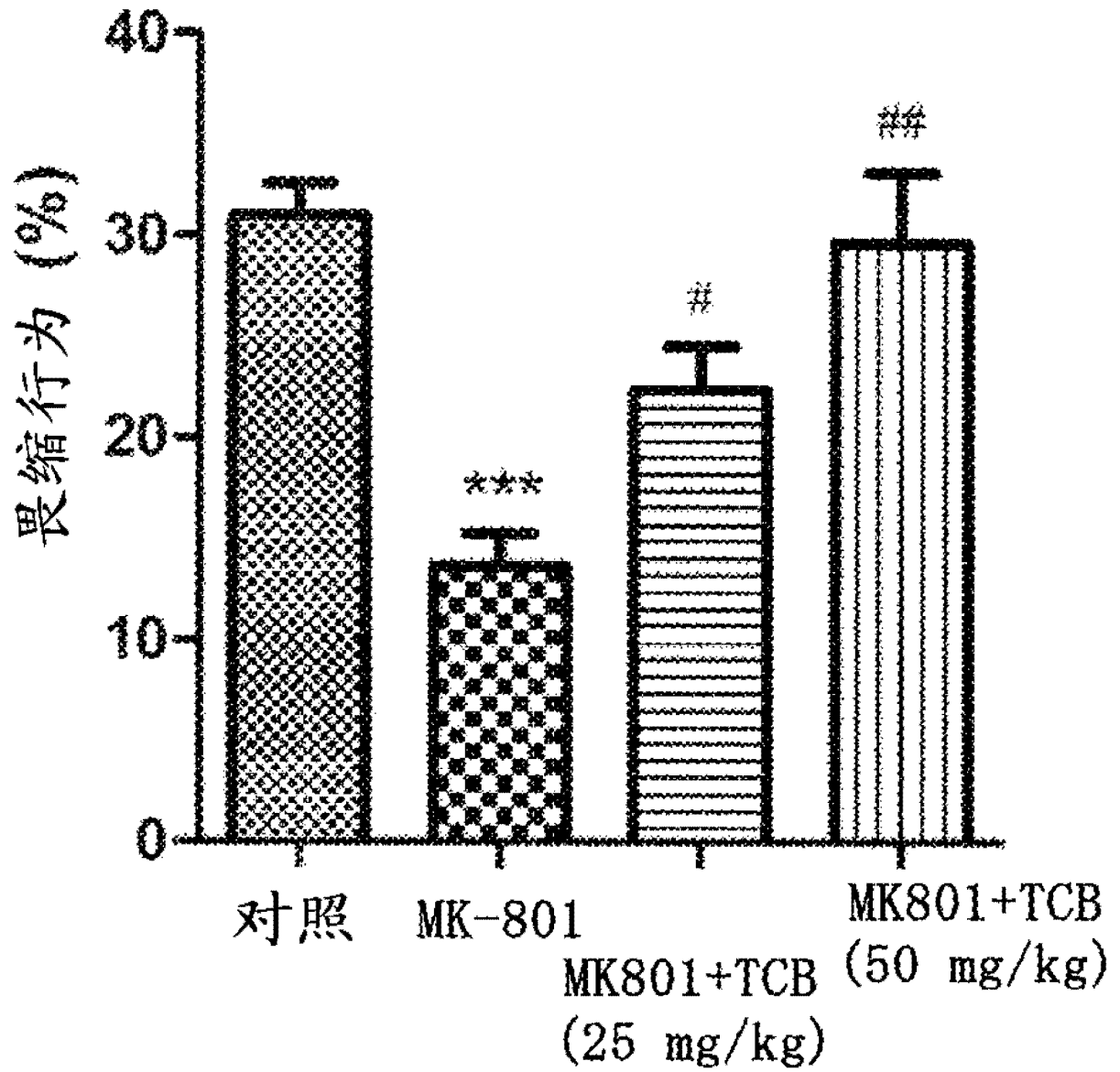


图 5C

PC12D 细胞中橘皮 提取物的 CRE 转录活性

