



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0077483
(43) 공개일자 2014년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/234 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0146340
(22) 출원일자 2012년12월14일
심사청구일자 2012년12월14일

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자
원무호
강원도 춘천시 신북읍 아리산길 22
김중대
강원도 춘천시 동산면 종자리로 379-55
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인 천지

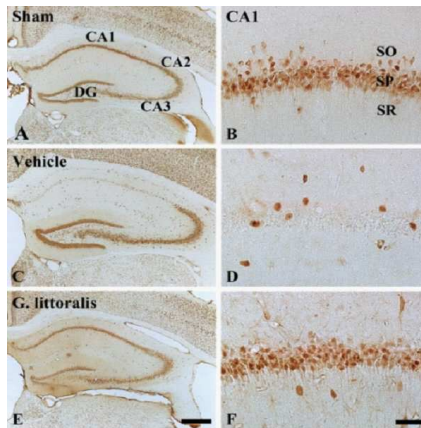
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 갯방풍 추출물을 포함하는 허혈성 뇌혈관 질환 예방 또는 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌혈관 질환 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물에 의하는 경우, 뇌조직 신경세포의 사멸을 효과적으로 억제할 수 있고, 신경아교세포의 비정상적 활성화도 억제할 수 있어, 뇌혈관 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위해 다양하게 응용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이재철

서울특별시 노원구 노원로18길 19, 204동 801호(하계1동, 현대2차아파트)

박준하

경기도 양평군 양서면 국수길 57

김인혜

강원도 춘천시 지석로 64, 601동 905호(퇴계동, 퇴계주공6차아파트)

조정휘

경기도 양주시 어하고개로132번길 10 (삼습동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010K000823

부처명 교육과학기술부

연구사업명 21세기 프론티어 연구 개발 사업, 뇌기능 활용 및 뇌질환 치료기술 개발 연구사업

연구과제명 천연소재 성분의 화학적 구조변경을 이용한 허혈성 신경세포사 제어 물질 개발

기여율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

갯방풍(*Glehnia littoralis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌혈관 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 허혈성 뇌혈관 질환은 뇌경색, 뇌출혈, 지주막하 출혈, 백질 이상증 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 허혈성 뇌혈관 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 갯방풍 추출물은 50 % 내지 90 % 농도의 탄소수 1 내지 5의 알코올 수용액으로 추출된 것인 허혈성 뇌혈관 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물.

청구항 4

갯방풍(*Glehnia littoralis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌혈관 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 허혈성 뇌혈관 질환은 뇌경색, 뇌출혈, 지주막하 출혈, 백질 이상증 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 허혈성 뇌혈관 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌혈관 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 전 세계적으로 노인인구의 증가 및 평균수명의 연장으로 인구의 고령화가 진행되고 있으며, 이와 같이 급속한 인구의 고령화 현상은 치매, 당뇨병, 고혈압 등의 노인성 질환의 증가로 이어지고 있다. 2004년 보건복지부의 전국노인생활실태 및 복지요구 조사 결과에 따르면 우리나라 노인의 90.9%가 1가지 이상의 만성질환을 앓고 있는 것으로 나타났다. 특히, 개인 뿐만 아니라 사회적으로도 막대한 손실을 초래하는 알츠하이머병(Alzheimer 병 disease), 파킨슨병(Parkinson 병 disease), 뇌졸중(Stroke)과 같은 신경질환이 계속해서 증가하여 사회적 문제가 되고 있다.

[0003] 다양한 신경질환 중에서 뇌졸중은 전 세계적으로 두 번째 사망원인으로 알려져 있으며, 국내에서는 단일질환 중 사망률 1위인 질환으로 크게 혈관이 막혀서 발생하는 허혈성 뇌졸중(cerebral ischemia)과 혈관이 터져서 생기는 출혈성 뇌졸중(cerebral hemorrhage)으로 분류된다.

[0004] 국내에서 뇌졸중은 1995년 인구천명 당 1.71명이었으나 2003년에는 3.14명으로 급격하게 발생률이 증가하였으며, 출혈성 뇌졸중에 비하여 허혈성 뇌졸중이 급격하게 증가하고 있는 추세이다.

[0005] 허혈성 신경세포사는 뇌조직에 산소와 포도당의 공급이 중단되면 여러 기전을 통해 일어나게 되며, 그 기전으로는 첫째, glutamate와 그 수용체에 의해 매개되는 신경세포사로서 허혈로 인해 glutamate 수용체의 흥분이 지속되면 과도한 calcium 이온이 신경세포내로 유입되어 세포사가 초래된다. 둘째, 기전으로는 재관류시 산소의 재

공급에 따라 일어나는 oxygen free radical의 생성과 염증반응으로 인한 신경세포의 손상이 알려져 있으며, 최근 연구 보고에 따르면 이들은 별개로 발생하는 것이 아니라, 서로 동반적으로 발생하여 신경세포사에 직접적으로 작용한다고 알려져 있다.

[0006] 현재까지 허혈성 뇌졸중에서 유일한 치료제로 FDA 승인을 받은 플라즈미노겐 활성화자(tissue plasminogen activator)는 뇌허혈을 유발시키는 혈전을 녹여 산소 및 포도당을 공급을 유도하는 물질로서, 허혈성 뇌졸중 발병 후 4.5시간 이내에 병원에 도착한 극소수의 환자들에게만 적용이 가능하며, 과량으로 사용하거나, 자주 사용하는 경우에는 혈관벽이 얇아져 결국 출혈성 뇌졸중을 유발하게 될 수 있다.

[0007] 또한, 최근 허혈성 뇌졸중 동물실험에서 효과를 보았던 신경보호제 (Neuroprotective agents)의 경우 대규모 임상시험이 실시되었으나 아직까지 성과를 거두지 못하고 있으며, 약물 치료 이외에 세포 이식, 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시되고 있지만 대부분이 위험요소와 부작용을 나타내고 있는 실정이며, 손상기전의 복잡성 등으로 실질적으로 신경세포의 손상을 보호하는 치료제는 개발되지 못하고 있는 실정이다.

[0008] 따라서, 뇌혈관 손상과 연관된 신경계 질환의 치료보다는 그에 대한 예방이 강조되고 있는 경향이며, 뇌신경세포를 보호할 수 있는 물질을 지속적으로 섭취하여 이러한 뇌혈관 질환을 예방하는 것의 필요성이 새롭게 인식되고 있다.

[0009] 또한, 인구의 평균 수명 증가와 함께 건강관리에 대한 관심이 고조되고 있으며, 삶의 질 향상을 위한 소비자의 노력이 증가함에 따라 의약품의 안전성 및 효능에 대한 관심이 높아지고 있는 추세이다. 이러한 추세에 따라서, 부작용이 문제될 수 있는 합성물 보다는 예로부터 민간요법이나 대체요법에 쓰여왔던 천연물질들에 대한 관심이 증가하고 있으며, 건강식품에 대한 관심 및 수요 증가와 함께 국내에서 다수의 천연물질이 뇌졸중 예방에 효과가 있는 건강식품으로 시판되고 있다.

