(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0051251
(43) 공개일자 2025년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 36/28* (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0134127
(22) 출원일자 2023년10월10일
심사청구일자 2023년10월10일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
허호진
경상남도 진주시 초장로 120, 504동 501호
주승겸
경상남도 진주시 소호로 39, 104동 104호
(74) 대리인
위병갑

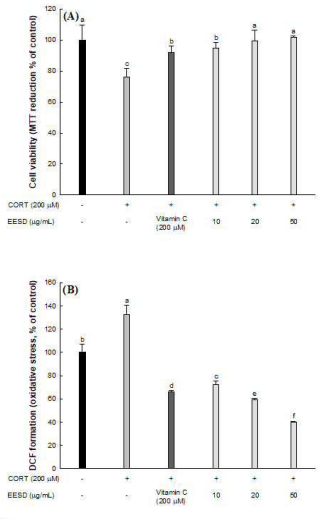
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **수리취 추출물을 포함하는 긴장 완화 또는 인지기능장애 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 수리취 추출물을 포함하는 긴장 완화 또는 인지기능장애 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 신경세포의 보호 활성, 신경세포 내 산화 스트레스 억제 효과, 미토콘드리아의 기능 개선 효과, 항산화 효과, 콜린성 시스템의 손상 억제 효과, HPA 축, 염증 및 세포 사멸의 조절 효과, 및 스트레스로 인한 긴장, 우울증 및 인지기능장애의 개선 효과를 나타냄으로써, 긴장 완화 및 인지기능장애 개선을 위해 유용하게 사용될 수 있으며, 더 나아가, 우울증, 불안증 등의 스트레스성 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 25/24 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

수리취 추출물을 포함하는 긴장 예방 또는 완화용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 긴장은 스트레스로 유발되는 것을 특징으로 하는, 긴장 예방 또는 완화용 식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 수리취 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로 추출된 것을 특징으로 하는, 긴장 예방 또는 완화용 식품 조성물.

청구항 4

수리취 추출물을 포함하는 인지기능장애 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 인지기능장애는 스트레스로 유발되는 것을 특징으로 하는, 인지기능장애 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 인지기능장애는 우울증으로 유발되는 것을 특징으로 하는, 인지기능장애 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 인지기능장애는 스트레스로 인한 우울증으로 유발되는 것을 특징으로 하는, 인지기능장애 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 수리취 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로 추출된 것을 특징으로 하는, 인지기능장애 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

수리취 추출물을 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 우울증은 스트레스로 유발되는 것을 특징으로 하는, 우울증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 수리취 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로 추출된 것을 특징으로 하는, 우울증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

수리취 추출물을 포함하는 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 인지기능장애는 스트레스로 유발되는 것을 특징으로 하는, 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 인지기능장애는 우울증으로 유발되는 것을 특징으로 하는, 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 인지기능장애는 스트레스로 인한 우울증으로 유발되는 것을 특징으로 하는, 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 수리취 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로 추출된 것을 특징으로 하는, 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 수리취 추출물을 포함하는 긴장 완화 또는 인지기능장애 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현대인들은 복잡한 사회의 구조와 과학기술과 지식이 급속히 발전함에 따라, 일상생활 속에서 끊임없이 스트레스에 노출되어 있다. 스트레스는 다양한 환경적, 생물학적 자극으로부터 체내 항상성을 유지하기 위한 인체의 생리적 반응으로, 단기로 발생하는 스트레스의 경우 상황을 극복할 수 있는 긍정적인 영향을 줄 수 있지만, 만성적인 스트레스에 노출이 되었을 경우에는 불면증, 피로 누적, 식이장애, 면역력 저하 등으로 인한 신경증, 위궤양 등의 신체적 증상이 발생하며, 집중력 또는 기억력 감소, 불안장애 등의 정신적 증상이 나타난다. 또한, 만성적인 스트레스는 기억과 학습에 관여하는 해마 부위에 신경 독성과 용적의 감소를 발생시킬 수 있는 것으로 보고되었으며, 기억, 집중, 사고, 의식 등의 중요 기능을 담당하는 대뇌 피질에서는 신경세포의 사멸을 촉진시

키는 것으로 알려져 있다.

[0003] 스트레스에 노출되면 시상하부-뇌하수체-부신 축(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis)이 활성화되어 시상하부에서 부신피질자극호르몬 방출 인자(corticotropin releasing factor, CRF)의 분비를 유발한다. CRF는 뇌하수체에서 부신피질 자극 호르몬(adrenocorticotropic hormone, ACTH)을 방출시켜 부신에서 글루코코르티코이드의 분비를 유발하고, 부신에서 분비된 글루코코르티코이드는 해마의 음성 피드백 작용을 통해 HPA 축 활동을 억제함으로써 스트레스 반응을 종료시킨다. 또한, 글루코코르티코이드는 포도당 신생합성을 촉진하여 스트레스에 대응하기 위한 에너지를 공급하는 것으로 알려져 있다. 하지만 만성적인 스트레스는 HPA 축을 과활성화시켜 글루코코르티코이드의 과분비를 유발하고, 과도한 글루코코르티코이드는 산화 스트레스를 일으켜 HPA 축의 음성 피드백을 조절하는 해마의 기능을 손상시킨다. 또한, 만성적인 스트레스는 면역 세포를 자극하여 염증성 사이토카인의 분비를 촉진한다. 증가된 염증성 사이토카인은 뇌 유래 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 및 세로토닌과 같은 호르몬의 분비를 감소시켜 우울증 및 인지기능 장애를 유발한다.

[0004] 현재 우울증 치료를 위한 항우울제는 대부분 중추 세로토닌 또는 노르아드레날린 시냅스에서 신경전달물질의 농도를 높이는 약리 작용을 가지고 있으며, 비교적 효과적이기는 하나 일부에서 심한 부작용 및 기대에 미치지 못하는 효과가 나타나는 경우가 있다. 인지기능장애의 개선을 위해서는 여러 가지 작용 기전에 따라 아세틸콜린성 신경세포의 기능을 강화시켜줄 수 있는 약물들이 개발되고 있으나 이러한 약물 또한 위장장애와 같은 일부 부작용이 나타나고 있어, 보다 안전하고 효과적인 천연 소재를 탐색하여 활용할 필요가 있다.

[0005] 한편, 수리취(*Synurus deltoides*)는 국화과에 속하는 여러해살이 식물로, 전국 산지에 분포하며 어린잎을 식용으로 한다. 수리취는 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등의 무기성분 및 식이섬유가 풍부하며, 단백질 및 탄수화물 함량이 높은 것으로 알려져 있다. 또한, 수리취의 항산화, 항염증 효과 등의 생리활성은 보고되었으나, 스트레스로 인한 우울증과 관련된 연구는 부족한 실정이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 수리취 추출물이 글루코코르티코이드에 속하는 코르티코스테론(corticosterone)으로 유도된 뇌 신경세포 독성에 대한 보호 효과, 및 스트레스로 유도된 긴장, 우울증 및 인지기능장애에 대한 개선 효과를 갖는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 수리취 추출물을 포함하는 긴장의 예방 또는 완화용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 수리취 추출물을 포함하는 인지기능장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 수리취 추출물을 포함하는 우울증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수리취 추출물을 포함하는 긴장 예방 또는 완화용 식품 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 긴장은 스트레스로 유발되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 만성 스트레스로 유발되는 것일 수 있다.

[0012] 상기 수리취 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로 추출된 것일 수 있으며, 바람직하게는 80% 에탄올로 추출된 것일 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 수리취 추출물을 포함하는 인지기능장애 예방 또는 개선용 식품 조성물, 또는 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 인지기능장애는 스트레스, 우울증 또는 스트레스로 인한 우울증으로 유발되는 것일 수 있으며, 상기 스트레스는 만성 스트레스일 수 있다.

[0015] 상기 수리취 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로 추출된 것일 수 있으며, 바람직하게는 80% 에탄올로 추출된 것일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 수리취 추출물을 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 우울증은 스트레스로 유발되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 만성 스트레스로 유발되는 것일 수 있다.

[0018] 상기 수리취 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로 추출된 것일 수 있으며, 바람직하게는 80% 에탄올로 추출된 것일 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 수리취 추출물을 포함하는 조성물은 신경세포의 보호 활성, 신경세포 내 산화 스트레스 억제 효과, 미토콘드리아의 기능 개선 효과, 항산화 효과, 콜린성 시스템의 손상 억제 효과, HPA 축, 염증 및 세포 사멸의 조절 효과, 및 스트레스로 인한 긴장, 우울증 및 인지기능장애 개선 효과를 나타냄으로써, 긴장 완화 및 인지기능장애 개선을 위해 유용하게 사용될 수 있으며, 더 나아가, 우울증, 불안증 등의 스트레스성 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 HT22 세포에서의 세포 생존율 및 활성 산소종(ROS) 수준을 확인한 결과를 나타낸다(A: 세포 생존율, B: 활성 산소종 함량).

도 2는 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 마우스의 자당 선호도 테스트(SPT)의 결과를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 마우스의 오픈 필드 테스트(OFT)의 결과를 나타낸다(A: 중앙 구역에서의 시간, B: 전체 거리, C: 경로 추적).

도 4는 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 마우스의 강제 수영 테스트(FST)의 결과를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 마우스의 꼬리 매달기 테스트(TST)의 결과를 나타낸다.

도 6은 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 마우스의 묻힌 음식 찾기 테스트의 결과를 나타낸다.

도 7은 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 마우스의 후각 회피 테스트의 결과를 나타낸다.

도 8은 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 마우스의 Y-maze 테스트의 결과를 나타낸다(A: 팔 진입 횟수, B: 교대 행동, C: 3D 경로 추적).

도 9는 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 모리스 수중 미로 테스트의 결과를 나타낸다(A: 탈출 대기 시간, B: W 구역 시간, C: 경로 추적).

