



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0138323
(43) 공개일자 2022년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/899 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/899 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-0123770
(22) 출원일자 2021년09월16일
심사청구일자 2021년09월16일
(30) 우선권주장
1020210043783 2021년04월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
양선아
경상북도 칠곡군 왜관읍 아곡5길 79, 동호빌리지
A동
박세호
대구광역시 달서구 장산남로 33, 103동 1003호(용
산동, 용산롯데캐슬그랜드)
이재열
대구광역시 남구 자유5길 72(대명동)
(74) 대리인
특허법인태백

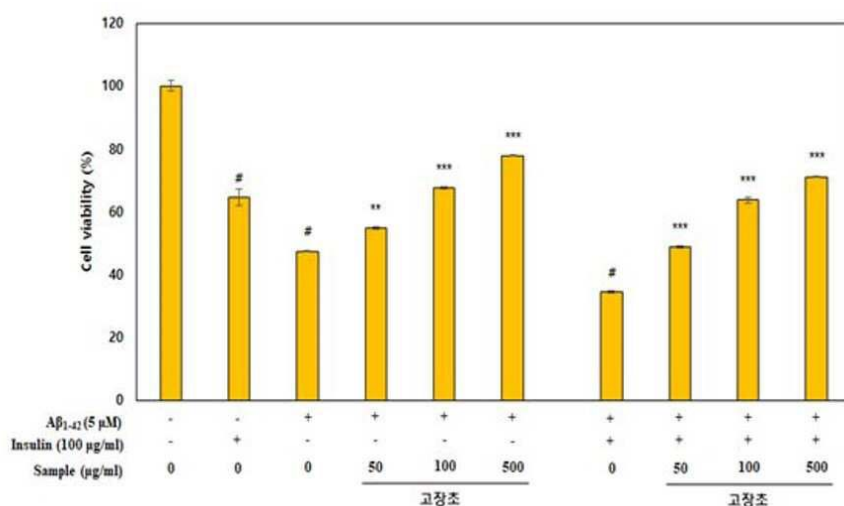
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 노화가 유도된 C6 세포에 인슐린과 β -아밀로이드를 처리하여 손상을 유도한 후 고장초 추출물에 의한 세포 보호 효과를 확인한 결과, 고장초 추출물은 세포 독성 없이 인슐린과 β -아밀로이드 처리된 세포의 세포 생존율을 증가시키는 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 퇴행성 뇌질환 치료제로 제공될 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345319955
과제번호	2018R1D1A1A02048746
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	퇴행성 뇌질환 예방 식용소재물질 평가를 위한 aquaporin 4 기반 in vitro 시스템
구축 및 적용 연구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 고장초 추출물은 C1 내지 C4의 알코올, 물 또는 이들의 혼합용매에 의해 추출되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 노인성 치매, 알츠하이머, 파킨슨병, 헌팅턴병, 피크병, 아밀로이드 성 뇌졸중 및 크로이츠펔트-야콥병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 고장초 추출물은 AQP4, GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 고장초 추출물은 β -아밀로이드 펩타이드의 축적 및 정상세포의 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생명과학 및 의학의 급속한 발전으로 인간의 평균 수명이 늘어나며, 장노년 인구의 비중이 점차 늘어남에 따라 새로운 사회적 문제들이 부각되고 있다. 특히 노인성 신경계 질환들, 특히, 뇌졸중 (stroke), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease, PD)은 치명적인 신경계의 기능장애로 나타나는데, 이를 막을 수 있는 효과적인 방법이 없는 현 실정에서는 삶의 질저하 및 막대한 의료비의 지출 등으로 주변 가족에게 상당한 정신적인 부담을 주고 있다.

[0003] 알츠하이머 병의 경우 60세 이상의 노인 중 2%에서 나타나고 있으며 이로 인해 미개발 국가로의 의료기술이 확산되고 있으나 노년인구의 증가로 2025년에는 약 2003 만명의 환자가 발생할 것으로 예상되고 있다 (<http://www.alz.co.uk/>). 뇌졸중의 경우 2025 년에 약 1500 만명의 환자가 발생할 것으로 추정된다. 미국의 경우 1997년에 400 만명의 AD 환자와 300 만명의 뇌졸중 환자가 보고되어 약 \$1,300억이 소요되었는데, 이를 토대로 추정해 보면 상기 두 질환으로 인한 의료경비는 2003년에 약 \$4,000억 (520조원)이 필요하다. 국내에서도 장노년층에서 발생하는 뇌질환이 사망의 주 원인이 되는데, 국가 경제 및 의학의 발전과 함께 더욱 심각한 경제적 문제로 대두될 것은 명확하다.

[0004] 뇌신경 질환인 알츠하이머 질환 (Alzheimer's Disease: 이하 "AD"라 칭함)은 점진적인 신경세포의 퇴화로 인해 인지능력 상실을 가져오는 치매의 50에서 70%를 차지하는 가장 일반적인 질병이다. AD는 뇌에 존재하는 판단,

기억, 언어기능을 담당하는 부분에 손상이 생겨서 기억력이 없어지고, 의식의 불분명해지며, 사고력, 계산력, 판단력, 상식 등의 대뇌기능이 장애를 나타내기 때문에 직업 및 일상 사회생활을 하기 어려워지게 된다.