[0010] 하지만, 이들 대부분은 과학적인 검증을 거치지 않은 것이 많으며 오히려 건강식품 남용의 원인이 되기도 하여 사회적인 문제가 되고 있다. 따라서 오랫동안 식품으로 사용되어 그 안전성이 입증된 천연자원을 객관적으로 검증하여 뇌신경세포를 효과적으로 보호할 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) KR 10-1164083 B

(특허문헌 0002) KR 10-2010-0037781 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌혈관 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌혈관 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 허혈성 뇌혈관 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물은 갯방풍(*Glehnia littoralis*) 추출물을 유효성분으로 포함한다.

[0015] 상기 허혈성 뇌혈관 질환은 뇌경색, 뇌출혈, 지주막하 출혈, 백질 이상증 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0016] 상기 갯방풍 추출물은 50 % 내지 90 % 농도의 탄소수 1 내지 5의 알코올 또는 상기 알코올 수용액으로 추출된 것 일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 식품 조성물은 갯방풍(*Glehnia littoralis*) 추출물을 유효성분으로 포함한다.

- [0018] 상기 허혈성 뇌혈관 질환은 뇌경색, 뇌출혈, 지주막하 출혈, 백질 이상증 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0019] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명의 발명자들은 안전성이 입증된 천연자원을 이용하여 부작용 없이 뇌 신경세포를 보호하여 뇌혈관 질환을 예방 또는 개선할 수 있는 물질에 대해 연구 하던 중, 갯방풍 추출물이 뇌 신경세포의 사멸을 억제하여 뇌혈관 질환을 치료, 예방 또는 개선할 수 있음을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한 신경세포 보호란 뇌 또는 중추 신경계, 일 예로 뇌 또는 척수의 신경세포의 사멸을 억제하거나, 신경세포를 피해로부터 보호하는 것을 의미하고, 보다 구체적으로 뇌허혈에 의하여 유발되는 뇌, 일 예로 해마 부위의 신경세포가 사멸하는 것을 억제하여 보호하는 것을 의미한다.
- [0022] 본 명세서에 있어서 특별한 언급이 없는 한 허혈이란 조직으로의 혈액 공급이 감소되거나 혈액 공급이 폐지되는 것을 의미한다. 허혈에 의해 조직에 산소와 영양소의 연합된 결핍이 일어나면, 허혈이 일어난 조직에서는 세포 사멸(괴사)이 초래될 수 있다.
- [0023] 본 명세서에 있어서 특별한 언급이 없는 한 환자란 사람 및 동물을 모두 포함하는 의미이다.
- [0024] 본 명세서에 있어서 조성물이란 명시된 성분들을 명시된 양으로 포함하는 생성물뿐만 아니라 명시된 양의 명시된 성분들의 배합물로부터 직접 또는 간접적으로 야기되는 생성물을 포함하는 의미이다.
- [0025] 본 명세서에 있어서 유효량 또는 치료학적 유효량이란 목적하는 치료, 경감, 억제 또는 예방 효과를 발생시키는 데 효과적인 본 발명의 추출물 또는 조성물의 양을 의미한다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 따른 허혈성 뇌혈관 질환 치료 또는 예방용 조성물은 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0027] 상기 갯방풍(*Glehnia littoralis*) 이란 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 다년생의 초본으로 우리나라를 비롯하여 남태평양 지역의 해안지역이나 절벽의 바위틈에 서식한다. 전체에 흰색 털이 나고 뿌리는 모래 속에 깊이 뻗으며 높이는 약 20cm정도이다. 잎은 두껍고 윤이 나며 끝이 뭉뚝하고, 줄기는 낮고 매우 짧으며 꽃은 흰색으로 6월 내지 8월에 피고 복산형 꽃차례로 줄기 끝에 난다. 갯방풍의 퓨라노코우마린(furanocoumarin) 계열 성분들은 항종양, 항균, 항류마티스 등의 효능이 있는 것으로 보고되고 있다.
- [0028] 상기 추출물은 추출용매로 추출한 용매 추출물, 추출용매로 추출하여 제조한 추출물에 분획용매를 가하여 분획한 분획물 또는 상기 분획물에 크로마토그래피를 수행하여 수득한 정제물일 수 있다.
- [0029] 상기 추출용매는 천연물 추출에 사용될 수 있는 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 직쇄 또는 분지형 알코올, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매, 탄소수 3 내지 5의 케톤 등의 중성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있으며, 바람직하게는 50% 내지 90%의 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 직쇄 또는 분지형 알코올 수용액, 더욱 바람직하게는 60% 내지 80% 에탄올 수용액, 더더욱 바람직하게는 65% 내지 75% 에탄올 수용액일 수 있다.
- [0030] 상기 분획용매는 물, 탄소수 5 내지 탄소수 7의 알칸, 부탄올을 포함한 탄소수 1 내지 탄소수 5의 직쇄 또는 분지형 알코올, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 헥산 또는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 갯방풍 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 갯방풍 추출물의 제조는 불순물을 제거한 갯방풍 열매의 건조물을 분쇄한 분쇄물에 추출용매를 가하고 추출하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 용매를 이용한 추출법은 냉침추출법, 온침추출법, 가압추출법, 환류추출법 또는 초음파 분쇄 추출법일 수 있다.
- [0032] 또한, 상기 갯방풍 추출물의 분획물의 제조는 상기 추출법으로 제조한 추출물 즉, 조추출물 또는 조추출액에 분획용매를 가한 후에 분획용매의 극성에 따라 분획물을 수득하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 분획물을 수득하는 방법은 층분리에 의한 분리법 또는 분회법으로 수행할 수 있다. 보다 구체적으로 상기 추출물에 추출용매와 극성이 상이한 분획용매를 가한 후에, 예를 들어 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물의 분획용매를 상기 기재와 동일한 순서로 가한 후에 층분리된 헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 메

틸렌클로라이드 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물을 수득하는 방법으로 수행할 수 있다.

