



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0025926
(43) 공개일자 2013년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/29 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/212 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0010544(분할)

(22) 출원일자 2013년01월30일

심사청구일자 2013년01월30일

(62) 원출원 특허 10-2011-0004037

원출원일자 2011년01월14일

심사청구일자 2011년01월14일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스
내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

윤태영

서울특별시 중랑구 묵동 태릉 브라운스톤@
102-1404

오대환

서울시 중랑구 묵동 태릉 브라운스톤@ 103-701

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

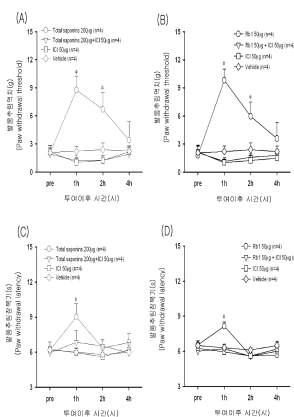
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 유효 성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 유효성분으로 함유하는 신경병 증성 통증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물 각각의 중추 신경 손상, 말초 신경 손상 및 염증으로 유발된 통증을 억제하는 효과를 확인 하였으며, 이러한 통증의 억제 효과는 에스트로젠 수용체를 매개하여 일어나며 또한 척수내 미세교신경세포의 통 증 관련 인자 발현을 억제함으로써 작용한다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

김동현

서울특별시 성북구 성북동 15-53

최두철

경기도 군포시 산본2동 래미안 하이어스 113동
1701호

임은정

서울특별시 성북구 보문동 75-1 스타빌 507호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010K000824

부처명 교육과학기술부

연구사업명 21C 프론티어 연구개발사업

연구과제명 척수손상 후 히스톤 변형 제어를 통한 세포사멸 억제 및 치료제 개발 연구

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100001758

부처명 교육과학기술부

연구사업명 선도연구센터육성사업

연구과제명 척수손상 후 희소돌기아교세포사멸 제어를 통한 신경세포 보호 및 기능회복 기술개발

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2010.03.01 ~ 2011.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010K000833

부처명 교육과학기술부

연구사업명 21C 프론티어 연구개발사업

연구과제명 염증 및 산화적 스트레스 조절을 통한 척수손상 치료제 개발 연구

주관기관 경희대학교 산학협력단

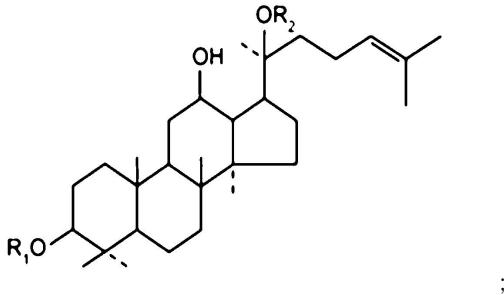
연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 [화학식 3]으로 나타내는 화합물인, 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 개선용 건강식품:

[화학식 3]



여기서, R1은 Glc₂Glc이며;

R2는 H이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 신경병증성 통증은 말초 신경 손상 또는 중추 신경 손상에 의해서 유도되는 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 예방 및 개선용 건강식품.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 치료용 조성물, 및 상기 유효성분을 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 개선용 건강식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

일반적으로 통증은 삶을 위협하거나 강한 외부자극에 대한 방어기작으로 나타나는 생리적 반응 중 하나로서 위험에서 신체를 보호하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 통증은 조직손상에 의한 침해성 통증(nociceptive pain)과 조직손상을 수반하지 않지만 신경계 이상반응으로 나타나는 신경병증성 통증(neuropathic pain)으로 구분된다. 침해성 통증은 조직손상에 의한 염증반응이 수반되어 통증과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며 일반적으로 손상된 부위가 치유되면서 자연히 소멸된다. 신경병증성 통증은 외상(trauma)이나 염증, 허혈성 손상, 또는 대사산물 등 다양한 원인에 의해 신경계가 손상될 때 유발되는 만성적 신경질환이다(Gilron et al., 2006; Barn, 2006). 신경병증성 통증은 아무런 자극 없이 생기는 자발통(spontaneous pain)과 외부자극에 의해 유발되는 통각과민(hyperalgesia) 또는 이질통(allodynia)등의 증상을 수반하는 것이 특징이다. 통각과민은 유해자극에 대한 과도한 비정상적인 통증반응으로 정의되며, 이질통은 무해한 자극에 의해 유발되는 통증반응으로 알려져 있다(Woolf and Mannion, 1999). 신경병증성 통증은 기존의 진통제로는 통증을 완화시키기 어려운 것으로 알려져 있다. 신경병증성 통증 억제제로는 칼슘채널에 작용하는 가바펜틴(Gabapentin), 프리가발린(Pregabalin)과 같은 항경련제, 나트륨 채널에 작용하는 카바마제핀(Carbamazepine)과 같은 항경련제; SNRI(Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor) 계열 항우울제; 응급 시에만 사용되는

아편류 등의 4가지 계열이 임상적으로 사용되고 있다.

[0003] 특히 완전한 혹은 부분적인 척수신경의 손상은 척수손상 환자들 중 약 70% 정도의 대다수에서 손상 후 몇 달 이내에 신경병증성 통증을 유발하며(Beric, 1997; Christensen and Hulsebosch, 1997; Yezierski, 1996 Yu et al., 2003) 궁극적으로 오랫동안 지속되는 만성적인 신경병증성 통증으로 발전하게 된다(Richards et al., 1980). 척수손상 후 유발되는 통증은 주로 세 부위에서 나타나는데 크게 손상 부위의 위쪽(rostral)에서 나타나는 통증인 above-level pain, 손상 부위와 가까운 부위 혹은 같은 분지(dermatome)에서 나타나는 통증인 at-level pain, 손상 부위의 아래쪽(caudal)에서 나타나는 통증인 below-level pain으로 구분된다(Siddall et al., 1997; Siddall and Cousins, 1997). 척수손상 후 발생하는 이러한 통증은 경미한 저림에서부터 자살을 시도할 정도로 극심한 통증까지 그 양상이 다양하며, 대개 만성 통증으로 이어짐으로써 일상생활이 불가능할 정도로 환자들을 괴롭힌다. 더구나, 신경병증성 통증은 통증 자체뿐만 아니라 수면장애, 불안, 우울증과 같은 정신적 스트레스를 동반하기 때문에 환자의 삶의 질을 위협할 뿐만 아니라, 막대한 치료비용이 지출되어(척수손상 환자의 경우 환자 개인당 연간 2,500만 원으로 평생 약 10억 원) 환자 및 가족을 넘어 심각한 사회, 경제적 문제로 대두되고 있다(Cairns et al., 1996; Segatore, 1994).

[0004] 손상 부위 위쪽에서 유발되는 통증에 관한 기전에 대해서는 아직까지 거의 알려지지 않은 반면 손상부위와 손상 부위 아래에서 나타나는 통증에 관한 기전은 척수신경 손상 후 통증을 치료하기 위한 목표에 초점을 두고 많은 연구가 되어왔다(Hulsebosch, 2002; Yezierski, 2004). 염증반응은 척수손상 후 나타나는 이차적 손상의 주된 요인으로서 급성, 만성 척수손상의 병리현상을 조절하는 중추적인 역할을 한다고 알려져 있으며(Bligh, 1992), 최근 들어 척수손상 후 활성화된 미세신경교세포(microglia)는 척수손상 후 발생하는 신경병증성 통증, 특히 below-level pain을 매개하는 세포로 알려져 있다(Hains and Waxman, 2006; Zhao et al., 2007). 따라서 미세신경교세포 활성화 억제를 통한 염증반응의 제어는 척수손상 치료 및 통증억제를 위한 핵심적 전략이라 할 수 있다. 그러나 아직까지 염증반응 조절 기작이나 미세신경교세포 활성화에 관한 연구는 매우 초기단계이며 집중적인 연구가 필요하다.

[0005] 위에서 언급되었듯, 신경병증성 통증에 사용되는 약물들은 임상에서 대부분 병용되지만, 각 계열의 약물들이 모두 비슷한 부작용을 가지고 있어 오히려 이러한 병용으로 인해 환자에 따라서는 부작용이 더욱 악화될 수 있는 반면, 치료효과는 저조하다는 문제점이 있다. 특히 현재까지 다양한 진통제 또는 진통방법의 발전에도 불구하고 신경병증성 통증 환자의 75%가 여전히 심각한 통증을 경험하는 것으로 보고되는 사실은 신경병증성 통증의 유발기전이 확실히 정립되지 않음은 물론, 기존의 진통제가 신경병증성 통증을 적절히 치료하지 못하고 있다는 것을 반증하므로 독성과 부작용이 없으며 더욱 진통효과가 큰 통증 억제제나 치료제의 개발이 요구된다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 인삼유래 사포닌 추출물 또는 인삼유래 사포닌 추출물로부터 분리한 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, 및 Compound K를 유효성분으로 함유하는 조성물을 중추 신경에 손상을 받은 후 신경통이 유발된 래트 모델에 각각 투여하였을 때, 기계적 이질통 및 열 통각과민이 감소되었으며, 이러한 통증의 억제효과가 에스트로겐 수용체를 통하여 일어나며, 아울러, 척수내 통증관련 인자인 p-38MAPK, pERK, 및 pJNK의 발현 억제를 통해서 통증을 억제시키는 효과를 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 인삼(*Panax ginseng*) 유래 사포닌 추출물 또는 이로부터 분리된 사포닌을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 치료용 조성물, 또는 건강식품을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 진세노사이드 Rb1 및 Rg3 및 Compound K로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 치료용 조성물, 또는 건강식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인삼(*Panax ginseng*) 유래 사포닌 추출물 또는 분리된 사포닌을 유효

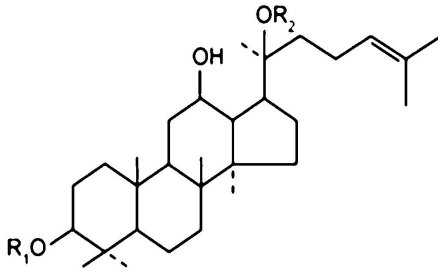
성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 나타내는 화합물을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 인삼(*Panax ginseng*) 유래 사포닌 추출물 또는 분리된 사포닌을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 [화학식 1]로 나타내는 화합물을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

화학식 1



[0013]

[0014] 여기서, R1은 Glc₂-Glc 또는 H이며;

[0015] R2는 Glc₆-Glc 또는 H 또는 Glc이다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물 각각은 중추 신경 손상, 말초 신경 손상뿐만 아니라, 염증으로 유발된 통증을 억제하는 효과가 있으며, 이러한 진통효과는 에스트로겐 수용체를 매개하여 일어나며, 또한 척수내 미세신경교세포의 염증 관련인자의 발현을 억제하여 작용하므로, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 유효성분으로 함유하는 조성물을 통증의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 말초 신경병증성 통증의 동물모델을 제작하는 과정에서 신경 손상의 위치를 나타내는 그림이다:

ossa coxae: 두 개의 장골들;

S1: 첫 번째 천골 신경(1번 Sacral nerve);

S2: 두 번째 천골 신경;

S3: 세 번째 천골 신경;

S4: 네 번째 천골 신경;

C1: 첫 번째 미골 신경(1번 Coccygeal nerve);

C2: 두 번째 미골 신경; 및

×: 신경 손상 위치로써, 구체적으로 천골 신경 1번과 2번 사이 상(superior), 하(inferior) 신경 위치를 잘라, 위의 꼬리로 가는 1번 신경만 손상시킴.