도 10은 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 혈청 호르몬 분석 결과를 나타낸다(A: 코르티코스테론 수준, B: 노르에피네프린 수준, C: 5-HT 수준, D: 5-HIAA 수준, E: 5-HIAA/5-HT 비율, F: 혈청 내 멜라토닌 수준).

도 11은 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 미토콘드리아의 기능 평가 결과를 나타낸다(A: 미토콘드리아 활성 산소종 수준, B: 미토콘드리아 막 전위, C: 미토콘드리아 ATP 함량).

도 12는 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 항산화 시스템 평가 결과를 나타낸다(A: 글루타티온 수준, B: 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 함량, C: 말론디알데히드 함량).

도 13은 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 콜린성 시스템 평가 결과를 나타낸다(A: 아세틸콜린 함량, B: 세틸콜린에스테라제 활성).

도 14는 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 HPA 축 조절 관련 인자 분석 결과를 나타낸다(A: 웨스턴 블롯 밴드 이미지, B: CRF의 단백질 발현 수준, C: ACTH의 단백질 발현 수준, D: CYP11B1의 단백질 발현 수준, E: GR의 단백질 발현 수준, F: BDNF의 단백질 발현 수준).

도 15는 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 염증 조절 관련 인자 분석 결과를 나타낸다(A: 웨스턴 블롯 밴드 이미지, B: TLR4의 단백질 발현 수준, C: MyD88의 단백질 발현 수준, D: p-JNK의 단백질 발현 수준, E: p-IκB-α의 단백질 발현 수준, F: p-NF-κB의 단백질 발현 수준, G: TNF-α의 단백질 발현 수준, H: IL-1β의 단백질 발현 수준).

도 16은 본 발명의 수리취 추출물 처리에 따른 세포 사멸 조절 관련 인자 분석 결과를 나타낸다(A: 웨스턴 블롯 밴드 이미지, B: BCl-2의 단백질 발현 수준, C: BAX의 단백질 발현 수준, D: BAX/BCl-2 비율의 단백질 발현 수

준, E: Caspase-3의 단백질 발현 수준).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시태양 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시태양 및 실시예에 한정되지 않는다.

[0022] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0023] 본 발명은 수리취 추출물을 포함하는 긴장 완화용 또는 인기지능장애 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 수리취 추출물을 포함하는 우울증 또는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] 상기 긴장, 우울증 및 인지기능장애는 스트레스로 유발되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 만성 스트레스로 유발되는 것일 수 있다.

[0026] 상기 수리취 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로 추출된 것일 수 있으며, 바람직하게는 80% 에탄올로 추출된 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 수리취 추출물을 포함하는 조성물은 신경세포의 보호 효과, 신경세포 내 산화 스트레스 억제 효과, 미토콘드리아의 기능 개선 효과, 항산화 효과, 콜린성 시스템의 손상 억제 효과, HPA 축, 염증 및 세포 사멸의 조절 효과, 및 스트레스로 인한 긴장, 우울증 및 인지기능장애 개선 효과를 나타낸다.

[0028] 본 발명의 "수리취(*Synurus deltoides*)"는 국화과 여러해살이풀로, 개취, 떡취, 산우방으로도 불리며, 우리나라의 야산에서 자생하고 형태 및 분포에 따라서 큰수리취, 가새수리취, 국화수리취, 왕수리취 등으로 분류된다.

[0029] 본 발명의 "스트레스(stress)"는 인체에 해로운 육체적, 정신적 자극이 가해졌을 때 그 생체가 나타내는 반응으로 심리적, 신체적 긴장상태를 포괄하는 의미이다. 상기 스트레스로 인한 질환은 스트레스성 긴장, 스트레스성 불안, 우울증, 피로증후군, 정신분열증, 두통, 신경변성 질병, 알츠하이머, 식이장애, 신경성 식욕부진, 위염, 위궤양, 약물중독, 약물 및 알코올 금단 증후군 또는 스트레스성 정신병 등을 모두 포함한다.

[0030] 본 발명의 "인지기능장애(인지장애, cognitive disorder)"는 정상 기능을 가진 동물에 대하여 인지손상 및 행동변화를 나타내는 장애로, 기억력, 공간지각력, 판단력, 집행기능, 언어능력 등의 기능 저하로부터 발생되는 질환을 일컫는다. 상기 인지기능장애는 예를 들면, 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease), 혈관성 치매(vascular dementia), 경도 인지장애(mild cognitive impairment), 기타 알콜 중독, 외상, 파킨슨병의 후유증으로 오는 치매와 같은 다양한 원인에 기인한 치매이거나 또는 건망증을 포함한다.

[0031] 본 발명의 "우울증(우울장애, depressive disorder)"은 의욕 저하와 우울감을 주요 증상으로 하여 다양한 인지, 정신 또는 신체적 증상을 일으켜 일상 기능의 저하를 가져오는 질환을 의미한다. 원인은 화학적, 생물학적, 심리학적, 사회학적, 약리학적 또는 병리학적으로 매우 다양한데, 그 중 하나는 세로토닌, 멜라토닌, 도파민 또는 노르에피네프린 등 신경전달물질의 화학적 불균형이다. 또한, 지속적인 스트레스, 고혈압제, 항불안제, 마약, 중추신경흥분제 등과 같은 약물 복용 또는 당뇨병, 췌장암, 내분비질환 등의 질병이 우울증의 원인이 될 수 있다.

[0032] 본 발명의 "불안증(불안장애, anxiety disorder)"은 통상 6개월 이상에 걸쳐 지속적이고 회복되지 않는 신경 과민, 긴장, 근심 등 극도의 불안을 나타내는 정신적인 질환을 의미한다. 원인은 매우 다양한데, 의학적으로는 뇌 신경 내의 신경전달물질의 부족 또는 과다, 유전적 소인, 뇌 영상 연구로부터 드러난 뇌의 기능적 또는 구조적 이상 등을 원인으로 보고 있으며, 지속적인 스트레스 역시 중요한 원인이 될 수 있다. 특히 소아 또는 청소년의 경우, 주의력 결핍 과잉 행동 장애(Attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 등이 심할 때 불안증 및 우울증으로 연결될 수 있다. 불안증은 범불안 장애(Generalized anxiety disorder, GAD), 강박장애, 공황장애, 외상 후 스트레스 장애와 같이 크게 4가지 유형으로 분류되며, 그 외 급성 스트레스 장애 또는 분리 불안 장애 등이 있다.

[0033] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품, 유제품, 발효제품 또는 식품 첨가물일 수 있다. 상기 건강기능식품은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로

섭취하는 것을 의미한다.

[0034] 상기 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 액제, 페이스트, 겔, 또는 젤리 등의 형태를 포함하며, 각 제형의 식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물은 분말, 과립, 정제, 피복정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 현탁액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 좌제, 에멀전제, 페이스트제(pastes), 연고제, 크림제, 로션제, 산제, 분무제 또는 현탁액으로 제형화될 수 있다. 상기 제제화를 위해 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 희석제 등의 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구투여 또는 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 또한 상기 조성물의 치료적으로 유효한 양은 투여방법, 목적부위, 환자의 상태에 따라 달라질 수 있으며, 인체에 사용시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다.

[0037] 또한, 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있다.

[0038] 본 발명에서 사용된 용어 "추출물(extract)"은 천연물로부터 분리된 활성성분 즉, 목적하는 활성을 보이는 물질을 의미한다. 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하는 추출과정으로 획득할 수 있으며, 추출물 이의 건조 분말 또는 이를 이용하여 제형화된 모든 형태를 포함한다. 또한, 상기 추출물에는 상기 추출과정을 거친 추출물을 분획한 것도 포함된다. 추출물의 추출 방법은 특별히 제한되지 않으며, 예컨대 교반추출, 진탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법으로 추출될 수 있다. 추출 용매로는 물, C1-C4의 저급 알코올과 같은 극성 용매나 헥산, 클로로포름, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트와 같은 비극성 용매, 또는 이들 중 2 이상의 혼합물을 사용할 수도 있다.

[0039] 본 발명에 사용된 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 질환 등을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하고, "개선"은 상기 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미하며, "완화"는 상기 조성물의 투여에 의해 발병 개체의 증상이 질적 또는 양적으로 개선되는 모든 효과를 의미한다.

[0040] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본원 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0042] **[준비예 1] 재료 및 추출물 제조**

[0043] 본 발명에 사용된 수리취(*Synurus deltoides*)는 강원도 홍천군에서 2021년 3월에 재배된 것을 구매하였다. 이후, 시료를 동결건조기(FDU-8612, Operon, Gimpo, Korea)로 건조한 뒤 분쇄하여 -20℃에서 냉동보관하여 사용하였다. 동결건조된 시료 20 g에 80% 에탄올 1 L를 첨가하여 40℃에서 2시간 동안 환류 냉각하에 추출하였다. 추출물은 No.2 여과지(Whatman PLC, Kent, UK)로 여과한 뒤 40℃에서 회전진공농축기(N-N series, EYELA Co., Tokyo, Japan)로 농축하였다. 농축한 추출물을 동결건조기로 건조한 뒤 -20℃에서 냉동 보관하여 각 실험에 사용하였다.

[0045] **[준비예 2] 뇌 신경세포 배양**

[0046] 본 발명에 사용된 HT22 세포는 마우스의 뇌 해마 조직에서 유래한 것으로 뇌 신경세포의 특성을 나타내며 경상국립대학교 수의과대학 조직학실험실(Jinju, Republic of Korea)에서 2021년 12월에 분양받았다. HT22 세포는 10% calf serum, 50 unit/mL penicillin 및 100 μg/mL streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

[0048] **[준비예 3] 스트레스 동물 모델 디자인**

[0049] 본 발명에 사용된 C57BL/6(4 weeks old, male) 마우스는 Samtako(Osan, Republic of Korea)에서 구매하였다. 마우스는 5마리씩 나누어 항온(22±2℃), 항습(50-55%) 및 12시간 간격으로 낮과 밤을 교대시키는 환경에서 사육하였다(경상국립대학교 동물실험 인가번호: GNU-220314-M0030; 승인일: 2022.03.14.). 마우스는 정상 대조군(NC), 샘플 대조군(NS), 스트레스 처리군(CUMS), 스트레스 + L-theanine 4 mg/kg of body weight 처리군(양성 대조군, PC), 스트레스 + EESD(수리취 에탄올 추출물) 20 mg/kg of body weight 처리군(EESD 20) 및 스트레스 + EESD 50 mg/kg of body weight 처리군(EESD 50)으로 나누었고, 실험동물에 대한 샘플과 양성 대조 물질은 경구투여 방식을 활용하였다.