- [0033] 상기 층분리에 의한 분획법은 상기 용매의 비극성의 정도에 따라 그 순서대로 추출물에 가하고, 각 적용시마다 층분리에 의해 얻어지는 분획물을 수득하는 방법일 수 있고, 일 예로 에탄올 수용액 추출물에 hexan을 첨가하여 층분리가 된 hexan층을 분획하여 얻은 hexan 분획물; 상기 hexan 분획물을 분리하고 남은 층에 메틸렌클로라이드를 첨가하여 층분리가 된 메틸렌클로라이드층을 분획하여 얻은 메틸렌클로라이드 분획물; 상기 메틸렌클로라이드 분획물을 분리하고 남은 층에 에틸아세테이트를 첨가하여 층분리가 된 에틸아세테이트층을 분획하여 얻은 에틸아세테이트 분획물 및 상기 에틸아세테이트 분획물을 분리하고 남은 층인 물 분획물을 순차적으로 수득하는 방법일 수 있다.
- [0034] 상기 분획물의 정제를 위한 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC) 또는 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 등의 다양한 크로마토그래피를 이용하여 수행할 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 추출물은 추출, 분획과정 또는 정제과정을 수행한 이후, 감압 여과 과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다. 따라서, 본 발명에서의 갯방풍 추출물은 통상적 방법으로 건조된 추출물의 건조물과 통상적 방법으로 농축된 추출물의 농축물, 상기 추출물, 건조물 또는 농축물의 희석액을 포함하는 의미로 사용된다. 상기 수득한 갯방풍 추출물은 사용 시까지 급속 냉동 냉장고(deep freezer)에 보관할 수 있다.
- [0036] 상기 허혈성 뇌혈관 질환이란 뇌의 혈관이 어떠한 이유로 막혀 뇌에 필요한 혈액이 공급되지 않아 발생하는 질환을 총칭하는 것을 의미하며, 뇌허혈 질환이라고도 한다. 상기 허혈성 뇌혈관 질환은 일 예로 뇌경색(허혈성 뇌졸중, ischemic stroke), 뇌출혈, 지주막하 출혈, 뇌신경 질환, 뇌허혈, 허혈성 신경질환, 퇴행성 신경질환, 중풍, 치매, 노인성 치매, 알츠하이머병, 파킨슨 병, 헌팅턴병, 크로이츠펠트-야콥병, 간질, 루게릭병, 기억력 감퇴, 혈전증, 혈전색전증, 소경색 또는 백질 이상증 등이 포함될 수 있고, 바람직하게는 뇌경색, 뇌출혈, 노인성 치매, 알츠하이머병, 파킨슨 병, 헌팅턴병, 혈전색전증 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있다.
- [0037] 상기 뇌허혈(cerebral ischemia)은 임상적으로 심장정지(cardiac arrest) 또는 뇌졸중에서 가장 보편적으로 나타나고, 난치성 뇌신경세포 손상이 야기되며, 이로 인해 불구가 되거나 혼수상태에 빠질 수 있고, 심한 경우에는 사망에 이르게 된다.
- [0038] 상기 뇌허혈에 의해 뇌의 혈류가 감소되어 산소와 포도당의 공급이 정상적으로 이루어지지 않게 되면, 산화적 인산화 반응이 감퇴되고, 결과적으로 혐기성 해당작용(glycolysis)도 정지되어, 세포 내 에너지원으로 사용되는 아데노신 트리포스페이트(adenosine triphosphate, ATP)가 고갈되게 된다. 상기 에너지원의 고갈에 의해, 생명 유지에 필수적인 세포기능이 저하되고, 이로 인해 다방면의 퇴행성 과정들이 유발됨으로써 세포사멸을 초래하게 된다. 상기 세포사멸은 허혈기간 동안은 물론 허혈 부위의 혈류가 회복되어 재관류(reperfusion)가 일어날 때에도 공급되는 산소에 의해 발생하는 자유 라디칼에 의해서 일어난다.
- [0039] 상기 세포사멸은 특히, 뇌세포 중 뇌허혈에 민감하다고 알려져 있는 해마조직 CA1 영역의 신경세포에서 더욱 잘 발생된다.
- [0040] 본 발명의 갯방풍 추출물은 일정기간 투여 후 저빌을 마취시켜 온목동맥을 결찰하여 뇌허혈을 유발시킨 후, 뇌 해마조직 및 상기 해마조직의 CA1 영역의 신경세포를 염색하여 효능을 측정하는 실험에서 뇌허혈에 의한 신경세포사 억제 효과가 우수한 것으로 확인되었다. 구체적으로 해마조직의 신경세포사가 억제된 것을 현미경 관찰을 통해서 확인하였고, 신경아교세포인 별아교세포 및 미세아교세포의 비정상적인 활성화 또한 억제하여 신경세포사를 억제함을 실험적으로 확인하였다.
- [0041] 상기 신경아교세포는 뉴런의 수보다 10배 이상 많으며 뇌와 척수 체적의 50% 이상을 차지하고 있으면서 뇌의 신경전달 및 흥분 등에 주도적인 역할을 하고 있으나, 신경아교세포가 비정상적으로 활성화 되는 경우 오히려 뇌세포의 손상이 초래되는데, 상기 갯방풍 추출물을 투여하는 경우 이러한 신경아교세포의 비정상적인 활성화가 효과적으로 억제됨을 실험적으로 확인하였다.
- [0042] 상기 별아교세포는 중추신경계의 아교세포 중에서 가장 크고 수가 가장 많은 세포로, 가늘고 긴 가지를 친 세포돌기가 별 모양의 세포체에서 뇌와 척수의 주위로 뻗어 나온다. 세포돌기의 종말팽대부는 혈관주위종말발이라고 하며 모세혈관을 완전히 둘러싸고 있고, 작은 혈관과도 연관되어 있으며, 이들 부위에서 종말발은 뇌혈관장벽의

일부가 되어 내 유독물질이 함부로 신경계에 들어오지 못하게 한다. 별아교세포의 세포질에는 독특한 아미노산 서열로 이루어진 아교섬유산성단백질로 구성된 중간세사가 밀집해 있고, 이 내재성 단백질은 중추신경계에서 이 세포에만 존재하기 때문에 면역조직화학적 표지물질로 사용된다. 별아교세포에는 교통신이 있기 때문에 구조적인 합포체를 형성하며 뉴런을 물리적으로 지지해주고, 대사과정에 도움을 준다. 과도한 양의 칼륨을 흡수하여 적절한 이온 환경을 마련해주며, GABA(감마아미노부티르산)의 활성을 조절하고 글루탐산과 같은 신경전달물질을 불활성화 시키는 역할을 한다.

- [0043] 상기 미세아교세포는 아교세포 중에서 가장 작은 세포로, 포식세포로 작용하여 중추신경계의 찌꺼기를 제거하고 침입하는 미생물을 방어하는 뇌의 면역계를 구성하는 역할을 한다.
- [0044] 상기 갯방풍 추출물은 상기와 같은 효과를 가지고 있으므로 허혈성 뇌혈관 질환의 치료, 예방 또는 개선을 목적으로 하는 조성물의 유효성분으로 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 갯방풍 추출물은 신경세포 보호용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있고, 이러한 측면에서, 본 발명은 갯방풍 추출물의 용도 즉, 갯방풍 추출물의 허혈성 뇌혈관 질환의 치료, 예방 또는 개선이나 신경세포 보호용 용도를 제공한다.
- [0045] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 허혈성 뇌혈관 질환의 치료 또는 예방용 조성물은 상기 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0046] 상기 허혈성 뇌혈관 질환의 치료 또는 예방용 조성물은 허혈성 뇌혈관 질환을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물일 수 있다.
- [0047] 상기 허혈성 뇌혈관 질환의 치료 또는 예방용 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 갯방풍 추출물을 0.001 내지 99.99중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있다.
- [0048] 상기 조성물은 갯방풍 추출물 외에 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산염류에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 상기 조성물에는 상기 성분들이 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다. 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 갯방풍 추출물 100 중량부 당 0.1 중량부 내지 20 중량부 범위에서 추가할 수 있다.
- [0049] 상기 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0050] 상기 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 생리식염수, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜 및 리퀴드 파라핀으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 갯방풍 추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0051] 상기 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 현탁제, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형물로 사용될 수 있다.
- [0052] 상기 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 갯방풍 추출물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량%, 더욱 바람직하게는 1중량% 내지 50 중량% 포함할 수 있다. 또한, 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 갯방풍 추출물 100 중량부 당 0.1 중량부 내지 20 중량부 범위에서 추가할 수 있다.
- [0053] 상기 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 약제화하는 경우, 통상의 증진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 유허제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구 모두 사용 할 수 있다.
- [0054] 구체적으로 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 항균 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 유허제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미