도 2는 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 4주가 경과한 후, 만성통증이 생긴 동물모델에, 본 발명에

따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 경구 투여한 후, 통증행위 반응테스트를 수행한 결과이다:

도 2의 A는 중추 신경병증성 통증 동물모델에 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 3일 동안 경구 투여하면서, BBB 테스트를 수행한 결과이다;

○ Vehicle: 1 ml 생리식염수를 투여한 음성 대조군(n=6);

▽ Minocycline: 22.5 mg/kg 미노사이클린을 투여한 양성 대조군(n=6);

□ Rb1: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rb1을 투여한 군(n=4);

◇ Compound K: 7 mg/kg의 진세노사이드 Rb1의 대사 산물을 투여한 군(n=4);

△ Total saponin: 50 mg/kg 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 군(n=4);

⬡ Rg3: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rg3을 투여한 군(n=4);

도 2의 B는 중추 신경병증성 통증 동물모델에 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 3일 동안 투여하면서, 기계적 이질통(mechanical allodynia) 테스트를 수행한 결과이다;

○ Vehicle: 1 ml 생리식염수를 투여한 음성 대조군(n=6);

▽ Minocycline: 22.5 mg/kg 미노사이클린을 투여한 양성 대조군(n=6);

□ Rb1: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rb1을 투여한 군(n=4);

◇ Compound K: 7 mg/kg의 진세노사이드 Rb1의 대사 산물을 투여한 군(n=4);

△ Total saponin: 50 mg/kg 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 군(n=4);

⬡ Rg3: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rg3을 투여한 군(n=4);

도 2의 C는 중추 신경병증성 통증 동물모델에 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 3일 동안 투여하면서, 열 통각과민(heat hyperalgesia) 테스트를 수행한 결과이다;

○ Vehicle: 1 ml 생리식염수를 투여한 음성 대조군(n=6);

▽ Minocycline: 22.5 mg/kg 미노사이클린을 투여한 양성 대조군(n=6);

□ Rb1: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rb1을 투여한 군(n=4);

◇ Compound K: 7 mg/kg의 진세노사이드 Rb1의 대사 산물을 투여한 군(n=4);

△ Total saponin: 50 mg/kg 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 군(n=4);

⬡ Rg3: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rg3을 투여한 군(n=4);

도 2의 D는 BBB, 기계적 이질통, 및 열통각과민 테스트별 최고점 대비 그룹의 평균값을 배분율로 나타낸 그래프이다;

1 Vehicle: 1 ml 생리식염수를 투여한 음성 대조군(n=6);

2 Minocycline: 22.5 mg/kg 미노사이클린을 투여한 양성 대조군(n=6);

3 Rb1: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rb1을 투여한 군(n=4);

4 Compound K: 7 mg/kg의 진세노사이드 Rb1의 대사 산물을 투여한 군(n=4);

5 Total saponin: 50 mg/kg 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 군(n=4);

6 Rg3: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rg3을 투여한 군(n=4).

도 3은 인삼유래 사포닌 추출물의 농도에 따른 중추 신경병증성 통증의 억제효과를 나타낸 그래프이다:

도 3의 A는 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 4주가 경과한 후 만성통증이 생긴 동물모델에 본 발명에 따른 인삼유래 사포닌 추출물을 농도별로 척수강내로 투여한 후 1시간, 2시간 및 4시간에서 기계적 이질통

테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다;

△ Vehicle: 래트 1마리당 10 μ l의 생리식염수를 척수강내로 투여한 군(n=4);

◇ Total saponin 20 μ g: 래트 1마리당 20 μ g의 인삼유래 사포닌 추출물을 척수강내로 투여한 군(n=4);

□ Total saponin 50 μ g: 래트 1마리당 50 μ g의 인삼유래 사포닌 추출물을 척수강내로 투여한 군(n=4);

▽ Total saponin 100 μ g: 래트 1마리당 100 μ g의 인삼유래 사포닌 추출물을 척수강내로 투여한 군(n=4);

○ Total saponin 200 μ g: 래트 1마리당 200 μ g의 인삼유래 사포닌 추출물을 척수강내로 투여한 군(n=4);

도 3의 B는 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 4주가 경과한 후 만성통증이 생긴 동물모델에 본 발명에 따른 인삼유래 사포닌 추출물중 Rb1만을 농도별로 척수강내로 투여한 후 1시간, 2시간 및 4시간에서 기계적 이질통 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다;

◇ Vehicle: 래트 1마리당 10 μ l의 생리식염수를 척수강내로 투여한 음성 대조군(n=4);

□ Rb1 10 μ g: 래트 1마리당 10 μ g의 진세노사이드 Rb1을 척수강내로 투여한 군(n=3);

▽ Rb1 25 μ g: 래트 1마리당 25 μ g의 진세노사이드 Rb1을 척수강내로 투여한 군(n=4);

○ Rb1 50 μ g: 래트 1마리당 50 μ g의 진세노사이드 Rb1을 척수강내로 투여한 군(n=4);

도 3의 C는 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 4주가 경과한 후 만성통증이 생긴 동물모델에 본 발명에 따른 인삼유래 사포닌 추출물을 농도별로 척수강내로 투여한 후 1시간, 2시간 및 4시간에서 열 통각과민 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다;

△ Vehicle: 래트 1마리당 10 μ l의 생리식염수를 척수강내로 투여한 군(n=4);

◇ Total saponin 20 μ g: 래트 1마리당 20 μ g의 인삼유래 사포닌 추출물을 척수강내로 투여한 군(n=4);

□ Total saponin 50 μ g: 래트 1마리당 50 μ g의 인삼유래 사포닌 추출물을 척수강내로 투여한 군(n=4);

▽ Total saponin 100 μ g: 래트 1마리당 100 μ g의 인삼유래 사포닌 추출물을 척수강내로 투여한 군(n=4);

○ Total saponin 200 μ g: 래트 1마리당 200 μ g의 인삼유래 사포닌 추출물을 척수강내로 투여한 군(n=4);

도 3의 D는 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 4주가 경과한 후 만성통증이 생긴 동물모델에 본 발명에 따른 인삼유래 사포닌 추출물중 Rb1만을 척수강내로 투여한 후 1시간, 2시간 및 4시간에서 열 통각과민 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다;

◇ Vehicle: 래트 1마리당 10 μ l의 생리식염수를 척수강내로 투여한 음성 대조군(n=4);

□ Rb1 10 μ g: 래트 1마리당 10 μ g의 진세노사이드 Rb1을 척수강내로 투여한 군(n=3);

▽ Rb1 25 μ g: 래트 1마리당 25 μ g의 진세노사이드 Rb1을 척수강내로 투여한 군(n=4);

○ Rb1 50 μ g: 래트 1마리당 50 μ g의 진세노사이드 Rb1을 척수강내로 투여한 군(n=4).

도 4는 에스트로겐 수용체의 중추 신경병증성 통증감소의 억제 효과를 나타낸 그래프이다;

도 4의 A는 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 4주가 경과한 후 만성통증이 생긴 동물모델에 인삼유래 사포닌 추출물과 에스트로겐 길항제를 각각, 또는 함께 척수강내로 투여한 후 1시간, 2시간 및 4시간에서 기계적 이질통 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다;

○ Total saponin 200 μ g: 래트 1마리당 200 μ g의 인삼유래 사포닌 추출물을 단독으로 척수강내로 투여한 군(n=4);

▽ Total saponin 200 μ g + ICI 50 μ g: 래트 1마리당 200 μ g의 인삼유래 사포닌 추출물과 에스트로겐 길항제 ICI 50 μ g을 척수강내에 함께 투여한 군(n=4);

□ ICI 50 μ g: 래트 1마리당 50 μ g의 에스트로겐 길항제를 단독으로 척수강내에 투여한 군(n=4);

◇ Vehicle: 래트 1마리당 10 μ l의 생리식염수를 척수강내로 투여한 음성 대조군 (n=4);

도 4의 B는 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 4주가 경과한 후 만성통증이 생긴 동물모델에 Rb1과

에스트로겐 길항제를 각각, 또는 함께 척수강내로 투여한 후, 1시간, 2시간 및 4시간에서 기계적 이질통 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다;

○ Rb1 50 μg : 래트 1마리당 50 μg 의 인삼유래 사포닌 추출물 Rb1을 단독으로 척수강내로 투여한 군(n=4);

▽ Rb1 50 μg + ICI 50 μg : 래트 1마리당 50 μg 의 인삼유래 사포닌 추출물 Rb1과 에스트로겐 길항제 ICI 50 μg 을 척수강내에 함께 투여한 군(n=4);

□ ICI 50 μg : 래트 1마리당 50 μg 의 에스트로겐 길항제 ICI를 단독으로 척수강내에 투여한 군(n=4);

◇ Vehicle: 래트 1마리당 10 μl 의 생리식염수를 척수강내로 투여한 음성 대조군 (n=4);

도 4의 C는 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 4주가 경과한 후 만성통증이 생긴 동물모델에 인삼유래 사포닌 추출물과 에스트로겐 길항제를 각각, 또는 함께 척수강내로 투여한 후 1시간, 2시간 및 4시간에서 열 통각과민 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다;

○ Total saponin 200 μg : 래트 1마리당 200 μg 의 인삼유래 사포닌 추출물을 단독으로 척수강내로 투여한 군(n=4);

▽ Total saponin 200 μg + ICI 50 μg : 래트 1마리당 200 μg 의 인삼유래 사포닌 추출물과 에스트로겐 길항제 ICI 50 μg 을 척수강내에 함께 투여한 군(n=4);

□ ICI 50 μg : 래트 1마리당 50 μg 의 에스트로겐 길항제를 단독으로 척수강내에 투여한 군(n=4);

◇ Vehicle: 래트 1마리당 10 μl 의 생리식염수를 척수강내로 투여한 음성 대조군(n=4);

도 4의 D는 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 4주가 경과한 후, 만성통증이 생긴 동물모델에, Rb1과 에스트로겐 길항제를 각각, 또는 함께 척수강내로 투여한 후, 1시간, 2시간 및 4시간에서 열 통각과민 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다;

○ Rb1 50 μg : 래트 1마리당 50 μg 의 진세노사이드 Rb1을 단독으로 척수강내로 투여한 군(n=4);

▽ Rb1 50 μg + ICI 50 μg : 래트 1마리당 50 μg 의 진세노사이드 Rb1과 에스트로겐 길항제 ICI 50 μg 을 척수강내에 함께 투여한 군(n=4);

□ ICI 50 μg : 래트 1마리당 50 μg 의 에스트로겐 길항제 ICI를 단독으로 척수강내에 투여한 군(n=4); 및

◇ Vehicle: 래트 1마리당 10 μl 의 생리식염수를 척수강내로 투여한 음성 대조군(n=4).

도 5는 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 염증반응에 의해서 유발된 통증을 억제하는 효과를 나타낸 그래프이다;

도 5의 A는 염증반응을 유발시키는 포르말린을 주입 30분전에 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 투여하고 관찰되는 통증 행위(발을 핥거나 드는 행동)를 나타낸 그래프이다;

○ Vehicle: 래트 1마리당 10 μl 의 생리식염수를 척수강내로 투여한 음성 대조군(n=8);

▽ Total saponin 200 μg : 래트 1마리당 인삼유래 사포닌 추출물 200 μg 을 척수강내에 투여한 군(n=4);

□ Compound K 50 μg : 래트 1마리당 진세노사이드 Compound K 50 μg 을 척수강내에 투여한 군(n=4);

◇ Rb1 50 μg : 래트 1마리당 진세노사이드 Rb1 50 μg 을 척수강내에 투여한 군(n=3);

△ Rg3 50 μg : 래트 1마리당 진세노사이드 Rg3 50 μg 을 척수강내에 투여한 군(n=3);

도 5의 B는 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 투여하고 30분 지난 래트에서 염증반응을 유발시키는 포르말린을 주입하자마자 관찰되는 통증 행위(발을 핥거나 드는 행동)를 0 ~ 10분, 10 ~ 60분대의 시간대로 나누어 관찰한 그래프이다;

Early phase: 포르말린 투여 후 0 ~ 10분 사이;

Late phase: 염증성 반응이 나타나는 10 ~ 60분 사이;

1 Vehicle: 10 μl 생리식염수를 척수강내로 투여한 음성 대조군(n=8);

2 Total saponin 200 μg : 인삼유래 사포닌 추출물 200 μg /래트로 척수강내에 투여한 군(n=4);

3 Compound K 50 μ g: 진세노사이드 Rb1의 대사산물인 Compound K를 50 μ g/래트로 척수강내에 투여한 군(n=4);

4 Rb1 50 μ g: 진세노사이드 Rb1 50 μ g/래트로 척수강내에 투여한 군(n=4); 및

5 Rg3 50 μ g: 진세노사이드 Rg3 50 μ g/래트로 척수강내에 투여한 군(n=3).

도 6은 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 미세신경교세포의 활성화제 효과를 확인한 그림이다:

도 6의 A는 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 경구 투여한 후, 요추 4번 척수 후각부위의 라미나 1, 2번(lamina I, II)에서의 미세신경교세포의 활성화제 효과를 면역조직화학염색법을 이용하여 확인한 그림이다;