[0050] 만성적인 스트레스(chronic unpredictable mild stress, CUMS)는 24시간 동안 음식 또는 물 공급 제한, 밤샘 조명, 24시간 동안 케이지 45° 기울임, 24시간 동안 다른 실험동물의 케이지와 교체, 24시간 동안 젖은 깔집 적용, 24시간 동안 깔집을 제거한 빈 케이지 적용, 2시간 동안 구속 등의 스트레스 요인을 무작위로 일주일에 하루에 한 가지씩 처리하고 전체 4주간 진행하였다.

[0052] **[준비예 4] 미토콘드리아 분리**

[0053] 뇌 조직에서 미토콘드리아를 분리하기 위해 뇌 조직을 215 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0.1% BSA, 20 mM HEPES sodium salt 및 1 mM EGTA가 포함된 isolation buffer (pH 7.2)로 균질화하고 원심분리(1,300 xg, 5분, 4℃)하여 얻은 상등액을 다시 원심분리(13,000 xg, 10분, 4℃)하였다. 이후, pellet에 0.1% digitonin이 포함된 isolation buffer를 첨가하여 5분간 얼음에서 반응시키고 원심분리(13,000 xg, 15분, 4℃)하였다. 이후, pellet에 EGTA-free isolation buffer를 첨가하여 원심분리(10,000 xg, 10분, 4℃)하였다. 최종 pellet에 다시 EGTA-free isolation buffer를 첨가하여 실험에 사용하였다.

[0055] **[준비예 5] 통계처리**

[0056] 본 발명의 모든 결과는 평균과 표준편차(mean±SD)로 나타냈으며, 각 값은 SAS software(version 9.4, SAS institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석을 시행하였고 Ducan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)을 이용하여 5% 수준 내에서 유의성을 검증하였다.

[0058] **[실시예 1] 뇌 신경세포 보호 효과 측정**

[0059] 뇌 신경세포 보호 효과를 측정하기 위해 HT22 세포를 96-well plate에 $1x10^4$ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포에 수리취 80% 에탄올 추출물(EESD)을 10, 20, 50 ug/mL 처리하고 30분간 반응시킨 뒤 200 μM 코르티코스테론(corticosterone)을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포에 10 μM MTT 용액을 처리하여 2시간 동안 반응시킨 뒤 배지를 제거하고 DMSO를 처리하여 반응을 종결시켰다. 흡광도는 microplate reader(Epoch2, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)로 determination wave 570 nm와 reference wave 655 nm에서 측정하였다.

[0060] 그 결과, 도 1A에 나타낸 바와 같이, 코르티코스테론(Corticosterone) 처리군 및 비타민 C를 처리한 양성대조군의 세포 생존율이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 세포 생존율이 증가한 것을 확인하였다. 특히, 50 μg/mL의 EESD를 처리한 군은 세포 생존율이 101.91%로 가장 많이 증가하였으며, 따라서 우수한 세포 보호 효과를 나타내었다.

[0062] **[실시예 2] 뇌 신경세포 내 산화 스트레스 억제 효과 측정**

[0063] 뇌 신경세포 내 산화 스트레스 억제 효과를 측정하기 위해 HT22 세포를 black 96-well plate에 $1x10^4$ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포에 EESD를 리하고 30분간 반응시킨 뒤 200 μM corticosterone을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포에 10 μM DCF-DA 용액을 처리하여 50분간 반응시킨 뒤 형광광도계(Infinite F200, Tecan, Mannedorf, Swiss)로 excitation wave 485 nm와 emission wave

535 nm에서 형광을 측정하였다.

[0064] 그 결과, 도 1B에 나타낸 바와 같이, 코르티코스테론(Corticosterone) 처리군의 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 수준이 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 ROS 수준이 감소한 것을 확인하였다. 특히, 50 μg/mL의 EESD를 처리한 군의 HT22 세포 내 ROS 수준은 40.12%로 가장 많이 감소하였으며, 따라서 우수한 세포 내 산화 스트레스 억제 효과를 나타내었다.

[0066] **[실시예 3] 동물 행동 실험**

[0067] **3-1. 자당 선호도 측정(Sucrose preference test)**

[0068] 자당 선호도 측정은 총 4일간 진행하였다. 첫 번째 날, 마우스를 한 마리씩 분리하고 각 케이지에 1% 자당 용액 두 병을 24시간 동안 공급하였다. 두 번째 날, 자당 용액 한 병을 물로 교체하고 특정 위치에 대한 선호를 방지하기 위해 12시간 뒤 두 병의 위치를 서로 교체하였다. 세 번째 날, 물과 음식을 24시간 동안 제한하였다. 마지막 날, 각 케이지에 자당 용액과 물을 공급하고 1시간 동안의 소모량을 기록하였다. 자당 선호도는 총 소비량에 대한 자당 소비량의 백분율로 계산하였다.

[0069] 스트레스로 인한 긴장, 우울증 또는 인지기능장애가 유도되면 마우스의 자당 선호도는 감소하게 되고, 이러한 평가 기준을 기초로 수리취 에탄올 추출물이 긴장, 우울증 또는 인지기능장애로 유발되는 행동을 개선하는 효과가 있는지 확인하였다.

[0070] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 자당 선호도가 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 자당 선호도는 증가한 것으로 나타났다.

[0072] **3-2. 오픈 필드 테스트(Open field test)**

[0073] 오픈 필드(흰색 아크릴 상자, 가로 50 cm x 세로 50 cm x 높이 50 cm)를 25 x 25 cm의 중앙 공간과 가장자리 공간으로 구분하였다. 마우스를 가장자리 영역에서부터 5분간 오픈 필드를 자유롭게 탐색하게 하였다. 마우스가 중앙 공간에 머무른 시간과 움직인 거리를 Smart 3.0 video tracking system (Panlab., Barcelona, Spain)을 이용하여 기록하였다.

[0074] 스트레스로 인한 긴장, 우울증 또는 인지기능장애가 유도되면 마우스의 활동성이 감소하게 되고, 이러한 평가 기준을 기초로 수리취 에탄올 추출물이 긴장, 우울증 또는 인지기능장애로 유발되는 행동을 개선하는 효과가 있는지 확인하였다.

[0075] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 중앙 공간에 머무른 시간이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 중앙 공간에 머무른 시간이 증가한 것으로 나타났다. 또한, 스트레스 처리군(CUMS)의 총 움직인 거리가 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 총 움직인 거리는 증가한 것으로 나타났다.

[0077] **3-3. 강제 수영 테스트(Forced swimming test)**

[0078] 강제 수영 테스트는 유리 원통 수조(지름 20 cm x 높이 50 cm)에 물을 채우고 마우스를 5분간 강제 수영하게 하였다. 마우스의 부동 시간을 Smart 3.0 video tracking system(Panlab.)을 이용하여 기록하였다.

[0079] 스트레스로 인한 긴장, 우울증 또는 인지기능장애가 유도되면 마우스의 부동 시간이 증가하게 되고, 이러한 평가 기준을 기초로 수리취 에탄올 추출물이 긴장, 우울증 또는 인지기능장애로 유발되는 행동을 개선하는 효과가 있는지 확인하였다.

[0080] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 부동 시간이 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 부동 시간이 감소한 것으로 나타났다.

[0082] **3-4. 꼬리 매달기 테스트(Tail suspension test)**

[0083] 꼬리 매달기 테스트는 의료용 테이프를 이용하여 마우스를 거꾸로 매달고 총 실험 시간 6분 중 마지막 4분간 마우스의 부동 시간을 Smart 3.0 video tracking system(Panlab.)을 이용하여 기록하였다.

[0084] 스트레스로 인한 긴장, 우울증 또는 인지기능장애가 유도되면 마우스의 부동 시간이 증가하게 되고, 이러한 평가 기준을 기초로 수리취 에탄올 추출물이 긴장, 우울증 또는 인지기능장애로 유발되는 행동을 개선하는 효과가 있는지 확인하였다.

[0085] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 부동 시간이 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 부동 시간이 감소한 것으로 나타났다.

[0087] **3-5. 묻힌 음식 찾기 테스트(Buried food pellet test)**

[0088] 묻힌 음식 찾기 테스트는 총 3일간 진행하였다. 테스트를 수행하기 전 24시간 동안 마우스에 물과 음식 공급을 중단하였다. 두 번째 날, 케이지(가로 20 cm x 세로 26 cm x 높이 13 cm)에 5 cm 높이로 깔짚을 채우고 케이지 한쪽 모서리에 1 cm 깊이로 음식을 매장하였다. 이후, 마우스를 케이지 중앙에 위치시키고 5분간 자유롭게 탐색하도록 하였고, 마우스가 앞발 또는 이빨로 음식을 찾는 데까지 걸리는 시간을 기록하였다. 테스트 후, 마우스의 생존을 위해 1 g의 음식을 공급하였다. 세 번째 날, 묻힌 음식의 위치를 바꾸고 두 번째 날과 같은 방법으로 실험을 진행하였다.

[0089] 스트레스로 인한 긴장, 우울증 또는 인지기능장애가 유도되면 마우스가 음식을 찾는 데까지 걸리는 시간이 증가하게 되고, 이러한 평가 기준을 기초로 수리취 에탄올 추출물이 긴장, 우울증 또는 인지기능장애로 유발되는 행동을 개선하는 효과가 있는지 확인하였다.

[0090] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 음식을 찾는 데까지 걸리는 시간이 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 음식을 찾는 데까지 걸리는 시간은 감소한 것으로 나타났다.