제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

- [0055] 상기 의약 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다. 구체적인 제형의 예로는 과립제, 산제, 시럽제, 액제, 현탁제, 전제, 침제, 정제, 좌제, 주사제, 주정제, 캡셀제, 환제, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 등일 수 있다. 더 나아가 본 발명의 치료용 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA. 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 바람직하게 제형화될 수 있다.
- [0056] 상기 의약 조성물의 바람직한 투여량은 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직하게는 상기 의약 조성물은 갯방풍 추출물의 양을 기준으로 1일 150 mg/kg내지 5,000 mg/kg으로, 보다 효과적이기 위해서는 200 mg/kg내지 2,500 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량과 투여횟수는 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물은 상기 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0058] 상기 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의미이다.
- [0059] 상기 식품은 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영아식, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0060] 상기 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 제조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.
- [0061] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 건강기능음료를 포함하는 의미이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0063] 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 g 내지 20 g, 바람직하게는 5 g 내지 12 g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.
- [0064] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 갯방풍 추출물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부 범위에서 선택될 수 있다.
- [0065] 상기 건강기능음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등

에 관한 제조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.

- [0066] 상기 건강기능음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 갯방풍 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0067] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 g 내지 20 g, 바람직하게는 5 g 내지 12 g 이다.
- [0068] 또한, 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 개선의 효과를 목적으로 하는 식품 조성물에 있어서, 상기 갯방풍 추출물의 양은 식품 또는 음료의 제조 시에 이용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있고, 일 예로, 상기 갯방풍 추출물은 전체 식품 중량의 0.01 중량% 내지 15 중량%로 포함할 수 있으며, 음료 조성물의 경우에는 전체 식품 중량의 100 ml를 기준으로 0.02 g 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 g 내지 1g의 비율로 포함할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 허혈을 유발시킨 수컷 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil, Harlan, USA)의 해마(hippocampus) 영역의 신경세포사를 억제하는 우수한 신경세포 보호효능을 가지고 있으므로, 허혈성 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 것으로 확인되었다.
- [0070] 또한, 본 발명은 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경세포 보호용 조성물에 관한 것이다.
- [0071] 상기 갯방풍 추출물은 허혈을 유발시킨 실험동물에서 신경세포사 억제 특히, 해마영역에서의 신경세포사를 억제할 수 있다는 측면에서, 상기 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 신경세포를 보호하는 효과가 뛰어나므로 상기 신경세포 보호용 조성물은 허혈성 뇌혈관 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과가 인정된다.
- [0072] 상기 신경세포 보호용 조성물은 그 용도에 따라 즉, 의약품 용도 또는 식품용 용도에 따라 상기 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 기재된 바와 같이 용도에 따라 선택되어 응용될 수 있다.

발명의 효과

- [0073] 본 발명의 갯방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 신경세포의 사멸을 억제할 수 있어 뇌허혈에 의한 신경세포의 손상을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있으므로 이를 위한 식품 또는 의약품에 유용하게 사용될 수 있다. 또한 상기 갯방풍 추출물은 부작용이 발생하지 않고 그 안정성이 밝혀진 추출물인바 부작용 없이 의료 산업 등에서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0074] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 갯방풍 추출물의 허혈성 뇌혈관 질환 보호 효과를 알아보기 위하여, 뇌허혈 유발 후 5일이 경과된 실험동물의 해마조직을 신경세포에 대한 항체인 마우스 항-NeuN(NeuN)을 이용하여 면역조직화학(immunohistochemistry) 방법으로 염색하여 촬영한 사진으로, 상기 A는 뇌허혈을 유발시키지 않은 정상군(Sham)의 해마전체를 촬영한 사진이고, B는 뇌허혈을 유발시키지 않은 정상군(Sham)의 CA1 영역을 촬영한 사진이며, 상기 C는 식염수 만을 투여한 후 뇌허혈을 유발시킨 대조군(Vehicle)의 해마전체를 촬영한 사진이고, D는 식염수 만을 투여한 후 뇌허혈을 유발시킨 대조군(Vehicle)의 CA1 영역을 촬영한 사진이며, 상기 E는 갯방풍 추출물을 투여한 실험군의 해마전체를 촬영한 사진이고, F는 갯방풍 추출물을 투여한 실험군의 CA1 영역을 촬영한 사진이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 갯방풍 추출물의 허혈성 뇌혈관 질환 보호 효과를 알아보기 위하여, 뇌허혈 유발 5일 후에 뇌 조직 절편에 생존해 있는 세포수를 정상군에 대한 상대적 수치로 나타낸 그래프이다. 상기 그래프에서 Sham은 정상군을 의미하고, Vehicle은 대조군을 의미하며, G. littoralis은 갯방풍 추출물을 투여한 실험군을 의미한다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 갯방풍 추출물의 허혈성 뇌혈관 질환 보호 효과를 알아보기 위한 것으로, 뇌허혈 유발 후 5일이 경과된 실험동물의 해마조직의 CA1 영역을 사멸 신경세포에 대해 Fluoro-Jade B(F-JB)를 이용하여 형광 염색한 사진이다. A는 뇌허혈을 유발시키지 않은 정상군(Sham)의 형광 염색 사진을 나타내고, B

는 식염수 만을 투여한 후 뇌허혈을 유발시킨 대조군(Vehicle) 형광 염색 사진을 나타내며, C는 갯방풍 추출물을 투여한 실험군의 형광 염색 사진을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 갯방풍 추출물의 허혈성 뇌혈관 질환 보호 효과를 알아보기 위한 것으로, 뇌허혈 유발 후 5일이 경과된 실험동물의 해마조직의 CA1 영역을 사멸 신경세포에 대해 Fluoro-Jade B(F-JB)로 형광 염색하여 염색된 신경세포의 수를 대조군에 대한 상대적 수치로 나타낸 그래프이다. 상기 그래프에서 세로 축은 사멸 신경세포의 수(%)를 나타내고, 가로축의 Sham은 뇌허혈을 유발시키지 않은 정상군 나타내고, Vehicle은 식염수 만을 투여한 후 뇌허혈을 유발시킨 대조군을 나타내며, *G. littoralis*은 갯방풍 추출물을 투여한 군을 나타낸다.

