



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0054381
(43) 공개일자 2018년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/84 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/84 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0152269

(22) 출원일자 2016년11월15일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

대한민국(농촌진흥청장)

전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동)

(72) 발명자

조익현

서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호 (반포동, 반포아파트)

최중희

경북 경주시 외동읍 신기앞길 59-2

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

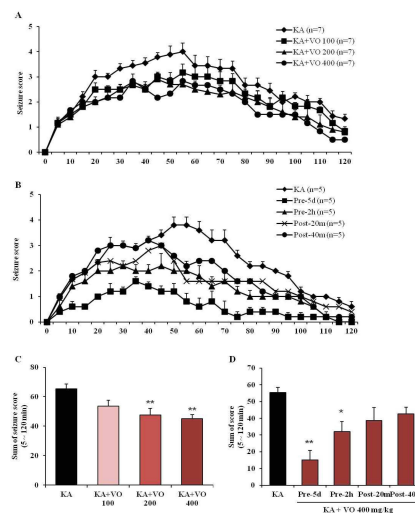
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 쥐오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 측두엽 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 쥐오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 측두엽 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 측두엽 뇌전증을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선할 수 있는 측두엽 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)

(72) 발명자

김영욱

서울특별시 관악구 난곡로 66, 101동 901호 (신림동, 대우신림2차푸르지오아파트)

박춘근

경기도 수원시 권선구 매실로 61, 202동 2007호 (호매실동, 삼익2차아파트)

이상원

대전광역시 유성구 노은서로210번길 32, 408동 902호 (지족동, 열매마을아파트4단지)

김연복

충청북도 충주시 예성로 401, 405동 1202호 (연수동, 연수주공4,5단지아파트)

이상현

경기도 평택시 평남로 671, 108동 502호 (비전동, 비전 경남아너스빌)

김학재

경기도 성남시 수정구 위례서일로1길 21-3, 401호 (창곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011582042016

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 국책기술개발사업

연구과제명 인삼과 쥐오줌풀의 스트레스성 우울증 개선효과 및 작용기전 구명

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

쥐오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는, 측두엽 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 쥐오줌풀은 물 또는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올을 추출용매로 하여 추출된 것인, 측두엽 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 쥐오줌풀 추출물은 에탄올 추출물인, 측두엽 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

쥐오줌풀 추출물을 포함하는, 측두엽 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 쥐오줌풀은 물 또는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올을 추출용매로 하여 추출된 것인, 측두엽 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 쥐오줌풀 추출물은 에탄올 추출물인, 측두엽 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 쥐오줌풀(*Valeriana fauriei Briquet*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 측두엽 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌전증(epilepsy, 간질)은 신경세포 중 일부가 짧은 시간에 과도한 전기를 발생시켜 반복적으로 발작이 발생하는 만성화된 질환군으로, 매우 흔한 신경계 질환이지만 신경생물학적, 정신적, 인지적, 사회적 변화를 수반하는 심각한 신경 질환이다.

[0003] 전 세계 인구의 약 0.5 % 내지 1 %가 뇌전증을 앓고 있다고 보고되고 있으며, 우리나라의 경우 약 30만 명 내지 40만 명의 뇌전증 환자가 있는 것으로 추정되며 매년 2만 명 정도의 새로운 뇌전증 환자가 발생한다고 보고되고 있다.

[0004] 그 중 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy)은 성인에서 가장 많이 볼 수 있는 뇌전증으로, 내측두엽(medial temporal lobe), 특히 해마 부위의 경화(hippocampal sclerosis), 내측두엽의 종양(cancer), 뇌졸중(stroke), 혈관기형(vascular malformations), 겔질형성이상(cortical dysplasia), 감염(infection) 등이 원인이 될 수 있다. 증상은 복합부분발작이 가장 흔하며, 명치조짐(epigastric aura), 자동증(automat) 등을 동반한다. 발작

후에는 대부분 혼돈이 발생하며 이차전신발작으로 진행되는 경우도 흔하다.

