

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0023372 (43) 공개일자 2012년03월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/03 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01) A23L 1/337 (2006.01)		(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(21) 출원번호 10-2010-0086391		(72) 발명자
(22) 출원일자 2010년09월03일		강일준
심사청구일자 2010년09월03일		강원도 춘천시 퇴계로 168, 주공2차 아파트 209동 403호 (퇴계동)
기술이전 희망 : , 실시권하여, 기술지도		김민주
		강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더?아파트 104동 706호 (후평동)

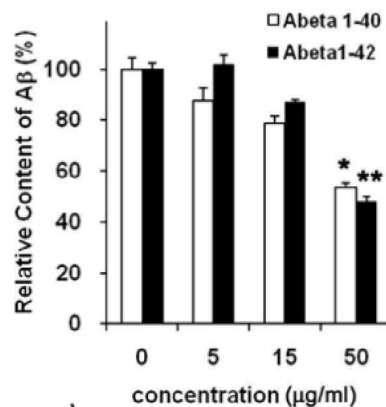
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 감태 (E. cava) 부탄을 분획물을 유효성분으로 포함하는 베타-아밀로이드 oligomer 및 fibril의 생성 억제용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

(57) 요약

본 발명은 감태 추출물 및 부탄을 분획물이 베타-아밀로이드의 생성과 생성 후 일어나는 oligomerization, fibrilization을 억제하며, 베타-아밀로이드 유래 신경세포사 또한 억제하는 natural compound임을 밝혀내어 베타-아밀로이드와 관련된 질환, 특히 알츠하이머병의 예방과 치료용 및 기능성 식품 조성물 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 F20832609H140000110

부처명 국토해양부

연구사업명 국토해양기술연구개발사업

연구과제명 해양생물로부터 인지기능 개선효과를 갖는 기능성 소재 및 제품개발

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2009.11.12 ~ 2010.11.11

특허청구의 범위

청구항 1

감태(*E. cava*) 부탄올 분획물을 유효성분으로 포함하는 베타-아밀로이드 oligomer 및 fibril의 생성 억제용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

청구항 2

청구1항에 있어서, 상기 감태 추출물을 0.1 내지 99 중량%로 함유하는 베타-아밀로이드 oligomer 및 fibril의 생성 억제용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 치매질환은 알츠하이머형 치매증, 뇌혈관성 치매증, 픽병, 크루즈펠트-야콥병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 추출물은 물 또는 50 내지 100% 농도의 탄소수 1 내지 4의 저가알코올로 추출된 감태 추출물인 베타-아밀로이드 oligomer 및 fibril의 생성 억제용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 0.01 내지 15 중량% 포함하는 베타-아밀로이드 oligomer 및 fibril의 생성 억제용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

청구항 6

감태 추출물을 포함하고, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 베타-아밀로이드 oligomer 및 fibril의 생성 억제용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 감태(*E. cava*) 추출물 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 베타-아밀로이드 oligomer 및 fibril의 생성 억제용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 국민생활 수준의 향상과 의학기술의 발달로 평균수명이 증가하면서 사회적으로 인구의 고령화 현상이 문제되고 있으며, 노인건강에 대한 관심이 높아지고 있다. 오늘날 알츠하이머병(Alzheimer's Disease: AD)은 암, 심장질환, 뇌졸중에 이어 노인사망의 네 번째 원인이 되었으며, 85세 이상 인구의 약 47%가 알츠하이머병 증상을 나타내고 있고, 국내환자 수는 약 28 만 명인 것으로 알려져 있다.

[0003] 흔히 알츠하이머병이라고 일컫고 있는 대부분의 노인성치매(senile dementia)는 그 발병원인에 대해서는 자세히 밝혀진 바 없으나 약 5%만이 유전적이며, 95%는 환경 및 복합적인 원인으로 발병하는 것으로 알려져 있다. 원인으로서는 신경 조직 및 혈관에서 플라크(plaque)의 축적, 신경섬유 얽힘, 아밀로이드 침착, 시냅스 손상 및 신경세포 사멸을 병리학적 특징으로 한다. AD는 다양한 유발인자가 관여한다고 알려져 있는데, 이중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 preseniline 유전자들의 돌연변이와 amyloid precursor proteins(APP)의 과다생성으로 인해 β -amyloid peptide(A β)가 과량으로 만들어지게 되고, 이 A β 의 침착으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다.