Vehicle: 1 ml의 생리식염수를 하루에 한번 경구 투여한 음성 대조군(n=4);

Minocycline: 22.5 mg/kg의 미노사이클린을 하루에 2번 복강 투여한 양성 대조군(n=4);

Rb1: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rb1을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=4);

Compound K: 7 mg/kg의 진세노사이드 Compound K를 하루에 한번 경구 투여한 군(n=4);

Total saponin: 50 mg/kg의 인삼유래 사포닌 추출물을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=4);

Rg3: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rg3을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=4);

도 6의 B는 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 후, 요추 4번 척수 후각부위의 라미나 1, 2번(lamina I, II)에서의 활성화된 미세신경교세포와 비활성화된 미세신경교세포의 비율을 나타낸 그래프이다;

Vehicle: 1 ml의 생리식염수를 경구 투여한 음성 대조군으로서, 도 6의 A에 나타난 Vehicle 그림에서, 점선으로 둘러싸인 조직 부분의 총 67개의 세포수 중, 미세신경교세포의 활성화(막대 그래프의 검정색)와 비활성(막대 그래프의 회색)을 나타낸다(n=4);

Minocycline: 22.5 mg/kg의 미노사이클린을 투여한 양성 대조군으로서, 도 6의 A에 나타난 Minocycline 그림에서, 점선으로 둘러싸인 조직 부분의 총 64개의 세포수 중, 미세신경교세포의 활성화(막대그래프의 검정색)와 비활성(막대그래프의 회색)을 나타낸다(n=4);

Rb1: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rb1을 투여한 군으로서, 도 6의 A에 나타난 Rb1 그림에서, 점선으로 둘러싸인 조직 부분의 총 61개의 세포수 중, 미세신경교세포의 활성화(막대그래프의 검정색)와 비활성(막대그래프의 회색)을 나타낸다(n=4);

Compound K: 7 mg/kg의 진세노사이드 Compound K를 투여한 군으로서, 도 6의 A에 나타난 Compound K 그림에서, 점선으로 둘러싸인 조직 부분의 총 60개의 세포수 중, 미세신경교세포의 활성화(막대그래프의 검정색)와 비활성(막대그래프의 회색)을 나타낸다(n=4);

Total saponins: 50 mg/kg의 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 군(n=4)으로서, 도 6의 A에 나타난 Total saponins 그림에서, 점선으로 둘러싸인 조직 부분의 총 62개의 세포수 중, 미세신경교세포의 활성화(막대그래프의 검정색)와 비활성(막대그래프의 회색)을 나타낸다;

Rg3: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rg3을 투여한 군으로서, 도 6의 A에 나타난 Rg3 그림에서, 점선으로 둘러싸인 조직 부분의 총 66개의 세포수 중, 미세신경교세포의 활성화(막대 그래프의 검정색)와 비활성(막대 그래프의 회색)을 나타낸다(n=4).

도 7은 도 6의 A에서 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 후, 요추 4번 척수 후각부위의 라미나 1, 2번(lamina I, II)에서의 미세신경교세포의 활성화정도를 면역조직염색법을 이용하여 확인한 그림에서 점선으로 둘러싸인 조직 부위를 확대한 그림이다:

Vehicle: 1 ml의 생리식염수를 하루에 한번 경구 투여한 음성 대조군(n=4);

Minocycline: 22.5 mg/kg의 미노사이클린을 하루에 2번 복강 투여한 양성 대조군(n=4);

Rb1: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rb1을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=4);

Compound K: 7 mg/kg의 진세노사이드 Compound K를 하루에 한번 경구 투여한 군(n=4);

Total saponin: 50 mg/kg의 인삼유래 사포닌 추출물을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=4); 및

Rg3: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rg3을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=4).

도 8은 진세노사이드 Rb1, 및 인삼유래 사포닌 추출물의 p-p38MAPK의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 중추 신경병증성 통증 동물모델의 요추 4번 척수를 분리해서 웨스턴 블랏을 수행한 결과이다;

도 8의 A는 중추 신경병증성 통증 동물모델에 진세노사이드 Rb1, 및 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 후, p-p38MAPK의 활성을 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과를 나타내는 그림이다;

Veh: 1 ml의 생리식염수를 하루에 한번 경구 투여한 음성 대조군(n=5);

Min: 22.5 mg/kg의 미노사이클린을 하루에 두번 복용 투여한 군(n=5);

Total-sap: 50 mg/kg의 인삼유래 사포닌 추출물을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5);

Rb1: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rb1을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5);

도 8의 B는 상기 웨스턴 블랏의 결과에서, 대조군의 발현량을 기준으로 p-p38MAPK의 발현량을 수치화한 그래프이다;

Veh: 1 ml의 생리식염수를 하루에 한번 경구 투여한 음성 대조군(n=5);

Minocycline: 22.5 mg/kg의 미노사이클린을 하루에 두번 복용 투여한 군(n=5);

Total saponins: 50 mg/kg의 인삼유래 사포닌 추출물을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5);

Rb1: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rb1을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5); 및

*: $P < 0.05$.

도 9는 진세노사이드 Rb1, 및 인삼유래 사포닌 추출물의 pERK(phosphorylated extracellular signal-regulated kinases)의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 중추 신경병증성 통증 동물모델의 요추 4번 척수를 분리해서 웨스턴 블랏을 수행한 결과이다;

도 9의 A는 중추 신경병증성 통증 동물모델에 진세노사이드 Rb1, 및 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 후, pERK의 활성을 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과를 나타내는 그림이다;

Veh: 1 ml의 생리식염수를 하루에 한번 경구 투여한 음성 대조군(n=5);

Min: 22.5 mg/kg의 미노사이클린을 하루에 두 번 복용 투여한 군(n=5);

Total-sap: 50 mg/kg의 인삼유래 사포닌 추출물을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5);

Rb1: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rb1을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5);

도 9의 B는 상기 웨스턴 블랏의 결과에서, 대조군의 발현량을 기준으로 pERK의 발현량을 수치화한 그래프이다;

Veh: 1 ml의 생리식염수를 하루에 한번 경구 투여한 음성 대조군(n=5);

Minocycline: 22.5 mg/kg의 미노사이클린을 하루에 두번 복용 투여한 군(n=5);

Total saponins: 50 mg/kg의 인삼유래 사포닌 추출물을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5);

Rb1: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rb1을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5); 및

*: $P < 0.05$.

도 10은 진세노사이드 Rb1, 및 인삼유래 사포닌 추출물의 pJNK(phosphorylated c-Jun N-terminal kinases)의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 중추 신경병증성 통증 동물모델의 요추 4번 척수를 분리해서 웨스턴 블랏을 수행한 결과이다;

도 10의 A는 중추 신경병증성 통증 동물모델에 진세노사이드 Rb1, 및 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 후, pJNK의 활성을 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과를 나타내는 그림이다;

Veh: 1 ml의 생리식염수를 하루에 한번 경구 투여한 음성 대조군(n=5);

Min: 22.5 mg/kg의 미노사이클린을 하루에 두 번 복강 투여한 군(n=5);

Total-sap: 50 mg/kg의 인삼유래 사포닌 추출물을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5);

Rb1: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rb1을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5);

도 10의 B는 상기 웨스턴 블랏의 결과에서, 대조군의 발현량을 기준으로 pJNK의 발현량을 수치화한 그래프이다;

Veh: 1 ml의 생리식염수를 하루에 한번 경구 투여한 음성 대조군(n=5);

Minocycline: 22.5 mg/kg의 미노사이클린을 하루에 두 번 복강 투여한 군(n=5);

Total saponins: 50 mg/kg의 인삼유래 사포닌 추출물을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5);

Rb1: 11.5 mg/kg의 진세노사이드 Rb1을 하루에 한번 경구 투여한 군(n=5); 및

*: $P < 0.05$.

도 11은 진세노사이드 Rb1, 및 인삼유래 사포닌 추출물의 말초 신경병증성 통증의 억제효과를 나타낸 그래프이다;

도 11의 A는 말초 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 2주가 경과한 후, 만성통증이 생긴 동물모델에, 본 발명에 따른 인삼유래 사포닌 추출물을 농도별로 척수강내로 투여한 후, 14, 15, 16일째에서 기계적 이질통 테스트를 수행한 결과를 나타내 그래프이다;

○ Vehicle: 1 ml 생리식염수를 투여한 음성 대조군(n=4);

▽ Minocycline; 22.5 mg/kg 미노사이클린을 투여한 양성 대조군(n=4);

□ Rb1: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rb1을 투여한 군(n=4);

◇ Compound K: 7 mg/kg의 진세노사이드 Rb1의 대사 산물을 투여한 군(n=4);

△ Total saponin: 50 mg/kg 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 군(n=4);

⬡ Rg3: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rg3을 투여한 군(n=4);

도 11의 B는 말초 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 2주가 경과한 후, 만성통증이 생긴 동물모델에, 본 발명에 따른 인삼유래 사포닌 추출물을 농도별로 척수강내로 투여한 후, 14, 15, 16일째에서 냉 이질통(cold allodynia) 테스트를 수행한 결과를 나타내 그래프이다;

○ Vehicle: 1 ml 생리식염수를 투여한 음성 대조군(n=4);

▽ Minocycline; 22.5 mg/kg 미노사이클린을 투여한 양성 대조군(n=4);

□ Rb1: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rb1을 투여한 군(n=4);

◇ Compound K: 7 mg/kg의 진세노사이드 Rb1의 대사 산물을 투여한 군(n=4);

△ Total saponin: 50 mg/kg 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 군(n=4);

⬡ Rg3: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rg3을 투여한 군(n=4);

도 11의 C는 말초 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 지, 2주가 경과한 후, 만성통증이 생긴 동물모델에, 본 발명에 따른 인삼유래 사포닌 추출물을 농도별로 척수강내로 투여한 후, 14, 15, 16일째에서 온 이질통(warm allodynia) 테스트를 수행한 결과를 나타내 그래프이다;

○ Vehicle: 1 ml 생리식염수를 투여한 음성 대조군(n=4);

▽ Minocycline; 22.5 mg/kg 미노사이클린을 투여한 양성 대조군(n=4);

□ Rb1: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rb1을 투여한 군(n=4);

◇ Compound K: 7 mg/kg의 진세노사이드 Rb1의 대사 산물을 투여한 군(n=4);

△ Total saponin: 50 mg/kg 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 군(n=4);

○ Rg3: 11.5 mg/kg 진세노사이드 Rg3을 투여한 군(n=4).

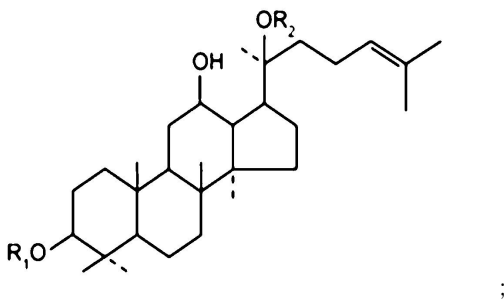
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

본 발명은 인삼(*Panax ginseng*) 유래 추출물 또는 이로부터 분리된 사포닌을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 인삼유래 사포닌 추출물로부터 분리된, 하기 [화학식 1]로 나타내는 화합물을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 치료용 조성물을 제공한다:

[화학식 1]



여기서, R1은 Glc₂-Glc 또는 H이며;

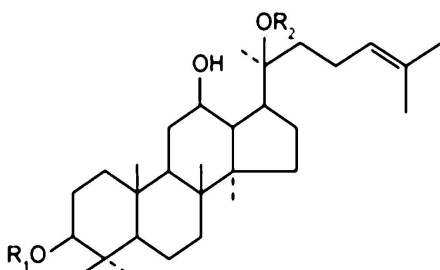
R2는 Glc₆-Glc 또는 H 또는 Glc이다.

