



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년12월01일
(11) 등록번호 10-0871559
(24) 등록일자 2008년11월25일

(51) Int. Cl.

A23L 1/29 (2006.01) A23L 2/38 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0109167

(22) 출원일자 2008년11월05일

심사청구일자 2008년11월05일

(56) 선행기술조사문헌

동의신경정신과 학회지, 2002, 13(2), 149-171

연구보고서: 한약을 이용한 치매 치료제의 개발, 송중근, 영남대학교, 2001.08.

JP2001139483 A

KR1020040046656 A

(73) 특허권자

원광대학교산학협력단

전북 익산시 신용동 344-2

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

류영수

전라북도 전주시 완산구 서신동 이편한세상 110동 1004호

강형원

경기도 군포시 속달동 250번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

노재철

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 김태산

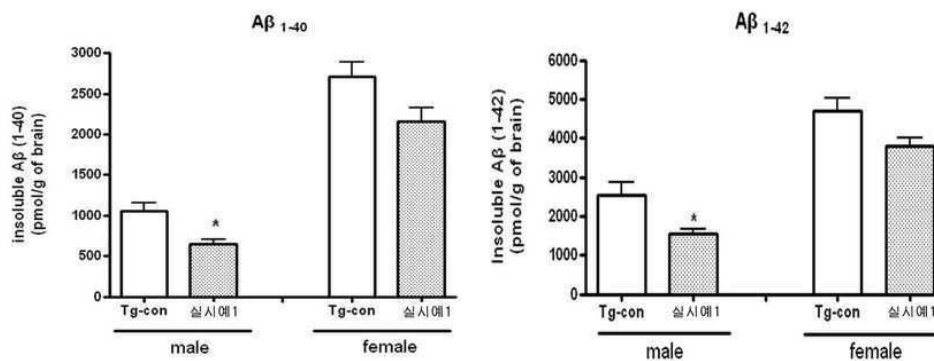
(54) 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 생약 추출물 함유 건강기능식품

(57) 요약

본 발명은 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 홍삼, 석창포, 백복령, 당귀, 맥문동, 현삼 및 백자인의 혼합생약 추출물을 함유하는 건강기능식품에 관한 것이다.

본 발명에 의한 홍삼, 석창포, 백복령, 당귀, 맥문동, 현삼 및 백자인의 혼합생약 추출물은 퇴행성 신경세포의 사멸을 억제하며, 동물 뇌조직의 베타 아밀로이드(A β 40/42)의 생성을 억제하고, 뇌유래영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현을 증가시킴과 동시에, 신경세포의 상해를 억제하여 뇌조직에 대한 신경보호 효과를 나타내므로 알츠하이머성 치매는 물론 혈관성 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 건강기능식품에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도11



(72) 발명자

김상태

서울특별시 광진구 자양동 스타시티 아파트 C동
3601호

손형진

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여대

한평림

서울특별시 양천구 목6동 한신청구아파트 109동
504호

심정희

서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 55동 505
호

조형권

전라북도 전주시 완산구 평화동2가 동아현대아파트
101동 1204호

서지선

광주광역시 남구 주월동 974-98

백인선

서울특별시 송파구 삼전동 73-9

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B070030

부처명 보건복지부

연구사업명 한의약연구개발사업

연구과제명 침단약물 탐색법을 활용한 퇴행성 뇌질환치료제 개발 및 실용화

주관기관 원광대학교 산학협력단

연구기간 2007년08월01일 ~ 2009년07월31일

특허청구의 범위

청구항 1

홍삼, 석창포, 백복령, 당귀, 맥문동, 현삼 및 백자인의 생약추출물을 함유하는 치매 증상의 개선 및 예방용 건강기능식품.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 건강기능식품은 환제, 분말, 정제, 캡슐제 또는 액제 제형 중에서 선택됨을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 액제 제형은 파우치 또는 음료임을 특징으로 하는 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 홍삼(Ginseng Radix Rubra), 석창포(Acorus gramineus Soland), 백복령(Hoelen), 당귀(Angelicae gigantis Radix), 맥문동(Liriopsis Tuber), 현삼(Scrophulariae Radix) 및 백자인(Thujae Semen)의 혼합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 치매는 우리나라 65세 이상의 노령인구 약 8.2~10.8%에서 나타날 정도로 흔하며, 인구의 급속한 고령화와 함께 심각한 사회문제로 대두되고 있는 대표적인 노년기 질환으로 후천적으로 지적능력을 상실하고 인지장애, 행동 및 성격의 점진적 황폐화라는 임상증상을 나타내는 퇴행성질환이다. 특히, 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)은 가장 많은 유형의 치매로 대뇌 피질(cortex)이나 해마(hippocampus)에 생기는 뇌위축과 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 그리고 신경세포의 과립공포변성(granulovacuolar degeneration), 히라노체(Hirano body) 등의 조직학적 소견을 특징으로 하며, 베타 아밀로이드(β -amyloid, A β)는 노인반의 주요 구성성분으로 AD가 발생하는 중요한 원인으로 추정되고, 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 발생시켜 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인한 신경세포사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다.
- <3> 주요 증상은 뇌세포파괴로 인한 인지기능, 기억력 감퇴로 서서히 진행되는 경우 사망에 이르게 된다. 40-65세 사이에 발병하는 경우 early-onset 또는 가족형 AD(familial AD), 65세 이상에서 발병되는 경우 late-onset 또는 산발성(sporadic AD)로 분류 된다. 가족형은 유전적 요인이 많이 작용한다. 일부 노화로 인한 신경퇴행성으로 발병하여 진행과정이 느린 경우를 노인성 치매(senile dementia)라고 하며 AD는 진행성으로 노인성 치매보다 증상의 진행속도(악화)가 빠르다.
- <4> 한의학에서 치매(痴呆)는 임상증후상 매병(呆病), 건망(健忘), 전증(顛證), 허로(虛勞) 등의 범주에 포함하고, 주요병인(主要病因)으로는 연노허쇠(年勞虛衰), 음식실조(飮食失調), 정지실조(情志失調), 중독외상(中毒外傷), 담음(痰飲), 어혈(瘀血) 등이 관여하며, 변증(辨證)으로는 간신부족(肝腎不足), 기혈허(氣血虧虛), 담탁저귀(痰濁阻礙), 기체혈어(氣滯血瘀)가 제시되고 치법(治法)으로는 보익간신(補益肝腎), 익기보혈(益氣補血), 활담개귀(豁痰開竅), 활혈화어통귀(活血化瘀通竅)를 활용한다.
- <5> 서양의학에서는 AD의 치료방법으로써 신경전달물질인 아세틸콜린(acetylcholine, ACh)의 감소에 근거한 인지 기능 개선을 위한 콜린에스테라제 억제제(cholinesterase inhibitor)와 엔-메틸-D-아스파테이트 수용체 길항제(NMDA, N-methyl-D-aspartate receptor antagonist) 등의 약물요법이 있고, 행동 심리증상 치료를 위한 항우울제, 진정제 등의 항정신성 약물요법과 심리, 인지, 행동, 작업, 재활치료의 비약물요법이 활용되고 있다.
- <6> 치매에 임상적으로 사용되는 항치매 약물은 치매 환자의 인지 기능 저하를 예방하고 회복시키며, 아울러 생활 기능을 증진시키는 약물인 콜린에스테라제(cholinesterase) 차단제인 타크린(tacrine), 도네페질(donapezil),

리바스티그민(revastigmine), 갈란타민(galantamine), MAO-B 차단제인 selegilin, 혈관 확장제, 뇌영양제(nootropics)등이 있고, 여성 호르몬 보충제 비타민 등도 인지 기능 저하를 치료하는 약물로 제안되고 있다.

