(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0142933
(43) 공개일자 2023년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 35/747 (2015.01) *A61K 36/40* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0041585
(22) 출원일자 2022년04월04일
심사청구일자 2022년04월04일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
허호진
경상남도 진주시 초장로 120, 504동 501호
이효림
경상남도 진주시 진주대로500번길 28, 301호
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 12 항

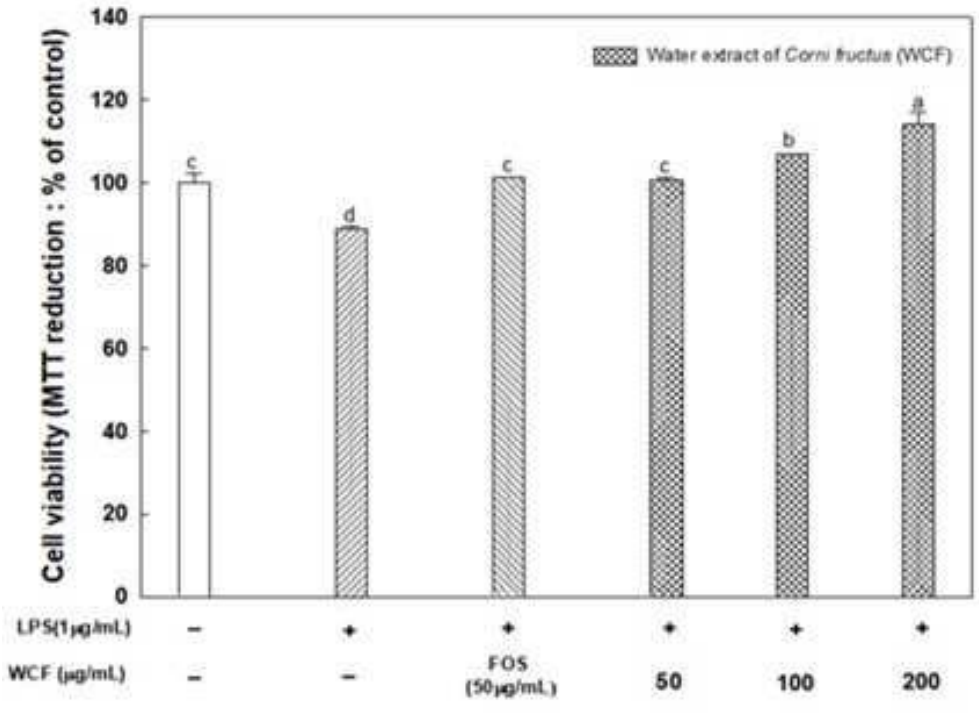
(54) 발명의 명칭 **산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 환자의 인지기능 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 신경세포 및 뇌 해마세포에서의 신경독성에 대한 산수유 추출물의 보호 효과를 확인하고, 덱스트란황산나트륨(dextran sulfate sodium, DSS)로 유도된 대장염 마우스에서 인지기능 장애에 대한 산수유 추출물과 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)의 조합이 가지

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1a



는 개선 효과에 관한 것으로, 본 발명의 산수유 추출물과 락토바실러스 루테리 및 이들의 조합(synbiotics)은 DSS로 유도된 대장염으로 인한 뇌의 산화적스트레스 및 콜린성 시스템 붕괴를 개선하고, 뇌 신경세포의 손상을 유발하는 p-tau와 amyloid β 단백질 발현량 및 세포사멸 관련 단백질을 억제함으로써 마우스의 인지장애를 개선하였다. 또한, 장내 미생물의 불균형을 개선하고 인지기능과 관련된 미생물의 풍부도를 증가시켰다. 따라서 산수유 추출물과 락토바실러스 루테리 및 이들의 조합은 대장염으로 인한 인지 손상에 대한 건강기능식품 소재로써 활용될 가능성이 있다.

(52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A61K 36/40 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A23V 2400/173 (2023.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345282522
과제번호	2018R1D1A3B07043398
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	(초)미세먼지 유도성 염증 발생과 뇌신경세포 기능저하와의 연계기전 및 개선 기작 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 염증성 장질환 환자를 대상으로 하는 것인, 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)를 더 포함하는 것인, 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포 보호 효과 및 세포 내 활성산소를 감소시키는 것인, 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 손상된 공간인지능력, 손상된 단기학습 및 손상된 기억력을 개선시키는 것인, 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 지질과산화물(MDA) 함량을 감소시키고, 초과산화물 제거효소(SOD) 수준을 증가시키는 것인, 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 아세틸콜린(ACh) 함량을 증가시키고, 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성을 감소시키는 것인, 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 p-tau 및 아밀로이드 베타(Aβ) 수준을 감소시키는 것인, 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포자멸사(apoptosis)를 억제시키는 것인, 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 조성물은 염증성 장질환 환자를 대상으로 하는 것인, 퇴행성 뇌 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 조성물은 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)를 더 포함하는 것인, 퇴행성 뇌 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 산수유(*Corni fructus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 환자의 인지기능 개선용 조성물에 관한 것으로, 이는 건강기능식품 또는 약학 조성물에 이용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)과 크론병(Chron's disease, CD)을 포함한 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)은 장에 염증을 일으키는 만성적인 질환으로 복통, 대변 출혈, 묽은 변, 체중 감소 등을 특징으로 하며 전 세계적으로 발병률이 증가하고 있다. IBD는 장의 염증뿐만 아니라 뇌 장애의 발달에도 영향을 줄 수 있으며, 실제로, IBD 환자들 중 일부 환자들에게서 종종 경미한 행동 및 인지장애를 나타낸다고 보고하고 있다.

[0003] 뇌와 장의 관계는 복잡한 신경계로 연결되어있는데, 장 염증으로 인한 염증/신경 활성 물질들은 장 점막을 관통하고 혈액을 통해 운반되어 혈액뇌장벽(blood brain barrier, BBB)을 통과하여 중추신경계에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 염증으로 인한 장 투과성 증가는 병원균 및 독소들의 침입을 증가시켜 조직의 손상을 불러일으키는데, 이때 산화 촉진 마커의 과잉 생산 및 염증 촉진 매개체들의 상향 조절은 전신 순환을 통해 뇌에 도달하여 신경세포의 항상성에 영향을 줄 수 있다. 특히, TNF-α와 IL-6와 같은 염증성 사이토카인은 혈액뇌장벽을 투과하고 뉴런의 손상을 촉진하여 파킨슨병, 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 다발성 경화증과 같은 여러 퇴행성 뇌 신경질환의 기초가 된다.

[0004] 손상된 장으로부터 비롯된 장내 균총의 불균형은 장과 뇌의 양방향 통신 시스템을 통하여 뇌 발달에 영향을 미친다고 알려져 있다. 또한, 지금까지 보고된 연구들에 의하면 장내 균총의 불균형과 AD 사이의 밀접한 관계가 있음을 보여준다. AD는 치매의 가장 흔한 유형으로서, 뇌 신경세포가 손상돼 기억력 감퇴와 인지기능 장애로 이어지는 퇴행성 뇌 신경질환이다. AD는 정확한 발병 원인이 아직 밝혀지지 않았으며, amyloid β 플라크 축적, tau 침착, 신경 변성, 염증, 혈관조절 장애, 시냅스 기능장애 등의 병리학적 증상들을 동반하여 인지기능 결핍과 기억장애로 이어진다. 장내 미생물 불균형은 아밀로이드와 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)의 분비를 초래하여 위장 투과성과 BBB 투과성을 증가시킨다고 보고된다. 이에 따라, 염증 신호전달 경로 활성화는 뇌신경염증, 뇌신경 손상을 촉진하고 궁극적으로 AD에서 뇌신경세포의 사멸로 이어진다.

[0005] IBD 환자는 장내 균총의 불균형을 일으켜 AD의 병리 형성에 기여할 수 있기 때문에, 프리바이오틱(prebiotics) 및 프로바이오틱(probiotics)의 섭취를 통해 유익한 종의 정량적 수준을 증가시키고 숙주의 면역기능을 강화하여 AD의 예방적인 수단으로 작용될 수 있다. 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*; *L. reuteri*)는 위장관에 존재하는 혐기성 유산균의 일종으로 유기산과 항균 화합물로 알려진 류테린(reuterin)을 생성하여 장내 병원균의 증식을 억제한다고 알려져 있다. 또한, *L. reuteri*는 감마-아미노부티르산(GABA)과 같은 억제성 신경전달 물질을 생산할 수 있어 뇌세포 대사적 균형 유도하여 신경안정 작용, 스트레스 해소, 기억력 증진 등에 효과가 있다고 보고된다. 산수유 열매(*Corni fructus*)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽활엽소교목인 산수유나무의 성숙한 과실을 건조한 것으로 약용 소재로써 사용되며, 식이섬유와 비타민 유기산 성분이 다량 함유되어 있어 신장 건강, 피부미용, 비만 및 당뇨 개선 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0006] 본 연구에서는 산수유와 락토바실러스 루테리의 synbiotic 효과를 확인하고자 하였으며, LPS로 유도된 신경세포

와 해마세포 및 대식세포의 손상 및 덱스트란황산나트륨(dextran sulfate sodium, DSS)으로 유도된 대장염으로 인한 인지장애 동물 모델에서 산수유 물 추출물이 가지는 인지기능 개선 효과를 평가하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 10-2020-0054870