- [0004] 알츠하이머병 환자의 뇌에서 발견되는 신경세포 바깥쪽에 쌓이는 물질인 노인성반(senile plaque)의 중심부분에는 베타-아밀로이드 침적물(deposit)이 발견되고 있으며, 이는 주로 베타-아밀로이드가 서로 달라붙어 형성되는 머리카락 구조의 화이브릴(fibril) 형태인 것으로 알려져 있다. 베타-아밀로이드는 아밀로이드 단백질 전구체(APP)에서 유래된 39-43개의 아미노산 잔기로 구성된 폴리펩타이드이다
- [0005] 아밀로이드 단백질 전구체(APP)는 α -, β -, γ -분해효소(α -, β -, γ -secretase) 중 β -, γ -분해효소에 의하여 베타-아밀로이드 40 또는 42(A β 40 또는 A β 42) 단량체가 된 후 집적하여 올리고머(oligomer)를 형성하고 이 올리고머의 집적으로 화이브릴(fibril), 플라그(plaque)의 단계를 거치게 된다. 이 여러 단계의 베타-아밀로이드 중에서 올리고머 상태의 단계는 뇌에 침착 되면 강한 신경 독성을 나타내어 뇌세포를 사멸시키게 된다. 그러므로 올리고머 상태의 베타-아밀로이드를 이해하는 것이 알츠하이머병을 연구하는데 기본적인 중요한 부분이다.
- [0006] 알츠하이머성 치매질환자들에 공통적으로 나타나는 노인반점(senile plaques)의 주요 요소인 베타-아밀로이드(β -amyloid, A β) 펩타이드는 그 전구 대사 단백질인 아밀로이드전구체단백질(APP) 695, 751, 770으로부터 유래한다. 이 아밀로이드전구체단백질은 대부분의 경우 α -세크레타제(α -secretase)와 γ -세크레타제(γ -secretase)라고 불리는 프로테아제(proteases)에 의하여 절단되어 P3 펩타이드와 세포의 바깥쪽으로 sAPP α 라는 수용성 단백질을 방출하게 된다. 특이적으로 알츠하이머성 치매 질환자에서는 베타-세크레타제와 감마-세크레타제가 활성화되어 베타-아밀로이드 펩타이드(A β)와 sAPP β (secreted form of β -secretase derived APP)라는 단백질이 세포 밖으로 방출된다. 알츠하이머성 치매 질환자들중에서 베타-아밀로이드 전구체 단백질(APP) 유전인자의 돌연변이의 경우를 보면 대부분이 α -, β -, γ -세크레타제(α -, β -, γ -secretase)들의 인지부분에 돌연변이가 생긴 경우로 이러한 돌연변이가 단백질의 구조를 변화시켜서 β 와 γ -세크레타제(β 와 γ -secretase)에 노출이 더 잘 되어 정상인의 경우보다 많은 양의 베타-아밀로이드 펩타이드가 생성되는 것으로 밝혀져 있다. 베타-아밀로이드 펩타이드는 42개의 아미노산 잔기로 이루어진 녹지 않는 성질을 가지며, 기억 및 인식과 관련된 뇌 영역에 침착 되어 뇌세포의 아포토시스(apoptosis)를 유발하는 것으로 알려져 있다. 최근 보고에 의하면 베타-아밀로이드전구체 단백질(APP) 유전인자의 돌연변이가 카스파제6(caspase-6)과 카스파제3(caspase-3)이라는 아포토틱 프로테아제(apoptotic protease)의 기질로 작용하여 절단이 되며, 이렇게 절단되어진 베타-아밀로이드 전구체 단백질(APP)은 β -, γ -세크레타제(β -, γ -secretase)에 의하여 보다 용이하게 베타-아밀로이드를 형성하게 된다고 알려져 있다. 이와 같이 알츠하이머성 치매질환의 원인 규명과 치료 방법의 개발에는 많은 연구가 이루어지고 있으나 현재까지 뚜렷한 효과가 확립된 치료소재 개발은 다소 미흡한 실정이다.
- [0007] 많은 동물실험 및 임상연구의 결과를 토대로 뇌중 acetylcholine량의 결핍과 β -secretase에 의해 생성되는 β -amyloid 단백질에 의한 독성이 알츠하이머병의 주요 병리 현상임으로 이에 대한 연구가 활발하다. 현재까지 미국 식품의약품안전청으로부터 알츠하이머병 치료제로 승인받아 임상에서 사용되는 의약품은 모두 아세틸콜린 억제제로 tacrine (CognexTM), donepezil (AriceptTM), rivastigmine (ExelonTM) 등과 천연물 추출 성분인 galanthamine (ReminylTM)이 있다. 그러나 이들의 경우 어느 정도 약효는 인정되고 있으나, 장기간 고용량 투여시, 근육통, 위장 장애로 인한 메스꺼움, 구토, 설사 및 식욕 부진과 함께, 간 독성 등의 부작용이 커서 치료를 중단해야 하는 경우가 자주 발생하는 등의 문제점이 지적되고 있다.
- [0008] 알츠하이머병의 원인은 현재까지 명확하게 밝혀지지 않았으나, 여러 증거들을 종합해 볼 때, 독성 단백질인 베타-아밀로이드의 축적과 이로 인한 신경세포의 퇴행이 대표적인 증상 또는 원인으로 알려져 있다. 최근에는 베타-아밀로이드 피브릴에 비하여 올리고머(oligomer)가 5배 이상의 독성을 가진다는 연구 보고와 A β 42만이 이와 같은 올리고머 형태를 이룬다는 사실이 밝혀지면서, A β 42에 의하여 생성되는 피브릴과 함께 올리고머도 알츠하이머병의 치료를 위한 새로운 표적으로 떠오르게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 감태(*E. cava*) 추출물 및 부탄올 분획물이 치매의 발병원인 중 하나인 베타-아밀로이드 oligomer 및 fibril이 신경세포에 독성을 일으킨 경우 독성을 완화하는 활성을 가질 뿐 아니라 신경세포사 또한 억제하는 natural compound임을 밝혔다. 따라서, 본 발명의 목적은 감태 부탄올 분획물을 유효 성분으로 포함하는 베타-아밀로이드 집적 관련 질환 예방 및 치료용 또는 기능성 식품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 감태(*E. cava*) 부탄올 분획물을 이용한 β -amyloid 생성 저해 효과, β -amyloid oligomerization의 감소 효과 확인, β -amyloid fibrilization의 감소 효과 확인 등을 통하여 베타-아밀로이드 집적 관련 질환 예방 및 치료 효과를 측정 규명한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 감태 부탄올 분획물을 유효 성분으로 포함하는 베타-아밀로이드와 관련된 질환, 특히 알츠하이머병의 예방과 치료 효과를 얻는 것을 그 특징으로 하며 이는 천연물에서 유래한 치매 예방 또는 치료용 조성물 또는 기능성 식품 조성물이라는 측면에서 그 의의가 있으며 이를 적극적으로 활용할 경우 다양한 질병에 대한 조성물로서 널리 활용될 수 있으며 나아가 국민 건강에 기여 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 HEK293 APP swedish stable cell line에서의 감태 부탄올 분획물의 독성 여부를 보여주는 도이다.

