



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0125706
(43) 공개일자 2011년11월22일

(51) Int. Cl.

A61K 36/71 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0045205

(22) 출원일자 2010년05월14일

심사청구일자 2010년05월14일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

임사비나

서울특별시 강남구 삼성2동 17 롯데캐슬프리미어 아파트 104동 803호

이제현

경상북도 경주시 성건동 709-6

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

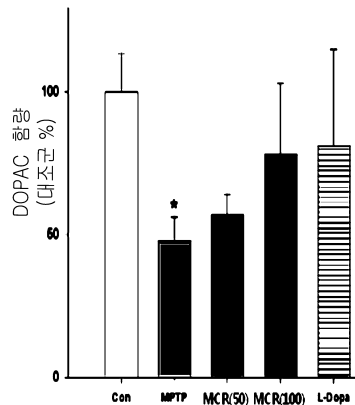
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 목단피 추출물을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 목단피 추출물을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출된 목단피 추출물이 MPTP로 유도된 도파민 신경세포 손상을 억제함으로써, 목단피 추출물을 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물 또는 건강식품에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

조성천

경기도 성남시 분당구 금곡동 210 코오롱 트리폴리스 B-1104호

김영홍

서울특별시 강남구 삼성2동 17 롯데캐슬프리미어아파트 104동 803호

최영곤

서울특별시 동대문구 회경1동 187-31

홍연미

서울특별시 노원구 공릉동 379-29

여수정

인천광역시 남동구 만수5동 908-4

최지훈

서울특별시 동대문구 이문동 292-255 아이비리그오피스텔 1003호

특허청구의 범위

청구항 1

목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 추출을 위한 용매는 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 저급 알코올은 물 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 목단피 추출물을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson's disease)은 안정떨림, 경직, 운동완만 및 자세 불안정이 특징적으로 나타나는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환으로 뇌의 흑질(Substantia Nigra pars compacta: SNc)에 분포하는 도파민의 신경세포가 점차 소실되는 신경병리학적 특징을 나타낸다(Calne *et al.*, 1983, Heikkila 1984). 파킨슨병 환자는 대략 60세 이상에서 인구의 약 1% 정도로 추정된다.

[0003] 파킨슨병의 원인은 정확히 밝혀져 있지 않지만 유전적 인자와 환경적 인자가 서로 상호작용하여 일어난다는 '다인성 가설'이 가장 보편적으로 받아들여지고 있다. 대부분의 파킨슨병 환자들은 가족력 없이 발병하지만 약 10% 정도가 가족성 파킨슨병으로 나타나고 있다.

[0004] 파킨슨병의 감소된 도파민의 양을 증가시키기 위한 대증요법제로서 L-Dopa가 현재 일반적으로 사용되고 있다. L-Dopa는 사용 후, 파킨슨병의 진행을 더디게 하고 임상증상의 경감을 보이지만, 장기간 복용 시 불수의적인 운동, 구토 등의 부작용이 따른다(Clarke and Deane, 2001). 그 외에도, 파킨슨병을 치료하기 위하여 사용되고 있는 치료제로는 FDA 허가된 도파민 작용제(Dopamine Agonists), 카테콜-O-메틸트랜스퍼레이스(catechol-O-methyltransferase inhibitor, COMT inhibitor), 모노아민 산화효소 B(monoamine oxidase B, MAO-B inhibitors), 항-콜린작용제(Anti-cholinergics) 등이 있다.

[0005]

[0006]

파킨슨병 연구를 위하여 사용되는 동물모델로는 6-하이드록시도파민(6-hydroxydopamine, 6-OHDA), 로테논(rotenon), 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)을 이용한 동물모델이 있다. 그 중, MPTP는 1982년 마약 중독자들에 의해 인간에게서 파킨슨병을 유발시키는 것으로 처음 알려졌는데 이는 사람뿐만 아니라 영장류와 마우스에서도 임상적으로 유사한 임상증세를 나타내어 파킨슨병의 병태 생리학적 변화를 연구하는데 적절한 실험동물모델로 평가되고 있다. MPTP에 의한 도파민 신경 세포의 손상 기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 못하나 최근에는 MPTP 노출에 의해 대뇌에서 염증 반응(inflammation)이 증가하고, 이러한 염증반응은 파킨슨병의 병리학적 연구에 중요한 과정이라고 보고되어 있다. MPTP는 마우스와 원숭이에서 흑선조체(nigrostriatal pathway)의 급성 퇴화(acute degeneration)를 유발하므로 유용한 파킨슨 모델로 사용되어왔다. 또한, MPTP에 의한 동물 실험 모델은 파킨슨병의 급성 염증 단계로서 미토콘드리아의 기능 손상과 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인한 세포 사멸에 대한 치료기술이나 약물의 신경보호 효과 유무를 연구하기에 적합하다고 알려져 있다.

[0007]

한의학에서 실시된 파킨슨병에 대한 치료는 1970년대 초반 Dr. Li가 침치료(acupuncture)와 천연물약제(Chinese herbal drugs) 그리고 뜸치료(moxibustion)를 적용하여 실시하였으며, 1995년에는 다른 약제와 병용 치료하여 치료효과에 대한 유효성을 문헌상으로 발표하였다(Li, 1995).

[0008]

목단피(牡丹皮, Moutan Radicis Cortex)는 오래전부터 사용한 중요한 한약재로서 미나리아재비과에 속하는 낙엽소관목이며, '모란 뿌리의 껍질'을 이르는 말로, 주성분으로는 페오노사이드(paeonoside; paeonol glucoside), 페오노라이드(paeonolide; paeonol-rhamnogluconide) 및 페오놀(paeonol)이며, 페오노사이드는 저장 중에 분해되어 당과 페오놀을 생성한다. 페오놀에는 항균작용이 있으며, 시험관 내에서 1,500 ~ 2,000배 희석된 대장균, 포도상구균, 연쇄상구균, 고초균 등의 증식을 억제하는 작용이 있음이 밝혀졌다. 또한, 페오니플로린(paeoniflorin), 옥시페오니플로린(oxypaeoniflorin), 벤조일페오니플로린(benzoylpaeoniflorin), 페오노라이드 탄닌(paeonolide tannin), 프로시아니딘 B1(procyanidin B1), 벤조일옥시페오니플로린(benzoyloxypaeoniflorin), 페오닌(paeonin), 아스트라갈린(astragaloside), 페라곤닌(pelargonin) 등의 성분이 함유되어 있다. 이러한 성분은 근피 뿐만 아니라 목심부에도 존재함이 조직 화학적으로 확인되었다. 페오니플로린은 혈소판 응집 억제 작용을 하고 피브리노겐을 감소시킨다. 벤조일페오니플로린, 벤조일옥시페오니플로린 등은 비만 세포에서의 히스타민 유리 억제작용이 있고, 페오노라이드 탄닌은 항바이러스 작용이 있다. 항염증 작용은 모노테르펜 글리코사이드(monoterpene glycosides) 성분이 관여하는 것으로 추측되고 있다. 목단피는 성질이 차서 한방에서 소염성 구어혈약으로서 이용되며, 그 약효는 하복부 장기의 혈관계의 염증, 울혈에 의한 동통, 발열, 화농, 출혈 등에 이용되며, 특히 부인과 영역에서 월경불순, 자궁 및 부속기의 염증, 울혈, 건인통에 대해서 소염, 진통, 진경의 효과가 있으며, 치질, 충수염에도 응용되고 있다.

