

增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度的药物组合物及其制造方法

技术领域

本发明是关于一种药物组合物，尤指一种口服药物及保健食品。

5

背景技术

荣获 1971 年诺贝尔生理医学奖的科学家 Earl Wilbur Sutherland Jr., 发现了细胞内 cAMP 的作用机制；而荣获 1992 年诺贝尔生理医学奖的科学家 Edmond H. Fischer 及 Edwin G. Krebs, 更进一步发现了细胞内 cAMP→PKA(即
10 cAMPdependent protein kinase)的作用机制；荣获 2000 年诺贝尔生理医学奖的科学家 Eric Kandel, 再更进一步发现了细胞内 cAMP→PKA→CREB 的作用机制。足见细胞内 cAMP 的相关作用，与人类的生理及医学，有绝对而且非常重大的关联；例如，当 Eric Kandel 探究出短期记忆和长期记忆形成的作用机制，是依赖细胞内 cAMP→PKA→CREB 信号转导通路(第二信使转导通路)并
15 荣获诺贝尔奖之后，科学家们认为，这些成果是发明记忆加强药的关键。虽然，科学家们不断努力，企图研发可以迅速活化脑细胞内 cAMP→PKA→CREB 信号转导通路的药物，使人类得以加强记忆力，以提高学习能力，以及预防和治疗健忘、老人痴呆、阿兹海默、帕金森等脑神经退行性疾病，更可以预防和治疗其它体内 cAMP 含量及利用度低下相关疾病，
20 例如忧郁症；但是，1971 年 Earl Wilbur Sutherland Jr. 获得诺贝尔生理医学奖至今，已经超过了 30 年，仍未见任何适于人类长期服用、毒副作用低、有效率高度的相关药物问市。

现有技术中，已问市的 SSRI、SNRI、NDRI 等类的抗忧郁药物，藉由抑制忧郁症病患机体中浓度已较正常人低下的 5-HT、NE、DA 等第一信使神经
25 递质的再摄取，待第一信使神经递质的浓度及与受体之结合趋向较正常之后，

才能从而使病患细胞内 cAMP 第二信使转导递质的生成趋向较正常；但是，副作用高，有效率低，却使抗忧郁药物令人望而生畏。故而，从未听闻有健康的人为了增加记忆力而长期服用抗忧郁药物。

美国国家健康研究院(NIH)的心理健康研究院(NIMH)耗资 3 千 5 百万美元，以 6 年的时间，对于超过 2800 名忧郁症病患，进行 5 种具代表性之 SSRI 类抗忧郁药物(Celexa、Zoloft、Wellbutrin、Effexor、Buspar)的临床有效率 (remission rat)研究(STAR*D study)，结果研究报告指出，每一种药物的有效率仅约 30%，而且平均约须 6 至 7 周才能缓解忧郁症状。更何況，已问市的抗忧郁药物都有不同程度的副作用，例如：增加自杀率、头痛、头晕、晕眩、失眠、嗜睡、耳鸣、口干、厌食、食欲增加、体重上升、血压上升、肠胃不适、反胃、恶心、呕吐、消化不良、腹泻、便秘、下肢痛、皮肤出疹、颤抖、痉挛、多汗、水肿、性欲降低、性无能等。近年来百忧解等抗忧郁药物已成为社会严重关注的问题，美国食品暨药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)更于 2004 年要求药厂将市场上主要的 32 种抗忧郁药物重新标示其副作用和警告的部分，并对医护人员强调这些药物可能增加孩童及青少年自杀的机率。

多年以来，国际医药界的科学家们不断努力研发副作用低、更安全、更有效，可以直接作用在第一信使神经递质的受体之后，更迅速的提高细胞内 cAMP 第二信使转导递质的生成及利用度的药物，以预防和治疗细胞内 cAMP 低下的相关病症。虽然，四型磷酸二酯酶(phosphodiesterase 4, PDE4)的抑制剂罗列普拉(Rolipram)，即属于受体后作用机制调节类药物，且试验表明它具有明显的抗忧郁作用，原因是细胞内生成的 cAMP 会被四型磷酸二酯酶降解，而抑制了四型磷酸二酯酶就提高了 cAMP 的利用度；但是，由于服用罗列普拉会出现强烈呕吐等副作用，故而并未能被广泛应用。

本人为了解决前述技术之不足，与张作光先生合作潜研成功一种采用人参、甘草及大枣 3 种天然植物为原料制成的药物组合物，不仅可以使细胞内 cAMP 含量升高，还可抑制磷酸二酯酶以减少 cAMP 的降解而增加 cAMP 的利用度，并可提高脑内 DA 和 NE 等神经递质的浓度，而且长期服用安全性高，适于治疗必须长期服药的忧郁症，当然也适于预防及治疗细胞内 cAMP 低下，以及脑内 DA 和 NE 等神经递质不足的相关病症。然而，天然植物因为生长期的不同、产地的不同、采收季节的不同，保存方式的不同，以及气候变迁温度、雨水、阳光等等因素，所以每一批天然植物原料中，可以提高 cAMP 的生成及利用度之有效成份的含量，均不可能相同；故而，有效成份愈明确，则愈能藉由控制及配比有效成份的含量，使每一次生产之药物组合物的有效性及安全性更趋一致化，以提升药物组合物的质量可控性(CMC)；再者，倘能更明确化有效成份中人参皂甙的种类，即可以扩大原料取得的范围，使原料不致匮乏，因为除了人参的根、茎、叶之外，例如三七、西洋参等植物的根、茎、叶亦含有多种人参皂甙可以利用。于是，本人与张作光先生为了进一步提升该药物组合物的质量可控性(CMC)，以及扩大原料取得的基源，遂在原研发成果的基础之上，继续努力研究更明确化之主要功效成份及作用机制，而研发成功主要功效成份更明确之人参皂甙 Rg1、Rb1、甘草酸(甘草次酸)及大枣 cAMP 的药物组合物，且系多靶标受体后作用机制调节类药物，而选择采用人参皂甙 Rg1、Rb1 为主要功效成份，更可以强化 BDNF 的表达。