도 2는 HEK293 APP swedish stable cell line에서의 감태 부탄올 분획물 처리 후 β -amyloid의 생성 억제 여부를 보여주는 도이다.

도 3은 HEK293 APP swedish stable cell line에서의 감태 부탄올 분획물 처리 후 APP processing 여부를 보여주는 도이다. (A) culture media와 cell lysate에서 sAPPs와 CTFs의 발현 양상을 immunoblot을 통해 확인. (B) (A)의 immunoblot을 densitometry (Image J; NIH)를 통해 정량화 한 후, sAPP α /sAPPs와 CTF α /actin ratio의 분석한 그림. (C) BACE inhibitor IV를 처리한 후 (B)와 동일한 양상의 분석.

도 4는 β -amyloid의 oligomerization의 감태 부탄올 분획물을 통한 저해 효과를 확인한 도이다. A와 B는 6E10 antibody를 통한 immunoblot을 수행. C의 경우는 B와 동일한 샘플에서의 TEM 그림.

도 5는 β -amyloid의 fibrilization의 감태 부탄올 분획물을 통한 저해 효과를 확인한 도이다. (A) Congo Red Assay (B) ThT fluorescence assay. 각각의 실험은 β -amyloid만 처리했을 때의 값을 기준(100%)으로 상대적으로 표시. (C-D) β -amyloid alone (C), 50 μ g/ml 부탄올 분획물 (D)를 처리한 동일 샘플(A와 B 실험의)에서의 TEM image (black bar = 200 nm)

도 6은 감태 부탄올 분획물에 의한 β -amyloid 유래 신경세포사의 억제 효과를 확인한 도이다. Neuro2A 신경세포주에 β -amyloid를 10 μ M로 처리한 후 세포사를 MTT assay (A)와 LDA release (B)를 통하여 확인 ($p < 0.01$, $p < 0.05$).

도 7은 감태의 부탄올 분획물의 β -amyloid 관련 pathogenic mechanism에 끼치는 영향에 관한 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] **시료제조예1:** 본 발명의 감태 추출물은, 건조된 무게 100 g의 10배의 에탄올을 가하고 수용액상에서 65℃에서 3시간 추출한 다음 이를 여과하여 추출액을 얻는다. 추출하는 과정을 3회 반복한다. 얻어진 추출액을 40℃ 이하에서 감압 농축한 후 이를 동결 건조하여 분말상의 추출물 13.5 g, 13.6%을 얻었다.