상기 신경병증성 통증은 말초 신경 손상 또는 중추 신경 손상에 의해서 유도되는 것이 바람직하며, 말초신경계 이상 또는 손상, 및 척수신경 손상을 포함한 다발성경화증, 삼차 신경통(trigeminal neuralgia), 당뇨병성 신경장애(diabetes neuropathy), 환지통(phantom limb pain), HIV 감염, 암, 알코올 중독, 암 치료인 약물치료(chemotherapy)후에 오는 통증, 비정형 안면통증(atypical facial pain), 포진성 신경통(post herpetic neuralgia), 및 신경학적 장애로부터 야기되는 신경병증성 통증을 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 인삼유래 사포닌 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 염증성 통증을 감소시키는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 조성물은 에스트로겐 수용체를 통하여 통증을 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후, 척수내 미세신경교세포의 활성을 억제하는 것이 바람직하며, 척수 내 p-p38, pERK, 및 pJNK의 활성 또는 발현을 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

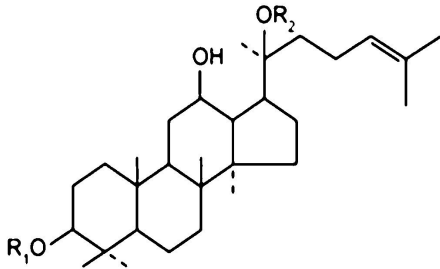
상기 인삼유래 사포닌 추출물로부터 분리된, [화학식 1]로 나타내는 화합물에 있어서, 하기 [화학식 2]로 나타내는 화합물인, 진세노사이드 Rb1의 R1은 Glc₂-Glc이며 R2는 Glc₆-Glc를 갖는 것이 바람직하다:

화학식 2



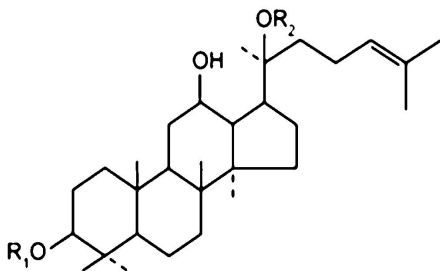
- [0029] 여기서, R1은 Glc₂-Glc이며;
- [0030] R2는 Glc₆-Glc이다.
- [0031] 상기 인삼유래 사포닌 추출물로부터 분리된, [화학식 1]로 나타내는 화합물에 있어서, 하기 [화학식 3]으로 나타내는 화합물인, 진세노사이드 Rg3의 R1은 Glc₂-Glc이며 R2는 H를 갖는 것이 바람직하다:

화학식 3



- [0032]
- [0033] 여기서, R1은 Glc₂-Glc이며;
- [0034] R2는 H이다.
- [0035] 상기 인삼유래 사포닌 추출물로부터 분리된, [화학식 1]로 나타내는 화합물에 있어서, 하기 [화학식 4]로 나타내는 화합물인, 진세노사이드 Compound K의 R1은 H이며 R2는 Glc를 갖는 것이 바람직하다:

화학식 4



- [0036]
- [0037] 여기서, R1은 H이며;
- [0038] R2는 Glc이다.
- [0039] 상기 인삼유래 사포닌 추출물은 하기와 같은 단계로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [0040] 1) 건조한 인삼(*Panax ginseng*)에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0041] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및
- [0042] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축하는 단계.
- [0043] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 인삼은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0044] 상기 추출 용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물, 바람직하게는 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매

로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 70% 에탄올 수용액을 사용하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 용매의 양은 인삼 건조 중량의 2 내지 15 배로 한다. 상기 추출 방법은 열수추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 및 냉침 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 냉침 추출방법이 될 수 있다. 추출시 온도는 10℃ 내지 100℃ 인 것이 바람직하며 상온인 것이 더욱 바람직하다. 상기 추출 시간은 30분 내지 4시간이며, 바람직하게는 1 ~ 2시간이다.

[0045] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0046] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 신경병증성 통증억제 효과를 확인하고자, 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제작한 후, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 투여하였다. 그 결과, 투여에 의한 운동기능의 변화는 관찰되지 않았으나, 기계적 이질통 및 열 통각과민에 대한 통증 억제 효과가 관찰되었으며, 이러한 효과는 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물 모두에서 관찰되었다(도 2 참조).

[0047] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 인삼유래 사포닌 추출물의 투여농도에 따른 통증 억제효과를 확인하고자, 20, 50, 100, 및 200 μ g을 중추 신경병증성 통증 동물모델에 투여하였을 때, 20 μ g과 50 μ g 농도는 전혀 효과를 보이지 않았으며 100 μ g과 200 μ g 농도에서 농도 의존적으로 진통효과를 나타냈다(도 3 참조).

[0048] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 인삼유래 사포닌 추출물의 통증 억제효과의 구체적인 메커니즘을 확인하기 위하여, 중추 신경병증성 통증 동물모델에 에스트로겐 길항제를 진세노사이드 Rb1 또는 인삼유래 사포닌 추출물과 함께 투여하였다. 그 결과, 에스트로겐 길항제를 함께 투여하였을 때, Rb1 또는 인삼유래 사포닌 추출물 투여시 관찰되는 통증 억제효과가 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과를 통해서 본 발명의 진세노사이드 Rb1, 및 인삼 유래 사포닌 추출물의 진통효과가 에스트로겐 수용체를 통하여 매개됨을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

[0049] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 중추 신경의 손상 및 말초 신경의 손상에 의한 통증뿐만 아니라, 염증으로 인한 통증에 있어서, 본 발명의 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 통증 억제효과를 관찰하였다. 그 결과, 포르말린을 피하로 투여한 후, 염증 반응이 나타나기 시작하는 10분에서 60분 사이, 염증 반응이 대조군에 비하여 현저하게 감소시킴을 확인할 수 있었다(도 5 참조).

[0050] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 중추 신경병증성 통증 동물모델에서 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 각각 투여한 후, 미세신경교세포의 활성화를 관찰하였다. 미세신경교세포 마커인 OX-42를 이용하여, 척수 후각부위의 라미나(lamina) I, II 부위를 면역 염색하여 관찰한 결과, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 군에서 활성화된 미세신경교세포의 수가 감소함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물이 미세신경교세포의 활성화 억제를 통하여 통증을 억제한다는 것을 보여주는 것이다(도 6 및 도 7 참조).

[0051] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 중추 신경병증성 통증 동물모델에 진세노사이드 Rb1, 및 인삼유래 사포닌 추출물을 투여에 의한 p-p38MAPK, pERK, 및 pJNK의 활성을 살펴보았다. p-p38MAPK, pERK, 및 pJNK의 활성화는 미세신경교세포 활성화에 밀접한 관계가 있다고 알려져 있으며, 이러한 연구 결과에 근거하여 중추 신경병증성 통증 동물모델의 요추 4번 척수를 분리해서 웨스턴 블랏을 수행하였을 때, 도 8 내지 도 10에 나타난 바와 같이, 본 발명의 인삼유래 사포닌 추출물 및 Rb1을 투여군에서 대조군에 비하여 유의적으로 p-p38MAPK, pERK, 및 pJNK의 발현이 감소되었다. 또한, 이러한 발현은 양성 대조군으로 사용한 미노사이클린(minocycline)에 비하여 더욱 효과적으로 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(도 8 내지 10 참조).

[0052] 아울러, 본 발명에서 말초 신경을 제거하여 제조한 말초 신경병증성 통증 모델을 이용하여, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 통증 억제 효과를 확인한 결과, 중추 신경병증성 동물모델과 유사하게, 기계적 이질통, 열 및 냉 통각과민에 대한 통증 억제 효과가 관찰되었으며, 이러한 효과는 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물 모두에서 관찰되었다(도 11 참조).

[0053] 따라서, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물은 각 성분이 모두

척수 손상 후 유발될 수 있는 신경병증성 통증 및 염증으로 유발되는 통증에 대한 억제효과를 보이므로, 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 유효성분으로 함유하는 조성물을 신경병증성 통증의 예방 및 치료용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 척수손상 예방 및 치료용 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 인삼유래 사포닌 추출물을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 인삼유래 사포닌 추출물을 함유하는 조성물은 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0055] 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡셀제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0056] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

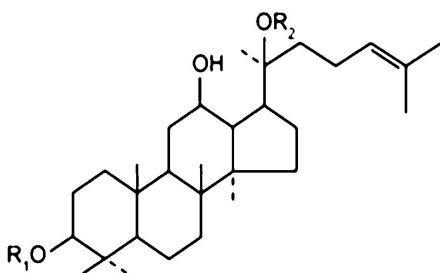
[0057] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로스테라틴 등이 사용될 수 있다.

[0058] 또한, 상기 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면, 척수강내, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명은 인삼(*Panax ginseng*)유래 사포닌 추출물 또는 이로부터 분리된 사포닌을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0060] 아울러, 본 발명은 인삼유래 사포닌 추출물로부터 분리된, 하기 [화학적 1]로 나타내는 화합물을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다:

[0061] [화학적 1]



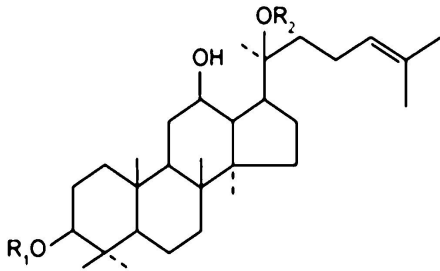
[0062] ;

[0063] 여기서, R1은 Glc₂-Glc 또는 H이며;

[0064] R2는 Glc₆-Glc 또는 H 또는 Glc이다.

[0065] 상기 인삼유래 사포닌 추출물로부터 분리된, [화학식 1]로 나타내는 화합물에 있어서, 하기 [화학식 2]로 나타내는 화합물인, 진세노사이드 Rb1의 R1은 Glc₂-Glc이며 R2는 Glc₆-Glc를 갖는 것이 바람직하다:

[0066] [화학식 2]



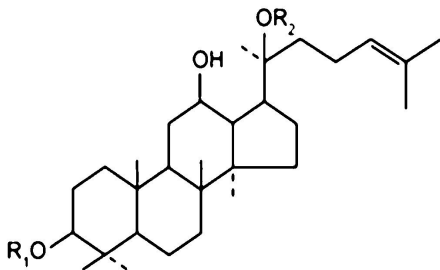
[0067] ;

[0068] 여기서, R1은 Glc₂-Glc이며;

[0069] R2는 Glc₆-Glc이다.

[0070] 상기 인삼유래 사포닌 추출물로부터 분리된, [화학식 1]로 나타내는 화합물에 있어서, 하기 [화학식 3]으로 나타내는 화합물인, 진세노사이드 Rg3의 R1은 Glc₂-Glc이며 R2는 H를 갖는 것이 바람직하다:

[0071] [화학식 3]



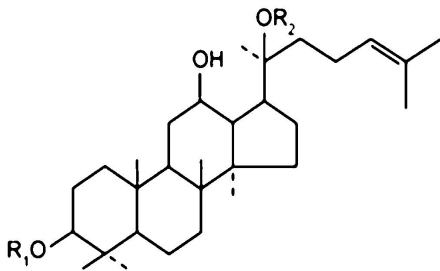
[0072] ;

[0073] 여기서, R1은 Glc₂-Glc이며;

[0074] R2는 H이다.

[0075] 상기 인삼유래 사포닌 추출물로부터 분리된, [화학식 1]로 나타내는 화합물에 있어서, 하기 [화학식 4]로 나타내는 화합물인, 진세노사이드 Compound K의 R1은 H이며 R2는 Glc를 갖는 것이 바람직하다:

[0076] [화학식 4]



[0077] ;

[0078] 여기서, R1은 H이며;

[0079] R2는 Glc이다.

- [0080] 상기 신경병증성 통증은 말초 신경 손상 또는 중추 신경 손상에 의해서 유도되는 것이 바람직하며, 말초신경계 이상 또는 손상, 및 척수신경 손상을 포함한 다발성경화증, 삼차 신경통(trigeminal neuralgia), 당뇨병 신경장애(diabetes neuropathy), 환지통(phantom limb pain), HIV 감염, 암, 알코올 중독, 암 치료인 약물치료(chemotherapy)후에 오는 통증, 비정형 안면통증(atypical facial pain), 포진성 신경통(post herpetic neuralgia), 및 신경학적 장애로부터 야기되는 신경병증성 통증을 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 인삼유래 사포닌 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 염증성 통증을 감소시키는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0081] 상기 조성물은 에스트로겐 수용체를 통하여 통증을 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후, 척수내 미세신경교세포의 활성을 억제하는 것이 바람직하며, 척수 내 p-p38, pERK, 및 pJNK의 활성 또는 발현을 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0082] 본 발명의 실시예를 통하여, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 각각 함유하는 조성물이 중추 신경 손상 및 말초 신경 손상으로 유발된 통증뿐만 아니라, 염증에 의해서 유발되는 통증을 억제하는 효과가 관찰되었으며, 이러한 통증의 감소효과는 에스트로겐 수용체에 의해서 매개되며, 또한 염증과 관련된 p-p38MAPK, pERK, 및 pJNK의 발현을 감소시킴으로써 나타남을 확인하였다.
- [0083] 따라서, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 유효성분으로 함유하는 조성물을 신경병증성 통증의 예방 및 개선용 건강 기능 식품으로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0084] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.
- [0085] 본 발명의 인삼유래 사포닌 추출물은 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 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 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 유효 성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0086] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 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 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0087] 상기 외에 본 발명의 인삼유래 사포닌 추출물은 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. 그밖에 본 발명의 인삼유래 사포닌 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 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 인삼유래 사포닌 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0088] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.
- [0089] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및

제조예에 한정되는 것은 아니다.