- [0005] 뇌전증 치료제로는 레벤티라세탐(levetiracetam), 카바마제핀(carbamazepine), 에토숙시미드(ethosuximide), 카바펜틴(cabapentin) 및 옥스카르바제핀(oxcarbazepine) 등이 있으나, 발진, 혈액질환, 골다공증, 저나트륨증, 두통, 행동변화 및 면역반응 등의 부작용이 알려져 있다. 이들 약물들 대부분은 원인적인 치료가 아니라 증상을 조절하는 역할을 하는 것이므로 지속적인 약물의 복용을 필요로 하며, 이와 같은 장기적인 약물의 복용은 막대한 경제적 부담 및 자살충동, 졸음 및 피로 등과 같은 심각한 약물 부작용을 야기할 수 있다.
- [0006] 그러나, 아직까지 이러한 뇌전증을 치료하기 위한 근본적인 치료 방법은 없으며, 측두엽 뇌전증을 본질적으로 치료하기 위한 치료제는 아직 개발되지 못하고 있는 실정이다.
- [0007] 따라서, 부작용이 비교적 적으면서도 측두엽 뇌전증을 장기적이고 효과적으로 개선, 예방 또는 치료할 수 있는 효과적인 치료제의 개발이 요구되고 있다.
- [0008] 이에 본 발명자들은 안전하면서도 효과적으로 측두엽 뇌전증을 예방 또는 치료할 수 있는 치료제를 개발하기 위하여 연구를 진행하던 중, 쥐오줌풀 추출물이 측두엽 뇌전증의 개선, 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 쥐오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 측두엽 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 목적은 쥐오줌풀 추출물을 포함하는 측두엽 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 이하, 본 명세서에 대하여 더욱 상세하게 설명한다.
- [0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 쥐오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 측두엽 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명에서 사용된 용어 '쥐오줌풀(*Valeriana fauriei* Briq)'은 길초근이라고도 하며, 마타리과(*Valerianaceae*) 발레리아나속(*Valeriana*)에 속하는 다년생 초본식물로서 주로 유럽의 북부지역과 아시아의 온대지역에 분포한다. 열매에 털이 있는 것을 광릉쥐오줌풀(var. *dasycarpa*), 잎이 갈라진 조각 가장자리에 톱니가 없는 것을 긴잎쥐오줌풀(var. *integra*)라고 한다.
- [0014] 본 발명에서 상기 쥐오줌풀은 산지에 제한 없이 사용할 수 있으며, 잎, 꽃, 뿌리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 뿌리를 포함하여 사용할 수 있다.
- [0015] 본 명세서에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0016] 본 명세서에서 상기 "예방"이란 상기 약학적 조성물의 투여로 측두엽 뇌전증을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 상기 "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여로 측두엽 뇌전증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0017] 본 명세서에서 추출물은 천연물로부터 그 안의 성분을 뽑아냄으로써 얻어진 물질을 의미하는 것으로, 뽑아내는 방법이나 성분의 종류와 무관하게 모든 형태를 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 쥐오줌풀 추출물은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라, 즉 통상적인 온도와 압력의 조건하에서, 통상적인 용매를 사용하여 제조될 수 있다.
- [0019] 추출용매로는 물, 유기용매 또는 이의 혼합용매가 이용될 수 있으며, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 헥산, 아세트산에틸, 디클로로메탄, 에테르, 클로로포름 및 아세톤으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것이 바람직하다. 상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 및 n-부탄올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것이 바람직하며, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올은 무수

또는 함수 알코올을 모두 포함할 수 있다.

- [0020] 본 발명의 추출 용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올 수용액일 수 있고, 상기 알코올 수용액은 바람직하게는 에탄올일 수 있다.
- [0021] 추출방법은 당 분야에 알려진 추출방법, 예컨대 냉침, 열수 추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 초임계 추출, 압착 추출 등의 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 쥐오줌풀 추출물은 건조된 쥐오줌풀의 뿌리를 추출용매로 에탄올을 이용하여 환류 냉각(Reflux 추출법) 방법을 통해 얻을 수 있다.
- [0023] 본 발명의 쥐오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 카인산(Kainic acid, KA) 유도성 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy) 동물 모델에서 발작억제 효과가 있음을 확인하였다(도 1).
- [0024] 또한, 본 발명의 쥐오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 카인산 유도성 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy) 동물 모델에서 해마(hippocampus) 신경세포사멸에 대한 보호 효과(도 2) 및 면역세포활성에 대한 억제 효과(도 3)가 있음을 확인하였다.
- [0025] 이에 더하여, 본 발명의 쥐오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 염증매개인자의 발현에 대해 억제 효과가 있음을 확인 하였다(도 4).
- [0026] 따라서, 본 발명의 쥐오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 측두엽 뇌전증의 예방 또는 치료에 우수한 효과를 나타낼 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물은 약효를 증가시키지는 않으나 약학적 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 성분을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 예컨대, 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 있으나, 이를 한정하지 않는다. 추가로, 상기 약학적 조성물은 단독 사용하거나 기존에 사용된 당뇨병성 신경병증성 통증에 대한 예방 또는 치료 활성을 가지는 물질을 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하고 경구 또는 비경구용의 인체 또는 수의용으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물을 제제화하는 경우 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다.
- [0029] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose) 및 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이트, 탈크 같은 윤활제를 사용할 수 있다.
- [0030] 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물 및 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0031] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.
- [0033] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 개체에 투여하여 측두엽 뇌전증을 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어, "개체"는 측두엽 뇌전증으로 인해 유발된 발작을 가지고 있으며, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 투여하여 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간을 포함한 말, 양, 돼지, 염소, 개 등의 포유동물을 의미하나, 바람직하게는 인간을 의미한다.