도 5은 본 발명의 일 실시예에 따른 갯방풍 추출물의 허혈성 뇌혈관 질환 보호 효과를 알아보기 위하여, 뇌허혈 유발 후 5일이 경과된 실험동물의 해마조직의 CA1 영역을 별아교세포의 표지자인 항-GFAP 항체(A, C, E), 미세 돌기아교세포의 표지자인 항-Iba-1 항체(B, D, F)를 이용하여 면역조직화학(immunohistochemistry) 방법으로 관찰한 사진을 나타낸다. 상기 사진에서 A 및 B는 뇌허혈을 유발시키지 않은 정상군(Sham)의 해마조직의 CA1 영역을 나타내고, C 및 D는 식염수 만을 투여한 후 뇌허혈을 유발시킨 대조군(Vehicle)의 해마조직의 CA1 영역을 나타내며, E 및 F는 갯방풍 추출물을 투여한 군(*G. littoralis*)의 해마조직의 CA1 영역을 나타낸다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 갯방풍 추출물의 허혈성 뇌혈관 질환 보호 효과를 알아보기 위한 것으로, 도 6a는 뇌허혈 유발 5일 후에 GFAP로 염색된 세포의 수를 정상군(sham)에 대한 상대적 수치로 나타낸 그래프이고, 도 6b는 뇌허혈 유발 5일 후에 Iba-1으로 염색된 세포의 수를 정상군(sham)에 대한 상대적 수치로 나타낸 그래프이다. 상기 그래프에서 Sham은 뇌허혈을 유발시키지 않은 정상군을 나타내고, Vehicle은 식염수 만을 투여한 후 뇌허혈을 유발시킨 대조군을 나타내며, *G. littoralis*는 갯방풍 추출물을 투여한 군을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0076] [제조예: 갯방풍 추출물의 제조]

[0077] 강원도 강릉시 옥계면에서 채배된 갯방풍 175 g을 농가로부터 구입하여 환류냉각기를 부착한 추출기에서 70% 에탄올 3 L를 넣은 후, 70℃에서 24시간 3회 반복하여 추출하였다. 이 추출물을 Whatman No. 1(Whatman Ltd, Maidstone, Kent, UK) 여과지와 감압여과장치를 사용하여 여과하였고, 여과액은 회전공농축기(EYELA, SN-1100, Tokyo, Japan)를 사용하여 50℃에서 감압농축 하였다. 농축된 추출물은 동결건조기(PVTFA 10AT, ILSIN, Korea)를 이용하여 -70℃에서 급속동결과정을 거쳐 분말 상태로 준비하여 시료로 사용하였다. 상기 제조된 추출물의 제조 수율을 확인한 결과, 8.68%로 확인되었다.

[0078] [실험예 1: 실험동물을 통한 갯방풍 추출물의 뇌허혈 시 신경세포 보호효능 확인]

[0079] 상기 실시예 1에서 제조된 갯방풍 추출물의 신경세포 보호효능을 체중 65 g 내지 75 g인 수컷 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil, Harlan, USA)을 마취시켜 온목동맥(common carotid artery)을 노출 후 결찰하여 뇌허혈을 유발시킨 몽골리안 저빌의 해마조직을 염색하여 관찰하는 방법을 통하여 확인하였다.

[0080] 실험예1-1. 실험동물의 사육

[0081] 체중 65 g 내지 75 g의 수컷 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*, Halan, USA) 30 마리를 오전 7시부터 오후 7시까지 빛을 가하는 일정한 명암주기, 21℃ 내지 25℃의 온도 및 45% 내지 65%의 상대습도의 조건에서 사육하였다. 실험동물의 사료는 일반적인 펠렛건조 사료(대한실험동물, 대한민국)를 사용하였고, 사료와 물은 상시로 섭취할 수 있게 하였다.

- [0082] 실험예 1-2. 뇌허혈시 신경세포 보호효능 측정
- [0083] 상기 실시예 2-1에서 사육한 실험동물에 실시예 1에서 제조된 갯방풍 추출물을 실험동물 체중 1 kg 당 200 mg이 되도록 함량을 조절하여 각각 생리식염수에 녹인 것을 수술 전 3일간 경구투여 하였다. 수술 당일에는 수술 30분 전에 갯방풍 추출물을 동일한 용량 및 방법으로 투여하였다.
- [0084] 상기 3일간 추출물들을 투입한 후에, 질소와 산소가 7 : 3으로 혼합된 가스에 3% 이소플루란(isoflurane, Baxtor, USA)을 혼합한 가스를 이용하여 실험동물을 진신마취하였다. 상기의 질소와 산소 혼합가스에 2.5% 이소플루란을 혼합한 가스를 이용하여 실험동물의 마취상태를 유지하면서 실험동물에 대한 수술을 수행하였다.
- [0085] 실험동물에 대한 수술은 목 부위의 털을 깎고 소독한 다음 절개를 하여 양쪽 온목동맥을 노출시키고, 동맥류 클립(aneurysm clip, Staeltling, USA)을 이용하여 5분 동안 결찰하여 뇌허혈을 일으킨 후, 클립을 제거하여 재관류시키는 방법으로 수행하였다. 이때, 각 실험군은 검안경(ophthalmoscope)을 이용하여 망막중심동맥(central artery of retina)의 혈액 순환 유무를 관찰하여 완전한 온목동맥의 폐쇄여부를 확인하였다.
- [0086] 뇌허혈을 유발시키는 동안 직장 내 체온계를 삽입하여 체온을 측정하였으며, 실험동물의 온도에 따라 자동으로 조절되는 온열 패드를 사용하여 체온을 정상 체온인 36.7℃ 내지 37.3℃로 일정하게 유지시켰다.
- [0087] 실험군은 뇌허혈 유발 5일 후에 티오펜탈 소듐(thiopental sodium, 유한양행, 대한민국)을 체중 1 kg 당 각각 30 mg의 용량으로 복강 내 주사하여 마취시킨 다음, 1,000 ml 당 헤파린 1,000 IU를 함유한 4℃의 생리식염수를 좌심실로 주입하여 관류 세척하였다. 관류 세척이 완료된 상기 동물에 대해 4℃의 4% 파라포름알데하이드(0.1 M 인산완충액(in 0.1 M phosphate buffer; PB), pH 7.4)를 이용하여 관류고정을 수행하였다.
- [0088] 뼈절단기를 이용하여 관류 고정이 끝난 실험동물의 머리뼈 공간을 열어 뇌를 적출하였다. 적출된 실험동물의 뇌를 4℃의 4% 파라포름알데하이드(in 0.1 M phosphate buffer; PB, pH 7.4)를 이용하여 4시간 동안 후고정하였다. 후고정이 끝난 뇌는 30% 수크로스 용액(in 0.1 M 인산 완충액(phosphate buffer))에 넣어 바닥에 가라앉을 때까지 침강시킨 후, 슬라이드 마이크로톰(sliding microtome, Reichert-Jung, 독일)으로 상기 뇌의 조직을 30 μm 두께로 잘라 조직절편을 만들었다. 상기의 조직절편을 보존액(storing solution)이 들어있는 6 well 플레이트에 넣어 염색을 수행할 때까지 4℃에서 보관하였다.
- [0089] 대조군은 상기 추출물을 녹이는데 이용된 생리식염수만을 경구투여한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 준비하였으며, 정상군은 갯방풍 추출물을 포함한 어떠한 물질도 투여하지 않고, 허혈-재관류 수술도 시행하지 아니하였으며, 정상군의 조직절편은 상기와 동일한 방법으로 준비하였다.
- [0090] 갯방풍 추출물의 신경세포 보호 효과, 보다 구체적으로 뇌허혈에 의한 신경세포의 사멸 방지 효과를 추가적으로 확인하기 위하여, 신경세포 표지자인 NeuN(Neuroanl specific nuclear protein)에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학(immunohistochemistry) 염색을 수행하였다.
- [0091] 보다 구체적으로, 준비된 조직절편 중 해마형성체(hippocampal formation)가 잘 나타난 조직절편을 선택하여 실험에 사용하였으며, 상기 선택된 조직절편은 조직에 존재하는 보존액을 제거하기 위해 0.01M PBS로 10분씩 3회 세척한 후 내인성 페록시다아제(peroxidase)를 제거하기 위하여 0.3% H₂O₂(in 0.001M PBS)와 30분 동안 반응시켰다. 상기 0.3% H₂O₂(in 0.001M PBS)로 반응시킨 조직 절편의 비특이적인 면역반응을 방지하기 위하여, 상기 조직절편을 3%의 정상 염소 혈청(normal goat serum)으로 30분간 반응시켰다.
- [0092] 신경세포에 대한 염색과 관련해서는 상기 3%의 정상 염소 혈청과 반응한 조직절편과 1:800으로 희석한 1차 항체인 마우스 항-NeuN(mouse anti-NeuN, Chemicon, USA)를 4℃에서 48시간 반응시켰다. 상기 반응이 끝난 조직절편은 각각 1:250으로 희석한 2차 항체인 항 마우스 IgG(anti-mouse IgG, Vector)로 상온에서 2시간 반응시킨 후, 1:200으로 희석한 3차 항체인 ABC용액(Vector)으로 2시간 반응 시켰으며, 3,3'-DAB(diaminobezidine)를 기질로 발색하였다. 상기 항체와 반응시키는 과정의 각 단계를 수행함에 있어서, 각 단계 별로 상기 조직절편을 0.01M PBS 를 사용하여 10분씩 3회 세척하였다.
- [0093] 상기 3차 항체를 이용한 반응이 끝난 조직절편을 젤라틴 코팅된 슬라이드 글라스(slide glass)에 도말 후, 실온에서 12시간 동안 건조하였고, 상기 건조된 조직절편은 통상적인 탈수투명화 과정을 거쳐 봉입하였다. 상기 NeuN 항체와 반응을 수행한 후, 봉입한 조직절편을 현미경을 이용하여 관찰하였으며, 그 관찰결과를 촬영한 사진을 촬영하여 도 1 나타내었다.
- [0094] 또한, 상기 촬영한 사진에 대해 이미지 분석기(Optimas 6.5, USA) 프로그램을 이용하여 항-NeuN 항체로 염색된