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 환자의 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 환자의 퇴행성 뇌 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 염증성 장질환 환자를 대상으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)를 더 포함하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 세포 보호 효과 및 세포 내 활성산소를 감소시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 손상된 공간인지능력, 손상된 단기학습 및 손상된 기억력을 개선시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 지질과산화물(MDA) 함량을 감소시키고, 초과산화물 제거효소(SOD) 수준을 증가시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 아세틸콜린(ACh) 함량을 증가시키고, 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성을 감소시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 p-tau 및 아밀로이드 베타(Aβ) 수준을 감소시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 세포자멸사(apoptosis)를 억제시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 이어서, 본 발명은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 염증성 장질환 환자를 대상으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)를 더 포함하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 신경세포 및 뇌 해마세포에서의 신경독성에 대한 산

수유 추출물의 보호 효과를 확인하고, 덱스트란황산나트륨(dextran sulfate sodium, DSS)로 유도된 대장염 마우스에서 인지기능 장애에 대한 산수유 추출물과 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)의 조합이 가지는 개선 효과에 관한 것으로, 본 발명의 산수유 추출물과 락토바실러스 루테리 및 이들의 조합(synbiotics)은 DSS로 유도된 대장염으로 인한 뇌의 산화적스트레스 및 콜린성 시스템 붕괴를 개선하고, 뇌 신경세포의 손상을 유발하는 p-tau와 amyloid β 단백질 발현량 및 세포사멸 관련 단백질을 억제함으로써 마우스의 인지장애를 개선하였다. 또한, 장내 미생물의 불균형을 개선하고 인지기능과 관련된 미생물의 풍부도를 증가시켰다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, LPS로 유도된 PC12 세포에서 산수유 물 추출물(WCF)이 세포 생존율(a) 및 세포 내 활성 산소 종 생산(b)에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, LPS로 유도된 HT22 세포에서 산수유 물 추출물(WCF)이 세포 생존율(a) 및 세포 내 활성산소 생성(b)에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, DSS 유도 마우스의 학습 및 기억 장애에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 효과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, PRE, PRO 및 SYN가 DSS로 유도된 마우스의 뇌 조직에서 항산화 시스템에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 마우스의 뇌 조직에서 콜린성 시스템의 조절을 통한 DSS 유도 마우스의 인지장애에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 효과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, PRE, PRO 및 SYN이 마우스의 뇌 조직에서 타우 과인산화 및 아밀로이드 β(Aβ) 생성 억제를 통한 DSS 유도 마우스의 인지장애에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 마우스의 뇌 조직에서 세포 사멸 경로의 조절을 통한 DSS 유도 마우스의 인지기능 장애에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 효과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, DSS로 유도된 마우스의 대변에서 장내 미생물군집에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 효과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 산수유 물 추출물(WCF)의 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0025] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0028] 일 측면에서, 본 발명은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 환자의 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 산수유로부터 추출한 것이며,

예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 산수유로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다.

[0030] 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0031] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 산수유를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0032] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨,소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0033] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0034] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제,캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 "건강기능식품 조성물"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제,

결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0036] 일 측면에서, 본 발명은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 환자의 퇴행성 뇌 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0037] 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 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0040] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01 ~ 5,000 ㎍/ml의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 ㎍/ml 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 ㎍/ml를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.

[0043] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0044] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/ 또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0045] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.

[0046] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0050] **<재료 및 실험방법>**

[0051] **<준비예 1> 재료 및 추출물의 제조**

[0052] 본 실험에 사용된 산수유 열매(*Corni fructus*)는 전남 구례군에서 재배되어 50℃에서 열풍 건조된 제품을 2020년 7월 22일에 구입하여 분말화하여 사용하였다. 산수유 20 g과 증류수 1 L를 혼합하여 40℃에서 2시간 동안 환류 냉각장치를 이용하여 추출하였고, 이 추출물을 No. 2 여과지(Whatman Inc, Kent, UK)를 통해 여과하였다. 추출된 산수유 물 추출물은 진공농축 후 동결건조하였다. 산수유 물 추출물의 수율은 49.61%로 나타났으며, -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

[0054] **<준비예 2> probiotic 균주 배양조건**

[0055] 실험에 사용된 유산균 균주는 성인의 대변 유래의 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) KCTC 3594를 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Jeongeup, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 균주는 MRS-agar에 도말하여 생성된 단일 colony를 MRS 액체 배지에 접종하였고, 37℃에서 48시간 배양하였다.

[0057] **<준비예 3> 세포배양**

[0058] 신경세포인 PC12 세포와, 뇌 해마세포인 HT22 세포는 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였으며, PC12 세포는 10% 소태아 혈청, 50 units/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였으며, HT22 세포는 10% 송아지 혈청, 50 units/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포배양은 37℃, 5% CO_2 조건을 유지하며 배양하였다.

[0060] **<준비예 4> 세포 보호효과 및 산화 스트레스 함량 측정**

[0061] LPS로 유도된 PC12와 HT22 세포사멸에 대한 산수유 물 추출물(WCF)의 세포 생존율을 측정하기 위하여, MTT reduction assay를 실시하였다. 세포를 96 well plate에 1×10^4/well로 분주하여 하루 동안 성장시켰다. 산수유 물 추출물(WCF) 5, 10, 20 μg/mL 농도와 양성대조군으로 사용된 fructo-oligosaccharide(FOS) 50 μg/mL 농도로 처리한 뒤 30분 후에 LPS를 증류수에 희석하여 1 μg/mL 농도로 만든 후 24시간 동안 세포를 전처리하였다. 배양 후 MTT stock 용액(5 mg/mL) 10 μL을 처리하여 37℃에서 3시간 동안 배양시키고 배양물을 제거한 뒤 DMSO를 첨가하여 반응을 종결시켜 570 nm(determination wave)와 690 nm(reference wave)에서 microplate reader(Epoch 2, BioTek Instruments, Inc.)로 측정하였다.

[0062] 세포 내 ROS 함량을 측정은 dichlorofluorescin diacetate(DCF-DA) 방법에 의하여 측정하였다. DCF-DA assay는 DCF-DA 시약이 세포 내로 들어가면, oxygen radical에 의해 산화되어 DCF로 탈 아세틸화되면서 형광을 발생하는 물질로 전환되는데, 이를 측정함으로써 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성 정도를 파악할 수 있다. Black 96 well plate에 전처리된 세포는 50 μM DCF-DA 용액을 혼합하여, 37℃에서 50분 동안 배양하였다. 이후, 배양액을 제거하고 멸균된 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS) 100 μL를 첨가하였다. 이후 형광 마이크로플레이트 판독기(Infinite 200, Tecan Co., SanJose, CA, USA)를 사용하여 들뜸 파장(excitation filter, 485 nm) 및 방출 파장(emission filter, 535 nm)에서 형광강도를 측정하였다.

[0064] **<준비예 5> 대장염 동물 모델 디자인**

[0065] 본 연구에 사용된 C57BL/6(male, 6 weeks) 마우스는 Samtako(Osan, Korea)로부터 구입하여 사용하였으며 경상대학교 동물실험 윤리위원회(IACUC 승인번호: GNU-210216-M0020)의 승인하에 수행되었고, 온도 22±2° C, 상대습도 50±5%를 유지하는 환경에서 사육되었다. 마우스는 반입 후 1주일 동안 적응 기간을 거친 후, 정상 대조군(CON), DSS 처리군(DSS), DSS+WCF 처리군(PRE), DSS+*L. reuteri* 처리군(PRO), DSS+WCF+*L. reuteri* 처리군(SYN)으로 무작위로 나누어 샘플을 3주간 식이하고 DSS를 6일간 멸균된 식수에 녹여 공급하였다.

[0066] WCF는 300 mg/kg of body weight으로 PBS에 녹여 마우스에 공급하였으며, *L. reuteri*는 MRS 배지에서 37℃에서 24시간 배양한 것을 13,000×g에 원심분리한 후 PBS로 두 번 워싱하고, 660 nm 흡광도(Epoch 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)에서 1×109/CFU/mL로 희석하였다. 스톡 용액을 -80℃에서 보관 후 실험에 사용하였으며, 실험 동물에게 하루 200 μL를 식이하였다.

[0068] **<준비예 6> 행동 실험**

[0069] **6-1. Y-미로 실험(Y-maze test)**

[0070] Y-미로 실험은 마우스의 자발적인 교대 행동 능력을 평가하는 실험으로 공간인지능력을 평가하는데 주로 사용되는 실험방법이다. 검은 플라스틱 재질로 이루어진 3개의 arm이 Y자 형태로 구성된 것을 사용하여 실험동물을 놓고 8분 동안 마우스의 이동 경로를 smart 3.0 video tracking system으로 기록하여 분석한다.

[0072] **6-2. 수동회피 실험(Passive avoidance test)**

[0073] 수동회피 실험은 마우스의 불쾌 자극에 대한 기억의 지속시간을 측정하기 위해 사용되며, 단기학습 기억력을 주로 평가하는 실험방법이다. 통로로 연결된 2개의 챔버로 이루어진 장치를 이용하여 1분간 적응시킨 뒤, 어두운 챔버로 들어가면 문을 닫고 전기충격을 3초간 가한다. 24시간 후 실험동물이 밝은 챔버에서 어두운 챔버로 들어가는데 걸리는 시간을 최대 300초까지 측정한다.

