



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0093128
(43) 공개일자 2011년08월18일

(51) Int. Cl.

A61K 36/12 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0012979

(22) 출원일자 2010년02월11일

심사청구일자 2010년02월11일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

윤태영

서울특별시 중랑구 묵동 태릉 브라운스톤 아파트 102-1404

김영미

서울특별시 강남구 대치3동 우성2차@ 205-901

오태환

서울시 중랑구 묵동 브라운스톤 태릉 아파트 103-701

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 13 항

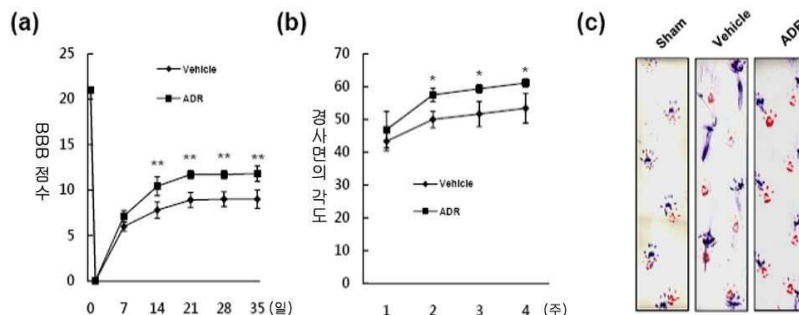
(54) 백지 추출물을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 백지 추출물을 함유하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출된 백지(*Angelica dahurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로 척수 신경 손상 후 세포 내에서의 항산화 및 항염증 효과, 소교세포 활성화 억제효과, 회소돌기아교세포의 사멸 억제 효과 및 운동기능 회복 효과를 나타내는 백지 추출물의 효능을 이용한 척수 손상 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 백지 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 산화적 스트레스 및 염증을 수반하는 중추신경계 염증성 질환에 대한 예방 및 치료제로 사용될 수 있고, 아울러 척수 손상 및 중추신경계 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강식품으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도10

척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 운동기능 증진 효과



특허청구의 범위

청구항 1

백지(*Angelica dahurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후 항산화 및 항염증 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후 소교세포 활성화 억제효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후 척수 희소돌기아교세포사멸 억제효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후 운동 기능 회복효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 에스트로젠 또는 미노사이클린을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

백지(*Angelica dahurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 중추신경계 염증성 질환은 뇌졸중, 치매, 파킨슨병, 루게릭병(ALS) 및 다발성경화증(multiple sclerosis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

백지(*Angelica dahurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 12

백지(*Angelica dahurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 중추신경계 염증성 질환은 뇌졸중, 치매, 파킨슨병, 루게릭병(ALS) 및 다발성경화증(multiple sclerosis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 건강식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 백지 추출물을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 또는 중추신경계 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 중추신경계는 신경세포와 신경교세포로 이루어져 있다. 신경교세포는 전체 뇌세포의 90%, 부피로는 뇌 전체의 50%를 차지하고 있고, 상기 신경교세포는 다시성상세포(astrocytes), 소교세포(microglia) 및 희소돌기아교세포(oligodendro cytes)의 세 종류로 구성되어 있다.

[0003] 이들 중에서 소교세포(microglia)는 중추신경계(central nervous system, CNS)에 상재하는 면역세포로서(Stoll and Jander, Prog Neurobiol 58:233-247, 1999; Kim and de Vellis, J Neurosci Res 81:302-313, 2005) 전체 뇌세포의 5 ~ 10%를 차지한다. 상기 소교세포는 CNS에서 일차 방어라인으로서 기능한다. 자극을 받는 경우, 휴지기의 분지 형태 소교세포는 아메바 형태로 전환되어(Giulian et al., J Neurosci 15:7712-7726, 1995), CNS 내의 면역 및 염증반응에 적극적으로 관여한다(Aloisi, Glia 36:165-179, 2001). 이러한 소교세포의 형태변화는 시험관내(in vitro) 및 생체 내(in vivo)에서 관찰된바 있으나(Perry and Gordon, Trends Neurosci 11:273-277, 1998; Suzumura et al., Brain Res 545:301-306, 1991; Raivich et al., Brain Res Rev 30:77-105, 1999), 이에 대한 정확한 기작은 아직 규명되어 있지 않다. 활성화된 소교세포는 손상된 신경 조직 영역으로 이동하여 미생물 및 세포파편(cell debris)을 포식하고 파괴한다(Gehrmann et al., Brain Res Rev 20:269-287, 1995). 염증세포로서의 소교세포의 역할은 항상 유익한 것만은 아니다. 현재, 조절되지 않은 소교세포의 활성화와 지속적인 과도한 신경 염증은 퇴행성 신경질환(neurodegenerative diseases)을 포함하는 다양한 CNS 병리의 원인으로 여겨지고 있다(Gonzalez-Scarano and Baltuch, Annu Rev Neurosci 22:219-240, 1999). 즉, 기능적으로 활성화된 소교세포는 염증 매개 물질을 생성 및 분비하여 신경 세포 사멸을 초래한다는 사실이 알려졌고, 이를 통해 소교세포의 활성화가 다양한 종류의 중추신경계 질환과 관련이 있음이 알려져, 소교세포의 활성을 조절하는 것이 중추신경계 질환의 예방 및 치료에 있어 중요한 전략의 하나로 고려되고 있다.

[0004] 외상 등으로 인해 척수신경이 손상을 받게 되면 인체기능의 마비를 초래한다. 척수 신경 조직은 뇌와 비교할 때 단순한 구조를 가지고 있으나, 신경 재생에 매우 어려운 문제를 가지고 있다. 척수 손상 후 일어나는 병리학적인 현상은 시간에 따라 일차적 손상과 이차적 손상 크게 두 가지 단계로 나누어진다. 일차적 손상으로서는 손상 직후 수 분 내에 일어나는 현상으로서 상처 부위의 세포가 괴사(necrosis)하는데, 이 시기에는 워낙 빠르게

세포가 파괴되기 때문에 약물학적인 치료로 다루기가 거의 불가능하다. 이차적 손상에 이어 나타나는 이차적 손상은 수 시간에서 수일에 걸쳐 천천히 진행되는데, 상처부위의 세포만 퇴화되는 것이 아니라 주변의 신경세포와 회소돌기아교세포에서 아포토시스에 의하여 서서히 세포사멸이 일어난다. 상기 세포사멸은 상처부위를 중심으로 하여 지속적으로 진행되어 결국 척수 내부의 손상부위가 점차 넓어지게 된다. 더불어 신경 신호의 이동통로인 축삭과 축삭의 기능을 돕는 미엘린 수초의 퇴화가 일어나, 결국에는 구멍과 같은 빈 공간이 형성되어 더 이상의 신경 신호 전달이 이루어질 수 없게 되어 영구적인 기능 소실을 초래한다.

[0005] 지난 십여 년 동안 이러한 척수신경 외상 후 일어나는 병리작용에 대한 원인 규명과 재생에 관한 연구를 통하여 척수손상으로 인한 영구적 기능 마비를 억제하거나 완화시키려는 연구가 진행되어왔다. 특히 척수손상의 초기 기전은 워낙 빠르게 일어나 약물학적인 치료로 다루기 어렵기 때문에, 이차적인 기전을 다루는 약물학적 전략이 치료제 개발에 중요한 부분이다. 이와 관련하여 현재까지 스테로이드, 항산화제, 글루타메이트 수용체 억제제, 이온 채널 억제제, 갱글리오시드(ganglioside), 축삭돌기 재생 억제제에 대한 항체, 항염증제, 신경영양인자 등 다양한 가능성 있는 약물학적인 치료들이 시도되어 왔다. 그러나 오직 메틸프레드니솔론만이 척수손상 후에 유일한 치료제로서 현재 사용되고 있다. 하지만 메틸프레드니솔론은 불분명한 치료 효과와, 과량의 투여량으로 인한 부작용 등 많은 문제점을 안고 있다. 따라서 새로운 치료제 개발이 매우 절실한 실정이다.

[0006] 염증반응은 척수손상 후 나타나는 이차적 손상의 주된 요인 중 하나로서 급성, 만성 척수손상의 병리현상 조절에 중추적인 역할을 한다. 척수손상 후 염증반응은 염증과 관련한 유전자 및 단백질의 발현이나 활성이 증가되어 발생하는데, 특히 종양괴사인자 알파(TNF α), 인터루킨-1 β (IL-1 β), 인터루킨-6 (IL-6)등의 초기 염증성 싸이토카인(pro-inflammatory cytokines)이나 사이클로옥시게나제(Cyclooxygenase 2; COX-2), iNOS(유도형 일산화질소 합성 효소; inducible nitric oxide synthase) 및 프로스타글란딘 합성효소(PROSTAGLANDIN synthase-2) 등의 염증 매개물질이 관여한다고 알려져 있다. 이러한 물질들은 손상 후 유입된 혈액세포나 척수 내 존재하는 소교세포(microglia)에서 분비되어 세포 독성을 나타내며 축삭퇴화나 탈수초화의 진행에도 영향을 미치게 된다.