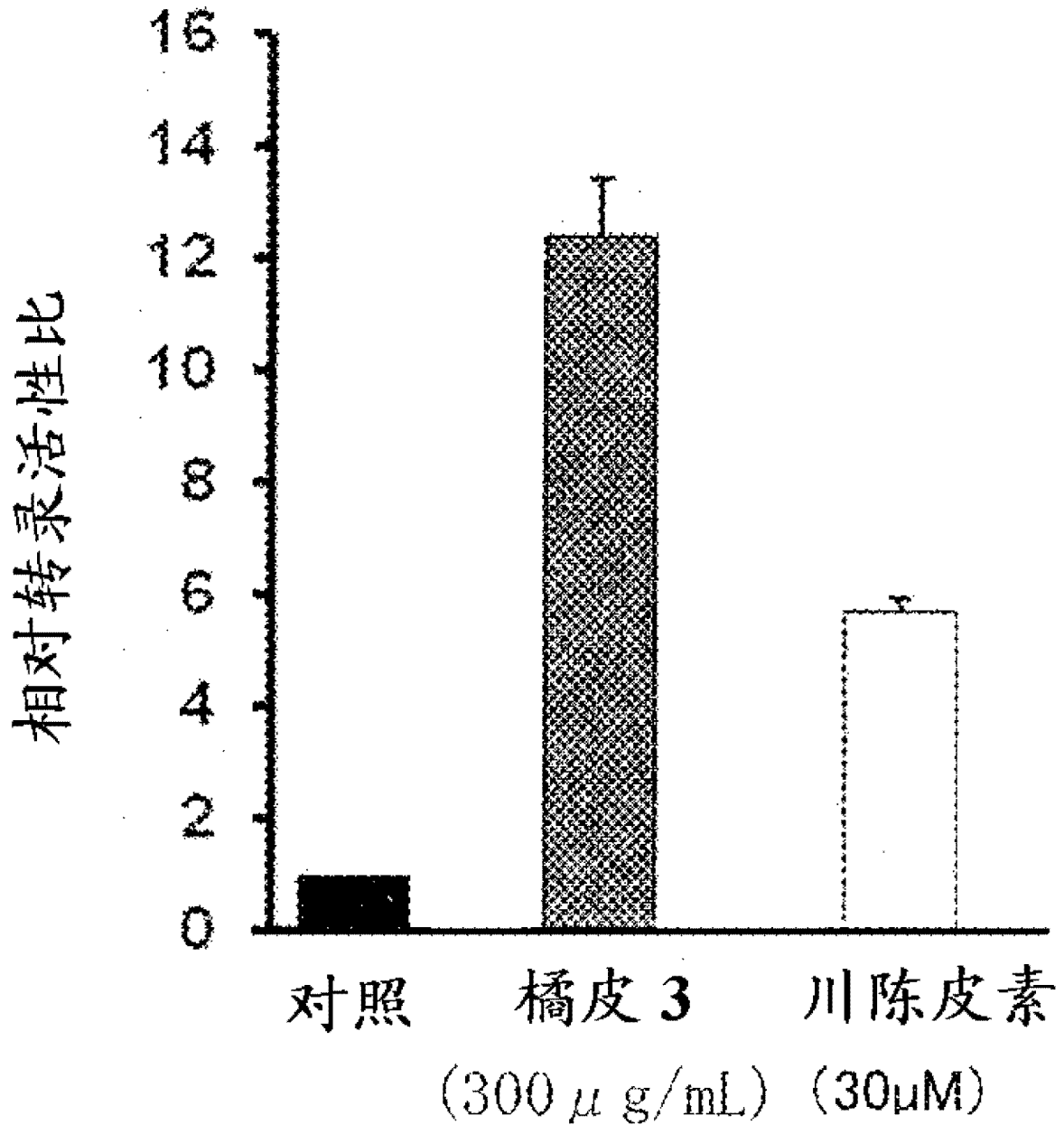


图 5D

PC12D 细胞中橘皮 提取物的 TH 转录活性

