

一种大麻素组合物及其在制备治疗帕金森、阿尔茨海默等神经退行性疾病的药物中的应用

技术领域

本发明涉及医药领域，具体涉及一种大麻素组合物及其在制备治疗帕金森、阿尔茨海默等神经退行性疾病的药物中的应用。

背景技术

在老龄化人群中，与帕金森病（Parkinson disease, PD）、阿尔茨海默症（Alzheimer disease, AD）和路易体痴呆（Dementia with Lewy bodies, DLB）等相关的神经变性是一种日益增长的健康负担。其中，80 岁以上的老年人中，每 2 人就有 1 人会罹患阿尔茨海默症，其死亡率仅次于心脏病、肿瘤和中风；65 岁以上的人群中帕金森患病率为 1%~2%，85 岁以上的人群中患病率约 4%。

经过长期研究，这些神经退行性疾病逐渐被认识到与多巴胺代谢失常及多巴胺分泌神经细胞因脱落而减少等有关。AD 标志性病理变化为神经元外的神经炎性斑以及神经元内纤维缠结。目前的常用治疗药物以胆碱酯抑制剂为主，但是研究发现，神经递质多巴胺也参与到了阿尔茨海默病程中，阿尔茨海默病人的尸检发现纹状体、杏仁核、黑质等部位多巴胺含量及 L-DOPA 和代谢物均有降低。

PD 的特征性病理改变是中脑黑质中多巴胺能（dopaminergic, DA）神经元大量变性死亡，以及残留的神经元胞浆中路易小体的形成。目前，PD 的治疗方法主要有传统的药物治疗和外科治疗。药物治疗包括多巴胺替代治疗、抗胆碱能制剂、多巴胺受体激动剂、单胺氧化酶抑制剂、儿茶酚-氧位-甲基转移酶抑制剂、谷氨酸受体拮抗剂等，其中左旋多巴是一种针对帕金森病的常用药物，被认为是治疗帕金森病最有效的药物。但包括左旋多巴在内的很多药物长期应用后，不但会引起疗效下降，还会出现各种并发症如开-关现象、剂末现象及运动障碍等。

因此，我们亟需寻找一种疗效高、药效持久且副作用小的药物。

发明的公开

本发明针对现有用于治疗如帕金森等神经退行性疾病的药物副作用大、长期使用后疗效变差等问题，提供一种大麻素组合物及其在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用。

大麻二酚（cannabidiol, CBD）是从大麻花叶中萃取的一种无毒的可用于药品、化妆品、保健食品的一种高附加值的酚类物质。目前，美国、英国等发达国家已用其做原料并开发出多种特效药品。CBD 是大麻中的非成瘾性成分，能阻碍 THC 对人体神经系统的影响，并具有抗痉挛、抗风湿性关节炎、抗焦虑等药理活性，亦有在治疗帕金森病方面的报道，但单独使用 CBD 的治疗效果并不理想。尽管也有研究涵盖了复合大麻素组合，但大多数组合中均含有成瘾性物质 THC。考虑到各国对 THC 有或多或少的管控措施，我们认为长远来看，在不使用 THC 的情况下，开发新的疗效好、副作用小的治疗药物更重要。

大麻酚（Cannabinol, CBN）是通过 THC 的氧化和分解而衍生的大麻素，在很大程度上减少了其精神活性。

大麻萜酚（cannabigerol, CBG）是其他大麻素（如 CBD 和 THC）的前体，其高效且无精神毒性和其他副作用。目前有关 CBD、THC 在治疗神经退行性疾病中的应用研究颇多，而关于 CBG 的有关治疗作用与研究还鲜有报道。

基于上述，本发明的第一个目的是提供一种大麻素组合物，所述的大麻素组合物包含：大麻二酚和大麻萜酚，所述的大麻二酚和大麻萜酚的质量比为 1: 1~1: 10 或 1: 0.3~1: 0.5 或 1: 0.5~1: 0.7 或 1: 0.7~1: 1。

