

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2012 年 4 月 5 日 (05.04.2012)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2012/040938 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/336 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01) A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/077542
- (22) 国际申请日: 2010 年 9 月 30 日 (30.09.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 北京绿色金可生物技术股份有限公司 (BEIJING GINKGO GROUP BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院科海福林大厦三层, Beijing 100081 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 李艳梅 (LI, Yanmei) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院科海福林大厦三层, Beijing 100081 (CN)。 李良 (LI, Liang) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院科海福林大厦三层, Beijing 100081 (CN)。
- (74) 代理人: 北京市德恒律师事务所 (BEIJING DE-HENG LAW OFFICE); 中国北京市西城区金融街 19 号富凯大厦 B 座 12 层, Beijing 100140 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,

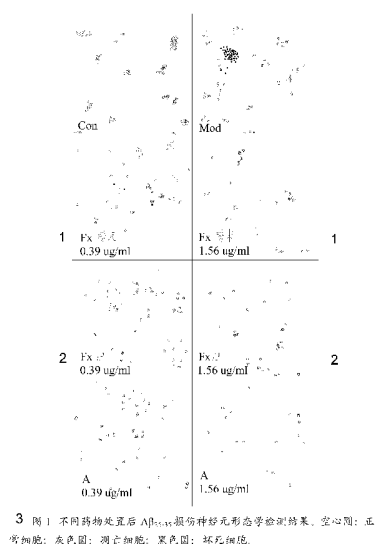
[见续页]

(54) Title: USE OF FUCOXANTHIN IN THE PREPARATION OF PRODUCT HAVING NEUROPROTECTIVE EFFECT ASSOCIATED WITH NEURODEGENERATIVE DISORDER AND IMPROVING MEMORY

(54) 发明名称: 岩藻黄素在制备与神经退行性疾病相关的神经保护作用以及改善记忆的产品中的应用

(57) Abstract: Use of fucoxanthin in the preparation of a product having neuroprotective effect associated with neurodegenerative disorder and improving memory is disclosed in the present invention. A product having neuroprotective effect associated with neurodegenerative disorder is also disclosed in the present invention. Fucoxanthin can inhibit oxidative stress of cells and has the effect of preventing or treating Alzheimer's disease and improving memory.

(57) 摘要:



3 图 1 不同药物处理后 Aβ₂₅₋₃₅ 损伤神经元形态学检测结果。空心圆: 正常细胞; 灰色圆: 凋亡细胞; 黑色圆: 坏死细胞。

1 POWDER
2 OIL
3 FIG 1 THE DETECTION RESULT OF INJURED NEURON MORPHOLOGY CAUSED BY Aβ₂₅₋₃₅ AFTER BEING TREATED WITH DIFFERENT MEDICAMENTS. HOLLOW ROUND: NORMAL CELLS; GREY ROUND: APOPTOTIC CELLS; BLACK ROUND: NECROTIC CELLS

本发明公开了岩藻黄素在制备与神经退行性疾病相关的神经保护作用以及改善记忆的产品中的应用。本发明还公开了一种用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品。本发明的岩藻黄素可抑制细胞的氧化应激, 具有预防或治疗阿尔茨海默病以及改善记忆的作用。

WO 2012/040938 A1



LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

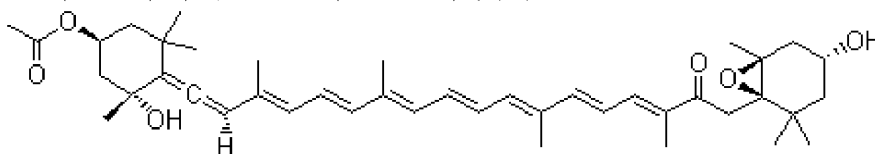
岩藻黄素在制备与神经退行性疾病相关的神经保护作用以及改善记忆的产品中的应用

技术领域

5 本发明涉及一种用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品，更具体的，本发明涉及岩藻黄素在改善记忆产品中的应用，以及岩藻黄素在与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品中的应用，所述神经退行性疾病包括如阿尔茨海默病、帕金森氏症以及亨廷顿舞蹈症等。

10 背景技术

天然类胡萝卜素，如 β -胡萝卜素、番茄红素、叶黄素、岩藻黄素，因其抗癌特性和卓越的清除自由基功能而被广泛研究。岩藻黄素（fucoxanthin）亦称褐藻素，来源于海带、马尾藻、墨角藻、鹅肠菜、囊藻、绳藻、裙带菜、巨藻、鹿角菜、海黍子、羊栖菜、海蒿子及硅藻等植物，尤以在褐藻中含量为丰。岩藻黄素分子式为 $C_{42}H_{58}O_6$ ，结构式如下：



岩藻黄素纯品是一种红褐色的结晶，是叶黄质的一种，是使褐藻类呈现出褐色的物质，也是褐藻类所特有的色素。岩藻黄素具有多种生理活性，对糖尿病人的血糖有较好的调控作用，对多种癌（乳腺癌，大肠癌，前列腺癌等）细胞有杀灭作用，同时也有很强的抗氧化功能，因此具有潜在的
20 开发利用价值。还有研究表明，岩藻黄素具有减肥功效。

有日本公开文献 2001-335480A 宣称岩藻黄素对脑缺血再灌注引起的大鼠胚胎神经细胞损伤具有抑制作用，对缺血再灌注造成的神经细胞具有保护活性。脑缺血再灌注损伤是指脑缺血一定时间恢复血液灌注后，脑组织细胞损伤反而加重，缺血性脑损伤包括缺血期原发性损伤和再灌注期继发性损伤，其病理过程始动环节是缺血，严重时会引起脑梗死。抑制再灌注损伤成为目前治疗缺血性脑卒中的关键环节。尽管日本专利证实岩藻黄素对脑缺血再灌注引起的大鼠胚胎神经细胞损伤具有抑制作用，并宣称其
25

神经保护活性，日本专利提到的脑缺血再灌注引起的神经细胞损伤，与进行性发展的神经退行性疾病是不相关的，针对的是病理性原因造成的神经损伤，与年龄不相关。

本发明主要论述的是岩藻黄素纯品及其提取物用于预防或治疗神经退行性病变方面的用途。所谓神经退行性疾病，尤其包括阿尔茨海默病（老年痴呆症），临床表现为认知和记忆功能不断恶化，日常生活能力进行性减退，并有各种神经精神症状和行为障碍的疾病。神经退行性疾病，主要随着年龄的增长，与衰老有关的疾病。因此本发明针对的是因年龄和衰老导致的神经退行性疾病相关的神经保护作用。

神经退行性疾病是指由遗传因素或环境因素诱发的慢性、长程神经细胞衰亡疾病，包括阿尔茨海默病（Alzheimer's Disease, AD）（也称老年痴呆），帕金森病和亨廷顿舞蹈症等。伴随着人口老龄化时代的到来，神经退行性疾病已经成为影响中老年人群的健康的主要因素之一，并给社会带来巨大的经济负担和社会负担，而 AD 是发病率最高的神经退行性疾病。流行病学的调查显示，在 60 岁以上人群 AD 的患病率为 1%，而在 85 岁人群的患病率为 30%。据估计，AD 病人的治疗费用惊人，每年支出共计 839 亿美元左右，并呈逐年上升趋势。