[0009]

지금까지, 파킨슨병의 대증요법제로 사용되고 있는 도파민 전구체인 L-Dopa는 도파민 신경의 손실을 막지는 못하며, 장기적인 사용으로 인한 부작용으로, 말기 파킨슨병의 대증요법제로서 그 효용에 한계가 있다. 이러한 부작용으로 인하여 L-Dopa의 대체 치료제인 프라미펙솔(Pramipexole)도 한동안 사용되었으나, 장기간의 사용 시에는 L-Dopa로 다시 치료를 해야한다는 연구보고를 통해, 아직 L-Dopa에 대한 확실한 대체제는 나오지 않은 실정이다. 최근 미국립 신경질환 및 뇌졸중 연구소(The National Institute of Neurological Disorders and Stroke, U.S.A : NINDS) 주도하에 신경보호 가능성이 큰 12가지의 후보물질을 선정하여 연구가 진행되고 있으나 여기서도 아직 뚜렷한 결과물은 없는 상태이다.

[0010]

이에, 본 발명자들은 MPTP에 의해 유발된 파킨슨병 동물모델을 이용하여, 목단피 추출물의 도파민 신경세포 보호 효과를 측정한 결과, 도파민의 생성에 주요한 역할을 하는 타이로신 하이드록실레이즈(TH), 도파민, 도파민 대사물질인 DOPAC의 함량이 목단피 추출물을 투여한 군에서 대조군에 비해 감소가 억제됨을 관찰하였으며, 파킨슨병 발병을 촉진한다고 알려진 iNOS 및 cox-2의 발현량이 목단피 추출물을 투여한 군에서 MPTP 투여군보다 감소되는 효과를 통해, 상기 목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물이 파킨슨병 예방 및 치료에 사용될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 목단피 추출물을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] 아울러, 본 발명은 목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 목단피 추출물은 MPTP로 유도된 파킨슨병 동물모델에서 TH, 도파민 및 DOPAC의 감소를 억제하며, 파킨슨병의 진행을 촉진하는 iNOS 및 cox-2의 발현을 억제함으로써, 파킨슨병에서 손상된 도파민 신경세포의 보호 효과를 보이므로, 목단피 추출물은 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물 및 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 목단피 추출물 및 MPTP 추출물의 투여기간을 나타낸 그림이다:

MCR: 목단피(*Moutan Cortex Radicis*) 추출물;

MPTP: 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine); 및

Levodopa: L-다이하이드록시페닐알라닌(L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA).

도 2는 선조체 내 타이로신 하이드록실레이즈(Tyrosine hydroxylase)의 면역 반응 변화를 관찰한 그림이다:

A: 대조군으로 식염수가 투여군;

B: MPTP 투여군;

C: 50 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

D: 100 mg/kg 목단피 추출물 투여군; 및

E: 15 mg/kg L-다이하이드록시페닐알라닌 투여군.

도 3은 MPTP로 유도한 파킨슨 동물모델에서 목단피 추출물의 흑질내 도파민 신경세포의 보호 효과를 측정하기 위한 그림이다:

도 3의 1은 MPTP로 유도한 파킨슨 동물모델에서 목단피 추출물의 MPTP로 유도된 흑질내 도파민 신경세포의 보호 효과를 면역염색법으로 관찰한 그림이다;

A: 대조군으로 식염수가 투여군;

B: MPTP 투여군;

C: 50 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

D: 100 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

E: 15 mg/kg L-다이하이드록시페닐알라닌 투여군;

도 3의 2는 MPTP로 유도한 파킨슨 동물모델에서 면역염색법으로 관찰한 목단피 추출물의 흑질내 도파민 신경세

포의 보호 효과를 그래프로 나타낸 그림이다;

con: 대조군(식염수 투여군);

MPTP: 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘 투여군;

MCR(50): 50 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

MCR(100): 100 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

***: 대조군에 비하여 $p < 0.001$; 및

##: MPTP군에 비하여 $p < 0.001$.

도 4는 MPTP로 유도한 파킨슨 동물모델에서 목단피 추출물의 선조체 내 도파민 함량의 변화를 측정하기 위한 그림이다:

con: 대조군(식염수 투여군);

MPTP: 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘 투여군;

MCR(50): 50 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

MCR(100): 100 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

L-Dopa: 15 mg/kg L-다이하이드록시페닐알라닌 투여군; 및

***: 대조군에 비하여 $p < 0.001$.

도 5는 MPTP로 유도한 파킨슨 동물모델에서 목단피 추출물의 선조체 내 도파민 대사산물인 DOPAC 함량의 변화를 측정하기 위한 그림이다:

con: 대조군(식염수 투여군);

MPTP: 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘 투여군;

MCR(50): 50 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

MCR(100): 100 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

L-Dopa: 15 mg/kg L-다이하이드록시페닐알라닌; 및

*: 대조군에 비하여 $p < 0.05$.

도 6은 MPTP로 유도한 파킨슨 동물모델에서 목단피 추출물의 도파민 신경세포의 손상 정도를 iNOS 발현을 통해서 확인한 그림이다:

도 6의 1은 목단피 추출물의 MPTP로 유도된 도파민 신경세포의 손상 정도를 측정하기 위한 지표로 iNOS 발현량을 웨스턴 블랏으로 관찰한 그림이다;

도 6의 2는 목단피 추출물의 MPTP로 유도된 도파민 신경세포의 손상 정도를 측정하기 위한 지표로 웨스턴 블랏으로 관찰된 iNOS 발현량을 광학밀도를 통해서 분석한 그래프이다;

con: 대조군(식염수 투여군);

MPTP: 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘 투여군;

MCR(50): 50 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

MCR(100): 100 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

L-Dopa: 15 mg/kg L-다이하이드록시페닐알라닌;

*: 대조군에 비하여 $p < 0.01$;

#: MPTP군에 비하여 $p < 0.01$; 및

###: MPTP군에 비하여 $p < 0.001$.

도 7은 MPTP로 유도한 파킨슨 동물모델에서 목단피 추출물의 도파민 신경세포의 손상 정도를 cox-2 발현을 통해서 확인한 그림이다;

도 7의 1는 MPTP로 유도한 파킨슨 동물모델에서 목단피 추출물의 도파민 신경세포의 손상 정도를 측정하기 위한 지표로 cox-2 발현량을 웨스턴 블랏으로 관찰한 그림이다;

도 7의 2는 MPTP로 유도한 파킨슨 동물모델에서 목단피 추출물의 도파민 신경세포의 손상 정도를 측정하기 위한 지표로 웨스턴 블랏으로 관찰된 cox-2 발현량을 광학밀도를 통해서 분석한 그래프이다;

con: 대조군(식염수 투여군);

MPTP: 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘 투여군;

MCR(50): 50 mg/kg 목단피 추출물 투여군;

MCR(100): 100 mg/kg 목단피 추출물 투여군; 및

L-Dopa: 15 mg/kg L-다이하이드록시페닐알라닌;

*: MPTP군에 비해서 $p < 0.01$;

#: 대조군에 비해서 $p < 0.01$; 및

##: 대조군에 비해서 $p < 0.001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명의 유효성분인 목단피 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

1) 목단피(*Moutan Cortex Radicis*)를 분쇄하는 단계;

2) 단계 1)의 분쇄한 목단피를 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 단계;

3) 단계 2)의 추출물을 여과하는 단계;

4) 단계 3)의 여과물을 감압 농축하는 단계; 및

5) 단계 4)의 농축물을 동결 건조하는 단계.

본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 1)의 목단피는 재배한 것 또는 시판되는 것을 제한없이 사용할 수 있다.

본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 2)의 알코올은 C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하며, 에탄올을 사용하는 것이 가장 바람직하다.

상기 추출 용매의 양은 생약 중량의 2 내지 10 배로, 바람직하게는 3 ~ 4배로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 용매를 가한 후 환류 냉각하여 추출하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 추출시 용매의 온도는 50℃ ~ 100℃인 것이 바람직하며, 70℃ ~ 90℃인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한 추출시간은 30분 ~ 10시간이 바람직하며, 1 ~ 5시간이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 아울러 추출 횟수는 1 내지 3 회인 것이 바람직하며, 2회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 방법에 의하여 목단피를 추출, 여과, 감압 농축한 뒤, 수분을 제거시켜 동결 건조하여 목단피 추출물을 수득하였다.