[0092] **3-6. 후각 회피 테스트(Olfactory avoidance test)**

[0093] 후각 회피 테스트를 위해 케이지(가로 26 cm x 세로 42 cm x 높이 18 cm)를 1:3으로 나누어 더 작은 구역에 No.2 여과지를 놓고 증류수로 희석한 2-methylbutyric acid(1.7×10^{-6} mol)를 분주하였다. 마우스를 케이지의 더 넓은 구역에 위치시키고 5분간 자유롭게 탐색하도록 하였다. 마우스가 케이지의 더 넓은 구역에 머무른 시간(회피 시간)을 Smart 3.0 video tracking system(Panlab.)을 이용하여 기록하였다.

[0094] 스트레스로 인한 긴장, 우울증 또는 인지기능장애가 유도되면 마우스의 회피 시간이 감소하게 되고, 이러한 평가 기준을 기초로 수리취 에탄올 추출물이 긴장, 우울증 또는 인지기능장애로 유발되는 행동을 개선하는 효과가 있는지 확인하였다.

[0095] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 회피 시간이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 회피 시간은 증가한 것으로 나타났다.

[0097] **3-7. Y-maze 테스트(Y-maze test)**

[0098] Y-maze(길이 33 cm x 너비 10 cm x 높이 15 cm) 테스트는 마우스를 Y-maze의 한쪽 팔 끝에 위치시키고 8분간 자유롭게 탐색하게 하였다. 마우스가 총 팔에 들어간 횟수와 교차 행동 수준을 Smart 3.0 video tracking system(Panlab.)을 이용하여 기록하였다.

[0099] 스트레스로 인한 긴장, 우울증 또는 인지기능장애가 유도되면 마우스의 교차 행동 수준이 감소하게 되고, 이러한 평가 기준을 기초로 수리취 에탄올 추출물이 긴장, 우울증 또는 인지기능장애로 유발되는 행동을 개선하는 효과가 있는지 확인하였다.

[0100] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 각 실험군 간 총 팔에 들어간 횟수는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 그러나, 스트레스 처리군(CUMS)의 교차 행동 수준이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 교차 행동 수준은 증가한 것으로 나타났다.

[0102] **3-8. 모리스 수중 미로 테스트(Morris water maze tets)**

[0103] 모리스 수중 미로(직경 90 cm x 높이 30 cm) 테스트는 총 6일간 진행하였다. 테스트를 위해 모리스 수중 미로를 사분면(E, W, S 및 N)으로 나누고 무독성의 흰색 잉크를 녹인 물을 채웠다. 각 사분면에 시각적 단서를 제공하고 W 구역의 중앙에 도피대를 설치하였다. 첫 번째 날, 도피대가 수면 위로 1 cm 가량 보이는 상태에서 1분간 마우스가 도피대를 찾을 때까지 수영하도록 하였다(visible test). 이후, 도피대가 수면 아래로 1 cm 가량 잠겨 보이지 않는 상태에서 4일간 하루에 4번씩 각각 다른 입수 위치에서 테스트를 진행하였고 1분간 도피대를 찾는 데까지 걸리는 시간을 기록하였다. 마우스가 시간 내 도피대를 찾지 못할 경우 도피대로 유도하여 20초간 머무르게 하였다(hidden test). 마지막 날, 도피대를 제거한 상태에서 1분간 마우스의 움직임과 W 구역에 머무른 시간을 Smart 3.0 video tracking system(Panlab.)을 이용하여 기록하였다(probe test).

[0104] 스트레스로 인한 긴장, 우울증 또는 인지기능장애가 유도되면 마우스의 기억력 및 학습력이 저하되고, 이러한 평가 기준을 기초로 수리취 에탄올 추출물이 긴장, 우울증 또는 인지기능장애로 유발되는 행동을 개선하는 효과가 있는지 확인하였다.

[0105] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, Hidden test를 진행하면서 모든 실험군은 도피대를 찾는 데까지 걸리는 시간이 감소하는 경향을 나타났다. 그러나, Probe test에서 스트레스 처리군(CUMS)의 W 구역에 머무른 시간이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 W 구역에 머무른 시간은 증가한 것으로 나타났다.

[0107] 따라서, 수리취 에탄올 추출물은 스트레스로 인한 긴장, 우울증 및 인지기능장애를 개선시키는 것을 확인하였다.

[0109] **[실시예 4] 호르몬 분석**

[0110] 혈청 호르몬 분석은 초고성능 액체크로마토그래피(ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer, UPLC-Q-TOF-MS, Vion, Waters Corp., Milford, MA, USA)로 수행하였다. 혈청은 내부표준물질로 0.1% terfenadine이 포함된 100% 메탄올로 용해하여 분석에 사용하였다. 컬럼은 ACQUITY UPLC BEH C18 column(100 x 2.1 mm, 1.7 μm; Waters Corp.)을 이용하였다. 이동상은 0.1% formic acid가 포함된 증류수(A)와 0.1% formic acid가 포함된 아세토니트릴(B)이며, 유속은 0.5 mL/min이다. Positive electrospray ionization (ESI) mode, 10-30 eV, 50-1,000 m/z에서 분석하였다.

[0111] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 corticosterone, 5-HIAA 및 5-HIAA/5-HT ratio가 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 corticosterone, 5-HIAA 및 5-HIAA/5-HT ratio는 감소한 것으로 나타났다. 또한, 스트레스 처리군(CUMS)의 norepinephrine, 5-HT 및 melatonin 수치가 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 norepinephrine, 5-HT 및 melatonin 수치는 증가한 것으로 나타났다.

[0112] 따라서, 수리취 에탄올 추출물은 스트레스로 인한 우울증 및 인지기능장애를 개선시키는 것을 확인하였다.

[0114] **[실험예 5] 미토콘드리아 기능 평가**

[0115] **5-1. 미토콘드리아 내 ROS 수준**

[0116] 미토콘드리아 내 ROS 수준을 측정하기 위해 추출된 미토콘드리아 용액에 125 mM KCl, 20 mM KH_2PO_4, 2.5 mM malate, 20 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM pyruvate 및 0.5 mM EGTA가 포함된 respiration buffer(pH 7.0)와 25 μM DCF-DA 용액을 첨가하여 20분간 암실에서 반응시키고 형광광도계(Infinite F200, Tecan)로 excitation wave 485 nm와 emission wave 535 nm에서 형광을 측정하였다.

[0117] 그 결과, 도 11A에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 미토콘드리아 내 ROS 수준이 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 미토콘드리아 내 ROS 수준은 감소한 것으로 나타났다.

[0119] **5-2. 미토콘드리아 막 전위**

[0120] 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)를 측정하기 위해 추출된 미토콘드리아 용액에 5 mM pyruvate 및 5mM malate가 포함된 isolation buffer와 1 μM JC-1을 첨가하여 20분간 암실에서 반응시키고 형광광도계(Infinite F200, Tecan)로 excitation wave 535 nm와 emission wave 590 nm에서 형광을 측정하였다.

[0121] 그 결과, 도 11B에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 MMP가 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 MMP는 증가한 것으로 나타났다.

[0123] **5-3. 미토콘드리아 내 ATP 함량**

[0124] 미토콘드리아 내 ATP 함량을 측정하기 위해 추출된 미토콘드리아 용액을 원심분리(13,000 xg, 10분, 4℃)하여 얻은 pellet에 1% TCA가 포함된 25 mM tris-acetate buffer(pH 7.75)를 첨가하고 다시 원심분리(13,000 xg, 10분, 4℃)하여 얻은 상등액을 실험에 사용하였다. 미토콘드리아 내 ATP 함량 측정은 ATP assay kit와 luminometer(GloMax-Multi Detection System, Promega Corp., Madison, WI, USA)를 이용하였다.

[0125] 그 결과, 도 11C에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 미토콘드리아 내 ATP 함량이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 미토콘드리아 내 ATP 함량은 증가한 것으로 나타났다.

[0127] 따라서, 수리취 에탄올 추출물은 미토콘드리아의 기능을 개선시키는 것을 확인하였다.

[0129] **[실험예 6] 항산화 시스템 평가**

[0130] **6-1. 뇌 조직의 GSH 수준**

[0131] Reduced glutathione(GSH) 수준을 측정하기 위해 뇌 조직을 1 mM EDTA를 포함한 10 mM phosphate buffer (pH 6.0)로 균질화하고 원심분리(10,000 xg, 15분, 4℃)하여 얻은 상등액을 5% metaphophoric acid와 1:1 비율로 혼합하고 다시 원심분리(2,000 xg, 2분, 4℃)하여 얻은 상등액을 실험에 사용하였다. 뇌 조직 상등액에 0.26 M tris-HCl, 0.65 N NaOH 및 1 mg/mL OPT를 첨가하여 15분간 암실에서 반응시키고 형광광도계(Infinite F200, Tecan)로 excitation wave 320 nm와 emission wave 420 nm에서 형광을 측정하였다.

[0132] 그 결과, 도 12A에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 GSH 수준이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 GSH 수준은 증가한 것으로 나타났다.

[0134] **6-2. 뇌 조직의 SOD 함량**

[0135] Superoxide dismutase(SOD) 함량을 측정하기 위해 뇌 조직을 PBS (pH 7.4)로 균질화하고 원심분리(400 xg, 10분, 4℃)하여 얻은 펠렛에 10x SOD buffer, 20% (*v*/*v*) Triton X-100 및 200 mM pMSF를 포함한 1x cell extraction buffer를 첨가하였다. 이후, 혼합물을 30분간 얼음에서 반응시키고 원심분리(10,000 xg, 10분, 4℃)하여 얻은 상등액을 실험에 사용하였다. SOD 함량은 SOD assay kit를 이용하여 측정하였다.

[0136] 그 결과, 도 12B에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 SOD 함량이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 SOD 함량은 증가한 것으로 나타났다.