[0014] **시료제조예2:** 상기 시료제조예1에서 얻은 감태 추출물에 증류수 10배를 가하여 현탁하고 동량의 hexan을 가하여 혼합한 후 hexan 가용성 분획부 및 수가용성 분획부로 분리하였다. 동일과정을 3회 반복하여 hexan 가용성 분획부만을 모은 후 이를 감압건조하여 hexan 가용추출물 분말 2.46 g, 18.2%을 얻었다. 동일한 방법으로 디클로로메탄 가용추출물 분말 0.59 g, 4.4%, 에틸아세테이트 가용추출물 분말 3.52 g, 25.9%, 부탄올 가용추출물 분말 1.8 g, 13.4%를 얻었으며 수가용성 분획부도 따로 모아 이를 감압건조하여 수가용추출물 분말 5 g, 37.6%을 얻었다.

[0015] **실시예 1: 감태 부탄올 분획물의 독성 조사**

[0016] 가. APP Swedisch Stable cell 만들기

[0017] Human APP(amyloid precursor protein) swedish mutants (K670N, M671L)를 발현하는 plasmid를 HEK293T cells에 transection한다. 약 12 시간 후에 600 $\mu\text{g/mL}$ 의 G418이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) media로 교환하여 배양한다. Colony를 형성한 cell만을 48-well plate 각 well에 옮겨 배양하며, 성장된 cell은 12-well plate에 옮겨 600 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 G418이 첨가된 DMEM media에서 선별 배양한다. 다시 60 mm dish를 거쳐 100 mm dish로 계대 배양 하면서 media내 G418의 농도를 200 $\mu\text{g/mL}$ 로 낮추어 선별 배양하였다. 이를 통하여 만들어진 stable colony는 western-blotting을 통해 swAPP 단백질을 발현 여부와 배양액에서의 amyloid-beta 1-40/1-42의 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; Biosource, USA)를 통하여 확인하였다.

[0018] 나. Cell culture 및 감태 부탄을 분획물의 처리

[0019] swAPP HEK293T stable cell을 10% FBS (Fetal bovine serum) 와 antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM media에 넣어 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양한다. 12-well plate에 70-80% confluent 하게 cell을 깔아준 후, 다음날 DPBS로 한번 씻어준 후, 1% FBS를 넣은 DMEM media를 각 well에 1 ml씩 넣어준다. 감태 부탄을 분획물을 1 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도가 되도록 1% FBS를 첨가한 DMEM media에 dilution 하여 각 well에 처리한다. 8 시간 후, media를 수거하여 amyloid-beta 1-40/1-42의 ELISA 및 western-blotting 하였다.

[0020] 다. 감태 부탄을 분획물의 세포 독성 실험

[0021] MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay를 통해서 세포독성을 측정하였으며, 5 mg/mL의 MTT solution을 1/5로 배양액에 처리하여 1시간 반응시킨 후, 배양액을 제거하고 DMSO로 첨가하여 lysis를 시켰다. lysis된 샘플은 570 nm에서 96 well spectrophotometer (molecular probe, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

[0022] 감태 부탄을 분획물의 β -amyloid 생성능의 차이를 보기 전에, 우선 농도별로 부탄을 분획물의 독성을 HEK293 APP swedish stable cell line에서 MTT assay를 통해서 측정하였다 (도 1). 50 $\mu\text{g/mL}$ 까지의 농도는 독성을 나타내지 않았으며, 따라서 다음으로 β -amyloid의 양의 측정을 진행할 수 있었다. (참고로 감태 부탄을 분획물은 일차로 감태의 ethanol extract로 추출한 다음 진행되었으며, 동일 ethanol extract로부터의 hexane, methylene chloride, ethyl acetate 분획물에서는 유사농도에서 독성이 검출되었다.)

[0023] 실시예 2: 감태 부탄을 분획물의 β -amyloid 생성 저해 효과

[0024] 가. Media에서 β -amyloid의 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)

[0025] Immunoblot 수행한 것과 동일한 media샘플에서 β -amyloid1-40와 1-42의 양을 ELISA (Invitrogen) kit를 이용하여 수행하였다. 적정 비율로 희석(2-20배)한 media를 일차 항체와 각각 50 μL 씩 섞어 다른 항체가 코팅된 96well ELISA plate에 분주하여 2시간 정도 실온에서 incubation하였다. 이를 washing buffer로 5번 정도 씻은 후에, 다시 HRP(horse radish peroxidase)가 표지된 이차항체를 처리하였다. 마지막 washing후에 TMB (tetramethylbenzidine) 용액으로 발색시킨 후에, 0.01N HCl 용액으로 고정시키고 96 well ELISA plate (Thermo)으로 450 nm의 흡광도에서 발색정도를 측정하였다. 측정된 값은 미리 녹여둔 β -amyloid의 standard curve에 대입하여, media의 β -amyloid의 양을 계산하였다.

[0026] 감태 부탄을 분획물을 50 $\mu\text{g/mL}$ 까지 HEK293 APP swedish cells에 8시간 동안 처리하였을 때, media의 β -amyloid 1-40와 1-42의 잔여량을 ELISA assay를 통해 측정 비교하였다. β -amyloid 1-40와 1-42 모두 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 감태 부탄을 분획물을 처리하였을 때, 40% 정도 유의한 생성 감소를 보였다 (도 2).