[0075] **<준비예 7> 뇌 조직에서 지질과산화물(malondialdehyde, MDA) 수준 측정**

[0076] 뇌 조직에 PBS를 넣고 균질화한 후 6,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리한다. 상층액에 1% 인산과 0.67% 타이오바비투르산를 넣고 혼합한 다음 95℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응 종료 후 원심분리하여 상층액을 532 nm에서 흡광도(Epoch 2, BioTek Instruments, Inc.,)를 측정한다.

[0078] **<준비예 8> 뇌 조직에서 초과산화물 제거효소(superoxide dismutase, SOD) 활성 측정**

[0079] PBS로 균질화한 뇌 조직을 400×g에서 10분간 원심분리하고 얻은 펠릿을 세포 추출 용액으로 4℃에서 30분간 추출한 후, 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 SOD 분석 키트(Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA)를 사용하여 분석하였다.

[0081] **<준비예 9> 뇌 조직에서 콜린성 시스템(cholinergic system) 평가**

[0082] 아세틸콜린(acetylcholine, ACh) 함량은 뇌 조직에 PBS를 넣고 균질화한 뒤 원심분리하여 상등액에 알칼리성의 하이드록실아민 시약을 첨가하여 1분 동안 상온에서 방치한 후 혼합액에 0.5 N 염산과 0.37 M 염화철(Ⅲ)을 첨가한 후 540 nm 파장에서 흡광도(Epoch 2, BioTek Instruments, Inc.)를 측정하였다.

[0083] 아세틸콜린 분해효소(acetylcholinesterase, AChE) 활성은 균질화한 뇌의 상등액에 50 mM 인산나트륨 완충액을 넣고 37℃에서 15분 동안 반응시킨 후 기질 용액을 첨가하여 10분 동안 반응시키고 405 nm 파장에서 10분 동안 흡광도(Epoch 2, BioTek Instruments, Inc.,)를 측정하였다.

[0085] **<준비예 10> 뇌 조직에서의 western blot assay**

[0086] 뇌 조직을 이용하여 콜린성 시스템, 아밀로이드 베타 경로 단백질과 세포사멸에 관여하는 단백질의 발현을 측정하였다. 적출된 조직들은 1% protease inhibitor가 첨가된 cell/tissue lysis buffer를 이용해 단백질을 추출하였다. 단백질 추출액은 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 이는 bradford법을 이용하여 단백질 상대 정량하였다. 샘플링이 끝나면 SDS-PAGE에 전기영동한 후에, polyvinylidene difluoride 막(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 옮겨졌으며, 다른 단백질의 혼입을 막기 위해 5% 탈지유로 1시간 동안 blocking 하였다. 그런 다음 1차 항체를 12시간 동안 배양시키고 0.1% tween 20이 함유된 트리스 완충 식염수(Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, TBST)에서 세척한 후, 2차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 배양한다. Western blot 이미지는 iBright imager(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 감지하며 발현 밀도는 이미지 감지 소프트웨어(image J, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 계산하였다.

[0088] **<준비예 11> NGS 분석**

[0089] 장내 미생물 분석을 위해 마우스의 대변에서 DNA를 추출하였으며, Qubit 3.0 Fluorometer(ThermoFisher, Waltham, MA, USA)를 이용하여 고품질의 DNA가 추출되었는지 확인하였다. 16S rRNA V3-V4 영역을 타겟으로 하는 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 증폭하였으며, 증폭하여 정량이 끝난 시료는 MiSeq(Illumina, CA, USA) 장비를 이용하여 시퀀싱을 수행하였다. Paired-end MiSeq Illumina reads(2x300 bp)는 QIIME2(version 2020.08)을 사용하여 처리되었으며, FastQC(version 0.11.8)을 사용하여 raw data의 품질을 확인하였다. 품질 검사 후 어댑터와 프라이머와 같은 인공 시퀀스 제거 및 노이즈 제거 작업을 수행한 뒤, library prep 과정에서 PCR 과정에서 끼어드는 chimeric sequence를 제거하여 고품질의 시퀀스를 얻었다. 이후 시퀀스 데이터는 Sliva 16S rRNA database를 사용하여 속(genus) 수준까지 분류되었다.

[0091] **<준비예 12> 생리활성물질 분석**

[0092] 산수유 물 추출물의 주요 생리활성물질은 고성능 액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC, Ultramate 3000 series, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 시료는 50%(v/v) 메탄올에 5 mg/mL 농도로 용해한 후 0.45 μm filter를 이용해 여과하여 분석에 사용하였다. 컬럼은 C_{18} column(100×2.1 mm, 3.5 μm, Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 이용하였고, 이동 용매는 0.1% formic acid가 함유된 증류수(a)와 0.1% formic acid가 함유된 acetonitrile(b)의 조성비를 10%(0~8 min), 10~40%(8~25 min), 40~60%(25~35 min), 60~100%(35~45 min)로 총 45분간 분석하였다. 시료의 주입량은 20 μL, 이동상의 유속은 1 mL/min이며 UV 검출 장치의 파장은 diodearray detector(DAD)로 254 nm에서 분석하였다. 검출파장에 대한 UV spectrum은 분석 파장을 저장하고 표준물질의 파장과 비교하여 유사성을 판단하였다. 검출된 생리활성물질의 정량분석을 위해 표준물질을 50, 100, 200, 500 μg/mL의 농도로 희석하여 시료와 같은 방법으로 분석하였고 크로마토그램에서 얻은 peak의 농도별 면적에 대해 검량곡선을 작성하여 검량선 대비 농도를 산출하였다.

[0094] **<준비예 13> 통계처리**

[0095] 모든 실험은 반복 실행하여 평균±표준편차로 나타내었고, 각 평균값은 SAS software(version 9.4, SAS institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, Ducan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 시료 간의 유의성을 5% 수준 내에서 검증하였다.

[0097] **<실시예 1> 세포 보호 효과 및 산화적스트레스 함량 측정**

[0098] 산수유 물 추출물(WCF)가 PC12 세포와 HT22 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정한 결과는 도 1a와 도 2a에 나타내었다. PC12의 경우, 대조군(100.00%)과 비교하였을 때, LPS 처리 군은 88.64%로 세포독성으로 인하여 비교적 낮은 세포 생존율을 나타냈다. 반면, WCF를 각각 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리하였을 때, 100.55%, 106.82%, 114.00%로, WCF 100, 200 μg/mL 농도에서 양성대조군인 FOS(101.17%)보다 유의적으로 높은 세포 생존율을 보여주었다. HT22 세포의 경우, 대조군(100.00%)과 비교하였

을 때, LPS 처리 군은 82.49%로 세포독성으로 인하여 비교적 낮은 세포 생존율을 나타냈다. 반면, WCF를 각각 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리하였을 때, 104.52%, 108.70%, 119.16%로, 양성대조군인 FOS(98.88%)보다 유의적으로 높은 세포 생존율을 보여주었다.

[0099] 또한, WCF가 LPS로 유도된 산화적스트레스에 미치는 영향을 확인한 결과는 도 1b와 도 2b에 나타냈다. PC12 세포의 경우, 대조군(100.00%)과 비교하였을 때, LPS 처리 군은 115.25%로 세포 내 활성산소(ROS)가 증가한 것을 볼 수 있었으며 FOS는 99.11%로 유의적으로 감소하는 경향은 보였으나, WCF가 처리된 세포에서는 각각 89.85%, 79.11%, 76.06%의 산화스트레스 발생 수준을 보였고, 대조군과 FOS군 보다, 산수유 물 추출물이 세포 내 ROS 함량을 유의적으로 더욱 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. HT22 세포의 경우, 대조군(100.00%)과 비교하였을 때, LPS 처리 군은 124.05%로 ROS 함량이 증가한 반면, WCF를 각각 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리하였을 때, 116.68%, 111.34%, 87.64%로, 양성대조군인 FOS(118.76%)보다 유의적으로 낮은 ROS 함량을 나타내었다.

[0101] **<실시예 2> DSS로 유도된 대장염 마우스에서 행동 실험에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0102] 마우스의 인지능력을 평가한 결과는 도 3에 나타내었다. 마우스가 8분 동안 Y자 미로의 각 팔에 들어간 총 횟수(평균 34.04회)는 모든 그룹에서 마우스의 행동 능력에 유의적으로 차이가 없었으며, 이는 마우스의 기본적인 행동 능력에 문제가 없음을 의미한다(도 3a). 하지만, DSS 군에서 31.55%로 CON 군(48.30%)과 비교하였을 때 약 16.75%의 손상된 공간인지능력을 보여주었다. 하지만 PRE, PRO 및 SYN 처리 군에서는 각각 39.40%, 50.71%, 54.32%로 DSS 처리 군보다 유의적으로 회복된 결과를 나타내었으며 PRE 군보다 PRO와 SYN 군에서 개선된 공간인지능력을 나타내었다(도 3b).