[0090] <실시예 1> 인삼유래 사포닌 추출물의 제조

[0091] 인삼유래 사포닌 추출물은 6년근 수삼 1 kg(충남 금산)을 70% 에탄올로 실온에서 냉침으로 추출한 후, 동결 건조한 분말을 물 또는 완충용액에 녹여 사용하였다.

[0092] <실시예 2> 인삼유래 사포닌 추출물로부터 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K 성분의 분리

[0093] 6년근 수삼 1 kg(충남 금산)을 적당한 크기(1 ~ 2cm)로 세절하고 헥산(Hexane) 10 ℓ 로 탈지하여 버리고, 잔사에 메탄올(MeOH) 10 ℓ 로 5회 추출한 후 이를 감압농축하여 120 g을 얻었다. 이를 물 500 ml에 녹인 후 부탄올(BuOH) 3 ℓ 로 4회 추출, 농축하여 인삼 부탄올 분획 85g을 얻었다(인삼 총분획). 이 분획을 물 8.5 L에 현탁하고 미리 brain heart infusion mediu(Difco co., U.S.A.)에서 배양한 Bacteroides stercoris HJ-15 각 200 g(습식중량)을 넣어 37℃에서 5일간 배양한다. 이어서 부탄올 20 ℓ 로 4회 추출하고 농축하여 가공처리된 인삼 분획 45 g을 얻었다.

[0094] 이를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피[컬럼사이즈 : 5 × 80 cm, 전개용매 : CH₂Cl₂:methanol(20:1→20:2→20:3→20:4→20:5→20:6, each 1 L)]로 분획 1-6을 얻고 이중 분획 3(3.1 g)과 분획 6(10.3 g)을 각각 다시 silica gel columns [컬럼사이즈 : 3 × 50 cm, 전개용매CHCl₃ : methanol : H₂O(65:35:10, lower layer) 2 L]을 이용하여 Compound K[20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol, 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토판사다이어](120 mg)와 ginsenoside Rb1(1.2 g)을 분리하였다.

[0095] Ginsenoside Rb1 White needle, m.p. 197-198°C(dec.) FAB-MS(m/z) 1110 [M+1]⁺

[0096] Ginsenoside Rg3 White needle, m.p. 248-250°C(dec.) FAB-MS(m/z) 786[M+1]⁺

[0097] Compound K White needle, m.p. 219-221° C, FAB-MS m/z: 623 [M+1]⁺

[0098] 인삼 건조물 2 g을 취하여 메탄올 100 ml씩 3회 추출하였다. 이 추출물을 감압 농축시킨 후에 이에 물 100 ml을 넣어 현탁시키고, 에테르 100 ml씩으로 3회 추출하고 감압 농축시켰다. 이어서 부탄올 100 ml씩으로 3회 추출하고 감압 농축시킨 후에 수득된 농축물을 메탄올 100 ml에 용해시켜 사포닌 분획 100 mg을 얻고 각 진세노사이드의 함량은 HPLC [YoungLin HPLC system: 컬럼, Lichrosorb NH₂25 × 0.4 cm, 5 mm, Merck Co., U.S.A.); 용출용매, 용매 A(acetonitrile / water / isopropanol = 80:5:15)와 용매 B(acetonitrile / water / isopropanol = 80 : 20 : 15)의 혼합용매, 용매 A와 용매 B 용매 구배율: 0-20 min, 용매 A: 용매 B = 70 : 30에서 0:100 및 20-60 min, 용매 A: 용매 B = 0:100; Detector, ELSD800(Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, U.S.A.)].

[0099] 인삼 내에 포함되어 있는 전체 사포닌의 종류 및 함량은 하기 표 1과 표 2에 기재되어 있다. Rb1은 인삼 및 홍삼 내에, Rg3은 홍삼 내에 함유되어있고, Compound K는 인삼 혹은 홍삼이 체내에 흡수되어 변환되는 대사산물이다.

표 1

[0100] 인삼의 각 사포닌 함량과 인삼을 썬 홍삼으로 만들 때 온도에 따른 사포닌의 함량(w/w,%)

인삼		홍삼		
		100° c	110° c	120° c
Rb1	0.56±0.03	0.50±0.03	0.30±0.03	0.12±0.03
Rb2	0.52±0.03	0.44±0.04	0.26±0.04	0.10±0.03
Rc	0.65±0.03	0.57±0.05	0.40±0.08	0.17±0.06

Rd	0.28±0.04	0.27±0.03	0.20±0.04	0.14±0.08
Re	0.38±0.03	0.30±0.04	0.08±0.02	0.02±0.01
Rf	0.11±0.02	0.12±0.03	0.10±0.04	0.10±0.04
Rb1	0.39±0.02	0.35±0.02	0.27±0.04	0.22±0.04
Rg2	0.13±0.01	0.20±0.02	0.32±0.05	0.30±0.03
Rg3	n.d. *	0.24±0.03	0.62±0.06	1.32±0.14
Rg5	n.d. *	0.15±0.03	0.35±0.05	0.64±0.08

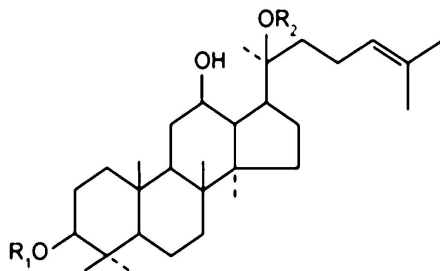
표 2

인삼 내 전체(주요)사포닌의 구성 비율

사포닌의 종류	구성비(%)
ginsenoside Ra	3.3
ginsenoside Rb1	22.9
ginsenoside Rb2	10.9
ginsenoside Rc	11.9
ginsenoside Rd	6.8
ginsenoside Rh2	0.1
ginsenoside Re	14.8
ginsenoside Rf	4.3
ginsenoside Rb1	18.6
ginsenoside Rg2	3.3
ginsenoside R0	2.3

진세노사이드 Rb1, Rg3 및 Compound K의 구조는 하기와 같다고 발표되었다(Bae et al., 2010, J Neurochem).

[화학식 1]



여기서, R1은 Glc₂-Glc 또는 H이며;

R2는 Glc₆-Glc 또는 H 또는 Glc이다.

<실시예 3> 동물의 사육 조건

7주령의 성체 수컷 래트(체중 220 ~ 250g)(샘타고, 경기도 오산)를 사용하였다. 이 동물은 12시간 주기의 명암 사이클실에서 사육하였고 물과 먹이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 이하의 실험은 경희대학교(Kyung Hee University) 동물 실험 지침에 따라 실시하였다.

<실시예 4> 중추 신경병증성 통증 동물 모델의 제작

클로랄 하이드레이트(chloral hydrate, 500 mg/kg)를 복강 주입하여 마취한 후에 척수 T8-T10 부분을 노출시켰다. 척수손상 동물 모델로서 10g 무게의 추를 일정 높이에서 떨어뜨려 인간 척수손상과 유사한 외상을 주고, 외상 강도를 컴퓨터에서 수치화할 수 있게 고안된 NYU impactor를 사용하였다. NYU impactor의 클램프에 래트를 고정시킨 다음, 25 mm 높이에서 10 g 무게의 추를 자유낙하 시켜 척수 T9 부위에 손상을 주었다. 컴퓨터에

나타나는 손상 강도에 대한 데이터를 통하여 정해진 오차 범위 내에 일정한 손상이 가해진 것을 확인한 후 상처 부위를 봉합하였다. 상처부위를 포비돈 용액으로 소독한 후, 2마리씩 케이지(cage)에 넣어 사육하였고, 하루 3 회 인위적으로 방광을 마사지하여 배뇨를 도왔다.

[0111] <실시에 5> 말초 신경병증성 통증의 동물모델의 제작

[0112] 래트(Sprague-Dawley rats, 150 ~ 200g) 수컷을 4% 이소플루란(isoflurane)과 96% 산소의 혼합가스로 마취를 유도한 후, 수술 전 과정에 걸쳐 2 ~ 3% 이소플루란과 96% 산소 혼합가스로 마취를 유지시켰다. 꼬리에 신경병 증성 통증을 유발시키기 위해 래트의 꼬리에 분포하는 상, 하미간(superior, inferior caudal trunk)을 노출시키고, 도 1에 나타난 바와 같이 제 1, 2 천수신경 사이에서 1 ~ 2 mm를 잘라낸다(Na 등, 1994)(도 1).

[0113] <실험예 1> 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 및 인삼 유래 사포닌 추출물의 중추 신경병증성 통증 억제 효과

[0114] 상기 <실시에 4>에서 척수손상과 유사한 외상을 가한 후, 제조된 중추 신경병증성 통증 동물모델을 이용하여, 신경병증성 통증의 유발과 본 발명의 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 및 인삼 유래 사포닌 추출물의 중추 신경병증성 통증 억제효과를 확인하기 위해 행위반응 테스트를 실시하였다. 구체적으로 척수손상 후 약 28 일까지 BBB locomoter test 및 손상 후 유도되는 통증반응을 관찰하였으며, 28, 29, 30일에 통증 행동 테스트를 실시하여 3일 동안의 평균값을 pre로 간주하였다. 그 중 신경병증성 통증이 완전히 유도된 래트를 선별하여 척수손상 후 31일째, 32일째, 및 33일째에 통증 행동 테스트를 실시하였다.

[0115] 상기 <실시에 4>의 방법에 따라 척수손상 후 신경병증성 통증이 생긴 중추 신경병증성 통증 동물 모델에게 인삼 유래 사포닌 추출물(50 mg/kg, n=4) 및 이로부터 분리된 단일화합물 Rb1(11.5 mg/kg, n=4), Rg3(11.5 mg/kg, n=4), Compound K(7 mg/kg, n=4)를 각각 경구 투여하여 신경병증성 통증 억제효과를 측정하였다. 음성대조군(vehicle, n=6)은 인삼유래 사포닌 추출물을 포함하지 않은 생리식염수를 1 ml로 경구투여 하였고, 양성대조군은 미노사이클린(minocycline)(22.5 mg/kg씩 하루 2번, 복강주사, n=6)를 이용했다.

[0116] 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 및 인삼 유래 사포닌 추출물 투여 전에 통증을 확인하였으며, 약물 투여 후 모든 행동 검사는 약제 투여 여부를 모르는 연구자에 의해 맹검법(blind study)으로 시행되었다.

[0117] <1-1> BBB 운동 기능 테스트

[0118] 테스트는 운동기능을 조절하는 다양한 신경 다발의 회복정도를 복합적으로 평가할 수 있는 실험 방법으로서, 0 부터 21까지 점수를 나누어 뒷다리를 전혀 사용하지 못하는 경우 0점, 정상 래트의 경우 21점을 주어 점수가 높아질수록 운동기능이 향상되었음을 나타낸다. 척수 외상을 주기 3일 전부터 하루에 한번, 한 마리당 4분씩 가로 90 cm × 세로 90 cm × 높이 7 cm의 플라스틱 오픈 필드 상자에 래트를 올려놓고 상자 안에서 자유롭게 돌아다니도록 하여 실험 환경에 대한 사전 적응 훈련을 실시하였다.

[0119] 척수 외상을 준 후 31일째부터 연속 3일 동안 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼 유래 사포닌 추출물을 투여한 후, 동물실험에 대한 개인의 편견을 배제하기 위하여 테스트에 임하는 실험자들은 각 래트에 대한 정보를 알지 못하게 하였고, 각 쥐에 대해 4분씩 관찰하여 점수를 냈다.