[0007] 또한 척수손상 후 유입되는 혈액세포 중 특히 호중성 백혈구(neutrophil)나 대식세포(macrophage) 등이 염증반응을 유도하여 세포사멸 및 신경교성반흔(gliotic scar)의 형성에 관여하고, 주위 세포의 부가적인 활성화를 야기하여 연속적인 염증반응을 일으킨다고 알려져 있어 이들의 유입을 억제하는 것이 중요한 치료전략 중 하나로 평가되고 있다.

[0008] 또한 평소 중추신경계의 면역반응에 관여하는 소교세포는 척수손상 후 과도하게 활성화되면 염증 유발물질을 생성, 분비하여 세포독성을 야기하게 되는데, 특히 척수손상 후 소교세포 활성화는 서행적으로 일어나는 신경세포와 회소돌기아교세포의 세포사멸에 관여한다고 알려져 있으며, 최근 척수손상 후 소교세포에서 증가하는 미토젠 활성화 단백질 키나제 (p38 MAPK)의 활성화는 회소돌기아교세포의 세포사멸을 유도하는 신경성장인자 전구물질(proNGF)을 생성하고, 축삭퇴화과정에도 관여한다고 보고된 바 있다.

[0009] 이뿐 아니라 활성화된 소교세포는 척수손상 후 만성적으로 발생하는 신경병증 통증(neuropathic pain)을 일으키는 주된 요인으로도 알려져 있어, 소교세포 활성화를 제어하는 것은 염증 조절을 통한 척수손상 치료 연구에 매우 중요한 사안이라 할 수 있다.

[0010] 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산소이온(oxygen ions), 자유라디칼(free radical) 및 과산화물(peroxide) 등을 포함하는 이온이나 매우 작은 분자를 의미한다. 활성산소종은 홀전자(unpaired electron)를 포함하고 있는데, 이러한 홀전자는 반응성이 매우 강하여 다른 물질들과 연쇄 반응을 일으켜 지질 과산화(lipid peroxidation), 단백질 카르보닐화(protein carbonylation) 및 질산화(nitration) 등을 유도함으로써, 단백질, DNA 및 지질 등 세포 내 고분자를 변형, 손상시키고 그 결과 세포사멸을 유도하게 된다. 따라서 활성산소의 억제는 세포보호를 위한 중요한 치료 표적 중 하나이다.

[0011] 대표적인 활성산소로는 슈퍼옥사이드(superoxide; O₂⁻)가 있는데 이는 매우 반응성이 좋으며 평소에는 미토콘드리아의 세포 호흡에 관여하지만 병리적 환경에서는 활성화된 백혈구나 대식세포에서 과량의 슈퍼옥사이드와 다른 활성산소가 생성되어 세포를 손상시킨다. 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 포스페이트(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH) 옥시다제(oxidase)가 슈퍼옥사이드를 만드는 주된 공급원으로 알려져 있다. 척수손상 후에는 다량의 활성산소종이 생성되며, 특히 운동기능 조절의 중추인 운동신경세포(motor neuron)가 이러한 산화적 스트레스에 매우 민감하여, 이러한 염증반응이나 활성산소종과 같은 산화적 스트레스 조절을 통한 척수 손상 치료제로의 응용에 대한 연구 또한 매우 중요하다.

- [0012] 백지(*Angelica dahurica*)는 산형과(Umbelliferae)의 *Angelica*속으로써, 한국, 중국, 일본 등에서 6 ~ 8월에 개화하는 다년생 초본으로 어린 잎은 식용이 가능하고, 가을에 뿌리를 채취하여 건조한 것을 "백지(白芷)"라 하며, 한약재로 사용한다. 백지는 생김새는 짧은 원뿌리로부터 많은 긴 뿌리가 갈라져서 대체로 방추형을 이루고 길이 10 ~ 25 cm이며 바깥면은 회갈색 또는 어두운 갈색을 띤다. 뿌리 윗부분에 약간의 엽초가 남아 있고 좁게 두드러진 돌림마디가 있다. 뿌리에는 세로주름과 세로로 두드러진 여러 개의 가는 뿌리 자국이 있으며 옆으로 잘린 면 주변에는 회백색으로 빈틈이 많고 가운데 부분은 어두운 갈색을 띤다.
- [0013] 예로부터 한방에서 백지는 발한, 진정, 진통, 감기, 두통, 치통 치료에 쓰이고, 미백, 모공수축, 항염증작용도 있는 것으로 알려져 있다(Chevallier A, 2001; Tang and Eisenbrand, 1992; Wagner H, 1999). 특히 간에 기능 보호 및 항균, 항염증, 항산화, 항돌연변이(antimutagenic activity) 기능 등이 보고된바 있다(Tang and Eisenbrand, 1992; Wagner H, 1999).
- [0014] 하지만, 항산화 및 항염증, 소교세포 활성화 억제, 희소돌기아교세포 사멸 억제 및 운동기능 회복에 대한 백지 추출물의 효능은 전혀 제시된 바 없다.
- [0015] 이에, 본 발명자들은 척수손상과 유사한 형태를 재현한 래트 척수 손상 모델을 이용하여, 척수 손상 후 백지 추출물을 투여하여, 척수 손상 동물모델에서 백지 추출물의 소교세포 활성화 억제 효과, 항산화 및 항염증 효과, 세포사멸 억제 효과 및 운동기능 회복 효과를 확인하여, 백지 추출물의 척수 손상에 대한 예방 및 치료용 조성물로서의 가능성을 확인하였다.
- [0016] 또한, BV-2 소교세포를 배양하여 활성화를 유도하고, 이에 백지 추출물을 투여하여, 백지 추출물의 항염증 및 항산화 효과를 확인함으로써, 산화적 스트레스 및 염증반응이 매개됨으로 신경세포 및 희소돌기아교세포의 사멸이나 축삭퇴화, 탈수초현상을 야기하는 뇌졸중, 치매, 파킨슨병, 루게릭병(ALS) 및 다발성경화증(multiple sclerosis) 등의 중추신경계 염증성 질환에 대한 예방 및 치료용 조성물로서의 가능성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0017] 본 발명의 목적은 백지(*Angelica dahurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 예방 및 치료용 조성물 또는 건강식품을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 백지(*Angelica dahurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성 또는 건강식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출된 백지(*Angelica dahurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출된 백지 추출물을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출된 백지 추출물을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출된 백지 추출물을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 백지(*Angelica dahurica*) 추출물은 척수 신경 외상 후, 항산화 및 항염증 효과, 소교세포 활성화 억제 효과, 척수 희소돌기아교세포 사멸 억제효과 및 운동 기능 회복 효과를 가짐으로써, 척수 손상 예방 및 치료용 조성물 또는 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있을 뿐 아니라, 산화적 스트레스와 염증반응이 매개됨으로 야기되는 중추신경계 염증성 질환에 대한 예방 및 치료용 조성물 또는 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 BV-2 세포에서 백지추출물의 세포 독성 여부를 확인한 MTT 시험의 결과를 나타내는 그림이다.

도 2는 BV-2 세포에서 백지 추출물의 항염증 효과를 나타낸 그림이다.

도 2a는 RT-PCR의 결과를 나타낸 그림이고, 2b는 이를 밴드(band)의 상대적 인텐시티(intensity)로 나타낸 표이다. 도 2c는 웨스턴 블랏의 결과를 나타낸 그림이고, 2d는 이를 밴드(band)의 상대적 인텐시티(intensity)로 나타낸 표이다.

LPS - 지질다당류(lipopolysaccharide);

ADR - 백지 추출물(*Angelica dahurica* Radix);

TNF- α - 종양괴사인자 알파(Tumor Necrosis Factor alpha);

GAPDH - 글리세릴알데히드-3-인산 탈수소효소(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase);

IL-6 - 인터루킨 6(interleukin 6);

iNOS - 유도형 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase);

COX-2 - 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase); 및

β -tubulin - 베타 튜블린.

도 3은 BV-2 세포에서 백지 추출물의 항산화 효과를 나타낸 그림이다.

도 3a는 DCF-DA 염색하여 형광현미경으로 관찰한 BV-2 세포를 나타낸 그림이다. 도 3b는 산화질소(Nitric oxide) 시험법의 결과를 나타낸 그림이고, 3c는 이를 밴드(band)의 상대적 인텐시티(intensity)로 나타낸 표이다.

LPS- 지질다당류(lipopolysaccharide);

CTR -대조군(control); 및

ADR- 백지 추출물(*Angelica dahurica* Radix).

도 4는 척수 손상 후 백지 추출물의 활성산소 억제 효과를 나타낸 그림이다.

도 4a는 형광현미경으로 관찰한 세포 사진을 나타낸 그림이다. 도 4b는 4a에서 관찰한 세포를 에티디움 신호의 상대적 인텐시티로 나타낸 표이다.

Sham - 음성대조군;

Vehicle - 운반체; 및

ADR - 백지 추출물(*Angelica dahurica* Radix).

도 5는 척수 손상 후 백지 추출물의 단백질 산화 억제 효과를 나타낸 그림이다. 도 5a는 단백질 나이트로실레이션을 보여주는 세포 염색 사진을 나타낸 그림이다. 도 5b는 5a에서 관찰한 세포의 나이트로티로신 양성 뉴런의 수를 비교하여 나타낸 표이다.