본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 4)의 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

- [0030] 본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 5)의 동결건조는 당업자에게는 상용화된 동결건조기를 구입하여, 그 사용절차에 따라 통상의 식품제조에서 널리 알려진바 대로 수행하는 것에 의해 용이하게 실시할 수 있을 정도로 공지된 것으로 이해될 수 있다.
- [0031] 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 실시양태에서, 목단피 추출물의 파킨슨병 예방 및 치료효과를 측정하기 위하여, 도파민 신경 세포의 손상, 염증반응 및 흑선조체(nigrostriatal pathway)의 급성 퇴화를 유발한다고 알려진 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)를 마우스에 투여하여, 파킨슨병 동물모델을 제작하였다. 목단피 추출물의 신경보호 효과를 측정하기 위하여, 도 1에 나타난 바와 같이, 실험 3일 동안 목단피 추출물을 투여하고, 그 다음 3일 동안 목단피 추출물과 MPTP를 동시에 투여한 후, 그 다음 2일 동안 목단피 추출물을 투여하여 총 8일 동안 MPTP 및 목단피 추출물의 투여를 진행하였다(도 1 참조).
- [0033] 본 발명의 실시양태에서, MPTP로 유도되는 도파민 신경세포의 손상을 특징으로 하는 파킨슨병 동물모델에서 목단피 추출물의 신경보호 효과를 측정하기 위하여, 도파민 생성의 중요한 역할을 하는 타이로신 하이드록실레이즈(Tyrosine hydroxylase) 함량 변화를 선조체에서 면역조직화학적 방법을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, 선조체에서 MPTP 투여시, 대조군에 비해 TH 면역 양성 세포가 현저히 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 TH 양성 면역 세포 감소 효과는 현재 사용되고 있는 파킨슨병 대증요법치료제인 L-Dopa와 유사하였다(도 2 참조).
- [0034] 본 발명의 실시양태에서, MPTP로 유도되는 도파민 신경세포의 손상을 특징으로 하는 파킨슨병 동물모델에서 목단피 추출물의 신경보호 효과를 측정하기 위하여, 타이로신 하이드록실레이즈 함량의 변화를 흑질에서 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다. 그 결과, 흑질 내에서 MPTP 투여시 대조군에 비해 TH 면역 양성 세포가 현저히 감소하였으며, 이러한 효과를 대조군을 기준으로 비교하였을 때, 목단피 추출물을 투여한 군에서 MPTP에 의해 TH 감소가 억제되는 경향을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 TH 양성 면역 세포 감소 효과가 현재 사용되고 있는 파킨슨병 대증요법치료제인 L-Dopa와 유사한 효과를 보였다(도 3 참조).
- [0035] 본 발명의 실시양태에서, 목단피 추출물에 의한 신경보호 효과를 측정하기 위하여, MPTP로 유도한 파킨슨병 동물모델에서 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 도파민 함량을 관찰하였다. 그 결과, 대조군에 비해 MPTP 투여군에서 도파민의 함량이 유의하게 감소함을 확인할 수 있었는데, 이는 MPTP 투여로 인한 도파민 신경의 손상 및 파킨슨 동물모델이 적절하게 유도되었음을 의미하며, 이러한 도파민 신경이 손상된 파킨슨 동물모델에 목단피 추출물을 투여한 경우, 선조체에서의 도파민 함량의 감소를 억제하는 경향을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 도파민 함량 감소를 억제하는 효과는 L-Dopa와 유사하였다(도 4 참조).
- [0036] 본 발명의 실시양태에서, MPTP로 유도된 파킨슨병 동물모델에서 목단피 추출물의 신경 보호 효과를 측정하기 위하여, 도파민 대사산물인 DOPAC 함량을 선조체에서 살펴본 결과, MPTP 투여군에서 DOPAC의 양이 감소하나, 목단피 추출물을 투여한 군에서 DOPAC 함량 감소가 억제됨을 확인할 수 있었다. 또한, 목단피 추출물의 투여량이 100 mg/kg인 군에서 DOPAC 함량은 L-Dopa 투여군과 유사하였다(도 5 참조).
- [0037] 본 발명의 실시양태에서, MPTP로 유도된 파킨슨병 동물모델에서 목단피 추출물의 신경보호 효과를 측정하기 위하여, 파킨슨병의 신경퇴행 과정을 진행시키는 데 중요한 역할을 하는 것으로 추정되는 iNOS의 발현을 측정하였다. 그 결과, MPTP 투여군에서 증가한 iNOS 발현량이 L-Dopa 투여군과 마찬가지로 목단피 추출물을 투여한 군에서 유의하게 감소함을 확인할 수 있었다(도 6 참조).
- [0038] 본 발명의 실시양태에서, MPTP로 유도된 파킨슨병 동물모델에서 목단피 추출물의 신경보호 효과를 측정하기 위하여, 도파민 신경세포의 산화를 유발시킨다고 알려진 cox-2 단백질의 발현을 측정하였다. 그 결과, MPTP 투여군에서 높은 발현량이 확인된 cox-2의 발현이 L-Dopa 투여군에 비하여, 목단피 추출물 투여군에서 더욱 감소함을 확인할 수 있었으며, 이러한 cox-2 발현 감소효과는 목단피 추출물의 농도가 높아질수록 더욱 증가함을 확인할 수 있었다(도 7 참조).
- [0039] 따라서, MPTP로 유도된 도파민 신경세포의 손상이 목단피 추출물을 투여한 군에서 억제되는 효과를 보이므로, 목단피 추출물을 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물로서 유용하게 사용할 수 있다.

- [0040] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)할 수 있으나 경구 투여가 바람직하다.
- [0041] 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 국소 투여의 조성물은 임상적 처방에 따라 무수형 또는 수성형일 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0042] 경구 투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡셀제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0043] 상기 조성물은 투여를 위해서 목단피 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 회석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형 등으로 제제화할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1~90 중량부 포함되는 것이 바람직하다.
- [0045] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 환자의 연령, 성별 및 비만의 정도에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물은 목단피 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0047] 아울러, 본 발명은 목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 실시양태에서, 목단피의 파킨슨병 예방 및 치료용 효과를 측정하기 위하여, 파킨슨병 유발물질로 알려진 MPTP를 마우스에 투여하여, 파킨슨병 동물모델로서 사용하였다. MPTP 및 목단피 추출물을 투여한 파킨슨병 동물모델에서, 목단피 추출물의 신경보호 효과를 측정하기 위하여, 파킨슨병의 손상이 관찰되는 뇌의 선조체 및 흑질 부위의 도파민 생성에 중요한 역할을 하는 TH의 함량, 도파민 및 도파민 대사 산물의 함량을 측정하였다. 그 결과, MPTP 투여로 인한 TH, 도파민 및 도파민 대사 산물 DOPAC의 함량의 감소를 통해서 도파민 신경세포의 손상을 확인할 수 있었다. 아울러, 파킨슨병의 신경퇴행 과정에서 주요한 역할을 한다고 알려진 iNOS 및 cox-2의 발현을 살펴본 결과, MPTP 투여로 인하여, iNOS 및 cox-2의 발현 증가를 통해서, 파킨슨병 동물모델이 적절하게 유도되었음을 확인함과 동시에, 이러한 동물모델에 목단피 추출물을 투여시 iNOS 및 cox-2의 발현이 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.
- [0049] 따라서, MPTP로 유도된 도파민 신경세포의 손상이 목단피 추출물을 투여한 군에서 억제되는 효과를 보이므로, 목단피 추출물을 파킨슨병 예방 및 개선용 건강식품으로서 유용하게 사용할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 목단피 추출물은 식품학적으로 허용된 담체와 혼합하여 식품 조성물로서 제공될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 목단피 추출물을 식품 또는 음료 첨가물로 사용할 경우, 상기 목단피 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 목단피 추출물의 혼합량은 그의 사용목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