AD 的临床表现为认知和记忆功能不断恶化，日常生活能力进行性减退，并有各种神经精神症状和行为障碍。研究表明，老年斑是 AD 的主要病理特征之一，而 β -淀粉样蛋白（ β -Amyloid, $A\beta$ ）是老年斑的重要成分。目前， $A\beta$ 沉积诱发氧化应激从而导致神经细胞损伤是公认的 AD 的主要发病学说。 $A\beta$ 在大脑的过量生成和集聚、沉积，可以引起细胞内离子超载，导致细胞内环境失衡，促进氧自由基（ROS）和丙二醛（MDA）等的产生，引起氧化应激反应，使细胞内抗氧化因子如超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-PX）和总抗氧化能力（T-AOC）等水平降低，从而引起神经元特别是与记忆相关神经元的变性，甚至坏死，诱发 AD 发生。此外 AD 的发病假说还有：tau 蛋白异常、重金属、血管因子或病毒感染等。AD 的受损脑区主要包括大脑皮质、基底前脑、海马等与学习记忆功能相关的脑区。

目前, A β 诱导大鼠皮质神经细胞损伤模型成为已研究抗 AD 产品的重要模型, 由于该模型以原代培养的神经元为标本, 既具有体外实验的靶向性, 更兼具体内实验的遗传稳定性, 因而是抗 AD 产品的筛选、研发的有力工具, 可明确证实产品是否具备抗 AD 及改善记忆作用。

5 临床上对 AD 的治疗主要包括: 抗淀粉样蛋白的治疗、神经保护疗法、抗氧化剂、美金刚、抗炎药物、激素补充疗法、胆碱酯酶抑制剂等。但截至目前, 上述疗法只能通过暂时改善和减慢认知功能的衰退速度而减轻病人的症状, 并不能消除病因而彻底治愈该病。因此, 寻找治疗 AD 的有效药物迫在眉睫, 而全世界的科研院所和高端药物企业也为此投入大量人、
10 财、物力。

近年来, 由于“回归自然”已成为人类的共识, 所以从天然和海洋植物中寻找有效的治疗疾病的药物吸引了科学家和研发企业的兴趣, 并获得了重大进展。因此, 从天然和海洋植物中寻找有效的治疗 AD 的药物, 可能会对 AD 的治疗带来曙光, 并且由于已经发现了大量的针对 AD 的分子水
15 平的治疗靶点, 因而我们有理由相信可以找到显著延缓并治疗 AD 的天然或海洋植物成分, 从而起到改善记忆暨预防和治疗神经推行性疾病等功效。

我们在寻找预防、治疗 AD 及改善记忆力的药品或食品时, 发现岩藻黄素对 A β 诱导大鼠皮质神经细胞损伤模型有改善作用, 可抑制该细胞模型的氧化应激, 证明岩藻黄素具有与神经退行性疾病相关的神经保护作用。

20

发明内容

本发明采用 A β 的活性片段 A β 25-35 诱导与记忆密切相关的原代皮层神经细胞为模型, 探讨岩藻黄素的抗 AD 活性。通过检测细胞存活率 (MTT)、细胞形态学、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶
25 (GSH-PX)、总抗氧化能力 (T-AOC)、丙二醛 (MDA) 等指标来评价岩藻黄素的抗 AD 活性。超氧化物歧化酶 (SOD) 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用, 此酶能够清除超氧阴离子自由基, 保护细胞免受损伤, 其活力高低间接反映机体清除氧自由基的能力。谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 是体内一种重要的催化过氧化氢分解的酶, 起到保护细胞

膜结构和功能完整性的作用。总抗氧化能力 (T-AOC) 测定可以评价体系中总抗氧化物质抗氧化能力的高低。丙二醛 (MDA) 的量反映机体内脂质过氧化物的程度, 可以间接反映出细胞受自由基攻击的损伤程度。细胞形态学观察采用 Hoechst/PI 双染实验: PI、Hoechst33342 均可与细胞核 DNA (或 RNA) 结合。但是 PI 不能通过正常的细胞膜, Hoechst 则为膜通透性的荧光染料, 故细胞在处于坏死或晚期凋亡时细胞膜被破坏, 这时为 PI 着红色。正常细胞和中早期凋亡细胞均可被 Hoechst 着蓝色, 但凋亡细胞的核由于浓集而呈亮蓝色, 由着色不同即可分辨出正常 (蓝色)、凋亡 (亮蓝色) 以及坏死细胞 (红色), 但由于说明书附图无法表现出色彩, 被空心圆 (蓝色)、灰色圆 (亮蓝色) 和黑色圆 (红色) 代替。

我们在研究中发现, 岩藻黄素纯品 A, 岩藻黄素粗提物粉末 Fx-powder 和油 Fx-oil 均能够显著提高 A β 25-35 诱导的大鼠大脑皮质神经元细胞模型的存活率, 具有与神经退行性疾病相关的神经保护作用; 对 A β 25-35 诱导的大鼠大脑皮质神经元细胞模型培养液中神经元 SOD 活力均具有一定的提高作用; 逆转 A β 25-35 损伤神经元的导致 GSH-PX 活力的显著下降; 逆转 A β 25-35 所致神经元损伤引起的总抗氧化能力 T-AOC 显著下降; 显著降低 A β 25-35 所致损伤神经元培养液中 MDA 的含量。并显示出一定的剂量依赖性, 呈现出随药物浓度增高 SOD 活力增强的趋势; 综合以上 4 个氧化损伤相关指标的检测, 结果显示 Fx-powder 和 Fx-oil 能够都具有一定的抗氧化损伤的作用, 表现在实验体系中清除过氧化物相关酶活性和总抗氧化能力的增强以及过氧化损伤产物的减少。细胞形态学检测结果表明, 不同浓度下, Fx-powder 和 Fx-oil 抑制细胞凋亡和细胞坏死发生。其岩藻黄素粗提物 Fx-01 粉和 Fx-01 油均具有一定的, 与神经退行性疾病相关的神经保护作用, 可能具有改善记忆活性。

动物实验结果显示, 在跳台试验和避暗试验中, 给含岩藻黄素组动物记忆获得的错误反应潜伏期延长, 错误次数、错误反应率降低, 与空白对照组比较, 差异具显著性。且训练及重复测验结果一致。表明岩藻黄素具有改善记忆的功能。岩藻黄素作为保健品, 在增进健康及预防疾病方面能起到很重要的作用, 主要包括增进大脑发育及记忆力方面, 具有广阔的前景。