优选地，所述的大麻二酚和大麻萜酚的质量比为 1: 1~1: 3 或 1: 3~1: 5 或 1: 5~1: 7。

优选地，所述的大麻素组合物还包含大麻酚。

优选地，所述的大麻二酚和大麻酚的质量比为 1: (0.05~1)。

优选地，所述的大麻二酚和大麻酚的质量比为 1: (0.1~0.5)。

优选地，所述的大麻二酚、大麻萜酚和大麻酚的质量比为 1: 3: 0.3。

本发明的另一个目的是提供所述的大麻素组合物在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用；

优选地，所述的神经退行性疾病包括帕金森病、阿尔茨海默症、路易体痴呆；

所述的大麻素组合物用于促进多巴胺神经细胞的发育、成熟，防止多巴胺神经细胞脱落，提高多巴胺神经细胞的生存能力；

所述的大麻素组合物用于提高多巴胺神经细胞分泌多巴胺的能力。

本发明的另一个目的是提供一种用于治疗神经退行性疾病的药用组合物，所述的药用组合物包括：所述的大麻素组合物，以及药学上可接受的载体。

所述的药用组合物的剂型包含油剂、颗粒剂、片剂、散剂、胶囊、丸剂、粉剂、口服液、溶胶剂、喷剂、雾化剂。

本发明的另一个目的是提供一种用于治疗神经退行性疾病的药盒，所述的药盒中包括：所述的大麻素组合物。

相对于现有技术，本发明的有益效果是：

(1) 本发明通过运用成纤维细胞诱导分化为多巴胺能神经元细胞模式的实验方法，检测成纤维细胞诱导分化培养后的细胞形态、数量以及 DA 相关因子的相对表达水平，筛选常见的不同大麻素及其组合对成纤维细胞诱导分化成多巴胺能神经元的影响，发现 CBD+CBG 组合提高多巴胺能神经元细胞生存能力和分泌多巴胺能力的效果最优，可用于制备治疗神经退行性疾病的药物，如帕金森。进一步设计 CBD 和 CBG 不同比例组合的实验，发现当 CBD 和 CBG 质量比为 1: 1~1: 5 时，实验效果较优且安全，其中，最佳质量比为 1: 3。

(2) CBD+CBG 作为效果最优组合，其不含成瘾性物质 THC，因此大大降低了药物使用后的副作用，不必担心药品滥用问题，在应用层面上扫除了极大的障碍。

(3) 本发明提供的 CBD+CBG 组合能够显著提高 Pitx3 和 TH-2 的相对表达水平，即提高多巴胺能神经元细胞的生存能力和分泌多巴胺的能力。这样的作用机理，相较于现有常用的帕金森治疗方案（如口服左旋多巴）更优，长期看，并不会产生左旋多巴类似的长期使用缺陷，不会令效果变差。同时，

因为作用机理的不同，理论上有可能和左旋多巴等药物共同使用，从而达到更好的治疗效果，或极大地延缓左旋多巴长期使用的缺点。

(4) 本发明基于 CBD+CBG 的组合还进一步设计 CBD、CBG 和 CBN 不同比例组合的实验，结果发现添加 CBN 会进一步提高大麻素组合物激活多巴胺神经细胞活力的效果，当 CBD: CBG: CBN (质量比) 为 1: 3: 0.3 时，激活多巴胺神经细胞活力的效果最优。

附图的简要说明

图1为本发明实施例1中显微镜观察HDF38纤维细胞诱导分化培养第13天的细胞形态图。

图2为本发明实施例1中各组细胞DA相关因子的相对表达量。其中：

A为Nurr1的表达检测结果；

B为TH-2的表达检测结果；

C为Pitx3的表达检测结果。

图1~图2中：Cont表示未诱导分化组；6CD表示诱导分化对照组；6CD+d表示诱导分化+CBD组；6CD+g表示诱导分化+CBG组；6CD+t表示诱导分化+THC组；6CD+dg表示诱导分化+CBD+CBG组；6CD+dt表示诱导分化+CBD+THC组。

图3为本发明实施例2中显微镜观察HDF38成纤维细胞诱导分化培养的细胞形态图；其中：

A为诱导培养第4天的细胞形态图；

B为诱导培养第7天的细胞形态图；

C为诱导培养第13天的细胞形态图。

图4为本发明实施例2中各组细胞DA相关因子的相对表达量。其中：

A为Nurr1的表达检测结果；

B为TH-2的表达检测结果；

C为Pitx3的表达检测结果。

图3~图4中：Cont表示未诱导分化组；6CD表示诱导分化对照组；6CD+dg0.1表示添加质量比为1: 0.1的CBD和CBG；6CD+dg0.3表示添加质量比为1: 0.3的CBD和CBG；6CD+dg0.5表示添加质量比为1: 0.5的CBD和CBG；

6CD+dg0.7表示添加质量比为1: 0.7的CBD和CBG; 6CD+dg1表示添加质量比为1: 1的CBD和CBG; 6CD+dg3表示添加质量比为1: 3的CBD和CBG; 6CD+dg5表示添加质量比为1: 5的CBD和CBG; 6CD+dg7表示添加质量比为1: 7的CBD和CBG; 6CD+dg10表示添加质量比为1: 10的CBD和CBG; 6CD+dt表示诱导分化+CBD+THC组。

图5为本发明实施例3中各组细胞DA相关因子的相对表达量。其中:

A为Nurr1的表达检测结果;

B为TH-2的表达检测结果;

C为Pitx3的表达检测结果。

图5中: Cont表示未诱导分化组; 6CD表示诱导分化对照组; 6CD+dg1表示添加质量比为1: 1的CBD和CBG; 6CD+dg1+n0.1表示添加质量比为1: 1: 0.1的CBD、CBG和CBN; 6CD+dg1+n0.3表示添加质量比为1: 1: 0.3的CBD、CBG和CBN; 6CD+dg1+n0.5表示添加质量比为1: 1: 0.5的CBD、CBG和CBN; 6CD+dg3表示添加质量比为1: 3的CBD和CBG; 6CD+dg3+n0.1表示添加质量比为1: 3: 0.1的CBD、CBG和CBN; 6CD+dg3+n0.3表示添加质量比为1: 3: 0.3的CBD、CBG和CBN; 6CD+dg3+n0.5表示添加质量比为1: 3: 0.5的CBD、CBG和CBN。

