(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0052119
(43) 공개일자 2010년05월19일

(51) Int. Cl.
A61K 36/27 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0111008
(22) 출원일자 2008년11월10일
심사청구일자 2008년11월10일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
김호철
서울 동대문구 이문2동 삼성래미안아파트 204동 1803호
부영민
서울 강동구 고덕1동 현대아파트 103-705
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

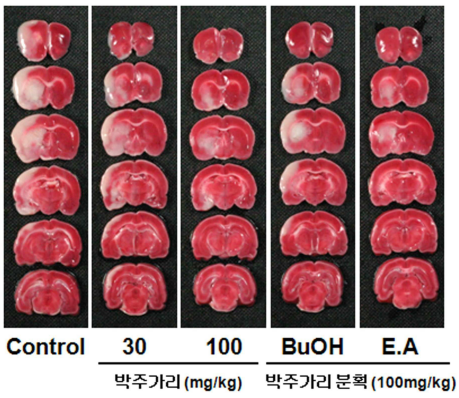
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 박주가리(*Metaplexis japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 박주가리 추출물, 또는 상기 추출물의 에틸 아세테이트 또는 부탄올 분획물은 뇌허혈에 의해 유도되는 뇌신경세포 손상을 보호하는 효과를 나타내고, 신경행동학적 회복효과실험에서 뛰어난 회복 효과가 있으므로 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물, 또는 건강기능식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김미연

서울 성북구 길음2동 길음뉴타운 224-1401

김재구

서울 성북구 삼선1가 238-20 혜성주택 102호

박주연

서울 성북구 돈암2동 한진아파트 202동 2006호

송미경

서울 도봉구 쌍문1동 460-88 서원 아트빌 A-401

니밀라 자말카텔

서울 동대문구 이문2동 334-73

나바라즈 판디트

서울 동대문구 이문2동 334-73

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PF-0320201-00

부처명 경희대학교

연구사업명 자생식물 이용기술 개발사업

연구과제명 국가 자생식물로부터 신경보호 식의약품 개발에 관한 연구

주관기관 경희대학교

연구기간 2006년 04월 01일 ~ 2010년 03년 31일

특허청구의 범위

청구항 1

박주가리(*Metaplexis japonica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 알코올은 C_1 내지 C_4 저급 알코올인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 5

박주가리 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 제조된 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 유기용매는 에틸 아세테이트 또는 부탄올인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 7

제 1항 또는 제 5항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병 및 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeld-Jakob)병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 8

약학적으로 유효한 양의 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 퇴행성 뇌질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료방법.

청구항 9

약학적으로 유효한 양의 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환

예방방법.

청구항 10

박주가리 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 에탄올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 12

박주가리 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 제조된 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 유기용매는 에틸 아세테이트 또는 부탄올인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 14

제 10항 또는 제 12항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병 및 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeld-Jakob)병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 박주가리(*Metaplexis japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 박주가리 추출물, 또는 상기 추출물의 에틸 아세테이트 또는 부탄올 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 통계청에서 2003년 10월 발표한 우리나라 노령 인구의 비율을 살펴보면, 우리나라는 지난 2000년 65세 이상 인구가 총인구에서 차지하는 비중이 7.2 %에 이르러 고령화 사회에 들어섰으며, 오는 2019년에는 이 비율이 14 %를 넘어 고령사회에 진입할 것으로 전망되고 있다. 이와 같이 최근 고령화 문제가 사회적인 이슈로 대두 됨에 따라 고령인구의 특성이나 주거, 보건, 문화, 여가 등 노인복지 등에 대한 국민의 관심이 높아지고, 이에 대한 통계 수요도 늘어나고 있다. 이러한 변화의 핵심은 노령화 인구의 증가로 인해서 지난 50여 년간 사망의 주된 원인이 되었던 급성 전염성 질병보다는 만성 퇴행성 질병이 더욱더 큰 문제로 대두 되고 있다는 점이다. 특히 만성 퇴행성 질병 중에서 뇌혈관 질환에 의한 사망은 단일질환에 의한 사망률 중에서 2위를 기록하고 있는 매우 중요한 질환이다.

[0003] 뇌혈관 질환은 크게 2가지 형태로 분류될 수 있다. 하나는 뇌출혈 등에서 볼 수 있는 출혈성 뇌질환이고, 다른 하나는 뇌혈관의 폐쇄 등에 의해 나타나는 허혈성 뇌질환이다. 출혈성 뇌질환은 교통사고 등에 의해서 주로 나타나며, 허혈성 뇌질환은 주로 노령의 사람들에서 자주 나타나는 질환이다.

[0004] 대뇌에 일시적인 뇌허혈이 유발되는 경우, 산소와 포도당의 공급이 차단되어 신경세포에서는 ATP 감소 및 부종(edema)이 발생 되며, 결국 뇌의 광범위한 손상이 유발된다. 신경세포의 사멸은 뇌허혈이 있은 후 상당한 시간 경과 후에 나타나는데, 이를 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)라고 한다. 지연성 신경세포사는 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil)을 이용한 일과성 전뇌 허혈모델(transient forebrain ischemic model)을 통한 실험에서 살펴보면, 5분간 뇌허혈 유도 4일 후 해마(hippocampus)의 CA1 영역에서 신경세포사가 관찰되는 것으로 보고되고 있다(Kirino T, Sano K. *Acta Neuropathol.*, 62: 201-208, 1984; Kirino T. *Brain Res.*, 239: 57-69, 1982).

[0005] 지금까지 가장 많은 사람들이 받아들이는 뇌허혈에 의한 신경세포사 기전으로는 2가지가 있다. 하나는 뇌허혈에 의해서 세포 바깥에 과도한 글루타메이트(glutamate)가 축적되게 되며, 이러한 글루타메이트가 세포 내로 유입되어 결국 과도한 세포 내 칼슘의 축적으로 신경세포사가 유발된다는 흥분성 신경세포사 기전(Kang TC, *et al.*, *J. Neurocytol.*, 30: 945-955, 2001)과 허혈-재관류시에 갑작스러운 산소 공급으로 인해 생체 내 라디칼의 증가로 인해 DNA 및 세포질에 손상을 입어 유발된다는 산화성 신경세포사, 2가지 기전에 있다(Won MH, *et al.*, *Brain Res.*, 836: 70-78, 1999; Sun AY., Chen YM., *J. Biomed. Sci.*, 5: 401-414, 1998; Flowers F, Zimmerman JJ. *New Horiz.* 6: 169-180, 1998).

[0006] 이러한 기전적인 연구를 바탕으로 해서 뇌허혈시에 나타나는 신경세포사를 효과적으로 억제하는 물질을 탐색하거나, 물질에 대한 기전을 밝히는 연구가 많이 수행되고 있다. 그러나 아직까지 효과적으로 뇌허혈에 의한 신경세포사를 억제하는 물질은 거의 없는 실정이다.

[0007] 지금까지 유일하게 뇌허혈 치료제로 FDA 공인 시판 중인 조직플라즈미노겐활성자(tissue plasminogen activator)는 혈전용해제로 뇌허혈을 유발시키는 혈전을 녹여 빠른 산소 및 포도당의 공급을 유도하는 물질이다. 따라서 직접적으로 신경세포를 보호하는 것이 아니기 때문에 빠른 사용이 필요하며, 혈전용해제라는 특징 때문에 과량 사용 또는 자주 사용시에는 혈관벽이 얇아져 결국 출혈성 뇌혈관질환을 유발하게 된다.

[0008] 또한, 초기의 칼슘 유입을 효과적으로 억제하기 위한 칼슘채널 억제제(calcium channel blocker)인 MK-801의 경우 임상적 테스트가 실행이 되었으나 그 부작용으로 인해 약물을 폐기한 바 있다.