本发明涉及到岩藻黄素用于改善记忆以及与神经退行性疾病相关的神经保护作用新用途,岩藻黄素可以用于神经退行性疾病相关的神经保护作用。

根据本发明的岩藻黄素在用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用产品中的用途,其中,所述产品包括食品、保健品和药品。

5 根据本发明的岩藻黄素用途,其中,所述神经退行性疾病包括阿尔茨海默病,帕金森氏症,亨廷顿舞蹈症。

根据本发明的岩藻黄素用途,其中,所述产品进一步包括改善记忆力的作用。岩藻黄素用于改善由神经退行性疾病引起的记忆损伤,如由阿尔茨海默病,帕金森氏症,亨廷顿舞蹈症等疾病引起的记忆衰退或损伤。

10 根据本发明的岩藻黄素用途,其中,所述含岩藻黄素产品的剂型选自由散剂、口服液、片剂、胶囊剂、颗粒剂及丸剂组成的组中的至少一种。

根据本发明的岩藻黄素用途,其中,所述岩藻黄素来源包括植物来源、微生物来源、或合成的化合物来源。

根据本发明的岩藻黄素用途,其中,所述岩藻黄素的植物来源是海藻。

15 根据本发明的岩藻黄素用途,其中,所述海藻选自海带、马尾藻、墨角藻、鹅肠菜、囊藻、绳藻、裙带菜、巨藻、鹿角菜、海黍子、羊栖菜、海蒿子和硅藻组成的组。

根据本发明的岩藻黄素用途,其中,所述岩藻黄素含量在 0.0001%-60% 之间,即所述岩藻黄素含量可以在 0.0001%-10%之间,5%-15 之间,10%-20% 之间,15%-25%之间,也可以在 25%-35%之间,40%-50%之间,50%-60%之间。
20 更为优选的,根据本发明的用途,其中,所述岩藻黄素含量在 0.0001%-10% 之间。

根据本发明的岩藻黄素的用途,其中,所述岩藻黄素在岩藻黄素提取物中的含量在 90-100%之间。

25 根据本发明的岩藻黄素的用途,其中,所述岩藻黄素在岩藻黄素提取物中的含量在 95-100%之间。

根据本发明的岩藻黄素用途,其中,所述岩藻黄素所制成的药品包括片剂,胶囊,微丸的形式。

根据本发明的岩藻黄素用途,其中,受试对象每日服用的岩藻黄素有

效成分为 0.001 mg-20 mg, 即受试对象每日服用岩藻黄素有效成分可以在 2 mg-8 mg 之间, 4 mg-9 mg 之间, 也可以在 10 mg-15 mg 之间, 15 mg-20 mg 之间。根据本发明的用途, 其中, 受试对象每日服用的岩藻黄素有效成分为 0.001-10 mg。

5 根据本发明的岩藻黄素用途, 其中, 所述产品含具有有效保护神经退行性疾病相关的疾病的剂量的岩藻黄素。

根据本发明的一种与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述产品中含有岩藻黄素。

10 根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用产品, 其中, 所述产品包括食品、保健品和药品。

根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述含岩藻黄素产品的剂型选自由散剂、口服液、片剂、胶囊剂、颗粒剂及丸剂组成的组中的至少一种。

15 根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述岩藻黄素来源包括植物来源、微生物来源、或合成的化合物来源。

根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述与神经退行性疾病包括阿尔茨海默病, 帕金森氏症, 亨廷顿舞蹈症。

根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述含岩藻黄素的产品, 还包括天然提取物。

20 根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述天然提取物, 是选自银杏提取物, 二十二碳六烯酸(DHA), 磷脂酰丝氨酸, 卵磷脂, 鱼油, Omega-3, 共轭亚油酸组成的组。

根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述岩藻黄素的植物来源是海藻。

25 根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述海藻选自海带、马尾藻、墨角藻、鹅肠菜、囊藻、绳藻、裙带菜、巨藻、鹿角菜、海黍子、羊栖菜、海蒿子和硅藻组成的组。

根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述岩藻黄素含量在 0.0001%-60%之间, 即所述岩藻黄素含量可以在

0.0001%-10%之间, 5%-15 之间, 10%-20%之间, 15%-25%之间, 也可以在 25%-35%之间, 40%-50%之间, 50%-60%之间。更为优选的, 根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述岩藻黄素含量在 0.0001%-10%之间。

5 根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中所述岩藻黄素在岩藻黄素提取物中的含量在 90-100%之间。

根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中所述岩藻黄素在岩藻黄素提取物中的含量在 95-100%之间。

根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 受
10 试对象每日服用岩藻黄素有效成分为 0.001 mg-20 mg, 即受试对象每日服用岩藻黄素有效成分可以在 2 mg-8 mg 之间, 4 mg-9 mg 之间, 也可以在 10 mg-15 mg 之间, 15 mg-20 mg 之间。

根据本发明的与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 受试对象每日服用岩藻黄素有效成分为 0.001 mg-10 mg。

15 根据本发明的产品在改善记忆力方面的用途。本产品改善由神经退行性疾病引起的记忆损伤, 如由阿尔茨海默病, 帕金森氏症, 亨廷顿舞蹈症等疾病引起的记忆衰退或损伤。

根据本发明的实施例, 本发明的产品在改善记忆力方面同样具有明显效果, 在本发明一个实施例中动物实验结果显示, 在跳台试验和避暗试验
20 中, 给含岩藻黄素组动物记忆获得的错误反应潜伏期延长, 错误次数、错误反应率降低, 与空白对照组比较, 差异具显著性, 表明岩藻黄素具有显著改善记忆的功能。因此, 岩藻黄素可以作为改善记忆的用途, 可以以岩藻黄素纯品的形式, 也可以以岩藻黄素提取物的形式, 高含量岩藻黄素的形式, 以及这些形式的岩藻黄素和其他原料组成的配方形式。岩藻黄素作为保健
25 品, 在增进健康及预防和治疗神经退行性疾病相关的神经疾病方面能起到很重要的作用, 主要包括增进大脑发育及记忆力方面, 用途非常广泛。

下面将通过具体的示例来验证本发明中的岩藻黄素用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用, 尤其是抗 AD 和改善记忆的作用, 以及岩藻黄素可以用来与神经退行性疾病相关的神经保护作用的新用途, 以及含岩藻黄素

与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品。

附图说明

图 1 不同药物处置后 A β ₂₅₋₃₅ 损伤神经元形态学检测结果。空心圆：

5 正常细胞；灰色圆：凋亡细胞；黑色圆：坏死细胞。

具体实施方式

以下通过具体实验说明本发明岩藻黄素用于改善记忆方面的用途，通过以 β 淀粉样肽 (A β ₂₅₋₃₅) 诱导的大鼠大脑皮质神经元细胞为模型，检测
10 对照品 A(岩藻黄素纯品)以及其粗提物 Fx-01 粉(岩藻黄素粉末 Fx-powder)和 Fx-01 油(岩藻黄素油 Fx-oil)的神经保护作用，以评价岩藻黄素的抗 β 淀粉样肽 (A β ₂₅₋₃₅) 致细胞损伤的潜在功效。下面提到的岩藻黄素纯品 A，岩藻黄素提取物，岩藻黄素粉末，岩藻黄素油的制备方法有很多，在这里只各举一个例子，作为说明。