[0005] AD로 사망한 환자의 두뇌에서는 노인성 플라그(senile plaque)와 신경원섬유의 엉킴(neurofibrillary tangles)이 병리학적 특성으로 나타난다. 노인성 플라그는 세포 외부에 단백질과 죽은 세포 등이 축적되어 형성되는 것으로, 주 구성 성분은 β -아밀로이드(β -amyloid)라는 펩티드이다. 그리고 응집체의 주요 구성 요소는 타우(Tau)라 부르는 단백질의 한 형태이다. 타우 단백질은 중추신경계에서 서로 붙어서 신경세포의 내부구조를 단단하게 하는 구조물 역할을 한다. 하지만, 치매 환자의 뇌에서는 이런 타우 단백질이 화학적으로 변성을 일으키고 마치 실타래기에 얽히듯이 서로 얽혀서 제 역할을 못하게 된다. 이로 인해 타우 단백질은 서로 떨어져 신경세포 사이의 연결을 떨어뜨리게 되고 결국 신경세포는 죽게 된다.

[0006] 현재까지 AD에 관한 연구는, 주로 β -아밀로이드 생성 억제제 또는 항산화제 같은 신경세포 독성 저해제들을 이용한 AD 예방 및 치료제가 개발되었다. 현재 니코틴 수용체 작용제(Nicotin receptor agonist)인 ABT-418; 무스카린 수용체 작용제(Muscarin receptor agonist)인 자노멜린(Xanomeline), YM-976; 아세틸콜린 전구체인 레시틴(Lecithin), 아세틸-L-카니틴(Acetyl-L-carnitine); 금속 킬레이터(Metal chelator)인 데스페리옥사민(Desferrioxamine), 리오퀴놀(Lioquinol); 베타-시트 차단제(Beta-sheet breaker)인 $iA\beta 5$, $iA\beta 11$; 항산화제(Antioxidant)인 비타민 E(Vitamine E), 은행잎추출물(Ginkgo Biloba), 멜라토닌(Melatonin), 아이디비논(Idebenone); sAPP 방출제(releasing agent)인 니코틴(Nicotine), 아세틸콜린(Acetylcholine), 카바콜(Cabachol); β 세크레타제 또는 γ 세크레타제 억제제(inhibitor)인 OM99-1, OM99-2, OM99-3, Z-VLL-CHO; 항염증제(Anti inflammatory agent)인 NSAID(Ibuprofen, Indomethacine); 호르몬(Horemone)인 에스트로겐(Estrogen); 백신인 AN-1792; 콜레스테롤(Cholesterol) 저하제인 심바스타틴(Simvastatin), 아트로바스타틴(Atrovastatin) 등이 개발되고 있으나, 이들의 효과는 약간의 병리적 증상을 완화 또는 진행 정도를 늦추는 정도이거나, 자체의 독성 때문에 실제 적용이 어려운 물질이 대부분이어서 안정적인 AD 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제10-2017-0006968호 (2017.01.18. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 생체 안정성이 우수하며, 효과적인 퇴행성 뇌질환 치료제를 제공하기 위해, 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강식품으로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 노화가 유도된 C6 세포에 인슐린과 β -아밀로이드를 처리하여 손상을 유도한 후 고장초 추출물에 의한 세포 보호 효과를 확인한 결과, 고장초 추출물은 세포 독성 없이 인슐린과 β -아밀로이드 처리된 세포의 세포 생존율을 증가시키는 효과를 나타내었으며, 알츠하이머가 유도된 동물모델에서 β -아밀로이드 펩타이드의 축적 및 정상세포의 사멸을 억제시키는 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 퇴행성 뇌질환 치료제로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 C6 세포 (cell passage 75)에서 고장초 처리에 따른 세포 생존율을 확인한 결과이다.
- 도 2는 계대배양에 의해 세포 노화가 유도되고 인슐린 (100 $\mu\text{g/ml}$)과 β -아밀로이드 (5 μM) 처리에 의해 세포 손상이 유도된 C6 세포에서 고장초 추출물 (50, 100 및 500 $\mu\text{g/ml}$) 처리에 의한 세포 생존율을 확인한 결과이다.
- 도 3은 계대배양에 의해 세포 노화가 유도되고 인슐린 (100 $\mu\text{g/ml}$)과 β -아밀로이드 (5 μM) 처리에 의해 세포 손상이 유도된 C6 세포에서 50 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 고장초 추출물 처리 후 AQP4, GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현 수준 변화를 확인한 결과이다.
- 도 4는 고장초 에탄올 추출물의 ACh 함량 및 AChE 활성을 스코폴라민 유도 건망증 동물모델 (N: normal, C: control, PC: donepezil(5 mg/kg), Z100: 고장초 에탄올 추출물(100 mg/kg), Z300: 고장초 에탄올 추출물 (300 mg/kg))에서 확인한 결과이다.
- 도 5는 고장초 에탄올 추출물이 경구투여된 스코폴라민 유도 기억장애 동물모델의 조직학적 분석을 수행한 결과로, 뇌 조직 절편을 헤마톡실린&에오신 염색 후 조직변화를 $\times 40$ (upper panels) 및 $\times 100$ (lower panels)로 확인한 결과이다. (N: normal, C: control, PC: donepezil(5 mg/kg), Z100: 고장초 에탄올 추출물(100 mg/kg), Z300: 고장초 에탄올 추출물 (300 mg/kg))
- 도 6은 스코폴라민 유도 기억장애 동물모델에서 고장초 에탄올 추출물의 A β 1-42 펩타이드 축적 억제 효과를 확인한 결과로, 뇌 조직 절편을 콩고레드 염색하여 A β 1-42 펩타이드 축적 변화를 $\times 40$ (upper panels) 및 $\times 100$ (lower panels)로 확인한 결과이다. (N: normal, C: control, PC: donepezil(5 mg/kg), Z100: 고장초 에탄올 추출물(100 mg/kg), Z300: 고장초 에탄올 추출물 (300 mg/kg))
- 도 7은 스코폴라민 유도 기억장애 동물모델에서 고장초 에탄올 추출물의 정상교세포 활성을 확인한 결과로, β -액틴을 내부대조군으로 사용한 웨스턴 블롯 분석 결과이다. (N: normal, C: control, PC: donepezil(5 mg/kg), Z100: 고장초 에탄올 추출물(100 mg/kg), Z300: 고장초 에탄올 추출물 (300 mg/kg))
- 도 8은 스코폴라민 유도 기억장애 동물모델에서 고장초 에탄올 추출물의 A β 1-42 펩타이드 제거 효과를 확인한 결과로, β -액틴을 내부 대조군으로 사용한 웨스턴 블롯 분석결과이다. (N: normal, C: control, PC: donepezil(5 mg/kg), Z100: 고장초 에탄올 추출물(100 mg/kg), Z300: 고장초 에탄올 추출물 (300 mg/kg))