但是，除了人参皂甙 Rg1、Rb1 之外，倘若能够再进一步利用人参、三七、西洋参等植物的根、茎、叶含有之其它种类的人参皂甙，协助人参皂甙 Rg1、Rb1，达成前述药物组合物的有效性，则可以更进一步增加天然植物原料中有效成份的利用度及降低成本。此外，前述药物组合物中含有甘草酸类

成份，而自古以来中医早已确定，有呕吐问题的人倘服用甘草，恐会诱发其呕吐之问题。

因此，本人继续努力在原研发成果基础上，悉心研究与探索，以更进一步改良现有技术及其中之缺失，并一本锲而不舍之精神，终构思出本案之“可
5 迅速增加体内 cAMP 含量及利用度之药物组合物”，以下为本案之简要说明。

发明内容

为了克服现有技术的不足，本发明的目的在于提供一组包含以人参皂甙
(Rg1+Rb1 + Re)、甘草酸及大枣 cAMP 为主要成份，制成迅速增加体内环
10 腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物，特别是能更进一步增加天然植物原料中有效成份的利用度及降低成本，并以稳定的质量提供可迅速强化细胞内 cAMP/PKA/CREB 信号转导通路，以及强化 BDNF 表现量的口服药物或保健食品的新技术方案。

本发明药物组合物的解决方案是经本人潜心研究探索并采用实施例进行
15 充分实验后证明之结果，由于先前技术实验证明人参皂甙 Rg1 与 Rb1 可以增加体内 BDNF 的表达，故而可用以作为研制相关药物的主要功效成份；但是目前技术尚未能人工合成人参皂甙 Rg1 与 Rb1，故而必须从人参、三七、西洋参等天然植物的根、茎、叶中取得。由于人参皂甙的种类多达 30 种以上，为了能更进一步增加天然植物原料中有效成份的利用度及降低成本，故而发
20 明人潜心研究探索后，可以采用人参皂甙 Re 协同人参皂甙 Rg1、Rb1，并与甘草酸(甘草次酸)及大枣 cAMP 配伍作为主要功效成份制成药物组合物，在进行充分实验后证明，本发明可以在正常大鼠服用 8 小时后，既提高海马组织中 cAMP 浓度，且增强 PKA 活性，并提高 CREB 磷酸化水平；尚可以抑制大鼠脑海马组织中 PDE 的活性；且慢性重复应激实验，服用的小鼠脑海马
25 组织中 cAMP 浓度、PKA 活性、CREB 磷酸化的表达，以及 BDNF 的表达，

均明显高于未服用之模型组的小鼠；而慢性重复应激实验，服用的大鼠海马组织中 cAMP、PKA，以及血清 BDNF 和下丘脑 5-HT、NE、DA 等单胺递质的表达，亦明显高于未服用之模型组的大鼠；由此可以证实，本发明之药物组合物可以迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度。足见本发明具有良好的有效性，而且比先前技术更进一步增加天然植物原料中有效成份的利用度及降低成本，并且可以有效地执行质量可控制性（CMC）。此外，由于本发明长期服用安全性高，且适于治疗必须长期服药的忧郁症，以及预防及治疗体内及细胞中 cAMP 低下、BDNF 表现量低下、脑内 DA 和 NE 等神经递质不足等的相关病症(例如：记忆力不足、老人痴呆、阿兹海默、帕金森等脑神经退行性疾病，以及牛皮癣、癌症等体内及细胞中 cAMP 低下之疾病等等)，适用人群广泛；但是，因为药物组合物中含有甘草酸类成份，而自古以来中医早已确定，有呕吐问题的人倘服用甘草，恐会诱发其呕吐；然而，自古以来中医也早已确定，长期服用安全性高的生姜是止吐圣品；故而，本发明之药物组合物，还可以加入生姜粉或其萃取物，以改善先前技术之不足。

本发明是揭露一种迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物，它是由包括含有人参皂甙（Rg1+Rb1 + Re）、甘草酸及大枣 cAMP 等主要功效成份的原料所制成。

本发明说明书和申请专利范围中所述之迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物，是实现本发明目的的核心内容，在本发明公开后，本领域的技术人员对上述药物进行常规的加减化裁，均属于本领域技术和研究人员的一般性技术活动，故其都在本发明的保护范围之内。

本发明得藉参阅如附图示及详细说明而获较佳了解。

附图概述

图 1 为制备本发明实施例一药物的方法流程示意图。

图 2 为制备本发明方案二药物的方法流程示意图。

图 3 为制备本发明方案三药物的方法流程示意图。

图 4 为制备本发明方案四药物的方法流程示意图。

图 5 为给药 8h 后，大鼠海马组织中 Cyclic AMP 的含量变化图。

- 5 图 6 为测定 cAMP-Dependent PKA 活性试验中典型的凝胶电泳照片（泳道自左至右 1-4 生理盐水组；5-8 帕罗西汀组；9-11 实施例一组；12 正对照样本；13 负对照样本）。

图 7 为给药 8h 后，大鼠海马组织中 cAMP-Dependent PKA 活性差异图。

图 8 为给药 8h 后，大鼠海马组织中 p-CREB 的含量变化图。

- 10 图 9 显示实施例一对于重复应激小鼠海马 cAMP 浓度的影响。

图 10 显示实施例一对于慢性应激小鼠海马 PKA 活性的影响。

图 11 显示实施例一对于慢性应激小鼠海马 CREB 磷酸化的影响。

图 12 显示实施例一对于慢性应激小鼠海马 BDNF 的影响。

15 本发明的较佳实施方式

以下将结合附图和实施例进一步说明本发明。本发明主要是采用本领域技术人员公知的方法结合本发明的特征制备本发明所述的药物。以下实施例仅仅是为了说明，并非限定本发明。

为了完成本发明的目的，本发明特别提出下列技术方案。

- 20 本发明是揭露迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物，它是由包括含有人参皂甙（Rg1+Rb1 + Re）、甘草酸及大枣 cAMP 等主要功效成份的原料所制成。

方案一：

- 25 以含有人参皂甙（Rg1+Rb1+Re）、甘草酸或甘草次酸及大枣 cAMP 的原料，加工制成本发明迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物。