- [0052] 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우, 상기 목단피 추출물은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에, 장기간 복용이 가능하다.
- [0053] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿류, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다.
- [0054] 음료수로 제형화할 경우에 목단피 추출물 이외에 첨가되는 액체 성분으로는 이제 한정되지는 않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드(예, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올이다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제[타우마린, 스테비아 추출물(예, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(예, 사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0055] 다른 양태로서, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한 본 발명의 식품 조성물은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0056] 이하 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.
- [0057] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] <실시예 1> 목단피 추출물의 제조
- [0059] <1-1> 목단피 에탄올 추출물의 제조
- [0060] 목단피(Moutan Cortex Radicis)는 서울특별시 동대문구 제기동 소재의 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 목단피 200 g을 분쇄기로 분쇄한 후, 70%의 에탄올 800 ml을 첨가 후 2회 환류 추출하였다. 추출액을 여과하여 감압 농축 후 동결건조하였으며, 목단피의 총 수득률은 9.2%이었다. 이를 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)에 20 mg/ml의 농도로 녹여 실험 시료로 사용하였다.
- [0061] <1-2> 목단피 메탄올 추출물의 제조
- [0062] 목단피 200 g을 분쇄기로 분쇄한 후, 70%의 메탄올 800 ml을 첨가 후 2회 환류 추출하였다. 추출액을 여과하여 감압 농축 후 동결건조하였으며, 목단피의 총 수득률은 15.6%이었다. 이를 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)에 20 mg/ml의 농도로 녹여 실험 시료로 사용하였다.
- [0063] <1-3> 목단피 열수 추출물의 제조
- [0064] 목단피 200 g을 분쇄기로 분쇄한 후, 열수 800 ml을 첨가 후 2회 환류 추출하였다. 추출액을 여과하여 감압 농축 후 동결건조하였으며, 목단피의 총 수득률은 20.7%이었다. 이를 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)에 20 mg/ml의 농도로 녹여 실험 시료로 사용하였다.
- [0065] <실시예 2> 파킨슨변 동물모델 제작
- [0066] 실험동물은 20 ~ 25 g인 생후 8주령의 C57BL/6J 수컷 마우스(대한바이오링크, 한국)를 사용하였으며, 한국실험동물 관리수칙(Guidelines of the Korean Academy of Medical Science)에 따라 항온(22±3℃) 동물실에서 물과

사료를 충분히 공급하면서 12시간 간격으로 조명을 조절한 환경에서 사육하였다.

[0067] 마우스에 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 30 mg/kg으로 1회/1일씩 연속 3일간 복강 내 주사하고 정상대조군(Con)은 동일한 방법으로 식염수를 주사하였다. MPTP 주사 3일 전부터 뇌를 적출하기 전까지 총 8일 동안 실험군을 4군으로 나누어, MPTP 단독 투여군(MPTP), 목단피 50 mg/kg 투여군(MCR 50), 목단피 100 mg/kg 투여군(MCR 100) 및 양성대조군인 L-Dopa 15 mg/kg 투여군(L-Dopa)으로 나누어 실험하여 비교하였다. 실험을 수행하기 위한 MPTP, 목단피 추출물 및 L-Dopa의 투여 일정은 도 1에 나타나 있는 바와 같다(도 1).

[0068] <실험예 1> 선조체 내 타이로신 하이드록실레이즈 면역 반응성의 변화 측정

[0069] 실시예에서 제작한 MPTP 투여로 유도된 파킨슨 동물모델에서, 도파민 신경세포 독성에 대한 목단피의 신경보호 효과를 알아보기 위하여 MPTP 투여 5일째 선조체와 흑질에서 타이로신 하이드록실레이즈(tyrosine hydroxylase, TH) 면역조직 화학 염색을 시행하였다.

[0070] 8일간의 약물투여를 마치고, 9일째에 마우스를 에틸에테르(ethyl ether)로 마취한 후, 0.05 M PBS를 관류하여 체내의 혈액을 제거하고, 0.02 M 인산염 버퍼(phosphate buffer)에 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 혼합한 용액으로 뇌조직을 고정시켰다. 적출된 뇌를 다시 0.02 M 인산염 버퍼(phosphate buffer)에 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 혼합한 용액으로 24시간 후고정하였고, 30% 수크로스(sucrose) 용액에 담가 조직을 절편할 때까지 4℃ 냉장 보관하였다.

[0071] 뇌 조직을 40 μm의 두께로 크라이톰(cryotome)을 사용하여 절편 하였으며, 조직 중 흑질(Substantia Nigra)과 선조체(Striatum) 부위를 선정하여 면역조직염색화학을 실시하였다. 30% 수크로스 보존액에 들어있는 뇌 조직을 꺼내 0.05 mM PBS를 이용하여 10분간 3회 세척하고, 1% 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)로 10분간 반응시켰다. 그 후, 1% 말의 혈청과 1% 소의 혈청 알부민을 섞은 (Sigma) 블로킹 용액을 사용하여 1시간 블로킹하였다. TH 단백질 발현량을 관찰하기 위하여 1차 항체(Biotechnologies, Santa Cruz CA, USA)를 1:1,000의 농도로 각각 실온에서 하루 밤 반응시키고, 다음날 바이오틴화(biotinylation)된 2차 항체로 실온에서 1시간 반응시킨 후, 아비딘-바이오틴-퍼옥시데이즈 복합체(Avidin-biotin-peroxidase complex)(Vector laboratories, USA)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 증류수 1 ml당 0.05 mg DAB(3,3'-diaminobenzidine)를 넣고 녹인 후 0.3 % H₂O₂ 100 μl를 첨가해서, 5분 동안 발색시키고, 젤라틴(gelatin)으로 코팅된 슬라이드에 조직을 붙인 후 건조시켜서, 각각의 슬라이드를 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 에탄올 차례로 사용하여 탈수시키고, 자일렌(xylene)으로 처리한 후 커버 글라스로 봉입하여, 광학현미경(Olympus BX51, Japan) 및 현미경에 연결된 카메라(Olympus DP70, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

[0072] 브레그마(Bregma)로부터 +1.20 mm의 선조체 절편에서 TH 면역 양성반응을 관찰한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 MPTP 투여시 TH 면역 양성 반응이 현저히 감소하였으나, 목단피 투여군의 경우 TH 면역 양성 반응의 감소가 감소하였다(도 2).

[0073] <실험예 2> 흑질내 TH 면역 양성 세포의 함량 변화 측정

[0074] MPTP의 도파민 신경세포 독성에 대한 목단피의 보호 효과를 알아보기 위하여 MPTP 투여 5일째 선조체와 흑질에서 TH 면역조직화학 염색을 시행하였다.

[0075] 8일간의 목단피 추출물 및 MPTP 투여를 마치고, 9일째에 마우스를 에틸에테르로 마취한 후, 0.05 M PBS를 관류하여 체내의 혈액을 제거하고, 0.02 M 인산염 버퍼에 4% 파라포름알데하이드를 혼합한 용액으로 뇌조직을 고정시켰다. 적출된 뇌를 다시 0.02 M 인산염 버퍼에 4% 파라포름알데하이드를 혼합한 용액으로 24시간 후고정하였고, 30% 수크로스 용액에 담가 조직을 절편할 때까지 4℃ 냉장 보관하였다.