도 6은 척수 손상 후 백지 추출물의 사이토카인 분비 억제 효과를 나타낸 그림이다. 도 6a는 RT-PCR의 결과를 나타낸 그림이고, 6b는 이를 밴드(band)의 상대적 인텐시티(intensity)로 나타낸 표이다. 도 6c는 웨스턴 블랏

의 결과를 나타낸 그림이고, 6d는 이를 밴드(band)의 상대적 인텐시티(intensity)로 나타낸 표이다.

TNF- α - 종양괴사인자 알파(Tumor Necrosis Factor alpha);

IL-1b - 인터루킨 1b(interleukin 1b);

iNOS - 유도형 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase);

COX-2 - 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase);

GAPDH - 글리세탈데히드-3-인산 탈수소효소(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); 및

β -tubulin - 베타 튜블린.

도 7은 척수 손상 후 백지 추출물의 소교세포 억제 효과를 나타낸 그림이다.

도 7a는 p38 MAPK의 인산화 여부 확인을 위한 웨스턴 블랏과 이를 밴드의 상대적 인텐시티로 나타낸 그림이다.

도 7b는 p38 MAPK의 인산화 여부 확인을 면역염색으로 확인한 세포 사진을 나타낸 그림이다. 도 7c는 ProNGF의 발현 확인을 웨스턴 블랏과 이를 밴드의 상대적 인텐시티로 나타낸 그림이다.

p-p38 MAPK - 인산화 미토젠 활성화 단백질 키나제;

p38 MAPK - 미토젠 활성화 단백질 키나제; 및

proNGF - 신경성장인자 전구물질.

도 8은 척수 손상 후 백지 추출물의 세포사멸 억제 효과를 나타낸 그림이다.

도 9는 척수 손상 후 백지 추출물의 카스페아제-3 활성 억제 효과를 나타낸 그림이다. 도 9a는 카스페아제-3의 활성을 비교하기 위한 웨스턴 블랏 결과와 이를 밴드의 상대적 인텐시티로 나타낸 그림이다. 도 9c는 카스페아제-3의 활성 비교를 위한 면역염색 후 세포 사진을 나타낸 그림이고, 도 9d는 세포의 수를 비교하여 나타낸 표이다.

도 10은 척수 손상 후 백지 추출물의 운동기능 증진 효과를 나타낸 그림이다.

도 10a: BBB 테스트;

도 10b: 경사면 테스트; 및

도 10c: 발자국 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

본 발명은 백지(*Angelica dahurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

상기 백지 추출물은 하기와 같은 단계로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다;

1) 건조한 백지(*Angelica dahurica*)를 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축하는 단계.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 백지는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.

상기 추출 용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물, 바람직하게는 C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 70% 에탄올 수용액을 사용하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 용매의 양은 백지 건조 중량의 2 내지 15 배로 한다. 상기 추출 방법은 열수추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 및 냉침 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 냉침 추출방법이 될 수 있다. 추출시 온도는 10℃ 내지 100℃ 인 것이 바람직하며 상온인 것이 더욱 바람

직하다. 상기 추출 시간은 30분 내지 4시간이며, 바람직하게는 1 ~ 2시간이다.

[0033] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0034] 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 활성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 산화적 스트레스의 산물로 매우 잘 알려져 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서 척수 손상 동물 모델에서 상기 백지 추출물의 활성산소종 생성 억제효과를 확인한 결과, 척수 손상 4시간에 운동 신경 세포에서 관찰되는 반점화된 활성 산소종을 확인하였고, 백지 추출물에 의해 관찰되는 활성 산소종이 현저히 감소됨을 확인하였다(도 4 참조). 이는 백지 추출물의 항산화 효과를 보여주는 것으로, 백지 추출물이 척수 손상 후 다량 생성되는 활성산소종에 의한 운동 신경세포의 산화적 스트레스를 조절하는데 효과적임을 나타낸다.

[0035] 척수 손상과 같은 중추신경계 질환의 병리학적 과정의 주요 메커니즘인 염증반응에 있어서, 신경계의 면역세포인 소교세포는 염증활성화 물질을 분비함으로써, 이 과정을 매개하는 주된 세포로 알려져 있다. 이러한 염증활성화 물질의 분비 증가는 신경세포와 회소돌기아교세포의 사멸을 유도하게 되고 주변으로 염증반응을 확대시키는 결과를 일으킨다. 본 발명의 실시예에서, 척수 손상 동물 모델에 백지 추출물의 투여군과 비투여군에서 척수 신경조직의 염증 반응 마커의 발현을 확인한 결과, 염증 반응 마커로 알려진 사이토카인 Cox-2, iNOS, IL-1 β 및 TNF- α 의 발현이 감소됨을 확인하였다(도 6 참조). 이는 백지 추출물이 척수 손상 동물 모델에서 항염증 효과를 나타냄을 보여주는 결과이다.

[0036] p38MAPK의 활성화는 소교세포 활성화에 밀접한 관계가 있다고 알려져 있고(Bhat et al., 1998), p38MAPK는 척수손상 후 소교세포에서 발현하고 proNGF의 생성과정에 관여하며 이 proNGF가 회소돌기아교세포 사멸을 유도한다고 보고된바 있다(Beattie et al., 2002; Yune et al., 2007). 본 발명의 구체적인 실시예에서, 이러한 선행 연구를 기반으로 척수 손상 동물 모델에서 척수 손상 5일째에 p38MAPK의 인산화여부를 웨스턴 블랏과 면역색으로 확인한 결과, 소교세포 내 p38MAPK의 활성이 백지 추출물에 의해 현저히 감소되고, proNGF의 발현 역시 감소됨을 확인하였다(도 7 참조). 이는 백지 추출물이 척수 손상 동물 모델에서 소교세포의 활성 억제 효과를 나타냄을 보여주는 결과이다.

[0037] 척수 외상 후 손상부위에서 시작되어 지속적으로 세포 사멸이 일어나게 되는데 뉴런과 회소돌기아교세포의 사멸이 기능 마비를 일으키는 중요한 요인으로 알려져 있다. 래트의 경우 척수 외상 후 1일 쯤에는 뉴런의 아포토시스가 현저히 증가하고, 5-7일 사이에는 회소돌기아교세포의 사멸이 주되게 일어난다. 본 발명의 실시예에서, 백지추출물의 신경세포 사멸 억제 효과를 확인하기 위하여 터넬(TUNEL) 염색을 수행하여 그 염색된 수를 비교한 결과, 1일과 5일의 척수 조직에서 백지 추출물 투여로 인하여 뉴런과 회소돌기아교세포의 사멸이 현저하게 억제됨을 확인하였다(도 8 참조). 또한, 아포토시스 과정에 중요한 역할을 하는 회소돌기아교세포 내 카스파제-3의 활성도 현저히 억제되는 것을 확인하였다(도 9 참조). 이는 척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물이 회소돌기아교세포의 사멸 억제 효과가 있음을 나타낸 결과이다

[0038] 또한, 척수 손상 동물 모델에 백지 추출물을 투여한 군은 비비비 오픈필드 스코어(BBB Open field score; 도 10a 참조), 경사면 테스트(Inclined plane test; 도 10b 참조) 및 발자국분석(Foot print analysis; 도 10c 참조)에서 모두 대조군(생리식염수 투여군)에 비해 운동기능이 회복되는 것을 확인하였다.

[0039] 상기와 같이 백지 추출물은 척수 신경 외상 후 항산화 및 항염증 효과, 소교세포 활성화 억제 효과, 회소돌기아교세포 사멸 억제효과 및 운동 기능 회복효과를 나타내어 척수 손상 예방 및 치료용 조성물에 유용하게 이용될 수 있다.

[0040] 또한, 상기 척수 손상 예방 및 치료용 조성물은 에스트로젠 또는 미노사이클린을 추가로 포함할 수 있다. 에스트로젠과 미노사이클린은 래트 척수 손상 후 뒷다리 운동 기능 회복 및 신경세포사멸 억제 효과를 나타내는 것으로 보고된바 있다(Yune TY et al., *J Neurotrauma* 21(3):293-306, 2004; Lee SM et al., *J Neurotrauma* 20(10):1017-27, 2003). 특히 상기 두 약물은 현재 임상에서도 사용되는 약물로서 매우 안전하고 부작용이 전혀 없는 약물로 알려져 있다. 척수 손상 후 상기 약물들의 효과는 여러 가지 세포 내 신호전달 과정을 통하여 나타나므로(예를 들어 에스트로젠은 척수 손상 후 Akt나 ERK를 매개로 하는 신호전달을 활성화시켜 세포사를 억제하고, 미노사이클린은 p38MAPK를 매개로 하는 신호전달을 억제시켜 세포사를 억제한다.), 각각의 서로 다른 작용 메커니즘을 가지는 약물을 함께 투여할 때에 다양한 신호전달 체계를 조절하여 시너지 효과를 기대할 수

있을 것이다. 이러한 관점에서 볼 때에 백지 추출물과의 복합적인 치료는 척수 손상 환자에게 더욱 효과적인 치료전략이라 할 수 있을 것이다.