[0027] 실시예 3: 감태 부탄을 분획물의 APP processing 여부의 확인

[0028] 가. Gel electrophoresis and immunoblotting

[0029] 감태 부탄을 분획물을 처리한 후 soluble APP의 양을 측정하기 위하여, media (20 μL)를 8% Tris-glycine gel에 loading하였다. 세포의 lysate의 APP의 C-terminal fragment (CTF)의 측정을 위해서는 0 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% SDS and 2mM sodium orthovanadate가 포함된 버퍼로 녹인 후, 초음파 파쇄를 통하여 샘플을

얻었다. 얻어진 샘플은 4-12% NuPAGE gel (Invitrogen)을 통하여 전기영동을 하였다. 이렇게 전기영동한 두 종류의 샘플은, 100V에서 약 2시간 전기영동 한 후, gel을 PVDF membrane 에 100V 에서 1 시간 transfer 한 후 5% skim milk로 1시간 동안 상온에서 blocking한다. TBS-T(Tris buffered saline with Tween20)으로 3회 씻어준 후, membrane은 primary antibody (22C11 or 6E10)와 over-night 반응시켰다. TBST로 3회 씻어준 후, secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated Ig anti-mouse antibody)로 상온에서 1시간 반응 시킨 다음 TBST로 3회 씻어주었다. Soluble APP (media)의 detection을 위해서는 anti- β amyloid (6E10; sAPP α)와 anti-APP (22C11; sAPPs or total sAPP)를 사용하였으며, CTF의 detection을 위해서는 anti-C-terminal APP (A8717; CTF α) 항체들을 사용하였다. Detection은 ECL (Enhanced chemiluminescence)과 Agfa CP-Bu film을 이용하여 확인하였다. Detection한 필름은 Image J software (NIH, USA)를 이용하여 정량화 하였다. Western blot에 사용한 항체의 detection 원리는 다음 그림과 같다.

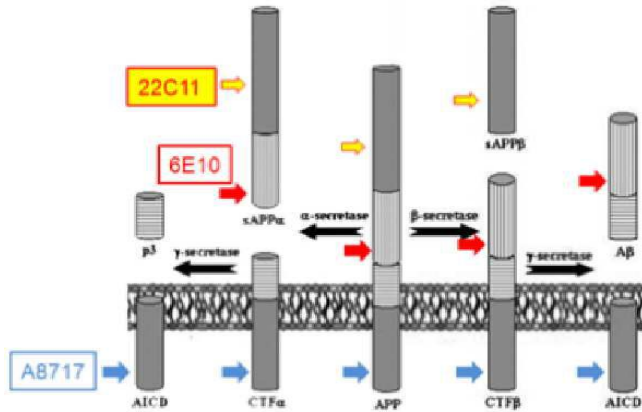


그림 1. APP (amyloid precursor protein)의 processing과 그 확인 방법

위쪽의 sAPP (soluble APP)는 extracellular space로 secretion된다. 이는 media에서 22C11 항체를 통해서 total sAPP (sAPP α + sAPP β)를 검출할 수 있으며, 6E10 항체는 sAPP α 만 검출할 수 있다. 따라서 β -secretase가 저해된다면, sAPP α (sAPP α) / total sAPP β (sAPP β)의 비율이 증가하게 된다. cell lysate에서는 A8717항체를 이용하여 C-terminal fragments (CTF)를 검출할 수 있다.

감태 부탄올 분획물을 50 μ g/mL까지 HEK293 APP swedish cells에 8시간 동안 처리하였을 때, β -amyloid의 생성 감소의 기전을 확인하기 위해서, media와 cell lysate에서의 APP processing 여부를 확인하였다. 우선 media에서의 APP processing을 확인하기 위해서, soluble APP의 발현을 22C11 (total soluble APPs or sAPPs) 항체와 6E10 (soluble APP α or sAPP α) 항체를 통해 immunoblot을 시행하였다. 그 결과 sAPPs에 비해 sAPP α 가 증가하였으며, 이는 β -secretase 활성이 감소하였음을 짐작케 할 수 있었다 (도 3A). 이는 시판되는 BACE inhibitor (IV; calbiochem)과 유사한 작용을 보임을 알 수 있었다. Cell lysate의 경우도 50 μ g/mL감태 부탄올 분획물에서 CTF α 의 증가를 확인할 수 있었다 (도3A). 이들 각각의 결과를 densitometry를 이용하여 정량화 한 후, sAPP α /sAPPs 와 CTF α /actin의 ratio로 비교하였을 때, 감태 부탄올 분획물의 β -amyloid 생성 감소 효과는 BACE inhibitor와 유사한 작용을 보이는 것을 짐작할 수 있었다 (도 3B와 4C).