- [0034] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물이 표적 세포로 이동할 수 있도록 하는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 체중, 성별, 연령, 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 단일 또는 다중 투여될 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여량은 약제학적으로 유효한 양이어야 한다. 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 제제화 방법, 환자의 상태 및 체중, 환자의 성별, 연령, 질환의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간, 배설 속도, 반응 감응성 등과 같은 요인들에 따라 당업자에 의해 다양하게 선택될 수 있다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 처리의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 쥐오줌풀을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 투여량 또는 복용량은 환자의 나이, 신체적 조건, 몸무게 등에 의해 다양화될 수 있지만, 일반적으로 0.01 내지 500 mg/kg (몸무게)/1일 범위 내에서 투여하는 것이 바람직하다. 그리고, 1일 유효투입량 범위 내에서 하루에 한번 또는 하루에 여러 번 나누어 투입할 수 있다.
- [0038] 상기 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 또한 쥐오줌풀 추출물을 포함하는 측두엽 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0039] 상기 측두엽 뇌전증의 예방 또는 개선용 건강기능식품은 본 발명의 쥐오줌풀 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 조합하여 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0040] 본 명세서에서 상기 기능 식품이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 본 명세서의 상기 기능이란 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적인 작용으로 보건 용도에 유용한 효과를 의미할 수 있다.
- [0041] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 쥐오줌풀 추출물을 포함하는 조성물에 첨가할 수 있는 식품의 예로는 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 쥐오줌풀 추출물을 포함하는 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명에 따른 쥐오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 발작, 해마신경세포사멸, 미세아교세포와 별아교세포의 활성화 및 대표적 염증매개인자인 COX-2와 iNOS의 발현을 현저하게 억제하는 효과가 뛰어나므로, 측두엽 뇌전증의 예방 또는 치료에 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 카인산(Kainic acid, KA) 유도성 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy) 동물 모델에서 발작 행동에 대한 쥐오줌풀 추출물의 억제 효과를 나타낸 것이다. 도 1A는 KA(55 mg/kg, i.p.) 투여 2시간 전 쥐오줌풀 추출물(100, 200 및 400 mg/kg)을 경구 투여하여 발작 정도를 측정한 결과이고, 도 1B는 KA(55 mg/kg, i.p.) 투여 5일 전 매일 1회(pre-5d), 동물모델 유도 2시간 전(pre-2h), 동물모델 유도 20분 후(post-20min) 및 동물모델 유도 40분 후(post-40min) 쥐오줌풀 추출물(400 mg/kg)을 경구 투여하여 발작 정도를 측정한 결과이고, 도 1C는 도 1A의 그래프에서 5 ~ 120분 사이의 발작 등급의 합을 나타낸 것이고, 도 1D는 도 1B의 그래프에서 5 ~ 120분

사이의 발작 등급의 합을 나타낸 것이다. (ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군)

도 2는 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 해마신경세포사멸에 대한 쥐오줌풀 추출물의 보호 효과를 나타낸 것이다. 도 2A-N은 KA (0.2 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$)의 뇌내 주입 5일 전 매일 1회씩(Pre-5d), 동물모델 유도 2시간 전(Pre-2h), 동물모델 유도 12시간 후(Post-12h), 동물모델 유도 36시간 후(Post-36h) 및 동물모델 유도 60시간 후(Post-60h) 쥐오줌풀 추출물(400 mg/kg)을 경구 투여하고, KA 투여 후 72시간 후 니슬염색 결과를 나타낸 것이다 (Bar = 100 μm). 도 2O는 CA1영역의 신경세포사멸의 정도를 나타낸 것이고, 도 2P는 CA3영역의 신경세포사멸의 정도를 나타낸 것이다. 도 2Q는 KA (0.2 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$) 주입 5일 전 매일 1회씩(Pre-5d) 투여 및 KA 투여 72시간 후 해마 조직의 Caspase-3 및 GAPDH 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다. (ANOVA test; ##P<0.01 vs Sham군; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군)

도 3은 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 면역세포활성에 대한 쥐오줌풀 추출물의 억제 효과를 나타낸 것이다. 도 3A-F는 KA (0.2 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$)의 뇌내 주입 5일 전 매일 1회(Pre-5d), 동물모델 유도 2시간 전(Pre-2h), 동물모델 유도 12시간 후(Post-12h) 동물모델 유도 36시간 후(Post-36h) 및 동물모델 유도 60시간 후(Post-60h) 쥐오줌풀 추출물(400 mg/kg)을 경구 투여하고, KA 투여 72시간 후 해마 조직의 Iba-1(calcium binding adaptor molecule 1)과 GFAP(glial fibrillary acidic protein)에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 결과를 나타낸 것이다(Bar = 100 μm). 도 3G 및 3H는 KA (0.2 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$)의 뇌내 주입 5일 전 매일 1회씩(Pre-5d) 투여하고, KA 투여 72시간 후 해마 조직의 CD11b 및 GFAP 단백질의 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석을 시행한 결과를 나타낸 것이다. (ANOVA test; ##P<0.01 vs Sham군; **P<0.01 vs KA군)

도 4는 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 염증매개인자의 발현에 대한 쥐오줌풀 추출물의 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다. 도 4A 및 4B는 KA (0.2 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$)의 뇌내 주입 5일 전 매일 1회(pre-5d), KA 투여 72시간 후 해마 조직의 COX-2 및 iNOS 단백질의 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다. (ANOVA test; #P<0.05 vs Sham군; *P<0.05 vs KA군)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 기술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0045] 실시예

[0046] 모든 결과는 SPSS 21 버전을 이용하여 분석하였으며, 실험결과는 mean $\pm$ standard deviation (평균 $\pm$ 표준편차) 값으로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 ANOVA (일원배치 분산분석)를 이용하여 분석 후 Tukey post hoc로 사후분석 하였고, 유의확률(p-value) 값은 p<0.05 및 p<0.01 미만인 경우에만 인정하였다.