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0014] 본 발명의 발명자들은 노화가 유도된 C6 세포에 인슐린과 β -아밀로이드를 처리하여 손상을 유도한 후 고장초 추출물에 의한 세포 보호 효과를 확인한 결과, 고장초 추출물은 세포 독성 없이 인슐린과 β -아밀로이드 처리된 세포의 세포 생존율을 증가시키는 효과를 나타내었으며, 알츠하이머가 유도된 동물모델에서 β -아밀로이드 펩타이드의 축적 및 정상세포의 사멸을 억제시키는 효과를 나타내는 것이 확인함에 따라 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 본 발명은 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0017] 상기 고장초 추출물은 C1 내지 C4의 알코올, 물 또는 이들의 혼합용매에 의해 추출되는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 70% 에탄올 수용액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 상기 퇴행성 뇌질환은 노인성 치매, 알츠하이머, 파킨슨병, 헌팅턴병, 피크병, 아밀로이드성 뇌졸중 및 크로이츠펠트-야콥병으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 고장초 추출물은 AQP4, GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 아쿠아포린-4(aquaporin-4, AQP4)는 물 수송 막단백질로 알려져 있으며, 최근 연구에 의하면 정상 세포의 막단백질로써 베타 아밀로이드의 제거 또는 글루타메이트의 흡수에 기여하여 신경세포를 보호하는 효과를 나타내는 것으로 보고되어졌으며, 정상세포가 손상된 신경세포를 복구시키고 새로운 신경세포를 생성한다는 것이 밝혀져 in vivo 연구에서 치매, 뇌졸중 후유증 등의 뇌 손상에 대한 AQP4의 역할 연구가 활발히 이루어지고 있다.

- [0021] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 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 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0025] 상기 고장초 추출물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명은 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.
- [0028] 상기 건강식품은 상기 고장초 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0029] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0030] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.
- [0032] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0034] <실험예>

[0035] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0037] 1. 고장초 추출물의 제조

[0038] 건조 상태의 고장초를 세절하여 70% 주정으로 80℃에 6시간 추출하였다. 추출한 시료는 부직포로 여과한 후 고속 추출 농축기를 이용하여 농축한 다음 동결 건조하여 분석용 시료로 사용하였다.

[0040] 2. 응집된 β -아밀로이드 (β -amyloid) 제조

[0041] β -아밀로이드(Abcam, ab120301)를 250 μ M로 제조하여 37℃의 조건에서 3일간 방치하여 응집(aggregation)을 유도하여 사용하였다.

[0043] 3. 세포배양

[0044] C6 세포 (ATCC, CCL-107)를 DMEM (with FBS, antibiotics)에 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하여 사용하였으며, 모든 실험에서 세포 계대 (cell passage)는 #75로 고정하였다.

[0046] 4. 스코폴라민 (Scopolamine)에 의해 노화가 유도된 마우스 모델에서 고장초 추출물의 활성 확인

[0047] 4-1. 실험 동물

[0048] 12주령 Balb/cJ계 수컷을 오리엔트 바이오(Seongnam-si, Korea)로부터 수입, 분양 받아 일주일간 검역과 순화, 사육을 거친 동물을 선정하여 체중에 따라 임의로 각 군당 7마리씩 4군으로 나누어 실험에 사용하였다(IRB 승인 번호: SEMI-21-003). 실험군은 대조군, 스코폴라민 투여군, 양성대조군(donepezil; 5 mg/kg) 및 고장초 추출물 투여군(100, 300 mg/kg)으로 나누었다. 식이와 물은 자유섭취 방법으로 급여하였으며, 실험실의 사육조건은 온도 20±2℃, 습도 50±5%, 명암은 12시간(08:00~20:00)을 주기로 자동 조절되었다.