方案二:

以含有人参皂甙 (Rg1+Rb1+Re) 合计 2~26 重量份、甘草酸或甘草次酸 3~48 重量份及大枣 cAMP 0.002~0.5 重量份的原料,加工制成本发明的药物组合物。

5 方案三:

以含有人参皂甙 (Rg1+Rb1+Re) 合计 4~13 重量份、甘草酸或甘草次酸 5~16 重量份及大枣 cAMP 0.01~0.1 重量份的原料,加工制成本发明的药物组合物。

方案四:

10 本发明之药物组合物包括可以加入生姜水萃取物。

方案五:

本发明之药物组合物包括可以含有药学上可接受的载体或添加剂,可以制成锭剂、胶囊剂、散剂等任何药剂学上所公知的口服药物剂型。

方案六:

15 本发明所述的药物组合物可用来制成迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物、保健食品和营养剂。

为了完成本发明的目的,特提出以下药物的制作方法。

方法一:

20 分别自人参、甘草及大枣中,萃取含有人参皂甙 (Rg1+Rb1+Re)、甘草酸及大枣 cAMP 的萃取物为原料,或直接采用已制备成的含有人参皂甙 (Rg1+Rb1+Re)、甘草酸或甘草次酸及大枣 cAMP 的原料,加工制成本发明迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物。

方法二:

将含有人参皂甙 (Rg1+Rb1+Re) 合计 2~26 重量份、甘草酸或甘草次酸 3~48 重量份及大枣 cAMP 0.002~0.5 重量份的原料,加工制成本发明的药物组合物。

方法三:

- 5 将含有人参皂甙 (Rg1+Rb1+Re) 合计 4~13 重量份、甘草酸或甘草次酸 5~16 重量份及大枣 cAMP 0.01~0.1 重量份的原料,加工制成本发明的药物组合物。

方法四:

本发明之药物组合物包括可以加入生姜水萃取物。

- 10 方法五:

本发明所述的药物组合物包括可以含有药学上可接受的载体或添加剂,可以制成锭剂、胶囊剂、散剂等任何药剂学上所公知的口服药物剂型。

方法六:

- 15 将本发明所述的原料依食品管理标准或依保健食品生产制造标准的方法,加工制成本发明迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度的保健食品或营养剂。

具体实施例

以下将结合附图和具体实施案例进一步说明本发明。

- 20 实施例一

请参阅图 1,为制备本发明实施例一药物的方法流程示意图。在第一图中,将 40 kg 的人参破碎后用 70%乙醇溶液加温萃取,经上柱层析分离纯化、干燥,得含 270g 人参皂甙 Rg1+Rb1+Re(Rg1 约 48.4g、Rb1 约 176.9g、Re 约 44.7g)之人参萃取物 1.42 kg;并将 15kg 的甘草破碎后常温浸泡 12 小时,以

水提醇沉法萃取、浓缩干燥，得含甘草酸 307 g 的甘草萃取物 3.1 kg；且将 10 kg 的大枣破碎后加水常温浸泡，再以水提醇沉法萃取获得大枣萃取液，再用大孔树脂 OU-2、ME-2 两柱先后连续上柱吸附分离、干燥，得含大枣 cAMP 0.752 g 的大枣萃取物 40 g 作为原料供制备本发明药物；之后，将上述方法得
5 到的人参萃取物 144 g、甘草萃取物 300 g 及大枣萃取物 3.6 g 粉碎混合均匀后，得 447.6 g (含 27.4g 人参皂甙 Rg1+Rb1+Re, 以及 29.7g 甘草酸, 以及 0.067g 大枣 cAMP) 本发明方案一的药物组合物。

实施例二

请参阅图 2，为制备本发明实施例二药物的方法流程示意图。在第二图
10 中，将实施例一得到的人参萃取物 120 g 及甘草萃取物 200 g 及大枣萃取物 0.5 g 粉碎混合均匀后，得 320.5 g (含 22.8 g 人参皂甙 Rg1+Rb1+Re、19.8 g 甘草酸及 0.009g 大枣 cAMP) 本发明方案二的药物组合物。

实施例三

请参阅图 3，为制备本发明实施例三药物的方法流程示意图。在第三图
15 中，将已制备成的 3.6g 纯度为 90% 的人参皂甙 Rg1、3.2g 纯度为 90% 的人参皂甙 Re、15.6g 纯度为 90% 的人参皂甙 Rb1 及 26 g 纯度为 96% 的甘草次酸及实施例一得到的大枣萃取物 10 g 粉碎混合均匀后，得 58.4 g (含 22.4g 人参皂甙 Rg1+Rb1、26 g 甘草次酸及 0.188g 大枣 cAMP) 本发明方案三的药物组合物。

20 实施例四

请参阅图 4，为制备本发明实施例四药物的方法流程示意图。在第四图中，将实施例一得到的本发明方案一的药物组合物 100g，与市售的生姜萃取物 35g 混合均匀后，得 135g 本发明方案四的药物组合物。

实验例一：正常大鼠给药实施例一8小时，对cAMP/PKA/CREB信号转导通路影响之动物实验。

正常大鼠灌胃给药实施例一8h后分取海马组织，用酶联免疫法（ELISA）测定海马组织中的环磷酸腺苷（Cyclic AMP）、磷酸化Cyclic AMP 反应组件结合蛋白（p-CREB）的含量变化，生物发光法（Bioluminescent）测定磷酸蛋白激酶A（cAMP-Dependent PKA）的活性变化，荧光法测定磷酸二酯酶（Phosphodiesterase, PDE）的活性变化，揭示实施例一给药8h后短时间内提高Cyclic AMP 浓度，从而增强cAMP-Dependent PKA 活性，提高CREB 磷酸化水平，且可抑制脑海马组织中PDE 活性之分子药理学机制。试验数据采用Oringin Pro 7.5 软件统计分析作图。