实现本发明的最佳方式

以下结合附图和实施例对本发明的技术方案做进一步的说明。

本发明公开了一种大麻素组合物, 所述的大麻素组合物包含: 大麻二酚和大麻萜酚, 其中大麻二酚和大麻萜酚的质量比为 1: 1~1: 10; 较佳地, 所述的大麻二酚和大麻萜酚的质量比为 1: 1~1: 3 或 1: 3~1: 5 或 1: 5~1: 7; 更优地, 所述的大麻二酚和大麻萜酚的质量比为 1: 3。

所述的大麻素组合物还包含大麻酚, 其中, 所述的大麻二酚和大麻酚的质量比为 1: (0.05~1); 较佳地, 所述的大麻二酚和大麻酚的质量比为 1: (0.1~0.5); 更优地, 所述的大麻二酚、大麻萜酚和大麻酚的质量比为 1: 3: 0.3。

经实验证明, 本发明提供了一种大麻素组合物, 一方面, 可促进多巴胺神经细胞的发育、成熟, 防止多巴胺神经细胞脱落, 提高多巴胺神经细胞的

生存能力；另一方面，可提高多巴胺神经细胞分泌多巴胺的能力。因此，该大麻素组合物可用于制备治疗神经退行性疾病的药物，所述的神经退行性疾病包括帕金森病、阿尔茨海默症、路易体痴呆。

本发明还提供了一种用于治疗神经退行性疾病的药用组合物，所述的药用组合物包括：本发明所述的大麻素组合物，以及药学上可接受的载体。

合适的药学上可接受的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在 Remington's Pharmaceutical Sciences 中可找到关于药学上可接受的载体的充分说明。在组合物中药学上可接受的载体可含有液体，如水、磷酸盐缓冲液、ringer 溶液、生理盐水、平衡盐溶液、甘油或山梨醇等。另外，这些载体中还可能存在辅助性的物质，如润滑剂、助流剂、润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质和稳定剂，如白蛋白等。在使用时，是将安全有效量的本发明所述的大麻素组合物施用于哺乳动物（如人）。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。对于某一对象的精确有效量取决于该对象的体型和健康状况、病症的性质和程度、以及选择给予的治疗剂和/或治疗剂的组合。对于某给定的状况而言，可以用常规实验来确定该有效量，临床医师是能够判断出来的。

所述的药用组合物的剂型包含油剂、颗粒剂、片剂、散剂、胶囊、丸剂、粉剂、口服液、溶胶剂、喷剂、雾化剂等。

本发明还提供了一种用于治疗神经退行性疾病的药盒，其中包括：本发明所述的大麻素组合或所述的药用组合物。

为了便于临床应用，本发明的药物组合物可以包含在注射用给药器（如注射用针）中，所述的注射用给药器中，可以包含一次给药量的所述的药物组合物。所述的注射用给药器可以被包含在药盒中，以方便储存、使用。本发明所述的药盒中，还可包括使用说明书，以利于本领域技术人员按照正确的方式使用。

下面结合附图以及实施例对本发明的实验过程及实验结果进行详细说明，从而详细阐述本发明大麻素药用组合物对多巴胺能神经元细胞的激活作用，能够用于制备治疗神经退行性疾病的药物，包括帕金森病、阿尔茨海默症、路易体痴呆。

关于实施例相关检测蛋白的介绍：

Nurr1: 核受体相关蛋白 1, 是细胞内转录因子核受体超家族的成员, 在维持大脑多巴胺能系统中起着关键作用。该基因的突变与多巴胺能功能障碍相关的疾病有关, 包括帕金森病、精神分裂症和躁狂抑郁症。该蛋白质被认为对中脑中多巴胺能表型的发育至关重要。

Pitx3: 炎症因子 3, 由 PITX3 基因转录的蛋白。Pitx3 特异表达于大脑多巴胺能神经元, 对于脑多巴胺能神经元的分化与成熟起着关键性作用, 被认为是中脑多巴胺能神经元特异性发育所必需的转录因子。

TH: Tyrosine hydroxylase, 是多巴胺生物合成途径的关键酶, PD 是由于黑质纹状体多巴胺严重不足导致的一种神经变性疾病, TH 的表达调节在 PD 的发展和治疗中有重要的作用。

多巴胺神经细胞分化过程中, 首先 Nurr1 表达维持一定水平后, TH 和 Pitx3 表达, Nurr1 表达才能诱导进一步促进细胞分化成熟的标志基因 TH 和 Pitx3 的表达, 所以, 在某种程度上讲, TH 和 Pitx3 的表达更为重要, 它们的表达能力更能体现多巴胺神经细胞的活力。

实施例 1

(一) 实验过程

1. 培养基的配置

基础培养基 1: DMEM 培养基, 10%FBS, 1% Penicillin Streptomycin。

基础培养基 2: Neurobasal 培养基, 1% N-2 添加剂, 1% Penicillin Streptomycin Glutamine。

诱导培养基 1: Neurobasal 培养基, 1% N-2 添加剂, 1% Penicillin Streptomycin Glutamine, 5% 谷氨酰胺, 1% B27, 10 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EFG, 50 ng/ml GDNF, 2 μ M RA; 10 μ M SB431542; 200 ng/ml Noggin。