[0050] 4-2. 약물투여

[0051] 고장초 추출물(100, 300 mg/kg)을 경구투여 하였으며, 스코폴라민(3 mg/kg, i.p.)과 함께 투여한 도네페질(donepezil, 5 mg/kg, p.o.)은 항치매제로 양성 대조군으로 사용하였다. 스코폴라민은 1주 순화 이후 7일 동안 하루에 한번씩 투여를 진행하였으며, 고장초 추출물(100, 300 mg/kg)은 스코폴라민 처리와 동시에 투여 진행하였다. 도네페질(5 mg/kg, i.p.)은 희생하기 30분 전에 투여하였다. 대조군은 동량의 생리식염수만을 투여하였으며, 모든 동물은 시험 종료 후 희생하였다.

[0053] 4-3. 아세틸콜린 (Acetylcholine) 함량 및 아세틸콜린 에스테라아제 (acetylcholine esterase) 활성 억제

[0054] 각 군의 개체의 해마 조직에서의 acetylcholine(ACh) 함량 및 acetylcholine esterase(AChE) 활성 측정은 ACh ELISA kit(MBS284198, MyBioSource, San Diego, CA, USA)와 AChE ELISA kit((MBS285759, MyBioSource, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 동일한 무게의 조직 샘플을 1.5 ml 튜브에 옮겨 담은 후, cold PBS를 넣고 homogenizer pestle을 이용하여 분쇄를 하였다. 분쇄된 뇌 조직샘플은 원심분리(13,000 rpm, 4℃, 15분)한 후, 상층액 분리하여 사용하였다. 모든 실험은 매뉴얼을 참조하여 진행하였다.

[0056] 4-4. 헤마톡실린&에오신 (H&E) 염색

[0057] 뇌의 해마를 분리한 후 절취한 해마조직을 10% 포르말린 (formalin)과 반응시켜 조직을 고정하고 수세한 후, 60%, 80% 및 100% 알코올을 순차적으로 반응시켜 탈수하였다. 그 후, 파라핀에 포매하고 block을 제조하였다. Rotary microtome을 사용하여 뇌의 해마 조직을 5 μ m의 두께로 절편을 제조한 후, 헤마톡실린 & 에오신으로 염색한 후 광학현미경(Nikon Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

[0059] 4-5. 콩고레드 (Congo Red) 염색

[0060] A β 1-42 펩타이드의 축적 변화를 관찰하기 위해 조직표본을 PBS에 2회 씻은 후 젤라틴이 코팅된 슬라이드에 고정시켜 24시간 동안 실온에서 건조시켰다. 이 후 콩고레드 용액(0.5% in 50% EtOH)에서 20분 동안 염색하고 증류수를 이용하여 수세 작업을 거쳤다. 발색의 조절은 alkaline alcohol solution(1% in 50% EtOH)를 사용하였고 수세, 탈수, 봉입 과정을 거쳐 조직 표본을 제작 및 관찰하였다.

[0062] 4-6. 웨스턴 블롯 분석 (Western blot analysis)

[0063] 뇌 조직을 T-PERTM tissue protein extraction reagent에 넣고 homogenizer를 사용하여 균질하게 녹였다. 이후 원심분리(13,000 rpm, 4℃, 10분)하여 단백질을 분리하였으며, 단백질의 정량은 BCA protein assay를 이용하였다. Tissue protein(20 μ g)을 12% SDS polyacrylamide gel에 loading하고 SDS-PAGE(120 V, 1시간 20분)를 수행하였다. SDS-PAGE 이후 겔 상의 단백질을 PVDF membrane에 옮기고 5% skimmed milk(with TBST buffer)에 1시간 동안 블로킹하였다. Membrane을 A β 1-42(1:200 dilution), AQP4(1:200 dilution), ApoE4(1:200 dilution), BDNF(1:500 dilution), GFAP(1:200 dilution), IDE(1:200 dilution), MMP-2(1:200 dilution), MMP-9(1:200 dilution), LRP1(1:500 dilution) 및 β -actin(1:1,000 dilution)에 넣고 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체의 반응 이후 TBST buffer를 이용하여 3회 세척하고 2차 항체에 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 각 단백질 밴드는 image software(UVP Vision Works[®] LS Image Acquisition & Analysis Software)를 이용하여 정성 및 정량하였다.

[0065] <실시예 1> 인슐린 및 β -아밀로이드에 의해 손상이 유도된 노화 세포에 대한 고장초 추출물의 세포 보호 효과 확인

[0066] 계대배양을 통하여 노화를 유도시킨 C6 세포 (1×10^5 cells/well)을 6 웰 배양 플레이트에 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 인슐린 (100 μ g/ml)과 β -아밀로이드 (5 μ M)를 고장초 추출물 (50, 100 및 500 μ g/ml)과 함께 처리한 후 48시간 동안 배양하였다.

[0067] 배양 후 MTT 용액 (final concentration: 500 μ g/ml)을 각 웰에 처리하여 4시간 반응시키고 상등액을 제거한 후 DMSO로 생성된 포르마잔을 용해시키고, ELISA reader 기기를 이용하여 550 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 세포 생존도 (cell viability)를 확인하였다.

[0068] 그 결과, 도 1과 같이 고장초 단독 처리군에서는 노화된 C6 세포의 세포 사멸이 나타나지 않았다. 또한, 도 2와 같이 인슐린 단독 처리군 및 인슐린과 β -아밀로이드 병용 처리군에서는 세포사멸이 확인된 반면, 고장초 추출물이 함께 처리된 실험군에서는 세포생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0070] <실시예 2> 인슐린 및 β -아밀로이드에 의해 손상이 유도된 노화 세포에 대한 고장초 추출물 처리에 따른 유전자 발현 확인

[0071] 계대배양을 통하여 노화를 유도시킨 C6 세포 (1×10^5 cells/well)을 6 웰 배양 플레이트에 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 인슐린 (100 μ g/ml)과 β -아밀로이드 (5 μ M)를 고장초 추출물 (50 및 500 μ g/ml)과 함께 처리한 후 48시간 동안 배양하고 AQP4, GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현 변화를 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다.