1. 试验材料

1.1 试验动物

健康雄性SD 大鼠，体重180-200g，70 只，购于北京维通利华动物试验中心。

1.2 试剂

阳性对照药物，抗忧郁剂盐酸帕罗西汀（批号：08030078，中美天津史克制药有限公司）；Parameter Cyclic AMP Assay Kit, KGE002（美国R&D Systems, Inc.）；DuoSet IC Human/Mouse/Rat Phospho-CREB (S133) ELISA Kit, DYC2510-2（美国R&D Systems, Inc.）；PepTag Assay for Non-Radioactive Detection of cAMP-Dependent Protein Kinase Kit, V5340（美国Promega Corporation.）；PDE-Glo Phosphodiesterase Assay Kit, V1361（美国Promega Corporation.）；Pierce BCA Protein Assay Kit, 23227,（美国Thermo）；环磷酸腺苷、腺苷等对照品购自中国药品生物制品检定所；NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、KH₂PO₄、KCl、NaCl、MgCl₂、Tris Base、Tris-HCl 等试剂均为

细胞培养级生化试剂,购自美国Sigma 公司;E-64、APROTININ、LEUPEPTIN、Pepstatin A、PMSF、NaF、EDTA、EGTA、DTT、NaVO₄、Sodium pyrophosphate、琼脂糖、甘油等试剂均为高纯级,购自加拿大BioBasic公司;乙腈、甲醇(色谱纯,德国 MERCK 公司);超纯水(MilliQ 纯水);实施例一。

5 1.3 试验仪器

FlexStation 3 多功能微孔板分析仪(美国 Molecular Devices Corporation.); Waters600E 高效液相色谱仪(四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、紫外检测器,美国Waters 公司);冷冻离心机(美国BECKMAN 公司);电子超声匀浆器(美国UNTRASOUND TECHNOLOGY 公司);电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶成像仪(SYN GENE 公司); ULTRA LOW 超低温冰箱(日本SANYO 公司); mLine 单道移液器、8 道移液器(芬兰 Biohit 公司)。

2. 给药

大鼠适应性饲养三天后,随机分为3 个组,分别标记为:A 生理盐水组、B 帕罗西汀组、C 实施例一组。盐酸帕罗西汀片碾碎,用超纯水配成一定浓度的混悬液,大鼠灌胃给药剂量为5mg/kg;实施例一取其内容物用水配成一定浓度的溶液,大鼠灌胃给药剂量为50mg/kg;生理盐水组给予等体积的0.9%生理盐水;给药之前所有大鼠称重并用苦味酸标记,所有药物均在37℃下预热30min 后给药。

20 3. 取材

A、B、C 三组试验动物给药8h 后,乙醚麻醉,股动脉放血处死,冰上断头取脑,分取海马组织,精细切割成三份,分别置于预先编号标记的1.5mL 彩盖螺口冻存管中,准确称重后迅速投入液氮中速冻15min,再置于-80℃冰箱中保存备用。

4. 样本检测

4.1 大鼠海马组织中Cyclic AMP 含量测定:

将海马组织样本解冻, 用少量生理盐水冲洗, 再按1:20 (g: mL) 的比例加入试剂盒提供的细胞裂解液 (将5 倍浓缩液稀释后使用), 电子超声匀浆器匀浆30s, 4℃ 下10000rpm 冷冻离心5min, 取上清液置于预先编号的1.5mL 彩色Eppendorf 离心管中, 置于冰盒内, 待测。应用美国R&D Systems 公司Parameter Cyclic AMP Assay ELISA试剂盒进行样本检测。将样品恢复至室温, 按试剂盒说明书采用竞争性ELISA 法测定样品中Cyclic AMP 含量。用多孔板分析仪在450nm 下测定OD 值, 根据标准曲线计算出样本中Cyclic AMP 含量。

4.2 大鼠海马组织中cAMP-Dependent PKA 活性测定:

将海马组织样本解冻, 用少量生理盐水冲洗, 再按1:10 (g: mL) 的比例加入PKA extraction buffer (按照试剂盒中配方配制), 电子超声匀浆器匀浆30s, 4℃下 10000rpm 离心5min, 取上清液置于预先编号的1.5mL 彩色Eppendorf 离心管中, 置于冰盒内, 待测。应用美国Promega 公司PepTag Assay for Non-Radioactive Detection of cAMP-Dependent Protein Kinase试剂盒进行检测分析。在预先编号的200μL PCR 八联管中按照试剂盒说明书加入预混的试剂, 分别取9μL 各样本对号加入各管中, 涡旋混匀, 离心, 室温反应30min, 然后置于PCR仪中98℃ 5min 对酶进行灭活。试验中按照说明书要求分别设置正对照与负对照管, 随行试验。制备0.8%的琼脂糖凝胶, 将酶反应后的样本各取10μL 加入凝胶的梳孔中, 100V, 130mA 电泳30min, 电泳液为50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液。电泳后将琼脂糖凝胶取出, 凝胶成像仪照相, 然后置于紫外分析仪上, 将已磷酸化反应的PepTag A1 Peptide 斑点切下, 分别置于预先编号标记的1.5mL 彩盖螺口冻存管中。加热使琼脂糖凝胶融化, 用超

纯水定容到250 μ L，迅速取出125 μ L加入预先编号的1.5mL 彩色Eppendorf 离心管中，再加入75 μ L 试剂盒提供的溶胶液和50 μ L 冰醋酸，涡旋混匀，取200 μ L 加入96 孔酶标板中，以负对照管正极方向琼脂糖为空白对照，在多孔板分析仪上进行荧光分析。设定Excitation Wavelength 568nm，Emission Wavelength 592nm。以样本荧光强度表示PKA 活性。

4.3 大鼠海马组织中p-CREB 含量测定：

应用美国 R&D Systems 公司 DuoSet IC Human/Mouse/Rat Phospho-CREB(S133)ELISA 试剂盒进行样本检测。将海马组织样本解冻，用少量生理盐水冲洗，再按1:20 (g: mL) 的比例加入组织匀浆液（按照试剂盒中IC DELUENT 6#配方配制），电子超声匀浆器匀浆30s，4 $^{\circ}$ C下10000rpm 离心5min，取上清液置于预先编号的1.5mL 彩色Eppendorf 离心管中，置于冰盒内，待测。测定时将样品恢复至室温，按试剂盒说明书采用sandwich ELISA 法测定样品中p-CREB 含量。用多孔板分析仪在450nm 下测定 OD 值，根据标准曲线计算出样本中p-CREB 含量。