[0009] 한편 국내의 경우, 다수의 천연물질이 뇌졸중 예방에 효과가 있는 건강식품으로 시판되고 있으나 이들 대부분은 과학적인 검증을 거치지 않은 것이 많으며 오히려 건강식품 남용의 원인이 되기도 하여 사회적인 문제가 되고 있다.

[0010] 따라서 오랫동안 사용되어 그 안전성이 입증된 천연자원들을 객관적으로 검증하여 뇌질환 치료 및 예방효과를 갖는 천연물질을 개발하고자 하는 노력이 시급히 요구되고 있다.

[0011] 박주가리(*Metaplexis japonica*)는 용담목 박주가리과에 속하는 다년생 덩굴풀인 박주가리의 전초를 말린 것이다. 각지의 산기슭과 들판에서 널리 자라며 여름철에 전초를 베어 햇볕에서 말린다. 박주가리 또는 새박덩굴이라고도 부른다. 다른 이름으로는 라마, 노아등(老鴉藤), 비래학 또는 학광표 등으로 불리고 있다. 일본, 쿠릴열도, 중국 및 만주에 분포하며 한국에는 전국 각처에 야생한다.

[0012] 박주가리의 뿌리 주요 성분은 에스테르(ester)형 배당체를 함유하였고, 프레그난(pregnane)형 게닌(genin)의 성분인 벤조일라마논(benzoylramanone), 메타플렉시게닌(metaplexigenin), 이소라마논(isoramanone), 사코르스틴(sarcostin), 가가미닌(gagaminin), 디벤조일가가임올(dibenzoylgagaimol), 데아실메타플렉시게닌(deacylmetaplexigenin), 데아실티난코게닌(deacylcynanchogenin), 페르굴라틴(pergularin) 또는 우텐딘(utendin) 등을 얻을 수 있다. 줄기와 잎에는 프레그난 배당체가 함유되어 있고, 그 가수분해 중에는 디-시마로즈(d-cymarose), 디지톡소스(digitoxose) 및 사코르스틴(sarcostin), 메타플렉시게닌(metaplexigenin), 벤조일라마논(benzoylramanone), 페르굴라틴(pergularin), 우텐딘(utendin) 등이 있다. 그 유즙에는 단백질 분해효소가 함유되어 있다. 박주가리의 약리 작용으로는 한방에서 종자 및 잎을 이용하여 강장제 또는 해독제로 사용하고 있고, 또한 민간요법에서는 지혈제로서도 이용되고 있다(이덕봉, 한국동식물도감 제 15권 식물(유용식물), 삼화서적주식회사, pp397, 1974; 과학백과사전 종합출판사, 1990, 재편집 동의학사전, 도서출

판 까치, pp329-330). 허손노상(虛損勞傷-폐결핵 등), 양위, 대하(帶下), 유즙불통(乳汁不通), 단독(丹毒), 창종(瘡腫)을 치료한다. 박주가리 성분 중 가가미닌(gagaminin)은 강력한 항산화제로 스테로이드 일칼로이드 물질로서 노화작용을 촉진하는 지질과산화작용과 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidae)의 활성을 동시에 억제한다는 보고가 있다(D. U. Lee, et. al., *Planta Medica.*, 62, 485-487, 1996; T. Nomura and H. Mitsuhashi, *Pharm. Bull.*, 20, 2065-2067, 1972). 그러나 뇌 신경세포 보호작용에 대한 연구는 보고된 바가 없으며, 특히 동물모델을 이용한 신경보호 작용에 대한 연구는 알려져 있지 않다.

[0013] 이에 본 발명자는 뇌질환 치료 및 예방효과를 갖는 천연물질 개발에 노력하던 중, 박주가리 추출물 또는 이의 분획물이 뇌허혈성 신경세포 사멸에 대한 억제 활성과 신경세포 손상으로 인한 감각운동 기능의 실조에 대한 보호 효과가 있어 신경세포 보호활성을 갖는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 신경세포 보호활성을 갖는 박주가리(*Metaplexis japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물, 및 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 박주가리(*Metaplexis japonica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 박주가리 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 제조된 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 박주가리 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 박주가리 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 제조된 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 퇴행성 뇌질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료방법을 제공한다.

[0020] 아울러, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방방법을 제공한다.

효 과

[0021] 본 발명의 박주가리(*Metaplexis japonica*) 추출물 또는 이의 분획물은 뇌허혈시 발생되는 신경세포사를 저해하는 효과가 탁월할 뿐만 아니라 신경손상으로 인한 감각운동 기능의 실조에 대한 보호 효과를 가짐으로써, 신경세포의 괴사에 의해 발생되는 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병 또는 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeld-Jakob)병 등의 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료를 위한 조성물 또는 건강기능식품의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0022] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은 박주가리(*Metaplexis japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 퇴행성 뇌질환은 신경세포사에 의하여 유발되는 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병 및 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeld-Jakob)병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0025] 상기 박주가리 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0026] 1) 박주가리(*Metaplexis japonica*)에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0027] 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및

[0028] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축한 후 건조하는 단계.

[0029] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 박주가리는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 박주가리는 잎, 줄기 또는 뿌리가 모두 이용가능하며, 전초를 이용하는 것이 바람직하다.

[0030] 상기 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C_1 내지 C_4 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 박주가리 분량에 5 내지 15배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 10배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 40 내지 100℃인 것이 바람직하며, 60 내지 80℃인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 4 내지 24시간인 것이 바람직하며, 8 내지 15시간이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0032] 상기 박주가리 추출물의 분획물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0033] 1) 박주가리 추출물에 추가로 유기용매를 가하여 유기용매 분획물을 제조하는 단계; 및

[0034] 2) 단계 1)의 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 활성 분획물을 수득하는 단계.

[0035] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 유기용매는 에틸 아세테이트 또는 부탄올인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0036] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔, 세파덱스, RP-18, 폴리아미드, 도요펄(Toyopearl) 및 XAD 수지로 이루어진 그룹으로부터 선택된 충진제를 이용한 컬럼을 이용한 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 활성화합물을 분리 및 정제할 수 있다. 컬럼 크로마토그래피는 필요에 따라 적절한 충진제를 선택하여 수차례 실시할 수 있으며, 용매로 클로로포름($CHCl_3$)-메탄올, 에틸 아세테이트(ethyl acetate)-메탄올 또는 디클로로메탄(dicloromethane)-메탄올을 이용할 수 있으나 이에 한정하지 않는다.

[0037] 본 발명자들은 박주가리 추출물 및 이의 분획물의 뇌신경세포 보호 효과를 확인하기 위하여, 중대뇌동맥폐색모델(MCAo)을 이용하여 혈관 내 봉합사 삽입법(intraluminal suture method)(Zea Longa, *et al.*, *Stroke*, 20: 84-91, 1989)을 이용하여 박주가리 추출물 및 이의 분획물의 뇌조직 및 뇌신경세포 보호 효과를 측정하였다. 그 결과, 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 투여한 실험군은 대조군에 비하여 신경세포가 손상되지 않은 것을 알 수 있었다. 또한, 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 투여한 실험군은 PVP를 투여한 대조군에 비해 농도 의존적인 신경보호효과를 유의적으로 나타냄을 확인하였다.