[0103] 단기학습 및 기억력의 평가를 위한 수동회피 실험의 결과는 도 3d와 3e에 나타내었다. 수동회피실험 첫째 날 모든 그룹에서 마우스가 밝은 챔버에서 어두운 챔버로 들어가는 시간에 유의적인 차이가 없었으나(평균 43.47 s)(도 3d), 어두운 챔버로 들어갔을 때 전기충격을 받은 뒤, 실험 둘째 날 DSS 군에서 58.90초로 CON 군(289.40 s)과 비교하여 손상된 단기학습 및 기억력을 보여주었고, 샘플 식이 군에서는 유의적으로 개선되는 경향을 보여주었다(PRE; 115.60 s, PRO; 144.95 s 및 SYN; 200.62 s)(도 3e).

[0105] **<실시예 3> DSS로 유도된 대장염 마우스의 뇌 조직의 산화적스트레스에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0106] 마우스의 뇌 조직에서 MDA 함량 및 SOD 수준 측정에 대한 결과는 도 4에 나타내었다. DSS 군에서 MDA 함량(1.09 nmole/mg of protein)은 CON 군(0.91 nmole/mg of protein)과 비교하였을 때 유의적으로 증가하였으나, PRE, PRO 및 SYN 군(각각 1.01 nmole/mg of protein, 0.98 nmole/mg of protein, 1.02 nmole/mg of protein)에서는 유의적으로 개선되었다(도 4a). SOD 수준은 CON 군(2.84 U/mg of protein)과 비교하였을 때, DSS 군(1.54 U/mg of protein)에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(도 4b). 하지만 PRE, PRO 및 SYN 군에서는 이를 유의적으로 증가시켰으며(각각 2.26 U/mg of protein, 2.02 U/mg of protein, 2.51 U/mg of protein), 특히 SYN 군에서 가장 높은 SOD 수준을 나타냈다.

[0108] **<실시예 4> DSS로 유도된 대장염 마우스의 뇌 조직의 콜린성 시스템에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0109] 마우스의 뇌 조직에서 신경전달물질인 ACh 함량과 AChE 활성, AChE과 choline acetyltransferas(ChAT) 단백질 발현량을 웨스턴 블롯팅한 결과는 도 5와 같다. ACh 함량 결과, DSS 군(1.32 mM/mg of protein)에서 CON 군(1.79 mM/mg of protein)과 비교하였을 때 약 1.36배 감소하였으며, PRE, PRO 및 SYN 군에서는 각각 1.73 mM/mg of protein, 1.83 mM/mg of protein, 1.89 mM/mg of protein로 유의적으로 증가하는 양상을 보였다(도 5a). AChE 활성 결과, CON 군(100.00%) 대비 DSS 군에서 138.88%로 증가하였고 PRE, PRO 및 SYN 군에서는 각각 109.94%, 110.20%, 99.94%로 DSS 유도로 증가한 AChE 활성을 감소시켰다(도 5b). 또한, 웨스턴블롯에서의 AChE 단백질 발현 결과(도 5c), CON 군 대비 DSS 군에서 약 1.67배 증가하였으며 도 5b의 결과와 마찬가지로, PRE, PRO 및 SYN 군에서 유의적으로 감소하는 경향을 보여주었다.

[0111] **<실시예 5> DSS로 유도된 대장염 마우스의 뇌 조직에서 tau 과인산화와 amyloid β(Aβ) 축적에 미치는 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0112] 마우스의 뇌 조직에서 AD의 병리학적 특성인 인산화된 tau와 Aβ의 단백질 발현량을 측정한 결과는 도 6와 같다. CON 군(1.00)과 비교하여, DSS 군은 p-tau와 Aβ의 단백질 발현량이 각각 1.45, 1.60으로 증가된 발현량을 보였다. 하지만 PRE, PRO 및 SYN 군에서는 p-tau 발현량은 각각 1.04, 1.17, 0.93으로 측정되었고, Aβ의 단백질 발현량은 각각 1.42, 1.24, 1.22로 측정되어, DSS 보다 감소되는 경향을 보였다.

[0114] **<실시예 6> DSS로 유도된 대장염 마우스의 뇌 조직에서 세포자멸사(apoptosis) 신호 경로에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0115] 마우스의 뇌 조직에서 apoptosis에 대한 샘플의 효과를 확인하기 위하여 관련 단백질 발현량을 측정한 결과는 도 7에 나타냈다. Bcl2는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax의 과발현이 이루어졌을 때는 apoptosis를 유발한다고 알려져 있으며, caspase 역시 apoptosis 유발에 직, 간접적으로 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다. Bcl2 결과, CON 군(1.00) 대비 DSS 군(0.42)에서 발현량의 감소를 나타냈고, Bax의 발현량 및 caspase 7 발현량은 각각 1.85, 1.34로 증가하였다. 하지만 PRE, PRO 및 SYN 군에서 이를 유의적으로 개선 시킴으로써 뇌 조직에서 apoptosis 신호 경로를 억제한 것으로 판단된다(각각 Bcl2; 0.54, 0.62, 0.60, Bax; 1.50, 1.05, 0.93, caspase 7; 1.12, 1.04, 1.08). 또한, Bax와 Bcl2의 비율 역시 CON 군(0.99) 대비 DSS 군에서 4.39로 증가하였지만, 샘플 식이 군에서는 감소하는 경향을 보여주었다(PRE; 2.77, PRO; 1.70, SYN; 1.55).

[0117] **<실시예 7> NGS 분석**

[0118] AD 환자에게서 장내 균총의 불균형 및 그의 대사산물인 단쇄지방산 함량의 감소가 관찰된다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 인지기능과 마우스의 장내 균총 사이의 상관성을 확인하기 위해, 마우스의 분변에서 NGS 분석하였다(도 8). 각 그룹 간의 장내 균총을 속(genus) 계통에서 분석하였다(도8a). DSS 군에서 단쇄지방산 생성균으로 알려진 *Lachnospiraceae* NK4A136 group(butyrate 생성균), *Akkermasia*(acetate와 propionate 생성균), *Anaerotruncus*(actetate 및 butyrate 생성균) 및 *Odoribacter* 속(butyrate 생성균)은 CON 군과 비교하여 낮은 수준을 보여주었다. 하지만, 산수유 물 추출물과 *L.reuteri*의 처리는 단쇄지방산 생성 균의 비율을 증가시켜 주었다. 특히, PRE 군에서 *Lachnospiraceae* NK4A136 group 속의 풍부도는 3.59%로, CON 군(2.89%)보다 더 증가시켰으며(도 8b), *Akkermasia* 속의 경우. SYN 군(2.22%)에서 CON 군(0.43%)보다 더 증가된 풍부도를 보여주었다(도 8c). *Anaerotruntus* 속은 PRO 군(0.81%)에서 가장 높은 풍부도를 보여주었다(도 8d). *Odoribacter* 속의 경우, PRE, PRO 및 SYN 군에서 각각 0.10%, 0.10%, 0.11%로, 샘플 그룹 간에는 유의적인 차이는 없었으나, DSS 군(0.04%) 보다 유의적으로 증가한 풍부도를 나타냈다(도 8e).

[0120] **<실시예 8> 생리활성물질 분석**

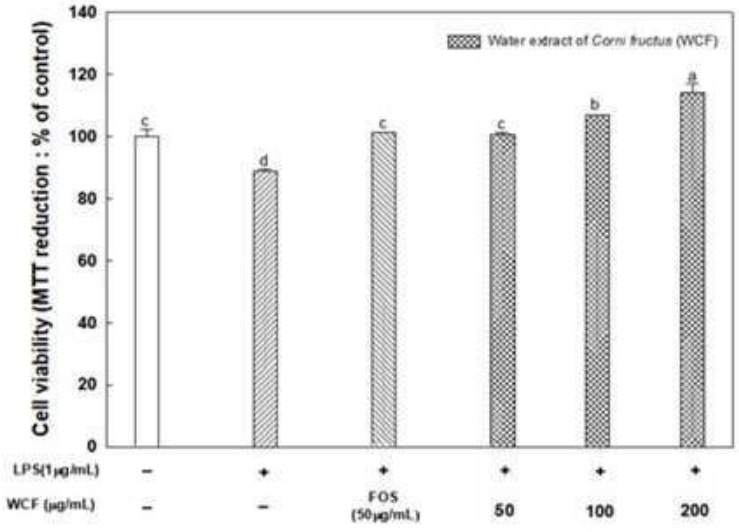
[0121] 인지기능 개선 효과를 가지는 것으로 판단되는 샘플의 주요 생리활성 물질 분석을 위해 산수유 물 추출물(WCF)에서 HPLC 분석을 수행하였으며, 그 결과는 도 9와 같다. HPLC 분석 결과 254 nm 파장에서 두 가지의 주요 peaks를 확인할 수 있었다. 첫 번째로, 8.017분에서 생성된 peak은 표준물질인 morroniside의 retention time (도 9a)과 UV-VIS spectrum을 비교하였을 때, 상동성(similarity)이 0.998로 morroniside 임을 확인하였다. 두 번째로, 13.887분에 나타난 peak은 표준물질의 retention time과 UV-VIS spectrum을 비교하였을 때 상동성이 0.999로 일치해 loganin으로 확인되었다(도 9b). WCF에 함유된 생리활성 물질인 morroniside과 loganin을 정량하기 위해 표준물질으로 검량곡선(morroniside, y=0.3473x+1.0111, R^2=0.9997; loganin, y=0.2384x+0.2951, R^2=1)을 그렸고, 표준물질의 검량선 대비 morroniside와 loganin의 함량은 각각 31.12 μg/mg of dried weight, 22.81 μg/mg of dried weight로 정량되었다.