- [0041] 본 발명의 척수 손상 예방 및 치료용 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 백지 추출물을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 백지추출물을 함유하는 조성물은 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0042] 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡셀제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0043] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0044] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 백지 추출물을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0047] 상기 중추신경계 질환은 뇌졸중, 치매, 파킨슨병, 루게릭병(ALS) 및 다발성경화증(multiple sclerosis)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 본 발명의 구체적인 실시예에서, BV-2 소교세포에 지질다당류(Lipopolysaccharide; LPS)를 처리하여, 그 활성화를 유도하고, 활성화된 소교세포에서 염증 반응 마커 유전자의 발현을 확인한 결과, 세포에서 염증 반응이 일어난 지 2시간 및 24시간 후에 발현이 증가되는 사이토카인의 발현이 백지 추출물 처리에 의해 현저히 감소됨을 확인하였다(도 2 참조).
- [0049] 또한, BV-2 소교세포에서 LPS에 의해 증가한 활성산소종과 활성질소종이 백지 추출물의 처리에 의해 현저히 감소함을 확인하였다(도 3 참조).
- [0050] 이는, 백지 추출물이 BV-2 소교세포에 직접적인 항염증 및 항산화 효과를 나타냄을 보여줌으로써, 백지 추출물이 산화적 스트레스 및 염증반응이 매개됨으로써 신경세포 및 희소돌기아교세포의 사멸이나 축삭퇴화, 탈수초현상의 야기로 인한 중추신경계 염증성 질환의 치료제로 유용하게 이용될 수 있음을 보여준다.
- [0051] 상기 조성물들의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 백지 추출물은 1일 0.0001 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 1000 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에

한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0052] 상기 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 비경구투여 방법이라면 어느 것이나 사용 가능하고, 전신 투여 또는 국소 투여가 가능하나, 전신 투여가 더 바람직하며, 정맥내 투여가 가장 바람직하다.

[0053] 또한, 본 발명은 백지 추출물을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0054] 또한, 본 발명은 백지 추출물을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0055] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 저농도에서 고농도의 백지 추출물을 BV-2 소교세포에 투여한 결과, 백지 추출물 자체에 의한 BV-2 소교세포의 독성은 나타나지 않음을 확인하였다(도 1 참조). 이는 상기 백지 추출물을 척수 손상 및 중추신경계 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강식품으로 사용함에 있어, 매우 안정하게 이용할 수 있다는 것을 보여준다.

[0056] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.

[0057] 본 발명의 백지 추출물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 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.

[0058] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0059] 상기 외에 본 발명의 백지 추출물은 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 백지 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 백지 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0060] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0061] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

- [0062] <실시예 1> 백지 추출물(*Angelica Dahurica Radix*, ADR)의 제조
- [0063] 백지 추출물은 백지(Jung Do Herbal Drug Co. 서울, 한국)를 70% 에탄올로 실온에서 냉침으로 추출한 후, 동결 건조한 분말을 물 또는 완충용액에 녹여 사용하였다.
- [0064] <실시예 2> 척수 외상 동물 모델 및 백지 추출물의 투여
- [0065] <2-1> 척수 외상 동물 모델
- [0066] 척수 외상 동물 모델로서 10g 무게의 추를 일정 높이에서 떨어뜨려 인간 척수손상과 유사한 외상을 주고, 외상 강도를 컴퓨터에서 수치화할 수 있게 고안된 NYU impactor를 사용하였다. 성체 수컷 래트(230 ~ 250g)(샘타코에서 구입)에 클로랄하이드레이트(500 mg/kg)를 복강 주입하여 마취한 후에, 척수 T8-T10 부분을 노출시켰다. NYU impactor의 클램프에 래트를 고정시킨 다음, 25mm 높이에서 10g의 추를 자유낙하 시켜 척수 T9 부위에 손상을 주었다. 컴퓨터에 나타나는 손상 강도에 대한 데이터를 통하여 정해진 오차 범위내에 일정한 손상이 가해진 것을 확인한 후 상처부위를 봉합하였다. 상처부위를 포비딘 액으로 소독한 후 2마리씩 케이지에 넣어 사육하였고, 하루 3회 인위적으로 방광을 마사지하여 배뇨를 도왔다.
- [0067] <2-2> 백지 추출물 투여
- [0068] 척수 외상을 준 후 1 ml 생리식염수에 녹인 백지 추출물을 100 mg/kg, 300 mg/kg로 경구 투여하였다. 수술이 끝난 지 2시간 후에 쥐가 완전히 마취에서 깨어난 것을 확인한 후 투여하였다. 음성대조군으로는 백지 추출물을 포함하지 않는 생리식염수 1 ml을 경구 투여하였다. 상기 투여는 하루에 한 번씩 2주 동안 투여하였다.
- [0069] <실험예 1> 백지추출물의 세포독성여부 확인
- [0070] BV-2 소교세포를 5% 소 혈청이 함유된 DMEM 배지에서 키운 후, 상기 <실시예 1>에서 제조된 백지 추출물을 1, 10, 50 ug/ml의 농도로 처리하여 24시간 경과 후, MTT 시험법을 이용하여 백지추출물 자체에 의한 BV-2 소교세포의 세포독성 여부를 평가하였다.
- [0071] 그 결과 본 실험에서 사용되는 모든 농도에서 백지 추출물이 세포에 안정함을 확인하였다(도 1).
- [0072] <실험예 2> BV-2 세포에서 백지 추출물의 항염증 효과
- [0073] BV-2 소교세포(아주대학교 조은혜 교수 연구실에서 분양받음)를 디엠이엠(DMEM) 배지에 5% 소 태아혈청(fetal bovine serum; FBS)이 포함된 용액 내에서 37° C, 5% 탄산가스(CO₂), 95% 공기(O₂)의 조건으로 배양한다. 배양 중인 BV-2 소교세포(1 X 10⁵ 세포/웰)를 24웰 플레이트에 분주하고, 24시간 후 지질다당류(Lipopolysaccharide; LPS)를 100 ng/ml 처리함으로써, 소교세포의 활성화를 유도하였다.
- [0074] 백지 추출물은 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)에 최종농도 0.001%가 되게 희석시켜, 1, 10, 50 ug/ml의 농도로 LPS를 처리하기 30분 전에 처리한 후, 활성화된 소교세포에서 염증 반응 마커 유전자의 발현을 RT-PCR과 웨스턴 블랏(Western blot)을 수행하여 확인하였다.
- [0075] 구체적으로, RT-PCR 및 웨스턴 블랏(Western blot)은 하기와 같은 방법으로 수행되었다.
- [0076] 백지 추출물이 투여된 BV-2 소교세포 및 척수 손상 동물 모델에서의 척수 신경 조직의 RNA는 트라이졸 용액(TRIZOL Reagent, Invitrogen)을 이용하여, 용액에 포함되어 있는 매뉴얼에 따라 실험을 수행하여 분리하고, 1 µg의 전체 RNA를 이용하여 20 µl의 전체 혼합물(total mixture)을 만들어 MMLV reverse transcriptase(Invitrogen)를 이용하여, RT-PCR(reverse transcription polymerasechain reaction)을 수행하였다. RT-PCR에 사용된 각 유전자와 프라이머쌍은 하기의 [표 1]과 같다.

표 1

[0077]	iNOS	센스	5' -CTCCATGACTCTCAGCACAGAG-3'
		안티센스	5' -GCACCGAAGATATCCTCATGAT-3'
	COX-2	센스	5' CCATGTCAAACCGTGGTGAATG-3'
		안티센스	5' -ATGGGAGTTGGCAGTCATCAG-3'
	TNF- α	센스	5' -CCCAGACCCTCACACTCAGAT-3'
		안티센스	5' -TGTCCTTGAAGAGAACCTG-3'
	IL-1 β	센스	5' -GCAGCTACCTATGTCTTGCCCGTG-3'
		안티센스	5' -GTCGTTGCTGTCTCTCCTTGT-3'
	IL-6	센스	5' -AAGTTTCTCTCCGCAAGATACTTCCAGCCA-3'
		안티센스	5' -AGGCAAATTTCTGTTATATCCAGTT-3'
	GAPDH	센스	5' -TCCCTCAAGATTGTCAGAA-3'
		안티센스	5' -AGATCCACAACGGATACATT-3'

[0078] 백지 추출물이 투여된 BV-2 소교세포 및 척수 손상 동물 모델에서의 척수 신경 조직에 파쇄 용액(Lysis Buffer; 1% Nonidet P-40, 20 mM Tris (pH 8.0), 137 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, 10 mM Na₂P₂O₇, 10 mM NaF, 1 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 1 mM vanadate, and 1 mM PMSF)을 처리하여 세포 및 조직 내 단백질을 얻고, 이를 이용하여 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 젤 전기영동법(SDS-PAGE)을 수행하였다. 이후 나이트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 전달한 후, 각각의 항체[항-COX-2 항체(Cayman Chemical에서 구입), 항-iNOS 항체(TransductionLaboratory에서 구입), 항- β -tubulin 항체(Sigma에서 구입)]에 포함되어 있는 설명서의 방법에 따라 웨스턴 블랏(western blot)을 수행하였다.