[0072] ThermoFisher Scientific 사의 Mem-PERTM Plus Membrane Protein Extraction Kit를 사용하여 AQP4 및 LRP1의 발현(100 μ g)을 확인하였으며, RIPA 용해 버퍼로 전체 단백질을 추출하여 GFAP, BDNF, MMP-2 및 MMP-9의 발현 (50 μ g)을 확인하였다. 단백질의 정량은 BCA assay로 확인하였으며 분해된 단백질을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하였다 (120 V, 1시간). PVDF 막에 옮기고 (100V, 1시간), 3% 탈지유 용액(skim milk solution)에 블로킹하였다. 이 후, AQP4 (cell signaling, #59678, 1:500 dilution), GFAP (cell signaling, #80788, 1:500 dilution), BDNF (Abcam, ab108319, 1:500 dilution), LRP1 (cell signaling, #64099, 1:500 dilution), MMP-2 (Abcam, ab86607, 1: 500 dilution), MMP-9 (Abcam, ab38898, 1:500 dilution) 및 β -actin (cell

signaling, #3700, 1:1000 dilution) 1차 항체와 하루 동안 반응시켰다. TBS-T 용액으로 3회 세척하고 2차 항체 (rabbit, cell signaling, #7074, 1:5,000 dilution 또는 mouse, cell singaling, #7076, 1:5,000 dilution)를 1시간 동안 상온에서 반응시키고, TBS-T 용액으로 3회 세척하였다.

[0073] 이후 ThermoFisher scientific 사의 SuperSignal Chemiluminescent Substrates를 선반응시키고 Chemidoc (UVP Vision Works® LS Image Acquisition & Analysis Software, Upland, CA)으로 단백질의 발현을 정성 및 정량하여 확인하였다.

[0074] 그 결과, 도 3과 같이 인슐린과 β -아밀로이드가 처리된 세포군에서는 AQP4, GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현 감소가 확인된 반면, 고장초 추출물이 함께 처리된 세포군에서는 AQP4, GFAP 및 BDNF의 발현이 증가가 확인됨에 따라, 정상세포 특성과 노화가 회복 효과가 확인되었으며, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현 증가가 나타나며 β -아밀로이드의 축적 억제 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] <실시예 3> 기억장애가 유도된 마우스 모델에서 고장초 추출물의 투여에 따른 ACh 함량 및 AChE 활성 저해 효과 확인

[0077] 스코폴라민으로 건망증이 유도된 마우스 모델에서 고장초 추출물 투여에 따른 ACh 함량 및 AChE 활성 저해 효과를 확인하였다.

[0078] 그 결과, 도 4와 같이 스코폴라민 처리에 의해 ACh의 함량은 121.6 pg/ml로 normal 군과 비교하여 47.3% 감소하였으며, 고장초 추출물의 함량이 증가함에 따라 스코폴라민 군과 비교하여 ACh의 함량이 증가하는 것을 확인하였다(Z100; 30.6%, Z300; 47.2%). 또한, AChE의 활성도 동일하게 스코폴라민 처리에 의해 증가하였으며(1.9 mg/ml), 고장초 추출물의 투여 농도에 따라 AChE의 활성이 유의적으로 감소함을 보였다 (스코폴라민 군과 비교하여 Z100; 21.7%, Z300; 36.5%).

[0080] <실시예 4> 기억장애가 유도된 마우스 모델에서 고장초 추출물의 투여에 따른 해마 조직 사멸 억제 효과 확인

[0081] 스코폴라민 처리에 의해 알츠하이머(AD)가 유도된 생쥐 뇌 조직에서 고장초 추출물 투여에 따른 세포사멸 정도를 정성적으로 확인하기 위해 H&E 염색을 수행하였다.

[0082] 그 결과, 도 5와 같이 스코폴라민 군에서는 전반적으로 뇌 조직의 사멸을 관찰할 수 있었으며, 고장초 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 뇌 조직의 사멸이 예방되는 것을 확인하였다

[0083] 상기 결과로부터 고장초 추출물에 의해 뇌 조직이 보호되는 것을 확인할 수 있었다.

[0085] <실시예 5> 기억장애가 유도된 마우스 모델에서 고장초 추출물의 투여에 따른 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드 축적 억제 효과 확인

[0086] 고장초 추출물 처리가 스코폴라민 처리에 의해 알츠하이머(AD)가 유도된 생쥐 뇌에서 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드의 축적에 미치는 영향을 확인하기 위해, 콩고레드 염색 (Congo Red staining)을 수행하였다.

[0087] 그 결과, 도 6과 같이 스코폴라민 처리에 의해 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드가 축적되는 것이 확인되었으며, 고장초 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드의 축적 억제를 확인할 수 있었다.

[0088] 상기 결과로부터 고장초 추출물은 뇌 조직 내 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드의 축적을 효과적으로 억제시키는 것이 확인되었다.