상기 조직절편의 신경세포를 계수하였다. 각 군에 대한 유의성의 검증을 위하여 일원분산분석(one-way ANOVA test)을 수행하였다. 상기 측정한 조직절편의 신경세포를 계수한 결과를 정상군(Sham)에 대한 상대적인 수 즉, 정상군의 신경세포 계수결과를 100%로 하여 각 실험군의 계수결과를 도 2에 나타냈다.

[0095] 상기 도 1에 나타난 바와 같이, 정상군(Sham, 도 1의 A)은 해마의 영역 전체에서 NeuN-면역반응성 신경세포가 잘 관찰되며, 특히 CA1 영역에서는 피라미드층에 NeuN-면역반응성 신경세포가 밀집하여 있는 것을 관찰할 수 있었다(도 1의 B). 그러나, 추출물을 투여하지 아니하고 뇌허혈을 유발시킨 대조군(Vehicle, 도 1의 C)의 경우, 뇌허혈에 의한 지연성 신경세포사로 인해 해마의 영역 중 CA1 영역에서 신경세포사가 일어남으로써 NeuN-면역반응성을 나타내는 신경세포가 거의 관찰되지 않았고, CA1 영역 중 피라미드층에 대부분의 신경세포가 소실되었음이 확인되었다(도 1의 D). 하지만, 갯방풍 추출물(도 1의 E, F)을 투여한 실험군의 경우 정상군과 같이 해마의 영역 전체에서 다수의 NeuN-면역반응성 신경세포가 관찰되며, CA1 영역의 피라미드층에서도 NeuN-면역반응성 신경세포가 밀집하여 있는 것이 관찰되었다. 상기 결과로부터, 갯방풍 추출물에 의한 신경세포 보호효과가 현저히 우수한 것으로 확인되었다.

[0096] 또한, 상기 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 대조군(vehicle)은 정상군에 비하여 해마의 CA1 영역 NeuN-면역반응성 신경세포의 수가 약 17.5% 정도 관찰되었으며, 갯방풍 추출물을 투여한 군(*G. littoralis*)의 경우 약 77.5%의 신경세포가 생존한 것으로 확인되어, 갯방풍 추출물은 신경세포보호에 매우 탁월한 효과를 가지고 있는 것을 확인하였다.

[0097] **[실험예 2: 실험동물을 통한 갯방풍 추출물의 뇌허혈 시 신경세포 보호효능 확인]**

[0098] 갯방풍 추출물의 신경세포 보호 효과를 구체적으로 확인하기 위하여, 상기 실험예 1에서 우수한 것으로 확인된 갯방풍 추출물 및 사멸된 신경세포에 대한 표지자인 Fluoro-Jade B를 이용하여 조직 형광염색을 수행하였다.

[0099] 보다 구체적으로, 상기 실험예 1에서 준비된 조직절편 중 해마복합체가 잘 나타난 조직절편을 선택하여 실험에 사용하였으며, 퇴행신경세포의 표지자인 Fluoro-Jade B(F-J B)를 이용하여 조직형광염색을 수행하였다. 상기 조직절편을 증류수를 이용하여 5분간 3회 세척한 후, 0.06% potassium permanganet 용액에 15분간 담그었다. 이후, 증류수로 2분간 세척하고 0.1% 아세트산(acetic acid)이 포함된 0.001% F-J B(Histochem, Jefferson, AR, USA) 용액에 30분간 담구어 염색을 수행하였다. 상기 염색된 조직은 1분씩 3회 증류수로 세척하고, 50°C slide warmer에서 20분간 건조한 후, 자일렌(xylen)에 담근 다음, DPX(Sigma, USA)로 봉입하였다. 상기 봉입된 조직을 형광현미경(Ex:385nm, Em:425nm)을 이용하여 관찰하였으며, 그 결과를 촬영한 사진을 촬영하여 도 3에 나타내었다.

[0100] 또한, 상기 촬영한 사진에 대해 상기 실험예 1과 같이 이미지 분석기 프로그램을 이용하여 염색된 신경세포를 계수하였으며, 상기 계수한 결과를 대조군(Vehicle)에 대한 상대적인 수치로 도 4에 나타내었다.