[0079] 그 결과, 세포에서 염증 반응이 일어난 지 2시간에 발현이 증가되는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 의 사이토카인과 염증 반응이 일어난 지 24시간에 발현이 증가되는 iNOS 및 COX-2의 염증 반응 마커 유전자의 발현이 백지 추출물 처리에 의해 현저히 감소되었음을 확인하였다(도 2).

[0080] 따라서, BV-2 소교세포에서 백지 추출물은 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0081] <실험예 3> BV-2 세포에서 백지 추출물의 항산화 효과

[0082] 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)등은 산화적 스트레스의 산물로 매우 잘 알려져 있다. BV-2 소교세포에서 백지 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해, DCF-DA 염색법(도 3a)와 산화 질소(Nitric oxide; NO) 시험법(도 3b, 3c)을 통하여 실험을 수행하였다.

[0083] 그 결과, LPS에 의해 증가한 활성산소종과 활성질소종이 백지 추출물을 처리한 세포에서 현저히 감소함을 확인하였다(도 3).

[0084] 따라서, BV-2 소교세포에서 백지 추출물은 항산화 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0085] <실험예 4> 척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 항산화 효과

[0086] 척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 활성산소종 생성 억제효과를 확인하기 위하여, 수퍼록사이드 이온(superoxide anion; O₂⁻)에 특이적으로 결합하는 형광 물질인 HET을 래트 관류 고정 1시간 전에 꼬리정맥에 주입한 후, 조직을 고정시킨 후, 크라이오스탯(cryostat)을 이용하여 조직 절편을 만들고, 이를 형광현미경을 이용하여 관찰 후, 백지 추출물 투여군과 비투여군간의 에티디움 신호의 상대적 인텐시티(intensity)를 비교하였다.

[0087] 구체적으로, 척수 신경 조직의 절편은 하기의 방법으로 준비되었다.

[0088] 척수 외상을 준 래트에서 심장(right atrium)을 통해 적절한 관류(perfusion)를 시행하여 조직에서 혈액을 제거하고, 이를 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정한 후, 척수 신경 조직을 절단한다. 이후 척수 신경 조직을 동결조직 포매제(OCT 화합물)로 감싸 동결시킨 후, 이를 크라이오스탯(Cryostat)을 사용하여 절단하여 척수 신경 조직의 절편을 준비하였다.

- [0089] 그 결과, 척수 손상 4시간에 운동 신경세포에서 관찰되는 반점화된 활성 산소종을 확인할 수 있었고, 백지 추출물에 의해 관찰되는 활성 산소종이 현저히 감소됨을 확인하였다(도 4).
- [0090] 또한 활성산소는 단백질, 지질, DNA 등의 거대 분자를 손상시키는데, 특히 단백질은 활성산소에 의해 카보닐레이션(carbonylation)이나 나이트로실레이션(nitrosylation)이 일어나게 되어, 단백질의 구조가 변형되어 제 기능을 못하게 된다. 백지 추출물이 활성산소를 억제함으로써 단백질의 변성을 막아주는지 여부를 알아보기 위하여, 활성 산소에 의해 손상받은 단백질을 확인할 수 있는 단백질 나이트로실레이션 여부를 검사하였고, 그 결과 백지 추출물이 활성 산소에 의한 단백질 손상을 현저히 감소시켜 주었음을 확인하였다(도 5).
- [0091] 따라서, 백지 추출물이 척수 손상 동물 모델에서 항산화 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [0092] **<실험예 5> 척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 항염증 효과**
- [0093] 염증반응은 척수손상과 같은 중추신경계 질환의 병리학적 과정의 주요 메커니즘 중의 하나로 알려져 있다. 그 중 신경계의 면역세포인 소교세포는 TNF- α , IL-1 β 및 NO와 같은 염증활성화 물질을 분비함으로써, 이 과정을 매개하는 주된 세포로 알려져 있다. 이러한 염증활성화 물질의 분비 증가는 신경세포와 회소돌기아교세포의 세포사멸을 유도하게 되고 또한 주변으로 염증반응을 확대시키는 결과를 일으킨다.
- [0094] 백지 추출물이 척수 손상 동물 모델에서 척수 손상 후 증가하는 염증 활성화 물질(염증 반응 마커)을 감소시키는 지 여부를 확인하기 위해, 척수 손상 후 2시간째의 조직을 준비하여, 대표적인 염증 반응 마커로 알려진 사이토카인 Cox-2, iNOS, IL-1 β 및 TNF- α 에 대한 RT-PCR 및 Cox-2 및 iNOS에 대한 웨스턴 블랏(Western blot)을 수행하였다.
- [0095] 그 결과, 척수 손상 동물 모델에 백지 추출물을 투여한 경우, 투여하지 않은 경우의 척수 신경 조직에서, 백지 추출물을 투여한 경우, 비투여한 경우에 비해 염증 반응 마커로 알려진 사이토카인 Cox-2, iNOS, IL-1 β 및 TNF- α 의 발현이 감소됨을 확인하였다(도 6).
- [0096] 따라서, 백지 추출물이 척수 손상 동물 모델에서 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [0097] **<실험예 6> 척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 소교세포 활성화 억제 효과**
- [0098] p38MAPK의 활성화는 소교세포 활성화에 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다(Bhat et al., 1998). 또한 p38MAPK는 척수손상 후 소교세포에서 발현하고 proNGF의 생성과정에 관여하며 이 proNGF가 회소돌기아교세포 사멸을 유도한다고 보고된바 있다(Beattie et al., 2002; Yune et al., 2007).
- [0099] 이러한 선행연구를 기반으로 척수손상 후 백지 추출물의 소교세포 활성화 억제효과를 알아보기 위해, 척수 손상 동물 모델에서 척수손상 5일째에 p38MAPK의 인산화여부를 웨스턴 블랏(Western blot)과 면역염색으로 확인하였다.
- [0100] 구체적으로, 면역염색은 10 μ m조직 절편을 이용하여 각각의 1차 항체의 실험법에서 제시하는 조건에서 반응시킨 후 2차 항체를 사용하여 염색한다. 형광 발색의 경우 Jackson의 2차 항체를 사용하고, DAB 발색의 경우 Vectastatin kit(Vector)를 사용하여 발색하였다.
- [0101] 그 결과, 소교세포 내 p38MAPK의 활성이 백지 추출물에 의해 현저히 감소됨을 확인하였고, proNGF 발현 역시 감소됨을 확인하였다(도 7).
- [0102] 따라서, 백지 추출물이 척수 손상 동물 모델에서 소교세포의 활성 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [0103] **<실험예 7> 척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 세포사멸 억제 효과**
- [0104] 척수 외상 후 손상부위에서 시작되어 지속적으로 세포 사멸이 일어나게 되는데 뉴런과 회소돌기아교세포의 사멸이 기능 마비를 일으키는 중요한 요인으로 알려져 있다. 래트의 경우 척수 외상 후 1일째에는 뉴런의 아포토시스가 현저히 증가하고, 5-7일 사이에는 회소돌기아교세포의 사멸이 주되게 일어난다. 백지 추출물의 신경세포 사멸 억제 효과를 확인하기 위하여, 터넬(TUNEL) 염색을 수행하였다.
- [0105] 구체적으로, 터넬(Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling; TUNEL) 염색은 척수 신경 조직의 절편을

ApopTag peroxidase kit(Chemicon)를 이용하여 염색하였고, 페록시다제(peroxidase)를 위한 기질로 Diaminobenzidine(DAB) substrate kit(Vector Laboratories)을 사용하여 응축된 DNA를 특이적으로 염색하였다. 이 방법은 아포토시스 과정에서 특징적으로 염색체가 잘리는 현상이 나타나는데, 이렇게 잘려진 염색체 말단에 항체를 붙여 발색시켜, 아포토시스로 죽어가는 세포만을 염색할 수 있는 방법이다.

[0106] 그 결과, 1일과 5일의 척수 조직에서 터널 염색 양성 세포 수를 비교해 보았을 때, 백지 추출물 투여로 인하여 뉴런과 희소돌기아교세포의 사멸이 현저하게 억제되었음을 확인하였다(도 8).

[0107] 또한 아포토시스 과정에 중요한 역할을 하는 카스페아제-3의 활성이 백지 추출물에 의해 억제되는지를 알아보기 위하여, 척수 손상 후 5일째 되는 조직 절편을 얻어 카스페아제-3 면역염색 및 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0108] 그 결과, 백지 추출물에 의해 희소돌기아교세포 내 카스페아제-3 활성이 현저히 억제되는 것을 확인하였고(도 9c 및 9d), 웨스턴 블랏에서도 동일한 결과를 얻었다(도 9a 및 9b).

[0109] 따라서, 척수 손상 모델에서 백지 추출물에 의해 희소돌기아교세포의 사멸이 억제됨을 확인하였다.

[0110] <실험예 8> 척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 운동기능 회복 효과

[0111] 척수 손상 모델에 백지 추출물 투여 후 운동기능 회복 효과를 세 가지 행동 테스트를 이용하여 확인하였다.