[0120] 그 결과, 도 2의 A에 나타난 바와 같이, 중추 신경병증성 통증 동물모델에 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 각각 3일 동안(척수 손상 후, 31일째, 32일째, 및 33일째) 투여하였을 때, 운동기능 정도를 측정한 BBB 전수는 모든 그룹의 평균값이 9.2 ± 0.7 로 그룹간 차이가 없었다(도 2의 A).

[0121] <1-2> 기계적 이질통(mechanical allodynia)의 측정

[0122] 본 발명자들은 기계 자극에 대한 통증 변화를 측정하여, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 통증 행동의 감소나 완화 효과를 측정하고자 하였다.

[0123] 실험동물은 철망(3 mm × 3 mm) 위의 투명한 플라스틱 박스(10 cm × 10 cm) 아래에 두었다. 적응은 감각 테스트

트 시작 전 적어도 20분 동안 시켰다. 본프레이 필라멘트(von-Frey filaments)는 양쪽 발바닥에 적용하였다. 촉각(기계적) 민감도는 로그로 증가되는 뾰뾰한 나일론 본프레이 단일 필라멘트 시리즈(3.61, 3.84, 4.08, 4.31, 4.56, 4.74, 4.93 and 5.18mN, Stoelting, WoodDale, IL, USA; equivalent in grams to 0.4, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 15.0)를 사용하였다. 증가된 기계적 자극에 대한 발의 회피반응은 힘을 충분히 가함으로써 평가하였다. 본프레이 필라멘트는 완전히 구부러질 정도로 각 발에 3-4초 동안 적용되었다. 50% 문턱값은 up-down 방법(Chaplan et al. 1994)을 사용하여 확인하였다.

[0124] 요약하면, 0.4 ~ 15 g의 8개 본프레이 필라멘트 가운데 중간인 2.0 g(4.31 mN)의 필라멘트를 처음으로 사용하였으며, 여러 부위에서 가장 민감한 부위를 확인하는 것으로 시작했다. 만약 발의 회피반응이 나타나지 않는다면 그 다음 굵기의 필라멘트로 반복하였다. 만약 반응이 있다면 더 약한 필라멘트로 그 민감한 부위에 적용한다. 자극은 2초 간격으로 행하였다.

[0125] 도 2의 B에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 중추 신경병증성 동물모델을 제조한 지 4주가 경과한 후, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1, Rg3, 및 Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 투여하지 않은 상태에서 무게가 있고 탄성이 있는 필라멘트(filament)로 동물모델의 발바닥에 자극을 주었을 때, $2.9 \pm 0.1g$ 에서 발을 들어 올렸다. 이는 본 발명에서 제조한 중추 신경병증성 동물모델에서 신경병증성 통증이 현저하게 유발되었음을 의미한다.

[0126] 본 발명의 중추 신경병증성 동물모델에서 통증이 유발됨을 확인한 후, 본 발명에 따른 진세노사이드 및 인삼유래 사포닌 추출물의 진통효과를 확인하였다. 그 결과, 도 2의 B에 나타난 바와 같이, 인삼유래 사포닌 추출물의 경우, 3일 동안 반복으로 투여한 경우에 진통효과가 나타난 반면, Rb1, Compound K는 처치가 반복될수록 진통효과가 서서히 나타났으며, 투여 마지막 날인 3일째에 가장 좋은 효과를 나타냈다. Rg3은 경구투여 3일째부터 신경병증성 통증 억제효과가 나오기 시작했다(도 2의 B). 양성대조군인 미노사이클린은 22.5 mg씩 하루에 두 번 처치해서 3일 내내 기계적 자극에 대해 통증반응을 감소시킴으로써 현저한 진통효과를 보여줬다.

[0127] <1-3> 열 통각과민(heat hyperalgesia)의 측정

[0128] 본 발명자들은 온도 자극에 대한 통증 변화를 측정하여, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 통증 행동의 감소나 완화 여부를 측정하고자 하였다.

[0129] 열 민감성은 Hargreaves et al.(1988)의 방법으로 발바닥 검사 장치를 사용하여 평가하였다. 유리판 위에 중추 신경병증성 통증 동물모델을 아크릴 박스 내에서 적어도 20분 정도 적응시켰다. 유리판 아래에는 위치 이동 가능한 레이저 빔이 나오는 장치로 실험동물의 발바닥 표면에 맞출 수 있게 되어있다. 그 빔의 열 강도는 약 15초의 평균 발 회피 잠복기를 얻어서 조절되었고 제한 시간은 조직 손상을 막기 위해 20초로 맞췄다. 3번의 열 자극은 5 ~ 10분 간격으로 양쪽 발에 주었다. 세 번 시도한 각 발의 발 회피 잠복기의 평균은 발 회피의 정도를 나타냈다.

[0130] 본 발명에 따른 중추 신경병증성 통증 동물모델에서 열 통각과민 테스트를 수행하여 통증 유발을 확인한 결과, 도 2의 C에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 중추 신경병증성 동물모델을 제조한 지 4주가 경과한 후, 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1, Rg3, 및 Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 투여하지 않은 상태에서 중추 신경병증성 통증 동물모델의 발바닥에 열빔으로 자극을 주었을 때, 6.4초 버티다가 발을 들어 올림을 확인하였다. 이는 본 발명에서 제조한 중추 신경병증성 동물모델에서 신경병증성 통증이 현저하게 유발되었음을 의미한다.

[0131] 본 발명의 중추 신경병증성 동물모델에서 통증이 유발됨을 확인한 후, 본 발명에 따른 진세노사이드 및 인삼유래 사포닌 추출물의 진통효과를 확인하였다. 도 2의 C에 나타난 바와 같이, 인삼유래 사포닌 추출물의 경우, 3일 동안 반복으로 투여한 경우에 진통효과가 나타난 반면, Rb1, Compound K는 처치가 반복될수록 진통효과가 서서히 나타났으며, 투여 마지막 날인 3일째에 가장 좋은 효과를 나타냈다. Rg3은 경구투여 3일째부터 신경병증성 통증 억제효과가 나오기 시작했다(도 2의 C).

[0132] 양성대조군인 미노사이클린은 하루에 2번 처치해서 3일 내내 열적 자극에 대해 통증반응을 감소시킴으로써 현저한 진통효과를 보였다.

[0133] 또한, 도 2의 D에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 인삼유래 사포닌 추출물 및 단일 화합물을 각각 투여한 경우, BBB 수치, 기계적 이질통, 및 열 통각과민을 측정한 결과를 비교하였다. BBB 수치의 경우, 모든 실험군(음

성 및 양성 대조군, 인삼유래 사포닌 추출물, Rb1, Rg3, 및 Compound K)에서 차이가 보이지 않았으나, 기계적 이질통의 경우, 진세노사이드 Rb1, 및 Compound K를 투여한 군에서 양성대조군으로 사용한 미노사이클린과 유사하게 통증을 대조군에 비하여 유의적으로 억제하는 효과가 관찰되었다. 열 통각과민인 경우도 Rb1 및 Compound K가 양성 대조군인 미노사이클린과 유사하게 통증을 유의적으로 억제하는 효과가 관찰되었다(도 2의 D).

[0134] <실험예 2> 인삼유래 사포닌 추출물 농도에 따른 중추 신경병증성 통증의 억제효과 확인

[0135] 본 발명자들은 인삼유래 사포닌 추출물의 투여 농도에 따른 통증 억제효과를 확인하고자, 상기 <실시예 4>에서 제조된 중추 신경병증성 통증 동물모델에 인삼유래 사포닌 추출물을 20, 50, 100, 200 μg 을 각각 1회 복강내로 투여한 후, 4시간 동안 통증의 억제효과를 관찰하였다.

[0136] 그 결과, 도 3의 A에 나타난 바와 같이, 중추 신경통증성 동물모델을 제조한 후 4주가 지난 "pre" 상태에서 인삼유래 사포닌 추출물 20, 50, 100, 및 200 μg 을 척수강내로 투여했을 때, 기계적 이질통에 대한 진통효과는 100 μg 과 200 μg 농도에서 농도 의존적으로 진통효과를 나타냈다(도 3의 A).

[0137] 또한, 도 3의 B에 나타난 바와 같이, 열 통각과민 테스트에서는 200 μg 농도에서만 투여 후 1시간째에 그 효과를 보였다(도 3의 B).

[0138] 아울러, 20 μg 의 저농도에서 200 μg 의 고농도까지의 인삼유래 사포닌 추출물을 척수강내로 주입하였을 때 실험 동물이 운동기능이 저하되어 움직임이 떨어진다거나 진정작용(sedation)과 같은 행동이 보이지 않았다. 따라서 사포닌 추출물의 고농도에 의한 독성의 영향은 전혀 없었다는 것을 알 수 있었다.

[0139] <실험예 3> 에스트로겐 길항제의 중추 신경병증성 통증감소 억제 효과

[0140] 본 발명자들은 진세노사이드 Rb1과 Compound K 및 인삼유래 사포닌 추출물의 단일주입의 실험결과 확인 후 이들의 진통 작용이 에스트로겐 수용체와 관련성이 있는지 확인하기 위해 에스트로겐 길항제인 ICI 180782를 중추 신경병증성 통증 동물모델에 척수강내로 1회 투여하였다.

[0141] 우선 상기 <실시예 4>의 중추 신경병증성 통증 동물모델을 제조한 후 4주가 경과한 후, 요추신경 5 ~ 6번 사이의 척추뼈 돌기 사이 지주막하내에 인삼유래 사포닌 추출물(200 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$), Rb1(50 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$)을 각각 주입한 단일주입의 영향을 알아보았고, 에스트로겐 길항제 ICI(50 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$)와 인삼유래 사포닌 추출물 또는 Rb1과 동시투여를 하여 에스트로겐 수용체와 진통작용과의 관련성을 알아보았다.

[0142] 도 4에 나타난 바와 같이, 기계적 이질통(mechanical allodynia)을 검사한 결과, 본 발명에 따른 인삼유래 사포닌 추출물 또는 진세노사이드 Rb1을 각각 투여한 후, 1시간에서 4시간 동안 관찰했을 때, 투여 1시간 후 가장 강력한 진통효과가 관찰되었으며, 이는 통계적인 유의성($p < 0.05$)을 보였다. 에스트로겐 길항제를 인삼유래 사포닌 추출물 또는 진세노사이드 Rb1과 함께 투여하였을 경우, 이러한 진통효과가 나타나지 않았다(도 4의 A 및 B).

[0143] 또한, 열 통각과민(heat hyperalgesia)을 검사한 결과, 본 발명에 따른 인삼유래 사포닌 추출물 또는 진세노사이드 Rb1을 각각 투여한 후, 1시간에서 4시간 동안 관찰했을 때, 투여 1시간 후 가장 강력한 진통효과가 관찰되었으며, 이는 통계적인 유의성($p < 0.05$)을 보였다. 그러나, 에스트로겐 길항제를 인삼유래 사포닌 추출물 또는 Rb1과 함께 투여한 경우, 이러한 진통효과가 관찰되지 않았다. 따라서, 이러한 기계적 자극 및 열 자극에 대한 통증반응을 관찰한 결과, 인삼유래 사포닌 추출물과 진세노사이드 Rb1이 에스트로겐 수용체를 통해 통증효과를 매개한다는 것을 알 수 있다.

[0144] <실험예 4> 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 염증성 통증 억제 효과

[0145] 본 발명자들은 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 염증성 통증 억제효과를 측정하고자, 한쪽 발등 피하에 5% 포르말린 용액 50 μl 를 주입한 주령의 성체 수컷 래트(체중 200 ~ 250 g)를 이용하였다.

[0146] 구체적으로, 본 발명의 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 포르말린을 주입하기 30분 전에 각각 주입한 후, 포르말린 용액을 성체 수컷 래트의 발등에 주입 30분 후에 바로 쥐의 발을 핥

거나(licking time), 발을 드는 시간(lifting time)을 측정하였다. 인삼유래 사포닌 추출물은 200 μg /래트(n=4), Rb1 50 μg /래트(n=3), Rg3 50 μg /래트(n=3), Compound K 50 μg /래트(n=4)의 농도로 척수강내로 주입하였다. 대조군은 사포닌 추출물 없이 생리식염수만 투여했다(n=8). 30분 후, 포르말린 용액을 주입하자마자, 투명한 아크릴 박스 내에 둔 후 1시간 동안 5분 간격으로 발을 드는 시간(lifting duration), 핥는 시간(licking duration)을 측정하였다.