15 岩藻黄素纯品 A 的制备方法：将含有 1 克岩藻黄素提取物的样品溶解于正己烷溶液，通过填充 50 克硅胶的层析柱，用正己烷和乙酸乙酯 98:2, 95:5, 90:10, 85:15 逐渐洗脱硅胶柱，薄层层析监控，硫酸乙醇溶液喷雾显色，纯度相同的流份合并，液相检测得到 98% 的岩藻黄素纯品。

岩藻黄素粉末的制备方法：参见 JP2009-261647 和 US12/619,474

20 岩藻黄素油的制备方法：将岩藻黄素提取物或者岩藻黄素纯品加入食用油，搅拌均匀，使产品中的岩藻黄素含量在需要的范围之内。

实施例 1 体外药理实验

(一)实验材料与方法

1 材料

25 1.1 动物

出生 0-4 天 SD 大鼠的乳鼠，购自北京大学医学部实验动物科学部，实验动物许可证号：SCXK(京)2006-0025。

1.2 试剂

A β ₂₅₋₃₅、MTT 均购自 Sigma 公司；总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂
30 盒、微量丙二醛 (MDA) 测试盒、谷胱甘肽-过氧化物酶 (GSH-PX) 测试

盒、SOD 测试盒均购自南京建成生物工程研究所；细胞凋亡荧光 Hoechst33342/PI 双染试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

2 方法

2.1 大鼠大脑皮质神经元细胞原代培养

1) 将1-4日龄大鼠乳鼠处死，置75%酒精泡2-3秒，放入无菌培养皿中。取脑，放入装有冷D-Hanks 液的无菌培养皿，剔除脑膜和血管，分离出大脑皮层。

2) 将分离出来的组织置于一个含有适量0.125%胰蛋白酶消化液的无菌培养皿中，剪碎组织成约0.5 mm × 0.5 mm × 0.5 mm大小，室温放置5分钟。

3) 将组织块转入15 ml 离心管中，加入适量含10%小牛血清的DMEM-F12培养基终止消化，用弯头吸管轻轻吹打，使之成为单细胞悬液。

4) 用400目细胞筛滤过细胞。

5) 1000 rpm离心5 分钟，弃去上清，加入D-Hanks液洗细胞，1000 rpm离心5 分钟，弃去上清。

6) 加入一定量的含10%小牛血清的DMEM-F12培养基，进行细胞计数，以 1×10^5 个/ml 浓度将细胞接种于预先用10 μ g/ml 多聚赖氨酸铺板的96或24孔板中，放入CO₂ 孵箱，在37℃，5% CO₂ 的条件下培养。

7) 24小时后，换培养基为含有5 mg/L阿糖胞苷和10%小牛血清的DMEM-F12培养基。再过24小时后更换为含2% B-27和10%小牛血清的DMEM-F12培养基。以后每隔2天更换为含2% B-27和10%小牛血清的DMEM-F12培养基，进行换液。

2.2 实验分组及处理方法

细胞存活率检测共设置8个实验组，包括正常对照组（Control）、模型组（Model）、5个不同浓度药物组（药物浓度（这里所说的药物浓度就是岩藻黄素净浓度）：0.39、0.78、1.56、3.12、6.25 μ g/ml）和药物对照组（6.25 μ g/ml）。其它检测指标：超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-PX）、总抗氧化能力（T-AOC）、丙二醛（MDA）、以及细胞形态学观察设置5个实验组，包括正常对照组、模型组和三个不同浓度给药组（药物浓度：0.39、0.78、1.56 μ g/ml）。

取培养7天的细胞，药物组给予相应浓度药物，Control和Model组加入等量相应溶剂，共孵育16h，之后除Control组，其它各组用5 μ M A β ₂₅₋₃₅（预先37℃老化7天）处理24 h。之后取细胞培养液进行T-AOC、SOD、MDA和GSH-PX检测，细胞采用MTT法测定细胞存活率或采用Hoechst/PI双染实验进行形态学观察。

2.3 实验指标测定方法

MTT法检测细胞存活率 96孔板培养细胞，给予药物保护16 h，A β ₂₅₋₃₅损伤24 h后，在培养液中加入5 mg/ml MTT，继续培养4h，终止培养，小心吸取除去培养液，每孔加入200 μ l二甲基亚砷，使结晶物充分溶解后，用酶标仪在OD 490 nm处测量各孔的吸光值，以对照组为100%计算细胞存活率。

Hoechst/PI双染实验方法参考试剂盒说明书并加以改进：向24孔板（400 μ l培养基）中加入10 μ l Hoechst 33342，37℃避光孵育20 min。小心吸除上清，PBS洗涤3次。每孔加入400 μ l Buffer A和3 μ l PI，37℃避光孵育15 min。小心吸除上清，PBS洗涤3次，每孔加入400 μ l Buffer A。激光共聚焦显微镜观察拍照。

本实验各指标的检测均进行了3 次重复不同样本的实验（Hoechst/PI双染实验观察细胞形态实验除外），结果均为3次实验结果经统计学分析得到。

(二) 实验结果与讨论

1 药物对细胞存活率的影响

检测对照品 A(A)(岩藻黄素纯品)以及其粗提物 Fx-01 粉(Fx-powder)和 Fx-01 油(Fx-oil)对 A β ₂₅₋₃₅诱导的大鼠大脑皮质神经元细胞模型存活率的影响，结果见表 1。结果显示，A β ₂₅₋₃₅处置后，细胞存活率显著下降($p < 0.01$)，为 76.03%，证明 A β ₂₅₋₃₅处置确实造成了神经元细胞的损伤，模型成功。而各个药物对造模后的神经元细胞均具有一定的保护作用。Fx-powder 与 A 相似，具有一定抑制神经元损伤作用，但这种作用未显示出剂量依赖关系。Fx-oil 具有神经保护作用，而且有一定的剂量依赖性，呈现出随药物浓度增高保护作用增强的趋势。对 3 种药物进行比较，在对细胞存活率的影响上来看，药物的神经保护作用：对照品 A > Fx-oil > Fx-powder。药物对照组与 Control 组没有显著性差异。

2 药物对 SOD 活力影响

SOD 活力的高低可以间接反映机体清除氧自由基的能力，检测对照品 A (A) 以及其粗提物 Fx-01 粉 (Fx-powder) 和 Fx-01 油 (Fx-oil) 对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的大鼠大脑皮质神经元细胞模型培养液中 SOD 活力的影响，结果见表 2。结果显示，Aβ₂₅₋₃₅ 处置后，细胞培养液中 SOD 活力有所下降，但不存在显著性差异，而各药物对造模后的神经元 SOD 活力均具有一定的提高作用，并显示出一定的剂量依赖性，呈现出随药物浓度增高 SOD 活力增强的趋势。