[0038] 또한, 본 발명자들은 박주가리 추출물 및 이의 분획물의 뇌신경세포 보호 효과를 확인하기 위하여, 4-혈관폐색모델(4-VO)을 이용하여 노다케닌의 뇌허혈에 의한 신경세포 손상에 대하여 신경세포 보호 효과를 측정하였다(Pulsinelli WA, *Brierley JB, Stroke,* 10, 267-272, 1979). 그 결과, 대조군 신경세포의 경우 정상 신경세포와는 다르게 조직이 이완되면서 세포들이 주변 세포로부터 유리되는 현상을 관찰할 수 있었고, 세포체(cell

body) 역시 본래의 추체상(pyramidal) 형태를 잃고 응축되어 단일 세포의 형태로 되어있음을 확인할 수 있었으며, 핵 염색질이 농축되고 핵막이 붕괴하는 현상이 관찰됨으로써 세포사멸(apoptosis)이 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 이에 반해, 본 발명의 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 투여한 실험군의 신경세포는 정상 세포와 유사한 형태를 나타내었고, 잘 뻗어나가는 핵주위질(perikaryon)과 중앙에 위치하는 둥근 핵으로 인하여 쉽게 구별되었으며, 대다수의 세포들이 세포고사로부터 방어되어 정상적인 추체 형태를 이루었으며 주변세포들과의 연결(junction)을 계속하여 유지하고 있음을 확인하였다. 또한, 대조군에서는 신경세포 고사가 많이 일어났으나 본 발명의 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 투여한 실험군에서는 우수한 신경세포 보호 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0039] 또한, 본 발명자들은 박주가리 추출물 및 이의 분획물의 운동기능 실조 보호효과를 확인하기 위해, 평균대 운동검사(Balance beam test)(Soblosky et al., *Behav. Brain. Res.,* 79(1-2), 79-92, 1996; Puurunen et al., *Neuropharmacology,* 40(4), 597-606, 2001)를 실시하였다. 그 결과, 본 발명의 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 유의성 있게 운동기능 실조에 대한 보호효과를 나타냄을 확인하였다.

[0040] 또한, 본 발명자들은 박주가리 추출물 및 이의 분획물의 운동기능 실조 보호효과를 확인하기 위해, 회전봉 행동실험(Rota rod test)(Rogers DC et al., *Stroke.,* 28, 2060-2065, 1997; Zhang L et al., *J Neurol Sci.,* 174, 141-146, 2000)을 실시하였다. 그 결과, 본 발명의 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 유의성 있게 유지시간이 증가하여 감각운동 기능의 실조에 대한 보호효과를 나타냄을 확인하였다.

[0041] 아울러, 본 발명자들은 박주가리 추출물 또는 이의 분획물이 포함된 조성물의 급성독성 실험을 위해, 마우스 및 랫트에게 경구 및 복강 투여 후 독성 여부를 관찰하였다. 그 결과, 본 발명의 조성물을 투여한 모든 동물에서 특이할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 본 발명의 조성물들은 경구투여 최소치사량(LD_{50})은 1000 ㎎/㎏이상인 안전한 물질로 판단되었고, 복강투여 최소치사량(LD_{50})은 200 ㎎/㎏이상인 안전한 물질로 판단되었다.

[0042] 따라서, 본 발명의 박주가리 추출물 또는 이의 분획물은 신경세포사에 의하여 유발되는 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병 및 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeld-Jakob)병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 이용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 조성물은 박주가리 추출물 또는 이의 분획물 중에서 하나 이상을 선택적으로 함유할 수 있으며, 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0044] 본 발명의 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 조성물은 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0045] 본 발명의 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사를 통할 수 있다.

[0046] 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전

부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 본 발명의 조성물의 유효용량은 0.0001 ~ 10 g/kg이고, 바람직하기로는 0.0001 g ~ 5 g/kg이며, 하루 1~6회 투여될 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물은 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 퇴행성 뇌질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료방법을 제공한다.

[0049] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방방법을 제공한다.

[0050] 상기 퇴행성 뇌질환은 신경세포사에 의하여 유발되는 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병 및 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeld-Jakob)병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0051] 또한, 본 발명은 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0052] 상기 퇴행성 뇌질환은 신경세포사에 의하여 유발되는 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병 및 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeld-Jakob)병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0053] 본 발명의 건강기능식품은 박주가리 추출물 또는 이의 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 약학적 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0054] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0055] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 0.01~0.04 g, 바람직하게는 약 0.02~0.03 g 이다.

[0056] 상기 외에 본 발명의 박주가리 추출물 또는 이의 분획물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 박주가리 추출물 또는 이의 분획물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.02~1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0057] 본 발명의 박주가리 추출물 및 이의 분획물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

실 시 예

[0058] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

[0059] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0060] **<실시예 1> 박주가리(*Metaplexis japonica*) 추출물의 제조**

[0061] **<1-1> 박주가리 70% 에탄올 수용액 추출물의 제조**

[0062] 박주가리의 전초(동우당제약, 영천) 100.06 g을 세절하여 추출 자루에 넣고 1 ℓ의 70% 에탄올 수용액에 침지하여 80℃에서 3시간 동안 1번 진탕 추출한 후 여과지에 여과하였다. 상기 추출액을 진공감압농축기를 이용하여 감압 하에 농축함으로써 건조한 박주가리 추출물 13.86 g을 제조하였다.

[0063] **<1-2> 박주가리 열수 추출물의 제조**

[0064] 추출용매로 70% 에탄올 수용액 대신 100℃의 물을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 <1-1>의 추출방법과 동일하게 추출하여 박주가리 열수 추출물 20.79 g을 제조하였다.

[0065] **<1-3> 박주가리 100% 메탄올 추출물의 제조**

[0066] 추출용매로 70% 에탄올 수용액 대신 100% 메탄올을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 <1-1>의 추출방법과 동일하게 추출하여 박주가리 메탄올 추출물 11.09 g을 제조하였다.

[0067] **<실시예 2> 박주가리 추출물로부터 유기용매 분획물의 제조**

[0068] 박주가리 전초를 70% 에탄올 수용액에 진탕 추출한 후, 여과하여 에틸 아세테이트(E. A)(250 mℓ) 및 부탄올(BuOH)(250 mℓ)을 가한 다음, 에틸 아세테이트 층 및 부탄올 층을 각각 진공감압농축기로 농축하여 건조물로부터 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에서 클로로포름($CHCl_3$)-메탄올(100%: 0%, 90% : 10%, 80% : 20%, 70% : 30%, 50%: 50%, 30: 70%, 0: 100%)로 구성되는 단계 농도구배 용매시스템을 적용하여 박주가리의 에틸 아세테이트 분획물(1.04 g) 및 부탄올 분획물(3.44 g)을 얻었다.

[0069] **<실험예 1> 박주가리 추출물의 뇌신경세포 보호효과 확인-중대뇌동맥폐색모델(MCAo)**

[0070] **<1-1> 실험동물의 준비**

[0071] 실험동물로 270 g 내외의 7주령의 스프라그-다울리계(sprague-dawly, 샘타코, 대한민국) 수컷 랫트와 170g 내외의 5주령의 위스터계(Wistar, 샘타코, 대한민국) 수컷 랫트를 구입하여 사료와 물을 충분히 공급하면서 실험환경에 적응하도록 하였다. 1주일 정도의 적응기간을 준 후, 동물실험을 수행하였다.

[0072] **<1-2> 뇌신경세포 보호효과 확인**

[0073] 박주가리 추출물의 국소 뇌허혈에 의한 신경세포 손상에 대하여 신경세포 보호 효과를 측정하기 위하여 응용된 혈관 내 봉합사 삽입법(intraluminal suture method)을 사용하였다(Zea Longa, *et al.*, *Stroke*, 20: 84-91, 1989).