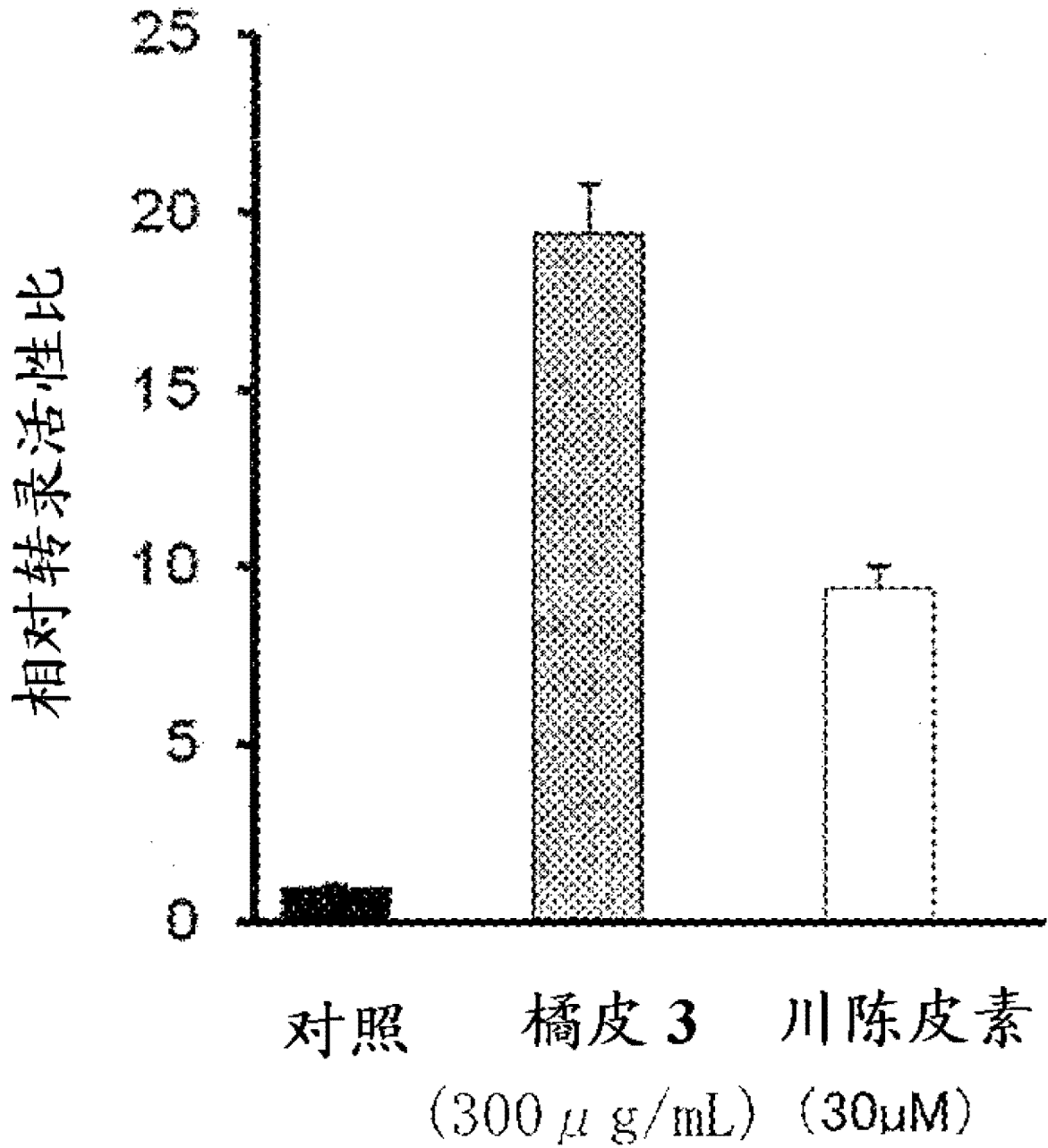


图 5E

橘皮提取物的提高 GCHI 表达量的效果