[0112] <8-1> 비비비 오픈필드 스코어(BBB Open field score)

[0113] BBB 테스트는 운동기능을 조절하는 다양한 신경 다발의 회복정도를 복합적으로 평가할 수 있는 실험 방법으로서, 0부터 21까지 점수를 나누어 뒷다리를 전혀 사용하지 못하는 경우 0점, 정상 래트의 경우 21점을 주어 점수가 높아질수록 운동기능이 향상되었음을 나타내었다. 척수 외상을 가하기 3일 전부터 하루에 한번, 한 마리당 4분씩 가로 90 cm × 세로 90 cm × 높이 7 cm의 플라스틱 오픈 필드 상자에 래트를 올려놓고 상자 안에서 자유롭게 돌아다니도록 하여 실험 환경에 대한 사전 적응 훈련을 실시하였다. 척수 외상을 준 후 1일부터 일주일에 2회씩 5명의 훈련된 실험자들이 각 래트의 뒷다리 움직임을 관찰하여 BBB 점수를 매겼고, 이들 5명의 BBB 점수의 평균값을 해당 쥐의 최종 BBB점수로 결정하였다. 동물실험에 대한 개인의 편견을 배제하기 위하여 테스트에 임하는 실험자들은 각 래트에 대한 정보를 알지 못하게 하였고, 각 쥐에 대해 4분씩 관찰하여 점수를 내었다.

[0114] 그 결과, BBB 척수 외상을 받은 직후 모든 래트는 뒷다리의 움직임이 전혀 없이 앞다리에 의존하여 하반신을 끄는 현상을 나타내는 것을 확인하였다. 척수 외상 후 1주일이 지난 후부터 백지 추출물을 투여한 래트의 BBB 점수가 생리식염수만 투여한 대조군에 비하여 높게 나타나기 시작하였고, 척수 외상을 준지 35일 지난 후에 BBB 점수를 확인한 결과, 대조군 래트의 BBB 점수는 9.0 ± 1.0 로서 가만히 서 있을 때에만 몸무게를 지탱할 뿐, 걸을 때에는 계속 발 등으로 딛는 정도의 회복을 나타내었다. 한편, 백지 추출물을 투여한 래트의 BBB 점수는 11.8 ± 0.84 로 발바닥으로 몸무게를 지탱하여 걸으며 걷는 동안에 대략 50% 빈도로 앞다리와 뒷다리가 리듬 있게 교차하게 되는 회복수준을 보여 대조군과 비교할 때 현저한 운동기능 회복 효과를 나타내었다(도 10a).

[0115] <8-2> 경사면 테스트(Inclined plane test)

[0116] 균형 잡는 능력을 평가할 수 있는 경사면 테스트를 일주일에 한 번씩 4주 동안 시행하였다. 평가의 기준으로 경사진 판 위에 쥐를 경사면과 수직이 되도록 올려놓은 후 5초 동안 떨어지지 않고 버티는지를 테스트 한 후 각도를 5도씩 올리면서 최대한 균형을 잡고 견딜 수 있는 각도를 점수로 나타내었으며, 이 테스트는 각 래트가 어느 그룹에 속하는지 알지 못하는 2명의 실험자에 의하여 수행되었다.

[0117] 그 결과, 척수손상을 받지 않은 정상 래트의 경우 평균 80도 각도에서도 떨어지지 않고 몸을 지탱할 수 있는 반면, 척수 외상 후 1주일에는 대부분의 래트가 40도 정도의 점수를 나타내었다. 2주가 지나면서부터 백지 추출물을 투여한 래트는 생리식염수만을 투여한 추출물에 비하여 경사면에서 몸을 지지하는 능력이 더 높게 나타났으며 4주째에서는 대조군이 52.4 ± 4.8 점에 머무른 것에 비하여 백지 추출물을 투여한 래트는 60.1 ± 0.8 점 이상을 보여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(도 10b). 이러한 결과는 몸을 지지하는 데 관여하는 신경인 전정척수로(vestibulospinal tract)의 회복을 의미한다.

[0118] <8-3> 발자국분석(Foot print analysis)

[0119] 척수 외상 후 래트의 뒷다리 운동 기능 회복정도를 평가하는 또 하나의 기준으로서 5주째에 발자국 분석을 실시하였다. 래트의 앞다리에는 빨간색 잉크를 묻히고, 뒷다리에는 파란색 잉크를 묻혔으며, 하얀 종이가 바닥에 깔린 내부가 어두운 좁은 통로(길이 1 m, 너비 7 cm)로 지나가게 하면서 발자국을 내게 하였다. 만일 래트가 5초 이내 통로를 통과하지 못하거나 중간에 멈추면 그 때의 결과는 분석에서 제외하였으며, 한 동물당 8번의 테스트를 시행하였다. 앞발과의 조화, 간격, 뒷발의 회전정도 및 뒷발사이의 보폭, 양발 사이의 간격, 발가락의 끌림 등이 뒷다리의 기능을 측정하는 지표로서 사용되었다. 테스트 시작하기 5일 전부터 하루에 3번씩 통로를 지나가게 함으로써 실험 환경에 적응하게 하였다.

[0120] 그 결과, 도 10c 에서 나타낸 바와 같이, 일반적으로 척수신경 외상 이후, 래트는 뒷다리가 마비되어 뒷발을 바닥에 대며 제대로 걸음을 걷지 못하고, 발을 질질 끌고 다녔다. 손상 이후 5주째에 발자국 분석을 해 보았을 때 생리식염수만 투여한 래트는 서 있는 상태에서 발바닥을 땅에 딛고 몸을 지탱할 수는 있으나 걸을 때에는 다리가 몸을 지탱하지 못하여 발등으로 걷기 때문에 개별적인 발자국이 찍히지 않고 지속적으로 긴 끌림 현상이 나타남을 볼 수 있다. 한편, 백지 추출물을 투여한 래트는 이 회복 정도가 훨씬 향상되어 약간의 발가락 끌림 현상은 있으나 주로 발바닥으로 걸음을 걸을 수 있을 정도로 회복되어 뒷발의 발자국이 종이에 찍히게 되었으며 발가락의 끌림으로 인해 뒷발 발자국 뒤로 짧게 끌리는 현상이 나타났다. 이러한 결과는 몸의 균형을 유지하고 리듬감 있는 운동을 관장하는 척색척수로(rubrospinal tract)의 회복을 의미한다.

[0121] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 제시한다.

[0122] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0123] 1. 산제의 제조

[0124]	백지 추출물	2 g
[0125]	유당	1 g
[0126]	상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.	

[0127] 2. 정제의 제조

[0128]	백지 추출물	100 mg
[0129]	옥수수전분	100 mg
[0130]	유 당	100 mg
[0131]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0132]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.	

[0133] 3. 캡슐제의 제조

[0134]	백지 추출물	100 mg
[0135]	옥수수전분	100 mg
[0136]	유 당	100 mg
[0137]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0138] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0139] 4. 환의 제조

[0140] 백지 추출물 1 g

[0141] 유당 1.5 g

[0142] 글리세린 1 g

[0143] 자일리톨 0.5 g

[0144] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0145] 5. 과립의 제조

[0146] 백지 추출물 150 mg

[0147] 대두 추출물 50 mg

[0148] 포도당 200 mg

[0149] 전분 600 mg

[0150] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[0151] <제조예 2> 식품의 제조

[0152] 본 발명의 백지 추출물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0153] 1. 밀가루 식품의 제조

[0154] 본 발명의 백지 추출물을 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0155] 2. 유제품(dairy products)의 제조

[0156] 본 발명의 백지 추출물을 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0157] <제조예 3> 음료의 제조

[0158] 본 발명의 백지 추출물 1000 mg

[0159] 구연산 1000 mg

[0160] 올리고당 100 g

[0161] 매실농축액 2 g

[0162] 타우린 1 g

[0163] 정제수를 가하여 전체 900 ml

[0164] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어

진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강식품 제조에 사용한다.

- [0165] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

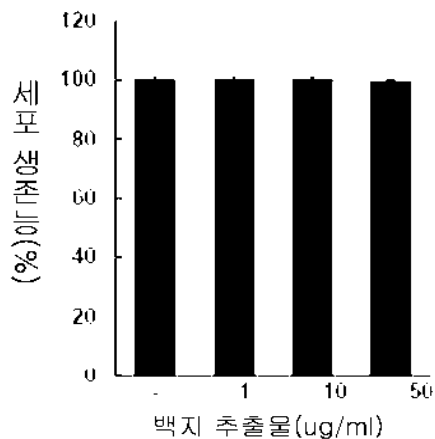
산업상 이용가능성

- [0166] 본 발명의 백지 추출물은 세포 독성이 거의 없는 비독성 천연 유래물질로, 척수 손상 예방 및 치료제 또는 건강식품, 중추신경계 염증성 질환 예방 및 치료제 또는 건강식품의 유효성분으로 안전하게 이용될 수 있으며, 치료제로 개발시 척수 손상 후 진행되는 이차적 손상을 억제시키고, 신체 기능 마비의 범위를 감소시켜 환자의 삶의 질을 향상시키며, 지속적으로 부담되는 환자의 막대한 치료비를 절감시킬 수 있을 뿐 아니라, 신약개발로 인한 막대한 수익을 기대할 수 있다.