[0076] 뇌 조직을 40 μm의 두께로 크라이톰을 사용하여 절편 하였으며, 조직 중 흑질과 선조체 부위를 선정하여 면역조직염색화학을 실시하였다. 30% 수크로스 보존액에 들어있는 뇌 조직을 꺼내 0.05 mM PBS를 이용하여 10분간 3회 세척하고, 1% 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)로 10분간 반응시켰다. 그 후, 1% 말의 혈청과 1% 소의 혈청 알부민(Sigma)을 섞은 블로킹 용액을 사용하여 1시간 블로킹하였다. TH 단백질 발현량을 관찰하기 위하여 1차 항체(Biotechnologies, Santa Cruz CA, USA)를 1:1,000의 농도로 각각 실온에서 하루 밤 반응시키고, 다음

날 바이오틴화(biotinylation)된 2차 항체로 실온에서 1시간 반응시킨 후, Avidin-biotin-peroxidase complex(Vector laboratories, USA)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 증류수 1 ml당 0.05 mg DAB(3,3'-diaminobenzidine)를 넣고 녹인 후 0.3 % H₂O₂ 100 μ l를 첨가해서, 5분 동안 발색시키고, 젤라틴으로 코팅된 슬라이드에 조직을 붙인 후 건조시켜서, 각각의 슬라이드를 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 에탄올 차례로 사용하여 탈수시키고, 자일렌(xylene)으로 처리한 후 커버 글라스로 봉입하여, 광학현미경(Olympus BX51, Japan) 및 현미경에 연결된 카메라(Olympus DP70, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

[0077] 브레그마로부터 -5.80 mm의 흑질 절편에서 TH 면역 양성 반응을 관찰한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 MPTP 투여 후 흑질내 TH 면역 양성 세포의 상대적인 비율은 MPTP 투여군이 정상대조군에 비해 51 $\pm$ 17%로 유의하게 감소하였다. 목단피 50 mg/kg 투여군은 MPTP 투여군에 비하여 39 $\pm$ 8%, 목단피 100 mg/kg 투여군은 41 $\pm$ 3% 및 양성 대조군인 L-Dopa 투여군에서는 36 $\pm$ 10%만큼 유의한 감소 억제 효과를 나타내었다. 목단피 투여군과 L-Dopa 투여군 사이에는 유의한 차이가 인정되지 않았다. 즉, MPTP 투여시 흑질에서 TH 면역 양성 세포가 현저히 감소하였으나, 목단피 투여군의 경우 TH 면역 양성 세포의 감소가 억제됨을 확인할 수 있었다(도 3).

[0078] <실험예 3> 선조체에서의 도파민 함량 변화

[0079] MPTP 투여에 따른 선조체 내 도파민의 감소에 대한 목단피 투여의 효과를 검토하기 위하여 마지막 MPTP 투여 후 5일째에 고성능 액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하여 선조체 내에서의 도파민의 양을 측정하였다.

[0080] HPLC를 이용하여 선조체에서의 도파민의 농도를 측정하기 위하여, 적출한 뇌 조직에 0.5 ml의 0.1 M 과염소산(perchloric acid), 0.1 mM 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 용액을 첨가하고, 초음파 분쇄기로 30초씩 3번 30-S pause 조건에서 조직 균등액을 제조하고, 이것은 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 그 상층액을 분리하였다. 상층액은 0.22 μ m 여과지(nitrocellulose membrane filter, Millipore)로 여과한 후 10 μ ml Shisheido C18(4.6 $\times$ 150 mm column; Waters Corp., Billerica, MA, USA)에 주입하였다. 이동상은 0.07 M 모노베이직 나트륨 인산염(monobasic sodium phosphate), 1 mM 옥탄설폰산나트륨(sodium octanesulfonic acid), 0.1 μ M EDTA, 5% 아세토니트릴(acetonitrile)(과염소산으로 pH를 3.2로 적정함) 용액으로 0.7 ml/min의 유속을 유지하였고, 전기화학 검출기(electrochemical detector)는 700 mV로 맞추었다. 도파민의 농도는 측정에 필요한 각 물질의 농도측정을 위해 조직 균등액 제조시 일정량의 디하이드록시벤질아민(dihydroxy benzylamine, DHBA)을 내부 스탠다드(internal standard)로 조직 균등액에 첨가하여 보관하였고, 원심분리 후 생성된 침전물은 0.4 ml PBS에 부유하여 단백질 측정에 사용하였다.

[0081] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 정상대조군에 비해 MPTP 투여군의 도파민 함량은 41 $\pm$ 4%로 유의하게 감소하였고, MPTP 투여군에 비하여 목단피 50 mg/kg 투여군은 21 $\pm$ 7%, 목단피 100 mg/kg 투여군은 23 $\pm$ 8%, L-Dopa 투여군은 17 $\pm$ 5% 만큼씩 도파민 함량의 감소를 억제하는 경향을 보였다(도 4).

[0082] <실험예 4> 선조체에서의 3-4-하이드록시페닐아세트산 함량 변화

[0083] MPTP 투여에 따른 선조체 내 3-4-하이드록시페닐아세트산(3-4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)에 대한 목단피 투여의 효과를 검토하기 위하여 마지막 MPTP 투여 후 5일째에 고성능 액체크로마토그래피를 이용하여 선조체 내에서의 DOPAC의 양을 측정하였다.

[0084] HPLC를 이용하여 선조체에서의 도파민 대사물질인 DOPAC의 농도를 측정하기 위하여, 적출한 뇌 조직에 0.5 ml의 0.1 M 과염소산, 0.1 mM 에틸렌다이아민테트라아세트산 용액을 첨가하고, 초음파 분쇄기로 30초씩 3번 30-S pause 조건에서 조직 균등액을 제조하고, 이것은 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 그 상층액을 분리하였다. 상층액은 0.22 μ m 여과지(nitrocellulose membrane filter, Millipore)로 여과한 후 10 μ ml Shisheido C18(4.6 $\times$ 150 mm column; Waters Corp., Billerica, MA, USA)에 주입하였다. 이동상은 0.07 M 모노베이직 나트륨 인산염, 1 mM 옥탄설폰산나트륨, 0.1 μ M EDTA, 5% 아세토니트릴(과염소산으로 pH를 3.2로 적정함) 용액으로 0.7 ml/min의 유속을 유지하였고, 전기화학 검출기는 700 mV로 맞추었다. DOPAC의 농도는 측정에 필요한 각 물질의 농도측정을 위해 조직 균등액 제조시 일정량의 디하이드록시벤질아민을 내부 스탠다드(internal standard)로 조직 균등액에 첨가하여 보관하였고, 원심분리 후 생성된 침전물은 0.4 ml PBS에 부유하여 단백질 측정에 사용하였다.

[0085] MPTP 투여 후 5일 째에 HPLC를 이용하여 선조체 내 DOPAC의 양을 측정한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 정상 대조군에 비해 MPTP 투여군의 DOPAC 함량은 $48 \pm 8\%$ 로 유의하게 감소하였고, MPTP 투여군에 비해 목단피 50 mg/kg 투여군은 $9 \pm 7\%$, 목단피 100 mg/kg 투여군은 $30 \pm 24\%$, L-Dopa 처리군은 $33 \pm 33\%$ DOPAC 함량의 감소를 억제하는 경향을 보였다(도 5).

[0086] <실험예 5> 흑질에서의 iNOS 단백질 발현

[0087] 신경교세포에서 발현되는 유도형 일산화질소 합성 효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)는 일산화질소(NO)를 생성하며, 일산화질소는 다양한 염증 관련 사이토카인과 함께 뇌 흑질치밀부의 소교세포를 활성화하면서 파킨슨병의 신경퇴행 과정을 진행시키는 중요한 역할을 하는 것으로 보고된바 있다(Salum C *et al.*, *Brain Res.*, 2008, 1198:27-33). 또한, 일산화질소는 파킨슨 동물모델에서 도파민성 신경세포의 퇴행을 촉진하는 역할을 수행한다고 알려져 있다(Zheng LT *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, 588(1):106-113.). 이에, 본 발명자들은 MPTP로 유도한 도파민 신경계가 손상된 파킨슨 동물모델에서 목단피 추출물의 신경보호 효과를 확인하기 위하여, iNOS 단백질의 발현을 살펴보았다.