4.4 大鼠海马组织中总蛋白测定：

为了更准确标定样本中每毫克蛋白所含的p-CREB 蛋白的量，需要对样本的总蛋白含量进行测定。取p-CREB 测定试验中的组织匀浆离心后的上清液，用PBS 稀释25倍后，作为测试样本，按照Pierce BCA Protein Assay Kit 试剂说明书，用多孔板分析仪在562nm 下测定OD 值，以牛血清白蛋白(BSA) 为标准品，根据标准曲线计算出样本中总蛋白含量。

4.5 磷酸二酯酶(PDE)活性测定：

使用美国Promega 公司生物发光法 (Bioluminescent) PDE-Glo Phosphodiesterase Assay 试剂盒测定实施例一对大鼠脑海马组织中PDE 活性的影响。

4.5.1 药液配制:

实施例一取内容物配制成0.02mg/mL、0.05mg/mL 和1.0mg/mL三个浓度。

4.5.2 样品制备:

取一定量的海马组织，少量生理盐水冲洗后，按1:10 (g: mL) 的比例加入PDE-Glo Reaction Buffer (Tris-HCl 40mM, MgCl₂ 10mM, BSA 0.1mg/ml, 另加入PMSF 1mM, leupetin 2μM/mL, aprotinin 2μM/mL, E-64 2μM/mL) , 电子超声器匀浆, 4℃下14000rpm 离心30 分钟, 取上清液作为酶液, 备用。

4.5.3 生物发光法测定:

按照试剂盒说明书提供的方法进行操作, 酶反应液部分, 加入1μL 药液, 1.5μL酶液, 共2.5μL; 加入含有2μmol Cyclic AMP的底物溶液2.5μL, 混匀, 37℃反应30min, 然后加入含有PDE 强抑制剂IBMX 的反应终止溶液2.5μL, 混匀; 加入测试溶液2.5μL, 混匀, 室温反应20min; 最后加入发光试剂10μL, 室温反应10min后在多功能微孔板分析仪上进行测试。

5. 试验结果

5.1 大鼠海马组织中 Cyclic AMP 含量:

用ELISA法测定了大鼠海马组织匀浆液中Cyclic AMP浓度, 除以称量的组织样本重量, 得到海马组织中含有的Cyclic AMP的含量, 以pmol / g Tissue表示 (图5)。

请参阅图5, 实施例一组与生理盐水组和帕罗西汀组比较, 大鼠海马组织中Cyclic AMP的含量显著升高, *P<0.05, n=10。

5.2 大鼠海马组织中 cAMP-Dependent PKA 活性:

酶反应后, 样本进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪照相, 进行粗略分析。

请参阅图6, 磷酸化的A1 肽带有负电荷, 向正极方向移动; 未磷酸化的A1 肽带有正电荷, 向负极方向移动, 将二者分开。其中向正极方向移动的

已磷酸化的A1肽斑点亮度越高，表明磷酸化水平越高，样本中cAMP-Dependent PKA 活性越高。图中可见实施例一组样本正极方向斑点亮度较生理盐水组和帕罗西汀组亮度更高。

切割琼脂糖凝胶斑点，熔胶后定容，以荧光法测定大鼠海马组织中cAMP-Dependent PKA 活性，以荧光强度表示（图7）。

请参阅图7，给药8h 后，实施例一组与空白对照组和帕罗西汀组比较，大鼠海马组织中cAMP-Dependent PKA 活性显著升高，* $P < 0.05$ ， $n = 10$ 。

5.3 大鼠海马组织中p-CREB 含量：

采用BCA 法测定了大鼠海马组织样本匀浆液中总蛋白的浓度，以标定每10 μg 总蛋白中含有p-CREB 的量。再采用sandwich ELISA 法测定了大鼠海马组织样品匀浆液中p-CREB 浓度，并以 p-CREB (pg) /总蛋白 (μg) 表示大鼠海马组织中p-CREB含量，结果见图8。

请参阅图8，给药8h 后，实施例一组与生理盐水组和帕罗西汀组比较，大鼠海马组织中p-CREB 的含量升高， $n = 10$ 。

15 5.4 药物对大鼠海马组织中磷酸二酯酶(PDE)活性影响：

用生物发光法测定了海马组织中PDE 的活性以及体外给予药物后对PDE 活性的抑制作用。以发光强度表示PDE 活性，与对照组比较，发光强度较高，说明PDE 活性较高；发光强度较低，说明PDE 活性被抑制；测定的结果显示，与空白对照组相比，实施例一(0.5mg/ml) 明显抑制了大鼠海马20 组织中PDE的活性，* $P < 0.05$ ， $n = 4$ 。

6、 结论

（1）大鼠灌胃给药8 小时后，与生理盐水组和帕罗西汀组比较，实施例一组大鼠脑海马组织中的Cyclic AMP 含量显著升高；cAMP-Dependent PKA 活性显著增强；p-CREB含量也有提高。

(2) 本实验证实了实施例一可以通过第二信使Cyclic AMP 细胞信号转导通路发挥药理作用, 并在给药8 小时后即可快速启动cAMP-PKA-CREB (p-CREB) 通路(与生理盐水组和帕罗西汀组相比有显著差异, $*P < 0.05$)。

(3) 同样8小时给药, 阳性对照药帕罗西汀并不能启动cAMP-PKA-CREB (p-CREB) 通路。

(4) 本实验结果尚且表明, 实施例一中剂量组可显著抑制大鼠海马组织中磷酸二酯酶的活性, 由于磷酸二酯酶是Cyclic AMP 的灭活酶, 其受到抑制后可使大鼠海马组织中Cyclic AMP 含量升高。

10 实验例二: 慢性应激小鼠给药实施例一10天, 对cAMP/PKA/CREB信号转导通路及BDNF表达量影响之动物实验。

1. 实施例一对于重复应激小鼠海马cAMP浓度的影响(图9):