[0047] 실시예 1: 쥐오줌풀 추출물의 제조

[0048] 충청북도 음성군 인삼특작과학원으로부터 얻은 건조된 쥐오줌풀의 뿌리 2 kg을 잘게 분쇄한 후, 순수 에탄올을 이용하여 환류냉각(Reflux 추출법) 방법을 이용하여 총 330.2 g의 쥐오줌풀 추출물(수득율 16.5 %)(이하, "VO"라 칭할 수 있다)을 얻었다.

[0049] 실시예 2: 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델의 제작

[0050] 실험 동물로서 7-8주령의 체중 22 g 내지 25 g 정도의 C57BL/6 계통의 수컷 생쥐(나라바이오텍, 서울, 한국)를 사육실에서 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 각 군별 식이 및 물은 자유로이 섭취케 하였다. 사육실 온도는 23 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$, 습도는 55~60 % 정도로 유지하고, 12시간 사이클(06:00 ~ 18:00)로 점등과 소등을 하였다. 모든 실험은 경희대학교 실험동물윤리 규정에 따라 수행하였다.

[0051] 생쥐에서의 측두엽 뇌전증의 유도는 확인하고자 하는 효과(지표)에 따라 흥분성신경세포 사멸을 유도하는 카인산(Kainic acid, KA)의 복강투여 또는 뇌내 직접 주입에 의하여 실시하였다.

[0052] (1) 경련/발작성 측두엽 뇌전증 동물 모델의 제작

[0053] 경련 및 발작 억제 효능을 측정하기 위한 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델을 제작하기 위하여, KA를 55

mg/kg의 농도로 생쥐에 복강투여(i.p.)하여 측두엽 뇌전증 동물 모델을 제작하였다.

[0054] (2) 신경세포사멸성 측두엽 뇌전증 동물 모델의 제작

[0055] 또한, 해마의 신경세포사멸에 대한 보호 효능을 측정하기 위한 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델을 제작하기 위하여, KA를 0.2 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$ 의 농도로 가쪽뇌실(lateral ventricle) 내로 정위적으로 직접 주입(intracerebroventricular(i.c.v.) injection; AP : -2.9, ML : 2.0, DV : -3.8)하여 측두엽 뇌전증 동물모델을 제작하였다.

[0056] 동물들을 관찰하여 하기와 같은 평가척도(rating scale)에 따라 분류하였다:

[0057] Grade 0 : 정상;

[0058] Grade 1 : 부동

[0059] Grade 2 : 앞다리와 꼬리의 긴장, 뻣뻣한 자세

[0060] Grade 3 : 머리를 끄덕거림, 간대성 경련, 계속적인 회전

[0061] Grade 4 : 전신성 경련, 타액 분비, 일어섰다 넘어짐을 반복

[0062] Grade 5 : 계속적인 전신성 경련

[0063] Grade 6 : 죽음

[0064] 상기 평가척도에 따라 적어도 4에 도달한 동물들만 실험 대상으로 간주하였으며, 동물은 각 그룹 당 5 ~ 7마리씩 나누었다.

[0065] **실시예 3: 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 쥐오줌풀 추출물의 발작 행동에 대한 억제 효과 확인**

[0066] 쥐오줌풀 추출물의 발작 억제 효과를 검증하고 가장 효과적인 농도를 선별하기 위하여, 상기 실시예 2-(1)에 기재된 방법에 따라 측두엽 뇌전증 동물모델을 제작하고 하기와 같이 4개의 그룹으로 나누어 실험을 수행하였다:

[0067] - KA군; KA 55 mg/kg, i.p. + saline, p.o.

[0068] - KA+VO100군; KA 55 mg/kg, i.p. + VO 100 mg/kg, p.o.

[0069] - KA+VO200군; KA 55 mg/kg, i.p. + VO 200 mg/kg, p.o.

[0070] - KA+VO400군; KA 55 mg/kg, i.p. + VO 400 mg/kg, p.o.

[0071] 각 쥐오줌풀 추출물(100, 200 및 400 mg/kg)은 비율별로 0.9 % saline에 녹여, KA를 복강으로 주사하기 2시간 전에 구강으로 투여하였으며, KA 투여 후 2시간 동안 실시예 2에 기재된 평가척도에 따라 발작의 정도를 측정하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0072] 도 1에 나타난 바와 같이, 쥐오줌풀 추출물을 투여한 군에서는 농도 의존적으로 발작의 정도가 현저하게 감소하였다(도 1A, C).

[0073] 쥐오줌풀 추출물의 가장 효과적인 농도는 400 mg/kg였다.

[0074] 쥐오줌풀 추출물의 투여시간에 따른 발작 억제 효과를 검사하기 위하여, 하기와 같이 5개의 그룹으로 나누어 실험을 수행하였다:

[0075] - KA군; KA 55 mg/kg, i.p. + saline, p.o.