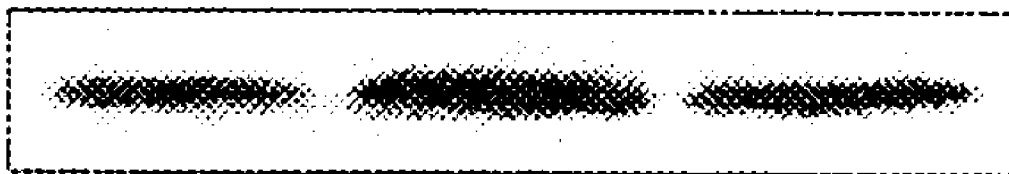
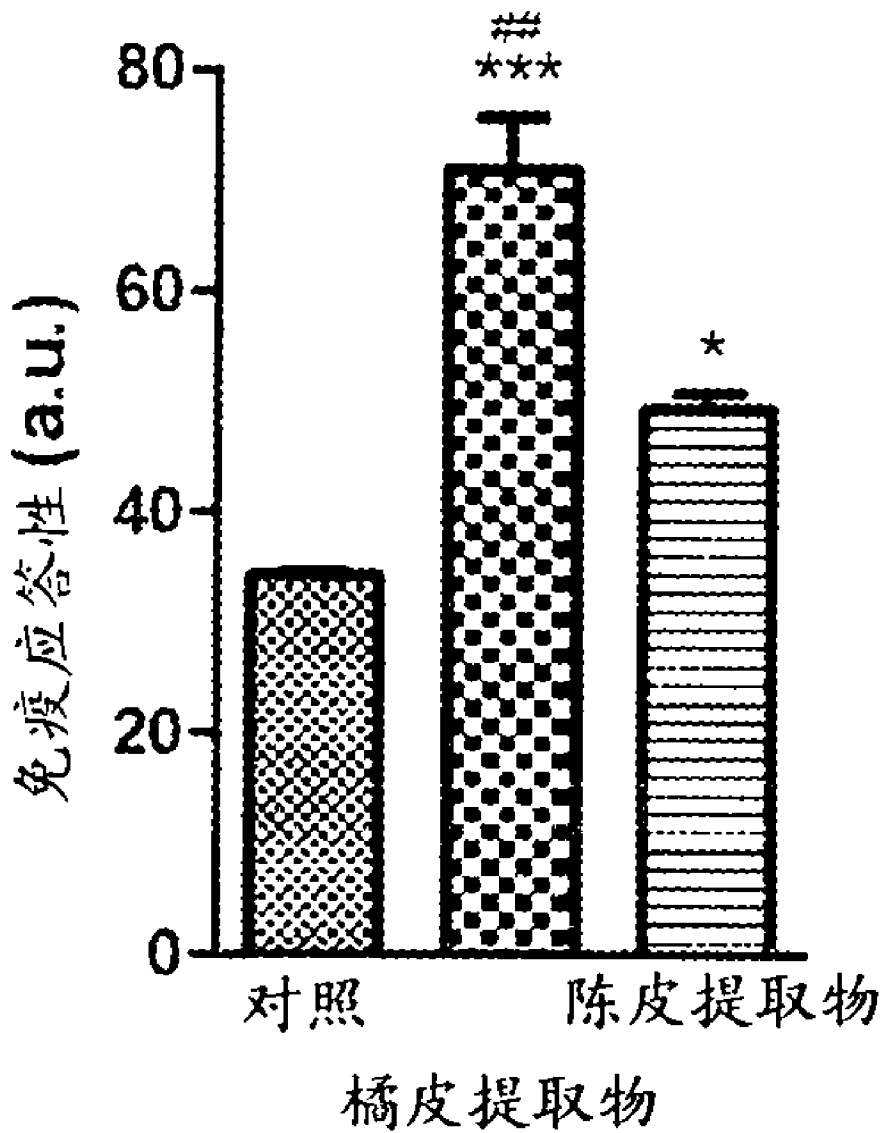