[0123] 따라서, 상기 실시예들에 의해 본 발명의 산수유 추출물이 염증성 장질환 환자의 인지기능 개선용 건강기능식품 조성물 또는 염증성 장질환 환자의 퇴행성 뇌 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

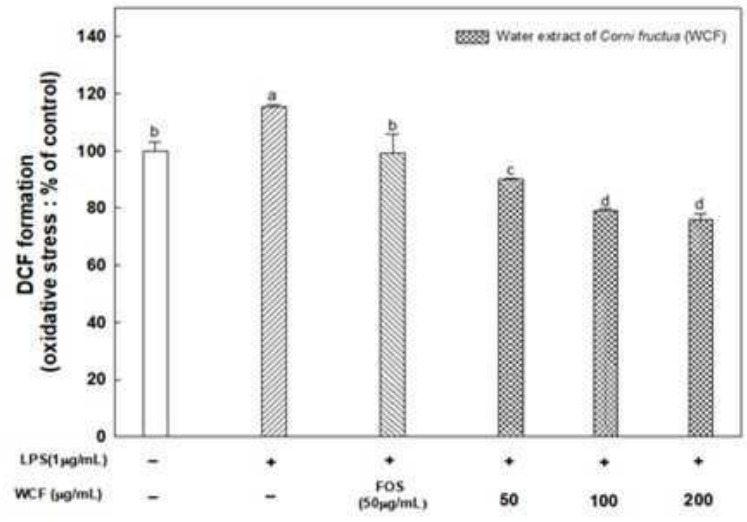
[0125] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 본 발명 분야의 통상의 기술자들은 동일한 기술적 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