[0076] - Pre-5d군; KA 55 mg/kg, i.p. + VO 400 mg/kg, p.o.; KA를 투여하기 5일 전부터 매일 1회 투여

[0077] - Pre-2h군; KA 55 mg/kg, i.p. + VO 400 mg/kg, p.o.; KA를 투여하기 2시간 전에 투여

[0078] - Post-20m군; KA 55 mg/kg, i.p. + VO 400 mg/kg, p.o.; KA를 투여한 뒤 20분 후에 투여

[0079] - Post-40m군; KA 55 mg/kg, i.p. + VO 400 mg/kg, p.o.; KA를 투여한 뒤 40분 후에 투여

[0080] 상기와 같이 동물모델 유도 5일 전부터 매일 1회(Pre-5d), 동물모델 유도하기 2시간 전(Pre-2h), 동물모델 유도 20분 후(Post-20min) 및 동물모델 유도한 후 40분 후(Post-40min) 추출물(400 mg/kg)을 구강으로 투여한 결과, Pre-5d와 Pre-2h군에서 현저한 발작 억제 효과를 나타내었다(도 1B, D).

- [0081] 상기 결과로부터, KA에 의한 측두엽 뇌전증에 쥐오줌풀 추출물이 발작 행동을 억제하는데 효과가 있음을 확인하였다.
- [0082] **실시예 4: 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 쥐오줌풀 추출물의 신경보호 효과 확인**
- [0083] 쥐오줌풀 추출물의 해마신경세포사멸에 대한 신경 보호 효과가 있는지를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2-(2)에 기재된 방법에 따라 측두엽 뇌전증 동물모델을 제작하고 하기와 같이 7개의 그룹으로 나누어 실험을 수행하였다:
- [0084] - Sham군; saline 4 μ l, i.c.v. + saline, p.o.
- [0085] - KA군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + saline, p.o.
- [0086] - Pre-5d군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + VO 400 mg/kg, p.o.; KA를 투여하기 5일 전부터 매일 1회씩 경구 투여
- [0087] - Pre-2h군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + VO 400 mg/kg, p.o.; KA를 투여하기 2시간 전에 경구 투여
- [0088] - Post-12h군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + VO 400 mg/kg, p.o.; KA를 투여한 뒤 12시간 후부터 경구 투여
- [0089] - Post-36h군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + VO 400 mg/kg, p.o.; KA를 투여한 뒤 36시간 후부터 경구 투여
- [0090] - Post-60h군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + VO 400 mg/kg, p.o.; KA를 투여한 뒤 60시간 후부터 경구 투여
- [0091] 상기와 같이 KA를 뇌 내로 직접 주입하기 5일 전부터 매일 1회씩(Pre-5d), 동물모델을 유도하기 2시간 전에(Pre-2h), 동물모델을 유도한 후 12시간 후에(Post-12h), 동물모델을 유도한 후 36시간 후에(Post-36h) 및 동물모델을 유도한 후 60시간 후에(Post-60h) 추출물(400 mg/kg)을 구강으로 투여하였다.
- [0092] 생쥐를 마취하고, 4 % 파라포름알데하이드(PFA, paraformaldehyde)를 심장으로 관류하여 고정하고 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 4 % PFA에 담가 4 °C에서 하루 정도 더 고정시킨 다음 30 % 수크로스(sucrose)로 바꾸어 4 °C에서 3일 이상 기간 동안 보관하여 동결손상을 방지하였다. 동결 절편기를 이용하여 해마를 30 μ m 두께로 잘라 PBS(phosphate buffered saline)에 보관하였다.
- [0093] **(1) 니슬염색 (cresyl violet stain)**
- [0094] 쥐오줌풀 추출물의 해마신경세포사멸에 대한 보호효과가 있는지를 확인하기 위하여, 30 μ m 두께로 자른 해마가 포함된 뇌를 코팅된 슬라이드 위에 올려 말린 뒤, 0.5 % cresyl violet (pH 3.9) 용액에 10-15분 담궈 니슬염색(Nissl stain)을 시행하였다. 70 % 에탄올 및 80 % 에탄올에 담궈 염색성을 조절하고 95 %, 100 % 에탄올에서 탈수가 되면, 자일렌(xylene)에 담궈 뒤 커버글라스를 덮었다. 해마의 CA1과 CA3 영역에서 신경세포가 손상되거나 사멸된 정도에 따라 0 - 6의 등급을 나누어 점수화하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0095] 도 2에 나타난 바와 같이, pre-5d와 pre-2h군의 해마의 CA1 및 CA3 영역에서 신경세포사멸에 대한 현저한 억제 효과를 나타내었다.
- [0096] **(2) 웨스턴 블롯(Western blot)**
- [0097] 생쥐를 마취하고 뇌에서 해마를 채취한 후, 단백질을 분해효소가 첨가된 lysis buffer(10 mM TrisCl, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.25 M Sucrose)를 사용하여 4 °C에서 homogenizer를 이용하여 균질화하였다. 용해된 단백질을 원심 분리(4 °C, 13,000 rpm, 15분간)하여 상층액을 취하였다.
- [0098] 분리된 단백질은 소혈청알부민(BSA, bovine serum albumin, sigma, 미국)을 사용한 Bradford (Bio-rad, 미국) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤, 단백질 25 μ g은 10 % SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane, Gendepot, 영국)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5 % 탈지유(skimmed milk, BD, 미국)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBST(mixture of tris-buffered saline and Tween 20)로 씻은 후 1차 항체 rabbit anti-(cleaved) caspase-3 (1:1,000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, 미국), rat anti-CD11b (1:500; Serotec, Oxford, 영국), mouse anti-GFAP (1:2,000; DACO, 미국), mouse anti-cyclooxygenase-2 (COX-2; 1:1,000; BD Biosciences, San Jose, CA, 미국) 및 rabbit anti-inducible nitric oxide (iNOS; 1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)를 3% 탈지유에 1:1,000으로 희석시켜 4에서 하루 동안 반응시킨 후 TBST로 10분씩 3회 씻고 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBST에 씻은 뒤 ECL system (Santacruz, 미국)으로 밴드를 확인하였다. 단백질의 확인 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+(Bio-