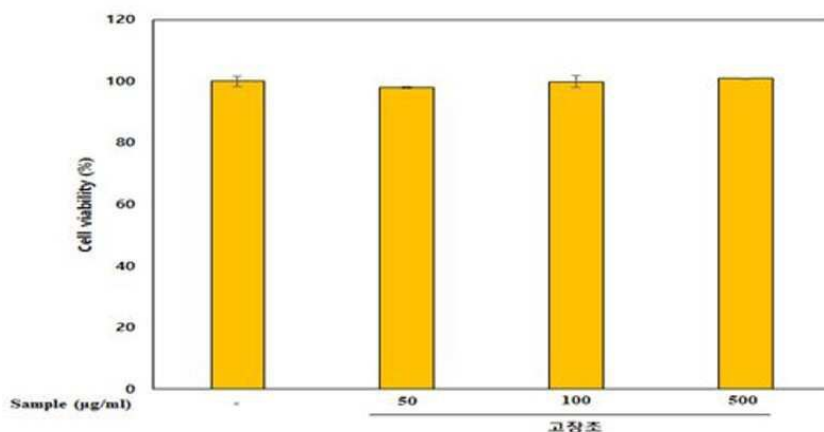
[0090] <실시예 6> 기억장애가 유도된 마우스 모델에서 고장초 추출물의 투여에 따른 AQP4, GFAP, BDNF 단백질 발현

[0091] 스코폴라민 처리에 의해 알츠하이머(AD)가 유도된 생쥐에 고장초 추출물을 투여하였을 때 성상교세포 (astrocyte) 기능의 회복을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 AQP4, GFAP, BDNF의 단백질 발현을 확인하였다.

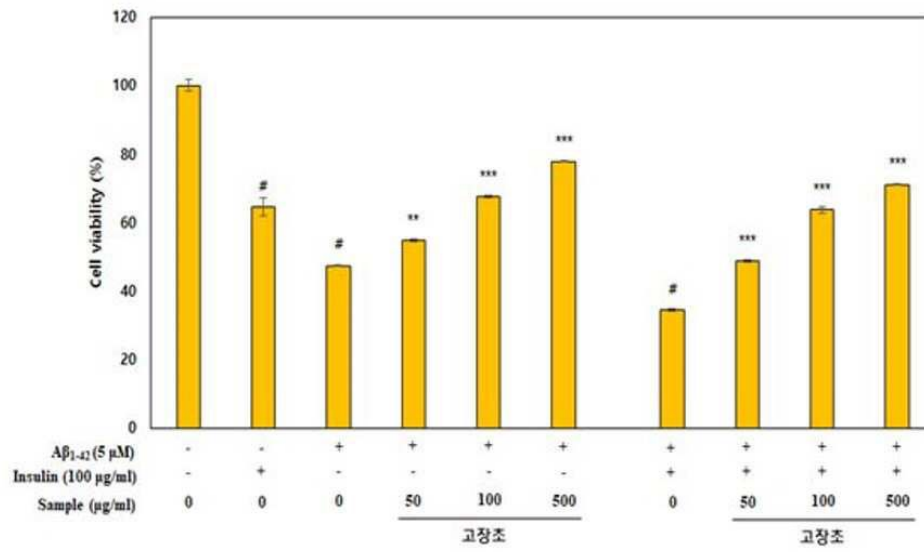
- [0092] 그 결과, 도 7과 같이 스코폴라민 군에서는 AQP4, GFAP, BDNF의 단백질 발현은 감소하였다. 그러나 고장초 추출물 처리군에서는 고장초 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 스코폴라민 군과 비교하여 AQP4, GFAP 및 BDNF의 단백질 발현은 효과적으로 증가하였다(100 mg/kg의 고장초 추출물 투여군과 300 mg/kg의 고장초 추출물 투여군에서 각각 AQP4; 0.56배, 1.10배, GFAP; 0.86배, 1.17배, BDNF; 0.62배, 0.96배).
- [0093] 상기 결과로부터 스코폴라민에 의해 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드 축적이 유도된 생쥐 뇌에서 기능 저하를 나타내는 정상교세포의 기능을 고장초 추출물이 회복시킴으로써 효과적으로 $A\beta_{1-42}$ 를 제거하는 것이 확인되었다.
- [0095] <실시예 7> 기억장애가 유도된 마우스 모델에서 고장초 추출물의 투여에 따른 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드, ApoE4, IDE, LRP1, MMP-2 및 MMP-9 단백질 발현 확인
- [0096] 스코폴라민 처리에 의해 알츠하이머(AD)가 유도된 생쥐에 고장초 추출물을 투여하였을 때, $A\beta_{1-42}$ 제거 시스템의 예방 또는 완화를 확인하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드, ApoE4, IDE, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 단백질 발현을 확인하였다.
- [0097] 그 결과, 도 8과 같이 스코폴라민 군에서는 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드와 ApoE4의 단백질 발현이 증가하였으며, IDE, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 단백질 발현은 감소하였다. 반면, 고장초 추출물은 처리 농도가 증가함에 따라 스코폴라민 군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드, ApoE4의 단백질 발현이 유의적으로 감소하였으며(100 mg/kg의 고장초 추출물 투여군과 300 mg/kg의 고장초 추출물 투여군에서 각각 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드; 2.26배, 1.15배, ApoE4; 1.89배, 0.66배), IDE, LRP1, MMP-2, MMP-9의 단백질 발현은 scopolamine 군과 비교하여 효과적으로 증가하였다(100 mg/kg의 고장초 추출물 투여군과 300 mg/kg의 고장초 추출물 투여군에서 각각 IDE; 0.52배, 0.85배, LRP1; 0.74배, 1.07배, MMP-2; 0.55배, 0.75배, MMP-9; 0.78배, 1.26배).
- [0098] 상기 결과로부터 스코폴라민에 의해 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드의 축적이 유도된 생쥐 뇌에서 고장초 추출물에 의해 $A\beta_{1-42}$ 제거 시스템이 회복되는 것이 확인되었다.
- [0100] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