- <7> 치매의 치료는 주로 알츠하이머병을 중심으로 발전되어 왔기 때문에 알츠하이머병의 약물 치료가 필수적인데 비 인지 장애 및 이상 행동의 치료제로는 사고 장애 및 공격 행동의 치료에 항정신병 약물인 할로페리돌(haloperidol)이 사용되어 왔지만, 현재 비전정적 정온제로 알려진 크로자핀(clozapine) 및 리스페리돈(risperidone), 올란자핀(olanzapine)의 소량 사용이 권장되고 있고 정동장애의 치료에는 현재 세로토닌 재흡수를 차단시키는 프로작(prozac), 졸로프트(zoloft), 세로작(seroxat) 등의 항우울제가 비교적 폭 넓게 사용되고 있다.
- <8> 최근 한의학계에선 한약의 AD에 대한 효과를 입증하는 연구들이 많이 진행되고 있는데 단방(單方)으로는 산사(山査), 원지(遠志), 석창포(石菖蒲), 조구등(釣鉤藤), 사상방(四象方)으로는 형방지황탕(荊防地黃湯), 조위승청탕(調胃升清湯)등이 있고 후세방(後世方)으로는 육미지황탕가감(六味地黃湯加減), 공진단(供辰丹), 보중익기탕가미방(補中益氣湯加味方), 총명탕가감(聰明湯加減), 천왕보심단(天王補心丹)등이 있다.
- <9> 따라서 기존의 치매 치료 약물을 대체할 수 있는 생약재를 이용한 새로운 치료제 및 건강기능 식품의 개발이 꾸준히 진행되고 있다.
- <10> 본 발명자는 홍삼, 석창포, 백복령, 당귀, 맥문동, 현삼 및 백자인의 생약 을 혼합하여 추출한 생약조성물을 이용하여 분자생물학 및 생화학적 실험을 한 결과 치매의 원인물질인 A β 가 감소하는 경향을 보임을 확인하고 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 건강기능식품의 소재를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <11> 본 발명은 생약재를 이용하여 치매 증상의 개선 및 예방용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- <12> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 홍삼(Ginseng Radix Rubra), 석창포(Acorus gramineus Soland), 백복령(Hoelen), 당귀(Angelicae gigantis Radix), 맥문동(Liriopis Tuber), 현삼(Scrophulariae Radix) 및 백자인(Thujae Semen)의 혼합생약 추출물(이하 '생약조성물'이라 한다)을 함유하는 치매 증상의 개선 및 예방용 건강기능식품을 제공한다.
- <13> 상기 생약조성물은 각각의 생약재를 건조하여 분쇄화 한 후, 약 10배량의 추출용매에서 1일간 냉침한 후, 추출 원액을 여과, 농축 및 동결건조 등의 방법을 통해 얻을 수 있고, 이때 추출용매는 그 선택에 있어서 특별히 한정되지는 않는다. 추출용매로는 정제수, 에탄올, 메탄올, 이소프로필알코올, n-부탄올 등의 저급 알코올, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜 등의 다가 알코올, 그리고 에틸아세테이트, 메틸아세테이트, 벤젠, n-헥산, 디에틸에테르, 디클로로메탄 등의 탄화수소계 용매 등을 예로 들 수 있고, 이들 중에서 하나 또는 두 종류 이상의 용매를 혼합하여 추출에 사용할 수 있다.
- <14> 상기 생약조성물은 액제, 환제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 시럽제 등의 제제로 제형화 할 수 있도록 추출물을 유동엑스, 연조엑스, 동결건조물 및 스프레이 드라이법을 이용하여 추출할 수 있다.
- <15> 신경 퇴행성 질환은 뇌조직에 베타-아밀로이드(beta-amyloid, A β)라는 플라크(senile plaque, A β -플라크)가 축적되고 뇌세포중에 신경섬유성 엉킴(neurofibrillary tangle, NFT)이 나타나며, 이로 인하여 뇌조직 전반에 퇴행성 위축이 일어나고 이와 관련한 각종 증상이 발생한다. 베타-아밀로이드-플라크와 신경섬유성 엉킴이 뇌세포를 죽게 하는지 혹은 뇌세포의 퇴행이 베타-아밀로이드-플라크와 신경섬유성 엉킴의 발생을 촉진하는 지는 확실하게 규명되어 있다. 신경 퇴행성 질환 중에서 알츠하이머(AD) 질환이 중요한 예이다.
- <16> 하기 실험예에 기재된 바와 같이, 본 발명은 분자생물학 및 생화학적 실험에서 퇴행성 신경세포의 사멸억제, 베타-아밀로이드 올리고머(A β oligomer)에 대한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성 억제, 및 락테이트 디하이드로게나제(lactate dehydrogenase, LDH)활성 감소를 확인하였으며, BAM-10 monoclonal A β antibody 일차항체로부터 베타-아밀로이드-플라크(A β plaque) 비교, calbindin antibody antibody로부터 칼슘-결합 단백질(calcium-binding protein, CB)의 발현 비교, phospho-CREB antibody로부터 phosphorylated CREB의 발현 비교, phospho-ERK antibody로부터 phosphorylated ERK의 발현 비교, phospho-JNK antibody로부터

phosphorylated JNK의 발현 비교, BDNF antibody로부터 BDNF의 발현 비교 시험으로부터 BDNF의 발현을 증가시키며 동시에, 신경세포의 상해를 억제하여 뇌조직에 대한 신경보호효과를 나타냄을 확인함으로써 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 건강기능식품으로서의 유용성을 밝힌 것이다.

- <17> APP의 베타-아밀로이드 올리고머의 생성 이전인 베타 아밀로이드(A β 1-40/42)의 생성은 신경세포의 사멸을 유도하기 위해 phospho-CREB의 감소를 유도하여 phosphorylated ERK발현을 억제시키고 phosphorylated JNK발현을 증가시키는 결과를 초래하므로 세포사멸을 촉진시키는데 이로 인해 CA1,3영역의 해마부위와 피질영역이 파괴되는 양상을 보이지만 본 발명의 생약조성물을 투여한 경우 Tg-APP/PS mice에서 정상군인 non-Tg 대조군과 유사한 양상으로 상기 단백질의 발현을 촉진하거나 감소시키는 결과로 인해 생존율이 증가되는데 이를 초파리에서 유사한 결과를 나타내었고, 해마 세포주에서도 세포사멸을 억제하는 경향을 보였다.
- <18> 따라서 본 발명의 생약조성물은 알츠하이머성 치매는 물론 혈관성 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.
- <19> 본 발명에 의한 건강기능식품은 치매 환자의 인지 기능 저하를 예방하고 회복시키며, 아울러 생활 기능을 증진시키는 약물인 콜린에스테라제(cholinesterase) 차단제인 타크린(tacrine), 도네페질(donapezil), 리바스티그민(revastigmine), 갈란타민(galantamine), MAO-B 차단제인 selegilin, 혈관 확장제, 뇌영양제(nootropics)등과 병용 투여할 수 있으며, 또한 항정신병 약물인 할로페리돌(haloperidol), 비전형적 정온제로 알려진 크로자핀(clozapine) 및 리스레리돈(risperidone), 올란자핀(olanzapine), 세로토닌 재흡수를 차단시키는 프로작(prozac), 졸로푸트(zoloft), 세로작(seroxat) 등의 항우울제와 병용하면 기존 약물의 상용량을 줄일 수 있고, 기존 약물들이 가지는 문제점들을 경감시킬 수 있다.
- <20> 또한, 본 발명에 따른 홍삼, 석창포, 백복령, 당귀, 맥문동, 현삼 및 백자인의 혼합생약 추출물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등에 첨가하여 건강기능식품으로 개발할 수 있으며, 상기 생약 추출물을 직접 환제, 산제, 정제, 캡슐제, 액제 등의 제형으로 제조하여 사용할 수 있다.
- <21> 아울러 본 발명은 액제 제형으로 제조되는 경우에는 파우치, 음료 또는 다류로 제조될 수 있고, 상기한 성분 이외에 다른 성분은 제형에 따라 당업자가 적의하게 선택하여 배합 할 수 있으며, 식품의 주·부원료로 하여 제조되거나 다른 식품에 첨가됨으로서 제조될 수 있다. 이 때 식품학적으로 허용되는 식품보조첨가제를 사용할 수 있다.

효 과

- <22> 본 발명은 홍삼, 석창포, 백복령, 당귀, 맥문동, 현삼 및 백자인의 혼합생약 추출물의 투여에 의해서 퇴행성 신경세포의 사멸억제, 동물 뇌조직의 베타 아밀로이드(A β 40/42)의 생성 억제제, BDNF의 발현 증가와 동시에 신경세포의 상해를 억제하여 뇌조직에 대한 신경보호효과를 나타낸다.
- <23> 그러므로 본 발명은 알츠하이머성 치매는 물론 혈관성 치매 환자를 위한 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <24> 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- <25> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- <26> **<실시예 1> 본 발명에 의한 생약조성물의 제조**
- <27> 홍삼 60g, 석창포 48g, 백복령 48g, 당귀 36g, 맥문동 36g, 현삼 48g 및 백자인 36g을 각각 세말하여 정제수 2.5L를 넣어 95~100℃에서 3시간 가온 추출한 후 25 μ m필터를 사용하여 여과하고 여액을 농축기를 이용하여 50~60℃에서 감압 농축한 다음 건조기에 넣고 60℃ 이하에서 건조시켜 건조물을 분쇄하여 분말화 된 건조엑스 95g를 얻었다(수득률 약 30.4%).
- <28> **<실험예 1> 세포 생존율 측정**
- <29> 1) 세포배양
- <30> 흰쥐 해마세포주인 H19-7을 10⁴ 세포수로 6-웰 플레이트(6-well plate)에 분주하여 37℃에서 5% 암소혈청(FETAL

BOVIAN SERUM, FBS)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)배지에 페니실린/스트렙토마이신을 첨가하여 80% 정도 조밀하게 배양시킨 다음 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 유지하였다.