도면

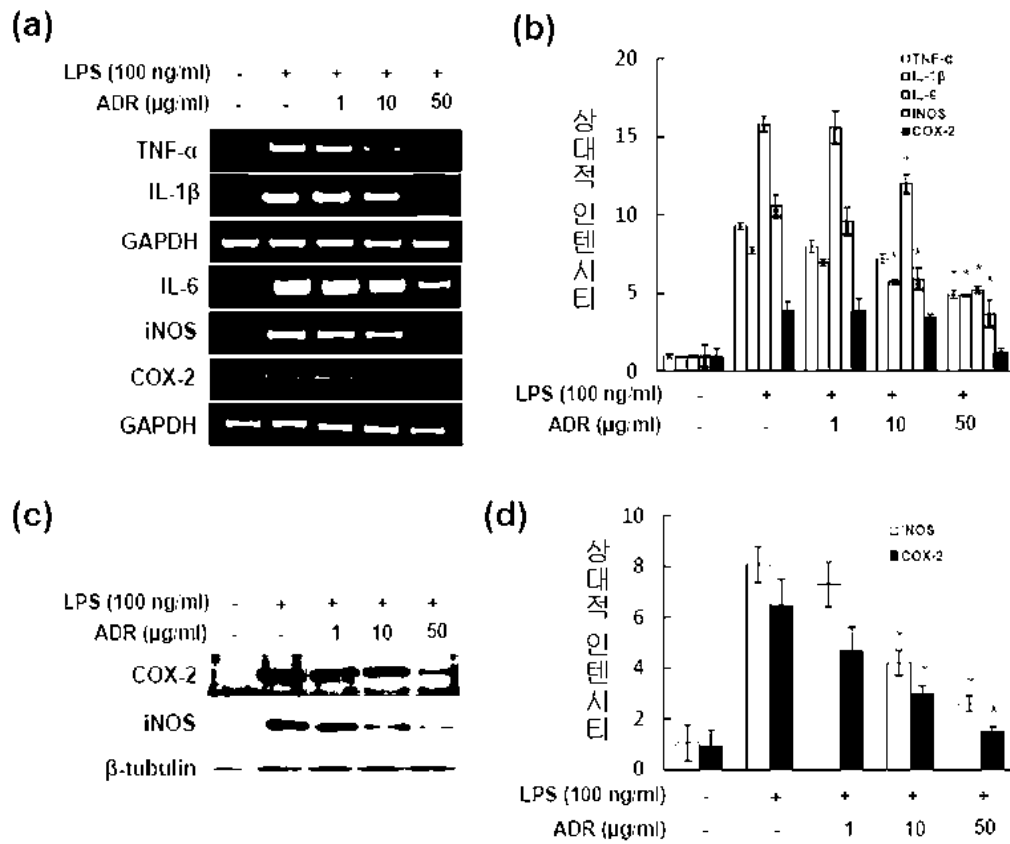
도면1

BV-2 세포에서 세포사멸 측정



도면2

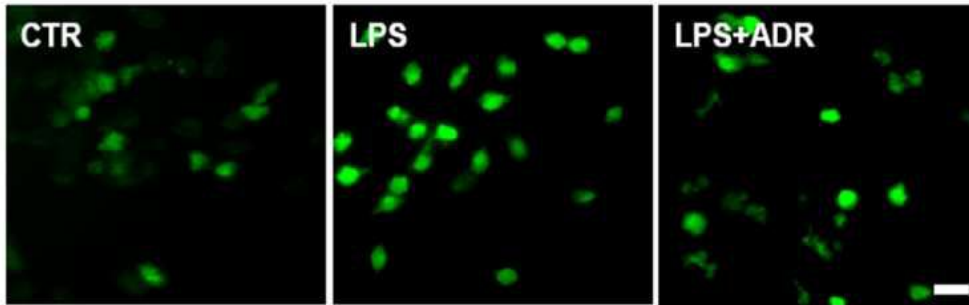
BV-2 소교세포에서 백지 추출물의 항염증 효과



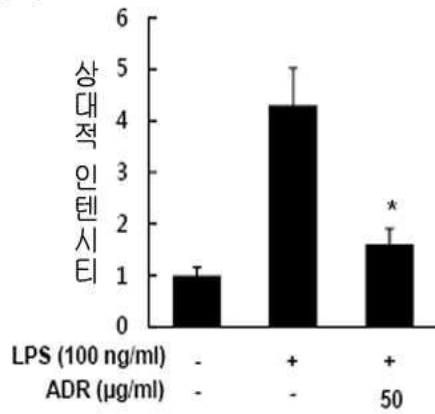
도면3

BV-2 소교세포에서 백지 추출물의 항산화 효과

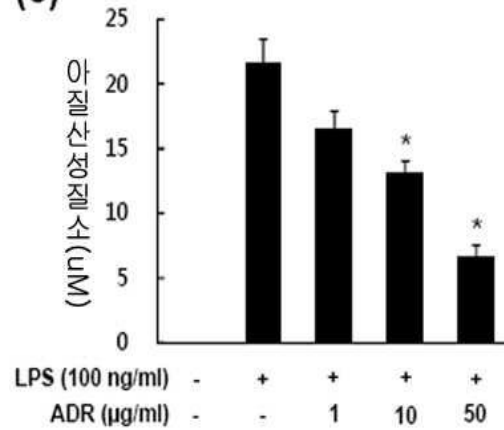
(a)



(b)



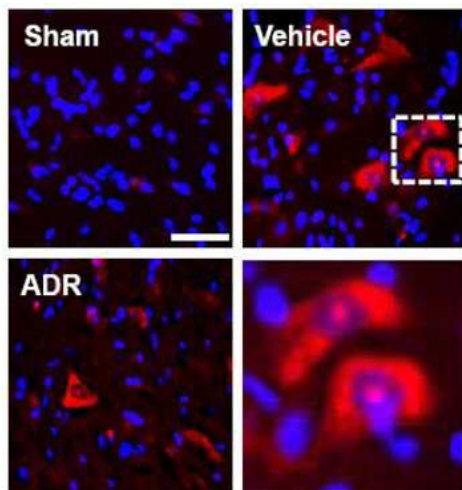
(c)



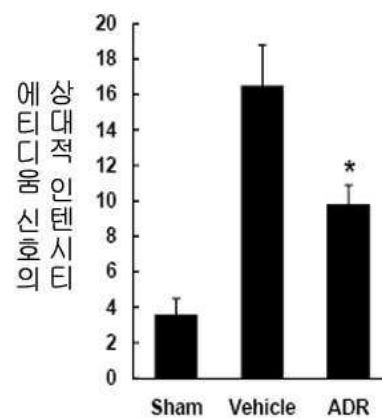
도면4

척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 활성산소 억제 효과

(a)



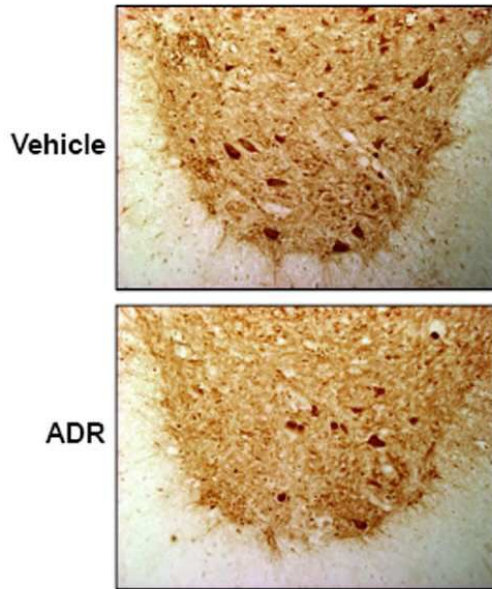
(b)



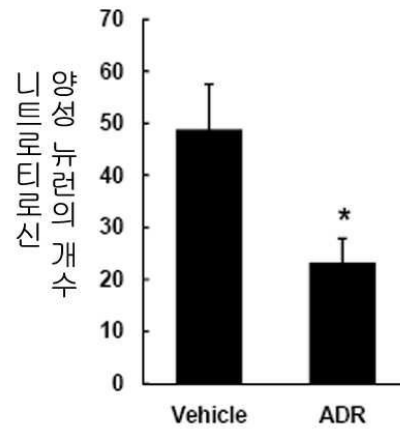
도면5

척수 손상 동물 모델에서
백지 추출물의 단백질 산화 억제 효과

(a)