诱导培养基 2: Neurobasal 培养基, 1% N-2 添加剂, 1% Penicillin Streptomycin Glutamine, 1% B27, 10 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EFG, 50 ng/ml GDNF, 2 μ M RA; 100 ng/ml SHH; 100 ng/ml FGF8b。

按照上述配方分别配制各培养基, 配制后滤膜除菌, 备用。

2. HDF38 纤维细胞的培养

将购买的 HDF38 纤维细胞复苏、培养后, 于 7 个含有基础培养基 1 的 6 cm 培养皿中进行细胞传代, 每个培养皿中含 80000 个 HDF38 纤维细胞, 置

于 37℃，5% CO₂ 培养箱中进行培养。培养 3 天后，进行细胞的诱导分化。

3.HDF38 纤维细胞的诱导分化

实验方法：将上述细胞移出基础培养基 1，并用 PBS 洗 3 次，洗去残留的培养基。接着进行诱导分化培养：首先换成含有各待测药物的诱导培养基 1，每 2.5 天全换液一次，此阶段培养 7 天；7 天后，将培养基换成含有各待测药物的诱导培养基 2，每 3 天全换液一次，此阶段培养 6 天。

诱导分化过程中，每天在显微镜（ZEISS AXIO observer）下观察细胞形态变化并且拍照记录。7 组实验的编号及培养基成分如下表 1 所示：

表 1 不同大麻素及其组合的实验设计

编号	组别	培养基	添加的待测药物
1	未诱导分化组	基础培养基 2	无
2	诱导分化对照组	诱导培养基 1、2	无
3	诱导分化+CBD 组	诱导培养基 1、2	CBD（1 μg/10 ml 培养基）
4	诱导分化+CBG 组	诱导培养基 1、2	CBG（1 μg/10 ml 培养基）
5	诱导分化+THC 组	诱导培养基 1、2	THC（0.2 μg/10 ml 培养基）
6	诱导分化+CBD+CBG 组	诱导培养基 1、2	CBD（1 μg/10 ml 培养基）和 CBG（1 μg/10 ml 培养基）
7	诱导分化+CBD+THC 组	诱导培养基 1、2	CBD（1 μg/10 ml 培养基）和 THC（0.2 μg/10 ml 培养基）

备注：CBG 溶液、CBD 溶液购自 SIGMA-ALDRICH，Δ9-THC 购自 FUJIFILM。

4. 检测 DA 相关因子的相对表达水平

诱导分化培养 13 天后，收集细胞并使用 TRIzol 通用试剂（Tiangen Biotech，中国北京）从细胞中提取总 RNA，并合成互补 DNA（cDNA）。利用 SYBR Green 荧光染料进行实时荧光定量 PCR 以检测细胞中 DA 相关因子 Nurr1、TH-2、Pitx3 的相对表达水平。

其中，使用以下引物扩增片段：

Nurr1 基因的引物序列：

F: 5'- ACTGCCGATTTTCAGAAGTGC-3'（SEQ ID NO: 1），

R: 5'- CCGGCCTTTTAAACTGTCTGTG-3'（SEQ ID NO: 2）；

TH 基因的引物序列:

F: 5'- GAGTACACCGCCGAGGAGATTG-3' (SEQ ID NO: 3),

R: 5'- GCGGATATACTGGGTGCACTGG-3' (SEQ ID NO: 4);

Pitx3 基因的引物序列:

F: 5'- AGCACAGCGACTCAGAAAAG-3' (SEQ ID NO: 5),

R: 5'- TTTTTCAGCGAACCGTCCTC-3' (SEQ ID NO: 6)。

qRT-PCR 反应条件为: 95°C, 10 分钟; 95°C, 15 秒, 30°C, 1 分钟, 40 个循环。反应结束后, 对目的基因与内参基因的 mRNA 进行分析。

(二) 实验结果

1. 大麻素组合物对细胞诱导分化的影响

通过显微镜观察各培养组细胞的形态, 结果如图 1 所示: HDF38 纤维细胞已成功分化为多巴胺能神经元细胞, 且加入大麻素类药物诱导培养的细胞, 其分化成的多巴胺神经细胞数目更多, 说明大麻素类药物能促进 HDF38 纤维细胞向多巴胺能神经细胞的分化; 其中, CBD+CBG 组的多巴胺能神经元细胞数目最多, 说明 CBD+CBG 组合物对成纤维细胞向多巴胺能神经元细胞分化的促进作用最强。

2. 大麻素组合物对 DA 相关因子表达的影响

如图 2 所示, 经诱导分化培养的 6 组细胞均成功表达多巴胺神经细胞标志基因 Nurr1、TH-2 和 Pitx3, 其中, 6 个诱导组细胞的 Nurr1 表达水平都显著高于 Cont 组, 说明本实验中 HDF38 纤维细胞已被成功诱导分化成多巴胺能神经元细胞 (图 2 的 A)。

