(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0035615
(43) 공개일자 2016년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/65 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 36/232 (2006.01) *A61K 36/233* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/65 (2013.01)
A23L 1/3002 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0130107
(22) 출원일자 2015년09월15일
심사청구일자 2015년09월15일
(30) 우선권주장
1020140124860 2014년09월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
동아에스티 주식회사
서울특별시 동대문구 천호대로 64(용두동)
(72) 발명자
김영미
서울특별시 강남구 도곡로93길 12 래미안 하이스턴 아파트 205-901
오명숙
서울특별시 강남구 삼성로 151 선경아파트 1동 305호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

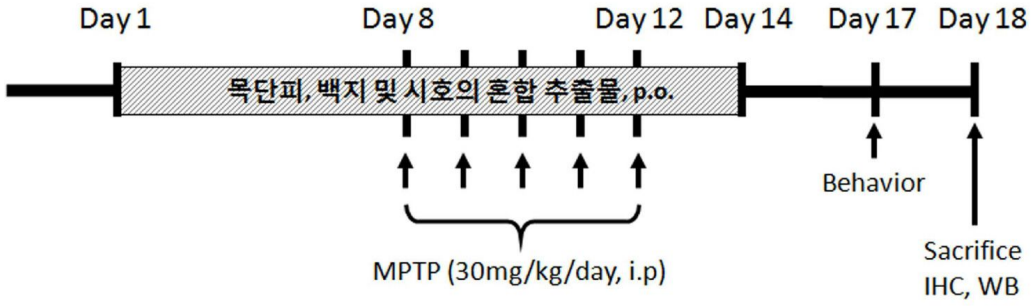
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 목단피(Moutan Root Bark, Moutan Radicis Cortex), 백지(Angelica Dahurica Root, Angelicae Dahuricae Radix) 및 시호(Bupleurum Root, Bupleuri Radix)로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 혼합 추출물은 시험관 내(*in vitro*)에서 단독 추출물에서 나타나는 것보다 현저하게 상승한 미토콘드리아 기능 손상 회복 효과, 소포체 스트레스 완화 효과, 염증반응 억제 효과를 동시에 나타내며, 상기 혼합 추출물은 파킨슨병 동물 모델에서 운동 협응(motor coordination) 개선 효과 및 도파민 신경세포 보호 효과를 유의적으로 나타내므로, 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 신경 퇴행성 질환 치료 및 예방용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 36/232 (2013.01)
A61K 36/233 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
(72) 발명자
홍선표
서울특별시 노원구 중계로14길 22 진로대림아파트 816호
손미원
경기도 용인시 기흥구 금화로 105번길 21 (상갈동)
정진석
서울 양천구 목동서로2길 22, 108동 204호 (목동, 한신청구아파트)
강해화
경기도 용인시 기흥구 금화로 12번길 13-11 301호 (모아빌)
김은진
서울특별시 강서구 공항대로 75길30 삼정그린코아 아파트 103동304호
유자영
서울 송파구 올림픽로4길 42, 26동 202호 (잠실동, 우성아파트)
조영웅
경기도 수원시 영통구 영통로 200번길 20. 104동 1002호
두효비
경기도 용인시 기흥구 금화로 11번길 10. 301동 607호 (주공그린빌)
최상진
경기 수원시 영통구 청명북로 33, 438동 1304호 (영통동, 청명마을삼성아파트)
김정수
경기 용인시 기흥구 상갈로 33-1, 302호 (상갈동)
김병문
서울특별시 강남구 도곡동 78길 22 114동 1408호 (대치동, 대치삼성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 B12002912010000100
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건산업진흥원
연구사업명 한의약선도기술개발사업
연구과제명 파킨슨병 치료 한약제제 개발을 위한 비임상연구 - (한의약 선도기술개발사업 - 한약제제 개발)
기 여 율 3/5
주관기관 경희대학교
연구기간 2012.06.01 ~ 2015.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2008-0061888
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터
연구과제명 신경퇴화 관련 미토콘드리아 기능조절에 의한 신경세포 보호기술 개발 : 신경퇴화제어 연구센터(SRC)
기 여 율 2/5
주관기관 경희대학교
연구기간 2008.09.01 ~ 2015.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

목단피(Moutan Root Bark, Moutan Radicis Cortex), 백지(Angelica Dahurica Root, Angelicae Dahuricae Radix) 및 시호(Bupleurum Root, Bupleuri Radix)로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 물, C_1 내지 C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것을 특징으로 하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올, 메탄올 또는 부탄올인 것을 특징으로 하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 4

목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물의 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 5

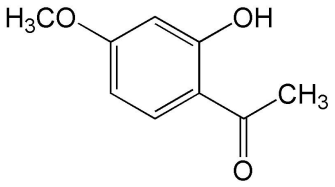
제 4항에 있어서, 상기 유기용매는 클로로포름, 헥산, 에틸 아세테이트 및 부탄올로 구성되는 군으로부터 선택되어진 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항 또는 제 4항에 있어서, 상기 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 하기 [화학식 1]로 기재되는 파에오놀(Paeonol, 2`-하이드록시-4`-메톡시아세토페논(2'-Hydroxy-4'-methoxyacetophenone)), 하기 [화학식 2]로 기재되는 파이오니프로린(paeoniflorin), 하기 [화학식 3]으로 기재되는 파에오니플로리지닌(paeoniflorigenone, [(2s,3as,5s,7ar,8s)-3a-하이드록시-7a-메틸-6-옥소헥사하이드로-2,5-메타노-1,3-벤조디옥솔-8-일]메틸벤조에이트([(2s,3as,5s,7ar,8s)-3a-hydroxy-7a-methyl-6-oxohexahydro-2,5-methano-1,3-benzodioxol-8-yl]methyl benzoate)), 하기 [화학식 4]로 기재되는 임페레이토닌(imperatorin, 9-[(3-메틸-2-부텐-1-일)옥시]-7h-푸로[3,2-g][1]벤조피란-7-원(9-[(3-Methyl-2-buten-1-yl)oxy]-7h-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one)), 하기 [화학식 5]로 기재되는 사이코사포닌 A(Saikosaponin A (3b,4a,16b)-13,28-에폭시-16,23-디하이드록시올레아나-11-엔-3-일-6-데옥시-3-O-베타-D-글루코피라노실-베타-D-갈락토피라노시드, (3beta,4alpha,16beta)-13,28-Epoxy-16,23-dihydroxyolean-11-en-3-yl-6-deoxy-3-O-beta-D-glucopyranosyl-beta-D-galactopyranoside), 하기 [화학식 6]로 기재되는 사이코사포닌 B2(Saikosaponin B2, (3b,4a,16a)-16,23,28-트리하이드록시올레아나-11,13(18)-디엔-3-일-6-데옥시-3-O-베타-D-글루코피라노실-베타-D-갈락토피라노시드, (3b,4a,16a)-16,23,28-Trihydroxyoleana-11,13(18)-dien-3-yl-6-deoxy-3-O-beta-D-glucopyranosyl-beta-D-galactopyranoside), 하기 [화학식 7]로 기재되는 사이코사포닌 B4(Saikosaponin B4, (3b,11a,16a)-16,23,28-트리하이드록시-11-메톡시올레아나-12-엔-3-일-6-데옥시-3-O-베타-D-글루코피라노실-베타-D-갈락토피라노시드, (3β,11α,16α)-16,23,28-

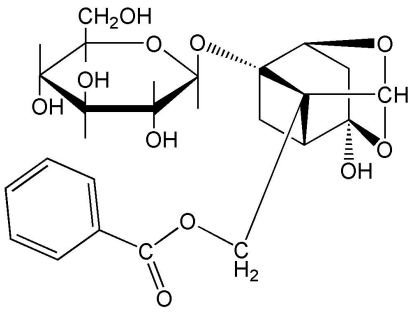
Trihydroxy-11-methoxyolean-12-en-3-yl-6-deoxy-3-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-galactopyranoside) 및 하기 [화학식 8]로 기재되는 사이코사포닌 D(saikosaponin D, (3b,4a,16a)-13,28-에폭시-16,23-디하이드록시올레아나-11-엔-3-일-6-데옥시-3-O-베타-D-글루코피라노실-베타-D-갈락토피라노시드, (3b,4a,16a)-13,28-Epoxy-16,23-dihydroxyolean-11-en-3-yl 6-deoxy-3-O-beta-D-glucopyranosyl beta-D-galactopyranoside)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물:

[화학식 1]



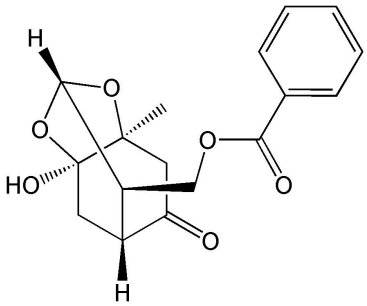
;

[화학식 2]



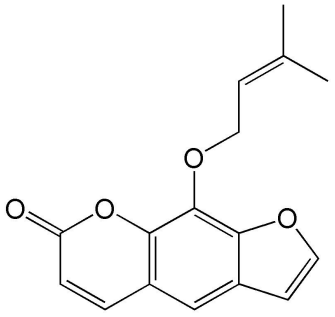
;

[화학식 3]



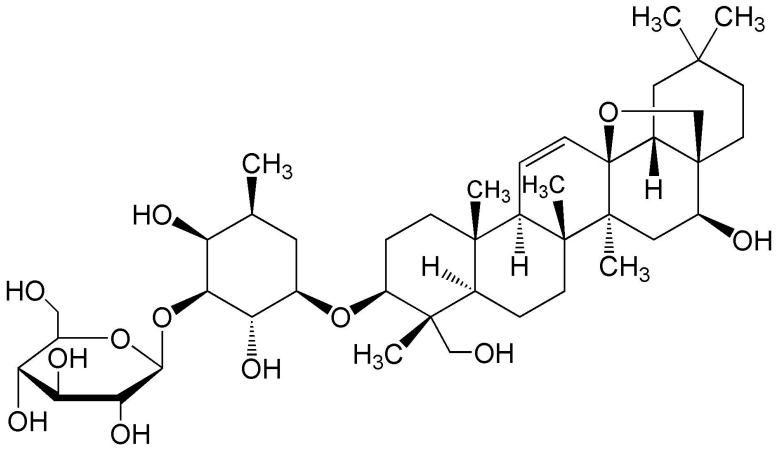
;

[화학식 4]



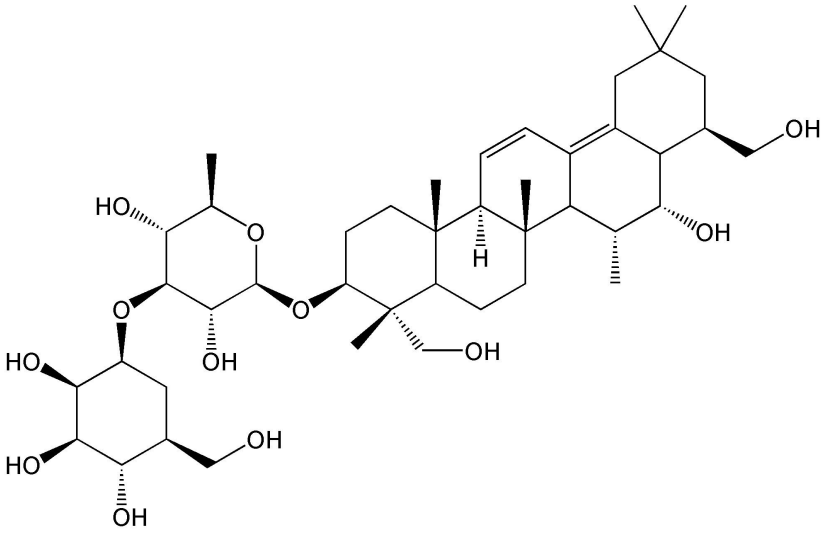
;

[화학식 5]



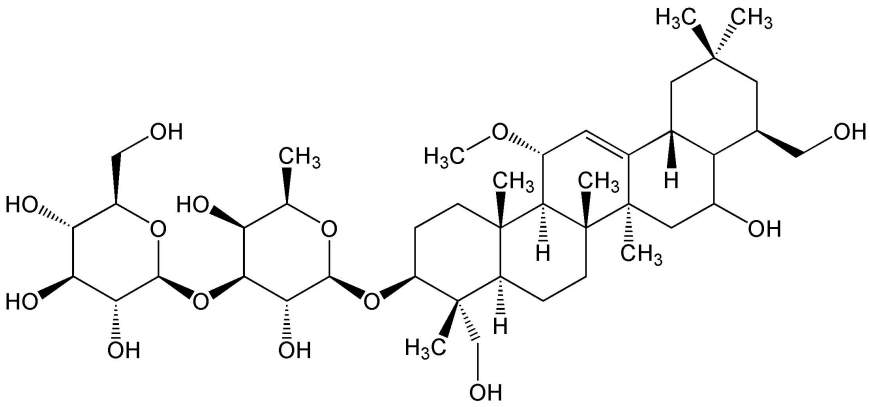
;

[화학식 6]



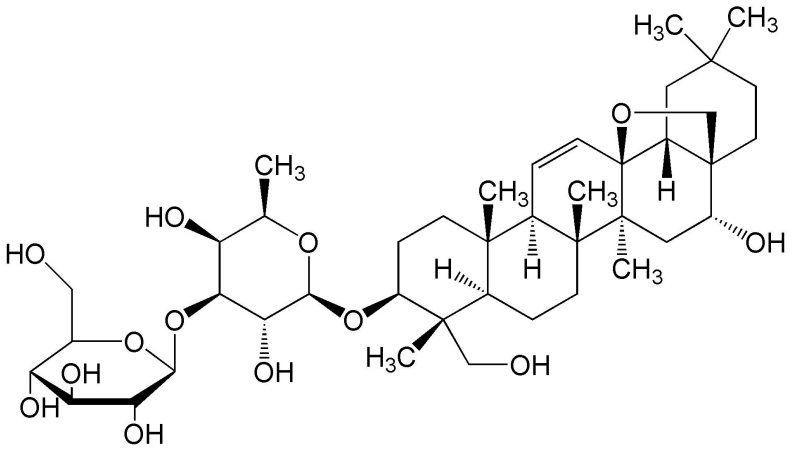
;

[화학식 7]



; 및

[화학식 8]



.

청구항 7

제 1항 또는 제 4항에 있어서, 상기 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 미토콘드리아(mitochondria) 기능 손상, 소포체 스트레스 또는 염증반응을 억제하는 것을 특징으로 하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항 또는 제 4항에 있어서, 상기 신경 퇴행성 질환은 치매, 헌팅턴병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌졸중, 루게릭병 및 척수손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 9

목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품.

청구항 10

목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물의 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품.

청구항 11

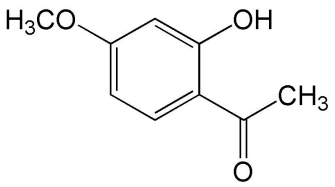
제 10항에 있어서, 상기 유기용매는 클로로포름, 헥산, 에틸 아세테이트 및 부탄올로 구성되는 군으로부터 선택되어진 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는, 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품.

청구항 12

제 9항 또는 제 10항에 있어서, 상기 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 하기 [화학식 1]로 기재되는 파에오놀, 하기 [화학식 2]로 기재되는 파이오니프로린, 하기 [화학식 3]으로 기재되는 파에오니플로리지넌, 하기 [화학식 4]로 기재되는 임페레이토닌, 하기 [화학식 5]로 기재되는 사이코사포닌 A, 하기 [화학식 6]로 기재되는 사이코사포닌 B2, 하기 [화학식 7]로 기재되는 사이코사포닌 B4 및 하기 [화학식 8]로 기재되는 사이코사포닌 D로부터

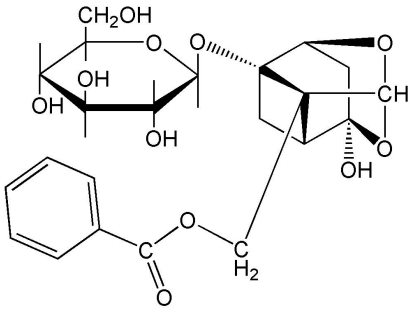
선택되는 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품:

[화학식 1]



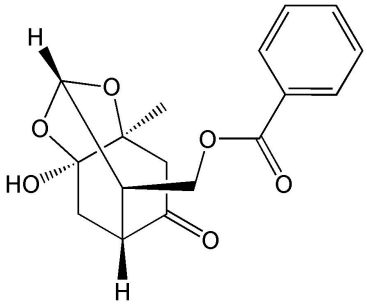
;

[화학식 2]



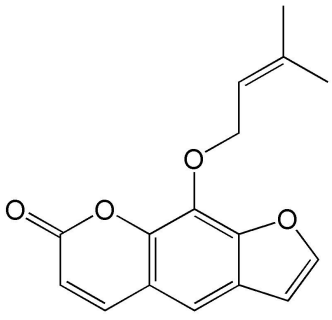
;

[화학식 3]



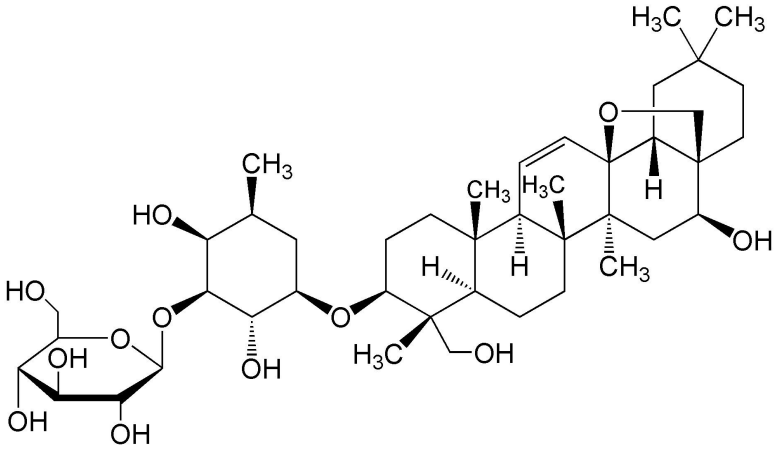
;

[화학식 4]



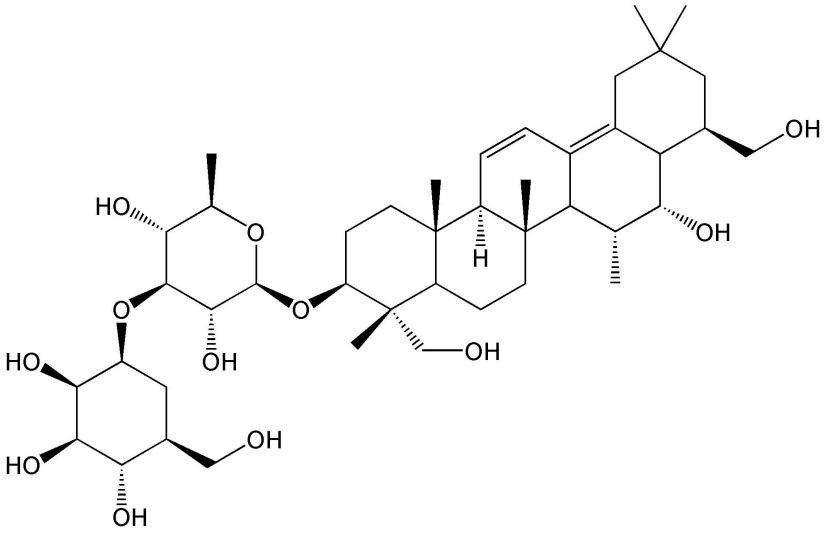
;

[화학식 5]



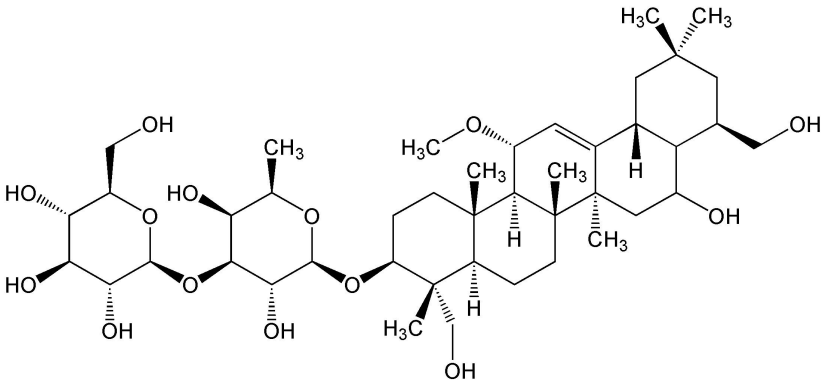
;

[화학식 6]



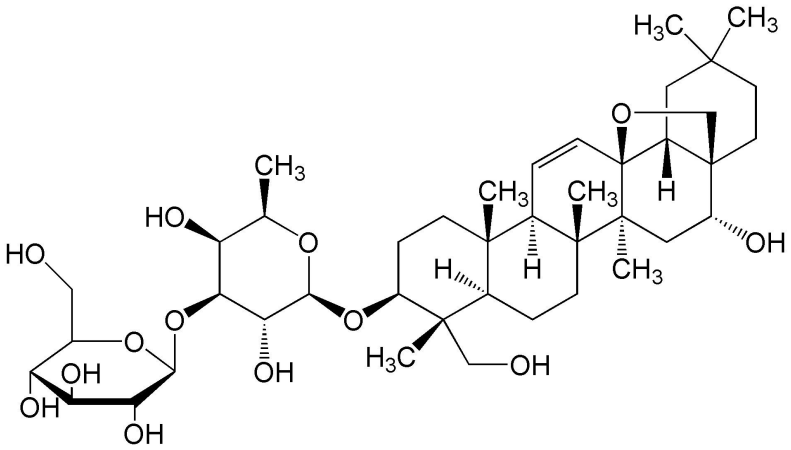
;

[화학식 7]



; 및

[화학식 8]



.

청구항 13

제 9항 또는 제 10항에 있어서, 상기 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 미토콘드리아(mitochondria) 기능 손상, 소포체 스트레스 또는 염증반응을 억제하는 것을 특징으로 하는, 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품.