[0147] 약물을 처치하지 않은 대조군은 약물처치 없이 포르말린만 발등 피하로 주입하였고 주입하자마자 통증성 행위반응을 측정하였다. 통증성 행위반응 측정은 상기 <실시예 1>에 기재된 기계적 이질통 및 열 통각과민 측정 방법과 동일하게 실시하였다.

[0148] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 포르말린 투여 후 0 ~ 10분 사이(Early phase)에서는 그룹 간 유의성이 없었으며, 염증성 반응이 나타나는 10 ~ 60분 사이(Late phase)에서는 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 각각 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의성(p<0.05) 있는 염증성 통증 억제효과가 나타남을 확인하였다. 실험군에서 나타난 염증반응시간이 대조군에 비해 인삼유래 사포닌 추출물은 50% 이하, Rb1은 7% 이하, Rg3은 30% 이하, Compound K는 20% 이하로 줄었다. 이러한 결과는 인삼유래 사포닌 추출물 및 이로부터 분리한 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K가 신경병증성 통증뿐만 아니라 염증성 통증을 억제시킨다는 것을 의미한다(도 5).

[0149] <실험예 5> 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 미세신경 교세포의 활성화 억제 효과

[0150] 본 발명에 따른 중추 신경병증성 동물모델에서 인삼유래 사포닌 추출물에 의한 척수 후각부위의 lamina I, II(요추 4번)에서의 미세신경교세포의 활성화 억제효과를 확인하기 위해서 인삼유래 사포닌 추출물(50 mg/kg, n=4) 및 이로부터 분리된 진세노사이드 Rb1(11.5 mg/kg, n=4), Rg3(11.5 mg/kg, n=4), Compound K(7 mg/kg, n=4)를 각각 삼차 증류수에 녹여 실험동물에게 하루에 1번씩 3일 동안 경구 투여하고, 마지막 3일째 경구 투여 1시간 후, 조직을 얻어 면역조직화학염색법을 실시하였다. 음성 대조군은 생리식염수를 1 ml씩 하루에 1번씩 3일 동안 경구 투여하였으며(n=4), 양성 대조군은 미노사이클린을 22.5 mg/kg의 용량으로 하루에 2번 복강주사로 3일간 투여하였다(n=4).

[0151] 미세신경교세포의 마커인 OX-42로 항원-항체반응을 시켜 실험군과 대조군의 활성화된 미세신경교세포의 수를 비교하였다.

[0152] 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 인삼유래 사포닌 추출물, vehicle, 및 미노사이클린의 투여 마지막 날 약물 투여 한 시간 후, 펜토바비탈나트륨(sodium pentobarbital)(50 mg/kg)을 복강 내에 주사하여 마취하고, 0.9% 생리식염수 용액을 좌심실을 통해 대동맥에 관류하여 혈관 내의 혈액을 씻어낸 후 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 함유하는 0.1몰의 인산 완충액으로 경심적으로 관류 고정하였다. 그 후 요추 신경 4번 척수신경을 적출하였고 이 조직을 고정액에 2시간 후고정(postfixation)한 후, 4℃의 30% 슈크로스(sucrose) 용액에 2 ~ 3일간 담귀 조직이 가라앉을 때까지 보관하였다. 적출한 조직은 냉동박절기를 이용하여 척수를 10 mm로 자른 후, 젤라틴으로 코팅된 슬라이드에 붙여 사용 전까지 냉동 보관하였다.

[0153] 10 mm 두께로 자른 척수 절편을 미세신경교세포 마커인 OX-42에 대한 항체를 사용하여 ABC(Avidin-biotin-peroxidase complex) 방법으로 면역조직-화학염색을 시행하였다(Hsu 등, 1981). 조직의 투과성을 높이기 위하여 0.3% Triton X-100을 포함한 0.05몰 인산완충액(PBS-Tx) 내에서 모든 반응을 진행시킨다. 조직절편을 10% 정상 염소 혈청(normal goat serum, NGS), 1% 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)이 포함된 PBS-Tx용액에서 1시간 반 동안 반응 시켜 비특이적 항원-항체 반응을 방지하고, 4℃에서 희석한 OX-42, GFAP(Chemicon, USA)의 1차 항체에 24시간 반응시켰다(희석도는 실험진행 중 결정). 이 조직 절편들을 0.05M PBS-Tx로 10분씩 3회 세척하고, 1:200으로 희석한 2차 항체용액(biotinylated goat anti-mouse IgG)에 담가 2시간 실온에서 반응시켰다. 다시 PBS-Tx로 10분씩 3회 세척한 뒤 ABC 용액에 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 인산완충액으로 10분씩 3회 씻고, 0.01% 과산화수소와 0.05% DAB를 포함한 인산완충액에 5 ~ 10분간(계속 관찰하면서 적절하게 시간을 조절함) 실온에서 발색반응을 일으킨다. 다시 인산완충액으로 10분씩 3회 세척한 후 3차 증류수에 5분씩 3회 세척하고, 상승 농도순의 에틸알코올(ethyl alcohol)과 자이렌(xylene) 으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 덮개유리를 씌워 영구표본으로 만들었다.

[0154] 척수 후각의 신경교세포의 발현정도는 면역염색 세포의 활성화된(activated) 혹은 비활성화된(resting) 상태로

나누어 개수를 세어 비교, 분석하였다.

- [0155] OX-42의 발현정도는 현미경을 통하여 획득한 척수의 디지털 영상을 분석소프트웨어(Scion image, Scion Corp. USA)를 이용하여 대조군과 비교, 분석하였다.
- [0156] 그 결과, 도 6의 A에 나타난 바와 같이, 활성화된 미세신경교세포의 수는 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 각각 투여한 군에서 양성 대조군으로 사용한 미노사이클린(minocycline)을 투여한 군만큼 감소함을 확인할 수 있었다. 특히, Rb1, Compound K를 투여한 군은 미노사이클린을 투여한 군보다 활성화된 미세신경교세포의 수가 더욱 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다(도 6의 A).
- [0157] 또한, 이러한 염색 결과를 통해서 활성화되거나, 비활성화된 미세신경교세포를 계수하였을 때, 음성대조군으로 사용한 생리식염수를 투여한 군에 비하여, 양성대조군으로 사용한 미노사이클린을 투여한 군에서 활성화된 미세신경교세포가 감소되었으며, 이러한 경향성은 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 각각 투여한 군에서 모두 관찰되었다. 그 중, 특히 진세노사이드 Rb1과 Compound K를 투여한 군에서는 미노사이클린보다 더욱 효과적으로 미세신경교세포의 활성을 감소시키는 결과를 보였다(도 6의 B). 이러한 결과는 척수 후각에서 활성화된 미세신경교세포가 통증을 증가시키고(Hains and Waxman, 2006 Detloff et al., 2008 Hulsebosch, 2008; Tan et al., 2009), 이를 인삼유래 사포닌 추출물과 이로부터 분리된 진세노사이드 Rb1, Rg3 및 Compound K가 미세신경교세포의 활성화를 막아 통증을 억제시키는 것을 의미한다(도 6).
- [0158] <실험예 6> 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물의 p38MAPK, pERK, 및 pJNK 활성화에 미치는 효과
- [0159] 본 발명자들은 상기 <실시예 4>에서 제조된 중추 신경병증성 통증 동물모델에 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 투여한 후, p-p38MAPK, pERK, 및 pJNK 활성화에 미치는 효과를 확인하고자 하였다.
- [0160] 구체적으로, 진세노사이드 Rb1(11.5 mg/kg, n=5), 인삼유래 사포닌 추출물(50 mg/kg, n=5)을 하루에 1번 3일 동안 경구 투여하였으며, 이에 대한 음성 대조군은 생리식염수 1 ml를 하루에 1번 3일 동안 경구 투여하였으며(n=5), 양성 대조군은 미노사이클린을 22.5 mg/kg으로 하루에 2번 복강 내로 투여하였다(n=5). 3일 동안 진세노사이드 Rb1, 인삼유래 사포닌 추출물, 생리식염수 및 미노사이클린을 각각 투여한 후, 3일째 투여 1시간이 경과한 후, 요추 4번 척수를 분리해서 웨스턴 블랏을 실시하였다.
- [0161] 구체적으로 용해 버퍼[1% NonidetP-40, 20 mM Tris(pH 8.0), 137 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% 글리세롤(glycerol), 10 mM Na₂P₂O₇, 10 mM NaF, 1 µg/ml 아프로티닌(aprotinin), 10 µg/ml 류펩틴(leupeptin), 1 mM 바나데이트(vanadate), 및 1 mM PMSF]를 이용하여 세포 내 단백질을 얻고 이를 SDS-PAGE를 실행하였다. 이후 나이트로로셀룰로스 멤브레인(Nitrocellulose membrane)에 트랜스퍼(transfer) 한 후, p-p38MAPK(1:1,000, Cell signaling), pERK(1:1,000, Cell Signaling), pJNK(1:1,000, Cell Signaling) 항체를 이용하여 각각의 항체에 대한 데이터 시트(data sheet)나오는 프로토콜에 따라 웨스턴 블랏을 시행하였다.
- [0162] 그 결과는 도 8 내지 도 10에 나타난 바와 같이, 인삼유래 사포닌 추출물 및 Rb1을 각각 투여한 군에서 p-p38MAPK, pERK, 및 pJNK의 발현량이 음성 대조군에 비해 확연히 감소되었고, 이러한 발현량의 감소는 양성대조군인 미노사이클린(minocycline)을 투여한 것보다도 더욱 현저하였다. 이는 인삼유래 사포닌 추출물 및 Rb1이 통증에 관련된 인자의 발현량을 억제하여 통증 억제 효과를 나타내는 것을 보여주는 결과이다(도 8 내지 도 10).
- [0163] <실험예 7> 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 및 인삼유래 사포닌 추출물의 말초 신경병증성 통증 억제 효과
- [0164] 상기 <실시예 5>에서 꼬리 신경을 손상시켜 제조된 말초 신경병증성 통증 동물모델을 이용하여, 말초 신경병증성 통증을 유발과 본 발명의 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 및 인삼유래 사포닌 추출물의 말초 신경병증성 통증 억제효과를 확인하기 위하여 행위반응 테스트를 실시하였다. 구체적으로 말초 신경 손상 후 약 14일 후 유도되는 통증반응을 관찰하였으며, 14, 15, 16일에 통증 행동 테스트를 실시하여 3일 동안의 평균값을 pre-14d로 간주하였다. 그 중 신경병증성 통증이 완전히 유도된 래트를 선별하여 척수손상 후 14일째, 15일째,

및 16일째에 통증 행동 테스트를 실시하였다.

[0165] 상기 <실험예 1>에서 사용한 통증 행동 테스트의 방법을 이용하여, 말초 신경손상 후 신경병증성 통증이 생긴 말초 신경병증성 통증 동물모델에게 인삼유래 사포닌 추출물(50 mg/kg, n=4) 및 이로부터 분리된 단일화합물 Rb1(11.5 mg/kg, n=4), Rg3(11.5 mg/kg, n=4), Compound K(7 mg/kg, n=4)를 각각 경구 투여하여 신경병증성 통증 억제효과를 측정하였다. 음성대조군(vehicle, n=4)은 인삼유래 사포닌 추출물을 포함하지 않은 생리식염수를 1 ml로 경구투여 하였고, 양성대조군은 미노사이클린(minocycline)(22.5 mg/kg씩 하루 2번, 복강주사, n=6)을 이용했다.

[0166] 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 및 인삼 유래 사포닌 추출물 투여 전에 통증을 확인하였으며, 약물 투여 후 모든 행동 검사는 약제 투여 여부를 모르는 연구자에 의해 맹검법(blind study)으로 시행되었다.