<31> 2) 세포 생존율 측정

<32> 흰쥐 해마세포주인 H19-7에 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약조성물을 50 μ g/ml 농도로 투여한 후, 본 발명의 생약조성물에 의한 세포생존율을 간접적인 관찰로 더 정확히 측정하기 위해 신경세포의 사멸에 관여하는 에이베타 올리고머(A β oligomer)를 12시간 정도 처리하고 3-[4,5-디메티오졸-2일]2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(3-[4,5-dimethiozol-2y]2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 용액 20 μ l를 첨가하여 3시간 동안 배양한 다음 디메틸 설펝소이드(Dimethyl Sulphoxide, DMSO) 50 μ l를 첨가하고 실온에서 30분 이상 반응시켜 심홍색의 색상이 변화되는 정도를 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A540/A630 nm에서 흡광도를 측정하여 도 1에 나타내었다. 본 발명에 의한 생약조성물 대신 curcumin 투여군을 대조군으로 하였다.

<33> 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 신경세포의 사멸에 관여하는 A β oligomer 투여군(Control)은 거의 생존율이 희박하나, 본 발명에 의한 생약조성물 투여군은 정상군(Normal)과 유사한 정도의 생존율을 나타내었으며, 특히 대조군인 쿠르쿠민(curcumin) 투여군에 비하여 매우 우수한 생존율을 나타내어, 생약조성물 투여군은 p<0.005 범위 내에서 유의성 있게 A β oligomer에 대한 억제효과로 인해 세포 생존율을 증가시키는 것으로 사료되므로 치매 환자를 위한 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

<34> <실험예 2> 세포 형태학적 관찰

<35> 본 발명에 의한 생약추출물이 흰쥐 해마세포주인 H19-7의 세포사를 억제하는 세포사의 유도양상을 관찰하기 위해 상기 실험예 1에서 배양한 흰쥐 해마세포주인 H19-7에 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약추출물을 50 μ g/ml 농도로 투여한 후, A β oligomer를 12시간 정도 처리하고 상기 세포주 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에 medium, 페니실린/스트렙토마이신을 첨가하여 37℃에서 12시간 배양하여 반응을 관찰하여 도 2에 나타내었다. 세포사 관찰은 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 200개 정도의 세포수를 촬영하여 조사하였다.

<36> 도 2에 나타난 바와 같이, 정상군(Wild type, 이하 WT)은 세포형태가 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라는 반면, 대조군인 쿠르쿠민 투여군에 대해서는 약한 세포생존 양상을 보였다. 본 발명의 생약조성물 투여군은 세포사 유도가 거의 진행되었으며 이와 함께 신경돌기가 소실되는 양상이 나타나 신경재생이 유도되고 세포 생존율이 증가되면서 신경돌기가 잘 발달되고 신경세포의 증식이 잘 진행된 것을 확인할 수 있어 치매 환자를 위한 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

<37> <실험예 3> 미토콘드리아 ROS량 측정

<38> H19-7 cell lines를 10³ 세포수로 laminin coated sliab cover glass에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 100 μ M의 H₂O₂를 첨가하여 배양된 H19-7 세포주에 산화적 스트레스(oxidative stress)를 주고 동시에 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약조성물을 1, 10, 25, 50, 100, 250 μ g/ml 농도별로 투여한 다음 A β oligomer로 처리하여 A β oligomer 최종농도가 1 μ M이 되도록 하였다. 엔,엔-디메틸-포름아미드(N,N-dimethyl-formamide, DMF)로 최종농도가 2 μ M 2', 7' -디클로로플루오로에신 디아세테이트(2', 7' -dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA: Sigma Co. USA)가 되도록 50분 동안 세포에 처리한 다음 3회 PBS으로 세척하고 H₂O₂에 의해 산화성 DCF-DA는 형광성 디클로로플루오로에신(dichlorofluorescein, DCF)으로 전환되는 원리를 이용하여 씨토플루오로 4000 플루오로에신 스펙트로포토메타(CytoFluor 4000 fluorescence spectrophotometer)로 485 nm/535 nm하에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)양을 측정하고 도 3에 나타내었다.

<39> 도 3으로부터 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약조성물은 50 μ g/ml 이상의 농도에서 p<0.005 범위 내에서 유의성 있게 A β oligomer에 대한 ROS의 생성을 억제하는 효과로 인해 세포 생존율을 증가시켰음을 알 수 있으므로 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

<40> <실험예 4> 미토콘드리아의 LDH 활성도 측정

<41> 락테이트 디하이드로게나제(lactate dehydrogenase, LDH)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상의 경우 세포막을 투과하지 않지만 세포막이 손상을 입을 경우 세포밖으로 분비되어 배지내로 방출된다. 방출된 LDH는 젖산과 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)로부터 피루빈산과 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 하이드로젠(nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen, NADH)을 생성시키며 이때 NAD가 산화됨에 따라 340 nm에서 흡광도가 변화하는 것으로부터 세포막에 방출된 LDH의 활성도를 측정할 수 있

다.

<42> 흰쥐 해마세포주인 H19-7를 5×10^4 세포수로 96-well에 분주하고 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약추출물을 1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 투여한 다음 A β oligomer 최종농도가 $1 \mu\text{M}$ 이 되게 처리한 후 세포를 분리하여 상등액 100 μl 과 반응액을 넣고 섞은 후 1N HCl을 더하여 반응을 중단하여 ELISA reader(Emax, USA)로 340 nm에서 흡광도를 측정하여 표 4에 나타내었다.

<43> 세포독성은 다음과 같이 정의하였다.

<44> $\text{Cytotoxicity (\%)} = (\text{실험치} - \text{control치}) / (\text{control치} - \text{정상치}) \times 100$

<45> 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 생약조성물은 농도 의존적으로 LDH 활성도가 감소하였는데 이로부터 본 발명의 생약조성물은 세포 생존율을 증가시킬 수 있으므로 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

<46> <실험예 5> 초파리 생존율 측정

<47> 1) 초파리 사육배양

<48> 본 실험에 사용된 초파리 사육을 위해 과당 600g, 효모 추출물(yeast extract) 120g, 옥수수전분 420g, 보키닌(bokinin) 20 ml, 프로피온산(propionic acid) 30 ml, 한천(agar) 60g을 물 6 L에 녹여서 멸균하여 사용한다. 형질전환 초파리모델은 야생형에 뇌신경세포에 잘 발현되도록 GMR-GAL4 초파리와 세포사멸에 관여하는 UAS-GRIM 초파리를 교배시킨 후 이를 다시 APP-GAL4 초파리와 재교배를 시킨 다음 유전적으로 잘 발현되는지 genotyping으로 확인하고 25°C BOD 인큐베이터에서 사육하여 15일마다 배지를 교환하여 정확한 치매모델용 초파리를 선정하여 본 실험에 사용하였다.

<49> 2) 초파리 생존율 측정

<50> 1주일된 성체 APP 발현 drosophila APP-GAL4/UAS-GRIM 25마리를 플라스틱 바이알에 분주하고 2일간 키운 다음 100 μM H_2O_2 를 첨가한 상태에서 야생종인 APP-GAL4/UAS-GRIM 정상군, APP-GAL4/UAS-GRIM 정상군에 100 μM H_2O_2 를 첨가한 군, 그리고 APP-GAL4/UAS-GRIM 정상군에 본 발명의 생약조성물 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여군을 각각 15일간 사육한 다음 상기 방법에 준하여 APP-GFP 형질전환 초파리로부터 생존율을 검정하여 도 5에 나타내었다.

<51> APP-grim으로 형질전환 된 초파리의 경우 세포사멸에 의해 신경계가 퇴행되고 개체의 생존에 치명적인 손상을 입게 된다. 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 야생형 초파리 정상군과 APP 형질전환 초파리 대조군, 그리고 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약조성물 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 생존율을 20일간 관찰한 결과, 정상군은 약 19.3 ± 0.5 마리, 대조군은 약 2.3 ± 1.5 마리, H_2O_2 처리군은 약 3.2 ± 0.5 마리였으나, APP/GRIM에 실시예 1 처리군의 경우 17.5 ± 1.2 마리로 생존율이 증가하였고($P < 0.05$), H_2O_2 에 실시예 1 처리군의 경우도 약 13.2 ± 0.5 마리로 대조군에 비해 생존율이 증가하였다($P < 0.005$). 특히 APP/GRIM에 실시예 1물 처리군 경우 $P < 0.05$ 범위 내에서 유의성이 있었고, H_2O_2 에 실시예 1 처리군 경우 $P < 0.005$ 범위에서 유의성이 있었다.