청구항 14

제 9항 또는 제 10항에 있어서, 상기 신경 퇴행성 질환은 치매, 헌팅턴병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌졸중, 루게릭병 및 척수손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 목단피(Moutan Root Bark, Moutan Radicis Cortex), 백지(Angelica Dahurica Root, Angelicae Dahuricae Radix) 및 시호(Bupleurum Root, Bupleuri Radix)로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지난 20년 사이, 세계적으로 신경 퇴행성 질환 환자가 급증하고 있다. 신경 퇴행성 질환의 치료에 있어서 제일 중요한 것은 예방이지만, 현재까지 뚜렷한 원인 및 치료법에 대한 연구가 부족한 상황이다. 신경 퇴행성 질환의 공통된 병리 현상은 중추신경 세포의 사멸이다. 다른 기관의 세포들과는 달리 중추신경세포들은 일단 세포사가 일어나면 재생이 거의 불가능하고 이에 따라 영구적인 기능 손실이 불가피하다. 지금까지 이러한 뇌질환에 대한 치료법의 모색은 신경세포 자체의 사멸 기전 분석과 이에 근거한 사멸 방지에 초점이 맞추어져 왔다. 그러나, 최근 알츠하이머 병 및 파킨슨병에 대한 기초 및 임상 연구결과, 뇌 염증반응이 신경세포사를 일으키는 주요 원인으로 주목받고 있다. 실제로 뇌질환 환자의 뇌척수액에서 증가된 염증 매개물질 및 활성산소군과 뇌 손상 부위에서 관찰되는 많은 수의 활성화된 소신경교세포는 뇌 염증반응이 파킨슨병의 발병에 주요 원인임을 나타내어, 교세포에 의한 뇌 염증반응의 억제는 상기 신경 퇴행성 질환의 또 다른 타겟이 되고 있다. 그러나, 현재까지 개발된 치료제들은 병의 증상을 조절하는 효과를 나타낼 뿐, 신경 퇴행성 질환을 효과적으로 억제하는 치료제는 아직까지 제시되지 않았다. 또한, 현대 사회에 항상 노출되어 있는 여러 환경오염 및 이로 인해 발생하는 유전자의 변이가 신경 퇴행성 질환을 증가시키고 있는 원인이 되기 때문에 이러한 사회적 현실에 발맞추어

현존하는 치료제와는 다른 새로운 개념의 신경 퇴행성 질환 예방 및 치료제가 요구되고 있다.

[0003] 신경 퇴행성 질환의 종류에는 알츠하이머 병, 파킨슨병, 뇌졸중, 헌팅턴 병 및 척수 손상 등이 있으며, 이 중 파킨슨병(Parkinson`s disease, PD)은 한국의 60세 이상 인구의 1 내지 2% 85세 이상의 4 내지 5%에서 발병하는 두 번째로 흔한 신경퇴행성 질환이다. 최근, 파킨슨병은 한국의 4-50대 중장년층에서도 급증하고 있으며, 중뇌에 존재하는 흑질(substantia nigra), 선조체(corpus striatum)에서 도파민 신경세포의 사멸로 인한 도파민(dopamine) 결핍으로 유발되는 것이 보고된 바 있으나, 도파민 신경 세포의 선별적인 사멸에 대한 정확한 원인이 현재까지 밝혀지지 않아, 효과적인 치료제 및 진단 시약의 개발이 미흡한 상태이다. 파킨슨병은 무표정한 얼굴, 경직(rigidity), 손떨림(tremor), 굽은 자세, 운동완서(bradykinesia)와 같은 운동기능과 관련된 증상을 나타낸다.

[0004] 최근 들어, 미토콘드리아의 기능손상이 파킨슨병을 비롯한 여러 가지 신경퇴행성 질환의 원인일 가능성이 제기되었다. 유전적인 원인에 의한 가족성 파킨슨병(Familial PD)의 원인 유전자로서, 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 발생과 단백질 분해에 관련하는 유전자인 미토콘드리아 외막의 PARK1/4(α-synuclein), PARK2(parkin), PARK6(PTEN-induced putative kinase 1, PINK1), PARK7(DJ-1) 및 PARK8(leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2) 유전자, 내막의 PARK13(HTRA2/OMI) 유전자가 발견되었다(Nat. Clin. Pract. Neurol 2, 136-146, 2006). 또한, PINK1, parkin, DJ-1 등은 미토콘드리아 네트워크 구조를 유지하는 미토콘드리아 동력성(dynamics), 분열(fission) 및 융합(fusion)에 관여한다(PLoS BioI. 6, e1000298, 2010).

[0005] 전체 파킨슨병의 95%를 차지하는 산발성 파킨슨병(sporadic PD) 역시 미토콘드리아 활성 손상을 특징으로 나타낸다. 이러한 미토콘드리아 활성의 손상 원인물질로 알려진 파라쿼트(paraquat), 로테논(rotenone)과 같은 살충제/제초제 등은 미토콘드리아의 전자전달계를 저해하는 것으로 알려져 있다. 또한, 파킨슨병의 실험 동물모델을 만들기 위해 사용되는 1-메틸4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 및 이의 대사체인 MPP+는 미토콘드리아의 전자전달계 복합체 1의 선택적인 저해제로 알려져 있다. 이러한 예는 미토콘드리아의 기능 손상으로 인한 도파민 신경세포의 선별적 사멸이 파킨슨병의 원인일 가능성을 의미하며, 동시에 미토콘드리아의 활성 회복이 파킨슨병의 치료에 중요한 타겟이 될 것임을 시사한다.

[0006] 세포 내 소기관인 소포체는 리보좀이 붙어있는 조면 소포체(rough ER, RER) 및 활면 소포체(smooth ER, SER)로 분류된다. 조면 소포체는 단백질 합성이 주된 기능으로 세포 내 단백질의 약 1/3이 조면 소포체에서 합성되며, 활면 소포체는 다양한 지질과 스테로이드 호르몬을 합성하고 세포 내 칼슘 농도를 조절하는데 중요한 역할을 한다. 그러나, 다양한 원인에 의해 단백질의 접힘(folding)이 비정상적으로 나타나게 되면 소포체의 기능 손상이 발생하며, 이러한 상태를 소포체 스트레스라 한다. 소포체 스트레스가 지속되면 다양한 신호전달을 통해서 세포사멸(apoptosis) 및 다량의 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 형성을 증가시켜 세포의 손상을 초래한다. 이러한 소포체 스트레스 역시 미토콘드리아 손상에 의해 야기되는 대사증후군, 당뇨, 비만, 지질대사이상 및 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅턴병 및 척수손상 같은 퇴행성 신경 질환을 유발하는 원인으로 보고되고 있다(Lindholm et aI., 2006; Penas et aI., 2007; Yoshida, 2007; Zhang et aI., 2006).

[0007] 목단피(牧丹皮, Moutan Root Bark, Moutan Radicis Cortex)는 목단(*Paeonia suffruticosa* Andrews)의 뿌리껍질을 지칭하는 생약으로 파에오놀(paeonol), 파에오니프로린(paeoniflorin), 옥시파에오니플로린(oxypaeoniflorin), 갈릭산(gallic acid) 또는 파에오니플로리지닌(paeoniflorigenone) 등이 함유되어 있다. 한방에서는 예로부터 진정, 진통, 소염 및 염증성 질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 최근 연구로는 목단피가 항균 작용, 항염증 작용, 항산화 작용, 항노화 작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 다양한 혼합물 중의 한 성분으로 뇌질환 치료 효능이 보고되고 있다.

[0008] 백지(白芷, Angelica Dahurica Root, Angelicae Dahuricae Radix)는 한국, 중국, 및 일본 등에서 자생하는 2내지 3년생 초본으로 한방에서는 구릿대(*Angelica dahurica* Bentham et Hooker f.) 또는 항백지(杭白芷, *Angelica dahurica Bentham* et Hooker f. var. *formosana* Shan et Yuan)의 뿌리를 말려 만든 생약을 말한다. 백지의 주요한 생활성 화합물로는 임페레이토린, 아이소임페레이토린(isoimperatorin), 옥시포세다닌

(oxypeucedanin), 펠롭테린(phellopterin), 바이아칸겔리콜(byakangelicol)로 보고되어 있다. 한방에서 예로부터 백지의 효능으로서 여러 가지가 알려져 있는데, 특히 발한, 진정, 진통, 감기, 두통 또는 치통의 완화에 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 미토콘드리아 기능 개선과 소포체 스트레스의 완화를 통한 신경질환에 관련된 작용효과 등에 대해서는 알려진 바 없다.

[0009] 시호 (柴胡, Bupleurum Root, Bupleuri Radix)는 시호(*Bupleurum falcatum* Linne) 또는 그 변종(산형과 Umbelliferae)의 뿌리를 지칭하는 한약재이다. 시호의 주요 약리활성으로는, 해열, 진정, 진통작용, 항균, 항바이러스 및 항염증 등의 다양한 약리활성이 보고되어있다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 약용식물로부터 신경 퇴행성 질환에 대한 치료제를 개발하기 위해 노력한 결과, 목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물이 시험관 내(*in vitro*)에서 이들의 단독 추출물에서 나타나는 미토콘드리아 기능 손상 회복 효과, 소포체 스트레스 완화 효과, 염증반응 억제 효과를 동시에 나타내며, 이는 단독 추출물에서의 효과보다 현저한 효과인 것을 확인하였다. 또한, 상기 혼합 추출물은 생체 내(*in vivo*)의 파킨슨병 모델에서 운동 협응(motor coordination) 개선 효과 및 도파민 신경세포 보호 효과를 유의적으로 나타내므로, 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 신경 퇴행성 질환 치료 및 예방용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 목단피(Moutan Root Bark, Moutan Radicis Cortex), 백지(Angelica Dahurica Root, Angelicae Dahuricae Radix) 및 시호(Bupleurum Root, Bupleuri Radix)로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물, 및 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 목단피(Moutan Root Bark, Moutan Radicis Cortex), 백지(Angelica Dahurica Root, Angelicae Dahuricae Radix) 및 시호(Bupleurum Root, Bupleuri Radix)로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 혼합 추출물의 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 추출물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품을 제공한다.

[0015] 아울러, 본 발명은 상기 혼합 추출물의 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 목단피(Moutan Root Bark, Moutan Radicis Cortex), 백지(Angelica Dahurica Root, Angelicae Dahuricae Radix) 및 시호(Bupleurum Root, Bupleuri Radix)로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물은 파킨슨병 세포 모델에서 미토콘드리아 기능 손상, 소포체 스트레스 및 염증반응이 동시에 유도되었을 때 세포 내 ATP 수준, 미토콘드리아 막전압 손상의 회복 및 ROS 발생 완화 효과에 대하여 단독 추출물에 비해 약 1.5 배 증가한 수준으로 나타낸다. 또한, 본 발명의 혼합 추출물은 파킨슨병 동물 모델에서 운동 협응(motor coordination) 개선 효과 및 도파민 신경세포 보호 효과를 유의적으로 나타내므로, 본 발명의 혼합 추출물 또는

이의 분획물은 신경 퇴행성 질환 치료 및 예방용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은, 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 투여를 통한 파킨슨병 동물 모델의 제조 과정을 나타내는 모식도이다. 구체적으로, 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물 1:1:1 비율의 동결건조물을 3% HPMC 용매에 녹여, 마우스 체중 1 kg 당 1, 3 또는 10 mg으로 총 14일 동안 1일 1회 경구 투여(per oral, p.o.)하였고 실험 시작 8일째부터 연속 5일 동안 각각의 경구 투여 3 시간 후에는, 마우스 체중 1 kg 당 30 mg의 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)을 총 5일 동안 복강 투여(intraperitoneal, i.p.)하여 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다. 상기 제조한 마우스를 이용하여 행동실험을 하고, 희생시켜 세포 및 웨스턴블럿 실험을 수행하였다.

도 2는, 6-OHDA(6-hydroxydopamine) 투여를 통한 파킨슨병 동물 모델의 제조 과정을 나타내는 모식도이다. 구체적으로, stereotaxic surgery를 통해 0.1% ascorbic acid 2 ㎕에 6-OHDA (6-hydroxydopamine) 16 ㎍을 희석하여 1회 주입하여 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다. 수술 일주일 후, 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물 1:1:1 비율의 동결건조물을 물에 녹여, 마우스 체중 1 kg 당 3 mg으로 총 7 일 동안 1 일 1회 경구 투여(per oral, p.o.)하였다. 상기 제조한 마우스를 이용하여 행동실험을 하고, 희생시켜 세포 및 웨스턴블럿 실험을 수행하였다.

도 3은, 로테논(rotenone) 투여를 통한 파킨슨병 동물 모델의 제조 과정을 나타내는 모식도이다. 구체적으로, 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물 1:1:1 비율의 동결건조물을 물에 녹여, 랫드 체중 1 kg 당 10 mg으로 총 6 주 동안 1 일 1회 경구 투여(per oral, p.o.)하였다. 각각의 경구 투여 1 주 후에는, 랫드 체중 1 kg 당 2.5 mg의 rotenone을 총 5 주 동안 1일 1회 복강 투여(intraperitoneal, i.p.)하여 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다. 상기 제조한 랫드를 이용하여 행동실험을 하고, 희생시켜 세포 및 웨스턴블럿 실험을 수행하였다.

도 4는, LPS(Lipopolysaccharide) 투여를 통한 파킨슨병 동물 모델의 제조 과정을 나타내는 모식도이다. 구체적으로, 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물 1:1:1 비율의 동결건조물을 물에 녹여, 마우스 체중 1 kg 당 10 또는 30 mg으로 총 3일 동안 1일 1회 경구 투여(per oral, p.o.)하였다. 마지막 경구 투여 후에는, 마우스 체중 1 kg 당 5 mg의 LPS (Lipopolysaccharide)을 단회 복강 투여(intraperitoneal, i.p.)하여 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다. 상기 제조한 마우스를 이용하여 항뇌염증 효능 실험을 수행하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 목단피(Moutan Root Bark, Moutan Radicis Cortex), 백지(Angelica Dahurica Root, Angelicae Dahuricae Radix) 및 시호(Bupleurum Root, Bupleuri Radix)로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물의 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 목단피, 백지 및 시호는 1 : 0.2 내지 5 : 0.2 내지 5(w:w:w)의 중량 비율로 혼합되는 것이 바람직하며, 구체적으로는 1 : 0.5 내지 2 : 0.5 내지 2(w:w:w)의 비율로 혼합되는 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로는 1:1:1(w:w:w)의 비율로 혼합되는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0022] 상기 목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종은 1 : 0.2 내지 5(w:w:)의 중량 비율로 혼합되는 것이 바람직하며, 구체적으로는 1 : 0.5 내지 2(w:w)의 비율로 혼합되는 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로는 1:1(w:w)의 비율로 혼합되는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0023] 상기 혼합 추출물은 물, C_1 내지 C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올은 에탄올, 메탄올 또는 부탄올인 것이 바람직하다.

[0024] 상기 혼합 추출물은 목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상을 혼합한 추출물인 것이 바람직하나, 목단피, 백지 또는 시호의 추출물 중에서 선택된 2 종 이상을 혼합한 혼합물 또한 사용될 수 있다.

[0025] 상기 혼합 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0026] 1) 목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상을 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0027] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0028] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.

[0029] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 목단피, 백지 및 시호는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.

[0030] 상기 방법에 있어서, 혼합 추출물의 추출 방법으로는 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류냉각 추출 및 초음파 추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있다.

[0031] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

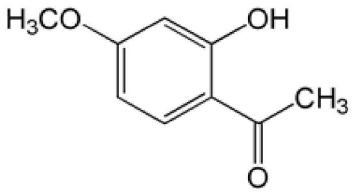
[0032] 상기 분획물은 혼합 추출물에 추가적으로 유기용매를 가하여 제조한 분획물인 것이 바람직하며, 상기 유기용매는 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 부탄올로 구성되는 군으로부터 선택되어진 하나 또는 그 이상인 것이 바람직하고, 구체적으로는 부탄올인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 상기 혼합 추출물은 하기 [화학식 1]로 기재되는 파에오놀(Paeonol, 2`-하이드록시-4`-메톡시아세토페논(2'-Hydroxy-4'-methoxyacetophenone)), 하기 [화학식 2]로 기재되는 파이오니프로린(paeoniflorin), 하기 [화학식 3]으로 기재되는 파에오니플로리지넌(paeoniflorigenone, [(2s,3as,5s,7ar,8s)-3a-하이드록시-7a-메틸-6-옥소헥사하이드로-2,5-메타노-1,3-벤조디옥솔-8-일]메틸벤조에이트([(2s,3as,5s,7ar,8s)-3a-hydroxy-7a-methyl-6-oxohexahydro-2,5-methano-1,3-benzodioxol-8-yl]methyl benzoate)), 하기 [화학식 4]로 기재되는 임페레이토닌(imperatorin, 9-[(3-메틸-2-부텐-1-일)옥시]-7h-푸로[3,2-g][1]벤조피란-7-원(9-[(3-Methyl-2-buten-1-yl)oxy]-7h-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one)), 하기 [화학식 5]로 기재되는 사이코사포닌 A(Saikosaponin A (3b,4a,16b)-13,28-에폭시-16,23-디하이드록시올레아나-11-엔-3-일-6-데옥시-3-O-베타-D-글루코피라노실-베타-D-갈락토피라노시드, (3beta,4alpha,16beta)-13,28-Epoxy-16,23-dihydroxyolean

[0034] -11-en-3-yl-6-deoxy-3-O-beta-D-glucopyranosyl-beta-D-galactopyranoside), 하기 [화학식 6]로 기재되는 사이코사포닌 B2(Saikosaponin B2, (3b,4a,16a)-16,23,28-트리하이드록시올레아나-11,13(18)-디엔-3-일-6-데옥시-3-O-베타-D-글루코피라노실-베타-D-갈락토피라노시드, (3b,4a,16a)-16,23,28-Trihydroxyoleana-11,13(18)-

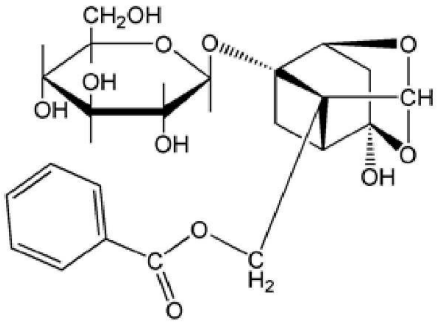
[0035] dien-3-yl-6-deoxy-3-O-beta-D-glucopyranosyl-beta-D-galactopyranoside), 하기 [화학식 7]로 기재되는 사이코사포닌 B4(Saikosaponin B4, (3b,11a,16a)-16,23,28-트리하이드록시-11-메톡시올레아나-12-엔-3-일-6-데옥시-3-O-베타-D-글루코피라노실-베타-D-갈락토피라노시드, (3β,11α,16α)-16,23,28-Trihydroxy-11-methoxyolean-12-en-3-yl-6-deoxy-3-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-galactopyranoside) 및 하기 [화학식 8]로 기재되는 사이코사포닌 D(saikosaponin D, (3b,4a,16a)-13,28-에폭시-16,23-디하이드록시올레아나-11-엔-3-일 6-데옥시-3-O-베타-D-글루코피라노실-베타-D-갈락토피라노시드, (3b,4a,16a)-13,28-Epoxy-16,23-dihydroxyolean-11-en-3-yl 6-deoxy-3-O-beta-D-glucopyranosyl beta-D-galactopyranoside)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

[0036] [화학식 1]



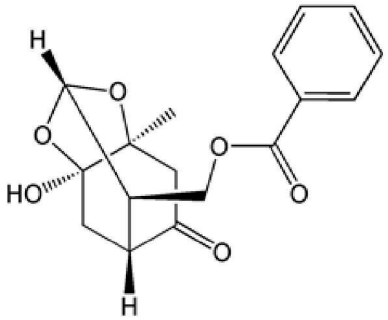
[0037] ;

[0038] [화학식 2]



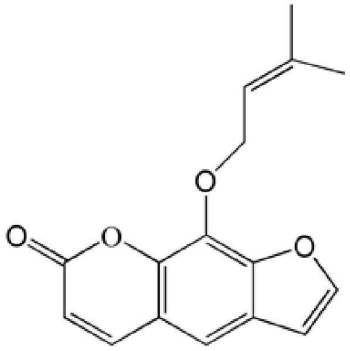
[0039] ;

[0040] [화학식 3]



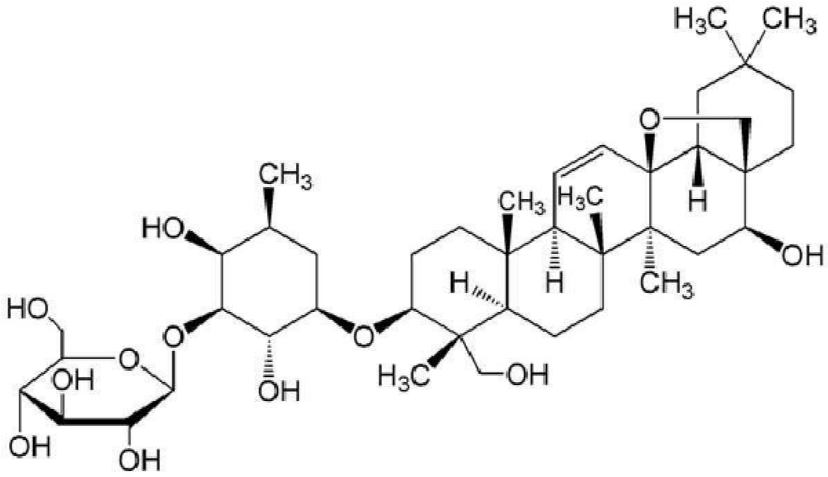
[0041] ;

[0042] [화학식 4]



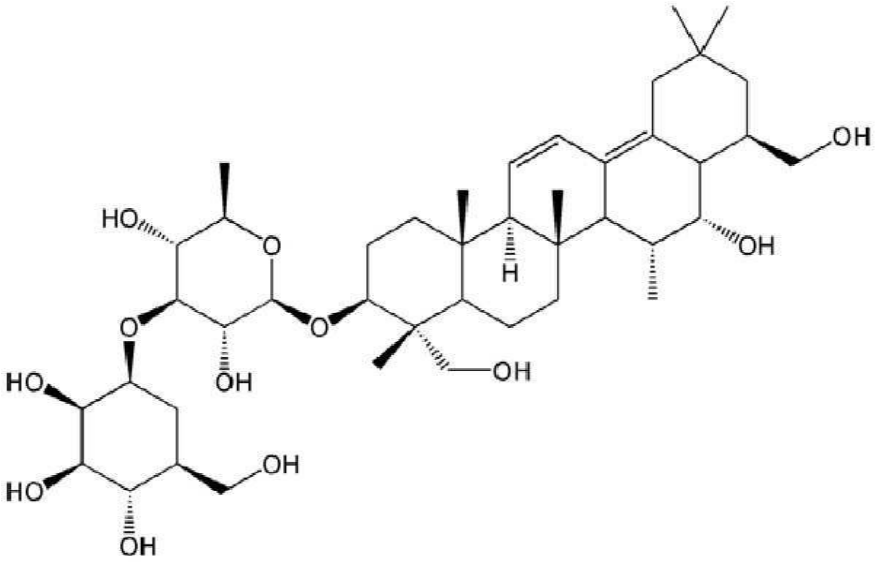
[0043] ;

[0044] [화학식 5]



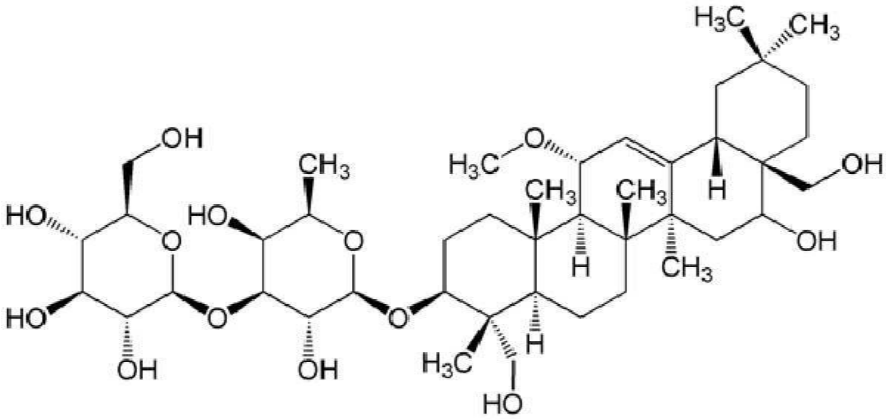
[0045]

[0046] [화학식 6]



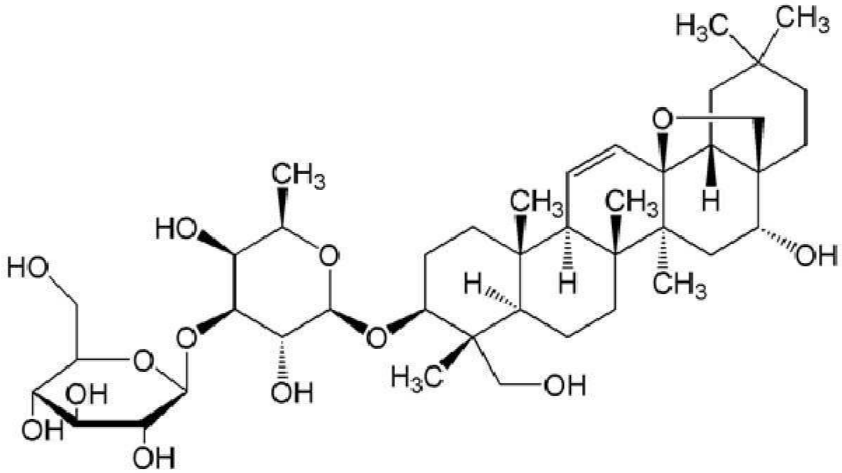
[0047] ;

[0048] [화학식 7]



[0049] ; 및

[0050] [화학식 8]



[0051] .