[0074] 구체적으로, 먼저 22 ㎜의 4-0 나이론 봉합사의 끝 부분에서 약 5-8 ㎜ 길이를 실리콘으로 코팅하되 지름이 0.36 ㎜가 되게 제작하여 실험에 사용하였다. 랫트를 70% N_2O와 30% O_2가 섞인 혼합가스에 5%의 이소플루란(isoflurane)으로 전신마취를 한 후, 한쪽은 채혈을 위한 주사기를, 다른 한쪽은 혈압측정용 프로브(probe)를 삽입하여 혈압을 관찰하였으며, 채혈을 한 후 혈당 및 혈액가스를 분석하여 관찰하였다. 목 전방 부위 중앙의

피부를 절개하고 오른쪽 경동맥과 외경동맥(ECA)을 주위조직과 신경들로부터 조심스럽게 분리하였다. 외경동맥 분지인 상부갑상선동맥과 후두동맥을 전기소작기로 소작하고 내경동맥의 분지인 익돌근구개동맥을 전기소작하고 외경동맥을 자르고 프로브를 외경동맥에서 내경동맥으로 삽입하되 총경동맥분지에서 약 18~19 ㎜ 정도 삽입한 후 실로 고정하였다. 피부절개부위를 다시 봉합한 후 마취에서 자연회복시켰다. 유발 직후 및 120분 후에 박주가리 추출물들을 각각 30 및 100 mg/kg, 및 박주가리 E. A 분획물 및 BuOH 분획물을 각각 100 mg/kg의 농도로 각각 랫트 체중 100 g당 0.69 ㎖씩의 부피로 PVP polyvinyl pyrrolidone)으로 희석하여 복강 내 주사하였으며, 대조군은 같은 부피의 PVP를 투여하였다. 모든 실험군은 당일에 같은 마리수를 유발하였으며 수술은 체온이 37±0.5℃가 되게 유지하면서 관찰하였다. 수술 120분 후 상기와 같은 방법으로 재마취하여 프로브를 후퇴시켜 재관류시켰다. 재관류 후 24시간 후에 경추탈골 시키고, 2분 이내에 뇌를 적출하여 2 ㎜ 두께로 6개의 절편을 얻었다. 2% TTC(triphenyltetrazolium chloride) 용액이 들어 있는 12 웰 플레이트(well plate)에 조직을 충분히 담그고 37℃에서 30분 동안 방치한 후, 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehide)로 고정시켜 조직을 관찰하였다. 모든 수술과정은 수술현미경하에서 시행하였으며, 마취는 이소플루란을 2%로 계속 유지하면서 체온이 37℃ 이하로 떨어지지 않도록 램프를 이용하여 체온을 유지시켰다. 염색된 뇌 조직은 디지털 카메라로 하나씩 촬영한 후 컴퓨터로 옮겼고, 이미지 분석프로그램인 옵티마스 6.5(Optimas 6.5, Bioscan)를 이용하여 뇌경색 비율(%)을 하기 수학식 1로 계산하였다. 이때, 교정된 뇌경색의 부피(㎣)는 하기 수학식 2로 계산하였다.

수학식 1

[0075] 뇌경색 비율(%) = (A-B / A) × 100

[0076] A: 정상 좌반구의 부피(㎣)

[0077] B: 교정된 뇌경색의 부피 (㎣)

수학식 2

[0078] 교정된 뇌경색의 부피(㎣) = (정상 좌반구의 부피) - (손상 반구의 정상 부위 부피)

[0079] 박주가리 추출물의 뇌조직 및 뇌신경세포 보호 효과를 측정한 결과, 대조군에 비하여 박주가리 추출물들, 박주가리 E. A 분획물, 및 BuOH 분획물을 투여한 군들은 신경세포가 사멸되어 TTC로 염색되지 않은 부위의 면적이 적었고, 신경세포가 손상되지 않아 TTC로 염색된 흑적색 부위의 면적이 넓은 것을 알 수 있었다. 참고로, TTC로 뇌조직을 염색하면 손상으로 인하여 조직이 사멸한 부위는 염색이 되지 않아 흰색으로 나타나며, 정상 부위의 조직은 염색이 되어 흑적색으로 나타난다(도 1).

[0080] 또한, PVP를 투여한 대조군은 뇌경색 비율(%)이 약 35.57±3.41%로 나타났고, 박주가리 추출물들을 각각 30 mg/kg 및 100 mg/kg, 및 박주가리 E. A 분획물 및 BuOH 분획물을 각각 100 mg/kg으로 투여한 군에서는 각각 27.24±3.64%, 16.15±4.06%, 12.65±2.92%, 및 19.22±4.21%로 나타나 농도 의존적인 신경보호효과를 나타내었다. 박주가리 추출물 30 mg/kg 투여군을 제외한 실험군에서 대조군에 비하여 각각 54.6%, 64.4%, 및 45.9%의 신경보호효과를 보인 것으로 나타나 100 mg/kg의 용량에서 최고 효능을 나타냄을 알 수 있었다(도 2).

[0081] **<실험예 2> 박주가리 추출물의 뇌신경세포 보호효과 확인-4-혈관폐색모델(4-VO)**

[0082] 치매 치료 효과 관찰을 목적으로 박주가리의 뇌허혈에 의한 신경세포 손상에 대하여 신경세포 보호 효과를 측정하기 위하여, 1979년 펄시넬리(Pulsinelli)가 개발한 4-혈관폐색(4-Vessel Occlusion) 모델을 사용하였다(Pulsinelli WA, *Brierley JB, Stroke,* 10, 267-272, 1979).

[0083] 랫트를 질소와 산소의 혼합가스(질소 70%, 산소 30%)에 포함된 5% 이소플루란으로 마취시킨 다음 정위고정장치(stereotaxic apparatus)에 수평면으로 머리를 기준으로 하여 꼬리를 아래로 30°경사지게 고정시켰다. 코와 입 주위는 플라스틱 원추흡입기(cone)로 마취기에 연결하고 1.5% 이소플루란으로 마취상태를 유지하였다. 꼬리를 수술대에 고정하고 경추를 신전시킨 상태로 실험하였다.

[0084] 먼저, 인후(咽喉)부위를 수술하기 위하여 총경동맥에 봉합사로 고리를 만들어 허혈을 유발하고 재관류할 수 있도록 장치하였다. 그리고 허혈 유발시 미세혈관의 순환을 봉쇄하기 위하여 실로 뒤쪽으로는 기관(trachea), 식도(esophagus), 외부 경정맥(external jugular vein), 총경동맥(common carotid arteries)들이 위치하도록 앞쪽으로는 경부(cervical), 척추주위(paravertebral) 근육들이 지나가도록 꿰뚫은 다음 수술용 클립으로 상처를 봉합하였다.

[0085] 그 후, 랫트를 돌려서 목 정중선 절개를 하여 후두골 하단의 1번 경추부를 수술확대경을 이용하여 근육이 다치지 않게 주의하면서, 1 ㎜ 이하의 미세한 전기소작침을 1번 경추의 우상공(alar foramina)을 통하여 밑으로 척추동맥이 통과하고 있는 터널로 집어넣어, 간헐적인 전류를 통전시켜 척추동맥을 소작하였다. 수술 현미경을 이용하여 뼈 속으로 지나가는 터널에 존재하는 척추동맥이 완전히 소작되어서 폐쇄되었다는 것을 확인한 다음 수술용 클립으로 봉합하였다. 봉합 후 24시간이 지난 다음 수술용 클립을 제거한 다음 총경동맥을 동맥류(動脈瘤, aneurysm) 클립으로 10분 동안 조여서 허혈을 유발하였다. 만약 1분 이내에 대광반사(對光反射, 눈에 빛을 비추었을 때의 반사작용)가 소실되지 않으면 경부봉합을 단단하게 하였고, 이때 대광반사가 소실되지 않은 랫트들은 완전한 양측 평행적인 해마의 CA1 신경손상이 유발되지 않았기 때문에 제외시켰고, 경련을 일으키는 랫트들도 제외시켰다. 허혈 유발 10분 후 총경동맥에서 동맥류 클립을 떼어내어 허혈을 중지시키고 재관류시켰다. 재관류 직후와 90분 후 각각 박주가리 추출물을 300 mg/kg 경구투여 하였다.