[0088] MPTP 주입 후, 도파민 신경세포의 손상 정도를 분석하기 위하여 마지막 MPTP 투여 5일 후, 마우스로부터 뇌 조직을 분리하여 iNOS 단백질의 발현을 측정하기 위하여 웨스턴 블랏을 실시하였다. 단백질 시료를 얻기 위하여 목단피 추출물을 투입 약물 투여를 시작한지 9일 째, 마우스를 경추 탈골로 희생시켜 뇌 조직을 분리한 뒤, 조직 균등 완충액[50 mM Tris(pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA), 1 mM PMSF, 1% SDS]을 넣고 잘 갈아서 조직 균등액을 제조하였다. 이를 4℃에서 5분간 13,000 rpm으로 원심분리하여, 침전시킨 후 상층액을 취하여 브래드포드(Bradford) 방법에 의하여 단백질을 정량하고, 총 10 μ g의 단백질 시료를 10% SDS 전기영동 젤(electrophoresis gel)을 이용하여 분석하였다. 단백질 분리가 끝난 후 젤을 나이트로셀룰로오스 필터(nitrocellulose filter)(Bio-Rad Laboratories., CA, USA)에 300 mA에서 20분 동안 트랜스퍼(transfer)한 후, 나이트로셀룰로오스 필터를 트리스 완충식염수(Tris-buffered saline, TBS)에 5% 탈지분유, 0.2% 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)을 녹인 용액으로 약 1시간 상온에서 블로킹하였다. 나이트로셀룰로오스 필터는 TBS에 0.1% 트윈-20(Tween-20)을 녹인 용액에 단클론 마우스 항-iNOS(monoclonal mouse anti-iNOS)(BD Biosciences Pharmingen, USA), actin(1:5000, Sigma)를 1:5,000으로 희석시켜, 이를 일차 항체로 하여 하룻밤 동안 상온에서 반응시켰다. 일차 항체들은 horse-radish-peroxidase가 결합된 1:2,000 안티-마우스 면역글로불린 G(anti-mouse Ig G) 이차항체로 1시간 동안 반응시킨 후, 화학 발광 염색 방법(enhanced chemiluminescence, ECL)(American Pharmacia Biotech, USA)을 이용하여 X-ray 필름에 노출시켜 발현량을 확인하였다.

[0089] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, iNOS 단백질의 발현은 정상대조군에 비해 MPTP 투여군에서 $123 \pm 4\%$ 로 유의하게 증가하였고, 목단피 50 mg/kg 투여군에서는 MPTP 투여군에 비해 $11 \pm 5\%$, 목단피 100 mg/kg 투여군에서는 $27 \pm 4\%$ 로 감소시키는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 수치는 L-Dopa 투여군에서 관찰되는 $35 \pm 7\%$ 와 유사하였 다(도 6).

[0090] <실험예 6> 흑질에서의 cox-2 단백질 발현

[0091] 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase, cox)는 아라키도네이트(arachidonate)로부터 프로스타글란딘(prostaglandin)의 형성에 관여하는 속도 조절단계의 효소이며, 이의 유도성 형태인 cox-2는 파킨슨병 환자 및 신경 독성에 의해 유도된 파킨슨병 동물모델의 흑질 부위에서 높게 발현된다고 알려져 있다. 최근에는 cox-2의 비정상적인 증가가 도파민의 산화를 유발시키면서, 파킨슨병에서와 같이 도파민성 신경세포의 선택적인 취약성에 공헌하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 발명자들은 목단피 추출물의 MPTP 신경 독성물질로 유도된 파킨슨 동물모델에서 신경보호 효과를 측정하기 위하여, cox-2의 발현을 살펴보았다.

[0092] 흑질에서의 cox-2의 발현을 측정하기 위하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 8일간의 목단피 추출물 투여가 끝난 후, 9일째에 경추 탈골로 희생시킨 마우스로부터 뇌 조직을 적출하였다. 적출한 뇌조직을 조직 균등 완충액[50 mM Tris(pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA), 1 mM PMSF, 1% SDS]을 넣고 잘 갈아서 조직 균등액을 제조하였다. 이를 4℃에서 5분간 13,000 rpm으로 원심분리하여, 침전시킨 후 상층액을 취하여 브래드포드 방법에 의하여 단백질을 정량하고, 총 10 μ g의 단백질 시료를 10% SDS 전기영동 젤을 이용하여 분석하였다. 단백질 분리가 끝난 후 젤을 나이트로셀룰로오스 필터(Bio-Rad

Labolatories., CA, USA)에 300 mA에서 20분 동안 트랜스퍼한 후, 나이트로셀룰로오스 필터를 트리스 완충식염수에 5% 탈지분유, 0.2% 소 혈청 알부민을 녹인 용액으로 약 1시간 상온에서 블로킹하였다. 나이트로셀룰로오스 필터는 TBS에 0.1% 트윈-20을 녹인 용액에 1:1,000 단클론 마우스 항-Cox-2(monoclonal mouse anti-Cox-2)(Santa Cruz Biotechnology Inc.,USA), actin(1:5000, Sigma)을 희석시켜, 이를 일차 항체로 사용하여 하룻밤 동안 상온에서 반응시켰다. 일차 항체들은 HRP(horse-radish-peroxidase)가 결합된 안티-마우스 면역글로불린 G(anti-mouse Ig G) 이차항체를 1:2,000으로 희석시켜 1시간 동안 반응시킨 후, 화학 발광 염색 방법(enhanced chemiluminescence,ECL)(American Pharmacia Biotech, USA)을 이용하여 X-ray 필름에 노출시켜 발현량을 확인하였다.

[0093] 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이, 정상대조군에 비해 MPTP 투여군에서는 cox-2 단백질의 발현이 $127 \pm 5\%$ 로 유의하게 증가되므로, MPTP 신경 독성이 도파민 신경세포 손상을 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해, 목단피 50 mg/kg 투여군에서는 cox-2 단백질 발현이 $30 \pm 6\%$ 로 나타났으며, 목단피 100 mg/kg 투여군에서는 $17 \pm 3\%$ 이 관찰됨으로써, MPTP 투여군에 비해 목단피 추출물 투여군에서 cox-2 단백질의 발현이 유의하게 감소함을 알 수 있었다. 양성대조군으로 사용된 L-Dopa 투여군에서는 $7 \pm 8\%$ 로 cox-2 단백질 발현이 억제되었다. 즉, 목단피 추출물이 MPTP 신경독성에 의한 파킨슨병 동물모델에서 도파민 손상을 유발하는 cox-2의 발현을 억제하는 것을 확인하였다(도 7).

[0094] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 제시한다.