[0052] 상기 혼합 추출물은 미토콘드리아 기능 손상, 소포체 스트레스 및 염증반응을 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0053] 상기 신경 퇴행성 질환은 치매, 헌팅턴병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌졸중, 루게릭병 및 척수손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0054] 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 목단피, 백지 또는 시호의 단독 추출물이 나타내는 효과를 확인하기 위하여 세포 기능 손상을 유도한 신경 세포주에서 회복 효과를 확인하였다. 그 결과, 목단피 단독 추출물은 미토콘드리아 기능 손상에 대하여 회복 효과를 나타내고(표 2 내지 표 7 참조), 백지 단독 추출물은 소포체 스트레스에 대하여 회복 효과를 나타내며(표 8 내지 표 13 참조), 시호 단독 추출물은 염증 반응에 대하여 회복 효과를 나타내는 것(표 14 내지 표 20 참조)을 확인하였다.

[0055] 또한 본 발명자들은 목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물을 처리하였을 때, 파킨슨병 세포 모델에서 유발된 미토콘드리아 기능 손상에 대해서 ATP 함량 회복 효과 및 활성 산소 발생 완화 효과를 나타내며, 특히 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물에서 현저한 미토콘드리아 기능 손상 회복 효과를 나타내었다(표 21 내지 표 23 참조).

[0056] 또한, 본 발명자들은 목단피, 백지 및 시호의 혼합 비율에 따른 파킨슨병 세포 모델의 기능 회복 효과를 확인한 결과, 1:1:1(w:w:w)의 혼합비율로 혼합되었을 때 세포 기능 회복이 효과적으로 나타났다(표 24 내지 표 26 참조). 목단피, 백지 및 시호 혼합 에탄올 추출물의 에탄올 농도에 따른 파킨슨병에 대한 세포 기능 회복 효과에 대해서는, 90% 에탄올을 추출 용매로 하여 추출한 혼합 추출물을 처리하였을 때 복합적 세포 기능 회복 효과가 가장 크게 증가하는 것을 확인하였으며(표 28 내지 표 30 참조), 에탄올 추출물이 물, 메탄올 추출물 또는 부탄올 추출물에 비해 가장 크게 증가한 효과를 나타내어, 다른 추출물을 사용한 경우에 비해 현저한 효과를 나타내었다(표 31 내지 표 33 참고).

[0057] 1:1:1 (w:w:w) 혼합 비율의 목단피, 백지 및 시호 혼합 90% 에탄올 추출물이 나타내는 효과를 확인하기 위하여 세포 기능 손상을 유도한 신경 세포주에서 회복 효과를 확인하였다. 그 결과 미토콘드리아 기능 손상에 대한 회복 효과, 소포체 스트레스에 대한 회복 효과, 염증 반응에 대한 회복 효과를 나타내었다(표 34 내지 표 38 참고).

[0058] 아울러, 본 발명자들은 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP), 6-하이드록시도파민 (6-Hydroxydopamine, 6-OHDA), 로테논 (Rotenone) 및 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 사용한 파킨슨병 동물모델을 사용하였다. MPTP를 투여하여 제조한 파킨슨병 동물모델에서 혼합 추출물을 투여하고 행동 시험을 수행한 결과, 혼합 추출물을 투여하지 않은 동물모델에 비해 운동 협응(motor coordination)이 개선되는 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 선조체(striatum, ST), 흑질(substantia nigra, SN) 및 소뇌(cerebellum) 조직에서 도파민 신경세포 보호효과 및 신호 전달계 손상에 대한 회복 효과를 나타내었다(표 39 내지 표 47 참조). 6-OHDA를 투여하여 제조한 파킨슨병 동물모델에서 행동 시험을 수행한 결과에서도 운동 협응 (motor coordination)이 개선되는 효과와 선조체 및 흑질에서 도파민 신경세포 보호효과가 나타났다(표 48 내지 표 52 참조). Rotenone을 투여하여 제조한 파킨슨병 동물모델에서 수행한 행동 시험에서도 rotenone에 의해 감소되었던 운동기능이 개선됨을 확인하였으며, 파킨슨병의 주요 병인인자인 흑질 부위의 α-synuclein-oligomer의 축적이 감소하였다(표 53 내지 표 54 참조). LPS를 투여하여 제조한 Neuroinflammation 마우스모델에는 흑질 및 해마에서 유도되는 astrocyte 및 microglia의 활성화가 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물에 의해 억제되어 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다 (표 55 내지 표 58 참조).

[0059] 따라서, 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물은 단독 추출물에서 나타나는 것보다 파킨슨병 세포 모델에서 상승된 미토콘드리아 기능 손상 회복 효과, 소포체 스트레스 완화 효과, 염증반응 억제 효과를 동시에 나타내며, 상기 혼합 추출물은 생체 내(*in vivo*)의 파킨슨병 모델에서 운동 협응(motor coordination) 개선 효과, 도파민 신경세포 보호 효과 및 항염증 효과를 유의적으로 나타내므로, 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 신경 퇴행성 질환 치료 및 예방용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0060] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0061] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤

활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0062] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 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, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0063] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용 또는 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 피부외용으로 사용한다.

[0064] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0065] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 혼합 추출물의 양을 기준으로 0.01 내지 1000 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 30 내지 500 ㎎/㎏이고, 더욱 바람직하게는 50 내지 300 ㎎/㎏이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0066] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명은 목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품을 제공한다.

[0068] 아울러, 본 발명은 상기 혼합 추출물의 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환의 개선 및 예방용 건강식품을 제공한다.

[0069] 상기 목단피, 백지 및 시호는 1 : 0.2 내지 5 : 0.2 내지 5(w:w:w)의 중량 비율로 혼합되는 것이 바람직하며, 구체적으로는 1 : 0.5 내지 2 : 0.5 내지 2(w:w:w)의 비율로 혼합되는 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로는 1:1:1(w:w:w)의 비율로 혼합되는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0070] 상기 목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종은 1 : 0.2 내지 5(w:w:)의 중량 비율로 혼합되는 것이 바람직하며, 구체적으로는 1 : 0.5 내지 2(w:w)의 비율로 혼합되는 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로는 1:1(w:w)의 비율로 혼합되는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0071] 상기 혼합 추출물은 물, C_1 내지 C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올은 에탄올, 메탄올 또는 부탄올인 것이 바람직하다.

[0072] 상기 혼합 추출물은 목단피, 백지 및 시호로 구성된 군으로부터 선택된 2 종 이상을 혼합한 추출물인 것이 바람직하나, 목단피, 백지 또는 시호의 추출물 중에서 선택된 2 종 이상을 혼합한 혼합물 또한 사용될 수 있다.

[0073] 상기 혼합 추출물은 상기 [화학식 1]로 기재되는 파에오놀, 상기 [화학식 2]로 기재되는 파이오니프로린, 상기 [화학식 3]으로 기재되는 파에오니플로리지넌, 상기 [화학식 4]로 기재되는 임페레이토닌, 상기 [화학식 5]로 기재되는 사이코사포닌 A, 상기 [화학식 6]로 기재되는 사이코사포닌 B2, 상기 [화학식 7]로 기재되는 사이코사포닌 B4 및 상기 [화학식 8]로 기재되는 사이코사포닌 D로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0074] 상기 혼합 추출물은 미토콘드리아 기능 손상, 소포체 스트레스 및 염증반응을 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0075] 상기 신경 퇴행성 질환은 치매, 헌팅턴병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌졸중, 루게릭병 및 척수손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하며, 구체적으로는 파킨슨병인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0076] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물은 단독 추출물에서 나타나는 것보다 현저하게 상승한 미토콘드리아 기능 손상 회복 효과, 소포체 스트레스 완화 효과, 염증반응 억제 효과를 동시에 나타내며, 상기 혼합 추출물은 생체 내의 파킨슨병 모델에서 운동 협응 개선 효과 및 도파민 신경세포 보호 효과를 유의적으로 나타내므로, 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 신경 퇴행성 질환 개선 및 예방용 건강식품의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0077] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0078] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0079] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0080] 상기 외에 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 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, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물 100 중량부당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0081] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0082] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0083] **<실시예 1> 목단피, 백지 및 시호의 단독 추출물의 제조**

[0084] **<1-1> 목단피의 에탄올 추출물 제조**

[0085] 목단피(Moutan Root Bark, Moutan Radicis Cortex; 정도약업사, 한국)에 90% 에탄올을 첨가하고, 실온에서 110분 동안 냉침하여 추출한 후, 여과하여 각각의 에탄올 추출물을 수득하였다. 수득한 추출물은 동결 건조하여

보관하였고, 완충용액에 녹여 사용하였다. 상기 추출물의 지표 성분으로는 파에오놀(Paeonol)을 사용하여 순도를 확인하였다.

[0086] **<1-2> 백지의 에탄올 추출물 제조**

[0087] 백지(Angelica Dahurica Root, Angelicae Dahuricae Radix; 정도약업사, 한국)를 90% 에탄올을 첨가하고, 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법을 수행하여 백지의 에탄올 추출물을 제조하였다. 백지 추출물의 지표 성분으로는 임페레이토린(Imperatorin)을 사용하여 순도를 확인하였다.

[0088] **<1-3> 시호의 에탄올 추출물 제조**

[0089] 시호(Bupleurum Root, Bupleuri Radix; 정도약업사, 한국)를 90% 에탄올을 첨가하고, 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법을 수행하여 백지의 에탄올 추출물을 제조하였다. 시호 추출물의 지표 성분으로는 사이코사포닌 A(Saikosaponin A)를 사용하여 순도를 확인하였다.

[0090] **<실시예 2> 목단피 및 백지 혼합 추출물의 제조**

[0091] 목단피 및 백지를 1:5, 1:1 또는 1:0.2(w:w)의 비율로 각각 혼합한 후 90% 에탄올을 첨가하고, 실온에서 110 분 동안 냉침하여 추출한 후, 여과하여 목단피 및 백지의 혼합 에탄올 추출물을 수득하였다. 수득한 혼합 에탄올 추출물은 동결 건조하여 보관하였고, 물 또는 완충용액에 녹여 사용하였다. 상기 혼합 추출물의 지표 성분으로는 파에오놀 및 임페레이토린을 사용하여 순도를 확인하였다.

[0092] **<실시예 3> 목단피 및 시호의 혼합 추출물의 제조**

[0093] 목단피 및 시호를 1:5, 1:1 또는 1:0.2(w:w)의 비율로 각각 혼합한 후 90% 에탄올을 첨가하고, 실온에서 110 분 동안 냉침하여 추출한 후, 여과하여 목단피 및 시호의 혼합 에탄올 추출물을 수득하였다. 수득한 혼합 에탄올 추출물은 동결 건조하여 보관하였고, 완충용액에 녹여 사용하였다. 상기 혼합 추출물의 지표 성분으로는 파에오놀 및 사이코사포닌 A를 사용하여 순도를 확인하였다.

[0094] **<실시예 4> 백지 및 시호의 혼합 추출물의 제조**

[0095] 백지 및 시호를 1:5, 1:1 또는 1:0.2(w:w)의 비율로 각각 혼합한 후 90% 에탄올을 첨가하고, 실온에서 110 분 동안 냉침하여 추출한 후, 여과하여 백지 및 시호의 혼합 에탄올 추출물을 수득하였다. 수득한 혼합 에탄올 추출물은 동결 건조하여 보관하였고, 완충용액에 녹여 사용하였다. 상기 혼합 추출물의 지표 성분으로는 임페레이토린 및 사이코사포닌 A를 사용하여 순도를 확인하였다.

[0096] **<실시예 5> 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 제조**

[0097] **<5-1> 목단피, 백지 및 시호 혼합 에탄올 추출물의 제조**

[0098] 목단피, 백지 및 시호를 하기 [표 1]의 중량 비율로 각각 혼합한 후, 10, 30, 50, 70 또는 90% 에탄올을 첨가하고, 실온에서 110 분 동안 냉침하여 추출한 후, 여과하여 목단피, 백지 및 시호의 혼합 에탄올 추출물을 수득하였다. 수득한 혼합 에탄올 추출물은 동결 건조하여 보관하였고, 완충용액에 녹여 사용하였다. 상기 혼합 추출물의 지표 성분으로는 파이에놀, 사이코사포닌 A 및 임페레이토린을 사용하여 순도를 확인하였다.

표 1

[0099] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호 추출물의 혼합 비율

번호	혼합 비율(%, w:w:w)		
	목단피	백지	시호
1	1	2	1

2	1	1	2
3	1	2	2
4	1	0.5	1
5	1	1	0.5
6	1	0.5	0.5
7	1	3	1
8	1	1	3
9	1	3	3
10	1	0.33	1
11	1	1	0.33
12	1	0.33	0.33
13	1	4	1
14	1	1	4
15	1	4	4
16	1	0.25	1
17	1	1	0.25
18	1	0.25	0.25
19	1	5	1
20	1	1	5
21	1	5	5
22	1	0.2	1
23	1	1	0.2
24	1	0.2	0.2
25	1	1	1

[0100] **<5-2> 목단피, 백지 및 시호 혼합 물 추출물의 제조**

[0101] 목단피, 백지 및 시호를 1:1:1(w:w:w)의 비율로 혼합한 후, 물을 첨가하여 상기 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 목단피, 백지 및 시호의 혼합 물 추출물을 제조하였다.

[0102] **<5-3> 목단피, 백지 및 시호 혼합 메탄올 추출물의 제조**

[0103] 목단피, 백지 및 시호를 1:1:1(w:w:w)의 비율로 혼합한 후, 90% 메탄올을 첨가하여 상기 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 목단피, 백지 및 시호의 혼합 메탄올 추출물을 제조하였다.

[0104] **<5-4> 목단피, 백지 및 시호 혼합 부탄올 추출물의 제조**

[0105] 목단피, 백지 및 시호를 1:1:1(w:w:w)의 비율로 혼합한 후, 90% 부탄올을 첨가하여 상기 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 목단피, 백지 및 시호의 혼합 부탄올 추출물을 제조하였다.

[0106] **<실험예 1> 목단피 추출물 및 이의 활성성분의 세포 내 효능평가**

[0107] **<1-1> 목단피 추출물 및 이의 활성성분의 세포 생존률 확인**

[0108] 본 발명의 목단피 추출물 및 이의 활성성분이 나타내는 세포 내 효능을 평가하기 위해, 신경세포(human neuroblastoma cell)에서 세포독성의 유무를 확인하였다.

[0109] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12(Dulbeco`s Modified Eagleas Medium & Ham`s F12; Gibco 사, 미국) 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 2.5×10^4 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 목단피 추출물 또는 이의 활성성분인 파에오놀, 파에오니프로린 또는 파에오니플로리지넌을 각각 1.0 ㎍/㎖의 농도로 4 시간 동안 처리한 후, 세포를 수득하여 칼세인(Calcein)을 사용해 세포의 생존률을 확인하고, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률

을 백분율로 구하였다.

[0110] 그 결과, 하기 [표 2]에서 나타난 바와 같이, 목단피 추출물 및 이의 활성성분은 정상세포에 대하여 독성을 나타내지 않았다(표 2).

표 2

[0111] 목단피 추출물 및 이의 활성성분의 세포 생존률 확인

처리 물질명		농도(㎍/㎖)	세포 생존률(% of control)
정상 대조군		-	100.0 ± 7.35
목단피 추출물 및 활성성분	90% 에탄올 추출물	1	105.4 ± 6.83
	파에오놀	1	102.2 ± 9.10
	파에오니프로린	1	97.9 ± 7.34
	파에오니플로리지넌	1	98.9 ± 8.10

[0112] **<1-2> 목단피 추출물 및 이의 활성성분의 미토콘드리아 손상에 따른 세포 사멸 억제**

[0113] 목단피 추출물 및 이의 활성성분이 미토콘드리아의 기능 손상에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, MTT 분석을 수행하여 살아있는 세포 내에서 미토콘드리아 복합체 1의 손상에 대한 회복 효과를 확인하였다.

[0114] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 목단피 90% 에탄올 추출물, 파에오놀, 파에오니프로린 또는 파에오니플로리지넌을 1.0 ㎍/㎖의 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양한 후, 50 ㎍/㎖ 아트라진(atrazine, 2-클로로-4-(에틸아민)-6-(이소프로필아민)-s-트리아진(2-chloro-4-(ethylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine), ATZ)을 상기 전처리한 세포에 처리하고 24 시간 동안 배양하여, 세포에 미토콘드리아 기능 저하를 유도하였다. 기능 저하가 유도된 세포에 0.2 mg/㎖ 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐-테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT; sigma 사, 미국)을 처리하여 4 시간 동안 배양한 후, 살아있는 세포에 의해 형성된 MTT 포르마잔(formazan) 침전물은 0.04 N 염산/이소프로판올(isopropanol) 100 ㎕ 에 용해하여, ELISA 마이크로플레이트 리더기(Molecular Devices 사, 미국)으로 540 ㎚에서 흡광도를 측정하여 MTT 분석을 수행한 다음, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포내 미토콘드리아 복합체 1의 손상 정도를 확인하였다. 또한, 음성 대조군으로는 50 ㎍/㎖의 아트라진만을 처리하여 미토콘드리아 손상을 유발하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 MTT 분석을 수행하였다.

[0115] 그 결과, 하기 [표 3]에서 나타난 바와 같이 아트라진에 의해 유도된 미토콘드리아 손상은 목단피 90% 에탄올 추출물, 파에오놀, 파에오니프로린 또는 파에오니플로리지넌 처리에 의해 정상 수준으로 회복하였다(표 3).

표 3

[0116] 목단피 추출물 및 이들의 활성성분의 미토콘드리아 복합체 1 손상 회복 효능

약물 처리		유발물질 (아트라진, ㎍/㎖)	MTT (% of control)
처리 물질명	농도(㎍/㎖)		
정상 대조군	-	-	100.0 ± 2.79
음성 대조군	-	50	76.7 ± 7.35
목단피 추출물	1	50	94.3 ± 5.55
파에오놀	1	50	101.8 ± 7.21
파에오니프로린	1	50	96.4 ± 7.44
파에오니플로리지넌	1	50	95.5 ± 6.09

[0117] **<1-3> 목단피 추출물 및 이의 활성성분의 미토콘드리아 손상에 따른 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능**

[0118] 목단피 추출물 및 이의 활성성분이 미토콘드리아의 기능 손상에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, ATP 분석을 수행하여 세포 내 ATP 함량의 손상에 대한 회복 효과를 확인하였다.

[0119] 구체적으로, 상기 실험예 <1-2>와 동일한 방법을 사용하여 SH-SY5Y 세포를 배양한 후, 50 ㎍/㎖의 아트라진을 처리하여 미토콘드리아 기능 저하를 유도하였다. 그런 다음, 상기 미토콘드리아 기능 저하 유도된 세포 파쇄물 100 ㎕을, ATP 생물발광 체세포 시험 키트인 생물발광성 체세포 분석 키트(bioluminescent somatic cell assay kit; Sigma 사, 미국)를 사용하여 100 ㎕ 루시페린-루시퍼라제(luciferin-luciferase) 반응 완충액과 혼합하고, 10 분 동안 20℃에서 배양하였다. 배양 후, 상등액을 수득하여 LB 9501 루매트 루미노미터(Lumat luminometer; Berthold 사, 독일)에서 형광 신호를 측정하였다. 배경값(background)은 세포가 없는 배지를 포함하는 대조군 웰의 형광값으로 사용하여, 상기 측정한 값에서 배경값을 제하여 계산하였고, ATP의 양은 단백질 농도로 정규화하였다. 정상 대조군으로 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리하였고, 모든 결과를 정상 대조군에 대한 백분율로 나타내어 세포내 ATP를 측정하였다. 또한, 음성 대조군으로는 50 ㎍/㎖의 아트라진만을 처리하여 미토콘드리아 손상을 유발하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 세포 내 ATP를 측정하였다.

[0120] 그 결과, 하기 [표 4]에서 나타난 바와 같이 아트라진에 의해 유도된 미토콘드리아 손상은 목단피 90% 에탄올 추출물, 파에오놀, 파에오니프로린 또는 파에오니플로리지넌 처리에 의해 정상 수준으로 회복되었다(표 4).

표 4

[0121] 목단피 추출물 및 이들의 활성성분의 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능

약물 처리		유발물질	세포 내 ATP 함량
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	(아트라진, ㎍/㎖)	(% of control)
정상 대조군	-	-	100.0 ± 6.45
음성 대조군	-	50	68.7 ± 8.09
목단피 추출물	1	50	91.2 ± 4.08
파에오놀	1	50	101.9 ± 7.42
파에오니프로린	1	50	94.3 ± 6.44
파에오니플로리지넌	1	50	89.1 ± 7.97

[0122] **<1-4> 목단피 추출물 및 이의 활성성분의 미토콘드리아 또는 파킨슨병 관련 유전자의 발현 수준 확인**

[0123] 본 발명의 목단피 추출물 및 이의 활성성분이 미토콘드리아의 기능 손상에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 미토콘드리아 유전자에 의해서 합성되는 싸이토크롬 c 옥시다제 서브유닛 III(cytochrome c oxidase subunit III, COX III) 유전자 및 가족성 파킨슨병의 원인 유전자 중 하나인 Park7(DJ-1)의 발현 수준을 실시간 PCR(real-time PCR, RT-PCR)을 수행하여 확인하였다.