Nurr1 成功表达后, TH-2 和 Pitx3 标志基因随后表达, 这两种基因的表达能力更能体现多巴胺神经细胞的生存能力和活力, 结果表明, 添加 CBD+CBG、CBD+THC 的两组细胞表达 TH-2 和 Pitx3 的水平较其他组有明显优势, 说明相较于单一组合药物, 这两种药物组合中的成分彼此间具有协同作用, 对多巴胺能神经元细胞的发育、成熟以及分泌能力起到更好的促进作用; 其中 CBD+CBG 组表达 TH-2 的水平约是 CBD+THC 的 3 倍, 表达 Pitx3 的水平约是 CBD+THC 的 2 倍, 由此说明, 相较于 CBD+THC, CBD+CBG 能更好地提高多巴胺神经细胞的活性 (图 2 的 B、C), 且因为 CBG 不具有精神活性, 没有成瘾性, 药物副作用将会大大降低。

实施例 2 不同比例 CBD+CBG 组合物对细胞诱导分化的影响

通过实施例 1 发现，CBD+CBG 的组合促进多巴胺能神经元生存与分泌能力的效果最好，但实施例 1 中仅是 CBD 和 CBG 质量比为 1：1 的效果，因此，继续设计 CBD 和 CBG 不同比例组合的实验，以寻求激活多巴胺能神经元效果最佳的比例组合。

(一) 实验过程

1. 培养基的配置

按照实施例 1 的配方分别配制基础培养基 1、基础培养基 2、诱导培养基 1 和诱导培养基 2，配制后滤膜除菌，备用。

2. HDF38 纤维细胞的培养

将购买的 HDF38 纤维细胞复苏、培养后，于 12 个含有基础培养基 1 的 6cm 培养皿中进行细胞传代，每个培养皿中含 80000 个 HDF38 纤维细胞，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中进行培养。培养 3 天后，进行细胞的诱导分化。

3.HDF38 纤维细胞的诱导分化

将上述细胞分为 12 组进行诱导分化，实验方法同实施例 1 中的相关操作，CBD 和 CBG 不同比例的设计如下表 2 所示，其中 CBD 添加量均为 1 μg/10 ml 培养基。

表 2 不同比例 CBD+CBG 组合的实验设计

编号	组别	培养基	待测药物及比例（质量比）
1	未诱导分化组	基础培养基 2	无
2	诱导分化对照组	诱导培养基 1、2	无
3	诱导分化+1CBD+0.1CBG 组		CBD：CBG=1：0.1
4	诱导分化+1CBD+0.3CBG 组		CBD：CBG=1：0.3
5	诱导分化+1CBD+0.5CBG 组		CBD：CBG=1：0.5
6	诱导分化+1CBD+0.7CBG 组		CBD：CBG=1：0.7
7	诱导分化+1CBD+CBG 组		CBD：CBG=1：1
8	诱导分化+1CBD+3CBG 组		CBD：CBG=1：3
9	诱导分化+1CBD+5CBG 组		CBD：CBG=1：5
10	诱导分化+1CBD+7CBG 组		CBD：CBG=1：7
11	诱导分化+1CBD+10CBG 组		CBD：CBG=1：10

12	诱导分化+CBD+THC 组		CBD (1 μ g/10 ml 培养基) 和 THC (0.2 μ g/10 ml 培养基)
----	----------------	--	--

诱导分化过程中，每天在显微镜（ZEISS AXIO observer）下观察细胞变化并且拍照记录。

4. 检测 DA 相关因子的相对表达水平

诱导分化培养 13 天后，收集细胞并使用 TRIzol 通用试剂（Tiangen Biotech，中国北京）从细胞中提取总 RNA，并合成互补 DNA（cDNA）。利用 SYBR Green 荧光染料进行实时荧光定量 PCR 以检测细胞中 DA 相关因子 Nurr1、TH-2、Pitx3 的相对表达水平。

（二）实验结果

图 3 中 A-C 分别表示各组诱导培养第 4 天、第 7 天和第 13 天的细胞形态，结果表明，诱导培养第 4 天时，各培养组细胞可观察到神经元细胞的产生，且神经元数目随着添加药物中 CBG 的增多而增多，说明高浓度 CBG 可提高成纤维细胞分化成神经元细胞的速率（图 3 的 A）；但当诱导培养一周后，含高浓度 CBG 的两组（质量比 1：7 和 1：10）细胞出现了不同程度的死亡，其他诱导分化组未出现细胞死亡现象，说明高浓度 CBG 会引发药物毒性，进而导致细胞死亡，因此在本实验 CBD 浓度下，大麻素组合物中 CBD 和 CBG 的质量比不高于 1：5 时被视为安全（图 3 中 B、C）。

图 4 为各组细胞 DA 相关因子的表达量对比图。如图 4 所示，当 CBD 和 CBG 的质量比分别为 1：1、1：3 和 1：5 时，TH-2 和 Pitx3 的表达水平显著高于对照组和其他实验组，其中，当比例为 1：3 时，TH-2 和 Pitx3 的表达量最高。

实施例 3 不同比例 CBD+CBG+CBN 组合物对细胞诱导分化的影响

通过实施例 2 发现，CBD 和 CBG 质量比为 1：1 和 1：3 时，其激活多巴胺能神经元的较好，因此以当前两个比例为基础，继续设计 CBD、CBG 和 CBN 不同比例组合的实验，以寻求激活多巴胺能神经元效果最佳的组合及比例。