도면

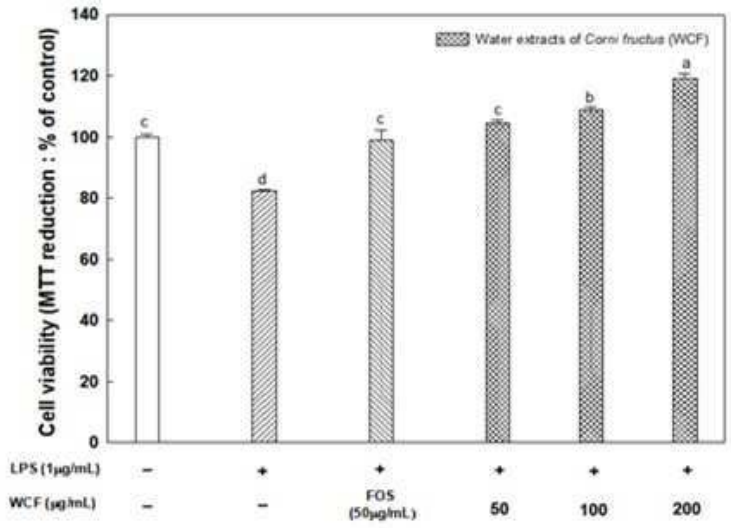
도면1a



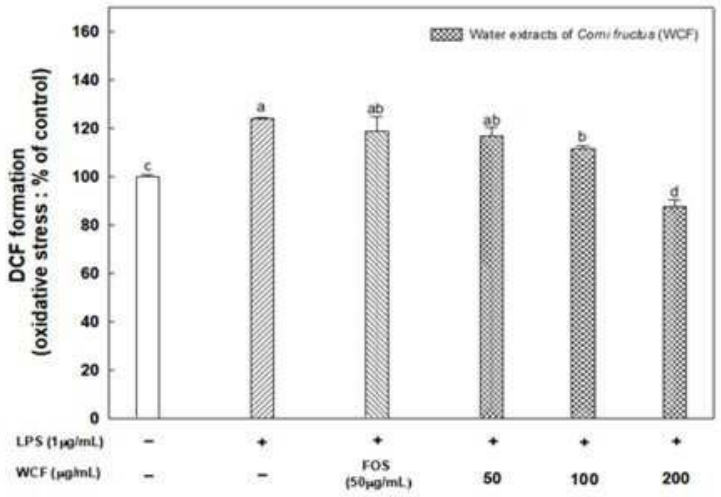
도면1b



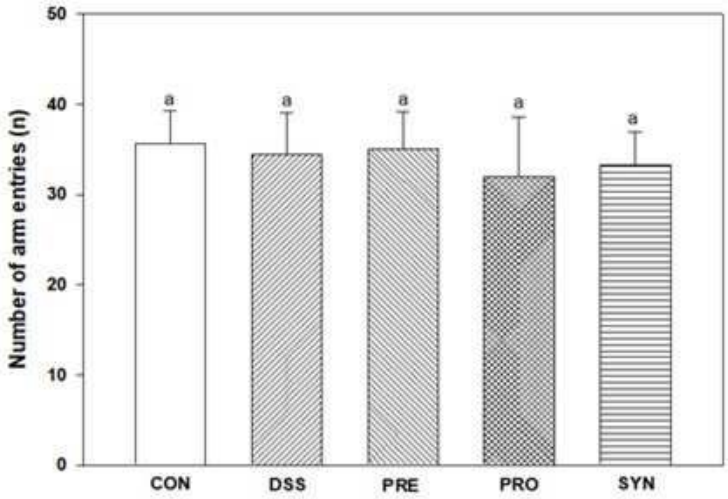
도면2a



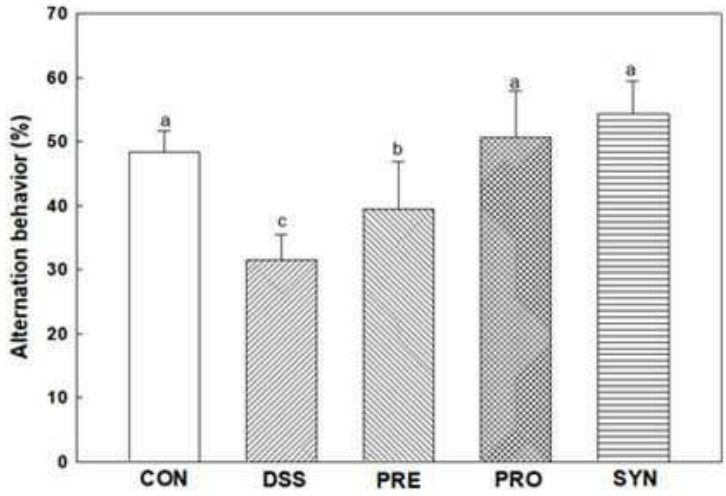
도면2b



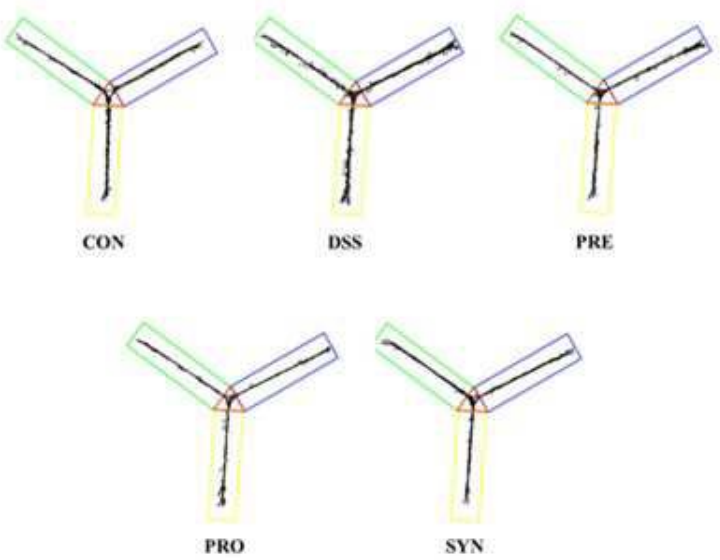
도면3a



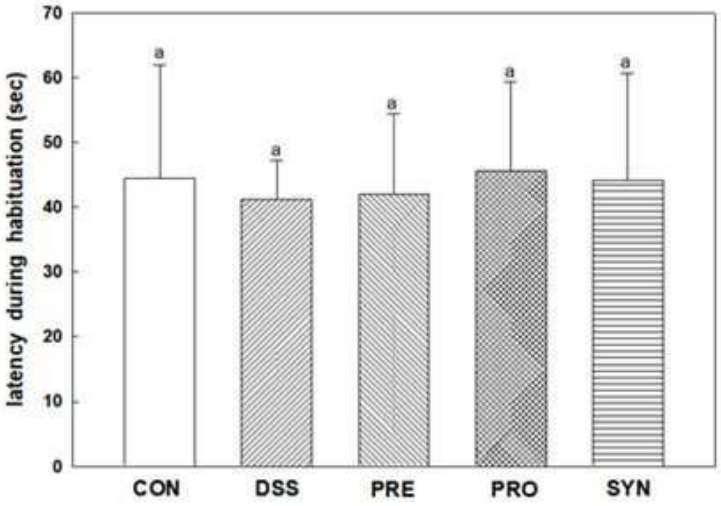
도면3b



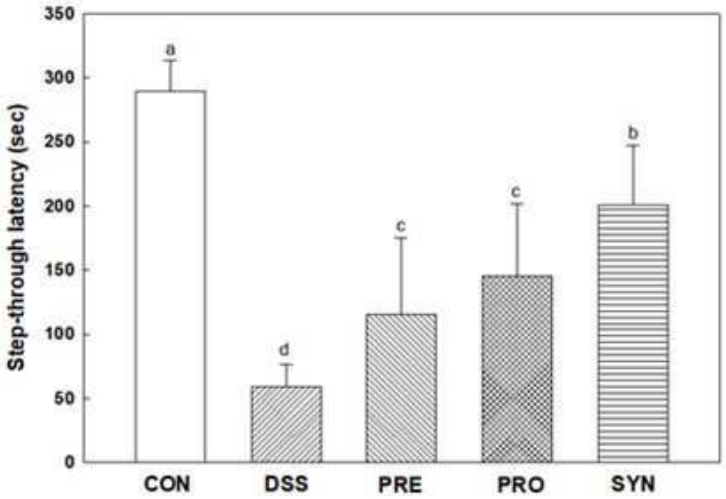
도면3c



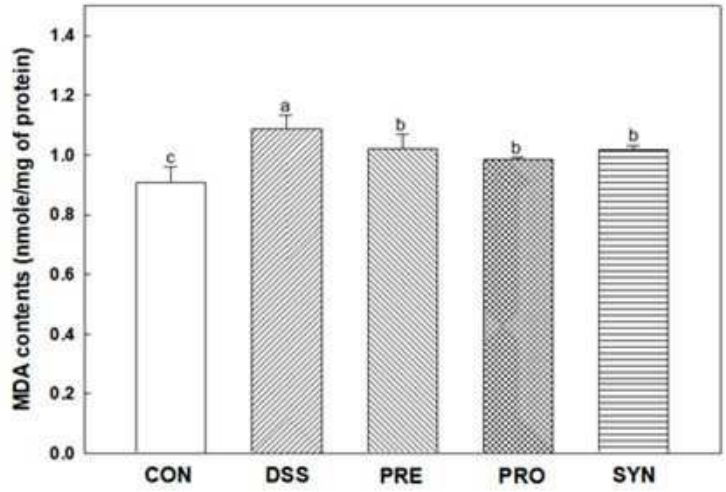
도면3d



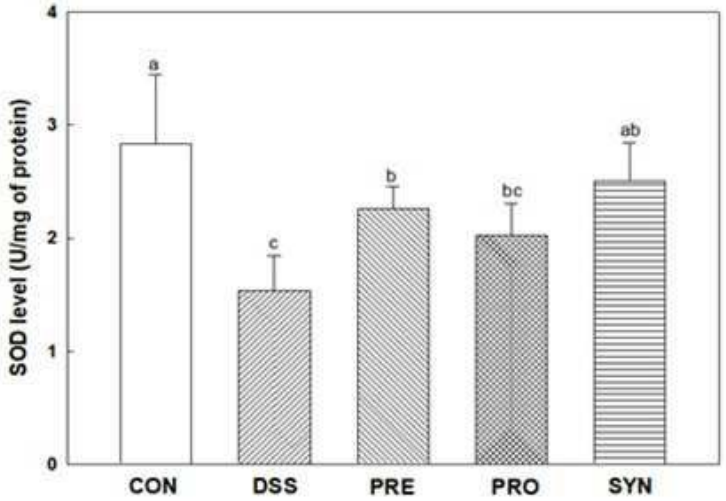
도면3e



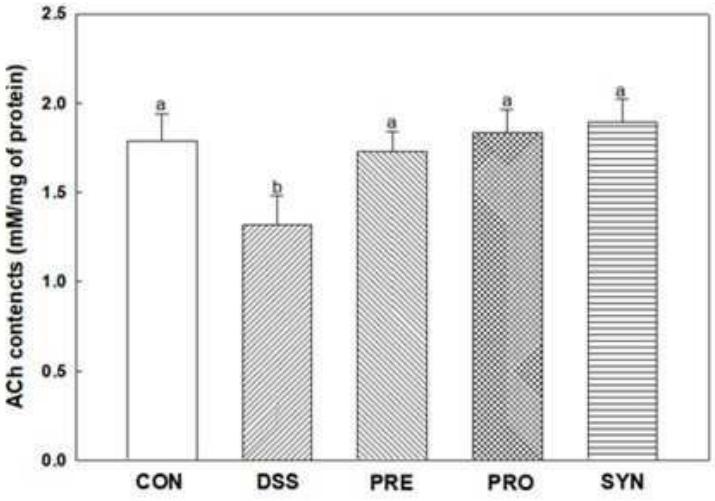
도면4a



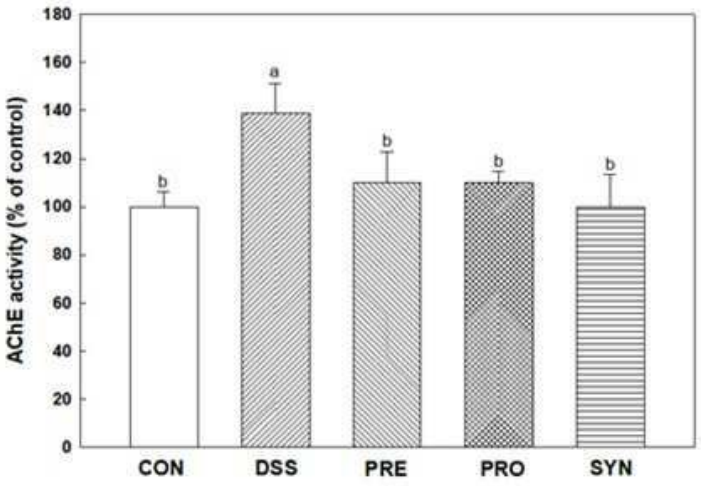
도면4b



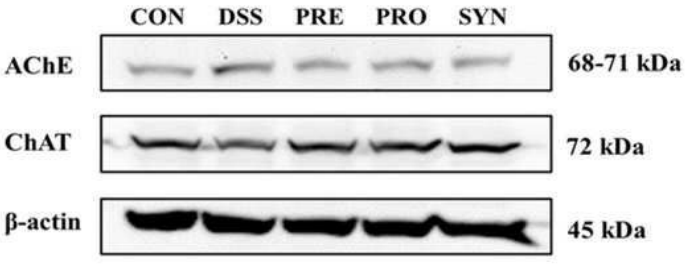
도면5a