<52> <실험예 6> 초파리의 행동학적 분석

<53> 초파리의 비행능력은 3-day-old females을 대상으로 18-cm-long vials에서 수행하였는데 이는 APP에 의해 ROS(활성산소종)가 발생되면서 신경세포의 신경사멸과 근육조직의 미토콘드리아 장애로 인해 운동력의 상실을 야기되므로 일정 높이에서 채공되는 마리수의 채공시간이 APP형질전환 초파리경우 계속 바닥으로 떨어지는 행동으로 올라가는 능력이 저하됨으로 올라가는 행동을 보이지 못하게 되는데 이 APP형질 전환군에 본 발명의 생약조성물을 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 군으로 구별하여 채공능력의 증감을 조사하기 위해 실온에서 1시간 동안 환경에 적응시킨 다음 초파리가 완전히 바닥에 앉아 있는 시점을 기준으로 실시하였다.

<54> 상기 실험예 5에 사용된 각각의 실험군을 대상으로 climbing time index(sec)은 시작부위에서 15cm 말단부위까지 5번 이상 도달하는 동안 소요되는 시간을 측정하였는데 5번의 반복실험을 수행하였다. Flight assay는 3-day-old females을 대상으로 Pesah방법을 적용하여 수행하여 도 6에 나타내었다($n > 25$). 단 통계는 T-test를 사용하였으며 $P < 0.05$ 를 유의 수준(P)으로, $P < 0.005$ 를 유의한 것으로 판단하였다. 초파리의 행동관찰 및 세포생존율에서 얻은 결과는 평균 $\pm$ S.D로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

- <55> 도 6에 나타난 바와 같이, APP-grim 형질전환 초파리군의 비행능력에 대한 본 발명의 생약조성물의 효과를 조사하기 위해 초파리의 상승능력을 관찰한 결과, 비행정도가 최초 3일에서 정상군을 100 %로 환산하였을 때, 대조군의 경우 약 $11 \pm 1\%$ 인데 반해 실시예 1 처리군은 $91 \pm 1\%$ 로 유의성 있게 증가하였고($p < 0.05$), 30일이 경과한 후에는 대조군의 경우 약 $4 \pm 0.5\%$ 인데 반해 실시예 1 처리군은 $90 \pm 5\%$ 로 3일경과시와 큰 변화를 보이지 않았다($p < 0.005$).
- <56> **<실험예 7> 초파리의 비행횟수에 미치는 영향**
- <57> 초파리는 곤충의 습성인 주지성이 있어서 상승상태에 머무르는 경향성이 있는데 수분공급이나 영양분을 보충하기 위해 바닥에 존재하는 배양배지를 먹으러 바닥에 내려왔다 올라가는 왕복비행을 하게 된다. 이때 APP의 발현에 의해 신경손상이 오면 비행장애가 초래되어 상승하강의 왕복이 잦아지게 된다.
- <58> 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약조성물을 투여한 후 초파리의 Flight assay를 3-day-old females를 대상으로 Pesah 방법을 적용하여 수행하였다($n > 25$). 비행횟수는 5번 이상 도달하는 것을 기준으로 5번의 반복실험을 수행하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- <59> 그 결과 도 7에서처럼 3일 경과 된 초파리를 대상으로 비행정도를 10분 동안 측정하면 정상군은 일반적으로 비행횟수가 2회 정도이며, 대조군의 경우는 약 18 ± 1 회인데 반해 본 발명의 생약조성물 처리군은 4.5 ± 1 회로서 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). 30일이 경과한 후 야생형인 정상군은 6회 정도인데 반해 대조군의 경우는 약 16 ± 1 회로서 비행횟수가 늘어남을 알 수 있고, 실시예 1 처리군은 7 ± 1 회로서 정상군과 큰 변화를 보이지 않았는데, 실시예 1 처리군은 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 감소하였다($p < 0.005$).
- <60> **<실험예 8> 공초점 형광현미경 측정**
- <61> 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약조성물이 APP가 신경세포의 Notch 신호에 관련해서 신경세포에 특이적으로 유도하기 위해 GMR-GAL4 driver를 작동시켜 APP-GRIM/GMR-GAL4 형질전환 초파리의 시신경에 존재하는 신경세포의 발현양상을 관찰하였다.
- <62> 약물 무처리군(WT), APP 발현군, APP에 본 발명의 생약조성물 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 군으로 구별하여 사육한 초파리의 head를 취하기 위해 CO_2 로 마취한 다음 4% 파라포름알데히드와 0.2% 트리톤 X-100이 있는 고정액으로 하룻밤 고정시키고 PBT PBS containing 0.2% Triton X-100으로 세 번 세척한다. 이를 파라핀으로 포매한 다음 이를 microtome(Leica, Japon)으로 $25 \mu\text{m}$ 정도의 두께로 절단한 다음 이를 시료로 해서 탈파라핀화 시키기 위해 자이렌(xylen)이 들어 있는 비이커에 담근 다음 탈수과정을 통해 blocking buffer(PBS, 5% heat-inactivated normal goat serum, 0.2% Triton X-100)으로 실온에서 1시간동안 block시킨다. eye disk염색은 eye disc가 있는 whole fly brains를 microscope하에서 수행하고 4% 파라포름알데히드에서 30분간 고정하였다. 1시간동안 block시킨 다음 eye disc는 poly(l-lysine)-coated coverslips에 올려놓고 현미경 관찰을 수행하여 도 8 및 도 9에 나타내었다. 모든 시료는 confocal microscopy와 fluorescence stereo-microscopy에서 수행하였다.
- <63> 도 8에서 알 수 있는 바와 같이, 야생형은 낱눈구조(ommatidia)가 규칙적으로 존재하는데 반해(도 8의 A, D 슬라이드) APP-grim 형질전환군은 신경세포의 사멸로 인해 구조가 붕괴된 상태였고(도 8의 B, E 슬라이드), 실시예 1 처리군은 구조가 정상군과 유사한 경향을 보이는 것이 주사전자현미경 현미경으로 관찰되었다(도 8의 C, F 슬라이드).
- <64> 도 9에서처럼 시신경의 생존을 의미하는 AKT발현을 면역화학분석법으로 확인시 발현양상이 정상군(도 9의 A 슬라이드)에 비해 APP-grim 형질전환군은 신경세포의 사멸로 시신경조직이 상당히 변형된 구조이었으나(도 9의 B 슬라이드), 실시예 1 처리군은 구조가 정상군과 유사한 경향을 보였는데(도 9의 C 슬라이드), 시신경의 세포질 골격에 해당되는 tubuline을 관찰시 시신경세포의 핵은 적색형광을 나타내었으며 시신경에 존재하는 Neuron의 표지자인 tubulin(녹색 형광) 발현양상을 확인한 결과는 야생형이 강하게 발현되는데 비해(도 9의 D 슬라이드) APP-grim 형질전환군은 신경세포의 사멸로 인해 tubulin의 발현이 감소하는 경향을 보여주었고(도 9의 E 슬라이드), 실시예 1 처리군은 tubulin의 발현정도가 증가하는 형태적 변화를 보여주었다(도 9의 F 슬라이드).
- <65> 따라서, 야생형인 경우 아무런 변화를 보이지 않는 반면, APP 발현 초파리의 경우 표현형이 시신경의 세포사멸을 나타내었고, 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약조성물 투여군의 경우 세포사멸 정도가 감소함을 알 수 있어 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.
- <66> **<실험예 9> 면역조직화학 분석법**