图 5F

海马细胞中来自立花桔叶的提取物的 CRE 转录活性

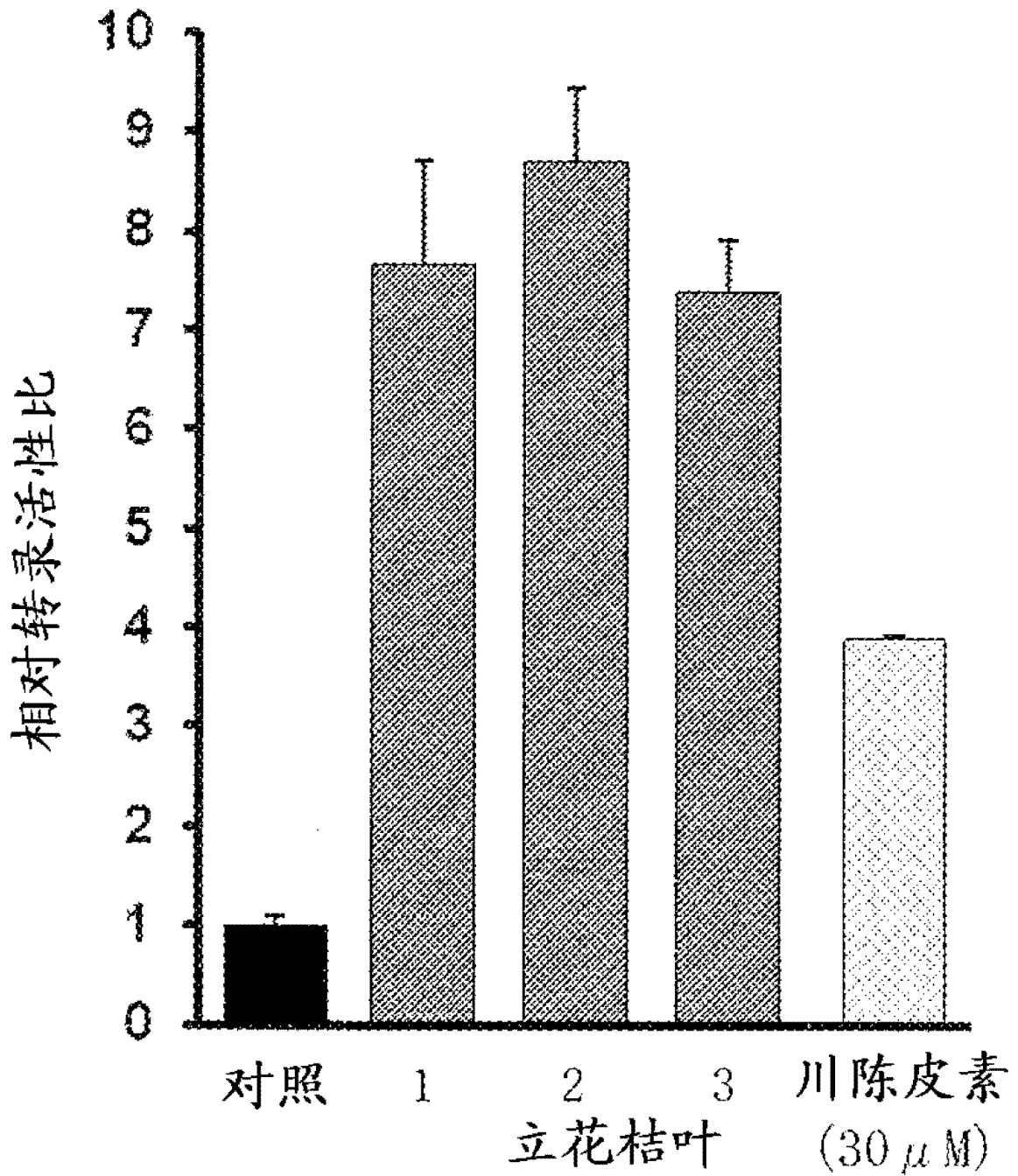


图 6A

PC12D 细胞中来自立花桔叶 