[0124] 구체적으로, 상기 실험예 <1-2>와 동일한 방법을 사용하여 SH-SY5Y 세포를 배양한 후 미토콘드리아 기능 저하를 유도하였다. 그런 다음, 상기 미토콘드리아 기능 저하 유도된 세포를 트리졸(TRIzol; Invitrogen 사, 미국)에 현탁하고 제조사의 프로토콜에 따라 세포의 전체 RNA를 추출하였다. 그런 다음, 상기 추출한 RNA 1 ㎍을 전체 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 하여 하기 [표 5]에 기재된 정방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 최적 조건에서 GeneAmp PCR 시스템 9700(Applied Biosystem 사, 미국)로 PCR을 수행하여 *COX III* 및 *Park7(DJ-1)* 유전자를 증폭한 후, 증폭된 PCR 산물을 1.5% 아가로즈 겔에서 전기영동하여 UV 상에서 이미지 덴시토미터(Image densitometer; Alpha Ease FC software; Alpha Innotech 사, 미국)를 이용하여 상대적인 농도를 측정하여, mRNA의 수준을 18S rRNA의 수준과 비교하여 표준화하였다. 정상 대조군으로 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리하였고, 음성 대조군으로는 50 ㎍/㎖의 아트라진만을 처리하여 미토콘드리아 손상을 유발하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 유전자 발현 수준을 확인하였다.

표 5

본 발명에서 유전자 발현 수준 확인을 위해 사용한 프라이머 서열

유전자 명	프라이머명	프라이머 서열	서열번호	산물 길이 (bp)	풀림 온도 (℃)
COX III	COX III_F	5'-CAATGATGGCGCGATGTAAC-3'	서열번호: 1	270	60
	COX III_R	5'-GGTGATTGATACTCCTGATG-3'	서열번호: 2		
PARK7	PARK7_F	5'-CGAGCTGGGATTAAGGTCAC-3'	서열번호: 3	267	60
	PARK7_R	5'-TTCATGAGCCAACAGAGCAG-3'	서열번호: 4		
GRP78	GRP78_F	5'-GAGATCATCGCCAACGATCAG-3'	서열번호: 5	188	55
	GRP78_R	5'-ACTTGATGTCCTGCTGCACAG-3'	서열번호: 6		
XBP1p	XBP1p_F	5'-GGTCTGCTGAGTCCGCAGCAGG-3'	서열번호: 7	335	60
	XBP1p_R	5'-GGGCTTGGTATATATGTGG-3'	서열번호: 8		
iNOS	iNOS_F	5'-CCTGGAGGTTCTGGATGAGA-3'	서열번호: 9	320	60
	iNOS_R	5'-GTAGTAGCGGGGCTTCAAGA-3'	서열번호: 10		
IL-6	IL-6_F	5'-CTGGAGTACCATAGCTACCTGGAG-3'	서열번호: 11	190	60
	IL-6_R	5'-GTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG-3'	서열번호: 12		
p65/RELA	p65/RELA_F	5'-GACCAACAATAACCCCTTTCAC-3'	서열번호: 13	700	60
	p65/RELA_R	5'-GTTTGAGATCTGCCCTGATGG-3'	서열번호: 14		
18s rRNA	18s rRNA_F	5'-GAGCGAAAGCATTTGCCAAG-3'	서열번호: 15	101	60
	18s rRNA_R	5'-GGCATCGTTTATGGTCGGAA-3'	서열번호: 16		

[0126] 그 결과, 하기 [표 6] 및 [표 7]에서 나타난 바와 같이 미토콘드리아 유전자에 의해 합성되는 *COX III* 유전자의 발현 및, 가족성 파킨슨병의 원인 유전자 중 하나인 *Park7(DJ-1)* 유전자의 발현 감소 역시 정상 수준으로 회복되었다(표 6 및 표 7).

표 6

[0127] 목단피 추출물 및 이의 활성성분의 *COX III* 유전자의 발현 수준 확인

처리 물질명		농도(㎍/㎖)	*COX III*/18S rRNA
정상 대조군	-	-	1.00 ±0.04
목단피 추출물	-	1	0.93 ± 0.06
파에오놀	-	1	1.05 ± 0.03
파에오니프로린	-	1	1.11 ± 0.04
파에오니플로리지넌	-	1	1.04 ± 0.05
음성 대조군	아트라진	-	0.52 ± 0.08
목단피 추출물	아트라진	1	0.91 ± 0.08
파에오놀	아트라진	1	1.07 ± 0.07
파에오니프로린	아트라진	1	0.92 ± 0.08
파에오니플로리지넌	아트라진	1	0.86 ± 0.07

표 7

[0128] 목단피 추출물 및 이의 활성성분의 *Park7(DJ-1)* 유전자의 발현 수준 확인

처리 물질명		농도(㎍/㎖)	*Park7(DJ-1)*/18S rRNA
정상 대조군	-	-	1.00 ± 0.08
목단피 추출물	-	1	0.98 ± 0.07
파에오놀	-	1	1.22 ± 0.08
파에오니프로린	-	1	1.05 ± 0.08
파에오니플로리지넌	-	1	0.98 ± 0.08
음성 대조군	아트라진	-	0.39 ± 0.02
목단피 추출물	아트라진	1	1.30 ± 0.08
파에오놀	아트라진	1	0.95 ± 0.07
파에오니프로린	아트라진	1	2.03 ± 0.07

파에오니플로리지넌	아트라진	1	0.45 ± 0.02

[0129] **<실험예 2> 백지 추출물 및 이의 활성성분의 세포 내 효능평가**

[0130] **<2-1> 백지 추출물 및 이의 활성성분의 세포 생존률 확인**

[0131] 백지 추출물 및 이의 활성성분이 나타내는 세포 내 효능을 평가하기 위해, 신경세포(human neuroblastoma cell)에서 세포독성의 유무를 확인하였다.

[0132] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>와 동일한 방법을 사용하여 SH-SY5Y 세포를 배양한 후, 상기 배양한 세포를 2.5 $\times 10^4$ 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 백지 추출물 1.0 ㎍/㎖ 또는 이의 활성성분인 임페레이토린을 0.5 ㎍/㎖ 또는 1.0 ㎍/㎖의 농도로 4 시간 동안 처리한 후, 세포를 수득하여 칼세인(Calcein)을 사용해 세포의 생존율을 확인하고, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률을 백분율로 구하였다.

[0133] 그 결과, 하기 [표 8]에서 나타난 바와 같이 백지 추출물과 임페레이토린 0.5 ㎍/㎖에서는 정상 세포에 대한 독성을 나타내지 않으나, 임페레이토린은 1 ㎍/㎖에서 약간의 독성을 나타내었다(표 8).

표 8

[0134] 백지 추출물 및 이의 활성성분의 세포 생존률 확인

처리 물질명		처리 농도(㎍/㎖)	세포 생존률(% of control)
정상 대조군		-	100.00 ± 0.89
백지 추출물 및 활성성분	90% 에탄올 추출물	1.0	99.50 ± 1.02
	임페레이토린	0.5	101.16 ± 0.59
	임페레이토린	1.0	79.16 ± 1.39

[0135] **<2-2> 백지 추출물 및 이의 활성성분의 소포체 스트레스에 따른 세포 사멸 억제 확인**

[0136] 본 발명의 백지 추출물 및 이의 활성성분이 소포체(endoplasmic reticulum) 스트레스에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 소포체에서 새로 합성된 단백질의 당화과정(N-glycosylation)을 억제하여 소포체 스트레스를 유도하는 것으로 알려진 투니카마이신(Tunicamycin, Tuni) 또는 소포체의 칼슘 항상성을 파괴하여 소포체 스트레스를 유도하는 것으로 알려진 탑시가긴(Thapsigargin, Thap)을 처리하여 소포체 스트레스를 유도한 세포에 대하여, MTT 분석을 수행하여 살아있는 세포 내에서 미토콘드리아 복합체 1의 손상에 대한 회복 효과를 확인하였다.

[0137] 구체적으로, 상기 실험예 <1-2>와 동일한 방법으로 SH-SY5Y 세포주를 배양한 다음, 실시예 <1-2>에서 제조한 백지 추출물 1.0 ㎍/㎖ 또는 이의 활성성분인 임페레이토린을 0.5 ㎍/㎖ 또는 1.0 ㎍/㎖의 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양한 후, 0.5 ㎍/㎖ 탑시가긴(thapsigargin, Thap) 또는 1 ㎍/㎖ 튜니카마이신(tunicamycin, Tuni)을 상기 전처리한 세포에 처리하고 24 시간 동안 배양하여, 세포에 소포체 스트레스를 유도하였다. 그런 다음, 상기 실험예 <1-2>과 동일한 방법으로 상기 소포체 스트레스를 유도한 세포에 대하여 MTT 분석을 수행한 다음, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포내 미토콘드리아 복합체 1의 손상 정도를 확인하였다. 또한, 음성 대조군으로는 0.5 ㎍/㎖의 탑시가긴 또는 1 ㎍/㎖ 튜니카마이신 만을 처리하여 소포체 스트레스를 유발하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 MTT 분석을 수행하였다.

[0138] 그 결과, 하기 [표 9] 및 [표 10]에서 나타난 바와 같이 탑시가긴 또는 튜니카마이신에 의해 유도된 소포체 스트레스에 의해 유도되는 신경세포의 사멸 및 미토콘드리아의 기능 손상은 백지 90% 에탄올 추출물 및 임페레이토린 처리에 의해 정상 수준으로 회복되었다(표 9 및 표 10).

표 9

[0139] 탑시가긴에 의해 유도된 소포체 스트레스에 대한 백지 추출물 및 이들의 활성성분의 미토콘드리아 복합체 1 손상 회복 효능

약물 처리		유발 물질	MTT
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	(탑시가긴, ㎍/㎖)	(% of control)
정상 대조군	-	-	100.00 ± 4.09
음성 대조군	-	0.5	65.61 ± 1.37
백지 추출물	1.0	0.5	82.45 ± 3.80
임페레이토린	0.5	0.5	86.23 ± 5.31

표 10

[0140] 튜니카마이신에 의해 유도된 소포체 스트레스에 대한 백지 추출물 및 이들의 활성성분의 미토콘드리아 복합체 1 손상 회복 효능

약물 처리		유발 물질	MTT
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	(튜니카마이신, ㎍/㎖)	(% of control)
정상 대조군	-	-	100.00 ± 5.73
음성 대조군	-	1.0	69.63 ± 3.42
백지 추출물	1.0	1.0	83.99 ± 2.01
임페레이토린	0.5	1.0	84.93 ± 3.68

[0141] **<2-3> 백지 추출물 및 이의 활성성분의 소포체 스트레스에 따른 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능**

[0142] 본 발명의 백지 추출물 및 이의 활성성분이 소포체 스트레스에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, ATP 분석을 수행하여 세포 내 ATP 함량의 손상에 대한 회복 효과를 확인하였다.

[0143] 구체적으로, 상기 실험예 <2-2>와 동일한 방법을 사용하여 SH-SY5Y 세포를 배양한 후 소포체 스트레스를 유도하였다. 그런 다음, 상기 소포체 스트레스가 유도된 세포를 상기 실험예 <1-3>와 동일한 방법을 수행하여 세포 내 ATP를 측정하였다. 정상 대조군으로 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리하였고, 모든 결과를 정상 대조군에 대한 백분율로 나타내어 세포내 ATP를 측정하였다. 또한, 음성 대조군으로는 0.5 ㎍/㎖의 탑시가긴 또는 1.0 ㎍/㎖의 튜니카마이신 만을 처리하여 소포체 스트레스를 유도하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 세포 내 ATP를 측정하였다.

[0144] 그 결과, 하기 [표 11]에서 나타난 바와 같이 탑시가긴 또는 튜니카마이신에 의해 유도된 소포체 스트레스에 의해 유도되는 신경세포의 사멸 및 미토콘드리아의 기능 손상은 백지 90% 에탄올 추출물 및 임페레이토린 처리에 의해 정상 수준으로 회복되었다(표 11).

표 11

[0145] 백지 추출물 및 이의 활성성분의 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능

약물 처리		유발물질	세포 내 ATP 함량
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	(㎍/㎖)	(% of control)
정상 대조군	-	-	100.00 ± 6.06
음성 대조군	-	탑시가긴, 0.5	77.89 ± 3.28
백지 추출물	1.0	탑시가긴, 0.5	112.05 ± 7.21
임페레이토린	0.5	탑시가긴, 0.5	104.85 ± 5.13
음성 대조군	-	튜니카마이신, 1.0	69.25 ± 2.09
백지 추출물	1.0	튜니카마이신, 1.0	84.85 ± 3.05
임페레이토린	0.5	튜니카마이신, 1.0	86.00 ± 1.18

[0146] **<2-4> 백지 추출물 및 이의 활성성분의 소포체 스트레스 마커 유전자의 발현 수준 확인**

[0147] 본 발명의 백지 추출물 및 이의 활성성분이 소포체 스트레스에 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 소포체 스트레스 마커인 *GRP78* 및 *XBP1p*의 발현 수준을 확인하였다.

[0148] 구체적으로, 상기 실험예 <2-2>와 동일한 방법을 사용하여 SH-SY5Y 세포를 배양한 후 소포체 스트레스를 유도하였다. 그런 다음, 소포체 스트레스를 유도한 세포로부터 상기 실험예 <1-4>과 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하여 *GRP78* 및 *XBP1p* 유전자의 발현 수준을 1.5% 아가로즈 겔에서 전기영동하여 UV 상에서 확인하였다. 정상

대조군으로 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리하였고, 음성 대조군으로는 0.5 ㎍/㎖의 탑시가긴만을 처리하여 소포체 스트레스를 유도하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 소포체 스트레스 마커 유전자의 발현을 확인하였다.

[0149] 그 결과, 하기 [표 12] 및 [표 13]에서 나타난 바와 같이 백지 90% 에탄올 추출물 및 임페레이토린 처리는 소포체 스트레스가 유도된 세포에서 소포체 스트레스 마커인 *GRP78* 및 *XBP1p* 유전자의 발현 수준을 정상수준으로 회복하였다(표 12 및 표 13).

표 12

[0150] 탑시가긴에 의해 소포체 스트레스가 유도된 세포에서 백지 추출물 및 이의 활성성분의 i*NOS* mRNA의 발현 수준 확인

약물 처리		유발물질 (탑시가긴, ㎍/㎖)	*GRP78*/18S mRNA
처리 물질명	농도(㎍/㎖)		
정상 대조군	-	-	1.93 ± 0.03
음성 대조군	-	0.5	100.00 ± 2.37
백지 추출물	1.0	0.5	2.78 ± 0.03
임페레이토린	0.5	0.5	2.97 ± 0.05

표 13

[0151] 탑시가긴에 의해 소포체 스트레스가 유도된 세포에서 백지 추출물 및 이의 활성성분의 *XBP1p* mRNA의 발현 수준 확인

약물 처리		유발물질 (탑시가긴, ㎍/㎖)	*XBP1p*/18S mRNA
처리 물질명	농도(㎍/㎖)		
정상 대조군	-	-	3.58 ± 0.06
음성 대조군	-	0.5	100.00 ± 3.18
백지 추출물	1.0	0.5	4.89 ± 0.07
임페레이토린	0.5	0.5	4.01 ± 0.05

[0152] **<실험예 3> 시호 추출물 및 이의 활성성분의 세포 내 효능평가**

[0153] **<3-1> 시호 추출물 및 이의 활성성분의 세포 생존률 확인**

[0154] 본 발명의 시호 추출물 및 이의 활성성분이 나타내는 세포내 효능을 평가하기 위해, 신경 미세교세포(murine microglial cell)에서 세포독성의 유무를 확인하였다.

[0155] 구체적으로, 마우스 신경 미세교세포인 BV2 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM(Dulbeco`s Modified Eagleas Medium; Gibco 사, 미국) 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 상기 배양한 세포를 2.5×10^4 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 실시예 <1-3>에서 제조한 시호 90% 에탄올 추출물, 사이코사포닌 A, 사이코사포닌 B2, 사이코사포닌 B4 또는 사이코사포닌 D를 1.0 ㎍/㎖의 농도로 4 시간 동안 처리한 후, 세포를 수득하여 칼세인(Calcein)을 사용해 세포의 생존률을 확인하고, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률을 백분율로 구하였다.

[0156] 그 결과, 하기 [표 14]에서 나타난 바와 같이 시호 추출물 및 이의 활성성분은 정상세포에 대하여 독성을 나타내지 않았음을 확인하였다(표 14).

표 14

[0157] 시호 추출물 및 이의 활성성분의 세포 생존률 확인

처리 물질명	농도(㎍/㎖)	세포 생존률(% of control)
정상 대조군	-	100.00 ± 6.48

시호 추출물 및 활성성분	90% 에탄올 추출물	1.0	101.46 ± 9.38
	사이코사포닌A	1.0	98.38 ± 7.69
	사이코사포닌 B2	1.0	102.74 ± 8.55
	사이코사포닌 B4	1.0	97.99 ± 2.86
	사이코사포닌 D	1.0	97.45 ± 3.99

[0158] **<3-2> 시호 추출물 및 이의 활성성분의 염증반응에 따른 세포 사멸 억제 확인**

[0159] 본 발명의 시호 추출물 및 이의 활성성분이 염증반응을 억제하는 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide, LPS)를 처리하여 염증반응을 유도한 세포에서 MTT 분석을 수행하여 살아있는 세포 내에서 미토콘드리아 복합체 1의 손상에 대한 회복 효과를 확인하였다.

[0160] 구체적으로, 상기 실험예 <3-1>과 동일한 방법을 사용하여 BV2 세포주를 배양한 후, 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 실시예 <1-3>에서 제조한 시호 90% 에탄올 추출물, 사이코사포닌 A, 사이코사포닌 B2, 사이코사포닌 B4 또는 사이코사포닌 D를 1.0 ㎍/㎖의 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양한 후, 100 ng/㎖ 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide, LPS)를 상기 전처리한 세포에 처리하고 20 시간 동안 배양하여, 세포에 염증 반응을 유도하였다. 염증 반응이 유도된 세포는 상기 실험예 <1-2>와 동일한 방법으로 MTT 분석을 수행한 다음, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 내 미토콘드리아 복합체 1의 손상 정도를 확인하였다. 또한, 음성 대조군으로는 100 ng/㎖의 LPS만을 처리하여 염증반응을 유발하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 MTT 분석을 수행하였다.

[0161] 그 결과, 하기 [표 15]에서 나타난 바와 같이 시호 90% 에탄올 추출물, 사이코사포닌 A, 사이코사포닌 B2, 사이코사포닌 B4 및 사이코사포닌 D는 LPS에 의한 염증 반응이 유도된 세포에서 세포 손상을 정상 수준으로 회복하였다(표 15).

표 15

[0162] 시호 추출물 및 이들의 활성성분의 미토콘드리아 복합체 1 손상 회복 효능

약물 처리		유발 물질	MTT
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	(LPS, ng/㎖)	(% of control)
정상 대조군	-	-	100.00 ± 9.56
음성 대조군	-	100	52.17 ± 7.86
시호 추출물	1.0	100	89.06 ± 6.78
사이코사포닌 A	1.0	100	91.49 ± 6.20
사이코사포닌 B2	1.0	100	88.85 ± 6.48
사이코사포닌 B4	1.0	100	87.12 ± 2.56
사이코사포닌 D	1.0	100	86.73 ± 1.25

[0163] **<3-3> 시호 추출물 및 이의 활성성분의 염증반응에 따른 산화질소(nitric oxide, NO) 농도 감소 효능**

[0164] 본 발명의 시호 추출물 및 이의 활성성분이 염증반응에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 그리스(Griess) 방법을 수행하여 세포 배지에 존재하는 아질산염(nitrite)/질산염(nitrate)(NO_x)의 농도를 확인하였다.

[0165] 구체적으로, 상기 실험예 <3-1>과 동일한 방법을 사용하여 BV2 세포주를 배양한 후 염증반응을 유도하였다. 그런 다음, 상기 염증반응이 유도된 세포를 배양한 배지 100 ㎕를 수득하여, 5% 술파닐아미드(sulfanilamide)를 포함하는 염산(hydrochloric acid) 및 2% 나프틸에틸렌디아민(naphthylethylenediamine) 수용액을 혼합한 그리스 시약(Griess reagent) 100 ㎕를 상기 수득한 배지에 첨가한 다음, 암실에서 30 분 동안 방치하여 반응하였다. 반응 후, 540 ㎚에서 엘리사 마이크로플레이트 리더기(EISA microplate reader; Versamax 사, 미국)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도를 사용하여 배지 내 산화질소의 농도를 계산하기 위한 표준 검정 곡선(Standard calibration curves)은 아질산나트륨(sodium nitrite)을 이용하였다. 정상 대조군으로 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리하였고, 음성 대조군으로는 100 ng/㎖의 LPS만을 처리하여 염증반응을 유발하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 산화질소 농도 감소

효과를 확인하였다.

[0166] 그 결과, 하기 [표 16]에서 나타난 바와 같이, 시호 90% 에탄올 추출물, 사이코사포닌 A, 사이코사포닌 B2, 사이코사포닌 B4 및 사이코사포닌 D는 LPS에 의한 NO의 생성을 완화시켰다(표 16).

표 16

[0167] 시호 추출물 및 이의 활성성분의 산화질소(nitric oxide, NO) 농도 감소 효능

약물 처리		유발 물질	NO(mM)
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	(LPS, ng/㎖)	
정상 대조군	-	-	3.29 ± 0.03
음성 대조군	-	100	28.17 ± 4.73
시호 추출물	1.0	100	13.06 ± 2.34
사이코사포닌 A	1.0	100	10.75 ± 3.60
사이코사포닌 B2	1.0	100	18.97 ± 2.68
사이코사포닌 B4	1.0	100	17.21 ± 2.11
사이코사포닌 D	1.0	100	18.12 ± 2.93

[0168] **<3-4> 시호 추출물 및 이의 활성성분의 염증반응에 따른 염증 반응 마커 유전자의 발현 수준 확인**

[0169] 본 발명의 시호 추출물 및 이의 활성성분이 염증반응에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 염증반응 마커 유전자인 유발유도성 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS), 인터류킨-6(interleukin-6, IL-6) 및 NF-kB p65/ReIA 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

[0170] 구체적으로, 상기 실험예 <3-1>과 동일한 방법을 사용하여 BV2 세포주를 배양한 후 염증반응을 유도하였다. 그런 다음, 상기 염증반응이 유도된 세포로부터 상기 실험예 <1-4>와 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하여 *iNOS*, *IL-6* 및 *NF-kB p65/ReIA* 유전자의 발현 수준을 정량적으로 확인하였다. 정상 대조군으로 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리하였고, 음성 대조군으로는 100 ng/㎖의 LPS만을 처리하여 염증반응을 유발하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 염증 반응 마커 유전자의 발현을 확인하였다.