表 2 不同药物处置对 Aβ₂₅₋₃₅ 损伤神经元培养液中 SOD 活力的影响

药物种类	SOD (U/ml)				
	Control	Model	给药 (μg/ml)		
			0.39	0.78	1.56
Fx-powder	17.51 ± 0.54	14.54 ± 1.56	15.49 ± 1.90	16.50 ± 1.19	17.30 ± 1.31
Fx-oil			15.49 ± 0.97	15.45 ± 1.14	16.43 ± 2.47
A (岩藻黄素纯品)			15.38 ± 0.71	15.72 ± 0.87	15.77 ± 0.83

3 药物对 GSH-PX 活力影响

检测对照品 A (A) 以及其粗提物 Fx-01 粉 (Fx-powder) 和 Fx-01 油 (Fx-oil) 对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的大鼠大脑皮质神经元细胞模型培养液中 GSH-PX 活力的影响，结果见表 3。结果显示，Aβ₂₅₋₃₅ 对神经元的损伤可以导致 GSH-PX 活力的显著下降 (p<0.05)，而 3 种药物均对 GSH-PX 有一定的提高作用，但是，与模型比没有显著性差异，而且未显示出剂量依赖关系。

表 3 不同药物处置对 Aβ₂₅₋₃₅ 损伤神经元培养液中 GSH-PX 活力的影响

药物种类	GSH-PX (U/ml)				
	Control	Model	给药 (μg/ml)		
			0.39	0.78	1.56
Fx-powder	59.22 ± 20.90	17.75 ± 17.32*	39.85 ± 8.43	37.00 ± 8.49	37.00 ± 5.66
Fx-oil			41.00 ± 14.14	54.44 ± 25.14	27.22 ± 0.79
A (岩藻黄素纯品)			38.17 ± 6.84	61.50 ± 51.62	34.00 ± 5.29

注：与 Control 比，*：p<0.05。

4 药物对总抗氧化能力 (T-AOC) 的影响

总抗氧化能力 (T-AOC) 测定可以评价体系中的总抗氧化物质抗氧化能力的高低。检测对照品 A (A) 以及其粗提物 Fx-01 粉 (Fx-powder) 和 Fx-01 油 (Fx-oil) 对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的大鼠大脑皮质神经元细胞模型培养液中 T-AOC 的影响, 结果见表 4。结果显示, Aβ₂₅₋₃₅ 对神经元的损伤可以导致培养液中的抗氧化物质总抗氧化能力的显著下降 ($p<0.05$), 而 3 种药物均对总抗氧化能力有一定的提高作用, Fx-powder 呈现出随药物浓度增高保护作用增强的趋势; 但是, A 与 Fx-oil 虽然也有提高总抗氧化能力的作用, 却未显示出剂量依赖关系。

表 4 不同药物处置对 Aβ₂₅₋₃₅ 损伤神经元培养液总抗氧化能力的影响

药物种类	T-AOC (U/ml)				
	Control	Model	给药 (μg/ml)		
			0.39	0.78	1.56
Fx-powder	1.47 ± 0.33	0.63 ± 0.05 [#]	0.78 ± 0.06 [*]	0.88 ± 0.18	1.11 ± 0.06 ^{**}
Fx-oil			1.40 ± 0.12 ^{**}	1.48 ± 0.23 ^{**}	0.64 ± 0.46
A (岩藻黄素纯品)			1.50 ± 0.54 [*]	1.26 ± 0.37 [*]	1.12 ± 0.13 ^{**}

注: 与 Control 比, [#]: $p<0.05$; 与 Model 比, ^{*}: $p<0.05$, ^{**}: $p<0.01$ 。

5 药物对 MDA 含量的影响

机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基, 后者能够攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化作用, 并因此形成脂质过氧化物, 如 MDA。因此, MDA 的量可以反映机体内脂质过氧化的程度, 由此间接反映出细胞受自由基攻击的损伤程度。检测对照品 A (A) 以及其粗提物 Fx-01 粉 (Fx-powder) 和 Fx-01 油 (Fx-oil) 对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的大鼠大脑皮质神经元细胞模型培养液中 MDA 含量的影响, 结果见表 5。结果显示, Aβ₂₅₋₃₅ 对神经元的损伤使培养液中的 MDA 含量略有增加。Fx-powder 可以显著降低损伤神经元培养液中 MDA 的含量, 并具有剂量依赖关系, 随药物浓度增加保护作用增强; Fx-oil 也具有这种保护神经元细胞氧化损伤的作用, 但剂量依赖关系不明显; 对照品 A 在低剂量时显示出了一定保护作用, 但是中、高剂量时这种作用似乎被反转, MDA 含量反而有所增加, 但与 Model 比, 没有统计学差异。

总之，综合以上 4 个氧化损伤相关指标的检测，结果显示 3 种药物都具有一定的抗氧化损伤的作用，表现在实验体系中清除过氧化物相关酶活性和总抗氧化能力的增强以及过氧化损伤产物的减少。

表 5 不同药物处置对 Aβ₂₅₋₃₅ 损伤神经元培养液中 MDA 含量的影响

药物种类	MDA (μmol/ml)				
	Control	Model	给药 (μg/ml)		
			0.39	0.78	1.56
Fx-powder	9.54 ± 3.05	11.05 ± 3.30	3.67 ± 1.62*	1.72 ± 2.08*	0.93 ± 0.21**
Fx-oil			6.23 ± 2.25	0.56 ± 3.47*	1.36 ± 1.16**
A (岩藻黄素纯品)			5.12 ± 1.17*	14.62 ± 3.82	12.34 ± 1.58

注：与 Model 比，*：p < 0.05，**：p < 0.01。

6 神经元形态学检测

形态学检测结果见图 1。正常对照组多为蓝色的正常细胞，有少数亮蓝色的凋亡细胞，未见坏死细胞。模型组亮蓝色的凋亡细胞明显增加，并出现亮红色的坏死细胞。Fx-powder 0.39 μg/ml 组凋亡和坏死细胞减少，0.78 μg/ml 组凋亡细胞减少、坏死细胞未见减少，1.56 μg/ml 组坏死细胞减少；但没有剂量依赖性。Fx-oil 0.39 μg/ml 组和 0.78 μg/ml 组凋亡细胞减少，1.56 μg/ml 组坏死细胞和凋亡细胞均减少；Fx-oil 呈现出一定的剂量依赖性。A 0.39 μg/ml 组坏死细胞有所减少，0.78 μg/ml 组和 1.56 μg/ml 组凋亡细胞和坏死细胞减少；A 有一定的剂量依赖关系。三种药物比较，A 的效果最好，Fx-oil 和 Fx-powder 次之。

(三)结论

- 1 对照品 A 以及其粗提物 Fx-01 粉和 Fx-01 油均具有一定的与神经退行性疾病相关的神经保护作用，可能具有改善记忆活性；
- 2 三种药物神经保护作用比较，对照品 A 最好，Fx-01 油和 Fx-01 粉次之；
- 3 三种药物都具有一定的抗氧化损伤的作用。