실시예 4: 감태 부탄올 분획물의 β -amyloid oligomerization와 fibrilization의 감소 효과 확인

가. β -amyloid의 oligomer와 fibril의 제조

Human β -amyloid 1-42 (Invitrogen)을 우선 cold HFIP (hexafluoroisopropanol)에 녹인 후, 실온에서 1시간 동안 보관하였다. 보관된 β -amyloid는 각각 적정 질량으로 분주한 후, Speedvac을 통하여 용매를 제거하고 각각을 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 보관된 β -amyloid는 DMSO(demethylsulfoxide)에 5 mM의 농도로 녹인 다음, 50-100 μ M의 농도로 증류수에 희석하였다. oligomer의 경우에는 low-size (tetramer 이하)의 경우에는 4' C에서, middle to high size (50-180kDa)의 경우에는 실온에서 18시간 정도 incubation하였다. fibril의 경우에는 37 $^{\circ}$ C에서 1주일간 보관하였다. 만들어진 oligomer의 경우 4-12% NuPAGE gel을 이용하여 6E10 항체로 immunoblot을 통해 확인하였고, fibril의 경우 congo red assay, ThT assay, 혹은 전자현미경(TEM)을 통해 확인하였다.

[0037] 나. Congo Red Assay

[0038] Congo red의 stock solution은 5mM Congo red, 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl (pH7.4)로 만들어 보관하였다. Assay 전에 congo red는 1000배 희석하여, 만들어진 β -amyloid fibril과 실온에서 암시야하에 반응시켰다. 반응시킨 시료는 480 nm와 540 nm에서 측정된 O.D. 값을 다음 공식에 대입하여 [Cb] 값을 측정하였다. 측정치를 감태 부탄을 분획물을 처리한 측정치와 비교하여 그래프로 표시하였다.

[0039]
$$[\text{Cb}] = [(\text{OD at } 540\text{nm}/25,295) - (\text{OD at } 480\text{nm}/46,306)] \times 106$$

[0040] 다. Thioflavin T (Th T) fluorescence assay

[0041] Thioflavin T의 stock solution은 5mM thioflavin T, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl으로 만들어 보관하였다. Assay 전에 thioflavin T는 100배 희석하여, 만들어진 β -amyloid fibril과 실온에서 암시야하에 반응시켰다. 반응시킨 시료는 excitation 480 nm와 emission 540 nm에서 96 well 형광계를 통하여 측정하였다. 측정치를 감태 부탄을 분획물을 처리한 측정치를 상대적으로 비교하여 그래프로 표시하였다.

[0042] 라. TEM (transmission electron microscopy

[0043] TEM analysis는 β -amyloid oligomer와 fibril의 형태를 보기 위해 수행하였다. 만들어진 oligomer 혹은 fibril은 formvar-carbon coated grid (300 mesh, Electron Microscopy Science)위에 10 μL 씩 올려 놓고, 1 분후에 washing한 후 1% uranyl acetate 용액을 이용하여 negative staining하였다. 말린 grid는 EF-TEM LEO 912AB (Carl Zeiss)를 이용하여 확대 관찰하였다.

[0044] β -amyloid는 단독 monomer의 생성 뿐만 아니라, 이미 만들어진 monomer로부터 oligomer와 fibril의 생성 여부 역시 알츠하이머씨 병의 주요 병리기전으로 알려져 있다. 따라서, 다음 실험으로 기억력 저하의 주원인으로 보고되고 있는 β -amyloid의 oligomerization에 감태 부탄을 분획물이 관련되는지의 여부를 조사해 보았다. β -amyloid의 oligomer는 여러 형태가 보고되고 있는데, 주로 tetramer이하의 low-size oligomer와 50-180kDa 사이의 soluble middle-high size oligomer가 각각 중요한 것으로 알려져 있다. 따라서 우선 low-size oligomer의 경우는 β -amyloid를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 정도 반응시켜서 만들었으며, 감태 부탄을 분획물의 농도에 따라 dimer, trimer, tetramer가 감소하는 것을 확인하였다(도 4A). soluble middle-high size oligomer의 경우는 β -amyloid를 실온에서 18시간 반응시켰는데, soluble oligomer의 생성이 역시 감태 부탄을 분획물 농도에 비례하여 감소함을 확인할 수 있었다(도 4B). 이런 soluble oligomer의 경우 전자현미경(TEM) 상 globular shape을 보인다고 알려져 있는데, 이 역시 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 처리하였을 때 관찰되지 않음을 확인하였다 (도 4C).