[0138] **6-3. 뇌 조직의 MDA 함량**

[0139] Malondialdehyde(MDA) 함량을 측정하기 위해 뇌 조직을 PBS (pH 7.4)로 균질화하고 원심분리(6,000 xg, 10분, 4℃)하여 얻은 상등액을 실험에 사용하였다. 뇌 조직 상등액에 1% phosphoric acid 및 0.67% TBA를 첨가하여 1시간 동안 95℃의 항온 수조에서 반응시키고 분광광도계(UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0140] 그 결과, 도 12C에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 MDA 함량이 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물

(EESD) 처리군의 MDA 함량은 감소한 것으로 나타났다.

[0142] 따라서, 수리취 에탄올 추출물은 항산화 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0144] **[실험예 7] 콜린성 시스템 평가**

[0145] **7-1. 뇌 조직의 ACh 함량**

[0146] 아세틸콜린(acetylcholine, ACh) 함량을 측정하기 위해 뇌 조직을 PBS(pH 7.4)로 균질화하고 원심분리(12,000 rpm, 30분, 4℃)하여 얻은 상등액을 실험에 사용하였다. 뇌 조직 상등액에 2 M hydroxylamine in 1 N HCl 및 3.5 N NaOH를 포함한 alkaline hydroxylamine 시약, 0.5 N HCl 및 0.37 M $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ in 0.1 N HCl를 첨가하고 microplate reader(Epoch2, BioTek Instruments Inc.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0147] 그 결과, 도 13A에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 ACh 함량이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 ACh 함량은 증가한 것으로 나타났다.

[0149] **7-2. 뇌 조직의 AChE 활성**

[0150] 아세틸콜린분해효소(acetylcholinesterase, AChE) 활성을 측정하기 위해 뇌 조직을 PBS(pH 7.4)로 균질화하고 원심분리(12,000 rpm, 30분, 4℃)하여 얻은 상등액을 실험에 사용하였다. 뇌 조직 상등액에 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 37℃에서 15분간 반응시켰다. 이후, 0.5 mM ATCI 및 1 mM DTNB를 포함한 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시키고 microplate reader(Epoch2, BioTek Instruments Inc.)를 이용하여 405 nm에서 20분간 흡광도를 측정하였다.

[0151] 그 결과, 도 13B에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 AChE 활성이 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 AChE 활성은 감소한 것으로 나타났다.

[0153] 따라서, 수리취 에탄올 추출물은 콜린성 시스템의 손상을 억제하는 것을 확인하였다.

[0155] **[실험예 8] Western blot assay**

[0156] Western blot assay를 위해 뇌 조직을 1% protease inhibitor가 포함된 ProtinEx™ animal cell/tissue로 균질화하였다. 균질화된 뇌 조직을 원심분리(13,000 xg, 10분, 4℃)하여 얻은 상등액을 Bradford 시약을 사용하여 단백질을 정량하고 2x loading dye와 1:1 비율로 혼합하여 95℃에서 5분간 반응시켰다. 이후, SDS-PAGE로 단백질을 분리하여 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 transfer한 뒤 5% skim milk로 1시간 동안 blocking 하였다. 이후, membrane을 4℃에서 1:1,000으로 희석한 1차 항체와 밤새 반응시킨 뒤 상온에서 1:2,500으로 희석한 2차 항체와 2시간 동안 반응시켰다. 단백질 발현은 membrane에 ProNa™ ECL Ottimo를 첨가하여 iBright CL1500 Imaging system (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 측정하였다.

[0158] **8-1. HPA 축 조절 관련 인자**

[0159] 뇌 조직에서 HPA 축 조절 관련 인자들의 단백질 발현을 측정한 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 CRF, ACTH 및 CYP11B1의 발현이 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 CRF, ACTH 및 CYP11B1의 발현은 감소한 것으로 나타났다. 또한, 스트레스 처리군(CUMS)의 GR 및 BDNF의 발현이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 GR 및 BDNF의 발현은 증가한 것으로 나타났다.

[0161] **8-2. 염증 조절 관련 인자**

[0162] 뇌 조직에서 염증 조절 관련 인자들의 단백질 발현을 측정한 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군

(CUMS)의 TLR4, MyD88, p-JNK, p-IκB-α, p-NF-κB, TNF-α 및 IL-1β의 발현이 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 TLR4, MyD88, p-JNK, p-IκB-α, p-NF-κB, TNF-α 및 IL-1β의 발현은 감소한 것으로 나타났다.

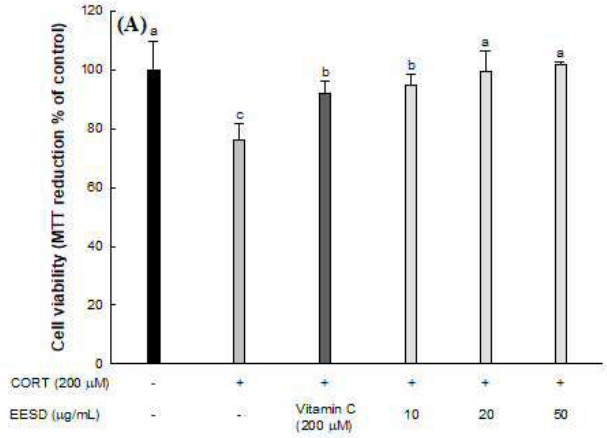
[0164] **8-3. 세포 사멸 조절 관련 인자**

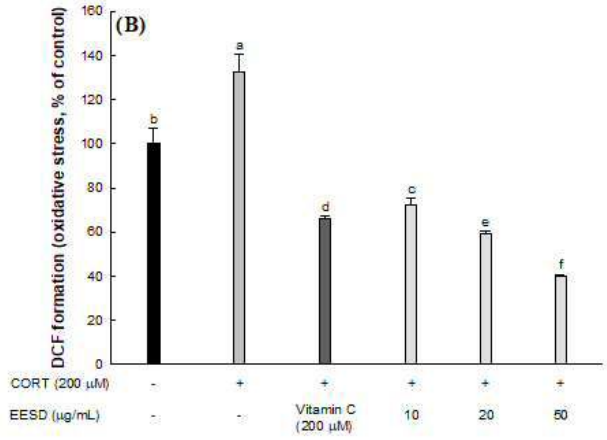
[0165] 뇌 조직에서 세포 사멸 조절 관련 인자들의 단백질 발현을 측정한 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이, 스트레스 처리군(CUMS)의 BCl-2 발현이 감소한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 BCl-2 발현은 증가한 것으로 나타났다. 또한, 스트레스 처리군(CUMS)의 BAX, BAX/BCl-2 ratio 및 Caspase-3의 발현이 증가한 반면, 수리취 에탄올 추출물(EESD) 처리군의 BAX, BAX/BCl-2 ratio 및 Caspase-3의 발현은 감소한 것으로 나타났다.

[0167] 따라서, 수리취 에탄올 추출물은 HPA 축, 염증 및 세포 사멸을 조절하는 효과를 갖는 것을 확인하였다.

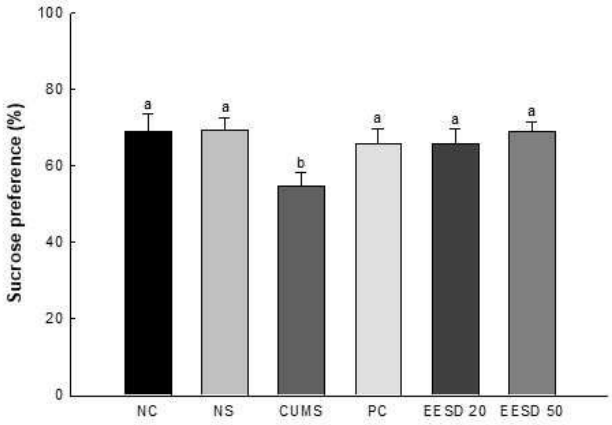
도면

도면1

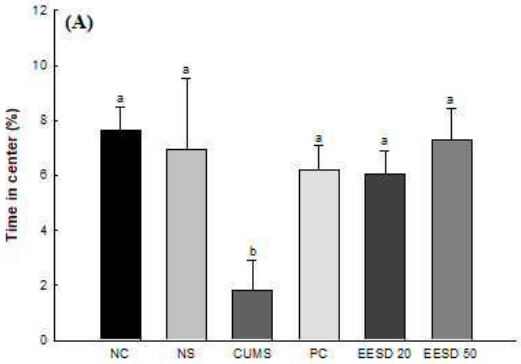


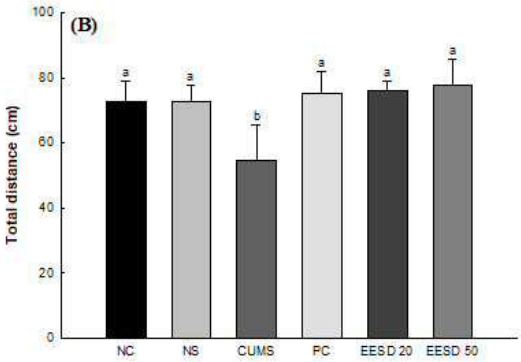


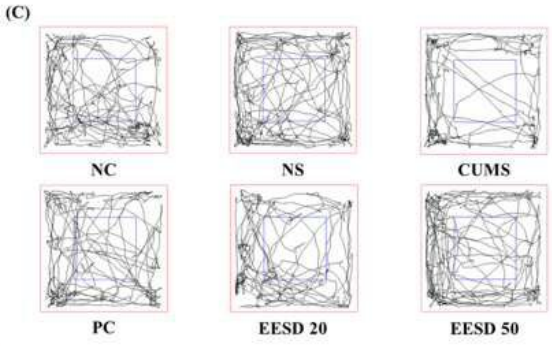
도면2


Sucrose preference (%)
100
80
60
40
20
0
a
a
b
a
a
a
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