实施例 2 体内药理实验

1 材料与方法

1.1 材料 岩藻黄素纯品由我公司自制，推荐小鼠日服量为相当于

人体日服剂量4 mg, 昆明种雄性小白鼠, 6~8 周龄、体重18~22g。

1.2 剂量与分组 以人体日服剂量4 mg岩藻黄素纯品作为一个剂量组, 转化成小鼠日服剂量, 并设空白对照组。

1.3 动物实验室设置 动物实验室为SPF 级。条件为室温 22 ± 2 °C, 5 湿度60%~80%。

1.4 仪器 跳台仪、避暗仪。

1.5 方法

1.51 跳台试验 选用雄性小鼠20 只, 体重18~22g, 随机分为空白对照组和给药组, 给药组每天灌胃给予岩藻黄素纯品, 连续给样30天后进行跳台训练。将动物放入反应箱内适应3min, 立即通以36 伏交流电, 动物的正常反应是跳回到绝缘平台上。多数动物可能再次或多次跳至铜栅上, 受到电击又迅速跳回平台。训练一次后, 将动物放在反应箱内的平台上, 记录10 5min 内每鼠受到电击的次数(错误次数), 以此作为学习成绩。24h 后重测验, 记录受电击的动物数、第一次跳下平台的潜伏期和3min 内的错误次数。15 数。

1.52 避暗试验 动物选择, 试验分组, 给受试物的剂量、途径、时间均同跳台试验, 连续给样30d 后开始进行避暗训练。实验时将小鼠面部背向洞口放入明室, 同时启动计时器, 动物穿过洞口进入暗室受到电击, 计时器停止, 取出小鼠, 记录每鼠从放入明室至进入暗室内遭电击所需的时间, 即潜伏期。24h后同一时间, 进行重复测验, 记录每鼠进入暗室的潜伏期、5min内的错误次数和进入暗室的动物数。20 期、5min内的错误次数和进入暗室的动物数。

1.6 数据处理 所得数据采用SPSS1010 统计软件包进行统计处理, 统计方法采用方差分析和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 跳台实验 由下表可见, 经口给予小鼠岩藻黄素纯品的给药组25 30d, 记忆获得(训练) 过程中, 平均错误次数少于对照组, 差异有显著性; 重复测验过程中, 给药组跳下平台的潜伏期长于对照组, 平均错误次数少于对照组, 错误反应率低于对照组, 差异亦有显著性($P < 0.05$) 。

表6 岩藻黄素对小鼠记忆获得的影响(跳台法)

组别	剂量	动物 (只)	潜伏期 测验(秒)	错误次数(次)		错误反应率(%)	
	(mg/ kg·bw)			训练	测验	训练	测验
对照组	0	10	89.7±56.4	3.1±0.62	1.0±0.82	100	70
给药组	0.42	10	136.2±25.6*	1.1 ±0.56**	0.3 ±0.31*	100	50

注: * 表示与空白对照组比较, $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

2.2 避暗实验 由下表可见, 结果可见, 给予小鼠岩藻黄素纯品30d , 给药组的平均潜伏期长于对照组, 平均错误次数低于对照组, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

表7 岩藻黄素对小鼠记忆获得的影响(避暗法)

组别	剂量	动物 (只)	潜伏期(秒)		错误次数(次) 测验	错误反应 率
	(mg/ kg·bw)		训练	测验	测验	(%)
对照组	0	10	26.5.7±6.4	123.41±80.5	1.5±0.6	100
给药组	0.42	10	40.2 ± 6.5*	240.4 ± 43.2*	0.4 ± 0.3*	50**

注: * 表示与空白对照组比较, $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

3 讨论

药理实验结果显示, 在跳台试验和避暗试验中, 给药组动物记忆获得的错误反应潜伏期延长, 错误次数、错误反应率降低, 与对照组比较, 差异具显著性。表明岩藻黄素具有改善记忆的功能。岩藻黄素作为保健品, 在增进健康及预防疾病方面能起到很重要的作用, 包括增进大脑发育及记忆力。

实施例 3 材料与方法

- 1.1 材料 昆明种雄性小白鼠, 6~8 周龄、体重18~22g。
- 1.2 剂量与分组 按照表16的配方, 并设空白对照组。
- 1.3 动物实验室设置 动物实验室为SPF 级。条件为室温22 ±2 ℃, 湿度60 % ~ 80 %。
- 1.4 仪器 跳台仪、避暗仪。
- 1.5 方法同实施例2
- 1.7 数据处理 所得数据采用方法同实施例2。
- 2 结果
- 2.1 跳台实验 由下表可见, 经口给予小鼠按照表16的配方的给药组

30d, 记忆获得(训练)过程中,平均错误次数少于对照组,差异有显著性;重复测验过程中,给药组跳下平台的潜伏期长于对照组,平均错误次数少于对照组,错误反应率低于对照组,差异亦有显著性($P < 0.05$)。

表8 表16配方对小鼠记忆获得的影响(跳台法)

组别	给含岩藻黄素有效成分的剂量	动物	潜伏期	错误次数(次)		错误反应率(%)	
	(mg/ kg · bw)			训练	测验	训练	测验
对照组	0	10	89.7±56.4	3.1±0.62	1.0±0.82	100	70
给药组	0.42	10	145.2±18.6*	0.8 ± 0.56**	0.2 ± 0.23*	100	30

5 注: * 表示与空白对照组比较, $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

3.2 避暗实验 由下表可见,结果可见,经口给予小鼠按照表16的配方的给药组30d,给药组的平均潜伏期长于对照组,平均错误次数低于对照组,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

表9 表14配方对小鼠记忆获得的影响(避暗法)

组别	给含岩藻黄素有效成分的剂量	动物	潜伏期(秒)		错误次数(次)测验	错误反应率
	(mg/ kg · bw)		训练	测验	测验	(%)
对照组	0	10	26.5.7±6.4	123.41±80.5	1.5±0.6	100
给药组	0.42	10	45.1 ± 6.5*	260.2 ± 33.1*	0.2 ± 0.1*	40**

10 注: * 表示与空白对照组比较, $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

4 讨论

药理实验结果显示,在跳台试验和避暗试验中,给药组动物记忆获得的错误反应潜伏期延长,错误次数、错误反应率降低,与对照组比较,差异具显著性。表明含岩藻黄素的配方具有改善记忆的功能,其作为药品和保健品,在增进健康及预防疾病方面能起到很重要的作用,包括增进大脑发育及记忆力。

实施例4 含有岩藻黄素提取物(含岩藻黄素95%)制成的硬胶囊(表8)。

表10.

组分	含量
岩藻黄素	2 mg
银杏提取物	98mg

变性淀粉 200 mg

对于阿尔茨海默症的人群服用方法是：1天服用1-2次，每次1-2粒。

实施例5 含有岩藻黄素提取物（含岩藻黄素 60%）制成的薄膜包衣片（表9）。

表11.