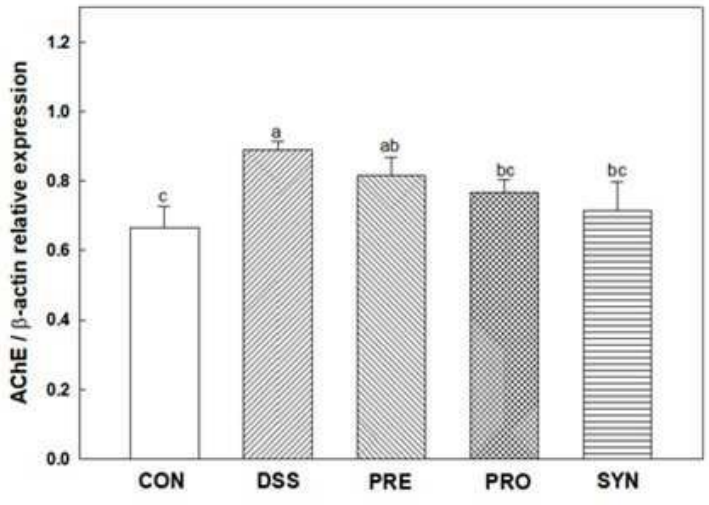
도면5b



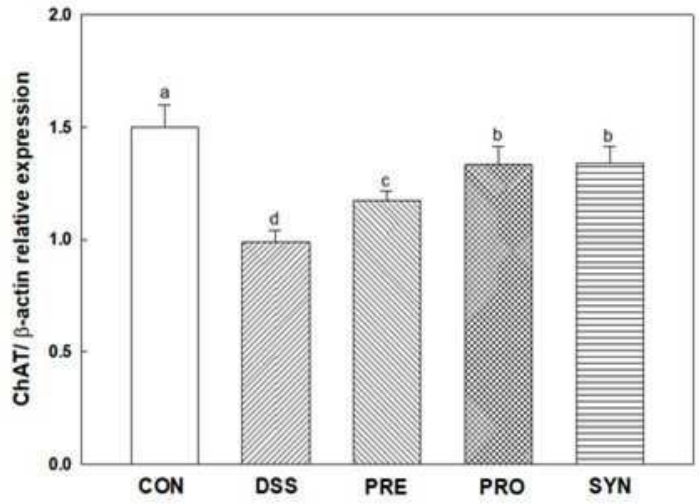
도면5c



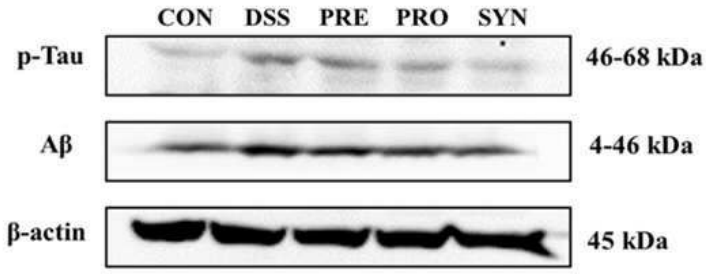
도면5d



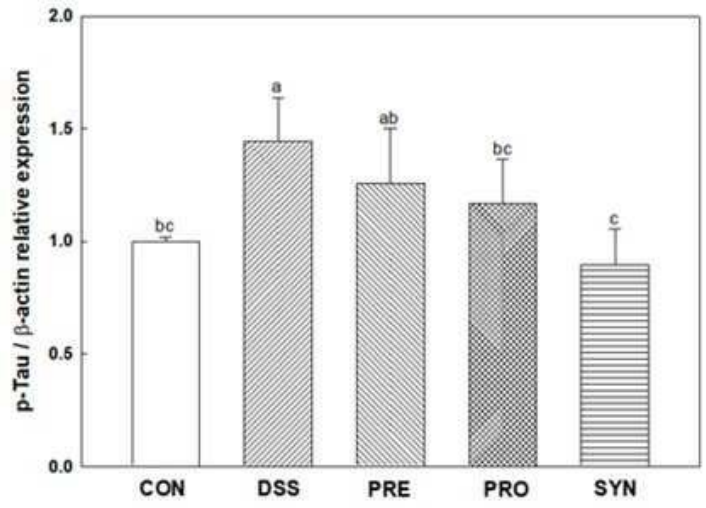
도면5e



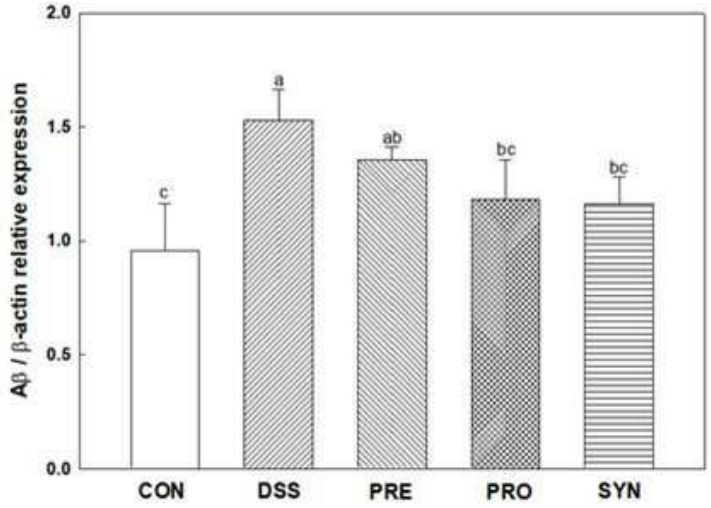
도면6a



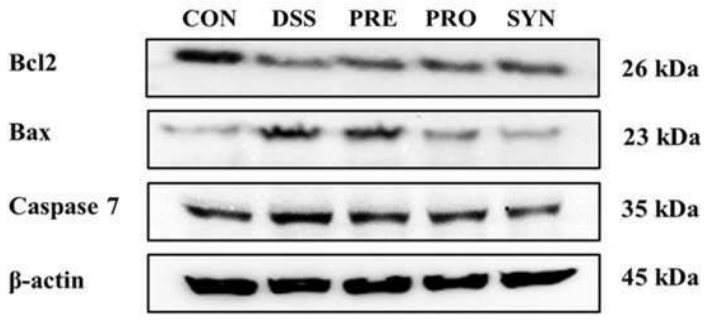
도면6b



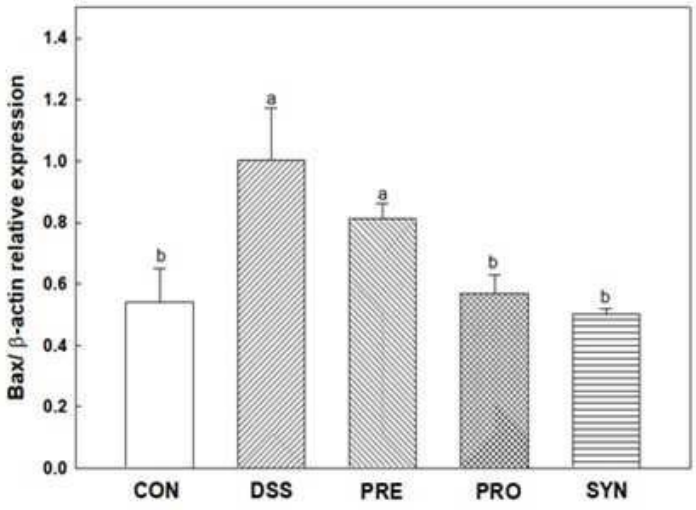
도면6c



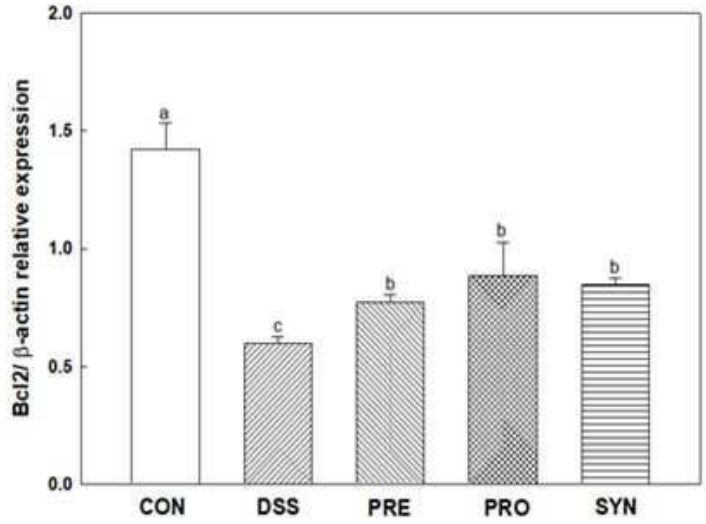
도면7a



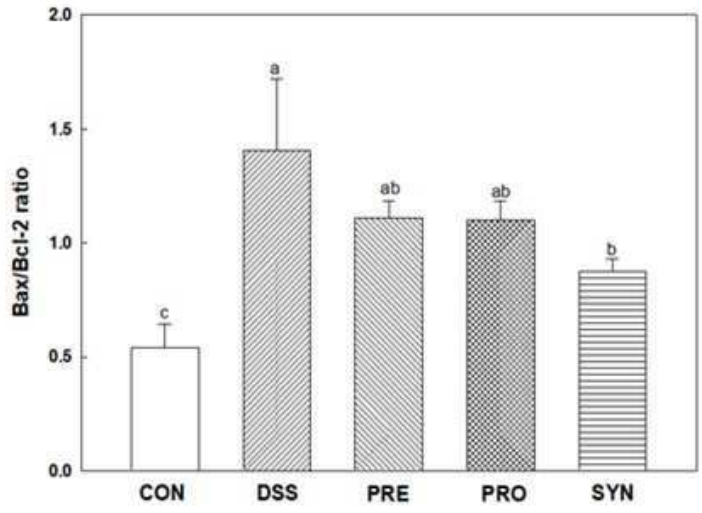
도면7b



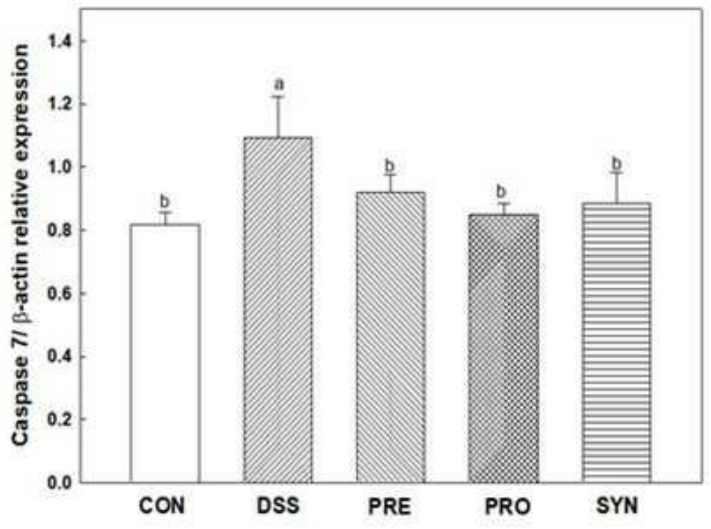
도면7c



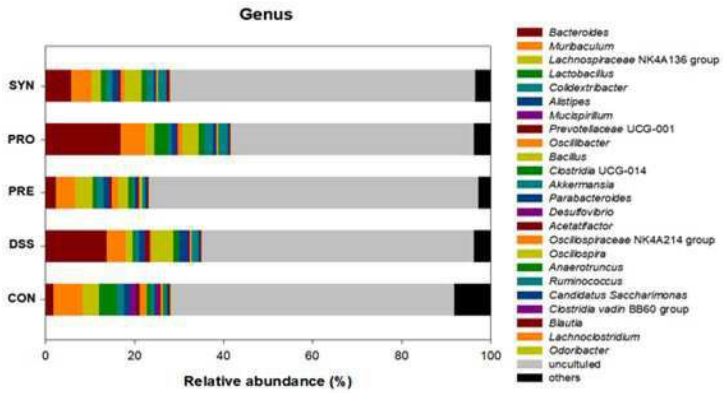
도면7d



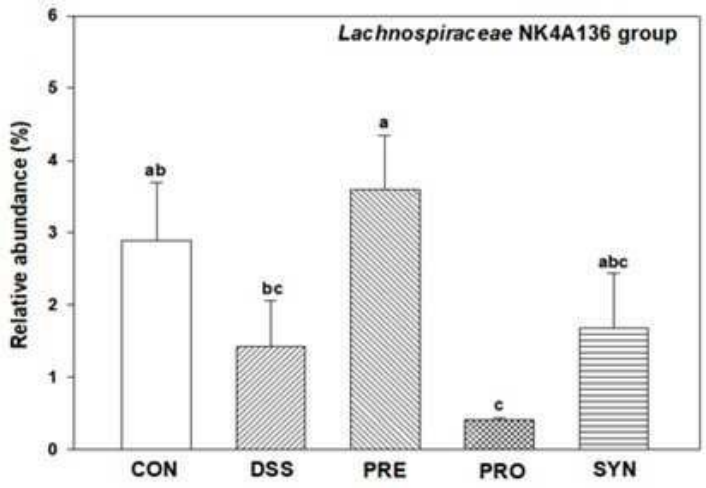
도면7e