[0101] 상기 도 3에 나타난 바와 같이, 정상군(Sham, 도 3의 A)은 해마의 CA1 영역 전체가 사멸된 신경세포 또는 사멸 중인 신경세포에 대한 표지자인 Fluoro-Jade B에 의해 염색되지 아니한 반면, 대조군(Vehicle, 도 3의 B)의 경우에는 해마의 CA1 영역에서 진하게 형광 염색되어, 다수의 신경세포가 사멸 또는 사멸 중인 것으로 확인되었으며, 갯방풍 추출물을 처리한 결과, 정상군과 같이 해마의 CA1 영역 전체에서 상기 사멸된 신경세포 또는 사멸 중인 신경세포에 대한 표지자인 Fluoro-Jade B에 의해 형광 염색된 세포들이 소수 관찰되었다. 따라서 상기 결과를 통해서 갯방풍 추출물에 허혈에 의하여 발생하는 신경세포의 사멸에 대하여도 직접적으로 신경세포 사멸을 억제하는 효과가 있는 것을 확인하였다.

[0102] 특히, 상기 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 갯방풍 추출물을 처리한 실험군의 경우, 사멸된 신경세포 또는 사멸 중인 신경세포에 대한 표지자인 Fluoro-Jade B로 염색된 신경세포의 수는 대조군의 약 28% 정도에 불과하여, 갯방풍 추출물의 신경세포 사멸 억제 효과가 현저히 우수한 것을 확인하였다.

[0103] **[실험예 3: 실험동물을 통한 갯방풍 추출물의 뇌허혈 시 신경세포 보호효능 확인-신경아교세포 활성 변화 측정]**

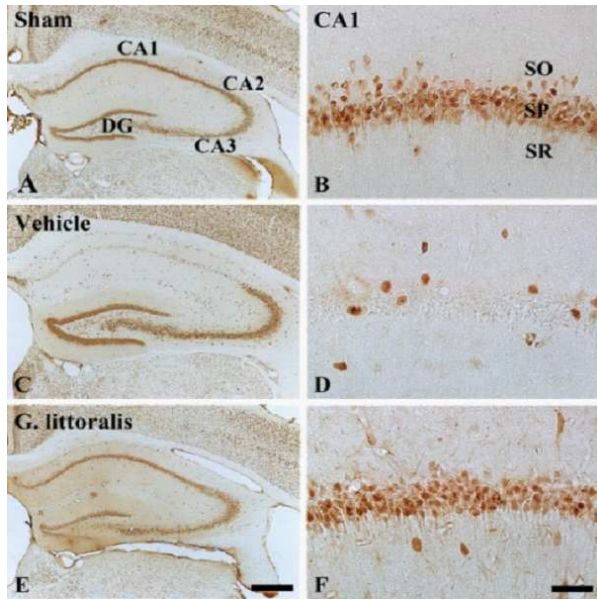
[0104] 갯방풍 추출물의 신경세포 보호 효과, 보다 구체적으로 뇌허혈에 의한 신경세포의 사멸 방지 효과를 추가적으로 확인하기 위하여, 상기 실험예 1 및 실험예 2에서 신경세포 보호효과가 우수한 것으로 확인된 갯방풍 추출물을 투여시킨 투여군에 대하여 추가적으로 별아교세포와 미세아교세포의 활성 변화를 확인하기 위하여 면역조직화학

(immunohistochemistry) 염색을 수행하였다.

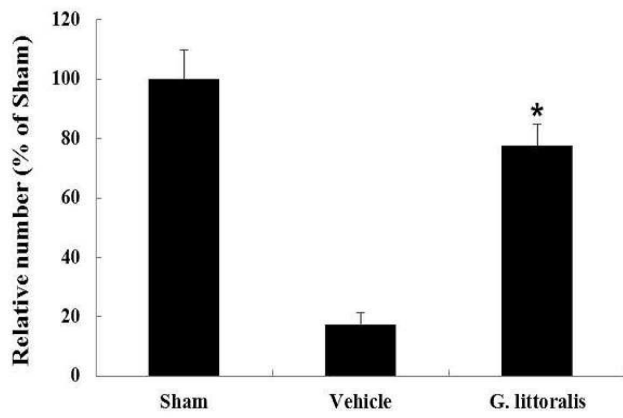
- [0105] 보다 구체적으로, 상기 실험예 1에서 준비된 조직절편 중 해마복합체가 잘 나타난 조직절편을 선택하여 실험에 사용하였으며, 상기 선택된 조직절편은 조직에 존재하는 내인성 페록시다아제(oxidase)를 제거하기 위하여 0.3% H₂O₂(in 0.001M PBS)와 30분 동안 반응시켰다. 상기 0.3% H₂O₂(in 0.001M PBS)로 반응시킨 조직 절편의 비 특이적인 면역반응을 방지하기 위하여, 상기 조직절편을 3%의 정상 염소 혈청(normal goat serum)으로 30분간 반응시켰다.
- [0106] 별아교세포와 미세아교세포의 변화를 확인하기 위하여, 상기 3%의 정상 염소 혈청과 반응한 각각의 조직절편은 1:1000으로 희석한 1차 항체인 항-GFAP(rabbit anti-GFAP, Chemicon, USA)와 항-Iba-1(rabbit anti-Iba-1, Wako Japan)에 4℃에서 48시간 반응시켰다. 상기 반응이 끝난 조직절편은 각각 1:200으로 희석한 2차 항체인 항 레빗 IgG(anti-rabbit IgG, Vector)로 상온에서 2시간 반응시킨 후, 1:200으로 희석한 3차 항체인 ABC용액(Vector)으로 2시간 반응시켰으며, 3,3'-DAB(diaminobezidine)를 기질로 발색하였다. 상기 항체와 반응시키는 과정의 각 단계를 수행함에 있어서, 각 단계별로 상기 조직절편을 0.01M PBS를 사용하여 10분씩 3회 세척하였다.
- [0107] 상기 3차 항체를 이용한 반응이 끝난 조직절편을 젤라틴 코팅된 슬라이드 글라스(slide glass)에 도말 한 후, 실온에서 12시간 동안 건조하였고, 상기 건조된 조직절편은 통상적인 탈수투명화 과정을 거쳐 봉입하였다. 상기 GFAP 또는 Iba-1 항체와 반응을 수행한 후, 봉입한 조직절편을 현미경을 이용하여 관찰하였으며, 그 관찰결과를 촬영한 사진을 촬영하여 도 5에 나타내었다.
- [0108] 상기 도 5에 나타난 바와 같이, 갯방풍 추출물을 투여한 실험군의 경우 용매를 투여한 대조군에 비하여 별아교 세포의 표지자로 알려진 GFAP의 발현 및 미세돌기아교세포의 표지자로 알려진 Iba-1의 면역반응성이 상당히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0109] 또한, 상기 촬영한 사진에 대해 상기 실시예 2와 같이 이미지 분석기 프로그램을 이용하여 염색된 신경아교세포를 계수하였으며, 상기 계수한 결과를 정상군(Sham)에 대한 상대적인 수치로 도 6에 나타내었다.
- [0110] 도 6a에 나타난 바와 같이, 상기 별아교세포에 대한 1차 항체인 GFAP에 의해 염색된 세포 즉, GFAP에 대한 면역 반응성이 확인된 별아교세포는 대조군의 경우 정상군에 대비하여 약 240%로 확인되었으며, 갯방풍 추출물을 투여한 실험군의 경우 정상군에 대비하여 약 145%로 확인되었다.
- [0111] 또한, 상기 도 6b에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 미세돌기아교세포에 대한 1차 항체인 Iba-1에 의해 염색된 세포 즉, Iba-1에 대한 면역반응성이 확인된 미세돌기아교세포는 대조군의 경우 정상군에 대비하여 약 260%로 확인되었으며, 갯방풍 추출물을 투여한 실험군의 경우 정상군에 대비하여 약 150%로 확인되었다. 따라서, 갯방풍 추출물을 투여한 실험군에서는 정상군에 비해서 별아교세포와 미세돌기아교세포가 활성화되기는 하였으나, 대조군과 비교하여 비정상적인 활성화를 최대한 억제하여, 상기 갯방풍 추출물이 신경세포보호에 탁월한 효과를 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0112] 상기한 바와 같이, 갯방풍 추출물은 허혈을 유발시킨 경우에서도 신경세포 특히, 해마 영역을 항-NeuN 항체를 통하여 염색한 신경절편을 관찰한 결과 해마의 전체 영역, 특히 해마의 CA1 영역에서의 신경세포사를 억제하는 것으로 확인되었고, 사멸된 신경세포에 대한 표지자인 F-J B를 통해 확인한 결과 신경세포사의 사멸이 현저하게 억제됨이 확인되었으며, 항-GFAP, 항-Iba-1 항체를 통하여 확인한 결과 신경아교세포의 비정상적 활성화를 매우 우수하게 억제할 수 있음이 확인되었으므로, 상기 갯방풍 추출물은 신경세포보호에 탁월한 효과가 있을 뿐만 아니라 신경아교세포의 비정상적 활성화 억제 효과도 우수한 것으로 평가되었다.
- [0113] 따라서, 상기 갯방풍 추출물은 허혈에 의해 발생하는 지연성 신경세포사를 현저하게 억제할 수 있으므로, 뇌허혈이 일어난 경우에도 운동, 언어, 시각 또는 후각 등의 관련 부위의 신경세포 손상을 최대한으로 억제하여, 뇌허혈에 의한 허혈성 뇌혈관 질환이나 운동손실, 감각의 마비, 언어장애, 시각 및 후각 장애와 같은 뇌기능 저하를 예방 또는 개선할 수 있으므로, 상기 갯방풍 추출물은 신경세포 보호효과가 매우 탁월한 것으로 평가될 수 있다.
- [0114] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