- <67> 치매유발에 관련하여 두개의 APP(amyloid precursor protein)과 presenilin1(PS1) 유전자가 형질 도입된 Tg-APP/PS1 마우스를 C57BL6/JxC3H hybrid 마우스와 집중 교배하여 얻은 자손의 꼬리 조직을 취하여 genomic DNA를 준비한 후 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 Tg-APP/PS 마우스와 non-Tg 마우스를 식별하였고 4.5 개월인 Tg-APP/PS male(n=10), female(n=10) mice를 가지고 실험하였다.
- <68> 실험그룹은 non-Tg 대조군(숫놈(n=3), 암놈(n=3), 총(n=6)), Tg 대조군(숫놈(n=3), 암놈(n=3), 총(n=6))과 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약조성물을 투여하는 그룹(숫놈(n=4), 암놈(n=4), 총(n=8))으로 지정하였다. Tg-APP/PS 마우스는 초기 암수 각각 12수 이상 확보하였으며, 정상군인 C57BL6와 대조군으로 Tg-APP/PS1 마우스에 일반사료를, Tg-APP/PS 마우스에 실시예1의 생약조성물 400 mg/Kg/day으로 처리하여 사육 프로토콜로부터 치매동물의 뇌조직에서의 반점(plaque) 생성정도, A β 40/42 양적변화와 단백질 변화를 측정하였는데 모든 동물은 7.5 개월이 되는 날 뇌를 취하여 다음단계의 조직학적 생화학적 검사 준비하였다.
- <69> 실험군으로 3개월간 경구투여 한 생쥐를 케타민(ketamin)으로 마취한 다음 두개골을 절개한 후 뇌부분을 파라핀 포매를 실시하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. 뇌조직의 일부는 A β 40/42 양적변화를 측정하기 위해 항원항체반응을 이용한 ELISA kit으로 측정하였으며, 일부 뇌조직부위는 포르말린으로 고정한 후, 50 μ m 두께로 microtome으로 절단하고 연속절편을 4 $^{\circ}$ C에서 2N HCl용액에서 20분간 반응시켜 DNA-denaturation을 수행하고 0.1M borate 완충액을 처리하여 안정시킨 후 비특이적인 면역반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K(DAKO, Denmark)가 포함된 0.5% bovine serum albumin을 1시간동안 반응시켰다. 각각의 조직을 유리슬라이드에 올려놓고 (1) BAM-10 monoclonal A β antibody 일차항체로부터 A β plaque 비교, (2) calbindin antibody antibody로부터 calcium-binding protein(CB)의 발현 비교, (3) phospho-CREB antibody로부터 phosphorylated CREB의 발현 비교, (4) phospho-ERK antibody로부터 phosphorylated ERK의 발현 비교, (5) phospho-JNK antibody로부터 phosphorylated JNK의 발현 비교, (6) BDNF antibody로부터 BDNF의 발현 비교를 위해 뇌의 cortex(피질)와 CA1 (히포캠퍼스 해마조직)에 표지하여 4 $^{\circ}$ C 냉장실에서 12시간동안 반응시켰다. Horseradish peroxidase-antibody가 표지된 avidin biotin complex(ABC: Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-디아미노벤지딘(DAB : Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M Tris-HCl완충액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후 광학현미경으로 50X 현미경하에서 관찰하였다. 도 10은 치매형질전환 생쥐의 약물투여 공정도를 나타낸 것이다.
- <70> 본 발명의 실시예 1에서 제조된 생약조성물을 투여한 다음 7.5개월 된 mice brain의 posterior piriform cortex tissue를 취해 protein prep.과정을 통하여 insoluble A β 을 얻었다. 이를 ELISA kit을 사용하여 A β (1-40)과 A β (1-42)를 측정한 결과를 조직의 무게 당 pmole로 나타내었다. 도 11에서 알 수 있는 바와 같이, A β (1-42)에서 숫놈은 실시예 1(400 mg/kg)을 투여한 그룹이 Tg 대조군에 비해서 유의미한 감소를 나타냈지만, 암놈의 실시예 1(400 mg/kg)을 투여한 그룹은 유의미하진 않지만 감소되는 경향을 보였다. A β (1-40)에서 Tg 대조군과 비교하면 숫놈의 경우 실시예 1(400 mg/kg)을 투여한 그룹은 유의미하게 감소를 하지만 암놈의 경우는 실시예 1(400 mg/kg)을 투여한 그룹이 감소하는 경향을 보이거나 유의미한 차이를 보이지 않았다. 그러므로 본 발명의 생약조성물은 일정한 농도(400 mg/kg)로 장기 투여시킨 결과, 알츠하이머 동물 모델인 Tg-APP/PS mice에서 insoluble한 A β (1-40)과 A β (1-42)의 양을 감소시키는 것을 나타냄을 알 수 있다.
- <71> 각 군의 A β plaque를 비교하기 위해서 BAM-10 monoclonal A β antibody를 사용하여 면역조직화학(immunohistochemistry)을 통해 확인하였다.
- <72> 도 12에 나타난 바와 같이, 뇌 전체(Hole brain section)중에 prefrontal cortex, Hippocampus, posterior piriform cortex 지역(40배)에서 7.5개월 된 숫놈 Tg-APP/PS 대조군의 prefrontal cortex는 Non-Tg 대조군에 비해 많은 plaque가 형성함을 관찰하였으며, 실시예 1을 투여한 군에서는 plaque 형성이 감소하였다. 7.5개월 된 숫놈 Tg-APP/PS 대조군의 해마(Hippocampus)에서 많은 수의 plaque가 관찰되었으며, 실시예 1을 투여한 군은 앞서 본 prefrontal cortex 지역과 같이 유사한 경향으로 plaque 형성이 감소하였다. 7.5개월 된 숫놈 Tg-APP/PS 대조군의 posterior piriform cortex에서는 Non-Tg 대조군에서 관찰할 수 없는 많은 수의 plaque를 관찰하였고, 실시예 1을 투여한 군에서는 앞에서 보여준 ELISA의 양적인 데이터와 같은 양상으로 plaque 형성이 감소하였다.
- <73> 도 13에서 알 수 있는 바와 같이, 암놈의 경우 7.5개월 된 암놈(female) Tg-APP/PS 대조군의 전두엽 층(prefrontal cortex)은 Non-Tg 대조군과 비교하면 Abeta plaque의 과다 침착을 확인하였으며, 실시예 1을 투여한 군에서는 plaque 형성이 감소하였다. 7.5개월 된 암놈 Tg-APP/PS 대조군의 해마에서 많은 수의 plaque가 관찰되었으며, 실시예 1을 투여한 군은 앞서 본 전두엽 층 지역과 같이 유사한 경향으로 plaque 형성이 감소하였다. 7.5개월 된 Tg-APP/PS 대조군의 posterior piriform cortex에서 Non-Tg 대조군에서 관찰할 수 없었던 침착

된 많은 수의 plaque를 관찰하였고, 실시예 1을 투여한 군에서는 앞에서 보여준 ELISA의 양적인 데이터와 같은 양상으로 plaque 형성이 감소하였다.