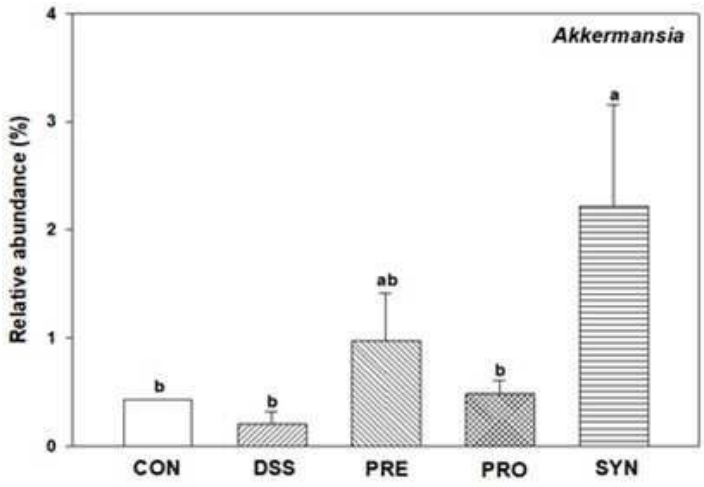
도면8a



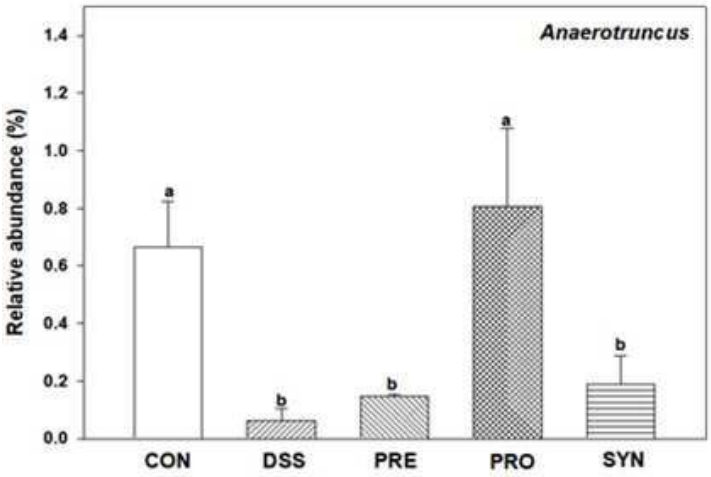
도면8b



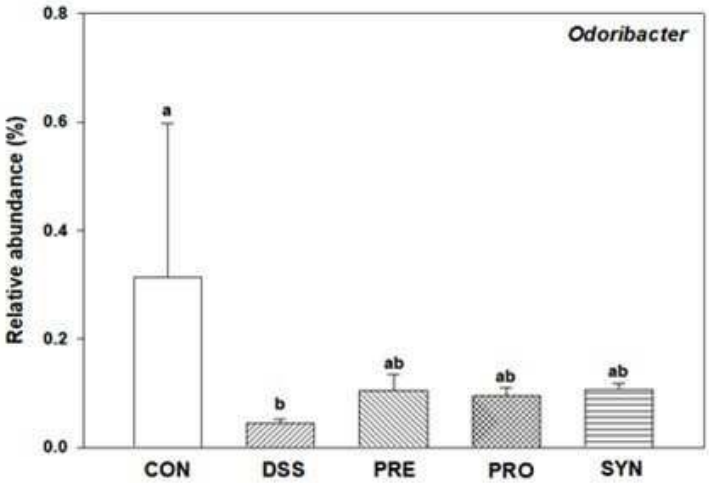
도면8c



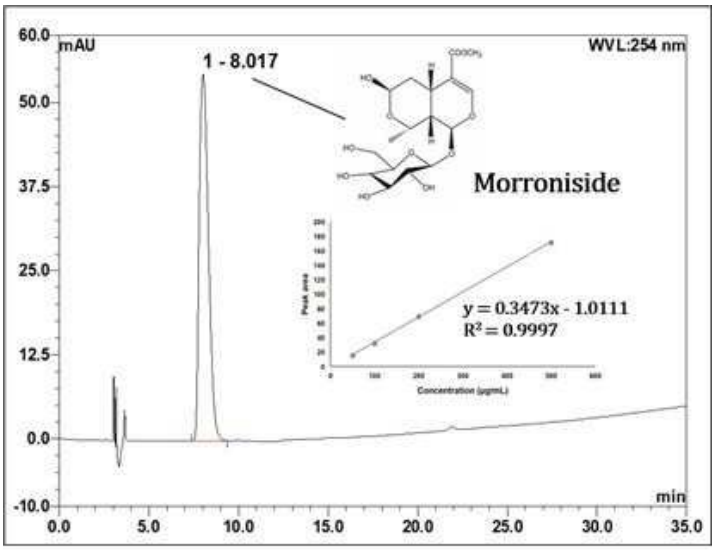
도면8d



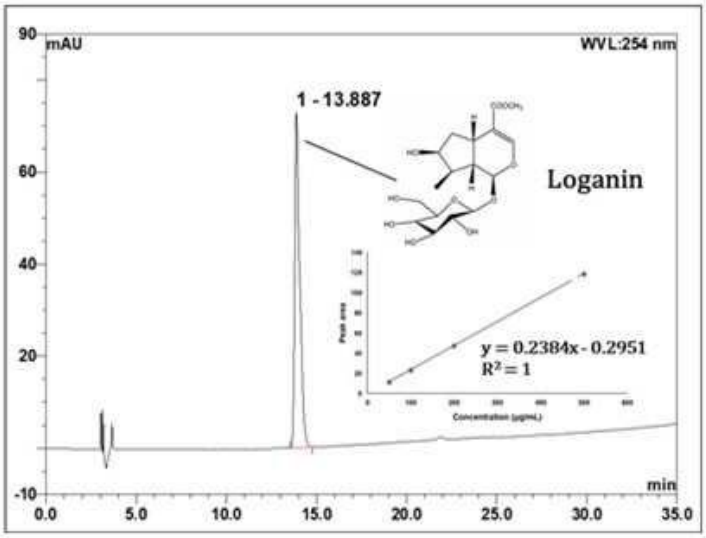
도면8e



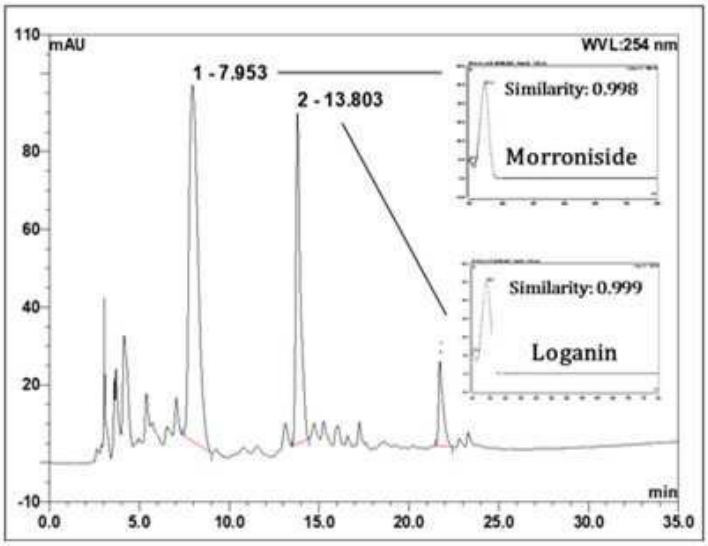
도면9a


mAU
WVL:254 nm
1 - 8.017
Morroniside
y = 0.3473x - 1.0111
R² = 0.9997
min

도면9b


mAU
WVL:254 nm
1 - 13.887
Loganin
y = 0.2384x - 0.2951
R² = 1
min

도면9c


mAU
WVL:254 nm
1 - 7.953
2 - 13.803
Similarity: 0.998
Morroniside
Similarity: 0.999
Loganin
min
110
80
60
40
20
-10
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0