[0171] 그 결과, 하기 [표 17] 내지 [표 19]에서 나타난 바와 같이 시호 90% 에탄올 추출물, 사이코사포닌 A, 사이코사포닌 B2, 사이코사포닌 B4 및 사이코사포닌 D의 처리는 염증반응이 유도된 세포에서 염증반응 마커 유전자인 *iNOS*, *IL-6* 및 *NF-kB p65/ReIA* 유전자의 발현 수준을 정상수준으로 회복하였다(표 17 내지 표 19).

표 17

[0172] 시호 추출물 및 이의 활성성분의 *iNOS* mRNA의 발현 수준 확인

약물 처리		유발 물질	*iNOS* mRNA
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	(LPS, ng/㎖)	(% of control)
정상 대조군	-	-	0.52 ± 0.01
음성 대조군	-	100	100.00 ± 1.82
시호 추출물	1.0	100	15.25 ± 0.11
사이코사포닌 A	1.0	100	14.85 ± 1.47
사이코사포닌 B2	1.0	100	18.11 ± 2.39
사이코사포닌 B4	1.0	100	26.06 ± 3.27
사이코사포닌 D	1.0	100	21.23 ± 1.99

표 18

[0173] 시호 추출물 및 이의 활성성분의 *IL-6* mRNA의 발현 수준 확인

약물 처리		유발 물질	*IL-6* mRNA
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	(LPS, ng/㎖)	(% of control)
정상 대조군	-	-	1.18 ± 0.07
음성 대조군	-	100	100.00 ± 3.73

시호 추출물	1.0	100	26.30 ± 2.37
사이코사포닌 A	1.0	100	18.05 ± 1.23
사이코사포닌 B2	1.0	100	29.67 ± 2.39
사이코사포닌 B4	1.0	100	28.53 ± 1.92
사이코사포닌 D	1.0	100	26.58 ± 1.75

표 19

[0174] 시호 추출물 및 이의 활성성분의 *p65/ReIA* mRNA의 발현 수준 확인

약물 처리		유발 물질	*p65/ReIA*mRNA
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	(LPS, ng/㎖)	(% of control)
정상 대조군	-	-	11.48 ± 0.53
음성 대조군	-	100	100.00 ± 1.12
시호 추출물	1.0	100	46.01 ± 3.19
사이코사포닌 A	1.0	100	40.38 ± 1.05
사이코사포닌 B2	1.0	100	50.18 ± 2.67
사이코사포닌 B4	1.0	100	53.70 ± 4.72
사이코사포닌 D	1.0	100	49.80 ± 3.54

[0175] **<3-5> 시호 추출물 및 이의 활성성분의 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 발생 완화 효능**

[0176] 본 발명의 시호 추출물 및 이의 활성성분이 염증반응에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 2',7'-다이클로로플루오로세인 디아세테이트(2',7'-dichlorofluoroscein diacetate, DCF-DA)를 사용하여 세포 내 활성산소 농도를 확인하였다.

[0177] 구체적으로, 상기 실험예 <3-1>과 동일한 방법을 사용하여 BV2 세포주를 배양한 후 염증반응을 유도하였다. 그런 다음, 상기 염증반응이 유도된 세포에 1 μM DCF-DA 및 0.05 μM 비스벤지미드(bisbenzimide, Hoechst 33342)를 처리하여 37℃에서 1 시간 동안 염색하였다. 염색 후, DCF-DA의 형광 세기를 485 ㎚/535 ㎚에서, 비스벤지미드의 형광 세기를 335 ㎚/460 ㎚에서 측정한 다음, DCF-DA/비스벤지미드의 비율로 ROS 양을 정량한 후, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 ROS 양을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 100 ng/㎖의 LPS만을 처리하여 염증반응을 유발하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 활성산소 발생 정도를 확인하였다.

[0178] 그 결과, 하기 [표 20]에서 나타난 바와 같이 시호 90% 에탄올 추출물, 사이코사포닌 A, 사이코사포닌 B2, 사이코사포닌 B4 및 사이코사포닌 D의 처리는 염증반응 및 스트레스에 의해 발생하는 DCF-DA-반응성 ROS의 농도를 완화시켰다(표 20).

표 20

[0179] 시호 추출물 및 이의 활성성분의 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 발생 완화 효능

약물 처리		유발 물질	DCF-DA-ROS
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	(LPS, ng/㎖)	(% of control)
정상 대조군	-	-	100.00 ± 1.09
음성 대조군	-	100	412.31 ± 4.26
90% 에탄올 추출물	1.0	100	235.45 ± 2.27
사이코사포닌 A	1.0	100	198.24 ± 3.72
사이코사포닌 B2	1.0	100	214.22 ± 1.87
사이코사포닌 B4	1.0	100	223.26 ± 2.86
사이코사포닌 D	1.0	100	218.61 ± 2.71

[0180] **<실험예 4> 목단피, 백지 및 시호의 2 종 이상 혼합 추출물의 세포 내 효능평가**

[0181] **<4-1> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호의 2 종 이상 혼합 추출물의 미토콘드리아 활성 회복 효능**

[0182] 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호의 2 종 이상 혼합 추출물이 나타내는 미토콘드리아 활성 회복 효

과를 확인하기 위하여, 파킨슨병 세포 모델에서 미토콘드리아 활성의 지표를 확인하여 회복 효과를 비교하였다.

[0183] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 <실시예 2>에서 제조한 목단피 및 백지 90% 에탄올 혼합 추출물, 상기 <실시예 3>에서 제조한 목단피 및 시호 90% 에탄올 혼합 추출물, 상기 <실시예 4>에서 제조한 백지 및 시호 90% 에탄올 혼합 추출물 또는 상기 실시예 <5-1>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 파킨슨병의 세포 모델을 제작하기 위해 사용되는 1-메틸-4-페닐피리디늄(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP+)을 1 mM 농도로 상기 배양한 세포에 첨가하고 24 시간 동안 추가 배양하여 파킨슨병 세포 모델을 제조하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <1-1>의 방법을 수행하여 칼세인을 사용해 세포의 생존률을 확인하고, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률을 백분율로 구하였다.

[0184] 그 결과, 하기 [표 21]에서 나타난 바와 같이 MPP+에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소에 따른 파킨슨병 세포모델의 생존률은 다양한 혼합 비율로 혼합하여 추출한 목단피, 백지 및 시호 에탄올 추출물 처리에 의해 회복되는 효과가 65 내지 70% 대로 나타나는데 비해, 목단피 및 시호 혼합 추출물, 목단피 및 백지 혼합 추출물, 백지 및 시호 혼합 추출물 처리시에는 77 내지 81% 대로 더 효과가 나타났으며, 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물 처리에 의해 92.84%로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 21).

표 21

[0185] 목단피, 백지 및 시호의 2 종 이상 혼합 추출물의 세포 생존률 확인

약물 처리			유발물질	세포 생존률
혼합 조성	혼합 비율	농도(㎍/㎖)	(MPP+, mM)	(%of control)
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 4.70
음성 대조군	-	-	1.0	51.56 ± 2.24
목단피	-	1.0	1.0	69.91 ± 2.18
백지	-	1.0	1.0	65.19 ± 2.87
시호	-	1.0	1.0	68.68 ± 1.78
목단피+백지	1:5	1.0	1.0	78.33 ± 3.89
	1:1	1.0	1.0	80.45 ± 4.02
	1:0.2	1.0	1.0	78.24 ± 3.59
목단피+시호	1:5	1.0	1.0	78.36 ± 2.35
	1:1	1.0	1.0	81.00 ± 4.08
	1:0.2	1.0	1.0	78.31 ± 3.16
백지+시호	1:5	1.0	1.0	78.22 ± 2.14
	1:1	1.0	1.0	79.26 ± 3.18
	1:0.2	1.0	1.0	77.98 ± 1.91
목단피+백지+시호	1: 1 :1	1.0	1.0	92.84 ± 5.51

[0186] **<4-2> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호의 2 종 이상 혼합 추출물의 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능**

[0187] 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호의 2 종 이상 혼합 추출물이 미토콘드리아의 기능 손상에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, ATP 분석을 수행하여 세포 내 ATP 함량의 손상에 대한 회복 효과를 확인하였다.

[0188] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 <실시예 2>에서 제조한 목단피 및 백지 90% 에탄올 혼합 추출물, 상기 <실시예 3>에서 제조한 목단피 및 시호 90% 에탄올 혼합 추출물, 상기 <실시예 4>에서 제조한 백지 및 시호 90% 에탄올 혼합 추출물 또는 상기 실시예 <5-1>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도

로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>와 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <1-3>의 방법을 수행하여 세포내 ATP를 측정한 후, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포내 ATP 함량을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 ATP 함량 손상 회복 효과를 확인하였다.

[0189] 그 결과, 하기 [표 22]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소에 따른 세포 내 ATP 함량 손상은 목단피, 백지 및 시호 각 90% 에탄올 추출물 처리에 의해 회복되는 효과가 68 내지 69% 대로 나타나는데 비해 목단피 및 시호 혼합 추출물, 목단피 및 백지 혼합 추출물, 백지 및 시호 혼합 추출물 처리에 의해 78~83% 대로 더 효과가 나타났으며, 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물 처리에 의해 95.82%로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 22).

표 22

[0190] 목단피, 백지 및 시호의 2 종 이상 혼합 추출물의 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능

약물 처리			유발물질	세포내 ATP
혼합 조성	혼합 비율	농도(㎍/㎖)	(MPP+, mM)	(%of control)
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 2.99
음성 대조군	-	-	1.0	57.13 ± 3.17
목단피	-	1.0	1.0	69.28 ± 2.37
백지	-	1.0	1.0	68.99 ± 3.57
시호	-	1.0	1.0	68.63 ± 2.49
목단피+백지	1:5	1.0	1.0	78.44 ± 3.44
	1:1	1.0	1.0	79.84 ± 3.01
	1:0.2	1.0	1.0	78.50 ± 2.68
목단피+시호	1:5	1.0	1.0	80.93 ± 1.25
	1:1	1.0	1.0	83.56 ± 3.15
	1:0.2	1.0	1.0	81.43 ± 2.36
백지+시호	1:5	1.0	1.0	78.29 ± 1.11
	1:1	1.0	1.0	81.39 ± 2.89
	1:0.2	1.0	1.0	79.92 ± 2.31
목단피+백지+시호	1: 1 :1	1.0	1.0	95.82 ± 3.61

[0191] **<4-3> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호의 2종 이상 혼합 추출물의 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 발생 완화 효능**

[0192] 파킨슨병 세포 모델에서 목단피 및 시호 혼합 추출물, 목단피 및 백지 혼합 추출물, 백지 및 시호 혼합 추출물, 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 미토콘드리아의 기능 손상에 따른 활성산소 발생에 대하여 완화 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 2',7'-다이클로로플루오로세인 디아세테이트(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA)를 사용하여 세포 내 활성산소 농도를 확인하였다.

[0193] 구체적으로, 마우스 신경 미세교세포인 BV2 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 <실시예 2>, <실시예 3>, <실시예 4> 및 실시예 <5-1>에서 제조한 목단피 및 백지 90% 에탄올 혼합 추출물, 목단피 및 시호 90% 에탄올 혼합 추출물, 백지 및 시호 90% 에탄올 혼합 추출물, 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>와 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <3-5>의 방법을 수행하여 DCF-DA/비스벤지미드의 비율로 ROS 양을 정량한 후, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 ROS 양을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 ROS 발생 완화 효과를 확인하였다.

[0194] 그 결과, 하기 [표 23]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소에

따른 활성산소 발생은 목단피, 백지 및 시호 각 90% 에탄올 추출물 처리에 의해 회복되는 효과가 144~146% 대로 나타나는데 비해, 목단피 및 백지 혼합 추출물, 목단피 및 시호 혼합 추출물, 백지 및 시호 혼합 추출물 처리시에는 120~132% 대로 더 효과가 나타났으며, 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물 처리에 의해 108.20% 로 거의 정상화되어 가장 큰 효과를 나타내었다(표 23).

표 23

[0195] 목단피, 백지 및 시호의 2 종 이상 혼합 추출물의 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 발생 완화 효능

약물 처리			유발물질 (MPP+, mM)	DCF-DA-ROS (%of control)
혼합 조성	혼합 비율	농도(㎍/㎖)		
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 3.60
음성 대조군	-	-	1.0	165.85 ± 4.67
목단피	-	1.0	1.0	146.91 ± 5.05
백지	-	1.0	1.0	144.44 ± 2.97
시호	-	1.0	1.0	145.67 ± 5.88
목단피+백지	1:5	1.0	1.0	125.01 ± 2.39
	1:1	1.0	1.0	124.69 ± 2.79
	1:0.2	1.0	1.0	128.55 ± 1.75
목단피+시호	1:5	1.0	1.0	122.23 ± 1.03
	1:1	1.0	1.0	120.82 ± 2.37
	1:0.2	1.0	1.0	123.82 ± 1.23
백지+시호	1:5	1.0	1.0	131.86 ± 1.67
	1:1	1.0	1.0	130.99 ± 3.78
	1:0.2	1.0	1.0	132.71 ± 4.54
목단피+백지+시호	1: 1 :1	1.0	1.0	108.20 ± 1.90

[0196] **<실험예 5> 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 혼합 추출물의 세포 내 효능평가**

[0197] **<5-1> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 혼합 추출물의 미토콘드리아 활성 회복 효능**

[0198] 파킨슨병에서 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 혼합 추출물이 나타내는 미토콘드리아 활성 회복 효과를 확인하기 위하여, 파킨슨병 세포 모델에서 미토콘드리아 활성의 지표를 확인하여 회복 효과를 비교하였다.

[0199] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 <실시예 5>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 90% 에탄올 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <1-1>의 방법을 수행하여 칼세인을 사용해 세포의 생존률을 확인하고, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률을 백분율로 구하였다.

[0200] 그 결과, 하기 [표 24]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소는 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1 혼합 추출물에서 93.22% 로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 24).

표 24

[0201] 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 혼합 추출물의 세포 생존률 확인

약물 처리			유발물질 (MPP+, mM)	세포 생존률 (% of Control)
혼합 조성	혼합 비율*	농도(㎍/㎖)		
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 4.55
음성 대조군	-	-	1.0	55.24 ± 3.74

목단피+백지+시호 혼합 추출물	1 : 1 : 1	1.0	1.0	93.22 ± 3.92
	1 : 1 : 2	1.0	1.0	84.26 ± 2.62
	1 : 2 : 1	1.0	1.0	85.61 ± 2.44
	1 : 2 : 2	1.0	1.0	86.30 ± 5.38
	1 : 1 : 0.5	1.0	1.0	84.27 ± 4.51
	1 :0.5 : 1	1.0	1.0	83.72 ± 4.65
	1 :0.5 : 0.5	1.0	1.0	86.88 ± 0.42
	1 : 1 : 3	1.0	1.0	86.78 ± 2.71
	1 : 3 : 1	1.0	1.0	84.87 ± 2.92
	1 : 3 : 3	1.0	1.0	84.06 ± 3.25
	1 : 1 :0.33	1.0	1.0	84.50 ± 4.83
	1 :0.33: 1	1.0	1.0	86.16 ± 3.99
	1 :0.33:0.33	1.0	1.0	83.89 ± 4.83
	1 : 1 : 4	1.0	1.0	87.56 ± 2.82
	1 : 4 : 1	1.0	1.0	84.88 ± 3.59
	1 : 4 : 4	1.0	1.0	85.65 ± 5.92
	1 : 1 :0.25	1.0	1.0	86.30 ± 2.42
	1 :0.25: 1	1.0	1.0	87.99 ± 2.92
	1 :0.25:0.25	1.0	1.0	85.17 ± 1.76
	1 : 1 : 5	1.0	1.0	86.22 ± 0.82
	1 : 5 : 1	1.0	1.0	86.21 ± 0.72
	1 : 5 : 5	1.0	1.0	86.31 ± 2.19
	1 : 1 : 0.2	1.0	1.0	84.14 ± 1.81
	1 : 0.2: 1	1.0	1.0	85.20 ± 3.02
	1 : 0.2: 0.2	1.0	1.0	84.47 ± 1.21

[0202] * 혼합 추출물의 혼합 비율은, 목단피:백지:시호(w:w:w)의 중량 비율을 나타낸다.

[0203] **<5-2> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 혼합 추출물의 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능**

[0204] 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 혼합 추출물이 미토콘드리아의 기능 손상에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, ATP 분석을 수행하여 세포 내 ATP 함량의 손상에 대한 회복 효과를 확인하였다.

[0205] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 <실시예 5>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 90% 에탄올 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <1-3>의 방법을 수행하여 세포내 ATP를 측정한 후, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포내 ATP 함량을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 ATP 함량 손상 회복 효과를 확인하였다.

[0206] 그 결과, 하기 [표 25]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소에 따른 세포 내 ATP 함량 손상은 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1 혼합 추출물에서 94.10% 로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 25).

표 25

[0207] 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 혼합 추출물의 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능

약물 처리			유발물질	세포 내 ATP 함량
혼합 조성	혼합 비율*	농도(㎍/㎖)	(MPP+, mM)	(% of Control)

정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 1.73
음성 대조군	-	-	1.0	60.88 ± 1.35
목단피+백지+시호 혼합 추출물	1 : 1 : 1	1.0	1.0	94.10 ± 3.56
	1 : 1 : 2	1.0	1.0	85.22 ± 1.89
	1 : 2 : 1	1.0	1.0	87.47 ± 2.61
	1 : 2 : 2	1.0	1.0	87.00 ± 2.18
	1 : 1 : 0.5	1.0	1.0	85.18 ± 1.89
	1 :0.5 : 1	1.0	1.0	90.22 ± 3.96
	1 :0.5 : 0.5	1.0	1.0	86.32 ± 2.12
	1 : 1 : 3	1.0	1.0	88.14 ± 2.44
	1 : 3 : 1	1.0	1.0	87.21 ± 2.39
	1 : 3 : 3	1.0	1.0	87.47 ± 1.92
	1 : 1 :0.33	1.0	1.0	88.17 ± 2.15
	1 :0.33: 1	1.0	1.0	88.24 ± 2.59
	1 :0.33:0.33	1.0	1.0	86.99 ± 1.44
	1 : 1 : 4	1.0	1.0	86.21 ± 3.60
	1 : 4 : 1	1.0	1.0	84.51 ± 0.13
	1 : 4 : 4	1.0	1.0	86.99 ± 1.39
	1 : 1 :0.25	1.0	1.0	87.72 ± 4.32
	1 :0.25: 1	1.0	1.0	85.14 ± 1.84
	1 :0.25:0.25	1.0	1.0	87.45 ± 3.44
	1 : 1 : 5	1.0	1.0	86.29 ± 3.92
	1 : 5 : 1	1.0	1.0	84.01 ± 1.85
	1 : 5 : 5	1.0	1.0	87.70 ± 1.59
	1 : 1 : 0.2	1.0	1.0	87.38 ± 2.60
	1 : 0.2: 1	1.0	1.0	87.68 ± 3.14
	1 : 0.2: 0.2	1.0	1.0	89.34 ± 3.12

[0208] * 혼합 추출물의 혼합 비율은, 목단피:백지:시호(w:w:w)의 중량 비율을 나타낸다.

[0209] **<5-3> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 혼합 추출물의 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 발생 완화 효능**

[0210] 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 혼합 추출물이 미토콘드리아의 기능 손상에 따른 활성산소 발생에 대하여 완화 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 2',7'-다이클로로플루오로세인 디아세테이트(2',7'-dichlorofluoroscein diacetate, DCF-DA)를 사용하여 세포 내 활성산소 농도를 확인하였다.

[0211] 구체적으로, 마우스 신경 미세교세포인 BV2 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 <실시예 5>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 90% 에탄올 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>와 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <3-5>의 방법을 수행하여 DCF-DA/비스벤지미드의 비율로 ROS 양을 정량한 후, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 ROS 양을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 ROS 발생 완화 효과를 확인하였다.

[0212] 그 결과, 하기 [표 26]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소에 따른 활성산소 발생은 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1 혼합 추출물에서 106.23%로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 26).

표 26

[0213] 목단피, 백지 및 시호 다양한 혼합비의 혼합 추출물의 활성산소 발생 완화 효능

약물 처리			유발물질 (MPP+, mM)	DCF-DA-ROS (% of Control)
혼합 조성	혼합 비율*	농도(㎍/㎖)		
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 1.78
음성 대조군	-	-	1.0	162.14 ± 0.33
목단피+백지+시호 혼합 추출물	1 : 1 : 1	1.0	1.0	106.23 ± 1.76
	1 : 1 : 2	1.0	1.0	112.70 ± 2.46
	1 : 2 : 1	1.0	1.0	114.79 ± 1.79
	1 : 2 : 2	1.0	1.0	111.66 ± 1.73
	1 : 1 : 0.5	1.0	1.0	114.60 ± 1.39
	1 :0.5 : 1	1.0	1.0	112.24 ± 2.03
	1 :0.5 : 0.5	1.0	1.0	114.84 ± 3.51
	1 : 1 : 3	1.0	1.0	112.02 ± 2.65
	1 : 3 : 1	1.0	1.0	113.82 ± 2.11
	1 : 3 : 3	1.0	1.0	112.51 ± 2.67
	1 : 1 :0.33	1.0	1.0	109.39 ± 1.01
	1 :0.33: 1	1.0	1.0	115.92 ± 1.73
	1 :0.33:0.33	1.0	1.0	115.92 ± 2.94
	1 : 1 : 4	1.0	1.0	112.51 ± 3.39
	1 : 4 : 1	1.0	1.0	113.73 ± 2.78
	1 : 4 : 4	1.0	1.0	113.94 ± 2.77
	1 : 1 :0.25	1.0	1.0	113.39 ± 2.71
	1 :0.25: 1	1.0	1.0	112.78 ± 1.79
	1 :0.25:0.25	1.0	1.0	113.77 ± 1.86
	1 : 1 : 5	1.0	1.0	110.71 ± 2.87
	1 : 5 : 1	1.0	1.0	113.86 ± 2.75
	1 : 5 : 5	1.0	1.0	113.28 ± 2.86
	1 : 1 : 0.2	1.0	1.0	112.75 ± 1.11
	1 : 0.2: 1	1.0	1.0	115.85 ± 1.01
	1 : 0.2: 0.2	1.0	1.0	112.72 ± 3.66

[0214] * 혼합 추출물의 혼합 비율은, 목단피:백지:시호(w:w:w)의 중량 비율을 나타낸다.

[0215] **<실험예 6> 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 에탄올 농도에 따른 세포내 효능 평가**

[0216] **<6-1> 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 에탄올 농도에 따른 함량 변화 확인**

[0217] 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물에 있어서, 추출 용매인 에탄올의 농도에 따른 혼합 추출물의 활성성분 함량 변화를 확인하였다.

[0218] 구체적으로, 상기 실시예 <5-1>의 방법으로 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 추출 용매를 10, 30, 50, 70 또는 90% 에탄올로 하여 제조한 다음, 수득한 혼합 추출물을 HPLC를 사용해 정량하였다.

[0219] 그 결과, 하기 [표 27]에서 나타난 바와 같이 목단피, 백지 및 시호 1:1:1 혼합 90% 에탄올 추출물에서 파에오놀, 파에오니프로린, 사이코사포닌 A, 임페레이토린의 함량이 가장 크게 나타났다(표 27).