的提取物的 CRE 转录活性

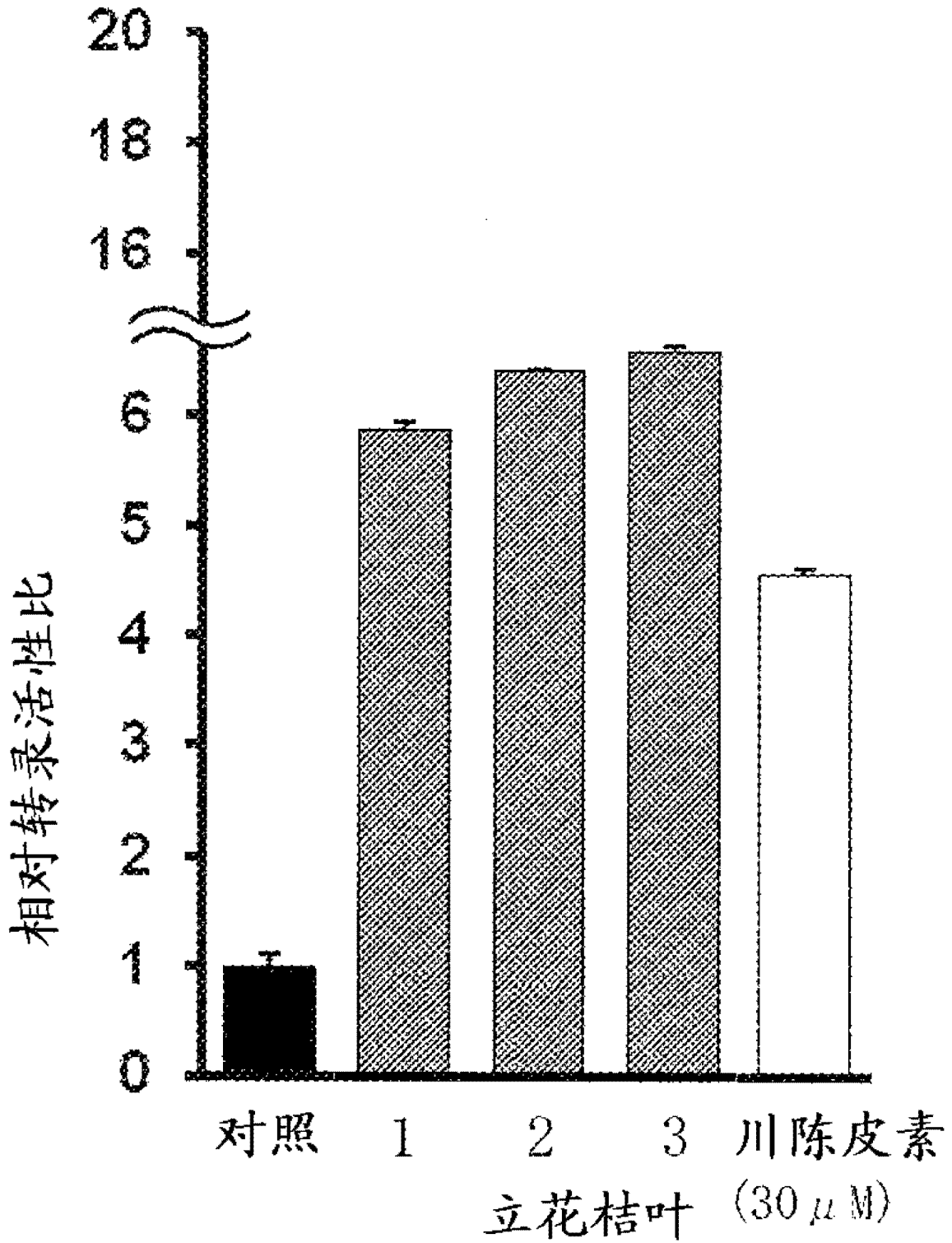


图 6B

海马神经细胞中的 CRE 转录活性