图9显示结果: 给药实施例一的小鼠海马cAMP浓度, 明显高于未给药的模型组, $*P < 0.05$ 。

15 2. 实施例一对于慢性应激小鼠海马PKA活性的影响(图10):

图10显示结果: 给药实施例一的小鼠海马PKA活性, 明显高于未给药的模型组, $*P < 0.05$ 。

3. 实施例一对于慢性应激小鼠海马CREB磷酸化的影响(图11):

20 图11显示结果: 给药实施例一的小鼠海马CREB磷酸化的表达, 明显高于未给药的模型组。

4. 实施例一对于慢性应激小鼠海马BDNF的影响(图12):

图12显示结果: 给药实施例一的小鼠海马内BDNF的表达, 明显高于未给药的模型组。

实验例三：慢性应激大鼠给药实施例一21天，对海马cAMP、PKA以及血清BDNF和下丘脑NE、DA、5HT等表达量影响之动物实验。

1. 实施例一对于慢性应激大鼠海马及皮质cAMP浓度的影响(表1):

表1: 各组大鼠海马及皮质cAMP表现量

组别	例数	给药剂量 (mg/kg/d)	海马 (pmol/ml)	皮质 (pmol/ml)
正常组	8	-	72.650±2.9017	67.650±4.0715
模型组	8	-	64.950±7.6459	57.825±5.8004
实施例一大剂量组	8	60	69.887±7.2155	66.850±5.0844
实施例一中剂量组	8	30	71.400±6.0233	66.975±6.6626
实施例一小剂量组	8	15	69.113±5.4286	65.388±8.0920

5

2. 实施例一对于慢性应激大鼠海马PKA含量的影响(表2):

表2: 各组大鼠海马PKA含量

组别	例数	给药剂量 (mg/kg/d)	海马 (μ mol/ml)
正常组	8	-	26.4988±2.75623
模型组	8	-	21.4936±3.01990
实施例一大剂量组	8	60	25.8763±3.48088
实施例一中剂量组	8	30	25.9150±4.77464
实施例一小剂量组	8	15	26.0025±4.87687

3. 实施例一对于慢性应激大鼠血清BDNF含量的影响(表3):

表3: 各组大鼠血清BDNF含量

组别	例数	给药剂量 (mg/kg/d)	BDNF (pg/ml)
正常组	8	-	111.00±45.28

10

模型组	8	-	72.57±19.49
实施例一小剂量组	8	15	102.90±18.70
实施例一中剂量组	8	30	110.14±31.64
实施例一大剂量组	8	60	91.53±39.93

4. 实施例一对于慢性应激大鼠下丘脑单胺类神经递质表达量的影响(表4):

表4: 各组大鼠下丘脑单胺类神经递质表达量

组别	例数	剂量 mg/kg/d	5HT /ngg1湿组织	NE /ngg1湿组织	DA /ngg1湿组织
正常组	11	-	1038.03±458.63	4254.74±1334.95	546.04±329.18
模型组	11	-	324.22±89.44	2572.61±707.43	229.40±109.74
实施例一小剂量组	11	15	990.45±261.38	4128.42±1608.56	477.27±274.74
实施例一中剂量组	11	30	857.52±273.55	3822.10±1295.65	473.60±269.23
实施例一大剂量组	11	60	857.28±293.29	3566.67±501.30	373.03±141.25

5. 结论:

给药实施例一的大鼠海马cAMP、PKA, 以及血清BDNF和下丘脑5-HT、NE、DA等单胺递质的表达, 明显高于未给药的模型组(*P<0.05)。

实验例四: 实施例一抗抑郁药效学动物实验。

10 1. 行为学动物实验:

抑郁症的发病机制及临床症状, 本人选择了小鼠悬尾、大鼠强迫游泳、小鼠强迫游泳、大鼠不可预测性长期应激、大鼠嗅球破坏模型等抗抑郁行为学动物实验。

1.1 实施例一灌胃给予小鼠20mg/kg/d、40 mg/kg/d、80 mg/kg (大鼠15 mg/kg/d、30 mg/kg/d、60 mg/kg/d)，连续1周，即可表现出抗试验性抑郁的功效，其中中剂量组(小鼠40 mg/kg/d、大鼠30 mg/kg/d)与阳性药帕罗西汀组(3 mg/kg/d)均可明显缩短悬尾小鼠不动时间，明显缩短强迫游泳小鼠、
5 大鼠的不动时间，与模型组相比具有明显的统计学差异($P<0.05$)。

1.2 实施例一灌胃给予慢性应激抑郁模型(CUMS)大鼠15 mg/kg/d、30 mg/kg/d、60mg/kg/d，连续21天，结果：与正常组相比，模型组(CUMS)大鼠体重增长缓慢，蔗糖水消耗量明显下降($P<0.01$)，水平活动和垂直活动均显著下降($P<0.01$)，大鼠跳台错误次数明显增加($P<0.01$)。与模型
10 组相比，实施例一小剂量组和阳性药帕罗西汀组大鼠体重增长显著提高、蔗糖水消耗量明显增加($P<0.01$)，实施例一小剂量组和阳性药帕罗西汀组大鼠水平和垂直活动明显增加($P<0.01$)，实施例一小剂量组和阳性药帕罗西汀组跳台错误次数明显减少($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。

1.3 实施例一灌胃给予嗅球破坏模型大鼠15mg/kg/d、30mg/kg/d、
15 60mg/kg/d，连续24天，在开野箱试验中实施例一大剂量组与模型组相比，可明显改善嗅球毁损所造成的大鼠水平及垂直运动减少，阳性参照药帕罗西汀(3mg/kg/d)也可以明显改善嗅球毁损所造成的大鼠水平运动减少；在被动回避试验中实施例一大、中剂量组和阳性药帕罗西汀组与模型组相比，均可明显改善嗅球毁损所造成的大鼠学习及记忆功能减退。