[0086] 허혈 유발 1주일 후에 랫트를 우레탄 1.2 g/kg, 복강 내 투여로 마취시켜 개흉한 다음, 심장 우심방을 절개하여 좌심실에 바늘을 주입한 후 헤파린 처리한 5% 질산 나트륨 생리식염수를 10분 동안 심장에 관류시키고, 4.0% 포르말린 고정액으로 관류시켰다. 그 후 랫트의 뇌를 떼어내어 2시간 동안 0.1 M 인산 완충된 포르말린 고정액에 후-고정한 다음, 30% 수크로오즈 용액에 담가 하룻밤 동안 방치하였다. 고정된 뇌에서 정수리점(bregma) -2.5 mm 와 -4.0 mm 사이의 등쪽 해마(dorsal hippocampus) 부위에 있는 관상조각(coronal block)을 절개하고 -70에서 동결한 후 슬라이딩 마이크로톰을 이용하여 30 ㎛ 간격으로 절단하여 해마를 포함하는 조직 절편을 제조하였다.

[0087] 상기의 방법으로 제조된 절편을 크레실 바이올렛(cresyl violet)에 염색하여 고정한 다음 등쪽 해마(odrsal hippocampal) CA1 중 지연성 신경원세포 사망(delayed neuronal death)에 의해 가장 손상되기 쉬운 부분인 (Crain BJ et al., *Neuroscience*, 27, 387-402, 1988) 중간대(middle zone) 1,000 ㎛ 부분 내에 존재하는 손상된 신경 세포 수를 관찰하였다. 세포 수의 관찰은 고배율(X 400)에서 정상적인 형태를 보이는 추체세포(pyramidal cell)의 수를 3인의 관찰자가 한 개의 뇌 조직에서 3개의 다른 조직 절편의 좌우 양측 2개, 총 6 부위에서 관찰한 값을 평균하였다. 대조군으로는 5% DMSO를 투여한 랫트의 뇌 해마 조직을, 비교군으로는 박주가리 추출물을 투여한 랫트의 뇌 해마 조직을 사용하였다.

[0088] 상기 실험 결과, 대조군 신경세포의 경우 정상 신경세포와는 다르게 조직이 이완되면서 세포들이 주변 세포로부터 유리되는 현상을 관찰할 수 있었으며, 세포체(cell body) 역시 본래의 추체상(pyramidal) 형태를 잃고 응축되어 단일 세포의 형태로 되어있음을 확인할 수 있었다. 또한, 핵 염색질이 농축되고 핵막이 붕괴하는 현상이 관찰됨으로써 세포사멸(apoptosis)이 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 본 발명의 박주가리 추출물들을 각각 300 ㎎/㎏ 경구투여한 군의 신경세포는 정상 세포와 유사한 형태를 나타내었으며, 잘 뻗어나가는 핵주위질(perikaryon)과 중앙에 위치하는 둥근 핵으로 인하여 쉽게 구별되었다. 또한, 대다수의 세포들이 세포고사로부터 방어되어 정상적인 추체 형태를 이루었으며 주변세포들과의 연결(junction)을 계속하여 유지하고 있음을 확인하였다(도 3).

[0089] 또한, 대조군에서는 가로×세포 1 ㎟ 당 세포수 평균이 84.00±4.64로 나타나 신경세포 고사가 많이 일어났음을 확인할 수 있었다. 그러나 본 발명의 각 박주가리 추출물들 300 ㎎/㎏을 투여한 실험군에서는 세포수 평균이 130.00±16.78의 세포수/㎟로 대조군에 비하여 13.03% 정도의 우수한 신경세포 보호 효과를 나타냄을 확인하였다(도 4).

[0090] **<실험예 3> 박주가리 추출물의 운동기능 실조 보호효과 확인**

[0091] **<3-1> 평균대 운동 검사(Balance beam test)**

[0092] 평균대 운동 검사는 랫트의 뒷발의 기능을 측정함과 동시에 균형감각, 전정기능 등을 측정하는데 좋은 실험방법이다. Soblosky의 방법(Soblosky et al., *Behav. Brain. Res.*, 79(1-2), 79-92, 1996; Puurunen et al., *Neuropharmacology*, 40(4), 597-606, 2001)을 응용하여 실시하였다. 너비 3 ㎝, 길이 150 ㎝의 나무로 된 봉

을 바닥에서 약 50 ㎝ 높이에 걸쳐 놓고, 상기 <실험예 1>의 방법으로 뇌허혈이 유발된 랫트를 봉의 중심에 균형을 잡게 놓은 후 30초간 랫트의 행동을 보고 3명의 관찰자가 그 점수를 매겼다 점수의 평가기준은 하기 [표 1]과 같이 정하여 실시하였다. 랫트 마다 매 3회 실시하여 평균값을 수치로 사용하였다.

[0093]

표 1

[0094]

점수	상태
0점	30초간 봉에서 균형을 유지할 수 없는 상태
1점	30초 이상 봉에서 균형을 유지할 수 있는 상태
2점	1점 + 봉의 길이 방향으로 몸을 트는 상태
3점	2점+봉의 길이 방향으로 걷되 걸음의 50% 이상 실족
4점	3점에서 50% 이하 실족
5점	4점에서 1 걸음 정도 실족
6점	5점에서 실족 없이 자유로이 움직이는 상태

[0095] 평균대 운동 검사 결과, 대조군에서는 1.22±0.88 점을 기록하였고, 박주가리 추출물들을 각각 30 mg/kg 및 100 mg/kg, 및 박주가리 E. A 분획물 및 BuOH 분획물을 각각 100 mg/kg으로 투여한 군에서는 각각 1.14±0.13, 1.12±0.13, 2.06±0.18, 1.78±0.25점으로 나타내었다. 박주가리 E. A 분획물 및 BuOH 분획물 100 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 운동기능 실조에 대한 보호효과를 나타내었다(도 5).

[0096] **<3-2> 회전봉 행동실험(Rota rod test)**

[0097] 회전봉 행동실험은 랫트의 운동 기능의 조정, 감각운동 조화와 자발운동에 대한 평가를 위한 좋은 지표이다(Rogers DC et al., *Stroke.*, 28, 2060-2065, 1997; Zhang L et al., *J Neurol Sci.*, 174, 141-146, 2000). 뇌허혈 유발 후 23시간에 실시하였으며, 행동실험의 회전봉이 5분간 0 rpm에서 40 rpm까지 회전하는 가속회전법을 사용하였고, 상기 <실험예 1> 방법으로 뇌허혈이 유발된 랫트를 봉의 가운데에 균형을 잡아 놓은 후, 회전을 시작한 시간부터 랫트가 떨어질 때까지의 시간을 측정하여 평가하였다. 각 랫트마다 5회 실시하여 최고치와 최저치를 제외한 중간 3개 값의 평균을 수치로 사용하였다.

[0098] 회전봉 행동실험 결과, 대조군에서는 10.55±4.20 초 동안의 유지시간을 보였고, 박주가리 추출물들을 각각 30 mg/kg 및 100 mg/kg, 및 박주가리 E. A 분획물 및 BuOH 분획물을 각각 100 mg/kg으로 투여한 군에서는 각각 21.71±12.99, 26.66±9.01, 42.27±10.69, 및 38.03±13.53초 동안의 유지시간을 나타내었다. 박주가리 E. A 분획물 100 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 유지시간이 증가하여 감각운동 기능의 실조에 대한 보호효과를 보였다(도 6).