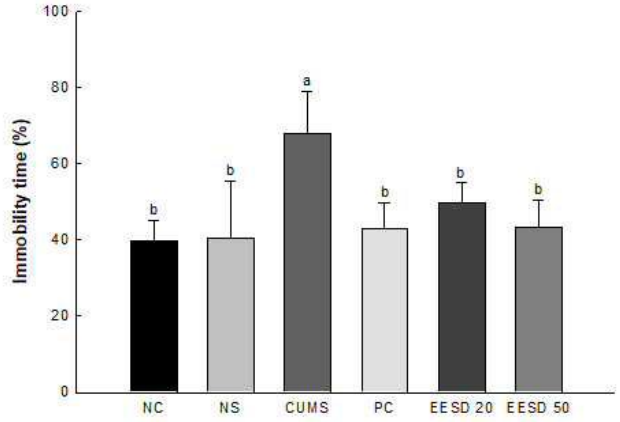
도면3


(A)
Time in center (%)
12
10
8
6
4
2
0
a
a
b
a
a
a
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

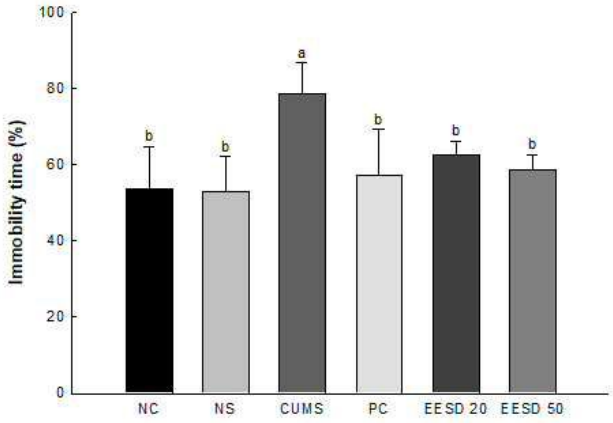

(B)
Total distance (cm)
100
80
60
40
20
0
a
a
b
a
a
a
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50


(C)
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

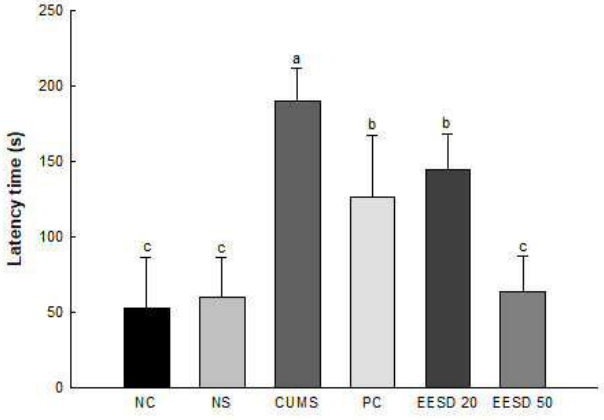
도면4


Immobility time (%)
100
80
60
40
20
0
a
b
b
b
b
b
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

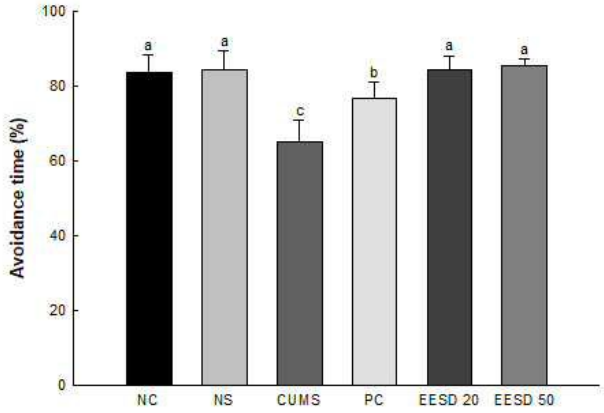
도면5


Immobility time (%)
100
80
60
40
20
0
a
b
b
b
b
b
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

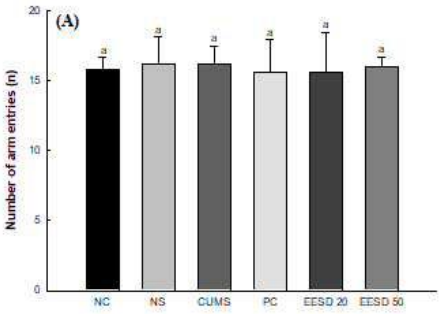
도면6

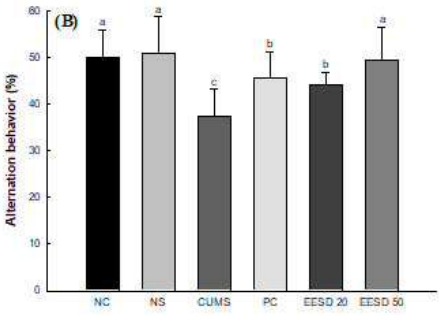

Latency time (s)
250
200
150
100
50
0
a
b
b
c
c
c
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

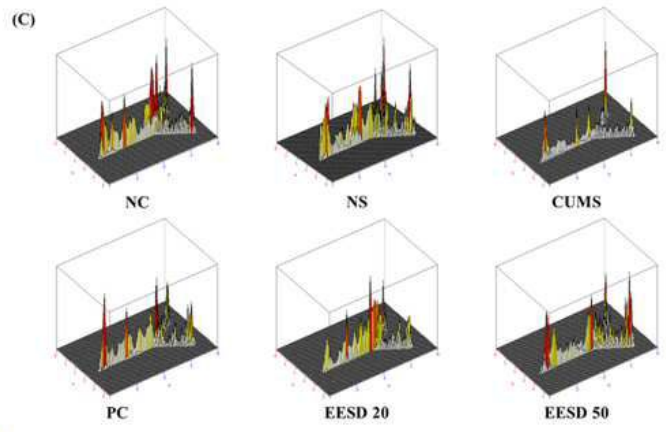
도면7


Avoidance time (%)
100
80
60
40
20
0
a
a
c
b
a
a
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

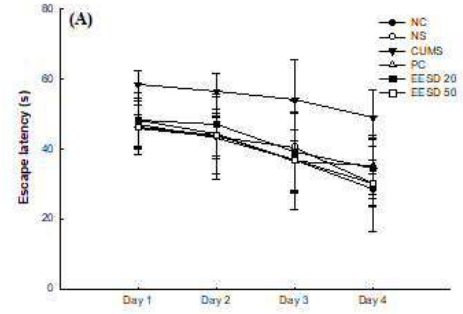
도면8

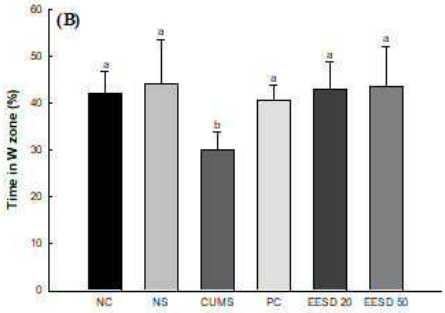

(A)
Number of arm entries (n)
20
15
10
5
0
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

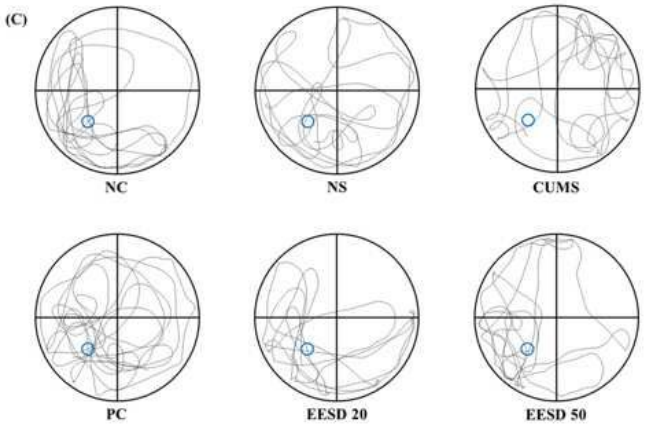

(B)
Alternation behavior (%)
60
50
40
30
20
10
0
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50