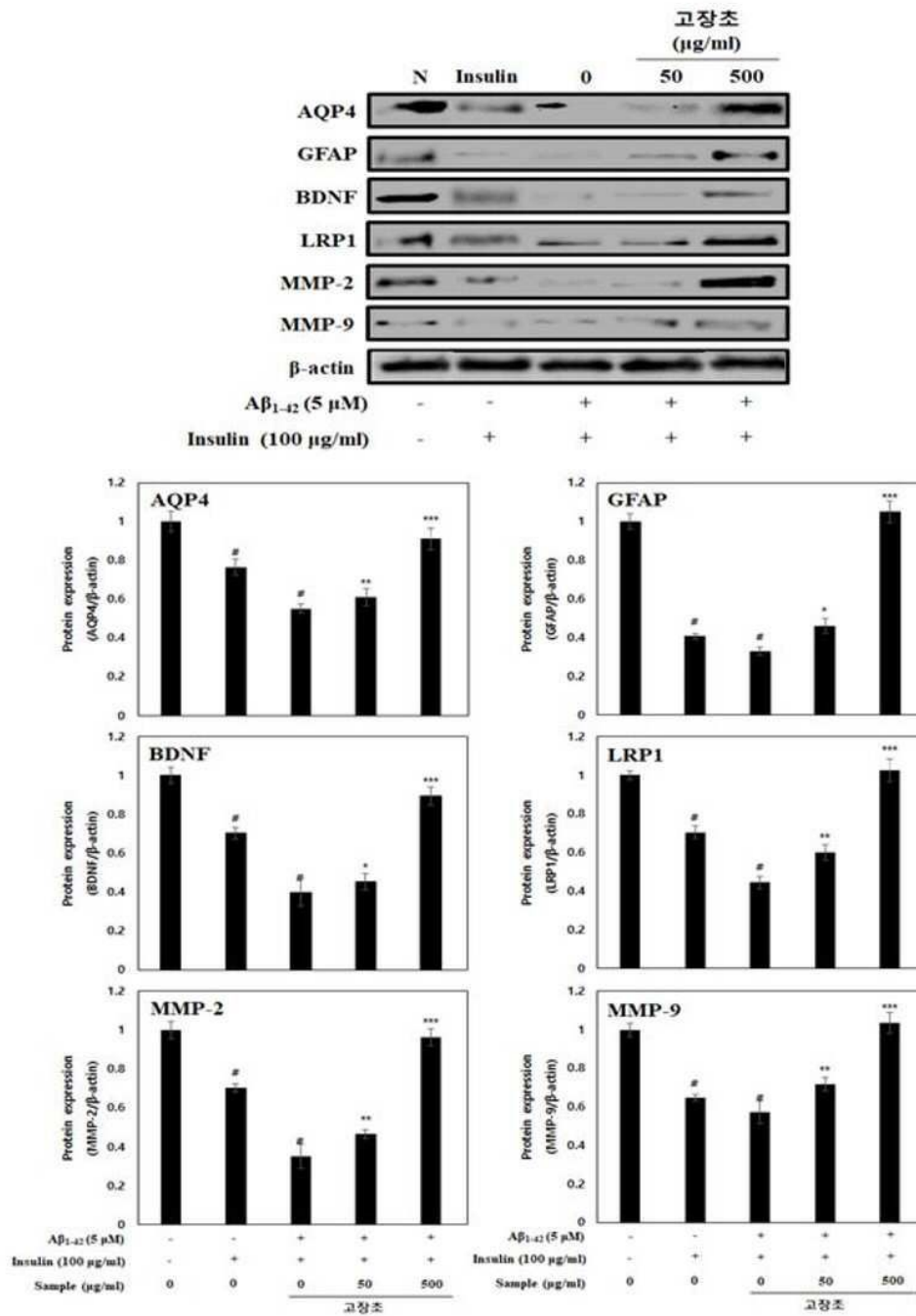
도면1



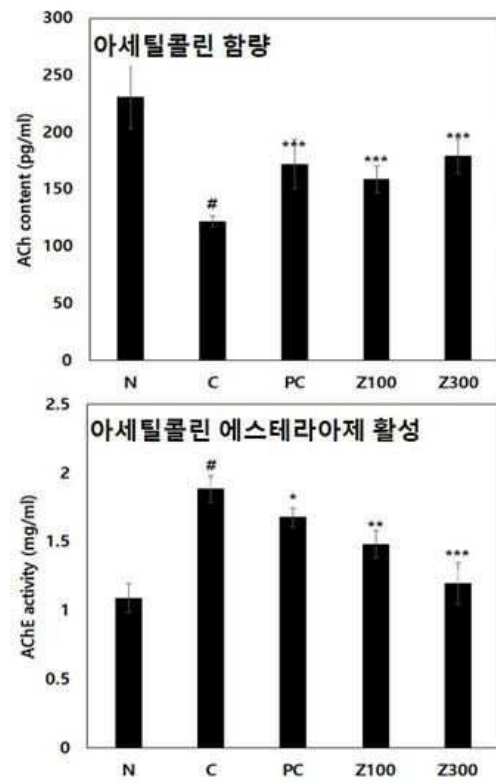
도면2



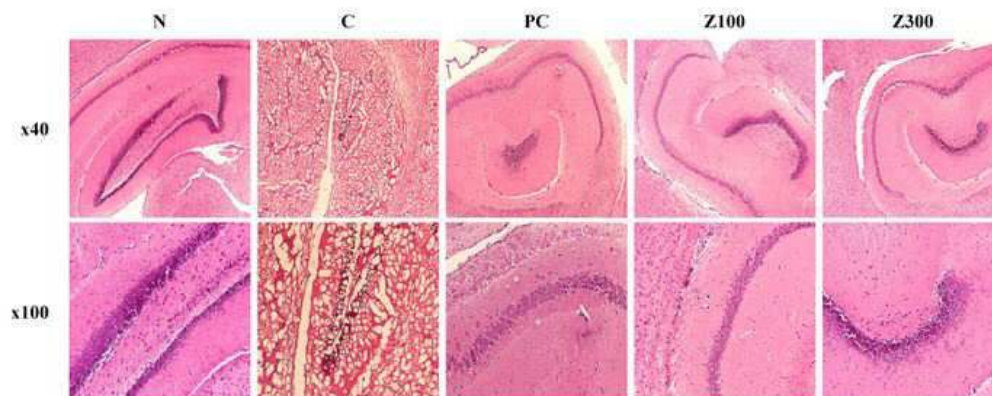