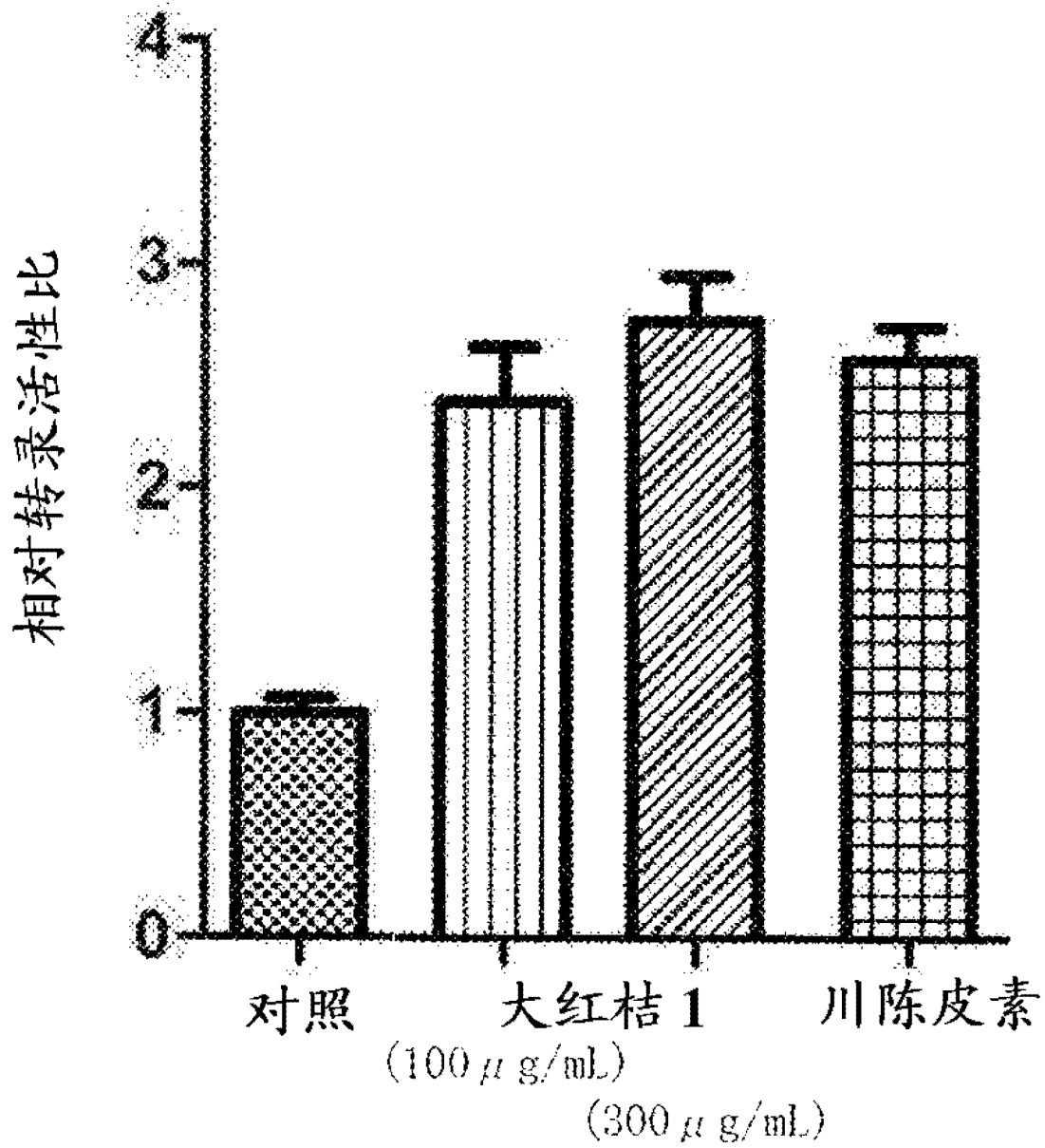


图 7A

PC12D 细胞中大红桔果皮提取物的 CRE 转录活性

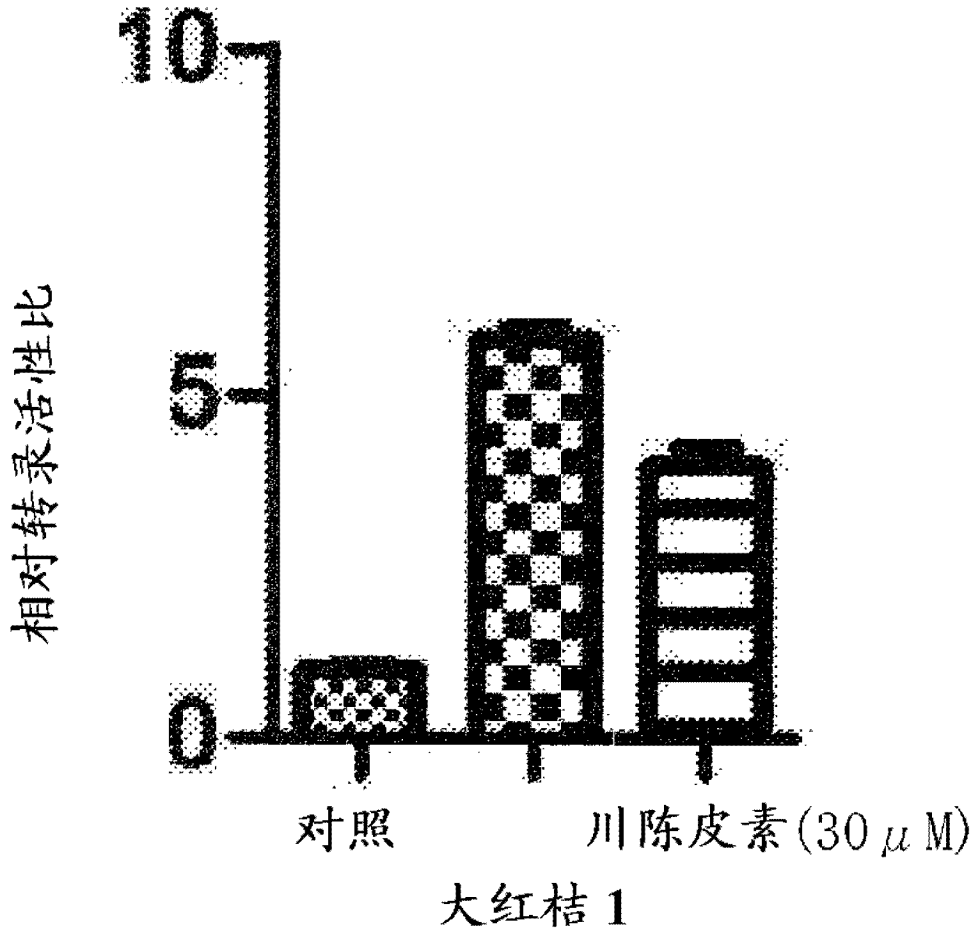