(C)
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

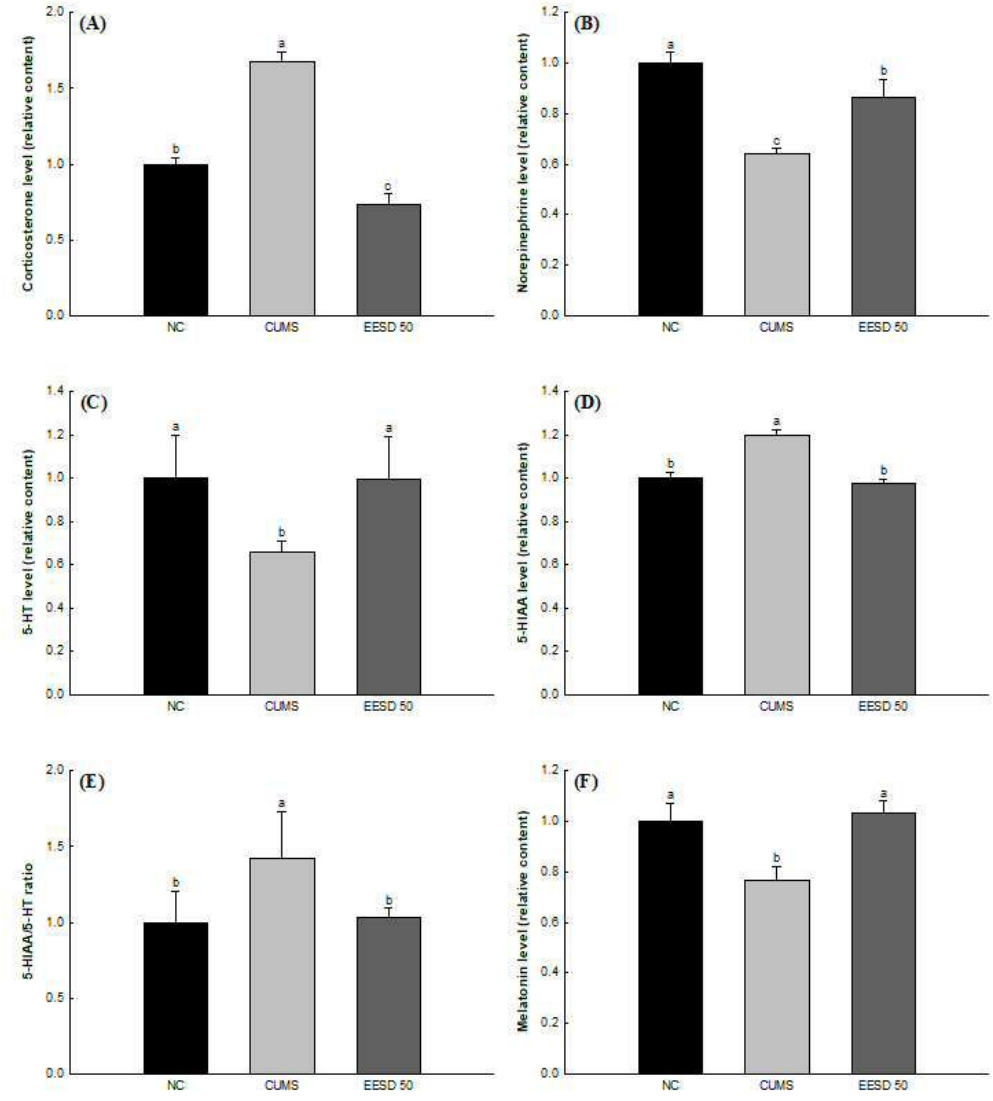
도면9


(A)
Escape latency (s)
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4

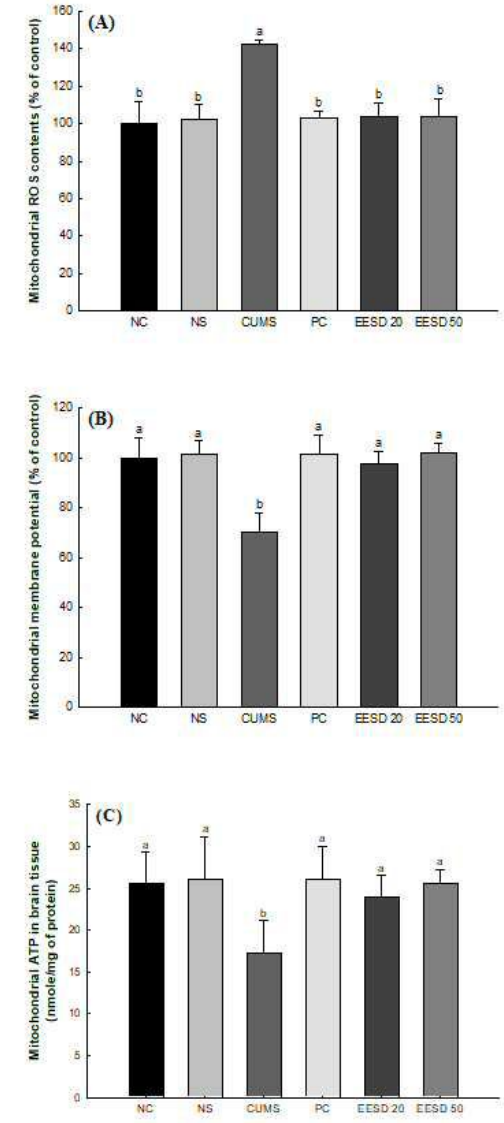

(B)
Time in W zone (%)
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50


(C)
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

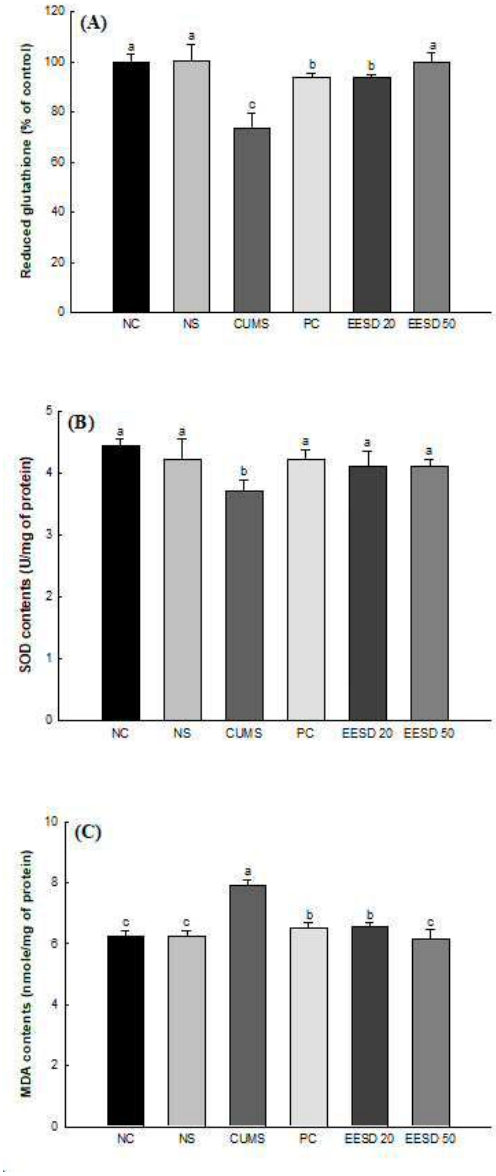
도면10


(A)
Corticosterone level (relative content)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
c
NC
CUMS
EESD 50
(B)
Norepinephrine level (relative content)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a
c
b
NC
CUMS
EESD 50
(C)
5-HT level (relative content)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a
b
a
NC
CUMS
EESD 50
(D)
5-HIAA level (relative content)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
b
a
b
NC
CUMS
EESD 50
(E)
5-HIAA/5-HT ratio
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
b
a
b
NC
CUMS
EESD 50
(F)
Melatonin level (relative content)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a
b
a
NC
CUMS
EESD 50

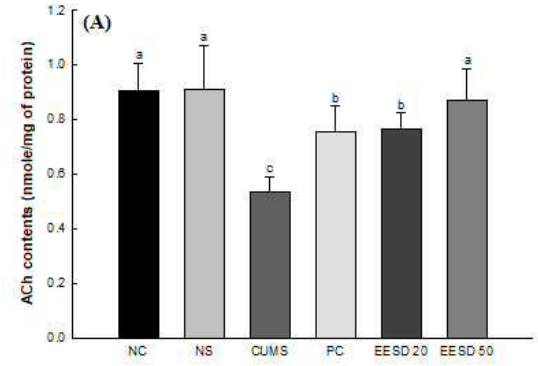
도면11

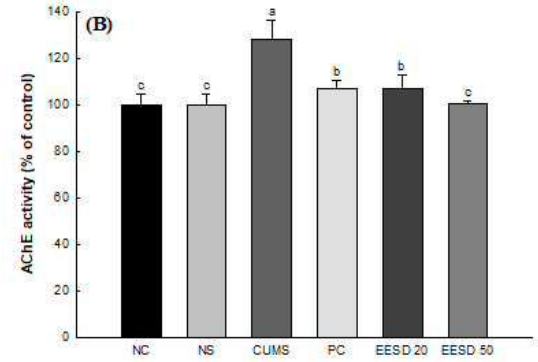

(A)
Mitochondrial ROS contents (% of control)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
a
b
b
b
b
b
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50
(B)
Mitochondrial membrane potential (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
a
a
b
a
a
a
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50
(C)
Mitochondrial ATP in brain tissue (nmole/mg of protein)
35
30
25
20
15
10
5
0
a
a
b
a
a
a
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

도면12

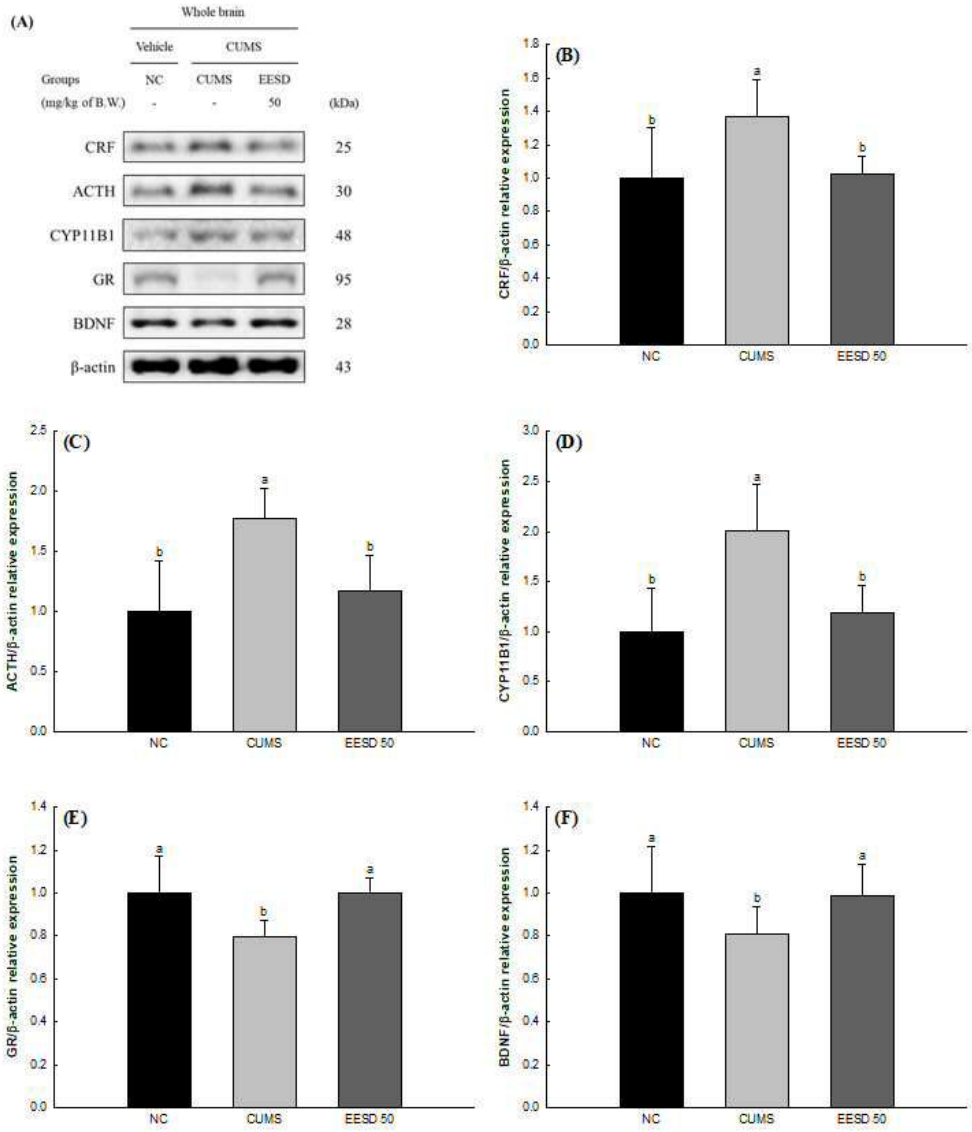

(A)
Reduced glutathione (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
a
a
c
b
b
a
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50
(B)
SOD contents (U/mg of protein)
5
4
3
2
1
0
a
a
b
a
a
a
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50
(C)
MDA contents (nmole/mg of protein)
10
8
6
4
2
0
c
c
a
b
b
c
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