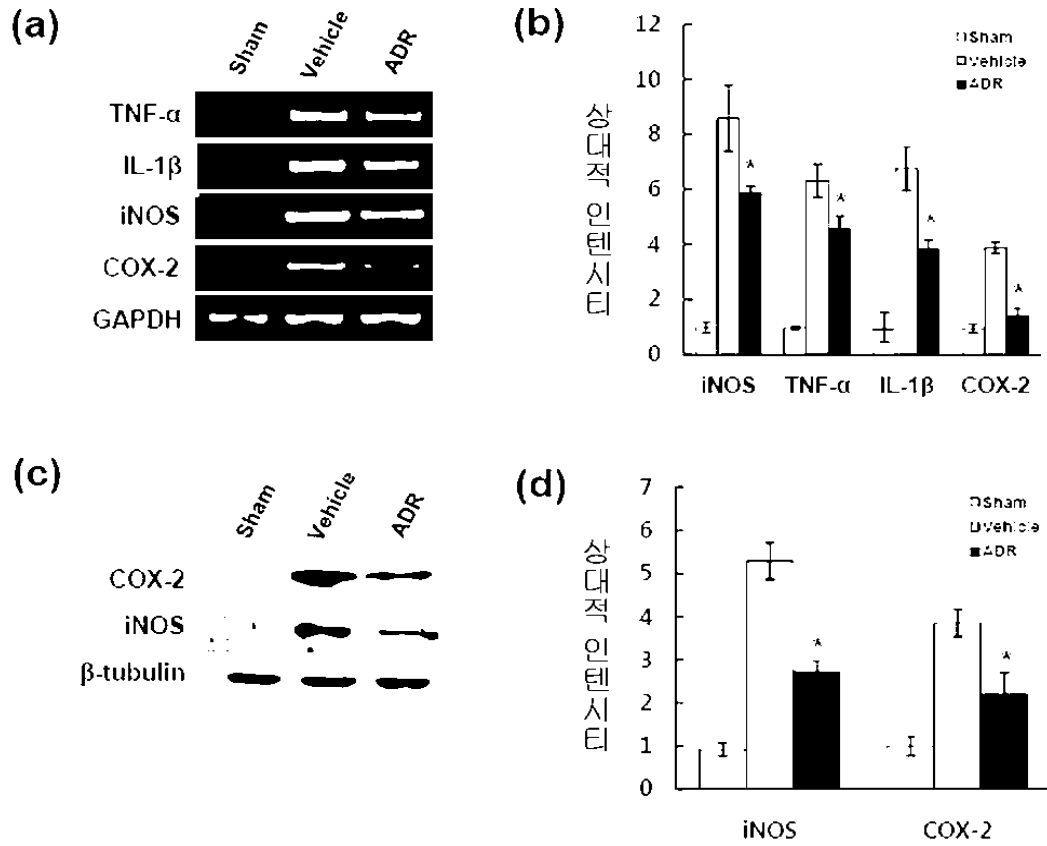


(b)



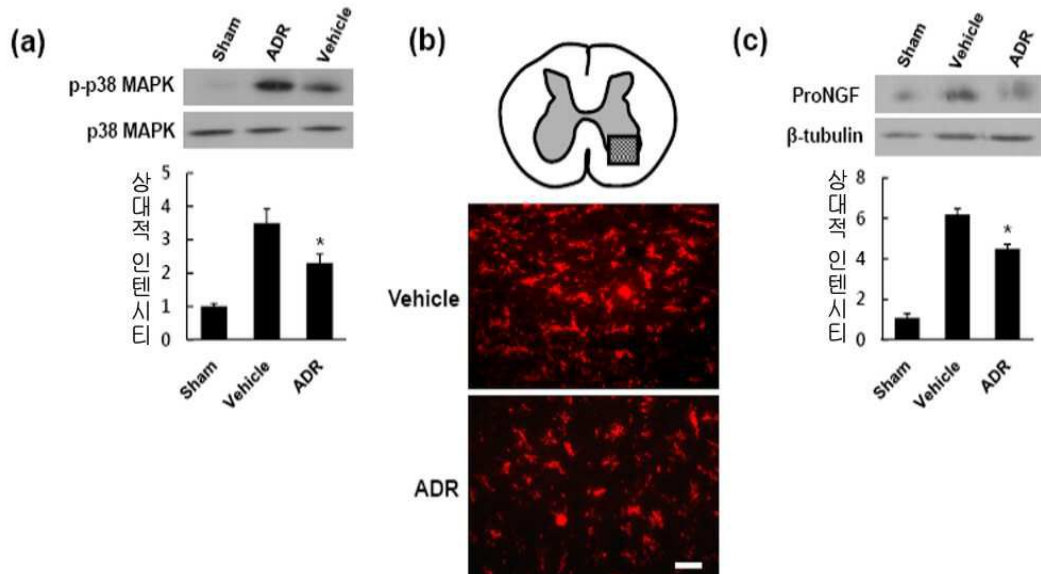
도면6

척수 손상 동물 모델에서
백지 추출물의 항염증 효과



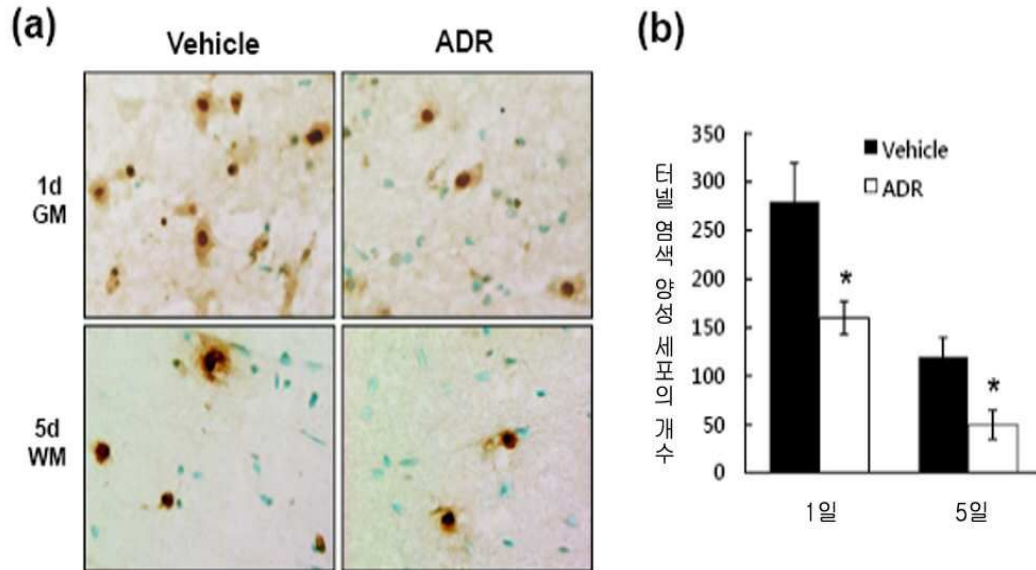
도면7

척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 소교세포 억제 효과



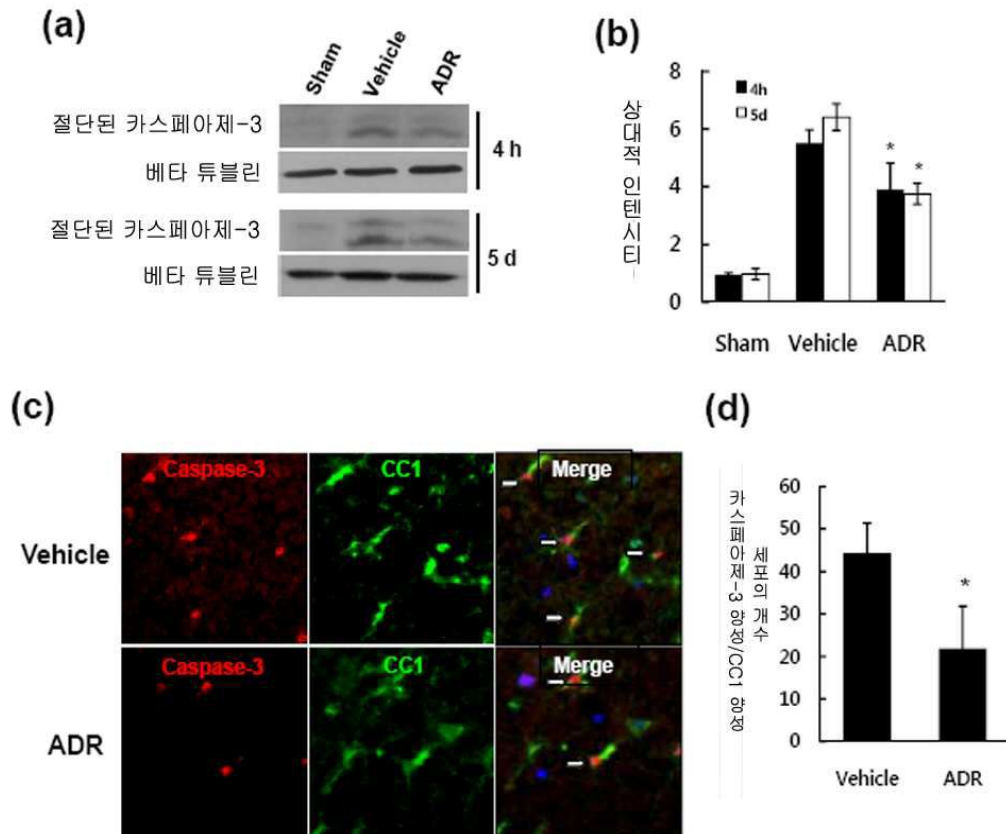
도면8

척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 세포사멸 억제 효과



도면9

척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 카스페아제-3 활성 억제 효과



도면10

척수 손상 동물 모델에서 백지 추출물의 운동기능 증진 효과