（一）实验过程

1. 培养基的配置

按照实施例 1 的配方分别配制基础培养基 1、基础培养基 2、诱导培养基

1 和诱导培养基 2，配制后滤膜除菌，备用。

2. HDF38 纤维细胞的培养

将购买的 HDF38 纤维细胞复苏、培养后，于 10 个含有基础培养基 1 的 6 cm 培养皿中进行细胞传代，每个培养皿中含 80000 个 HDF38 纤维细胞，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中进行培养。培养 3 天后，进行细胞的诱导分化。

3.HDF38 纤维细胞的诱导分化

将上述细胞分为 10 组进行诱导分化，实验方法同实施例 1 中的相关操作，CBD 和 CBG 不同比例的设计如下表 3 所示，其中 CBD 添加量均为 1 μg/10 ml 培养基。

表 3 不同比例 CBD+CBG+CBN 组合的实验设计

编号	组别	培养基	待测药物及比例（质量比）
1	未诱导分化组	基础培养基 2	无
2	诱导分化对照组	诱导培养基 1、2	无
3	诱导分化+1CBD+1CBG 组		CBD: CBG=1: 1
4	诱导分化+1CBD+1CBG+0.1CBN 组		CBD: CBG: CBN=1: 1: 0.1
5	诱导分化+1CBD+1CBG+0.3CBN 组		CBD: CBG: CBN=1: 1: 0.3
6	诱导分化+1CBD+1CBG+0.5CBN 组		CBD: CBG: CBN=1: 1: 0.5
7	诱导分化+1CBD+3CBG 组		CBD: CBG=1: 3
8	诱导分化+1CBD+3CBG+0.1CBN 组		CBD: CBG: CBN=1: 3: 0.1
9	诱导分化+1CBD+3CBG+0.3CBN 组		CBD: CBG: CBN=1: 3: 0.3
10	诱导分化+1CBD+3CBG+0.5CBN 组		CBD: CBG: CBN=1: 3: 0.5

诱导分化过程中，每天在显微镜（ZEISS AXIO observer）下观察细胞变化并且拍照记录。

4. 检测 DA 相关因子的相对表达水平

诱导分化培养 13 天后，收集细胞并使用 TRIzol 通用试剂（Tiangen Biotech，中国北京）从细胞中提取总 RNA，并合成互补 DNA（cDNA）。利用 SYBR Green 荧光染料进行实时荧光定量 PCR 以检测细胞中 DA 相关因子 Nurr1、TH-2、Pitx3 的相对表达水平。

（二）实验结果

图 5 为各组细胞 DA 相关因子的表达量对比图。结果表明，在 CBD 和 CBG 中添加 CBN，会进一步提高大麻素组合物激活多巴胺神经细胞活力的效果。其中，当 CBD+CBG+CBN 组合物中的 CBD 和 CBG 质量比为 1: 3 时，TH-2 和 Pitx3 的表达水平均高于 CBD 和 CBG 质量比为 1: 1 时的 CBD+CBG+CBN 组，再一次证明实施例 2 的结论；进一步地，当 CBD: CBG: CBN（质量比）为 1: 3: 0.3 时，TH-2 和 Pitx3 的表达量最高，激活多巴胺神经细胞活力的效果最优。

对本发明实施例 2 编号 8 的组合物进行临床试验，并进行临床观察，具体情况如下：

1. 临床资料

总共 14 名患者，年龄最小者 55 岁，年龄最大者 93 岁。其中男性 5 例，女性 9 例，病程最短者 1 年，最长者约 15 年。其中，帕金森病患者为 10 名，4 名为阿尔茨海默病患者。临床检查：所有病例根据国家、行业协会相关判定标准确诊。

2. 治疗方法

给予根据本发明实施例 2 编号 8 的大麻素组合制备成的药物（舌下滴剂，每瓶 2 ml，每瓶含有活性成分：10 mg CBD+30 mg CBG），每天 1-2 次，临睡前 0.5-1 小时一次，或中午及临睡前各一次。将本品通过舌下含服的形式，含至舌下约 60 秒后吞服。4 周为一个疗程，根据症状不同，疗程使用量不同。

3. 疗效评价标准

改善：患者本人或旁观者、医学检测，显示患者症状有所减轻，或自主行为、意识有所增强；

明显改善：患者本人或旁观者、医学检测，显示患者症状明显减轻，或自主行为、意识明显增强（如帕金森 4 期症状改善至 3 期症状）；

不明显：患者使用后，无论患者本人或旁观者、医学检测，都不认为患者症状有所减轻，或自主行为、意识有所增强。

5. 治疗结果

约 29% 的患者（4 名患者）在使用药品后的第 1 周内症状即得到初步改善，64% 的患者（9 名患者）在 2 周内症状得到改善，79% 的患者（11 名患者）在第一个疗程内病症得到明显改善。截至目前，约 14% 的患者（2 名患