[0045] β -amyloid의 fibril 생성은 in vivo 동물 또는 알츠하이머병 환자의 senile plaque (노인반) 혹은 amyloid plaque의 생성 등의 병리학적 소견의 원인 물질이 된다. 따라서, oligomerization 실험 외에도 또 다른 실험으로, 감태 부탄을 분획물에 의한 fibrilization의 감소 효과를 측정해 보았다. 우선 생화학적 실험으로서 β -amyloid fibril 형성의 주 원인인 β -sheet 구조를 측정할 수 있는 congo red assay (도 5A)와 thioflavin T (ThT assay; 도 5B)를 측정하였을 때, 감태 부탄을 분획물 농도 증가에 의한 fibril의 생성 감소를 확인할 수 있었다. 또한 같은 샘플들을 통해서 확인하였을 때, TEM 이미지에서도 fibril의 모양이 완전하지 않음을 역시 확인할 수 있었다 (도 5C).

[0046] 마. 감태 부탄을 분획물의 β -amyloid induced cell death의 억제 효과 확인

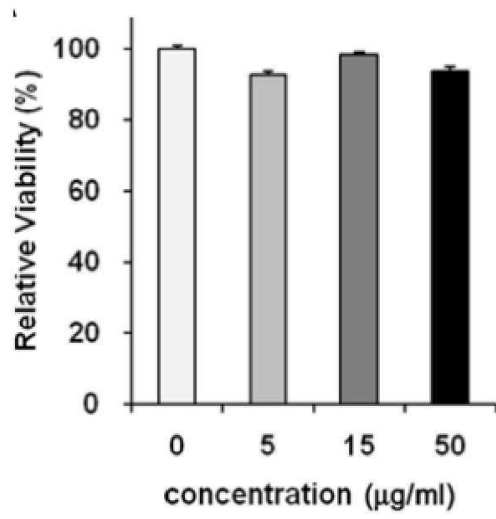
[0047] 감태 부탄을 분획물의 β -amyloid 유래 세포사의 억제효과를 확인하기 위해서, 신경세포 유래 세포주인 Neuro2A 세포에 10 μM 의 농도로 β -amyloid를 24시간 동안 처리하였다. 처리한 후 MTT mitochondrial reduction (도 6A)과 LDH release assay (도 6B)를 수행하여 감태 부탄을 분획물의 농도가 증가함에 따라 신경세포사가 억제되는 것을 확인하였다.

[0048] 바. 감태 부탄을 분획물의 β -amyloid 관련 메카니즘의 연관성

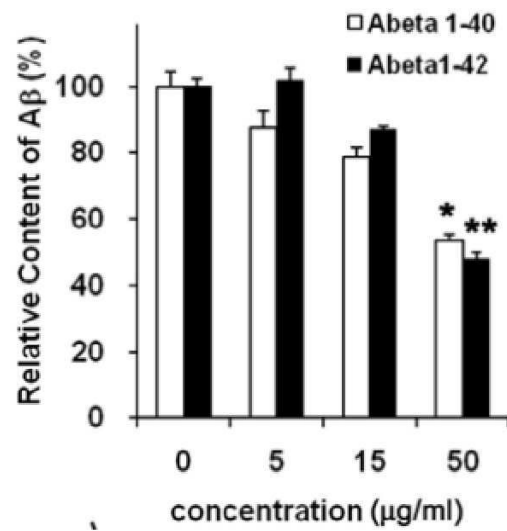
[0049] 위의 실험 결과를 종합하여볼 때, 감태의 부탄을 분획물은 β -amyloid의 생성과 생성 후 일어나는 oligomerization, fibrilization을 억제 하는 것으로 보인다. 또한 아직 기전은 불확실하나 β -amyloid 유래 신경세포사 또한 억제하는 natural compound임을 본 실험을 통하여 밝혔다(도 7).