도면13

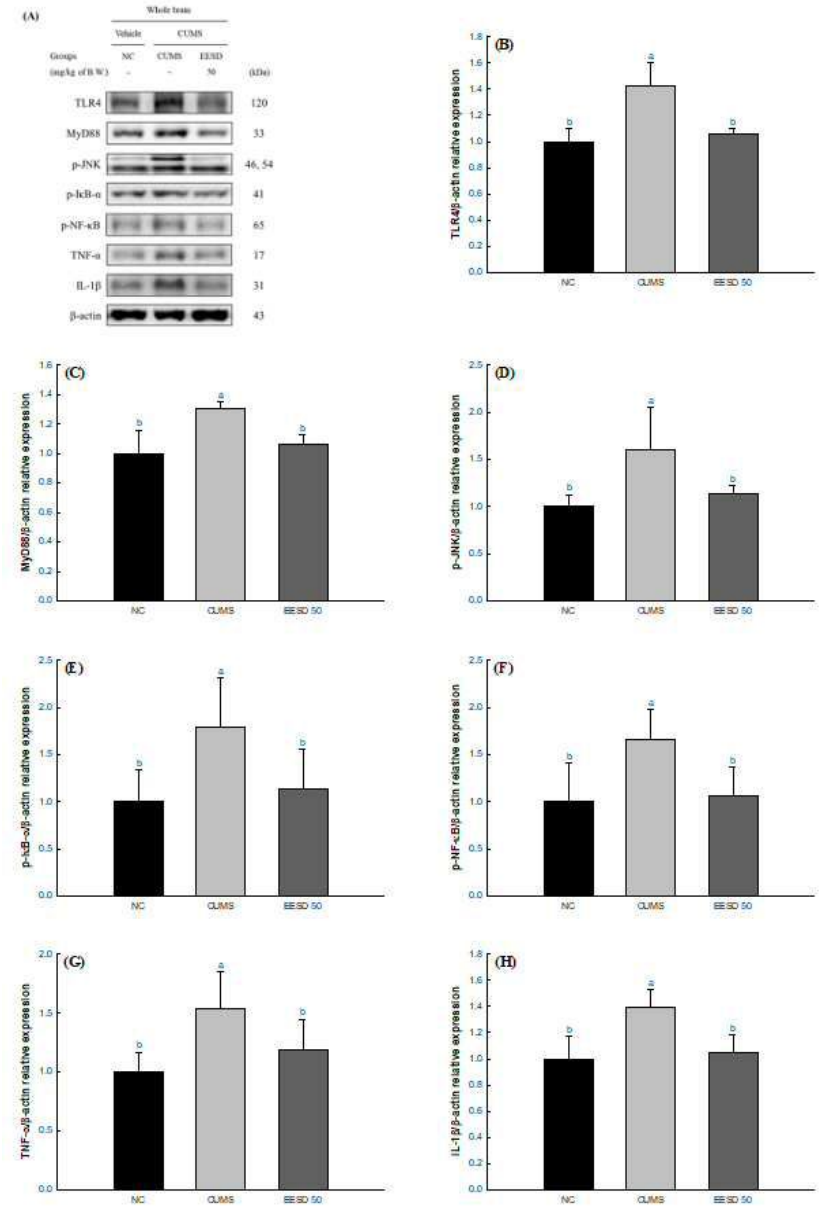

(A)
ACh contents (nmole/mg of protein)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a
a
c
b
b
a
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50


(B)
AChE activity (% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
c
c
a
b
b
c
NC
NS
CUMS
PC
EESD 20
EESD 50

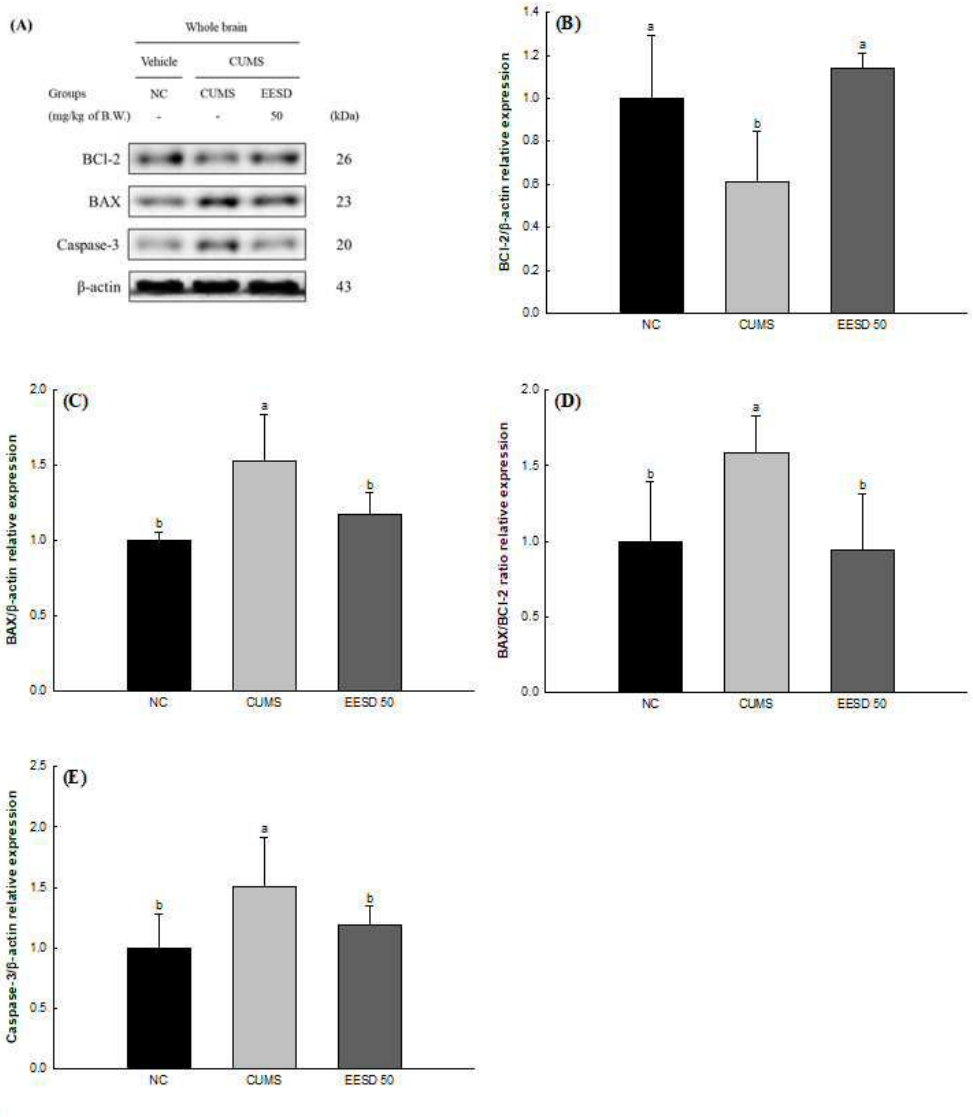
도면14


(A)
Whole brain
Vehicle
CUMS
Groups
NC
CUMS
EESD
(mg/kg of B.W)
-
-
50
(kDa)
CRF
25
ACTH
30
CYP11B1
48
GR
95
BDNF
28
β-actin
43
(B)
CRF/β-actin relative expression
(C)
ACTH/β-actin relative expression
(D)
CYP11B1/β-actin relative expression
(E)
GR/β-actin relative expression
(F)
BDNF/β-actin relative expression
NC
CUMS
EESD 50

도면15


(A)
Whole tissue
Vehicle
CUMS
Groups
NC
CUMS
EESD
(mg/kg of B.W.)
-
-
50
(kDa)
TLR4
120
MyD88
33
p-JNK
46, 54
p-IκB-α
41
p-NF-κB
65
TNF-α
17
IL-1β
31
β-actin
43
(B)
TLR4/β-actin relative expression
(C)
MyD88/β-actin relative expression
(D)
p-JNK/β-actin relative expression
(E)
p-IκB-α/β-actin relative expression
(F)
p-NF-κB/β-actin relative expression
(G)
TNF-α/β-actin relative expression
(H)
IL-1β/β-actin relative expression
NC
CUMS
EESD 50

도면16


(A)
Whole brain
Vehicle
CUMS
Groups
NC
CUMS
EESD
(mg/kg of B.W.)
-
-
50
(kDa)
BCl-2
26
BAX
23
Caspase-3
20
β-actin
43
(B)
BCl-2/β-actin relative expression
NC
CUMS
EESD 50
(C)
BAX/β-actin relative expression
(D)
BAX/BCl-2 ratio relative expression
(E)
Caspase-3/β-actin relative expression