[0099] **<실험예 4> 급성독성 실험**

[0100] **<4-1> 경구투여**

[0101] ICR계 마우스(몸무게 25±5g)와 스프라그-다울리계(sprague-dawly) 랫트를 각각 10마리씩 4군으로 나누어 본 발명의 조성물들을 각각 100, 250, 500 및 1000 ㎎/㎏의 용량으로 경구 투여한 후 2주간 독성 여부를 관찰한 결과, 실험 물질을 투여한 모든 동물에서 특이할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 본 발명의 조성물들은 랫트에서 각각 1000 ㎎/㎏까지도 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량(LD_{50})은 1000 ㎎/㎏이상인 안전한 물질로 판단되었다.

[0102] **<4-2> 복강투여**

[0103] ICR계 마우스(몸무게 25±5g)와 스프라그-다울리계(sprague-dawly) 랫트를 각각 10마리씩 4군으로 나누어 본 발

명의 조성물들을 각각 25, 50, 100 및 200 ㎎/㎏의 용량으로 복강투여한 후 24시간 동안 독성여부를 관찰한 결과, 실험 물질을 투여한 모든 동물에서 특이할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 본 발명의 조성물들은 랫트에서 각각 200 ㎎/㎏까지도 독성변화를 나타내지 않았으며, 안전한 물질로 판단되었다.

[0104] 하기에 본 발명의 박주가리 추출물 및 이의 분획물을 포함하는 제조예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0105] **<제조예 1> : 약학적 제제의 제조**

[0106] 1. 산제의 제조

[0107] 실시예 <1-1>의 추출물 300 ㎎

[0108] 유당 100 ㎎

[0109] 탈크 10 ㎎

[0110] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0111] 2. 정제의 제조

[0112] 실시예 <1-1>의 추출물 50 ㎎

[0113] 옥수수전분 100 ㎎

[0114] 유당 100 ㎎

[0115] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

[0116] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0117] 3. 캡슐제의 제조

[0118] 실시예 <1-1>의 추출물 50 ㎎

[0119] 옥수수전분 100 ㎎

[0120] 유당 100 ㎎

[0121] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

[0122] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0123] 4. 주사제의 제조

[0124] 실시예 <1-3>의 추출물 50 ㎎

[0125] 주사용 멸균 증류수 적량

[0126] pH 조절제 적량

[0127] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ㎖) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0128] 5. 액제의 제조

[0129] 실시예 <1-3>의 추출물 1,000 ㎎

[0130] 설탕 20 g

[0131] 이성화당 20 g

[0132] 레몬향 적량

[0133] 정제수를 가하여 전체 1000 ㎖로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색 병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[0134] **<제조예 2> : 건강 식품의 제조**

[0135] 실시예 <1-2>의 추출물 1,000 mg

[0136] 비타민 혼합물 적량

[0137] 비타민 A 아세테이트 70 ㎍

[0138] 비타민 E 1.0 mg

[0139] 비타민 B1 0.13 mg

[0140] 비타민 B2 0.15 mg

[0141] 비타민 B6 0.5 mg

[0142] 비타민 B12 0.2 ㎍

[0143] 비타민 C 10 mg

[0144] 비오틴 10 ㎍

[0145] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0146] 엽산 50 ㎍

[0147] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0148] 무기질 혼합물 적량

[0149] 황산 제1철 1.75 mg

[0150] 산화아연 0.82 mg

[0151] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0152] 제1인산칼륨 15 mg

[0153] 제2인산칼슘 55 mg

[0154] 구연산칼륨 90 mg

[0155] 탄산칼슘 100 mg

[0156] 염화마그네슘 24.8 mg

[0157] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0158] **<제조예 3> : 건강 음료의 제조**

[0159] 실시예 <1-2>의 추출물 1000 mg

[0160] 구연산 1000 mg

[0161] 올리고당 100 g

[0162] 매실농축액 2 g

[0163] 타우린 1 g

[0164] 정제수를 가하여 전체 900 ㎖

[0165] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

도면의 간단한 설명

[0166] 도 1은 박주가리(*Metaplexis japonica*) 70% 에탄올 수용액 추출물, 상기 추출물의 에틸 아세테이트 분획물(E.A) 및 부탄올 분획물(BuOH)의 투여 농도에 따른 랫트 뇌조직에서의 뇌신경세포 손상 보호 효과를 관찰하기 위해 랫트의 뇌조직 절편을 TTC 염색법으로 관찰한 결과를 나타내는 그림이다.

[0167] 도 2는 PVP(polyvinyl pyrrolidone)를 투여한 대조군과 박주가리 70% 에탄올 수용액 추출물, 상기 추출물의 에틸 아세테이트 분획물(E.A) 및 부탄올 분획물(BuOH) 투여군에서의 뇌조직 손상율(또는 뇌경색비율)을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0168] 도 3은 박주가리 70% 에탄올 수용액 추출물의 랫트 뇌조직에서의 뇌신경세포 손상 보호 효과를 관찰하기 위해 랫트의 뇌조직 절편을 크레실 바이올렛(cresyl violet) 염색법으로 관찰한 결과를 나타내는 그림이다.

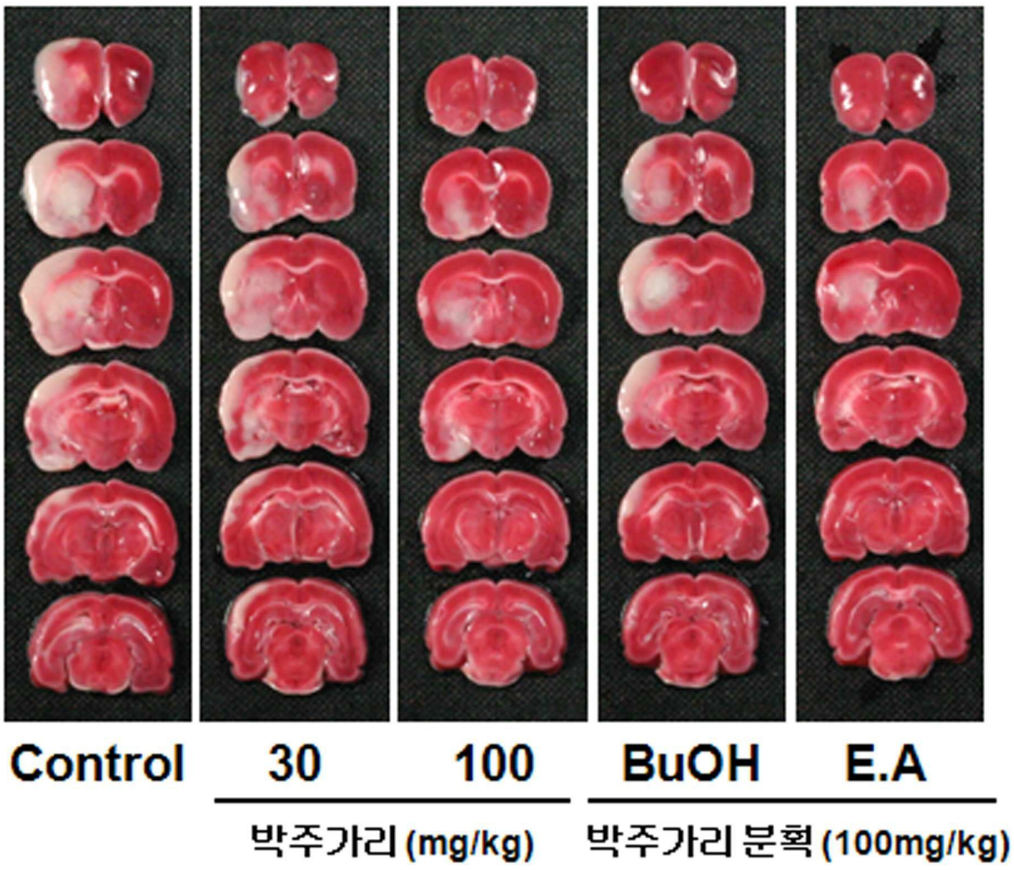
[0169] 도 4는 5% DMSO를 투여한 대조군과 박주가리 70% 에탄올 수용액 추출물 투여군에서의 정상 뇌 신경세포수를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0170] 도 5는 박주가리 70% 에탄올 수용액 추출물, 상기 추출물의 에틸 아세테이트 분획물(E.A) 및 부탄올 분획물(BuOH)의 투여 따른 신경행동학적 회복효과를 관찰하기 위해 평균대 운동 검사 결과를 나타내는 그래프이다.