- <74> 도 14에서 알 수 있듯이 7.5개월 된 Tg-APP/PS mice의 각 군의 칼슘-결합 단백질(calcium-binding protein, CB)의 해마(Hippocampus)의 CA1, dentate gyrus(DG)영역에서 발현 양상을 관찰하였는데 CA1 영역의 pyramidal cells에서 non-Tg 대조군과 비교했을 때 Tg 대조군에서 CB 발현의 감소를 보였으며, Tg 대조군에서 감소한 CB의 발현이 실시예 1을 투여한 군에서는 약간 증가하는 경향을 나타내었으며, DG 영역의 granule cell에서도 거의 비슷한 경향으로 나타내었다.
- <75> 도 15는 전사수준에서의 7.5 개월 된 Tg-APP/PS mice 각 군의 phosphorylated CREB의 발현을 비교한 경우 해마(Hippocampus)지역에서 관찰한 결과를 나타낸 것으로서, 도 15로부터 CA1, CA3영역의 pyramidal cells와 DG 영역의 granule cell에서의 phospho-CREB의 발현은 Tg 대조군에서 non-Tg 대조군과 비교했을 때 감소되는 것을 알 수 있고, 실시예 1을 투여한 군에서는 non-Tg 대조군과 비슷한 정도로 증가됨을 확인하였다.
- <76> 도 16은 7.5개월 된 Tg-APP/PS mice 각 군의 phosphorylated ERK의 발현을 비교한 것을 나타낸 것으로서, CA1, CA3영역의 pyramidal cells와 DG 영역의 granule cell에서의 phospho-ERK의 발현은 Tg 대조군에서 non-Tg 대조군과 비교했을 때 감소되는 것을 알 수 있고, 실시예 1을 투여한 군에서는 non-Tg 대조군과 비슷한 정도로 증가하는 것을 확인하였다.
- <77> Tg-APP/PS mice같은 경우 뇌영역에서 APP의 효소절단과정에서 ROS가 증가하므로 스트레스가 늘어나게 되는데 이때 뇌신경세포의 세포사멸의 증가가 뚜렷하게 늘어나므로 이를 확인하기 위해 phospho-JNK를 확인하고 그 결과를 도 17에 나타내었다. 도 17에서 보듯이, 7.5개월 된 Tg-APP/PS mice 각 군의 phosphorylated JNK의 발현은 CA1, CA3영역의 pyramidal cells와 DG 영역의 granule cell에서의 phospho-JNK의 발현은 Tg 대조군에서 non-Tg 대조군과 비교했을 때 증가하는 것을 관찰하였고, 본 발명의 생약조성물을 투여한 군에서는 non-Tg 대조군과 비슷한 정도로 감소하는 경향을 확인하였다.
- <78> 또한, 신경전달인자인 BDNF의 발현을 비교 관찰한 것을 도 18에 나타내었는데, 도 18에서 알 수 있듯이 CA1, CA3영역의 pyramidal cells와 DG 영역의 granule cell에서의 BDNF의 발현은 Tg 대조군에서 non-Tg 대조군과 비교했을 때 감소하는 것을 관찰하였고, 본 발명의 생약조성물을 투여한 군에서는 non-Tg 대조군과 비슷한 정도로 증가하는 경향을 나타내었다.
- <79> 이런 결과를 종합해보면, APP의 A β oligomer의 생성이전인 베타 아밀로이드(A β 1-40/42)의 생성은 신경세포의 사멸을 유도하기 위해 phospho-CREB의 감소를 유도하여 phosphorylated ERK발현을 억제시키고, phosphorylated JNK발현을 증가시키는 결과를 초래하므로 세포사멸을 촉진시키는데, 이로 인해 CA1,3영역의 해마부위와 피질영역이 파괴되는 양상을 보이지만 본 발명의 생약조성물을 투여한 경우 Tg-APP/PS mice에서 정상군인 non-Tg 대조군과 유사한 양상으로 상기 단백질의 발현을 촉진하거나 감소시키는 결과로 인해 생존율이 증가되는데 이를 초파리에서 유사한 결과를 나타내었고 해마 세포주에서도 유사한 결과를 나타냄을 알 수 있다.
- <80> 그러므로 본 발명에 따른 생약조성물은 치매 증상의 개선 및 예방을 위한 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.
- <81> 이하 본 발명에 따른 생약제 추출물을 주·부원료로 하여 각종 건강기능식품을 제조할 수 있다.
- <82> <제조예 1> 산제의 제조
- <83> 대한약전 제제총칙중 산제의 제조방법에 따라 1 포당 하기의 성분 함량으로 제조한다.
- <84> 실시예 1에서 제조된 생약 조성물의 건조분말 200 mg
- <85> 유당 100 mg
- <86> 탈크 10 mg
- <87> <제조예 2> 정제의 제조
- <88> 대한약전 제제총칙중 정제의 제조방법에 따라 1정 당 하기의 성분 함량으로 제조한다.
- <89> 실시예 1에서 제조된 생약 조성물의 건조분말.....100 mg
- <90> 옥수수전분 100 mg

- <91> 유당 100 mg
- <92> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <93> <제조예 3> 캡셀제의 제조
- <94> 대한약전 제제총칙중 캡셀제의 제조방법에 따라 1 캡셀당 하기의 성분 함량으로 제조한다.
- <95> 실시예 1에서 제조된 생약 조성물의 건조분말.....100 mg
- <96> 옥수수전분 100 mg
- <97> 유당 100 mg
- <98> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <99> <제조예 4> 액제의 제조
- <100> 대한약전 제제총칙중 액제의 제조방법에 따라 액제 100㎖당 하기의 성분 함량으로 제조한다.
- <101> 실시예 1에서 제조된 생약 조성물의 건조분말.....200 mg
- <102> 이성화당 10 g
- <103> 만니톨 5 g
- <104> 정제수 적량

도면의 간단한 설명

- <105> 도 1은 본 발명에 의한 생약조성물의 신경세포 생존율을 나타낸 것이다.
- <106> 도 2는 본 발명에 의한 생약조성물의 신경세포의 형태학적 현미경 사진이다.
- <107> 도 3은 본 발명의 생약조성물에 의한 신경세포의 ROS양의 변화를 나타낸 것이다.
- <108> 도 4는 본 발명의 생약조성물에 의한 신경세포의 LDH활성도의 변화를 나타낸 것이다.
- <109> 도 5는 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 초파리의 생존율을 나타낸 것이다.
- <110> 도 6은 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 초파리의 비행정도를 나타낸 것이다.
- <111> 도 7은 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 초파리의 비행회수를 나타낸 것이다.
- <112> 도 8은 형질전환 초파리의 결눈의 변화를 나타낸 것이다.
- <113> 도 9는 형질전환 초파리의 결눈에 대한 면역조직화학 분석결과를 나타낸 것이다.
- <114> 도 10은 치매형질전환 생쥐의 약물투여 공정도를 나타낸 것이다.
- <115> 도 11은 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 생쥐 뇌조직에서의 A β 40/42양적변화를 나타낸 것이다.
- <116> 도 12는 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 수컷생쥐 뇌조직에서의 plaque 분포양상을 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 것이다.
- <117> 도 13은 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 암컷생쥐 뇌조직에서의 plaque 분포양상을 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 것이다.
- <118> 도 14는 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 생쥐 뇌조직에서의 calbindin 발현양상을 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 것이다.
- <119> 도 15는 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 생쥐 뇌조직에서의 p-CREB 발현양상을 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 것이다.
- <120> 도 16은 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 생쥐 뇌조직에서의 p-ERK 발현양상을 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 것이다.
- <121> 도 17은 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 생쥐 뇌조직에서의 p-JNK 발현양상을 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 것이다.

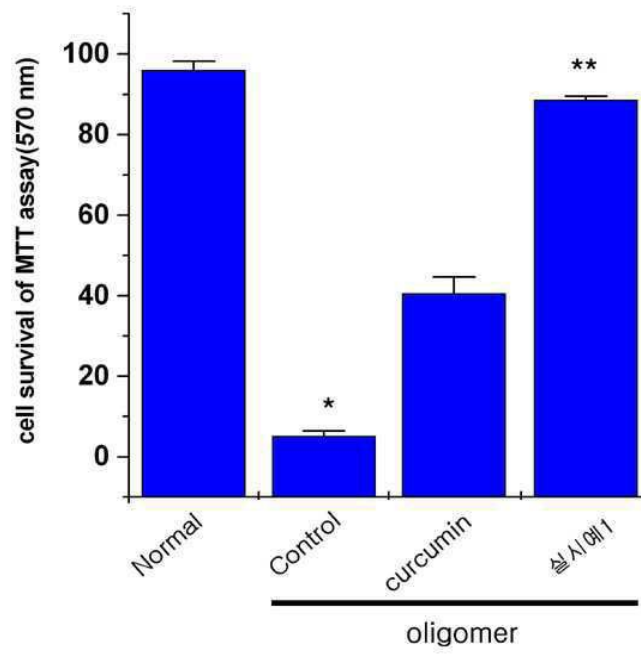
나타낸 것이다.

<122>

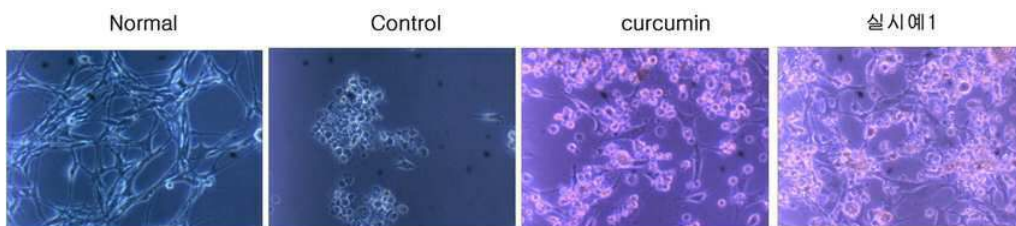
도 18은 본 발명의 생약조성물에 의한 형질전환 생쥐 뇌조직에서의 BDNF 발현양상을 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 것이다.