组分	含量
岩藻黄素	15 mg
大豆卵磷脂	55 mg
迷迭香提取物	50 mg
微晶纤维素	60 mg
淀粉	110 mg
羧甲基纤维素钠	2 mg
柠檬黄	3 mg
二氧化钛	5 mg

5 对于阿尔茨海默症的人群服用方法是：1天服用1次，每次1粒。

实施例6 含有岩藻黄素提取物制成的软胶囊（含岩藻黄素0.1%）（表10）。

表12.

组分	含量
岩藻黄素提取物	100 mg
磷脂丝氨酸	100 mg
氢化大豆油	50 mg
黄蜡	50 mg
大豆油	200 mg

对于阿尔茨海默症的人群服用方法是：1天服用2次，每次1-2粒。

实施例7 含有岩藻黄素提取物（含岩藻黄素10%）制成的软胶囊（表11）。

表13.

组分	含量
岩藻黄素提取物	50 mg
鱼油	50 mg
氢化大豆油	50 mg
黄蜡	50 mg
大豆油	200 mg

对于阿尔茨海默症的人群服用方法是：1天服用2次，每次1-2粒。

实施例8 含有岩藻黄素提取物（含岩藻黄素100%）制成的硬胶囊（表12）。

表14.

组分	含量
岩藻黄素提取物	4 mg
二十二碳六烯酸(DHA)	20mg
变性淀粉	200 mg

- 5 对于阿尔茨海默症的人群服用方法是：1天服用1-2次，每次1-2粒。

实施例9 含有岩藻黄素提取物（含岩藻黄素0.1%）制成的软胶囊（表13）。

表15.

组分	含量
岩藻黄素提取物	50 mg
Omega-3	50 mg
氢化大豆油	50 mg
黄蜡	50 mg
大豆油	200 mg

对于阿尔茨海默症的人群服用方法是：1天服用2次，每次1-2粒。

实施例10 含有岩藻黄素1%油制成的软胶囊（表14）。

表16.

组分	含量
岩藻黄素 1%油	25 mg
共轭亚油酸 (CLA)	450 mg
大豆油	25 mg

对于阿尔茨海默症的人群服用方法是：1天服用2次，每次2粒

5 实施例 11 含岩藻黄素60%的岩藻黄素提取物制成的软胶囊

表17.

组分	含量
岩藻黄素提取物	5 mg
共轭亚油酸 (CLA)	90 mg
卵磷脂	50 mg
银杏提取物	50 mg
二十二碳六烯酸(DHA)	20 mg
磷脂丝氨酸	50 mg
大豆油	35 mg

对于阿尔茨海默症的人群服用方法是：1天服用2次，每次1-2粒。

实施例 12 由100%岩藻黄素提取物制成的微丸

表18.

组分	含量
岩藻黄素提取物	20 mg

实施例 13 由90%岩藻黄素提取物制成的微丸
表19.

组分	含量
岩藻黄素提取物	15 mg

5

可以理解，为了解释本发明的本质，在不偏离本发明如以下权利要求所表达的原则和范围的情况下，本领域普通技术人员可以对已经在这里描述的详情、材料、以及配方作出各种改变。

权利要求书

1. 岩藻黄素在用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品中的用途，其中，所述产品包括食品、保健品和药品。
2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中，所述神经退行性疾病包括阿尔茨海默病，帕金森氏症，亨廷顿舞蹈症。
3. 根据权利要求 2 所述的用途，其中，所述产品进一步包括改善记忆力的作用。
4. 根据权利要求 1 所述岩藻黄素的用途，其中，所述岩藻黄素来源包括植物来源、微生物来源、或合成的化合物来源。
5. 根据权利要求 4 所述岩藻黄素的用途，其中，所述岩藻黄素的植物来源是海藻，选自由海带、马尾藻、墨角藻、鹅肠菜、囊藻、绳藻、裙带菜、巨藻、鹿角菜、海黍子、羊栖菜、海蒿子和硅藻组成的组。
6. 根据权利要求 1 所述岩藻黄素的用途，其中，所述岩藻黄素在所述产品中的含量在 0.0001%-60%之间。
7. 根据权利要求 1 所述岩藻黄素的用途，其中，所述岩藻黄素在所述产品中的含量在 0.0001%-10%之间。
8. 根据权利要求 1 所述岩藻黄素的用途，其中，所述岩藻黄素在岩藻黄素提取物中的含量在 90-100%之间。
9. 根据权利要求 1 所述岩藻黄素的用途，其中，所述岩藻黄素在岩藻黄素提取物中的含量在 95-100%之间。
10. 根据权利要求 1-3 所述岩藻黄素的用途，其中，受试对象每日服用的岩藻黄素有效成分为 0.001 mg-20 mg。
11. 根据权利要求 1-3 所述岩藻黄素的用途，其中，受试对象每日服用的岩藻黄素有效成分为 0.001 mg -10 mg。
12. 根据权利要求 1 所述岩藻黄素的用途，其中，所述产品含预防或治疗神经退行性疾病的有效剂量的岩藻黄素。
13. 一种用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品，其中，所述产

品中含有岩藻黄素。

14. 根据权利要求 13 所述的产品, 其中, 所述产品包括食品、保健品和药品。

5 15. 根据权利要求 13 所述用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述岩藻黄素来源包括植物来源、微生物来源、或合成的化合物来源。

16. 根据权利要求 13 所述的用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述岩藻黄素在所述产品中的含量在 0.0001%-60%之间。

10 17. 根据权利要求 13 所述的用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述岩藻黄素在所述产品中的含量在 0.0001%-10%之间。

18. 根据权利要求 13 所述的用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述岩藻黄素在岩藻黄素提取物中的含量在 90-100%之间。

15 19. 根据权利要求 13 所述的用于与神经退行性疾病相关的神经保护作用的产品, 其中, 所述岩藻黄素在岩藻黄素提取物中的含量在 95-100%之间。

20. 根据权利要求 13 所述的产品, 其中, 所述神经退行性疾病相关包括阿尔茨海默病, 帕金森氏症, 亨廷顿舞蹈症。

20 21. 根据权利要求 13 所述的产品, 其中, 所述含岩藻黄素的产品, 还包括天然提取物。

22. 根据权利要求 17 所述的产品, 其中, 所述天然提取物, 是选自银杏提取物, 二十二碳六烯酸(DHA), 磷脂酰丝氨酸, 卵磷脂, 鱼油, Omega-3, 共轭亚油酸组成的组。

25 23. 根据权利要求 13 所述的产品, 其中, 所述岩藻黄素的植物来源是海藻, 选自由海带、马尾藻、墨角藻、鹅肠菜、囊藻、绳藻、裙带菜、巨藻、鹿角菜、海黍子、羊栖菜、海蒿子和硅藻组成的组。