图 7B

PC12D 细胞中大红桔果皮的 提取物的 TH 转录活性

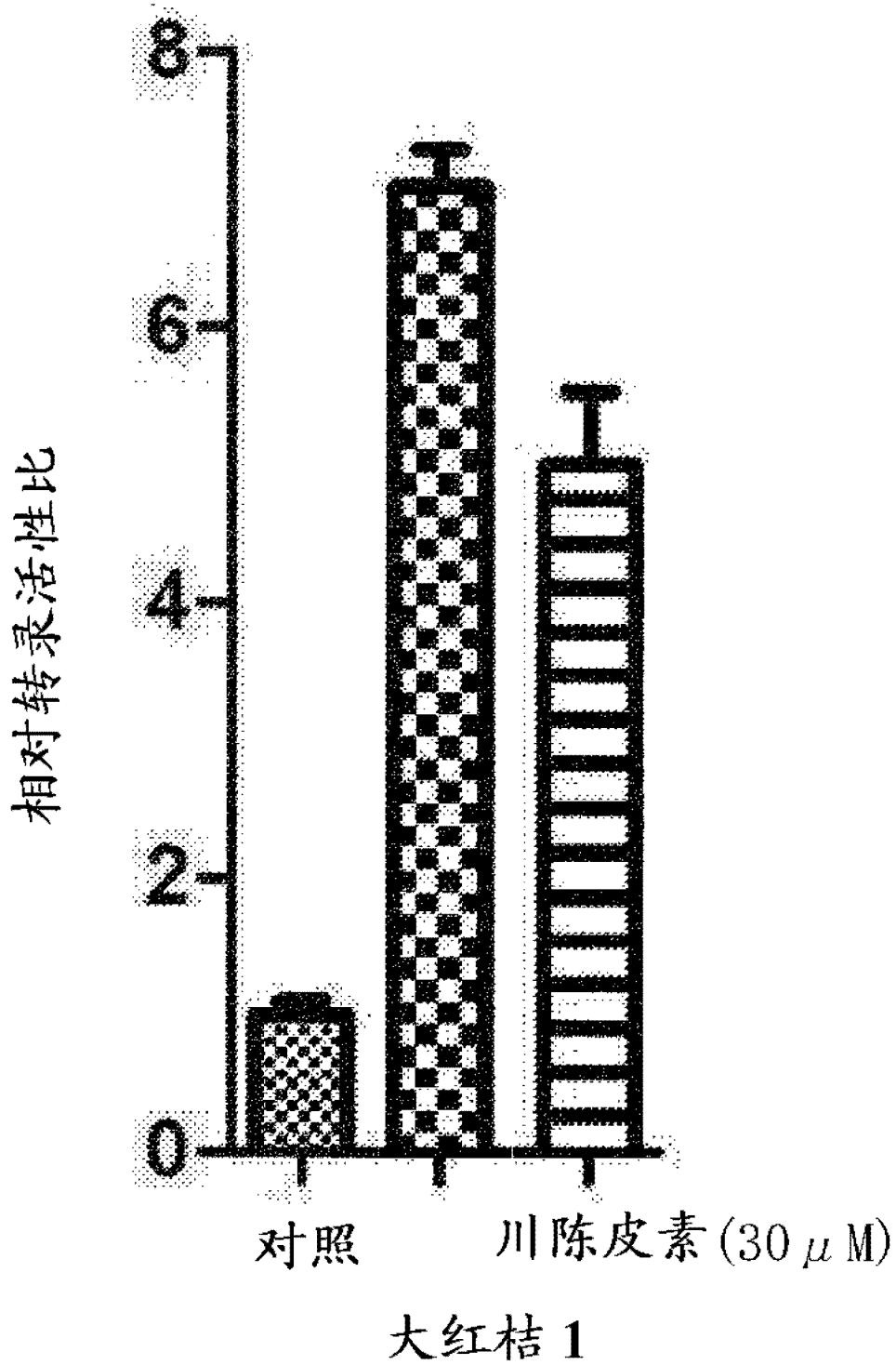


图 7C