도면

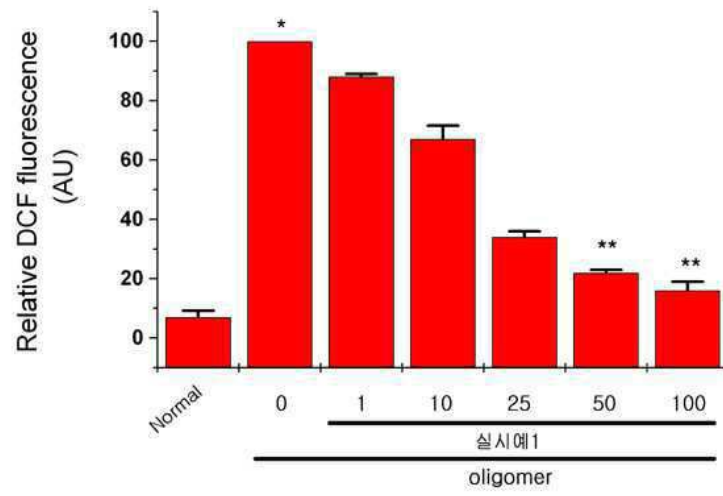
도면1



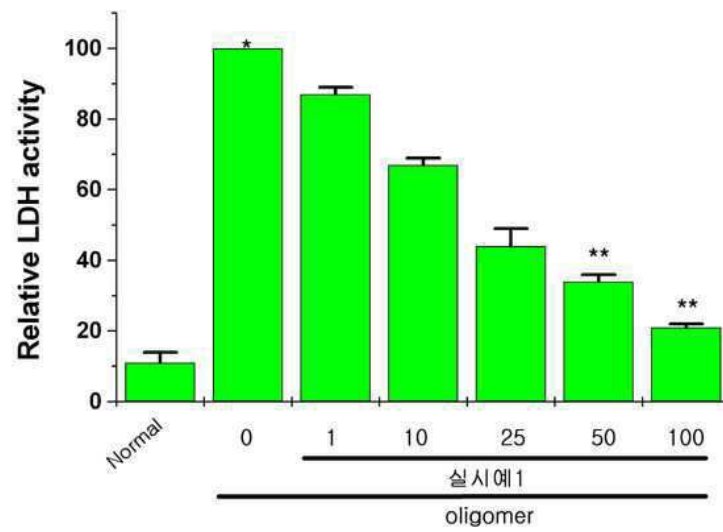
도면2



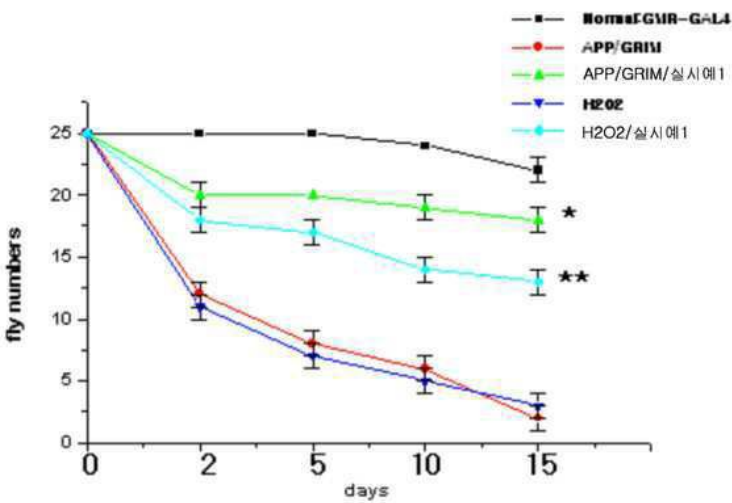
도면3



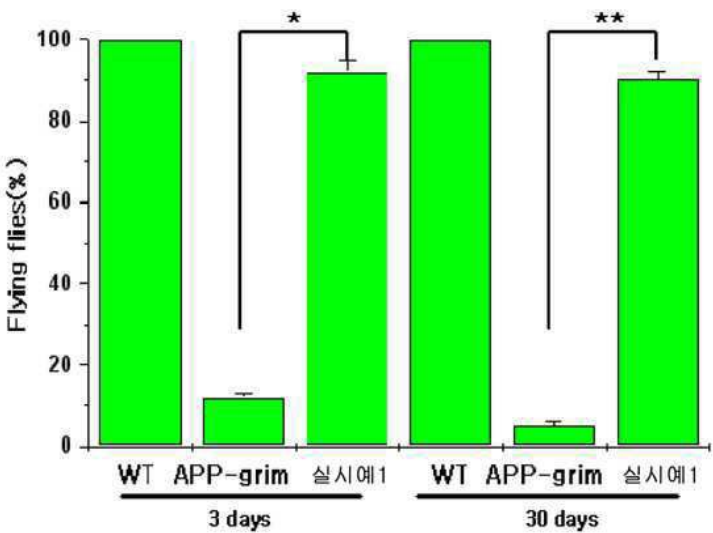
도면4



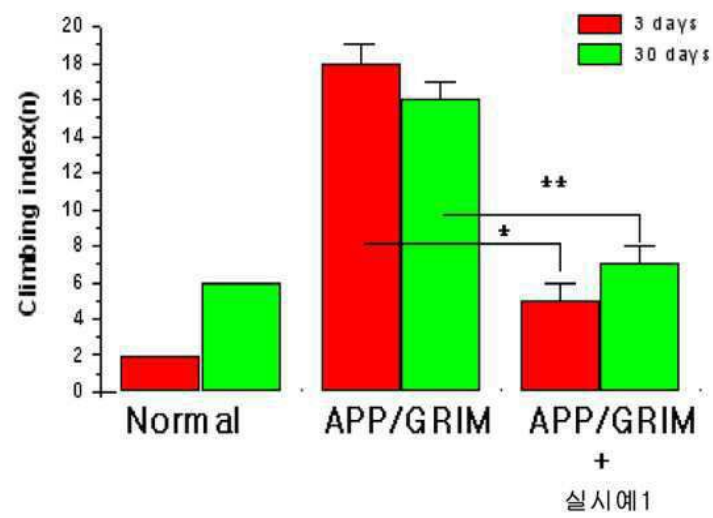
도면5



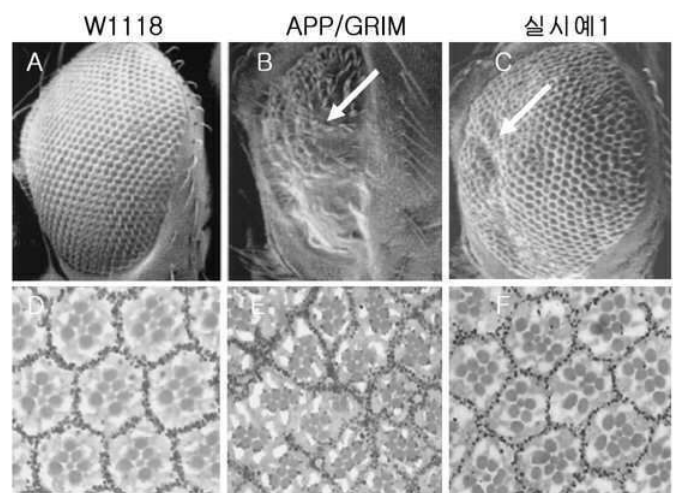
도면6



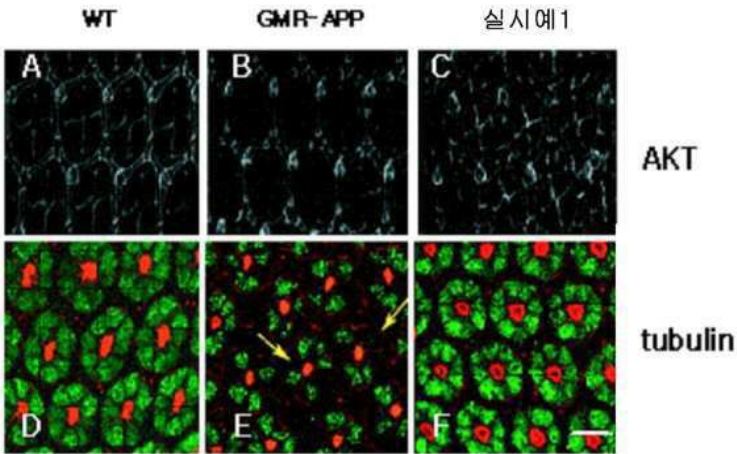
도면7



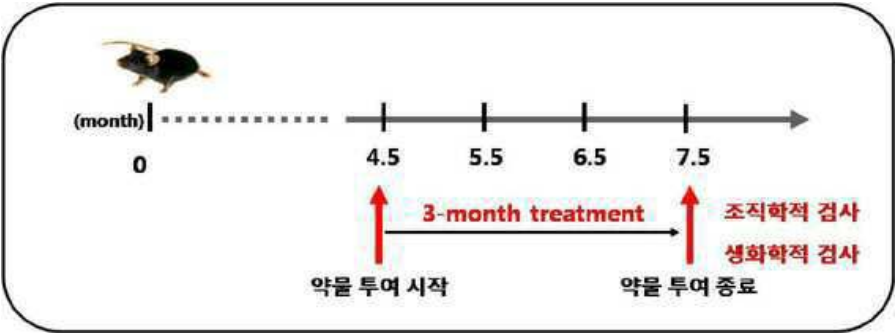
도면8