Rad)를 이용하였다. 그 결과 또한 도 2에 나타내었다.

[0099] 상기 니슬염색 결과와 마찬가지로 웨스턴 블롯 분석결과, caspase-3 단백질의 발현은 KA군에서 증가하였으나, pre-5h군에서 현저하게 감소하였다(도 2Q).

[0100] 상기 결과로부터, KA에 의한 측두엽 뇌전증에 쥐오줌풀 추출물이 해마신경세포사멸에 대한 보호 효과가 있음을 확인하였다.

[0101] **실시예 5: 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 쥐오줌풀 추출물의 면역세포활성에 대한 억제 효과 확인**

[0102] 쥐오줌풀 추출물의 면역세포활성에 대한 효과가 있는지를 확인하기 위하여, 동결절편을 가지고 Iba-1과 GFAP에 대한 면역염색을 시행하였다.

[0103] **(1) 면역조직염색(Immunohistochemistry)**

[0104] 조직절편을 내재성 페록시다아제(endogenous peroxidase)를 차단하기 위해 3 % H₂O₂에 30분간 처리하였다. PBS로 10분씩 3회 수세하고 면역염색 중 나타날 수 있는 비특이적 반응을 줄이기 위해 차단 용액(blocking solution) (5 % normal goat serum, 2 % bovine serum albumin, 2 % fetal bovine serum 및 0.1 % triton X-100 in PBS)에 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 각 조직은 1차 항체[rabbit anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1); 1 : 2,000; WAKO, 일본 or rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP); 1 : 2,000; DACO, 미국]]를 18시간 이상 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 PBS로 10분간 3회 세척하고, 계속하여 goat anti-rabbit IgG (Vector, CA, 미국) 등의 이차항체 및 ABC complex (Vector, CA, 미국)에 상온에서 각 1시간씩 반응시켰다. 항원항체 반응이 끝난 조직은 DAB(3,3'-Diaminobenzidine)가 함유된 Tris buffer (pH 7.4)용액에서 3~5분간 발색을 확인한 후 슬라이드에 뇌 조직을 올려 말린다. 탈수와 투명화 과정을 거쳐 mounting 용액을 떨어뜨려 커버글라스를 덮어 봉입한 뒤 현미경으로 각각의 면역반응성을 관찰하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0105] 도 3에 나타낸 바와 같이, KA군의 해마에서 Iba-1(+) 미세아교세포와 GFAP(+) 별아교세포의 활성화도는 증가하였으나, Pre-5d군에서는 현저히 감소하였다(도 3A-D, H-K). 이러한 결과와 일치하여 웨스턴블롯 분석에 의한 CD11b와 GFAP에 대한 단백질의 발현도 현저하게 억제되었다(도 30, P). 상기 결과로부터, KA에 의한 측두엽 뇌전증에 쥐오줌풀 추출물이 면역세포활성에 대한 억제 효과가 있음을 확인하였다.

[0106] **실시예 6: 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 쥐오줌풀 추출물의 염증매개인자의 발현에 대한 억제 효과 확인**