24. 根据权利要求 13-15 所述的产品, 其中, 受试对象每日服用的有效剂量的岩藻黄素为 0.001 mg-20 mg。

25. 根据权利要求 13-15 所述的产品, 其中, 受试对象每日服用的有效剂

量的岩藻黄素为 0.001 mg-10 mg。

26. 根据权利要求 13 所述的产品在改善记忆力方面的用途。

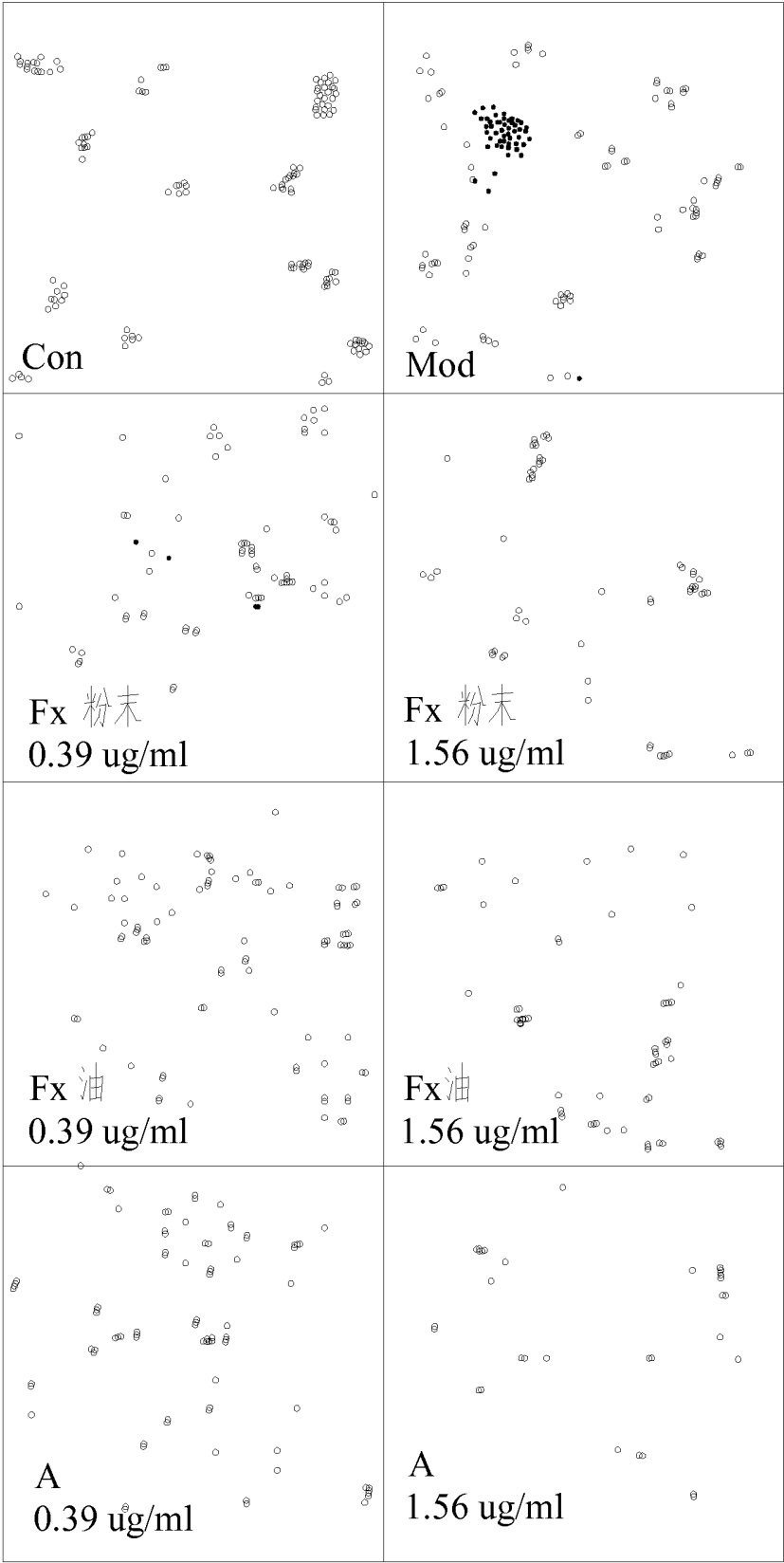


图 1 不同药物处置后 $A\beta_{25-35}$ 损伤神经元形态学检测结果。空心圆：正常细胞；灰色圆：凋亡细胞；黑色圆：坏死细胞。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/077542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT(Cprs), CTCMPD, CNKI Full-Text database, Chinese Medicine Abstract, WPI, EPODOC, Embase, Medline, CA; fucoxanthin, neurodegenerative, neurodegeneration, neuroprotective, neuroprotection, cerebroprotective, Alzheimer, parkison,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP2008001623A(UNIV KYOTO) 10 January 2008(10. 01. 2008), claims 1-2	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 June 2011(15. 06. 2011)Date of mailing of the international search report
30 Jun. 2011 (30.06.2011)Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451Authorized officer
LEI, Yaolong
Telephone No. (86-10)62411119

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/077542

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
claims 1-12, 26 are directed to a method of treatment of the human/animal body(Article 17 (2) (a) (i) and Rule 39. 1(iv) PCT), however, the search has been carried out and based on the alleged effects of the products in claims 1-12, 26.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2010/077542

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP2008001623A	10. 01. 2008	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/077542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

A61K 31/336(2006. 01)i

A61K 9/48(2006. 01)i

A61K 9/20(2006. 01)i

A61K 9/16(2006. 01)i

A61K 9/14(2006. 01)i

A61P 25/28(2006. 01)i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/077542

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT(Cprs), 中国药物专利数据库(CTCMPD), CNKI, 中国药学文摘, WPI, EPODOC, Medline, Embase, CA, 墨角藻黄素, 岩藻黄质, 岩藻黄素, 藻褐素, 褐藻素, 褐藻黄素, fucoxanthin, neurodegenerative, neurodegeneration, neuroprotective, neuroprotection, cerebroprotective, Alzheimer, parkison, antiparkinsonian, dementia, huntinton

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	JP2008001623A(UNIV KYOTO) 10. 01 月 2008(10. 01. 2008), 权利要求 1-2	1-26

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
15. 6 月 2011(15. 06. 2011)

国际检索报告邮寄日期
30.6 月 2011 (30.06.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员

雷耀龙
电话号码: (86-10) **62411119**

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求：1-12, 26

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求1-12, 26所要求保护的方法为治疗人体或动物体的方法（条约第17(2)(a)(i)和细则第39.1(iv) PCT），但是审查员还是针对权利要求1-12, 26所宣称的产品的作用进行了检索。

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/077542

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
JP2008001623A	10. 01. 2008	无	

A. 主题的分类:

A61K 31/336(2006. 01)i

A61K 9/48(2006. 01)i

A61K 9/20(2006. 01)i

A61K 9/16(2006. 01)i

A61K 9/14(2006. 01)i

A61P 25/28(2006. 01)i