표 27

[0220] 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 추출 용매 에탄올 농도에 따른 지표성분 함량 변화 확인

에탄올 농도(%)	지표성분 함량(%)			
	파에오놀	파에오니프로린	임페레이토린	사이코사포닌A
10	1.2	2.7	0.0	0.1
30	2.5	2.2	0.2	1.0
50	4.2	2.7	0.4	1.8
70	4.4	2.2	0.6	1.5

90	4.9	4.2	1.1	1.7

[0221] **<6-2> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 추출 용매 농도에 따른 미토콘드리아 활성 회복 효능**

[0222] 파킨슨병에서 목단피, 백지 및 시호 1:1:1 혼합 에탄올 추출물의 에탄올 농도에 따른 혼합 추출물이 미토콘드리아 활성 회복 효과를 확인하기 위하여, 파킨슨병 세포 모델에서 미토콘드리아 활성의 지표를 확인하여 회복 효과를 비교하였다.

[0223] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 실시예 <5-1>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호 1:1:1 혼합 에탄올 추출물의 에탄올 농도에 따른 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <1-1>의 방법을 수행하여 칼세인을 사용해 세포의 생존률을 확인하고, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률을 백분율로 구하였다.

[0224] 그 결과, 하기 [표 28]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소는 목단피, 백지 및 시호 1:1:1 혼합 90% 에탄올 추출물에서 95.02% 로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 28).

표 28

[0225] 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 추출 용매 에탄올 농도에 따른 세포 생존률 확인

약물 처리			유발물질	세포 생존률
처리 물질명	에탄올 농도(%)	농도(㎍/㎖)	(MPP+, mM)	(% of Control)
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 2.05
음성 대조군	-	-	1.0	53.73 ± 2.39
목단피 + 백지 + 시호 (1:1:1; w:w:w)	10	1.0	1.0	88.22 ± 1.47
	30	1.0	1.0	89.85 ± 1.55
	50	1.0	1.0	90.11 ± 1.14
	70	1.0	1.0	92.39 ± 1.74
	90	1.0	1.0	95.02 ± 2.61

[0226]

[0227] **<6-3> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 에탄올 농도에 따른 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능**

[0228] 파킨슨병의 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 에탄올 농도에 따른 혼합 추출물이 미토콘드리아의 기능 손상에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, ATP 분석을 수행하여 세포 내 ATP 함량의 손상에 대한 회복 효과를 확인하였다.

[0229] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 실시예 <5-1>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 에탄올 농도에 따른 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <1-3>의 방법을 수행하여 세포내 ATP를 측정한 후, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포내 ATP 함량을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 ATP 함량 손상 회복 효과를 확인하였다.

[0230] 그 결과, 하기 [표 29]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소는 90% 에탄올을 추출용매로 하여 추출한 혼합 추출물에서 96.45% 로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 29).

표 29

[0231] 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 추출 용매 에탄올 농도에 따른 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능

약물 처리			유발물질	세포 내 ATP
처리 물질명	에탄올 농도(%)	농도(㎍/㎖)	(MPP+, mM)	(% of Control)
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 1.34
음성 대조군	-	-	1.0	59.28 ± 2.45
목단피 + 백지 + 시호 (1:1:1; w:w:w)	10	1.0	1.0	89.31 ± 2.33
	30	1.0	1.0	89.34 ± 1.68
	50	1.0	1.0	90.14 ± 1.47
	70	1.0	1.0	93.81 ± 2.59
	90	1.0	1.0	96.45 ± 2.41

[0232] **<6-4> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호 1:1:1 혼합 에탄올 추출물의 에탄올 농도에 따른 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 발생 완화 효능**

[0233] 파킨슨병의 목단피, 백지 및 시호 1:1:1 혼합 에탄올 추출물의 에탄올 농도에 따른 혼합 추출물이 미토콘드리아의 기능 손상에 따른 활성산소 발생에 대하여 완화 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 2',7'-다이클로로플루오로세인 디아세테이트(2',7'-dichlorofluoroscein diacetate, DCF-DA)를 사용하여 세포 내 활성산소 농도를 확인하였다.

[0234] 구체적으로, 마우스 신경 미세교세포인 BV2 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 <실시예 5>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호 1:1:1 혼합 에탄올 추출물의 에탄올 농도에 따른 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <3-5>의 방법을 수행하여 DCF-DA/비스벤지미드의 비율로 ROS 양을 정량한 후, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 ROS 양을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 ROS 발생 완화 효과를 확인하였다.

[0235] 그 결과, 하기 [표 30]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소는 목단피, 백지 및 시호 1:1:1 혼합 90% 에탄올 추출물에서 105.06% 로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 30).

표 30

[0236] 목단피, 백지 및 시호의 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물의 추출 용매 에탄올 농도에 따른 ROS 발생 완화 효능

약물 처리			유발물질	DCF-DA-ROS
처리 물질명	에탄올 농도(%)	농도(㎍/㎖)	(MPP+, mM)	(% of Control)
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 1.05
음성 대조군	-	-	1.0	161.71 ± 1.88
목단피 + 백지 + 시호 (1:1:1; w:w:w)	10	1.0	1.0	111.22 ± 1.58
	30	1.0	1.0	110.67 ± 2.23
	50	1.0	1.0	108.27 ± 2.98
	70	1.0	1.0	108.75 ± 2.24
	90	1.0	1.0	105.06 ± 1.55

[0237] **<실험예 7> 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매 종류에 따른 세포내 효능 평가**

[0238] **<7-1> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 미토콘드리아 활성 회복**

효능

[0239] 파킨슨병에서 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 혼합 추출물이 미토콘드리아 활성 회복 효과를 확인하기 위하여, 파킨슨병 세포 모델에서 미토콘드리아 활성의 지표를 확인하여 회복 효과를 비교하였다.

[0240] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 <실시예 5>의 방법으로 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매를 물, 90% 에탄올, 90% 메탄올 또는 90% 부탄올로 하여 제조한 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <1-1>의 방법을 수행하여 칼세인을 사용해 세포의 생존률을 확인하고, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포 생존률을 백분율로 구하였다.

[0241] 그 결과, 하기 [표 31]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소는 목단피, 백지 및 시호 혼합 90% 에탄올 추출물에서 93.09% 로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 31).

표 31

[0242] 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 혼합 추출물의 세포 생존률 확인

약물 처리			유발물질	세포 생존률
처리 물질명	추출용매 종류 및 농도(%)	농도(㎍/㎖)	(MPP+, mM)	(% of Control)
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 1.22
음성 대조군	-	-	1.0	55.29 ± 1.06
목단피+백지+시호 (1:1:1; w:w:w)	물	1.0	1.0	87.80 ± 2.83
	90% 에탄올	1.0	1.0	93.09 ± 1.52
	90% 메탄올	1.0	1.0	87.15 ± 1.36
	90% 부탄올	1.0	1.0	89.76 ± 2.95

[0243]

[0244] **<7-2> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능**

[0245] 파킨슨병의 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 혼합 추출물이 미토콘드리아의 기능 손상에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, ATP 분석을 수행하여 세포 내 ATP 함량의 손상에 대한 회복 효과를 확인하였다.

[0246] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 <실시예 5>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <1-3>의 방법을 수행하여 세포내 ATP를 측정한 후, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 세포내 ATP 함량을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 ATP 함량 손상 회복 효과를 확인하였다.

[0247] 그 결과, 하기 [표 32]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소는 목단피, 백지 및 시호 혼합 90% 에탄올 추출물에서 95.90% 로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 32).

표 32

[0248] 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 세포 내 ATP 함량 손상 회복 효능

약물 처리			유발물질	세포내 ATP
처리 물질명	추출용매 종류 및 농도(%)	농도(㎍/㎖)	(MPP+, mM)	(% of Control)
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 1.78
음성 대조군	-	-	1.0	54.10 ± 1.69
목단피+백지+시호 (1:1:1; w:w:w)	물	1.0	1.0	89.21 ± 2.34
	90% 에탄올	1.0	1.0	95.90 ± 3.64
	90% 메탄올	1.0	1.0	90.87 ± 1.86
	90% 부탄올	1.0	1.0	88.97 ± 1.78

[0249] **<7-3> 파킨슨병 세포 모델에서 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 발생 완화 효능**

[0250] 파킨슨병의 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 혼합 추출물이 미토콘드리아의 기능 손상에 따른 활성산소 발생에 대하여 완화 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 2',7'-다이클로로플루오로세인 디아세테이트(2',7'-dichlorofluoroscein diacetate, DCF-DA)를 사용하여 세포 내 활성산소 농도를 확인하였다.

[0251] 구체적으로, 마우스 신경 미세교세포인 BV2 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스(CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 <실시예 5>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 혼합 추출물을 1 ㎍/㎖ 농도로 각각 처리하여 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 방법을 사용하여 파킨슨병의 세포 모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 유도된 세포에서 상기 실험예 <3-5>의 방법을 수행하여 DCF-DA/비스벤지미드의 비율로 ROS 양을 정량한 후, 추출물 또는 활성성분을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 ROS 양을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 1 mM의 MPP+ 만을 처리하여 제조한 파킨슨병 세포 모델에 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 ROS 발생 완화 효과를 확인하였다.

[0252] 그 결과, 하기 [표 33]에서 나타난 바와 같이 1-메틸-4-페닐피리디늄에 의해 유도된 미토콘드리아 활성 감소는 목단피, 백지 및 시호 혼합 90% 에탄올 추출물에서 106.82% 로 가장 큰 효과를 나타내었다(표 33).

표 33

[0253] 목단피, 백지 및 시호 혼합 추출물의 추출용매에 따른 활성산소 발생 완화 효능

약물 처리			유발물질	DCF-DA-ROS
처리 물질명	추출용매 종류 및 농도(%)	농도(㎍/㎖)	(MPP+, mM)	(% of Control)
정상 대조군	-	-	-	100.00 ± 5.55
음성 대조군	-	-	1.0	161.78 ± 7.06
목단피+백지+시호 (1:1:1; w:w:w)	물	1.0	1.0	112.71 ± 3.28
	90% 에탄올	1.0	1.0	106.82 ± 2.22
	90% 메탄올	1.0	1.0	110.45 ± 1.46
	90% 부탄올	1.0	1.0	109.47 ± 2.79

[0254] **<실험예 8> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 세포내 효능평가**

[0255] **<8-1> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 미토콘드리아 활성 개선**

[0256] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 나타내는 세포내 효능을 평가하기 위해, 신경세포(human neuroblastoma cell)에서 미토콘드리아 생합성 (biogenesis)의 대표적인 표지자인 TFAM, H2AX 등의 발현수준을 웨스턴 블럿을 수행하여 확인하였다.

[0257] 구체적으로, 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포주를 10% FBS가 포함된 1:1 DMEM/F12 배지에 접종하여, 37℃, 5% 탄산가스 (CO_2) 및 95% 공기(O_2) 조건에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양한 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 무혈청 배지에 옮기고, 상기 실시예 <5-1>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물 1:1:1 비율의 동결건조물을 1.0 ㎍/ml의 농도로 처리하여 4시간 배양한 후, 0.5 mM MPP+를 상기 전처리한 세포에 처리하고 24

시간 동안 배양하여, 세포의 미토콘드리아 기능 저하를 유도하였다. 그런 다음 세포로부터 세포 단백질을 수득하여, 웨스턴 블럿을 수행하여 STAT 단백질의 인산화 (S727 및 Y705), AKT 단백질의 인산화 (T308 및 S473), TH, TFAM 및 H2AX 단백질의 발현 수준을 확인하였다. 발현의 비교를 위한 대조 단백질로는 β-액틴(β-actin)을 사용하였다. 정상 대조군으로 추출물을 처리하지 않고 DMSO를 처리하였고, 음성 대조군으로는 0.5 mM의 MPP+만을 처리하여 미토콘드리아 손상을 유발하고 추출물을 처리하지 않은 세포를 대상으로 하였다.

[0258] 그 결과, 하기 [표 34]에서 나타난 바와 같이 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물을 1.0 ㎍/ml 처리하였을 때, STAT (Y705) 단백질의 인산화, AKT 단백질의 인산화(T308 및 S473), TH, TFAM 및 H2AX 단백질의 발현 수준이 정상 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다(표 34).

표 34

[0259] 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 미토콘드리아 활성 관련 유전자의 단백질 발현 수준 확인

처리 물질명	농도(㎍/㎖)	유발물질 농도(MPP+, 0.5 mM)	*pSTAT(S727)/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.04
음성 대조군	-	30	95.24 ± 5.27
목단피+백지+시호(1:1:1, w:w:w)	1	30	106.82 ± 2.98
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	유발물질 농도(MPP+, 0.5 mM)	*pSTAT(Y705)/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 3.18
음성 대조군	-	30	7.41 ± 0.91
목단피+백지+시호(1:1:1, w:w:w)	1	30	42.54 ± 5.33
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	유발물질 농도(MPP+, 0.5 mM)	*STAT3/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.86
음성 대조군	-	30	101.27 ± 4.05
목단피+백지+시호(1:1:1, w:w:w)	1	30	99.39 ± 2.02
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	유발물질 농도(MPP+, 0.5 mM)	*pAKT(T308)/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 3.08
음성 대조군	-	30	10.45 ± 0.82
목단피+백지+시호(1:1:1, w:w:w)	1	30	98.42 ± 3.07
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	유발물질 농도(MPP+, 0.5 mM)	*pAKT(S473)/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.10
음성 대조군	-	30	8.13 ± 0.72
목단피+백지+시호(1:1:1, w:w:w)	1	30	95.32 ± 3.09
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	유발물질 농도(MPP+, 0.5 mM)	*AKT1/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.06
음성 대조군	-	30	96.21 ± 3.07
목단피+백지+시호(1:1:1, w:w:w)	1	30	99.41 ± 2.02
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	유발물질 농도(MPP+, 0.5 mM)	*TH/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 3.06
음성 대조군	-	30	9.28 ± 1.01
목단피+백지+시호(1:1:1, w:w:w)	1	30	97.38 ± 4.37
처리 물질명	농도	유발물질 농도(MPP+, 0.5 mM)	*TFAM/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.97
음성 대조군	-	30	15.83 ± 2.12
목단피+백지+시호(1:1:1, w:w:w)	1	30	97.21 ± 3.05
처리 물질명	농도(㎍/㎖)	유발물질 농도(MPP+, 0.5 mM)	*H2AX/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 3.07
음성 대조군	-	30	4.11 ± 0.72
목단피+백지+시호(1:1:1, w:w:w)	1	30	89.32 ± 2.73

[0260] **<8-2> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 소포체 스트레스 마커 유전자의 발현 수준 확인**

[0261] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 소포체 스트레스에 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 소포체 스트레스 마커인 *GRP78* 및 *XBP1p*의 발현 수준을 확인하였다.

[0262] 구체적으로, 상기 실험예 <2-2>와 동일한 방법을 사용하여 SH-SY5Y 세포를 배양한 후 소포체 스트레스를 유도하였다. 그런 다음, 소포체 스트레스를 유도한 세포로부터 상기 실험예 <1-4>과 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하여 *GRP78* 및 *XBP1p* 유전자의 발현 수준을 1.5% 아가로즈 겔에서 전기영동하여 UV 상에서 확인하였다. 정상 대조군으로 추출물을 처리하지 않고 DMSO를 처리하였고, 음성 대조군으로는 0.5 ㎍/㎖의 탑시가긴만을 처리하여 소포체 스트레스를 유도하고 추출물 또는 활성성분은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 소포체 스트레스 마커 유전자의 발현을 확인하였다.

[0263] 그 결과, 하기 [표 35] 및 [표 36]에서 나타난 바와 같이 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물을 1.0 ㎍/㎖ 처리하였을 때 소포체 스트레스가 유도된 세포에서 소포체 스트레스 마커인 *GRP78* 및 *XBP1p* 유전자의 발현 수준을 정상수준으로 회복하는 효과를 나타내었다(표 35 및 표 36).

표 35

[0264] 탑시가긴에 의해 소포체 스트레스가 유도된 세포에서 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 GRP78 mRNA의 발현 수준 확인

약물 처리		유발물질 (탑시가긴, ㎍/㎖)	*GRP78*/18S mRNA
처리 물질명	농도(㎍/㎖)		
정상 대조군	-	-	2.01 ± 0.04
음성 대조군	-	0.5	100.0 ± 3.05
목단피+백지+시호1:1:1 (w:w:w) 혼합 추출물	1	0.5	3.12 ± 0.02

표 36

[0265] 탑시가긴에 의해 소포체 스트레스가 유도된 세포에서 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 *XBP1p* mRNA의 발현 수준 확인

약물 처리		유발물질 (탑시가긴, ㎍/㎖)	*XBP1P*/18S mRNA
처리 물질명	농도(㎍/㎖)		
정상 대조군	-	-	3.46 ± 0.03
음성 대조군	-	0.5	100.0 ± 2.79
목단피+백지+시호1:1:1 (w:w:w) 혼합 추출물	1	0.5	2.98 ± 0.01

[0266] **<8-3> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 항염증 및 항산화 효능**

[0267] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 염증 반응에 대하여 회복 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 그리스 (Griess) 방법을 수행하여 세포 배지에 존재하는 아질산염(nitrite)/질산염(nitrate)(NO_x)의 농도를 측정하였으며, 2',7'-다이클로로플루오로세인 디아세테이트 (2',7'-dichlorofluorocein diacetate, DCF-DA)를 사용하여 세포 내 활성산소 농도를 확인하였다.

[0268] 구체적으로, 상기 실험예 <3-1>과 동일한 방법을 사용하여 BV2 세포주를 배양한 후 염증반응을 유도하였다. 그런 다음, 상기 염증반응이 유도된 세포를 배양한 배지 100 ㎕를 수득하여, 5% 술파닐아미드(sulfanilamide)를 포함하는 염산(hydrochloric acid) 및 2% 나프틸에틸렌디아민(naphthylethylenediamine) 수용액을 혼합한 그리스 시약(Griess reagent) 100 ㎕를 상기 수득한 배지에 첨가한 다음, 암실에서 30 분 동안 방치하여 반응하였다. 반응 후, 540 nm에서 엘리사 마이크로플레이트 리더기(EISA microplate reader; Versamax 사, 미국)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도를 사용하여 배지 내 산화질소의 농도를 계산하기 위한 표준 검정 곡선(Standard calibration curves)은 아질산나트륨(sodium nitrite)을 이용하였다. 또한 활성산소

농도를 측정하기 위해서는, 상기 염증반응이 유도된 세포에 1 μM DCF-DA 및 0.05 μM 비스벤지미드(bisbenzimide, Hoechst 33342)를 처리하여 37℃에서 1 시간 동안 염색하였다. 염색 후, DCF-DA의 형광 세기를 485 nm/535 nm에서, 비스벤지미드의 형광 세기를 335 nm/460 nm에서 측정한 다음, DCF-DA/비스벤지미드의 비율로 ROS 양을 정량한 후, 추출물을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소된 ROS 양을 백분율로 구하였다. 또한, 음성 대조군으로는 100 ng/㎖의 LPS만을 처리하여 염증반응을 유발하고 추출물은 처리하지 않은 다음, 상기와 동일한 방법으로 산화질소 농도 감소 효과 및 활성산소 농도 감소 효과를 확인하였다.

[0269] 그 결과, 하기 [표 37]에서 나타난 바와 같이, 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물은 LPS에 의한 NO의 생성을 완화시키는 효과를 나타내는 것을 확인하였다(표 37). 또한 하기 [표 38]에서 나타난 바와 같이, 염증반응 및 스트레스에 의해 발생하는 DCF-DA 반응성 ROS의 농도를 완화시키는 효과를 나타내었다(표 38).

표 37

[0270] 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 산화질소(nitric oxide, NO) 농도 감소 효능

약물 처리		유발 물질(LPS, ng/㎖)	NO(mM)
처리 물질명	농도(㎍/㎖)		
정상 대조군	-	-	46.79 ± 3.45
음성 대조군	-	100	200.32 ± 10.24
목단피+백지+시호1:1:1 (w:w:w) 혼합추출물	1	100	42.67 ± 2.09

표 38

[0271] 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 활성산소(reactive oxgen species, ROS) 발생 완화 효능

약물 처리		유발 물질(LPS, ng/㎖)	DCF-DA-ROS (% of control)
처리 물질명	농도(㎍/㎖)		
정상 대조군	-	-	100.24 ± 6.79
음성 대조군	-	100	134.09 ± 19.13
목단피+백지+시호1:1:1 (w:w:w) 혼합추출물	1	100	115.83 ± 8.09

[0272] **<실험예 9> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 파킨슨병 치료 효능**

[0273] **<9-1> 파킨슨병 동물 모델의 제조- MPTP-유도 파킨슨병 마우스 모델**

[0274] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 도 1에 나타난 바와 같이 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다(도 1).

[0275] 구체적으로, 8 주령의 C57BL/6 계 수컷 마우스(체중 19 내지 22 g)를 분양 받아, 동아에스티(주)연구소 동물 사육실에서 1 주일 이상 사육하여 환경에 적응시켰다. 사육 동안, 22±2℃의 실내 온도, 53±3%의 습도 및 자동적인 12 시간 명암 주기의 환경에서 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 적응 후, 마우스를 6 마리 씩 총 5 군으로 나누고, 상기 실시예 <5-1>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물 1:1:1 비율의 동결건조물을 3% HPMC 용매에 녹여, 마우스 체중 1 kg 당 1, 3 또는 10 mg으로 총 14 일 동안 1 일 1회 경구 투여(per oral, p.o.)하였다. 실험 시작 8일째부터 연속 5일 동안 각각의 경구 투여 3 시간 후에는, 마우스 체중 1 kg 당 30 mg의 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)을 총 5 일 동안 복강 투여(intraperitoneal, i.p.)하여 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다. 정상 대조군으로는 혼합 추출물을 포함하지 않는 3% HPMC를 마우스 체중 1 kg 당 5 ㎖씩 투여한 다음, MPTP를 포함하지 않는 PBS를 복강 투여하였다.

[0276] **<9-2> MPTP-유도 파킨슨병 동물모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 운동 협응(motor coordination) 개선 효능**

[0277] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하

기 위해, 혼합 추출물을 투여하고 제조한 MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델에서 행동 시험(Pole test, Rotarod test)을 수행하였다.

[0278] 구체적으로, 상기 실험예 <8-1>에서 파킨슨병 동물모델을 제조한 후, 14 일 뒤에 상기 동물모델을 8 mm 직경 및 55 cm 높이를 가지는 수직의 표면이 거친 기둥의 상층부 근처에 두었다. 그런 다음, 30 초 단위로 마우스가 완전히 아래쪽으로 이동하는데 소요되는 시간을 측정하여 이를 돌아서는 시간(time to turn, T-turn)으로 정의하였고, 완전히 바닥면에 도착하는데 소요되는 시간을 측정하여 이를 운동 활성 시간(locomotion activity time, T-LA)으로 정의하였다. 또한 rpm 조절이 가능한 쳇바퀴 실험 장치를 활용하여 기구에 동물을 올려놓은 후, 떨어지기까지 걸리는 시간 (Latency to fall)을 측정하였다. 정상 대조군으로는 3%의 HPMC의 용매(vehicle)를 처리한 정상 마우스를 사용하였고, 음성 대조군으로는 마우스의 체중 1 kg 당 30 mg의 MPTP를 총 5 일 동안 복강 투여(i.p.)하고 혼합 추출물을 처리하지 않은 군을 대상으로 하여, 상기와 동일한 방법으로 Pole test를 통해 T-turn와 T-LA 시간을, Rotarod test를 통해 떨어지는데 걸리는 시간을 측정하였다.