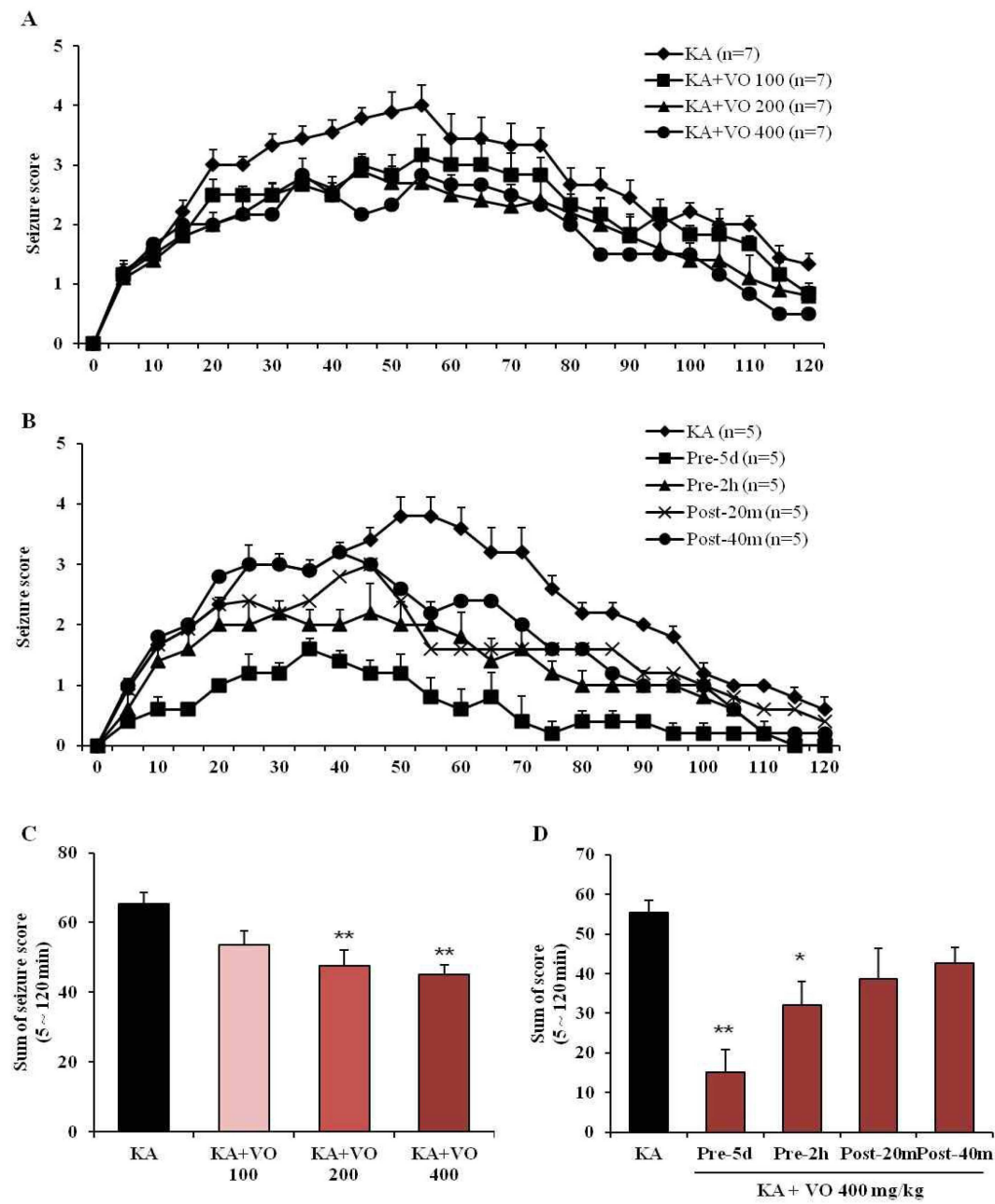
[0107] 쥐오줌풀 추출물의 염증매개인자의 발현에 대한 조절효과가 있는지를 확인하기 위하여, KA 투여 후 72 시간의 해마조직을 가지고 COX-2와 iNOS의 단백질 발현정도를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0108] 도 4에 나타낸 바와 같이, KA군의 해마에서 COX-2와 iNOS의 단백질 발현의 정도는 증가하였으나, Pre-5d군에서는 현저히 감소하였다(도 4A, B).