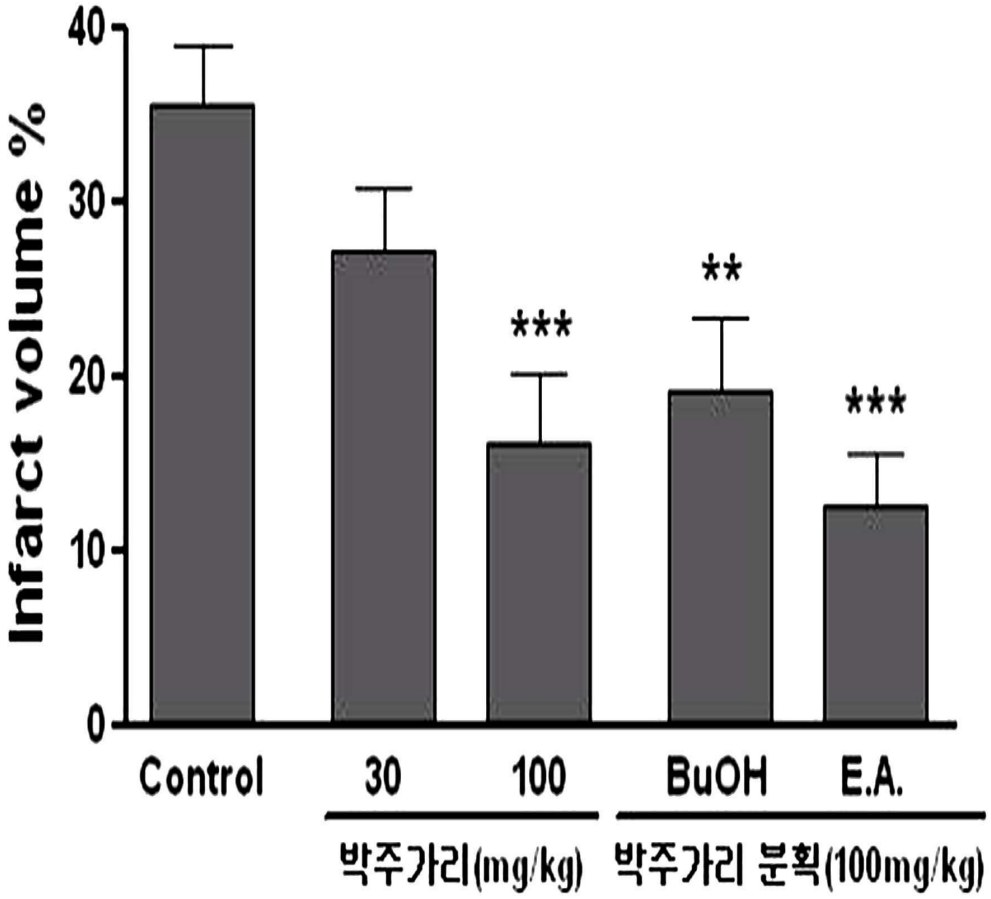
[0171] 도 6은 박주가리 70% 에탄올 수용액 추출물, 상기 추출물의 에틸 아세테이트 분획물(E.A) 및 부탄올 분획물(BuOH)의 투여에 따른 신경행동학적 회복효과를 관찰하기 위해 회전봉 행동 실험 결과를 나타내는 그래프이다.