20 2. 相互作用模型动物实验：

根据抑郁症的发病机制及临床症状，本人选择了小鼠利血平模型(体温下降、运动不能、眼睑下垂)和五羟色氨诱导小鼠甩头等试验。

2.1 实施例一灌胃给予小鼠20mg/kg/d、40 mg/kg/d、80 mg/kg/d (大鼠15 mg/kg/d、30mg/kg/d、60 mg/kg/d)，连续1周，可明显拮抗利血平诱导的小
25 鼠体温下降、运动不能及眼睑下垂，表明实施例一抗试验性抑郁作用可能与

影响单胺递质有关；可明显增加小鼠注射五羟色氨酸后的甩头次数，表明实施例一抗抑郁作用可能与抑制MAO 有关。此外，由于试验结果表明实施例一对小鼠自主活动无明显影响，实施例一无中枢兴奋作用。

3. 实施例一主要抗抑郁药效学实验结果整理如下表(表5):

5

(表5)

项目	试验模型/方法	给药量 (mg/kg)	给药情况 (途径/时间/频次/起效剂量)	主要结果
1.1	大鼠强迫游泳试验	60 30 15	口服/7天/每日2次/15mg/kg (* P < 0.05)	可明显缩短大鼠强迫游泳累积不动时间
1.2	小鼠强迫游泳试验	80 40 20	口服/7天/每日2次/40mg/kg (** P < 0.01)	可明显缩短小鼠强迫游泳累积不动时间
1.3	小鼠悬尾试验	80 40 20	口服/7天/每日2次/20mg/kg (* P < 0.05)	可明显缩短小鼠悬尾累积不动时间
1.4	小鼠自主活动试验	80 40 20	口服/7天/每日2次	对小鼠自主活动无明显影响
2.1	大鼠不可预测性长期应激试验：体重测定	60 30 15	口服/7天/每日1次/15mg/kg (** P < 0.01)	可明显提高不可预测性长期应激大鼠的体重增长。
2.2	大鼠不可预测性长期应激试验：蔗糖水摄入量测定	60 30 15	口服/7天/每日1次/15mg/kg (** P < 0.01)	可明显改善不可预测性长期应激大鼠饮蔗糖水量减少
2.3	大鼠不可预测性长期应激试验：	60 30	口服/7天/每日1次/15mg/kg (* P < 0.05)	可明显改善不可预测性长期应激大鼠

	敞箱法测定模型大鼠自主活动试验	15		水平及垂直运动的减少
2.4	大鼠不可预测性长期应激试验：跳台法测定大鼠行为变化	60 30 15	口服/7天/每日1次/15mg/kg (* P < 0.05)	可明显减少不可预测性长期应激大鼠跳台错误次数
2.5	不可预测性长期应激模型大鼠脑内单胺递质 (NE、5-HT等) 的测定	60 30 15	口服/7天/每日1次/15mg/kg (** P < 0.01)	可明显增加模型大鼠大脑皮质中NE、5-HT及DA 含量。
3.1	嗅球破坏模型试验：敞箱法测定大鼠自主活动试验	60 30 15	口服/7天/每日1次/30mg/kg (* P < 0.05)	可明显改善嗅球毁损所造成的大鼠水平及垂直运动增加
3.2	嗅球破坏模型试验：测定大鼠被洞回避试验	60 30 15	口服/7天/每日1次/30mg/kg (* P < 0.05)	对嗅球毁损所造成的大鼠学习及记忆功能减退有明显改善作用。
4.1	利血平模型试验：小鼠体温下降	80 40 20	口服/7天/每日2次/40mg/kg (** P < 0.01)	可明显拮抗体利血平诱导的体温下降。
4.2	利血平模型试验：小鼠运动不能 (木僵状态)	80 40 20	口服/7天/每日2次/40mg/kg (** P < 0.01)	可明显拮抗体利血平诱导的运动不能。
4.3	利血平模型试验：小鼠眼睑下垂	80 40 20	口服/7天/每日2次/40mg/kg (** P < 0.01)	可明显拮抗体利血平诱导的眼睑下垂。

4.4	五羟色氨诱导小鼠甩头试验	80 40 20	口服/7天/每日1次/40mg/kg (** P < 0.01)	可明显增加小鼠注射五羟色氨酸后的甩头次数。
备注：1、实施例一与模型组相比*P < 0.05, **P < 0.01。 2、阳性对照药：帕罗西汀，小鼠给药剂量3mg/kg/d，大鼠2mg/kg/d（除悬尾试验**外，其它均为*）。				

4. 结论：实施例一具有明显抗试验性抑郁作用。

各项实验例的结果显示：

（1）大鼠灌胃给药实施例一8 小时后，与生理盐水组和帕罗西汀组比较，
5 海马组织cAMP 显著升高、PKA 活性显著增强（*P < 0.05），p-CREB 含量也有所升高，PDE4 的活性受到明显抑制（*P < 0.05）。

（2）慢性应激小鼠灌胃给药实施例一10 天后，可以显著提高由于重复应激导致的海马cAMP、PKA 的下降，促进小鼠海马内磷酸化CREB 和BDNF 的表达（*P < 0.05）。

10 （3）慢性应激大鼠灌胃给药实施例一21 天后，可显著提高由于重复应激导致的海马cAMP、PKA 的下降，促进血清BDNF和下丘脑NE、5-HT等单胺递质的表达（*P < 0.05），下调血清GSC。

（4）实施例一具有明显抗试验性抑郁作用。

15 本发明迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物的应用范围：

1.本发明所述的迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物中，可以含有药物学上可接受的添加剂；

2.本发明所述的迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物

可以将其加工制成散剂、胶囊剂、片剂、等各种公知的剂型；以及

3. 本发明所述的迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物可以制成预防和治疗体内和细胞中 cAMP 含量及利用度低下导致的疾病、强化 BDNF 表现量、强化细胞内 cAMP/PKA/CREB 信号转导通路，以及增加

5 脑内 DA、NE 及 5HT 神经递质含量和增强记忆力的药物、保健食品和营养剂。

综言之，本发明之实施例如下：

1. 一种增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度的药物组合物，包括：

一第一主要成份：包含人参皂甙 Rg1、Rb1 及 Re；

10 一第二主要成份：包含一甘草酸类，是选自一甘草酸、一甘草次酸及其组合之一；以及

一第三主要成份：包含一大枣环腺苷单磷酸制成。

2. 如实施例 1 所述的药物组合物，其中该药物组合物包括 2~26 重量份的该人参皂甙 Rg1 及 Rb1、3~48 重量份的该甘草酸类及 0.002~0.5 重量份的