者)改善效果不明显,其中1人使用了2周,另一人使用了5周。改善率约为86%。

所有患者未见明显副作用,约43%的患者(6名患者)报告了部分嗜睡症状。

本发明的病例均是现阶段为初步证明本申请效果所进行的,只是一些志愿者用药,由于帕金森、阿尔兹海默症等神经退行性疾病的特性,对病史及其效果的描述都是病人或病人家属描述,可能有主观的或不够严谨的地方,但病例以及疗效均是真实的。由于病例效果并非医学领域专业人员描述,病例各方面的技术效果不代表权威的医学诊断结果。

病例1

高某:男,85岁,山东日照人,退休医师,2017年确诊帕金森。

病史:自2012年开始,行动迟缓,面部无表情,后愈发严重,精细动作困难,四肢僵硬弯曲,走路小碎步,便秘,头面部出油等,2017年住院检查:面具脸,慌张步态,双手静止性震颤,四肢肌张力过强,四肢肌力5级,确诊为帕金森病。按医生医嘱服药治疗4年以来,震颤有所缓解,但面部表情无改善逐步趋于严重,流口水严重,行走状况缓慢趋于困难,不能离开拐杖行走,自述无力行走。

处理:2021年7月起服用本发明实施例2编号8组合物制备的药物,每日睡前使用一次,一次一瓶。已连续服用5周。

效果:病人服用一周后,眼睛呆滞情况有改善,面部表情有所丰富,在室内行走,有时可脱离拐杖行走,四肢僵硬弯曲有所改善,精细动作明显改善,恢复了中断约2年的自行剪指甲、剥药片等自理能力。病人服药后嗜睡,用喝茶缓解嗜睡。

病例2

徐某:女,83岁,河南郑州人,2019年确诊帕金森。

病史:自2014年开始,病人行动逐渐迟缓,四肢僵直,睡眠时间减少,且出现睡眠紊乱等现象。2018年开始,情况加重明显,走路困难,吐字发音困难,舌头开始出现不易控制等现象。2019年经医院检查确诊为帕金森。

处理:2021年7月起服用本发明实施例2编号8组合物制备的药物,每日睡前使用一次,一次一瓶。已连续服用3周。

效果：病人服用第 2 周自控能力开始增强。流口水、舌头不受控制的状况明显好转，自主站立行走时长增长明显，单次自主行走时间由原来的不到 10 分钟，增长至超过 20 分钟。睡眠时间明显增长，情绪稳定。

病例 3

计某：女，93 岁，黑龙江人，2021 年初确诊帕金森。

病史：自 2015 年开始，四肢僵直、非自主震颤开始发生。2020 年，病情明显加重，无法自主行走，长时间卧床，四肢常出现痉挛，基本无法完成吃饭、吃药等精细动作，情绪不稳定，易怒。2021 年初，经医院诊断确诊为帕金森病。

处理：2021 年 5 月起服用本发明实施例 2 编号 8 组合物制备的药物，每日睡前使用一次，一次一瓶。已连续服用 11 周。

效果：病人服用第 2 周四肢僵直情况明显缓解，非自主性震颤频率、幅度减小，四肢痉挛情况减少。服用 11 周后，患者可自主扶墙站立近 5 分钟。口齿清晰、发音正确，与人交谈趋于正常。睡眠时间增长，情绪稳定。

病例 4

戴某：女，81 岁，马来西亚人，2017 年确诊阿尔茨海默症。

病史：自 2014 年以来，患者出现较严重的记忆力衰退等现象，无法用钥匙开门，喜欢藏东西，多疑。2017 年开始，病情明显加重，出现认知障碍，不认识亲人、朋友，不记得自己刚刚做过的事等。患者治疗先以饮食改善、生活习惯改善等非药物治疗为主，辅以 Donepezil (Aricept, 安理申)；持续一年无明显改善后，改用草药及食疗，但效果还是不理想。

处理：2021 年 5 月起服用本发明实施例 2 编号 8 组合物制备的药物，每日睡前使用一次，一次一瓶。已连续服用 11 周。

效果：病人服用一周后，短期记忆开始增强，可与护工正常聊天。使用约 3-4 周后，记忆开始恢复，认识家人、之前常见的朋友等。目前已经使用 11 周，恢复情况良好，已经可以回忆一年以前的记忆。无报告不良反应。

病例 5

申某：女，68 岁，广东人，2021 年初确诊阿尔茨海默症。

病史：患者因“记忆力减退 3 年余，加重 1 年半”于 2021 年初入院。入院检查尿血常规、肿瘤七项、心肌损伤四联等未见明显异常。颅脑 CT：双侧

基底节区、放射冠多发腔隙性脑梗死；脑白质变性；脑萎缩。颅脑磁 MRI：腔隙性梗塞灶，脑白质变性，脑萎缩。其余检查无明显异常。确诊患阿尔茨海默病，卡巴拉汀胶囊、美金刚等药物治疗持续约 4 个月，无明显改善。

处理：2021 年 5 月起服用本发明实施例 2 编号 8 组合物制备的药物，每日睡前使用一次，一次一瓶。

效果：病人服用后第 3 周，瞬时记忆明显增强，开始可以记得过去 3 天内发生的事情及过去 1 周内发生的主要事件；服用 11 周，记忆力改善明显，日常交谈、回忆等，障碍明显减小。开始日间睡眠，有轻微嗜睡症状。