도면

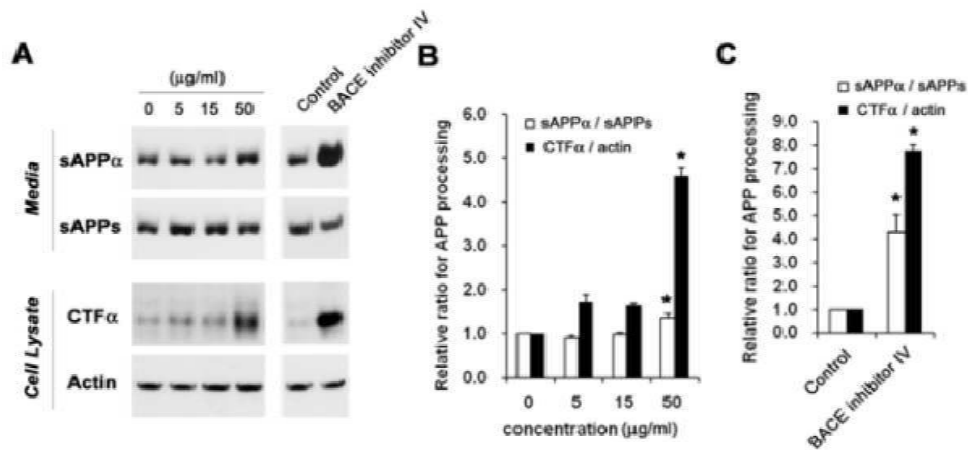
도면1



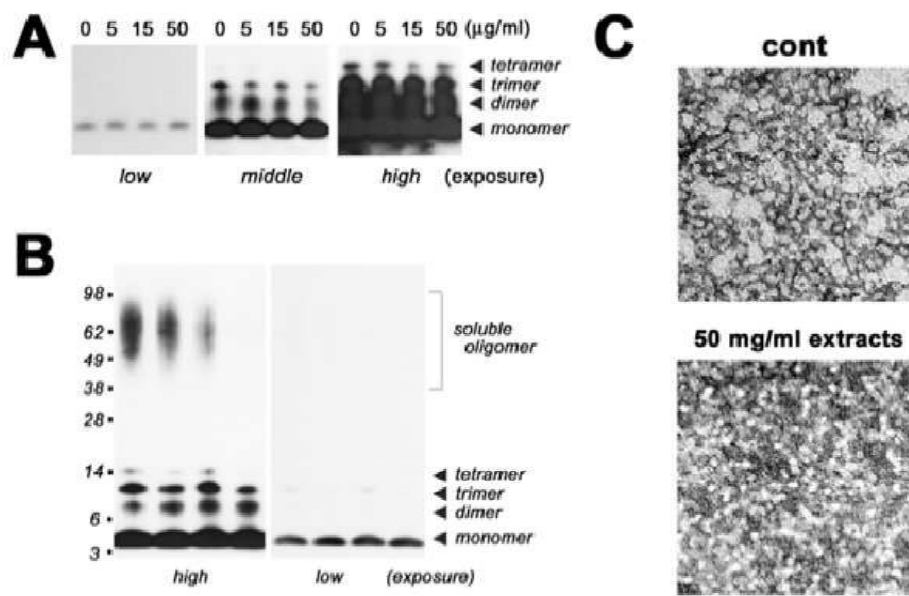
도면2



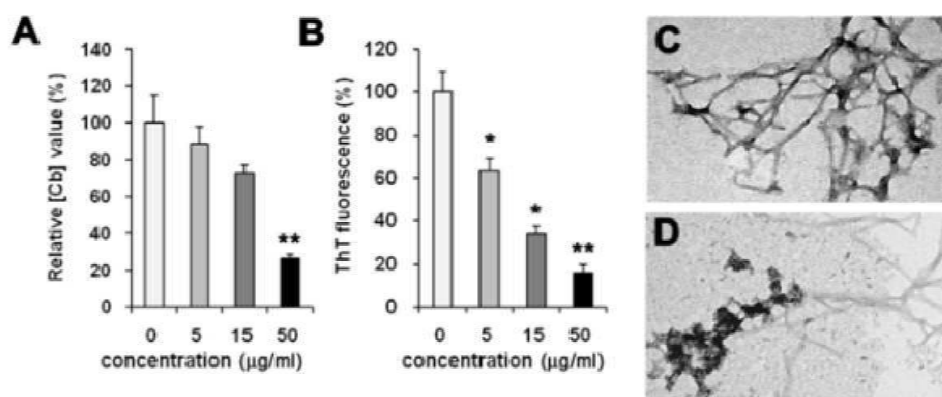
도면3



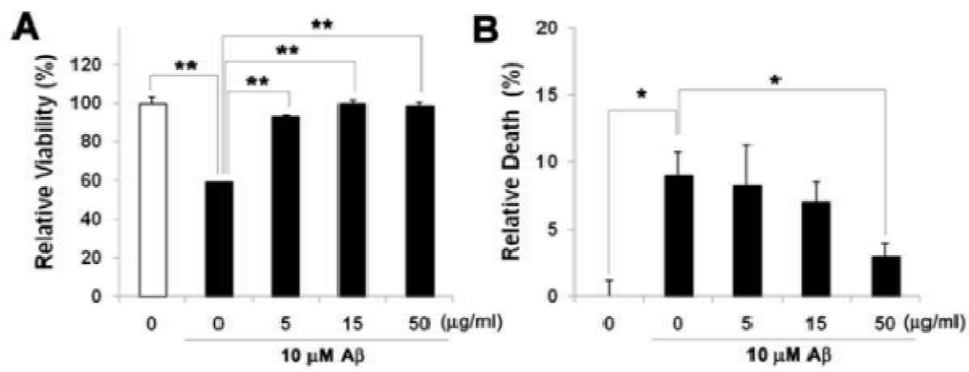
도면4



도면5



도면6



도면7