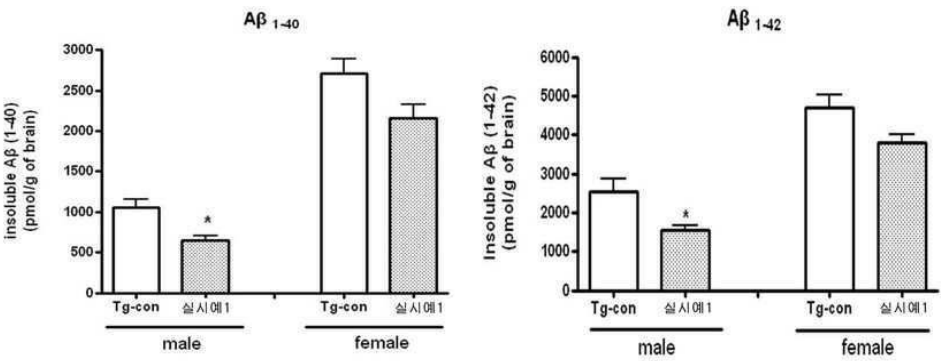
도면9



도면10

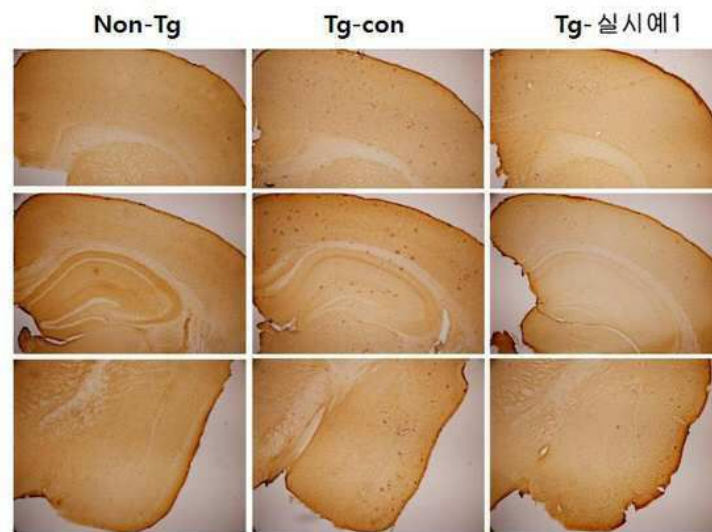


도면11



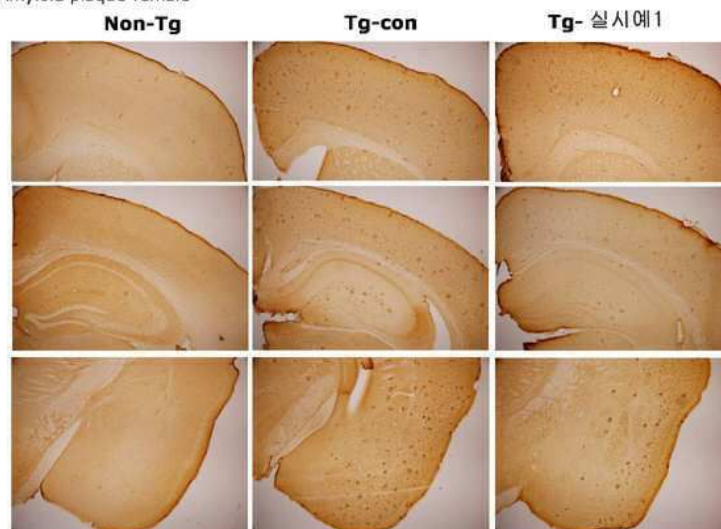
도면12

Amyloid plaque-male

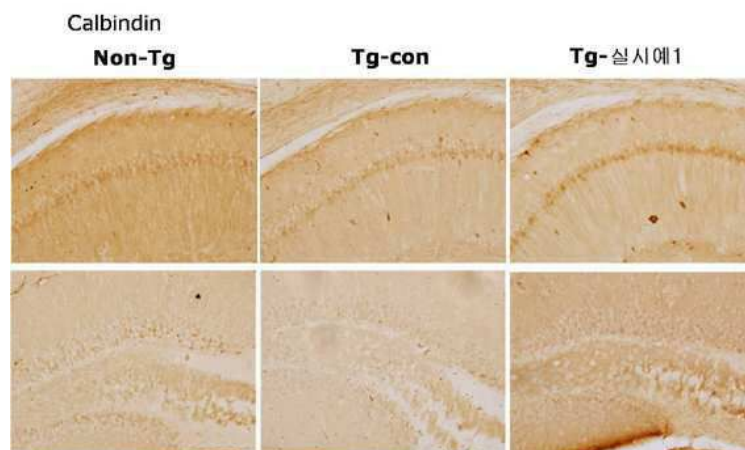


도면13

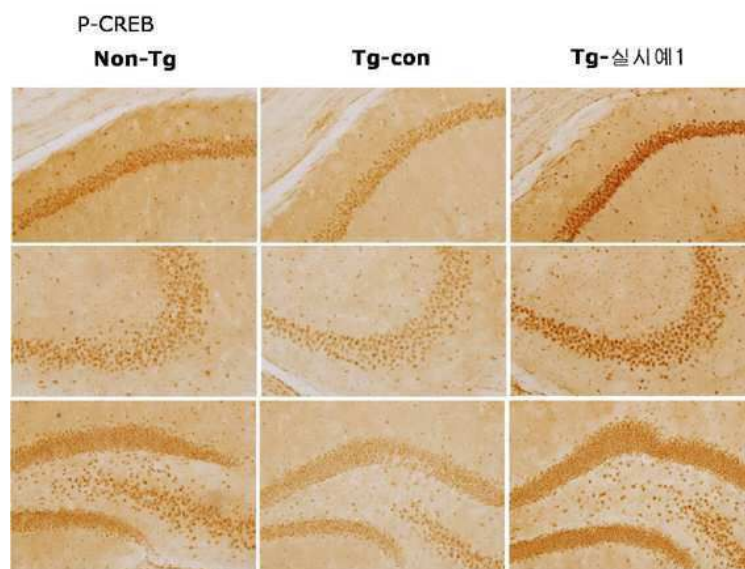
Amyloid plaque-female



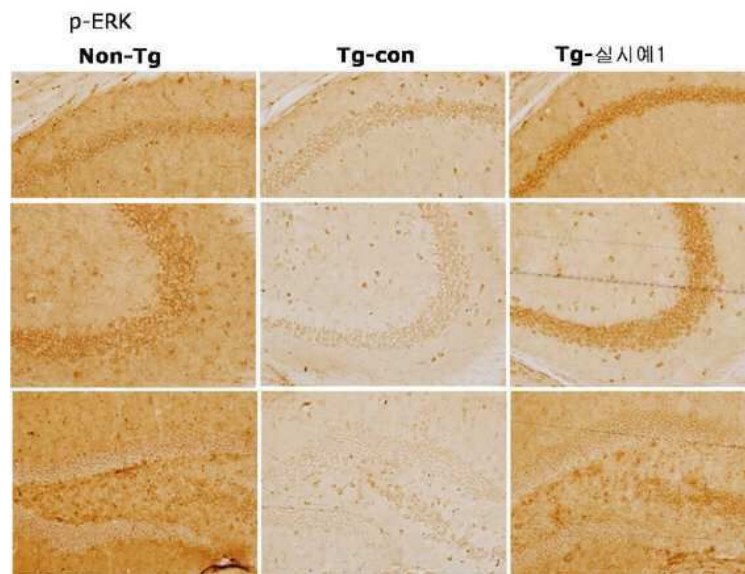
도면14



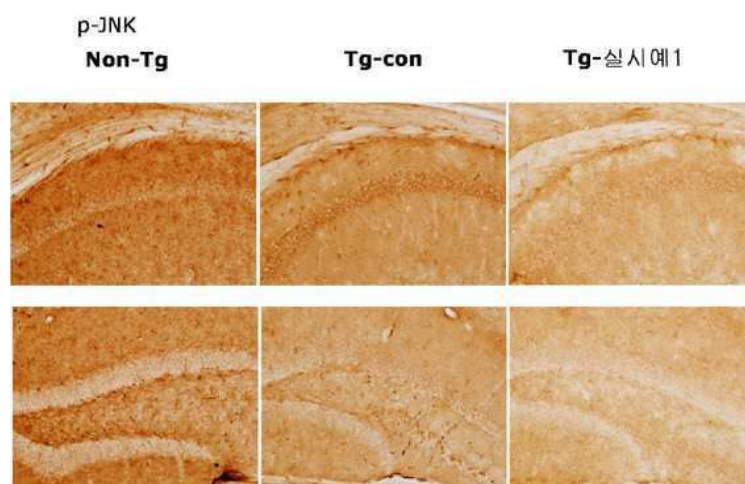
도면15



도면16



도면17



도면18