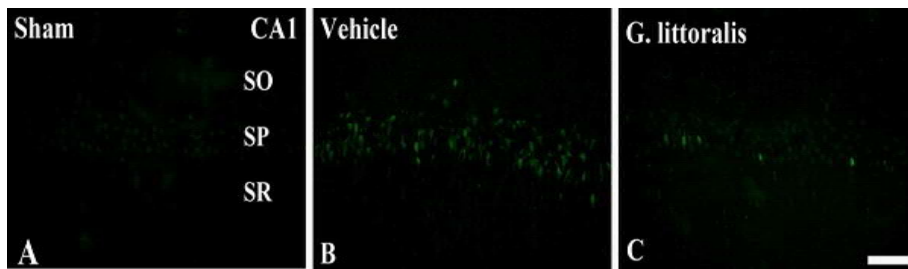
도면1



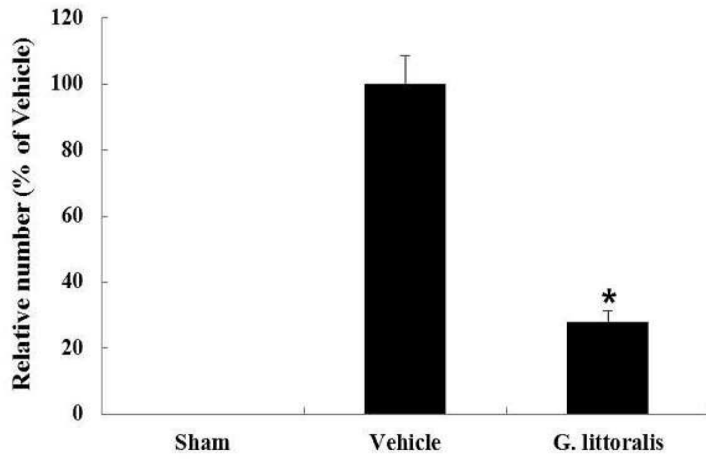
도면2



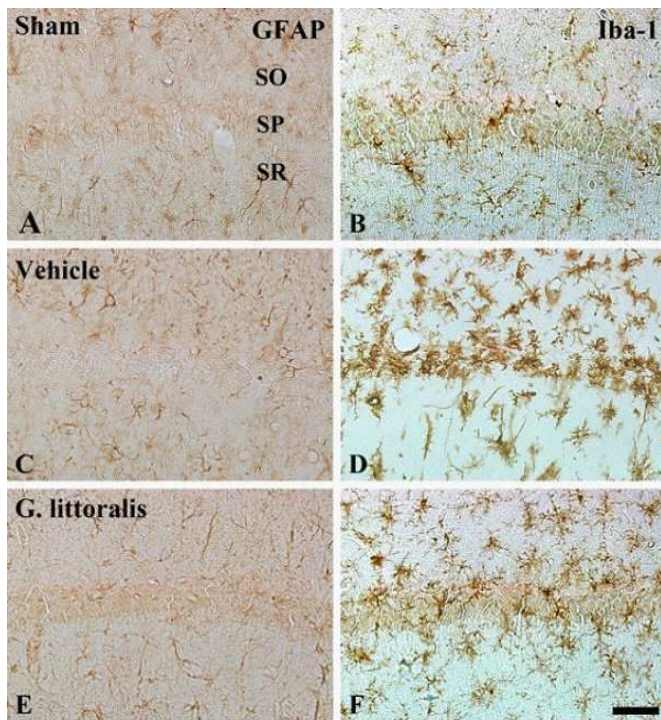
도면3



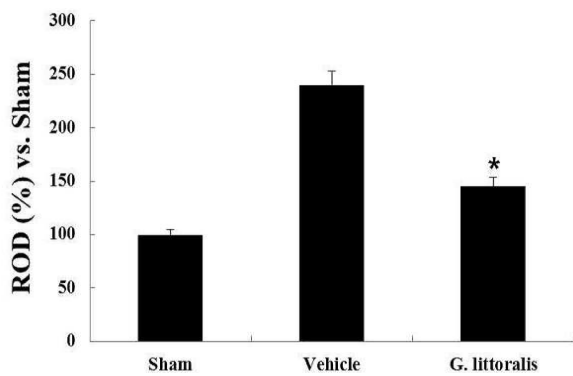
도면4



도면5



도면6a



도면6b