[0095] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0096] <1-1> 산제의 제조

[0097] 본 발명의 실시예<1-1> 추출물 2 g

[0098] 유당 1 g

[0099] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0100] <1-2> 정제의 제조

[0101] 본 발명의 실시예 <1-1> 추출물 100 mg

[0102] 옥수수전분 100 mg

[0103] 유 당 100 mg

[0104] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0105] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0106] <1-3> 캡슐제의 제조

[0107] 본 발명의 실시예<1-2> 추출물 100 mg

[0108] 옥수수전분 100 mg

[0109] 유 당 100 mg

[0110] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0111] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0112] <1-4> 환의 제조

[0113] 본 발명의 실시예 <1-1> 추출물 1 g

[0114]	유당	1.5 g
[0115]	글리세린	1 g
[0116]	자일리톨	0.5 g
[0117]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.	
[0118]	<1-5> 과립의 제조	
[0119]	본 발명의 실시예<1-1> 추출물	150 mg
[0120]	대두 추출물	50 mg
[0121]	포도당	200 mg
[0122]	전분	600 mg
[0123]	상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.	
[0124]	<제조예 2> 식품의 제조	
[0125]	<2-1> 과자 및 분식의 제조	
[0126]	본 발명의 실시예 <1-3> 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.	
[0127]	<2-2> 유제품의 제조	
[0128]	본 발명의 실시예 <1-3> 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.	
[0129]	<2-3> 전식의 제조	
[0130]	현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.	
[0131]	검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.	
[0132]	본 발명의 본 발명의 실시예 <1-3> 추출물을 진공 농축기에서 감압 농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.	
[0133]	상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 실시예<1-3> 추출물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.	
[0134]	곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),	
[0135]	종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),	
[0136]	본 발명의 실시예 <1-3> 추출물의 건조분말(3 중량부),	
[0137]	영지(0.5 중량부), 및	
[0138]	지황(0.5 중량부)	
[0139]	<제조예 3> 음료의 제조	

[0140]	본 발명의 실시예 <1-3> 추출물	1000 mg
[0141]	구연산	1000 mg
[0142]	올리고당	100 g
[0143]	매실농축액	2 g
[0144]	타우린	1 g
[0145]	정제수를 가하여 전체	900 ml

[0146] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강식품 제조에 사용한다.

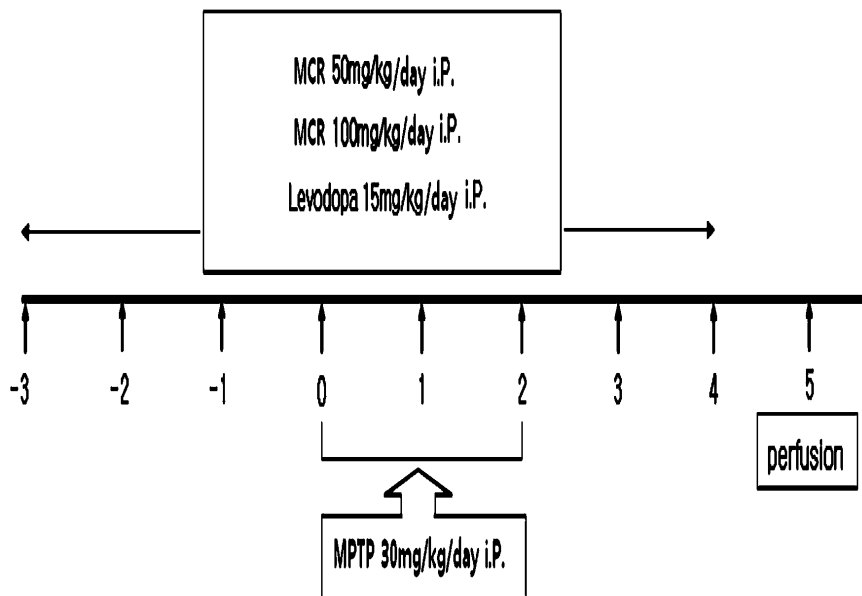
[0147] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

산업상 이용가능성

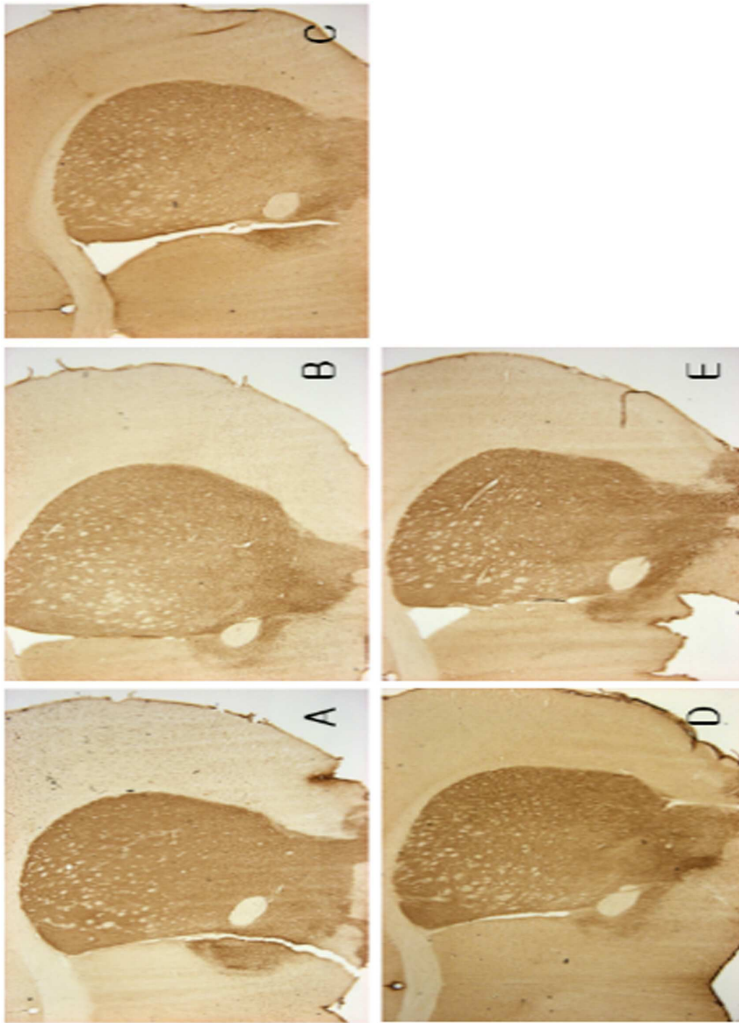
[0148] 상기에서 보는 바와 같이, 본 발명의 목단피 추출물은 MPTP로 유도된 파킨슨병 동물모델에서 TH, 도파민 및 DOPAC의 감소를 억제하는 효과를 보이며, 파킨슨병의 진행을 촉진하는 iNOS 및 cox-2의 발현을 억제함으로써, 파킨슨병에서 손상된 도파민 신경세포의 보호 효과를 보이므로, 목단피 추출물을 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물 및 건강식품으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면