15 该大枣环腺苷单磷酸。

3. 如实施例 1 或 2 所述的药物组合物，其中该药物组合物包括 4~13 重量份的该人参皂甙 Rg1 及 Rb1、5~16 重量份的该甘草酸类及 0.01~0.1 重量份的该大枣环腺苷单磷酸。

4. 如实施例 1 至 3 任何一项所述的药物组合物，其中该药物组合物含有选自

20 药学上可接受的一载体、一添加剂及其组合之一。

5. 如实施例 1 至 4 任何一项所述的药物组合物，其中该药物组合物制成一剂型，该剂型系选自一锭剂、一胶囊剂、一散剂、一片剂、一粉剂、一溶液剂、一微囊剂、一混悬剂、一乳剂、一颗粒剂、一滴丸剂、一丸剂及药剂

学上的一口服药物剂型其中之一。

6. 如实施例 1 至 5 任何一项所述的药物组合物，其中该药物组合物可以制成
预防和治疗体内及细胞中 cAMP 含量及利用度低下、强化细胞内
cAMP/PKA/CREB 信号转导通路、强化 BDNF 表现量、增加脑内 DA、NE
5 及 5HT 神经递质含量和增强记忆力的药物、保健食品和营养剂。
7. 如实施例 1 至 6 任何一项所述的药物组合物，其中该药物组合物更包含一
第四主要成分，其系选自一生姜粉及生姜萃取物及其组合之一。
8. 一种增加体内环腺苷单磷酸利用度之药物组合物，包括：
一第一主要成份：包含人参皂甙 Rg1、Rb1 及 Re；
10 一第二主要成份：包含一甘草酸类，是选自一甘草酸、一甘草次酸及其组
合之一；以及
一第三主要成份：包含一大枣环腺苷单磷酸制成。
9. 一种制造增加体内环腺苷单磷酸含量之一药物组合物之方法，包括：
提供一第一主要成份，其中该第一主要成分包含人参皂甙 Rg1、Rb1 及
15 Re；
提供一第二主要成份，其中该第二主要成分包含一甘草酸类，系选自一
甘草酸、一甘草次酸及其组合之一；以及
提供一第三主要成份，其中该第三主要成分包含一大枣环腺苷单磷酸，
以制成该医药组合物。
- 20 综上所述，以上仅为本发明的较佳实施例而已，并非用于限定本发明的
保护范围，因此，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换、
改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

工业实用性

1.本发明所述的迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物中，可以含有药物学上可接受的添加剂；

2.本发明所述的迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物可以将其加工制成散剂、胶囊剂、片剂、等各种公知的剂型；以及

5 3.本发明所述的迅速增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度之药物组合物可以制成预防和治疗体内和细胞中 cAMP 含量及利用度低下导致的疾病、强化 BDNF 表现量、强化细胞内 cAMP/PKA/CREB 信号转导通路，以及增加脑内 DA、NE 及 5HT 神经递质含量和增强记忆力的药物、保健食品和营养剂。

权 利 要 求 书

1. 一种增加体内环腺苷单磷酸含量及利用度的药物组合物，包括：
 一第一主要成份：包含人参皂甙 Rg1、Rb1 及 Re；
 一第二主要成份：包含一甘草酸类，是选自一甘草酸、一甘草次酸及其
5 组合之一；以及
 一第三主要成份：包含一大枣环腺苷单磷酸制成。
2. 如权利要求 1 所述的药物组合物，其中该药物组合物包括 2~26 重量份的
 该人参皂甙 Rg1 及 Rb1、3~48 重量份的该甘草酸类及 0.002~0.5 重量份
 的该大枣环腺苷单磷酸。
- 10 3. 如权利要求 1 所述的药物组合物，其中该药物组合物包括 4~13 重量份的
 该人参皂甙 Rg1 及 Rb1、5~16 重量份的该甘草酸类及 0.01~0.1 重量份的
 该大枣环腺苷单磷酸。
4. 如权利要求 1 所述的药物组合物，其中该药物组合物含有选自药学上可接
 受的一载体、一添加剂及其组合之一。
- 15 5. 如权利要求 1 所述的药物组合物，其中该药物组合物制成一剂型，该剂型
 系选自一锭剂、一胶囊剂、一散剂、一片剂、一粉剂、一溶液剂、一微囊
 剂、一混悬剂、一乳剂、一颗粒剂、一滴丸剂、一丸剂及药剂学上的一口
 服药物剂型其中之一。
6. 如权利要求 1 所述的药物组合物，其中该药物组合物可以制成预防和治疗
20 体内及细胞中 cAMP 含量及利用度低下、强化细胞内 cAMP/PKA/CREB 信号
 转导通路、强化 BDNF 表现量、增加脑内 DA、NE 及 5HT 神经递质含量和
 增强记忆力的药物、保健食品和营养剂。
7. 如权利要求 1 所述的药物组合物，其中该药物组合物还包含一第四主要成

分，其是选自一生姜粉及生姜萃取物及其组合之一。

8. 一种增加体内环腺苷单磷酸利用度的药物组合物，包括：

一第一主要成份：包含人参皂甙 Rg1、Rb1 及 Re；

一第二主要成份：包含一甘草酸类，是选自一甘草酸、一甘草次酸及其

5 组合之一；以及

一第三主要成份：包含一大枣环腺苷单磷酸制成。

9. 一种制造增加体内环腺苷单磷酸含量之一药物组合物的方法，包括：

提供一第一主要成份，其中该第一主要成分包含人参皂甙 Rg1、Rb1 及 Re；

10 提供一第二主要成份，其中该第二主要成分包含一甘草酸类，是选自一甘草酸、一甘草次酸及其组合之一；以及

提供一第三主要成份，其中该第三主要成分包含一大枣环腺苷单磷酸，以制成该医药组合物。