도면

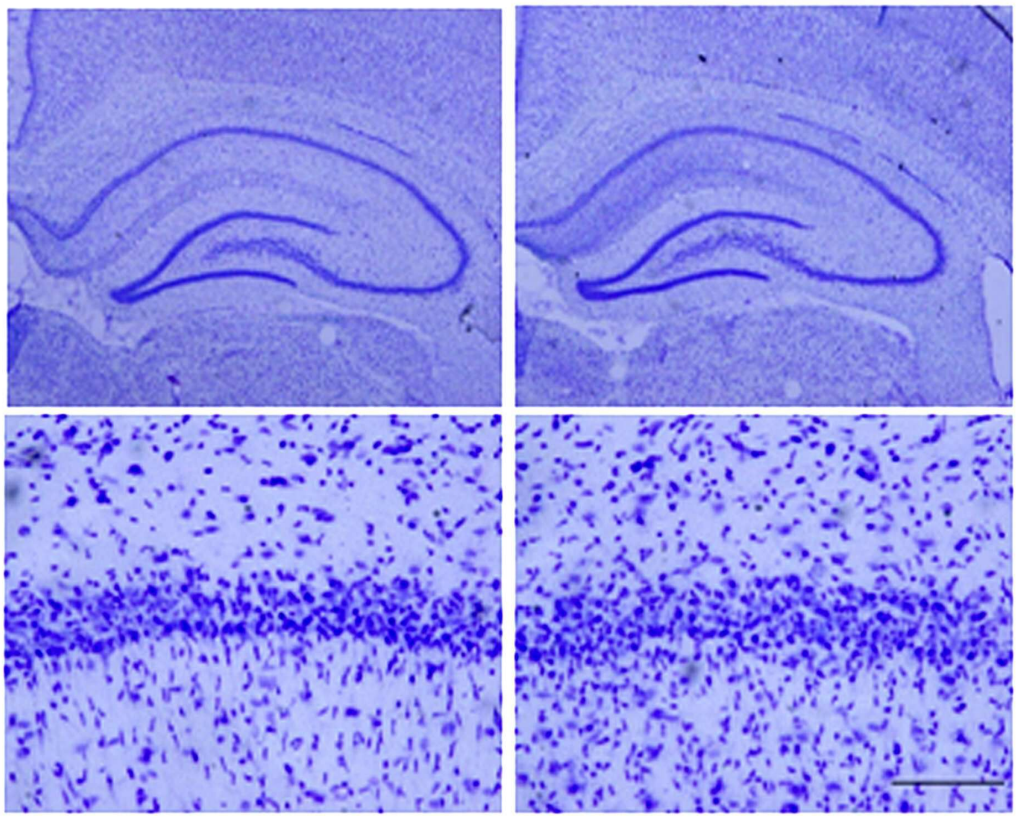
도면1



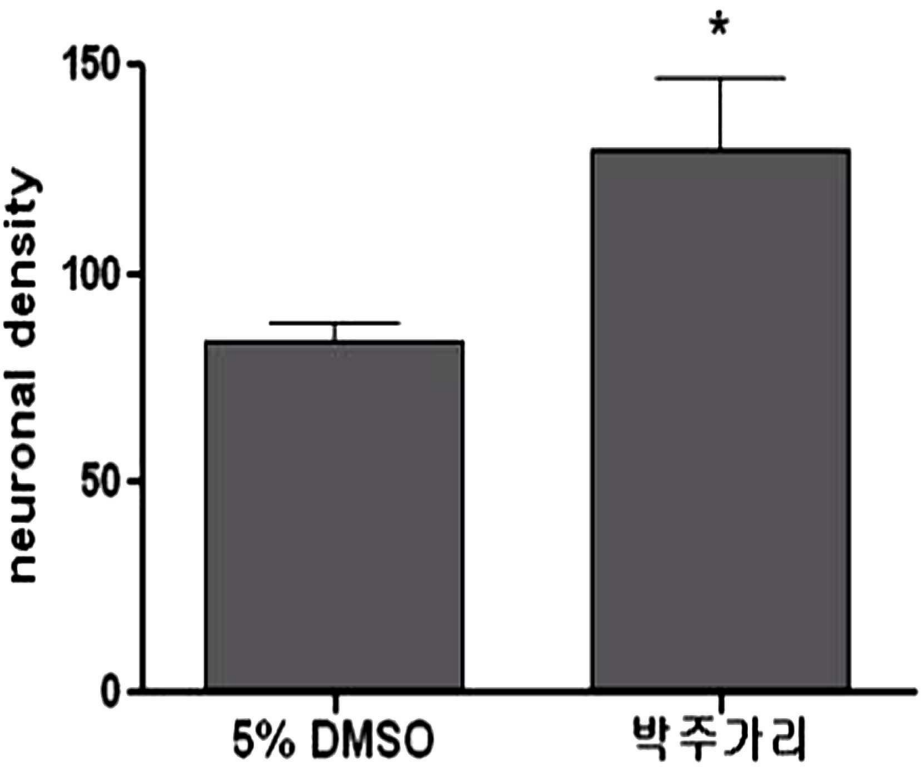
도면2


Infarct volume %
40
30
20
10
0
***
**
***
Control
30
100
BuOH
E.A.
박주가리(mg/kg)
박주가리 분획(100mg/kg)

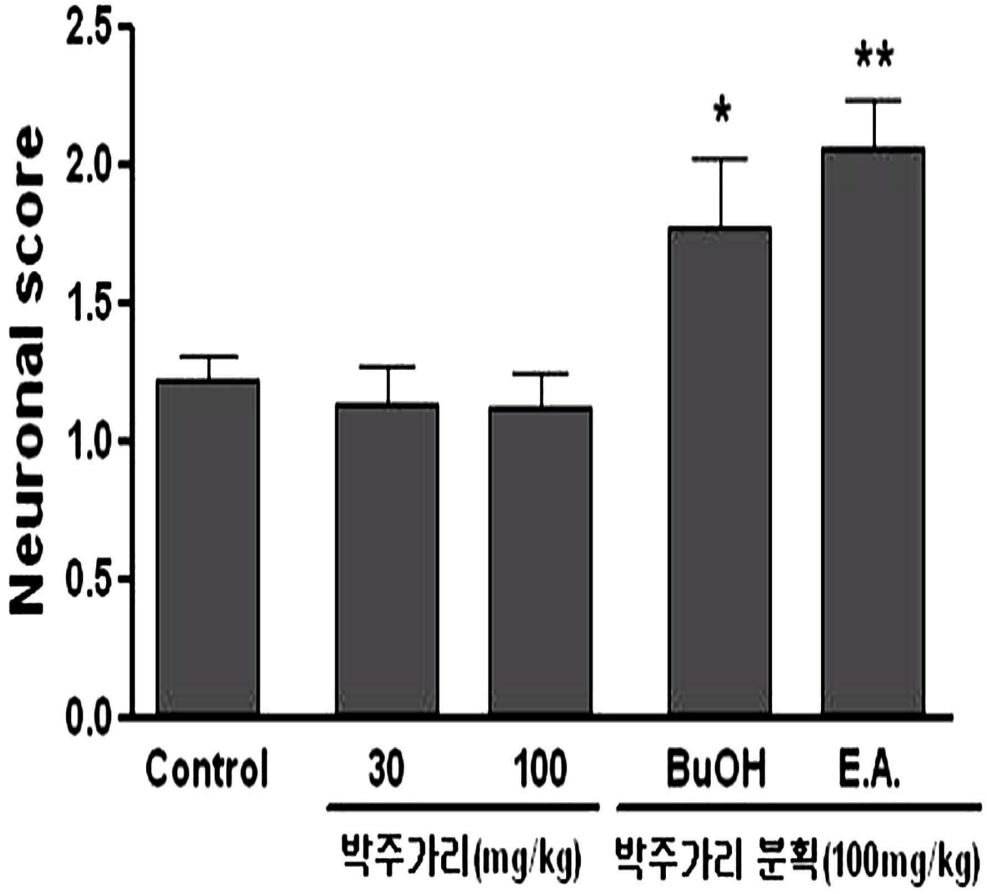
도면3



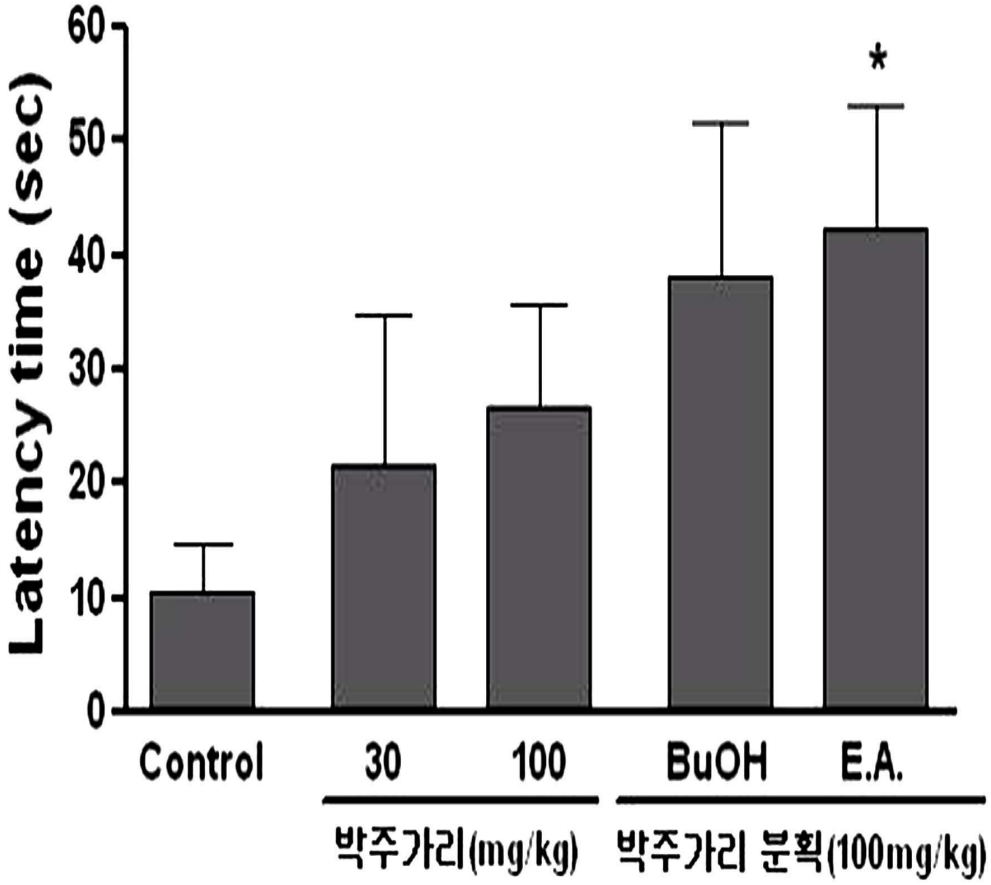
도면4



도면5


Neuronal score
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
Control
30
100
BuOH
E.A.
박주가리(mg/kg)
박주가리 분획(100mg/kg)

도면6


Latency time (sec)
60
50
40
30
20
10
0
*
Control
30
100
BuOH
E.A.
박주가리(mg/kg)
박주가리 분획(100mg/kg)