도면1

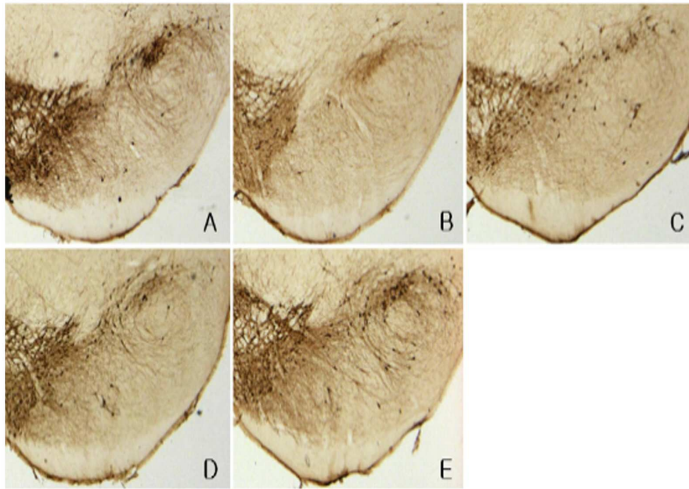


도면2

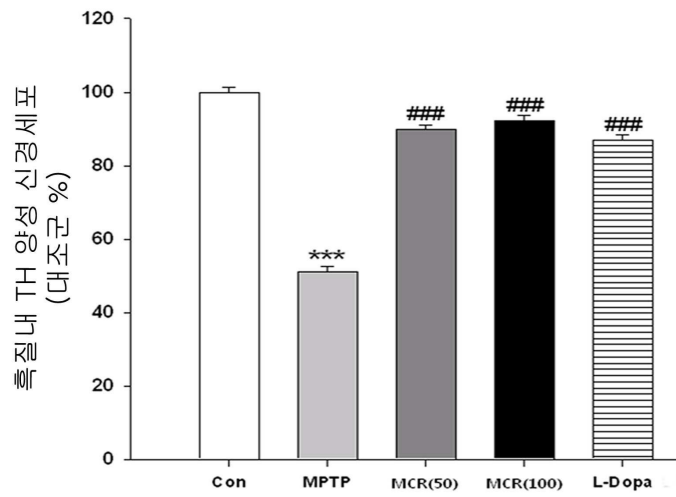


도면3

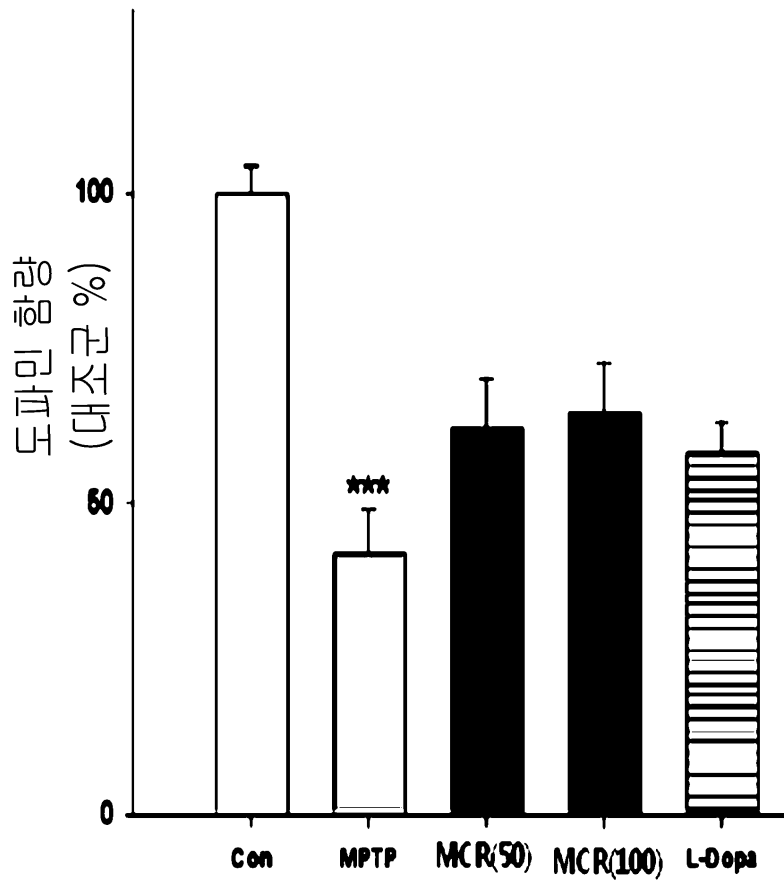
1.



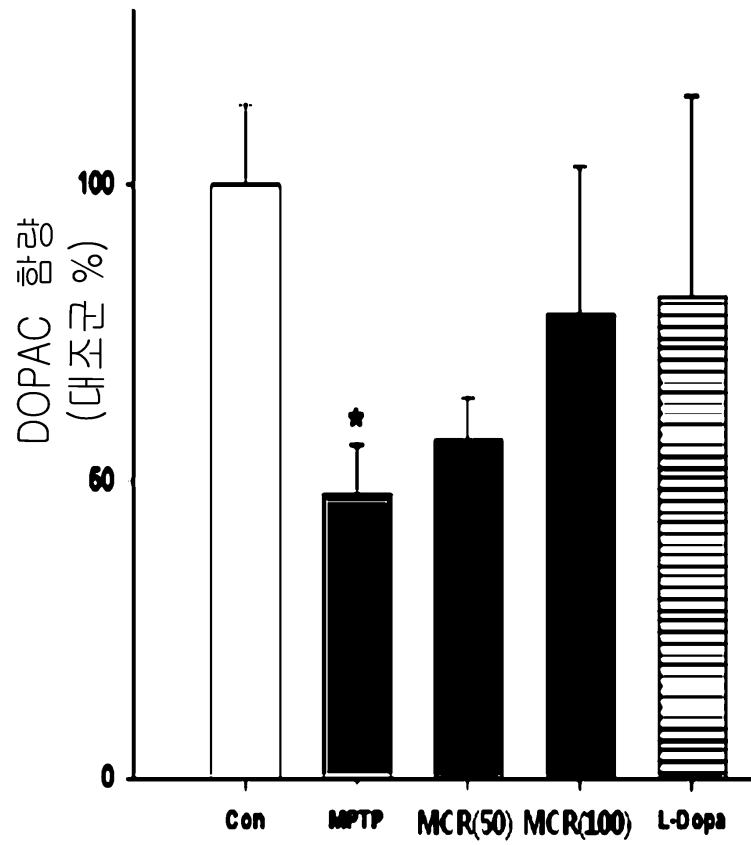
2.



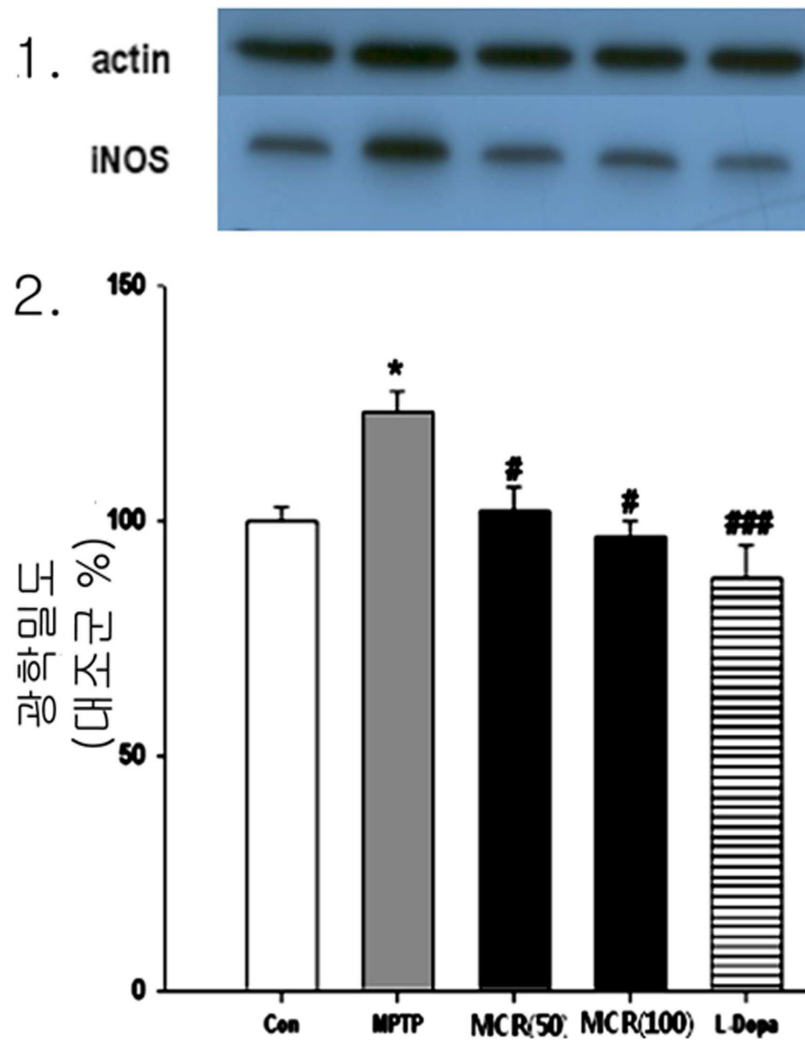
도면4



도면5



도면6



도면7