病例 6

王某：男，87 岁，马来西亚人，2013 年确诊阿尔茨海默症。

病史：自 2007 年以来，患者就有记忆力衰退等现象。2013 年，患者经医院检查确诊阿尔茨海默症，并开始治疗。开始治疗的两年内，记忆力衰退等认知功能衰退现象得到了缓解，但作用很快消退，病情继续恶化。十多年来，治疗对患者病症的恶化起到了一定的延缓作用，然而从未让患者的情况好转。

患者初次与我们见面时，对打招呼的人无反应，且无法理解大多数语言语义，如无法理解“放在舌头下含着”等服药指示。平时卧床或轮椅出行，可站立，但自主行动能力差，基本无生活自理能力。辨识能力差，无法认出自己亲人。

处理：2021 年 6 月起服用本发明实施例 2 编号 8 组合物制备的药物，每日睡前使用一次，一次一瓶。

效果：病人服用 1 周后，开始变得清醒，且明白服药指示等语言。服用 9 周后，恢复情况良好，可以和楼下邻居自如聊天，可介绍自己衣着、购物情况。开始记得孙子手机号，大部分正常交流已趋于正常。

综上所述，本发明通过运用成纤维细胞诱导分化为多巴胺神经细胞模式的实验方法，检测 CBD、CBG、THC 及其组合对成纤维细胞诱导分化成多巴胺能神经元的影响，发现 CBD+CBG 对多巴胺能神经细胞的诱导分化起到的促进效果最优，能显著提高多巴胺神经细胞的生存能力和分泌多巴胺的能力，可用于治疗神经退行性疾病的药物，如帕金森，且不含有成瘾性物质 THC，副作用大大降低；进一步设计 CBD 和 CBG 不同比例组合的实验，发

现 CBD 和 CBG 质量比为 1: 1~1: 5 时, 大麻素组合物能显著提高多巴胺神经细胞的活力, 其中当比例为 1: 3 时, 效果最优; 进一步设计 CBD、CBG 和 CBN 不同比例组合的实验, 结果发现添加 CBN 会进一步提高大麻素组合物激活多巴胺神经细胞活力的效果, 当 CBD: CBG: CBN (质量比) 为 1: 3: 0.3 时, 激活多巴胺神经细胞活力的效果最优。

尽管本发明的内容已经通过上述优选实施例作了详细介绍, 但应当认识到上述的描述不应被认为是对本发明的限制。在本领域技术人员阅读了上述内容后, 对于本发明的多种修改和替代都将是显而易见的。因此, 本发明的保护范围应由所附的权利要求来限定。

权利要求

1. 一种大麻素组合物，其特征在于，所述的大麻素组合物包含：大麻二酚和大麻萜酚，所述的大麻二酚和大麻萜酚的质量比为 1: 1~1: 10 或 1: 0.3~1: 0.5 或 1: 0.5~1: 0.7 或 1: 0.7~1: 1。
2. 如权利要求 1 所述的大麻素组合物，其特征在于，所述的大麻二酚和大麻萜酚的质量比为 1: 1~1: 3 或 1: 3~1: 5 或 1: 5~1: 7。
3. 如权利要求 1 所述的大麻素组合物，其特征在于，所述的大麻二酚和大麻萜酚的质量比为 1: 3。
4. 如权利要求 1 所述的大麻素组合物，其特征在于，所述的大麻素组合物还包含大麻酚。
5. 如权利要求 4 所述的大麻素组合物，其特征在于，所述的大麻二酚和大麻萜酚的质量比为 1: (0.05~1)。
6. 如权利要求 4 所述的大麻素组合物，其特征在于，所述的大麻二酚和大麻萜酚的质量比为 1: (0.1~0.5)。
7. 如权利要求 4 所述的大麻素组合物，其特征在于，所述的大麻二酚、大麻萜酚和大麻酚的质量比为 1: 3: 0.3。
8. 一种根据权利要求 1-7 中任意一项所述的大麻素组合物在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用。
9. 如权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述的神经退行性疾病包括帕金森病、阿尔茨海默症、路易体痴呆中的至少一种。
10. 如权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述的大麻素组合物用于促进多巴胺神经细胞的发育、成熟，防止多巴胺神经细胞脱落，提高多巴胺神经细胞的生存能力。
11. 如权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述的大麻素组合物用于提高多巴胺神经细胞分泌多巴胺的能力。
12. 一种用于治疗神经退行性疾病的药用组合物，其特征在于，所述的药用组合物包括：权利要求 1-7 中任意一项所述的大麻素组合物，以及药学上可接受的载体。
13. 如权利要求 12 所述的药用组合物，其特征在于，所述的药用组合物的剂

型包含油剂、颗粒剂、片剂、散剂、胶囊、丸剂、粉剂、口服液、溶胶剂、
喷剂、雾化剂。

14. 一种用于治疗神经退行性疾病的药盒，其特征在于，所述的药盒中包括：
权利要求 1-7 中任意一项所述的大麻素组合物。