[0279] 그 결과, 하기 [표 39] 및 [표 40]에서 나타난 바와 같이 용매를 처리한 정상 마우스인 정상 대조군에 비해, MPTP 만을 투여한 음성 대조군에서는 현저하게 증가한 T-turn 및 T-LA를 나타낸 반면, 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물을 투여한 파킨슨병 동물모델에서는 T-turn 및 T-LA가 감소하였다(표 39 및 표 40). 또한 하기 [표 41]에서 나타난 바와 같이 Rotarod test 결과에서도 정상 대조군에 비해, MPTP 만을 투여한 음성대조군에서는 떨어지는 데 걸리는 시간이 현저하게 감소한 반면, 목단피, 백지 및 시호의 90%에탄올 추출물을 투여한 파킨슨병 동물모델에서는 증가하였다. 이상의 결과로 파킨슨병 동물모델에서 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물에 의해 행동의 조정력(coordination)이 회복되었다(표 39 내지 표 41).

표 39

[0280] MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 돌아서는 시간(T-turn) 감소 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	T-turn(s)
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg*)		
정상 대조군	-	-	1.96 ± 0.17
음성 대조군	-	30	4.79 ± 0.41
목단피+백지+시호 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물	1	30	4.06 ± 0.36
	3	30	3.74 ± 0.42
	10	30	2.84 ± 0.19

[0281] * 투여량은 동물모델 마우스의 체중 1 kg 당 처리되는 혼합추출물의 질량(mg)을 나타낸다.

표 40

[0282] MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 운동 활성 시간(T-LA) 감소 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	T-turn(s)
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg*)		
정상 대조군	-	-	4.63 ± 0.37
음성 대조군	-	30	8.27 ± 0.18
목단피+백지+시호 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물	1	30	7.93 ± 0.63
	3	30	7.27 ± 0.27
	10	30	6.43 ± 0.44

[0283] * 투여량은 동물모델 마우스의 체중 1 kg 당 처리되는 혼합추출물의 질량(mg)을 나타낸다.

표 41

[0284] MPTP-유도 파킨슨병 동물모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 떨어지는 데 걸리는 시간 (Latency to fall) 증가 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	Latency to fall(s)
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg*)		
정상 대조군	-	-	211.03 ± 4.69
음성 대조군	-	30	99.87 ± 32.47
목단피+백지+시호 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물	1	30	153.34 ± 27.13
	3	30	187.06 ± 24.94
	10	30	181.76 ± 19.81

[0285] * 투여량은 동물모델 마우스의 체중 1 kg 당 처리되는 혼합추출물의 질량(mg)을 나타낸다.

[0286] **<9-3> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 도파민 신경세포 보호 효능**

[0287] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 혼합 추출물을 투여하고 제조한 MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델의 뇌조직을 수득하여 선조체(striatum, ST) 및 흑질(substantia nigra, SN)의 도파민 신경 세포에 대한 보호활성을 확인하였다.

[0288] 구체적으로, 상기 실험예 <8-2>에서 행동 시험을 종료한 마우스 모델에 졸레틸(zoletil) 50 mg/kg 투여량을 근육주사하여 마취한 다음, 4% 파라포름알데하이드를 포함하는 PBS를 심장을 통해 관류하여 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 4% 파라포름알데하이드로 다시 한번 고정한 다음, 4℃에서 30% 수크로즈(sucrose) 용액에 가라앉을 때까지 담가 냉동하였다. 냉동 후, 저온 유지장치 절단기(cryostat microtome; 제품명: CM3000, Leica 사, 독일)를 사용하여 냉동한 뇌 조직을 30 ㎛ 관상 절편(coronal section)으로 절편한 후, 글리세린, 에틸렌글리콜 및 PBS의 저장용액에 담가 4℃에서 보관하였다. 보관한 절편을 커버 슬립 위에 올리고, PBS 로 세척한 후, 15 분 동안 1% 과산화수소(H_2O_2)를 포함하는 PBS를 처리하여 조직에 존재하는 과산화효소(peroxidase) 활성을 제거하였다. 그런 다음, 항-티로신 하이드록시라제 항체(anti-Tyrosine hydroxylase antibody, anti-TH; 1:2000 희석, 토끼 기원; Millipore 사, 미국)를 1 차 항체로 처리하여 하룻밤동안 반응한 후, 2 차 항체로 비오틸화된 항-토끼 IgG 항체(biotinylated anti-rabbit IgG antibody)를 처리한 후 90 분 동안 실온에서 반응하였다. 반응 후, 벡타스테인 ABC 키트(Vectastain ABC kit; Vector Laboratories 사, 미국)에 포함되어 있는 아비딘-비오틴 복합 용액(avidin-biotin complex solution)을 처리하여 1 시간 동안 반응한 후, 디아미노벤지딘(Diaminobenzidine)을 이용하여 발색하였다. 도파민 신경세포(dopamine cell) 보호 효과는 선조체(striatum, ST)에서 광학밀도를 측정한 후, 흑질에서 티로신 하이드록시라제(Tyrosine hydroxylase, TH)를 나타내는 양성세포의 수를 계측하여 확인하였다. 정상 대조군으로는 용매를 처리한 정상 마우스를 사용하였고, 음성 대조군으로는 마우스의 체중 1 kg 당 30 mg의 MPTP를 총 5 일 동안 복강투여(i.p.)하고 혼합 추출물을 처리하지 않은 군을 대상으로 하였다.

[0289] 그 결과, 하기 [표 42]에서 나타난 바와 같이 목단피, 백지 및 시호의 에탄올 추출물을 투여한 파킨슨병 마우스 모델의 선조체(striatum, ST) 내에서 염색된 TH의 광학밀도는 농도 의존적으로 상승하여, 도파민 신경세포의 보호 효과를 나타내었다. 또한, 하기 [표 43]에서 나타난 바와 같이 흑질(substantia nigra, SN)에서도 목단피, 백지 및 시호의 에탄올 추출물을 투여하였을 때 투여량에 의존적으로 TH 양성세포가 증가하였다(표 42 및 표 43).

표 42

[0290] MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 선조체(ST) 내 TH의 광학밀도 증가 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	Optical density (% of control)
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg*)		
정상 대조군	-	-	100.00± 4.33
음성 대조군	-	30	43.48 ± 4.02
목단피+백지+시호 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물	1	30	52.70 ± 2.39
	3	30	66.45 ± 5.23
	10	30	72.00 ± 4.21

[0291] * 투여량은 동물모델 마우스의 체중 1 kg 당 처리되는 혼합추출물의 질량(mg)을 나타낸다.

표 43

[0292] MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 흑질(SN) 내 TH-양성 세포의 증가 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	TH-positive cell (% of control)
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg*)		
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.99
음성 대조군	-	30	52.83 ± 6.42
목단피+백지+시호 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물	1	30	62.27 ± 2.78
	3	30	73.20 ± 3.93
	10	30	85.14 ± 4.69

[0293] * 투여량은 동물모델 마우스의 체중 1 kg 당 처리되는 혼합추출물의 질량(mg)을 나타낸다.

[0294] **<9-4> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 도파민 측정**

[0295] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 혼합 추출물을 투여하고 제조한 MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델의 뇌조직을 수득하여 도파민 양을 측정하였다.

[0296] 구체적으로 상기 실험예 <8-2>에서 행동 시험을 종료한 마우스 모델에서 뇌를 적출하여 선조체(ST)를 분리하여 균질화한 후, Perchloric acid (Sigma)을 가하여 배양하여, 거른 후 가압 농축하였다. 농축된 추출액을 크로마토그래피 분석을 통해 도파민 양을 측정하였다. 정상 대조군으로는 용매를 처리한 정상 마우스를 사용하였고, 음성 대조군으로는 마우스의 체중 1 kg 당 30 mg의 MPTP를 총 5 일 동안 복강투여(i.p.)하고 혼합 추출물을 처리하지 않은 군을 대상으로 하였다.

[0297] 그 결과, 하기 [표 44]에서 나타난 바와 같이 목단피, 백지 및 시호의 에탄올 추출물을 투여한 파킨슨병 동물모델의 도파민 양이 크게 감소하였으나, 목단피, 백지 및 시호의 에탄올 추출물을 투여하였을 때 유의성 있는 차이를 보이며 증가하였다 (표 44).

표 44

[0298] MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 도파민 양 확인

약물 처리		유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	Dopamine content (% of control)
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg*)		
정상 대조군	-	-	100.02 ± 7.69
음성 대조군	-	30	34.16 ± 4.77
목단피+백지+시호 1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물	1	30	49.87 ± 3.86
	3	30	53.77 ± 2.09
	10	30	57.02 ± 2.76

[0299] * 투여량은 동물모델 마우스의 체중 1 kg 당 처리되는 혼합추출물의 질량(mg)을 나타낸다.

[0300] **<9-5> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 TH, 미토콘드리아, 인슐린 신호전달계 손상에 대한 회복 효능**

[0301] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 혼합 추출물을 투여하고 제조한 MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델의 뇌조직에서 TH 및 미토콘드리아 마

커인 ND9 단백질의 발현 수준, 및 인슐린 신호전달계 마커인 Akt1 단백질의 인산화 수준을 확인하였다.

[0302] 구체적으로, 상기 실험예 <8-3>의 방법을 수행하여 흑질(substantia nigra, SN), 선조체(corpus striatum, ST) 및 소뇌(cerebellum) 절편을 수득하여, 이로부터 뇌 조직 단백질을 수득한 다음, 웨스턴 블럿을 수행하여 TH 및 ND9 단백질의 발현 수준, 및 Akt1 단백질의 인산화(S473 및 T308) 수준을 확인하였다. 발현의 비교를 위한 대조 단백질로는 β-액틴(β-actin)을 사용하였다. 양성 대조군으로는 용매를 처리한 정상 마우스를 사용하였고, 음성 대조군으로는 마우스의 체중 1 kg 당 30 mg의 MPTP를 총 5 일 동안 복강투여(i.p.)하고 혼합 추출물을 처리하지 않은 군을 대상으로 하였다.

[0303] 그 결과, 하기 [표 45] 내지 [표 47]에서 나타난 바와 같이 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물을 10 ㎎/kg의 투여량으로 투여한 마우스모델의 선조체, 흑질 및 소뇌 조직에서 TH 및 ND9 단백질의 발현 수준이 정상 대조군과 유사한 수준으로 회복되었으며, Akt1 단백질의 인산화 역시 정상 수준으로 회복되었다(표 45 내지 표 47).

표 45

[0304] MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 흑질의 TH, 미토콘드리아, 인슐린 신호전달계 손상에 대한 회복 효능

약물 처리		유발물질 투여량	*pAkt(T308)/β-actin*
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg)	(MPTP, mg/kg 5x, ip)	
정상 대조군	-	-	100.00 ± 1.31
음성 대조군	-	30	5.65 ± 0.97
목단피+백지+시호	1	30	67.43 ± 4.62
1:1:1(w:w:w)	3	30	71.07 ± 3.99
혼합 추출물	10	30	79.03 ± 3.12
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*pAkt(S473)/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 1.82
음성 대조군	-	30	2.90 ± 0.37
목단피+백지+시호	1	30	72.74 ± 6.81
1:1:1(w:w:w)	3	30	83.62 ± 2.95
혼합 추출물호	10	30	87.78 ± 4.12
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*Akt/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.95
음성 대조군	-	30	101.94 ± 1.17
목단피+백지+시호	1	30	103.71 ± 3.95
1:1:1(w:w:w)	3	30	97.34 ± 2.60
혼합 추출물	10	30	97.82 ± 3.78
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*TH/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 1.25
음성 대조군	-	30	3.79 ± 0.06
목단피+백지+시호	1	30	76.62 ± 5.65
1:1:1(w:w:w)	3	30	88.76 ± 5.57
혼합 추출물	10	30	80.27 ± 4.96
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*ND9/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.81
음성 대조군	-	30	6.17 ± 0.57
목단피+백지+시호	1	30	83.42 ± 2.53
1:1:1(w:w:w)	3	30	86.03 ± 2.78
혼합 추출물	10	30	87.71 ± 3.76

표 46

[0305] MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 선조체의 TH, 미토콘드리아, 인슐린 신호전달계 손상에 대한 회복 효능

약물 처리		유발물질 투여량	*pAkt(T308)/β-actin*
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg)	(MPTP, mg/kg 5x, ip)	
정상 대조군	-	-	100.00± 3.73
음성 대조군	-	30	8.82 ± 0.41
목단피+백지+시호	1	30	76.83 ± 3.96
1:1:1(w:w:w)	3	30	88.86± 4.94
혼합 추출물	10	30	82.53 ± 7.71
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*pAkt(S473)/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 3.97
음성 대조군	-	30	6.05 ± 1.03
목단피+백지+시호	1	30	72.53 ± 5.71
1:1:1(w:w:w)	3	30	86.77 ± 2.65
혼합 추출물	10	30	96.18 ± 6.11
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*Akt/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.11
음성 대조군	-	30	101.34 ± 4.14
목단피+백지+시호	1	30	96.35 ± 6.44
1:1:1(w:w:w)	3	30	104.85 ± 2.24
혼합 추출물	10	30	103.51 ± 3.91
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*TH/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.61
음성 대조군	-	30	5.41 ± 1.72
목단피+백지+시호	1	30	87.02 ± 5.97
1:1:1(w:w:w)	3	30	93.53 ± 2.59
혼합 추출물	10	30	92.79 ± 5.41
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*ND9/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 4.88
음성 대조군	-	30	5.03 ± 0.74
목단피+백지+시호	1	30	79.33 ± 1.18
1:1:1(w:w:w)	3	30	86.85± 2.63
혼합 추출물	10	30	92.31 ± 3.68

표 47

[0306] MPTP-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 소뇌의 TH, 미토콘드리아, 인슐린 신호전달계 손상에 대한 회복 효능

약물 처리		유발물질 투여량	*pAkt(T308)/β-actin*
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg)	(MPTP, mg/kg 5x, ip)	
정상 대조군	-	-	100.00± 3.73
음성 대조군	-	30	8.82 ± 0.41
목단피+백지+시호	1	30	76.83 ± 3.96
1:1:1(w:w:w)	3	30	88.86± 4.94
혼합 추출물	10	30	82.53 ± 7.71
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*pAkt(S473)/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 3.97
음성 대조군	-	30	6.05 ± 1.03
목단피+백지+시호	1	30	72.53 ± 5.71
1:1:1(w:w:w)			
혼합 추출물			

	3	30	86.77 ± 2.65
	10	30	96.18 ± 6.11
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*Akt/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.11
음성 대조군	-	30	101.34 ± 4.14
목단피+백지+시호	1	30	96.35 ± 6.44
1:1:1(w:w:w)	3	30	104.85 ± 2.24
혼합 추출물	10	30	103.51 ± 3.91
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*TH/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 2.61
음성 대조군	-	30	5.41 ± 1.72
목단피+백지+시호	1	30	87.02 ± 5.97
1:1:1(w:w:w)	3	30	93.53 ± 2.59
혼합 추출물	10	30	92.79 ± 5.41
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg)	유발물질 투여량 (MPTP, mg/kg 5x, ip)	*ND9/β-actin*
정상 대조군	-	-	100.00 ± 4.88
음성 대조군	-	30	5.03 ± 0.74
목단피+백지+시호	1	30	79.33 ± 1.18
1:1:1(w:w:w)	3	30	86.85± 2.63
혼합 추출물	10	30	92.31 ± 3.68

[0307] **<실험예 10> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 파킨슨병 치료 효능**

[0308] **<10-1> 파킨슨병 동물 모델의 제조- 6-OHDA(6-hydroxydopamine)-유도 파킨슨병 마우스 모델**

[0309] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 도 2에 나타난 바와 같이 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다(도 2).

[0310] 구체적으로, 8 주령의 ICR계 수컷 마우스(체중 19 내지 22 g)를 분양 받아, 경희대학교 약학대학 동물 사육실에서 1 주일 이상 사육하여 환경에 적응시켰다. 사육 동안, 22±2℃의 실내 온도, 53±3%의 습도 및 자동적인 12 시간 명암 주기의 환경에서 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 적응 후, 마우스를 6 마리씩 총 3 군으로 나눈 후, stereotaxic surgery(injection)를 통해 0.1% ascorbic acid 2 ㎕에 6-OHDA (6-hydroxydopamine) 16 ㎍을 희석하여 1회 주입하여 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다. 수술 일주일 후, 상기 실시예 <5-1>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물 1:1:1 비율의 동결건조물을 물에 녹여, 마우스 체중 1 kg 당 3 mg으로 총 7 일 동안 1 일 1회 경구 투여(per oral, p.o.)하였다. 양성 대조군으로는 용매를 처리한 정상 마우스를 사용하였고, 음성 대조군으로는 6-OHDA를 포함하는 0.1% ascorbic acid를 stereotaxic surgery를 통해 주입한 군을 대상으로 하였다.

[0311] **<10-2> 6-OHDA-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 운동 협응(motor coordination) 개선 효능**

[0312] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 혼합 추출물을 투여하고 제조한 파킨슨병 마우스모델에서 행동 시험(Pole test, Rotarod test)을 수행하였다.

[0313] 구체적으로, 상기 실험예 <9-1>에서 파킨슨병 마우스모델을 제조한 후, 7 일 뒤에 상기 동물모델을 8 mm 직경 및 55 cm 높이를 가지는 수직의 표면이 거친 기둥의 상층부 근처에 두었다. 그런 다음, 30 초 단위로 마우스가 완전히 아래쪽으로 이동하는데 소요되는 시간을 측정하여 이를 돌아서는 시간(time to turn, T-turn)으로 정의하였고, 완전히 바닥면에 도착하는데 소요되는 시간을 측정하여 이를 운동 활성 시간(locomotion activity time, T-LA)으로 정의하였다. 또한 rpm 조절이 가능한 쳇바퀴 실험 장치를 활용하여 기구에 동물을 올려놓은 후, 떨어지기까지 걸리는 시간 (Latency to fall)을 측정하였다. 양성 대조군으로는 용매를 처리한 정상 마우

스를 사용하였고, 음성 대조군으로는 6-OHDA를 포함하는 0.1% ascorbic acid를 stereotaxic surgery를 통해 주입한 군을 대상으로 하였으며, 상기와 동일한 방법으로 Pole test를 통해 T-turn와 T-LA 시간을, Rotarod test를 통해 떨어지는데 걸리는 시간을 측정하였다.

[0314] 그 결과, 하기 [표 48] 및 [표 49]에서 나타난 바와 같이 용매를 처리한 정상 마우스인 정상 대조군에 비해, 6-OHDA 만을 투여한 음성 대조군에서는 현저하게 증가한 T-turn 및 T-LA를 나타낸 반면, 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물을 투여한 파킨슨병 마우스모델에서는 T-turn 및 T-LA가 감소하였다(표 48 및 표 49). 또한 하기 [표 50]에서 나타난 바와 같이 Rotarod test 결과에서도 정상 대조군에 비해, 6-OHDA 만을 투여한 음성대조군에서는 떨어지는 데 걸리는 시간이 현저하게 감소한 반면, 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물을 투여한 파킨슨병 마우스모델에서는 증가하였다. 이상의 결과로 파킨슨병 마우스모델에서 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물에 의해 행동의 조정력(coordination)이 회복하였다(표 48 내지 표 50).

표 48

[0315] 6-OHDA-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 돌아서는 시간 (T-turn) 감소 효능

약물 처리		유발물질 투여량(6-OHDA, ㎍)	T-turn(s)
처리 물질명	추출물 투여량(㎎/㎏)		
정상 대조군	-	-	3.75 ± 0.76
음성 대조군	-	16	15.64 ± 4.01
목단피+백지+시호 1:1:1 (w:w:w) 혼합추출물	3	16	4.71 ± 1.65

표 49

[0316] 6-OHDA-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 운동 활성 시간(T-LA) 감소 효능

약물 처리		유발물질 투여량(6-OHDA, ㎍)	T-LA(s)
처리 물질명	추출물 투여량(㎎/㎏)		
정상 대조군	-	-	9.54 ± 1.67
음성 대조군	-	16	17.24 ± 7.01
목단피+백지+시호 1:1:1 (w:w:w) 혼합추출물	3	16	7.87 ± 3.08

표 50

[0317] 6-OHDA-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 떨어지는 데 걸리는 시간 (Latency to fall) 증가 효능

약물 처리		유발물질 투여량(6-OHDA, ㎍)	Latency to fall(s)
처리 물질명	추출물 투여량(㎎/㎏)		
정상 대조군	-	-	46.08 ± 19.24
음성 대조군	-	16	3.11 ± 0.38
목단피+백지+시호 1:1:1 (w:w:w) 혼합추출물	3	16	17.20 ± 3.19

[0318] **<10-3> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 도파민 신경세포 보호 효능**

[0319] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 혼합 추출물을 투여하고 제조한 6-OHDA-유도 파킨슨병 마우스모델의 뇌조직을 수득하여 선조체(striatum, ST) 및 흑질(substantia nigra, SN)의 도파민 신경 세포에 대한 보호활성을 확인하였다.

[0320] 구체적으로, 상기 실험예 <9-2>에서 행동 시험을 종료한 마우스 모델에 졸레틸(zoletil) 50 ㎎/㎏ 투여량을 근육주사하여 마취한 다음, 4% 파라포름알데하이드를 포함하는 PBS를 심장을 통해 관류하여 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 4% 파라포름알데하이드로 다시 한번 고정한 다음, 4℃에서 30% 수크로즈(sucrose) 용액에 가라앉을

때까지 담가 냉동하였다. 냉동 후, 저온 유지장치 절단기(cryostat microtome; 제품명: CM3000, Leica 사, 독일)를 사용하여 냉동한 뇌 조직을 30 ㎛ 관상 절편(coronal section)으로 절편한 후, 글리세린, 에틸렌글리콜 및 PBS의 저장용액에 담가 4℃에서 보관하였다. 보관한 절편을 커버 슬립 위에 올리고, PBS 로 세척한 후, 15 분 동안 1% 과산화수소(H_2O_2)를 포함하는 PBS를 처리하여 조직에 존재하는 과산화효소(peroxidase) 활성을 제거하였다. 그런 다음, 항-티로신 하이드록시라제 항체(anti-Tyrosine hydroxylase antibody, anti-TH; 1:2000 희석, 토끼 기원; Millipore 사, 미국)를 1 차 항체로 처리하여 하룻밤 동안 반응한 후, 2 차 항체로 비오틸화된 항-토끼 IgG 항체(biotinylated anti-rabbit IgG antibody)를 처리한 후 90 분 동안 실온에서 반응하였다. 반응 후, 벡타스테인 ABC 키트(Vectastain ABC kit; Vector Laboratories 사, 미국)에 포함되어 있는 아비딘-비오틴 복합 용액(avidin-biotin complex solution)을 처리하여 1 시간 동안 반응한 후, 디아미노벤지딘(Diaminobenzidine)을 이용하여 발색하였다. 도파민 신경세포(dopamine cell) 보호 효과는 선조체(striatum, ST)에서 광학밀도를 측정한 후, 흑질에서 티로신 하이드록시라제(Tyrosine hydroxylase, TH)를 나타내는 양성 세포의 수를 계측하여 확인하였다. 양성 대조군으로는 용매를 처리한 정상 마우스를 사용하였고, 음성 대조군으로는 6-OHDA를 포함하는 0.1% ascorbic acid를 stereotaxic surgery를 통해 주입한 군을 대상으로 하였다.