도면3



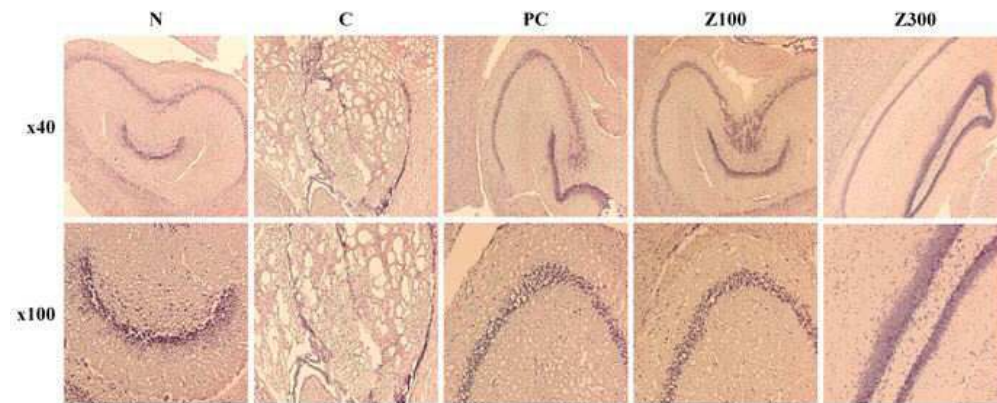
도면4



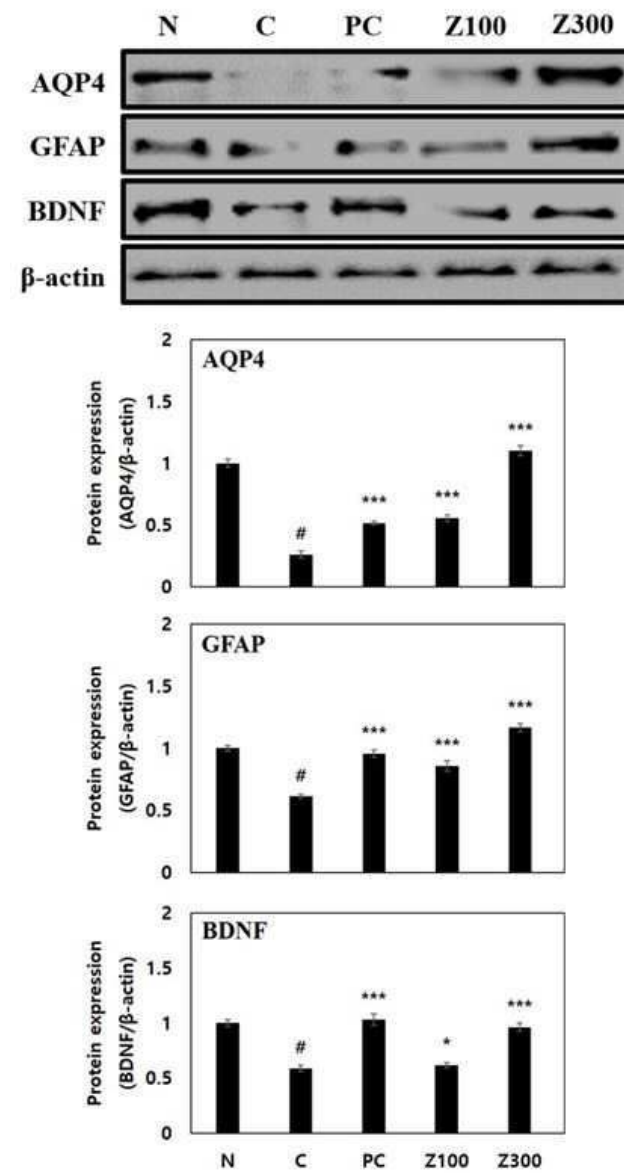
도면5



도면6



도면7



도면8