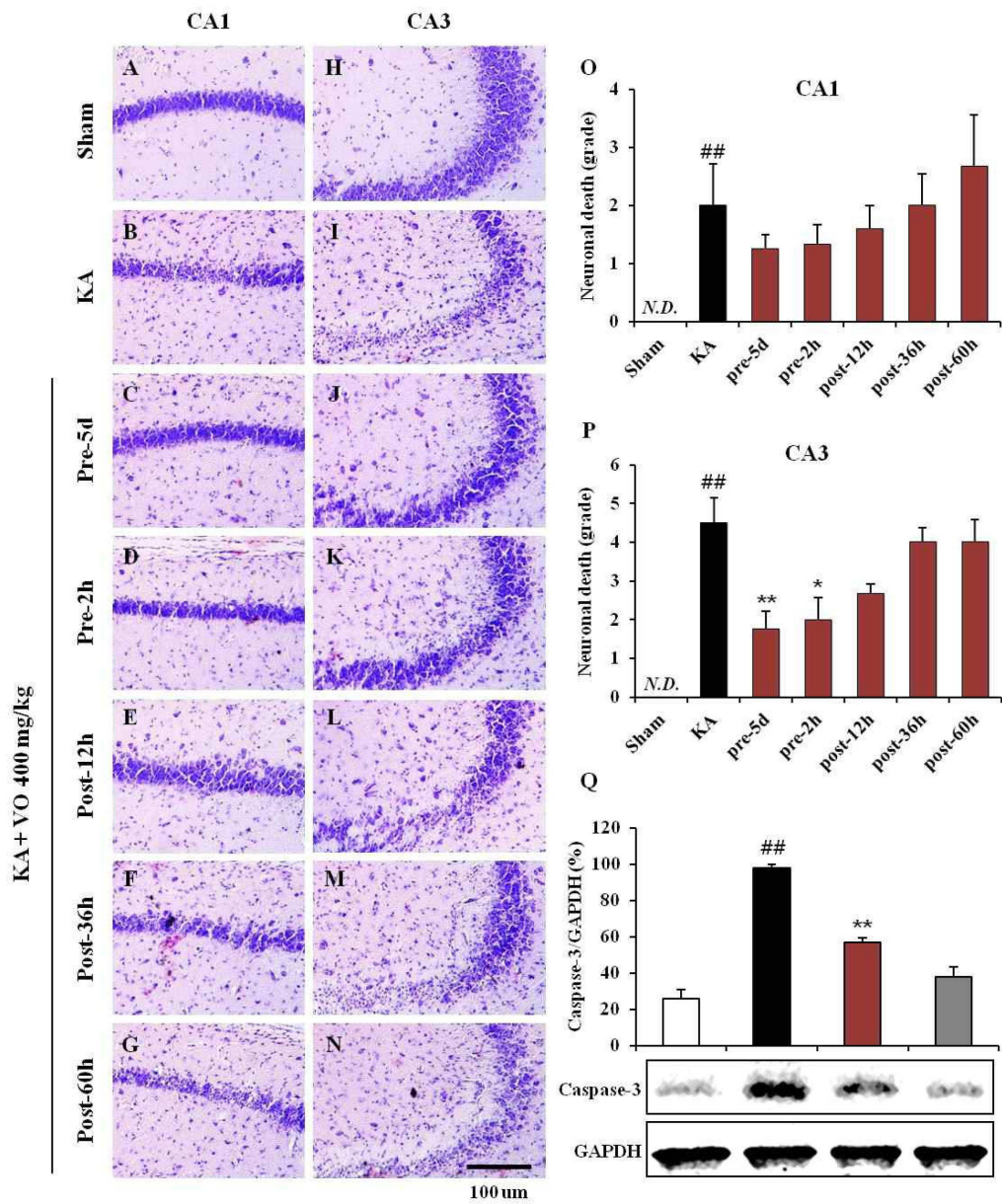
[0109] 상기 결과로부터, KA에 의한 측두엽 뇌전증에 쥐오줌풀 추출물이 염증매개인자에 대한 억제 효과가 있음을 확인하였다.

도면

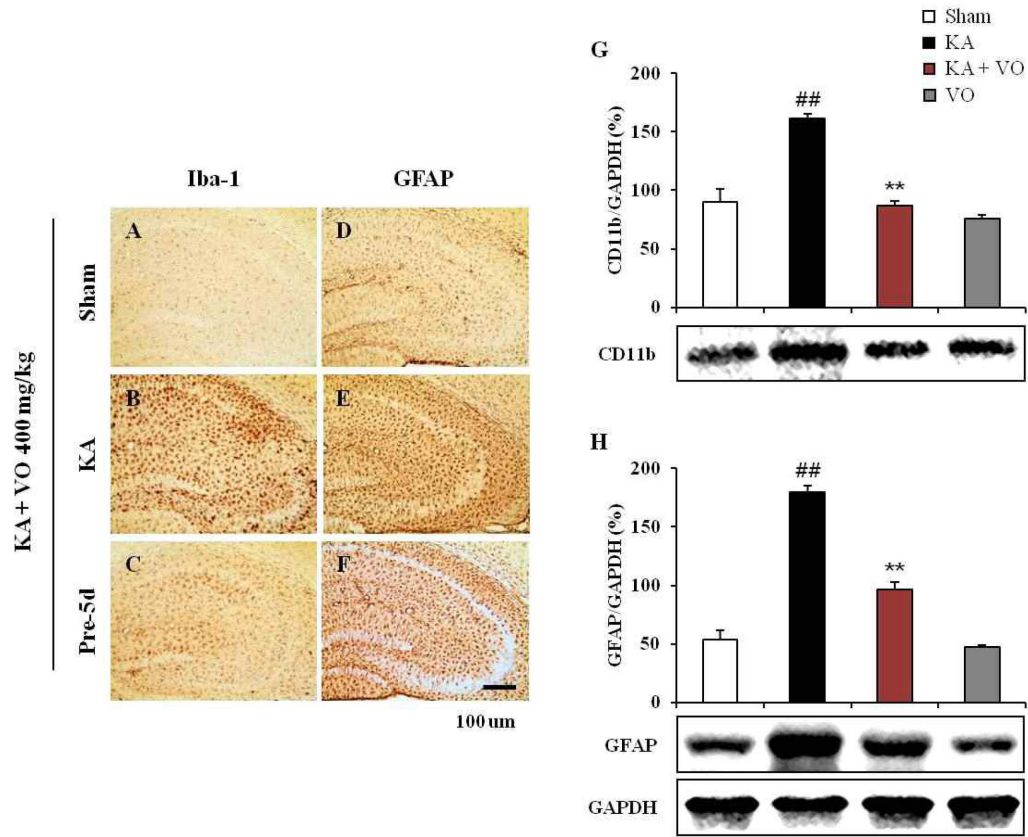
도면1



도면2



도면3



도면4