[0321] 그 결과, 하기 [표 51] 및 [표 52]에서 나타난 바와 같이 목단피, 백지 및 시호의 에탄올 추출물을 투여한 파킨슨병 동물 모델의 선조체(striatum, ST) 내에서 염색된 TH의 광학밀도가 상승하여, 도파민 신경세포의 보호 효과를 나타내었다. 또한, 흑질(substantia nigra, SN)에서도 목단피, 백지 및 시호의 에탄올 추출물을 투여하였을 때 TH 양성세포가 증가하였다(표 51 및 표 52).

표 51

[0322] 6-OHDA-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 선조체(ST) 내 TH의 광학밀도 증가 효능

약물 처리		유발물질 투여량(6-OHDA, ㎍)	Optical density (% of control)
처리 물질명	추출물 투여량(㎎/㎏)		
정상 대조군	-	-	100.01 ± 6.58
음성 대조군	-	16	58.46 ± 4.09
목단피+백지+시호 1:1:1 (w:w:w) 혼합추출물	3	16	76.84 ± 5.37

표 52

[0323] 6-OHDA-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 흑질(SN) 내 TH-양성 세포의 증가 효능

약물 처리		유발물질 투여량(6-OHDA, ㎍)	TH-positive cell (% of control)
처리 물질명	추출물 투여량(㎎/㎏)		
정상 대조군	-	-	100.00 ± 7.94
음성 대조군	-	16	63.67 ± 3.08
목단피+백지+시호 1:1:1 (w:w:w) 혼합추출물	3	16	76.90 ± 2.18

[0324] **<실험예 11> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 파킨슨병 치료 효능**

[0325] **<11-1> 파킨슨병 동물 모델의 제조- Rotenone-유도 파킨슨병 랫드 모델**

[0326] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 도 3에 나타난 바와 같이 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다(도 3).

[0327] 구체적으로, 7 주령의 SD 계 수컷 랫드(체중 200 내지 220 g)를 분양 받아, 동아ST 연구소 동물 사육실에서 1 주일 이상 사육하여 환경에 적응시켰다. 사육 동안, 22±2℃의 실내 온도, 53±3%의 습도 및 자동적인 12 시간 명암 주기의 환경에서 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 적응 후, 랫드를 6 마리씩 총 3 군으로 나누고, 상기 실시예 <5-1>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물 1:1:1 비율의 동결건조물을 물에 녹여, 랫드 체중 1 kg 당 10 mg으로 총 6 주 동안 1 일 1회 경구 투여(per oral, p.o.)하였다. 각각의 경구 투여 1 주 후에는, 랫드 체중 1 kg 당 2.5 mg의 rotenone을 총 5 주 동안 1일 1회 복강 투여(intraperitoneal,

i.p.)하여 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다. 양성 대조군으로는 용매를 처리한 정상 랫드를 사용하였고, 음성 대조군으로는 랫드 체중 1 kg 당 2.5 mg의 rotenone을 총 5 주 동안 1일 1회 복강 투여한 군을 대상으로 하였다.

[0328] **<11-2> Rotenone-유도 파킨슨병 랫드모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 운동 협응(motor coordination) 개선 효능**

[0329] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 혼합 추출물을 투여하고 제조한 Rotenone-유도 파킨슨병 랫드모델에서 행동 시험(Cylinder test)을 수행하였다.

[0330] 구체적으로, 상기 실험예 <11-1>에서 파킨슨병 동물모델을 제조한 후, Cylinder test를 시행하였다. 랫드를 높이 30 cm, 직경 20 cm의 실린더에 넣고 몸을 일으켜서 5분간 앞발을 벽에 대고 서는 횟수를 측정하였다. 양성 대조군으로는 용매를 처리한 정상 랫드를 사용하였고, 음성 대조군으로는 랫드 체중 1 kg 당 2.5 mg의 rotenone을 총 5 주 동안 1일 1회 복강 투여한 군을 대상으로 하여, 상기와 동일한 방법으로 5분간 앞발을 벽에 대고 서는 횟수를 측정하였다.

[0331] 그 결과, 하기 [표 53] 에서 나타난 바와 같이 용매를 처리한 정상 랫드인 양성 대조군에 비해, Rotenone 만을 투여한 음성 대조군에서는 현저하게 감소된 서는 시간이 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물을 투여한 파킨슨병 동물모델에서는 증가하였다 (표 53).

표 53

[0332] Rotenone-유도 파킨슨병 랫드모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 5분간 앞발을 벽에 대고 서는 횟수 증가 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (Rotenone,mg/kg)	No.of rears per 5 min
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg)		
정상 대조군	-	-	13.75 ± 2.14
음성 대조군	-	2.5	2.19 ± 0.49
목단피+백지+시호 1:1:1 (w:w:w) 혼합추출물	10	2.5	6.05 ± 1.85

[0333] **<11-3> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 α-synuclein 축적 감소 효능**

[0334] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 혼합 추출물을 투여하고 제조한 Rotenone-유도 파킨슨병 랫드모델의 뇌조직을 수득하여 흑질(substantia nigra, SN)의 α-synuclein-oligomer 축적에 미치는 영향을 확인하였다.

[0335] 구체적으로, 상기 실험예 <11-2>에서 행동 실험을 종료한 랫드 모델에 졸레틸(zoletil) 50 mg/kg 투여량을 근육주사하여 마취한 다음, 4% 파라포름알데하이드를 포함하는 PBS를 심장을 통해 관류하여 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 4% 파라포름알데하이드로 다시 한번 고정한 다음, 4℃에서 30% 수크로즈(sucrose) 용액에 가라앉을 때까지 담가 냉동하였다. 냉동 후, 저온 유지장치 절단기(cryostat microtome; 제품명: CM3000, Leica 사, 독일)를 사용하여 냉동한 뇌 조직을 30 ㎛ 관상 절편(coronal section)으로 절편한 후, 글리세린, 에틸렌글리콜 및 PBS의 저장용액에 담가 4℃에서 보관하였다. 보관한 절편을 커버 슬립 위에 올리고, PBS 로 세척한 후, 15 분 동안 1% 과산화수소(H_2O_2)를 포함하는 PBS를 처리하여 조직에 존재하는 과산화효소(peroxidase) 활성을 제거하였다. 그런 다음, 항-알파 시누클레인 항체(anti-α-synuclein antibody; 1:2000 희석; 마우스기원, abcam 사, 영국)를 1 차 항체로 처리하여 하룻밤 동안 반응한 후, 2 차 항체로 비오틸화된 항-마우스 IgG 항체(biotinylated anti-mouse IgG antibody)를 처리한 후 90 분 동안 실온에서 반응하였다. 반응 후, 벡타스테인 ABC 키트(Vectastain ABC kit; Vector Laboratories 사, 미국)에 포함되어 있는 아비딘-비오틴 복합 용액(avidin-biotin complex solution)을 처리하여 1 시간 동안 반응한 후, 디아미노벤지딘(Diaminobenzidine)을 이용하여 발색하였다. α-synuclein-oligomer 축적은 흑질에서 α-synuclein을 나타내는 양성 세포의 수를 계측하여 확인하였다. 양성 대조군으로는 용매를 처리한 정상 랫드를 사용하였고, 음성 대조군으로는 랫드 체중 1 kg 당 2.5 mg의 rotenone을 총 5 주 동안 1일 1회 복강 투여한 군을 대상으로 하였다.

[0336] 그 결과, 하기 [표 54]에서 나타난 바와 같이 목단피, 백지 및 시호의 에탄올 추출물을 투여한 파킨슨병 랫드 모델의 흑질(substantia nigra, SN)에서 목단피, 백지 및 시호의 에탄올 추출물을 투여하였을 때 α-synuclein 양성세포가 감소하였다(표 54).

표 54

[0337] Rotenone-유도 파킨슨병 랫드모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 흑질(SN) 내 α-synclein 양성 세포의 감소 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (Rotenone,mg/kg)	α-synuclein-positive cell(% of control)
처리 물질명	추출물 투여량(mg/kg)		
정상 대조군	-	-	100.27 ± 1.86
음성 대조군	-	2.5	241.76 ± 15.24
목단피+백지+시호 1:1:1 (w:w:w) 혼합추출물	10	2.5	116.45 ± 9.08

[0338] **<실험예 12> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 생체 내 파킨슨병(뇌염증) 치료 효능**

[0339] **<12-1> Neuroinflammation 동물 모델의 제조- LPS-유도 파킨슨병 마우스모델**

[0340] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 도 4에 나타난 바와 같이 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다(도 4).

[0341] 구체적으로, 8 주령의 C57BL/6 계 수컷 마우스(체중 19 내지 22 g)를 분양 받아, 경희대학교 약학대학 동물 사육실에서 1 주일 이상 사육하여 환경에 적응시켰다. 사육 동안, 22±2℃의 실내 온도, 53±3%의 습도 및 자동적인 12 시간 명암 주기의 환경에서 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 적응 후, 마우스를 6 마리씩 총 4 군으로 나누고, 상기 실시예 <5-1>에서 제조한 목단피, 백지 및 시호의 90% 에탄올 추출물 1:1:1 비율의 동결건조물을 물에 녹여, 마우스 체중 1 kg 당 10 또는 30 mg으로 총 3 일 동안 1 일 1회 경구 투여(per oral, p.o.)하였다. 마지막 경구 투여 후에는, 마우스 체중 1 kg 당 5 mg의 LPS (Lipopolysaccharide)을 단회 복강 투여(intraperitoneal, i.p.)하여 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다. 양성 대조군으로는 용매를 처리한 정상 마우스를 사용하였고, 음성 대조군으로는 마우스의 체중 1 kg 당 5 mg의 LPS를 투여하고 혼합 추출물을 처리하지 않은 군을 대상으로 하였다.

[0342] **<12-2> 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 항 뇌염증 효능**

[0343] 본 발명의 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물이 생체 내에서 파킨슨병에 대한 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 혼합 추출물을 투여하고 제조한 LPS-유도 파킨슨병 마우스모델의 뇌조직을 수득하여 흑질(substantia nigra, SN) 및 해마에서 별아교세포(astrocyte) 및 미세아교세포(microglia)의 활성화에 미치는 영향으로 항 뇌염증 효능을 확인하였다.

[0344] 구체적으로, 상기 실험예 <12-1>에서 제작한 neuroinflammation 동물 모델에 졸레틸(zoletil) 50 mg/kg 투여량을 근육주사하여 마취한 다음, 4% 파라포름알데하이드를 포함하는 PBS를 심장을 통해 관류하여 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 4% 파라포름알데하이드로 다시 한번 고정한 다음, 4℃에서 30% 수크로즈(sucrose) 용액에 가라앉을 때까지 담가 냉동하였다. 냉동 후, 저온 유지장치 절단기(cryostat microtome; 제품명: CM3000, Leica 사, 독일)를 사용하여 냉동한 뇌 조직을 30 ㎛ 관상 절편(coronal section)으로 절편한 후, 글리세린, 에틸렌글리콜 및 PBS의 저장용액에 담가 4℃에서 보관하였다. 보관한 절편을 커버 슬립 위에 올리고, PBS 로 세척한 후, 15 분 동안 1% 과산화수소(H_2O_2)를 포함하는 PBS를 처리하여 조직에 존재하는 과산화효소(peroxidase) 활성을 제거하였다. 그런 다음, anti-GFAP 항체 (1:5000 희석; Neuromics사, 토끼기원, 미국) 또는 anti-Iba-1 항체 (1:1000 희석; Dako사, 토끼기원, 일본)를 1차 항체로 처리하여 하룻밤동안 반응한 후, 2차 항체로 비오틸화된 항-토끼 IgG 항체(biotinylated anti-rabbit IgG antibody)를 처리한 후 90 분 동안 실온에서 반응하였다. 반응 후, 벡타스테인 ABC 키트(Vectastain ABC kit; Vector Laboratories 사, 미국)에 포함되어 있는 아비딘-비오틴 복합 용액(avidin-biotin complex solution)을 처리하여 1 시간 동안 반응한 후, 디아미노벤지딘(Diaminobenzidine)을 이용하여 발색하였다. 흑질 및 해마에서 유도되는 활성화된 astrocyte 및 microglia는 각각 GFAP 및 Iba-1을 나타내는 양성 세포의 수를 계측하여 확인하였다. 양성 대조군으로는 용매를 처리한 정

상 마우스를 사용하였고, 음성 대조군으로는 마우스의 체중 1 kg 당 5mg의 LPS를 투여하고 혼합 추출물을 처리하지 않은 군을 대상으로 하였다.

[0345] 그 결과, 하기 [표 55] 및 [표 56]에서 나타난 바와 같이 목단피, 백지 및 시호의 에탄올 추출물을 투여한 파킨슨병 마우스 모델의 흑질(substantia nigra, SN)에서 LPS에 의해 증가되었던 GFAP 및 Iba-1을 나타내는 양성세포가 목단피, 백지 및 시호의 에탄올 추출물을 투여하였을 때 투여량에 의존적으로 감소하였으며, 이를 통해 astrocyte 및 microglia의 활성화 감소, 즉 뇌염증반응이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(표 55 및 표 56). 이와 유사하게, 하기 [표 57] 및 [표 58]에서 나타난 바와 같이 파킨슨병 마우스 모델의 해마에서도 LPS에 의해 증가되었던 GFAP 및 Iba-1을 나타내는 양성세포가 투여량에 의존적으로 감소하였고, 마찬가지로 astrocyte 및 microglia의 활성화가 감소, 뇌염증반응 감소를 확인할 수 있었다 (표 57 및 표 58).

표 55

[0346] LPS-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 흑질(SN) 내 LPS-에 의해 증가된 GFAP-양성 세포(astrocyte, 별아교세포, 성상교세포)의 감소 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (LPS, mg/kg)	GFAP-positive cell (% of control)
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)		
정상 대조군	-	-	5.76 ± 0.75
음성 대조군	-	5	38.15 ± 4.97
목단피+백지+시호1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물	10	5	14.28 ± 2.68
	30	5	9.41 ± 1.04

표 56

[0347] LPS-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 흑질(SN) 내 LPS-에 의해 증가된 Iba-1-양성 세포(microglia, 미세아교세포)의 감소 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (LPS, mg/kg)	Iba-1 -positive cell (% of control)
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)		
정상 대조군	-	-	8.79 ± 0.75
음성 대조군	-	5	28.67 ± 0.49
목단피+백지+시호1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물	10	5	22.09 ± 2.04
	30	5	17.08 ± 1.39

표 57

[0348] LPS-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 해마(hippocampus) 내 LPS-에 의해 증가된 GFAP-양성 세포의 감소 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (LPS, mg/kg)	GFAP -positive cell (% of control)
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)		
정상 대조군	-	-	20.48 ± 4.98
음성 대조군	-	5	71.18 ± 3.63
목단피+백지+시호1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물	10	5	38.05 ± 3.91
	30	5	21.24 ± 2.87

표 58

[0349] LPS-유도 파킨슨병 마우스모델에 대한 목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물의 해마(hippocampus) 내 LPS-에 의해 증가된 Iba-1 양성 세포의 감소 효능

약물 처리		유발물질 투여량 (LPS, mg/kg)	Iba-1 -positive cell (% of control)
처리 물질명	추출물 투여량 (mg/kg)		
정상 대조군	-	-	18.67 ±5.44
음성 대조군	-	5	58.15 ± 4.76
목단피+백지+시호1:1:1(w:w:w) 혼합 추출물	10	5	24.70 ± 3.31
	30	5	14.75 ± 3.08

[0350] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0351] **<1-1> 산제의 제조**

[0352] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물 0.1 g

[0353] 유당 1.5 g

[0354] 탈크 0.5 g

[0355] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0356] **<1-2> 정제의 제조**

[0357] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물 0.1 g

[0358] 락토오스 7.9 g

[0359] 결정성 셀룰로오스 1.5 g

[0360] 마그네슘 스테아레이트 0.5 g

[0361] 상기의 성분들을 혼합한 후 직타법(direct tableting method)으로 정제를 제조하였다.

[0362] **<1-3> 캡슐제의 제조**

[0363] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물 0.1 g

[0364] 옥수수전분 5 g

[0365] 카르복시 셀룰로오스 4.9 g

[0366] 상기의 성분들을 혼합하여 분말을 제조한 후, 상기 분말을 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라 경질 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0367] **<1-4> 주사제의 제조**

[0368] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물 0.1 g

[0369] 주사용 멸균 증류수 적량

[0370] pH 조절제 적량

[0371] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플 당(2 ㎖) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.

[0372] **<1-5> 액제의 제조**

[0373] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물 0.1 g

[0374] 이성화당 10 g

[0375] 만니톨 5 g

[0376] 정제수 적량

[0377] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고, 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합하였다. 그 다음 정제수를 가하여 전체 100 로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[0378] **<제조예 2> 건강식품의 제조**

[0379] **<2-1> 밀가루 식품의 제조**

[0380] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이를 혼합한 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0381] **<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0382] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물 0.1 ~ 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0383] **<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조**

[0384] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0385] **<2-4> 유제품(dairy products)의 제조**

[0386] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0387] **<2-5> 선식의 제조**

[0388] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0389] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0390] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0391] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및, 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 하기의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0392] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0393] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0394] 본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물(3 중량부),

[0395] 영지(0.5 중량부),

[0396] 지황(0.5 중량부)

[0397] **<2-6> 건강보조식품의 제조**

[0398]	본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물	100 ㎎
[0399]	비타민 혼합물	적량
[0400]	비타민 A 아세테이트	70 ㎍
[0401]	비타민 E	1.0 ㎎
[0402]	비타민 B1	0.13 ㎎
[0403]	비타민 B2	0.15 ㎎
[0404]	비타민 B6	0.5 ㎎
[0405]	비타민 B12	0.2 ㎍
[0406]	비타민 C	10 ㎎
[0407]	비오틴	10 ㎍
[0408]	니코틴산아미드	1.7 ㎎
[0409]	엽산	50 ㎍
[0410]	판토텐산 칼슘	0.5 ㎎
[0411]	무기질 혼합물	적량
[0412]	황산제1철	1.75 ㎎
[0413]	산화아연	0.82 ㎎
[0414]	탄산마그네슘	25.3 ㎎
[0415]	제1인산칼륨	15 ㎎
[0416]	제2인산칼슘	55 ㎎
[0417]	구연산칼륨	90 ㎎
[0418]	탄산칼슘	100 ㎎
[0419]	염화마그네슘	24.8 ㎎

[0420] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였으나, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0421] **<제조예 3> 건강 음료의 제조**

[0422]	본 발명의 혼합 추출물 또는 이의 분획물	100 ㎎
[0423]	구연산	100 ㎎
[0424]	올리고당	100 ㎎
[0425]	매실농축액	2 ㎎
[0426]	타우린	100 ㎎
[0427]	정제수를 가하여 전체	500 ㎖

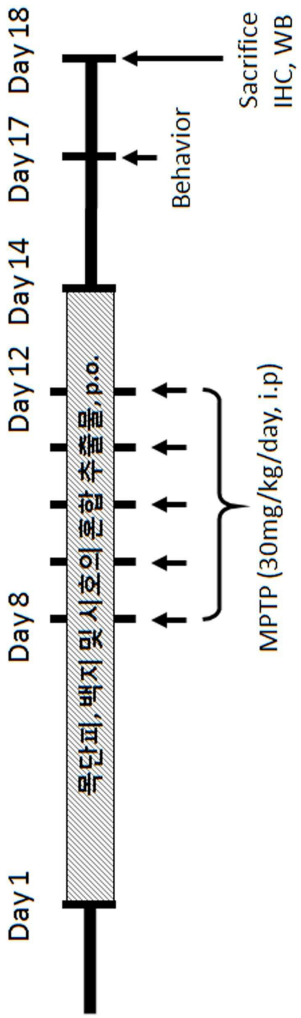
[0428] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 ℓ용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하여 본 발명의 건강음료 조성물

제조에 사용한다.

[0429] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였으나, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

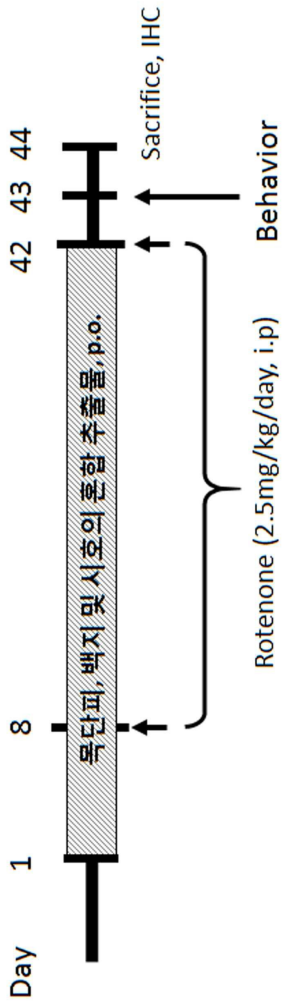
도면1



도면2


Day 1
Day 8
Day 14
Day 15
Day 16
Day 17
목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물, p.o.
6-OHDA (16μg/2μl)
: Stereotaxic surgery
Behavior
Sacrifice,
IHC

도면3


Day
1
8
42
43
44
목단피, 백지 및 시호의 혼합 추출물, p.o.
Rotenone (2.5mg/kg/day, i.p)
Behavior
Sacrifice, IHC

도면4



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Croup of Kyung Hee University

Dong-A Pharmaceurical Co., Ltd.

<120> Pharmaceutical composition containing combination extract of Moutan Root Bark, Angelica Dahurica Root and Bupleurum Root and fractions thereof for prevention and treatment of neurodegenerative disorder

<130> 2015P-08-046

<150> KR 10-2014-0124860

<151> 2014-09-19

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX III_F

<400> 1

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX III_R

<400> 2

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PARK7_F

<400> 3

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PARK7_R

<400> 4

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GRP78_F

<400> 5

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GRP78_R

<400> 6

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> XBP1p_F

<400> 7

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> XBP1p_R

<400> 8

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iNOS_F

<400> 9

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iNOS_R

<400> 10

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-6_F

<400> 11

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-6_R

<400> 12

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p65/RELA_F

<400> 13

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p65/RELA_R

<400> 14

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18s rRNA_F

<400> 15

caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18s rRNA_R

<400> 16

caatgatggc gcgatgtaac 20