[0167] <7-1> 기계적 이질통(mechanical allodynia)의 측정

[0168] 말초 신경병증성 통증 동물모델을 둥근 아크릴 통(5.5×15, 6.5×18 cm, 몸 크기에 따라 맞게 사용)에 넣고 꼬리만 밖으로 빼낸 후, 판 위에 올려놓았다. 기계적 이질통에 대한 측정은 여러 가지 von Frey hair(0.4, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 15.0 g)를 이용하여 Up & Down 방식(Chaplan et al, 1994)으로 꼬리를 자극하여 50% 회피반응을 보이는 von Frey hair의 그램(g)을 산정하는 방식으로 시행하였다. 신경 손상 전과 비교하여 통계적으로 유의하게 회피반응 역치가 감소한 것을 기계적 이질통이 발생한 것으로 판정하였다.

[0169] 그 결과 도 11의 A에 나타난 바와 같이, 말초 신경에 손상을 가하기 전(Pre-OP)상태에서 양성대조군인 미노사이클린은 하루에 한번 처치해서(22.5 mg씩 하루 2번, 복강주사) 3일 내내 기계적 자극에 대해 통증반응을 감소시킴으로써 현저한 진통효과를 보여줬다. 또한 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 및 인삼 유래 사포닌 추출물 투여 후, 양성 대조군으로 사용한 미노사이클린과 유사하게 현저히 통증을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(도 11의 A). 구체적으로, 인삼유래 사포닌 추출물의 경우, 3일 동안 반복으로 투여한 경우에 진통효과가 나타난 반면, Rb1, Compound K 는 처치가 반복될수록 진통효과가 서서히 나타났으며, 투여 마지막 날인 3일째에 가장 좋은 효과를 나타냈다.

[0170]

[0171] <7-2> 냉 이질통(cold allodynia)의 측정

[0172] 말초 신경병증성 통증 동물모델을 둥근 아크릴 통에 넣고 꼬리만 밖으로 꺼내 늘어뜨린 후 4℃ 물속에 넣어 꼬리가 회피반응을 보일 때까지의 시간을 측정하여 기록하였다. 실험결과는 5분간의 간격을 두고 5회 실시한 평균값으로 하였다. 15초까지 회피하지 않을 때는 꼬리의 민감화를 막기 위해 물속에서 꼬리를 빼내고 15초를 경과로 하였다. 수술 전보다 유의성 있게 빨리 회피하는 경우는 냉 이질통의 결과로 추정하였다.

[0173] 그 결과 도 11의 B에 나타난 바와 같이, 말초 신경에 손상을 가하기 전(Pre-OP)상태에서 양성대조군인 미노사이클린은 하루에 한번 처치해서(22.5mg씩 하루 2번, 복강주사) 3일 내내 냉 이질통에 대해 통증반응을 감소시킴으로써 현저한 진통 효과를 보여줬다. 또한 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 및 인삼 유래 사포닌 추출물 투여 후, 양성 대조군으로 사용한 미노사이클린과 유사하게 현저히 냉 이질통에 대한 통증을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(도 11의 B). 구체적으로, 인삼유래 사포닌 추출물의 경우, 3일 동안 반복으로 투여한 경우에 진통효과가 나타난 반면, Rb1, Compound K 는 처치가 반복될수록 진통효과가 서서히 나타났으며, 투여 마지막 날인 3일째에 가장 좋은 효과를 나타냈다.

[0174]

[0175] <7-3> 온 이질통(warm allodynia)의 측정

[0176] 온 이질통을 측정하기 위한 방법은 상기 <7-2>의 냉 이질통과 같은 방법으로 시행하되 물의 온도를 40℃로 하여 수행하였다. 말초 신경 손상을 가하기 전에 비하여 유의하게 빨리 회피하는 경우를 온 이질통의 결과로 추정하였다.

[0177] 그 결과 도 11의 C에 나타난 바와 같이, 말초 신경에 손상을 가하기 전(Pre-OP)상태에서 양성대조군인 미노사이클린은 하루에 한번 처치해서(22.5mg씩 하루 2번, 복강주사) 3일 내내 온 이질통에 대해 통증반응을 감소시킴으로써 현저한 진통효과를 보여줬다. 또한 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 및 인삼 유래 사포닌 추출물 투여 후, 양성 대조군으로 사용한 미노사이클린과 유사하게 현저히 온 이질통에 대한 통증을 감

소시키는 것을 관찰할 수 있었다(도 11의 C). 구체적으로, 인삼유래 사포닌 추출물의 경우, 3일 동안 반복으로 투여한 경우에 진통효과가 나타난 반면, Rb1, Compound K 는 처치가 반복될수록 진통효과가 서서히 나타났으며, 투여 마지막 날인 3일째에 가장 좋은 효과를 나타냈다.

[0178] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 제시한다.

[0179] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0180] <1-1> 산제의 제조

[0181] 인삼유래 사포닌 추출물 2 g

[0182] 유당 1 g

[0183] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0184] <1-2> 정제의 제조

[0185] 진세노사이드 Rb1 100 mg

[0186] 옥수수전분 100 mg

[0187] 유 당 100 mg

[0188] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0189] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0190] <1-3> 캡슐제의 제조

[0191] Compound K 100 mg

[0192] 옥수수전분 100 mg

[0193] 유 당 100 mg

[0194] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0195] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0196] <1-4> 환의 제조

[0197] 진세노사이드 Rg3 1 g

[0198] 유당 1.5 g

[0199] 글리세린 1 g

[0200] 자일리톨 0.5 g

[0201] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0202] <1-5> 과립의 제조

[0203] 진세노사이드 Rb1 150 mg

[0204] 대두 추출물 50 mg

[0205]	포도당	200 mg
[0206]	전분	600 mg
[0207]	상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.	
[0208]	<제조예 2> 식품의 제조	
[0209]	<2-1> 과자 및 분식의 제조	
[0210]	본 발명의 인삼유래 사포닌 추출물 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.	
[0211]	<2-2> 유제품의 제조	
[0212]	본 발명의 인삼유래 사포닌 추출물 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.	
[0213]	<2-3> 전식의 제조	
[0214]	현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.	
[0215]	검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.	
[0216]	본 발명의 인삼유래 사포닌 추출물을 진공 농축기에서 감압 농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.	
[0217]	상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 인삼유래 사포닌 추출물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.	
[0218]	곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),	
[0219]	종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),	
[0220]	인삼유래 사포닌 추출물의 건조분말(3 중량부),	
[0221]	영지(0.5 중량부), 및	
[0222]	지황(0.5 중량부)	
[0223]	<제조예 3> 음료의 제조	
[0224]	인삼유래 사포닌 추출물	1000 mg
[0225]	구연산	1000 mg
[0226]	올리고당	100 g
[0227]	매실농축액	2 g
[0228]	타우린	1 g
[0229]	정제수를 가하여 전체	900 ml
[0230]	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.

[0231]

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.

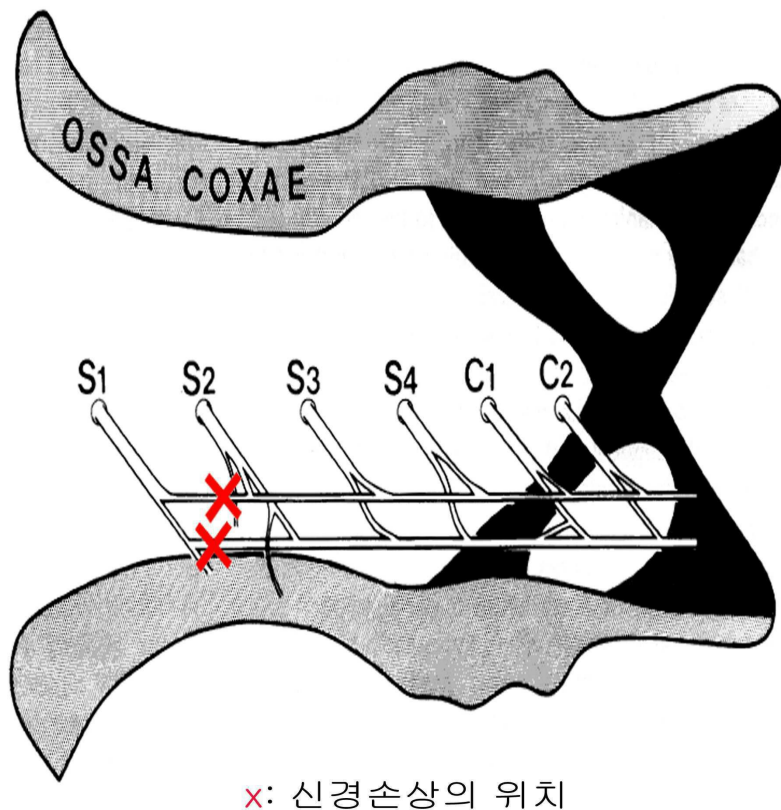
산업상 이용가능성

[0232]

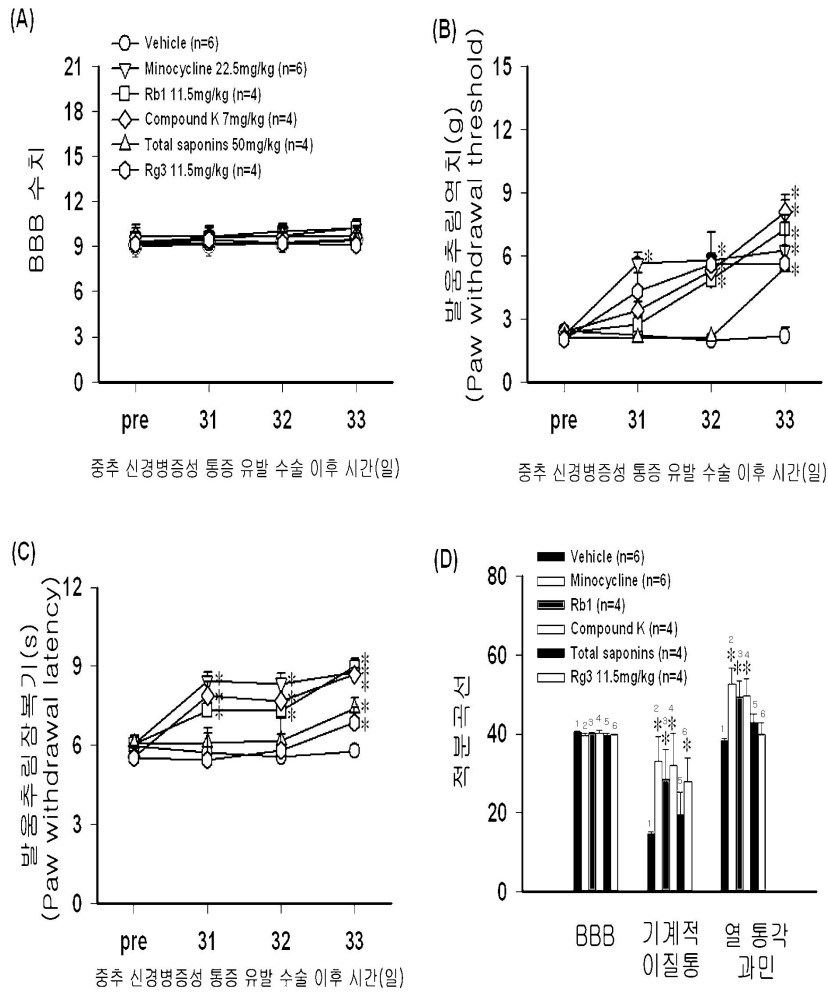
본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 신경병증성 통증 억제나 치료용으로 사용된다면 현재 임상적으로 사용되고 있는 약물들을 대체할 수 있을 뿐만 아니라, 장기간 복용함에 따른 부작용등의 단점도 보완할 수 있다는 점에서 환자의 삶의 질을 향상시키고, 경제적, 사회적 손실을 줄여줄 수 있다. 더욱이 삼차 신경통(trigeminal neuralgia), 당뇨병성 신경장애(diabetes neuropathy), 환지통(phantom limb pain), 다발성 경화증(multiple sclerosis), HIV 감염, 암, 알코올 중독, 암 치료인 약물치료(chemotherapy)후에 오는 통증, 비정형 안면통증(atypical facial pain), 포진성 신경통(post herpetic neuralgia), 신경학적 장애 등, 다양한 원인에 의해 나타나는 신경병증성 통증을 포함하여, 본 발명에서 추가적으로 확인된 결과에 근거하여 조직손상 등에 의해 나타나는 침해성 통증에 대해서도 좋은 치료 효과를 기대할 수 있다고 판단된다. 따라서 본 발명에 따른 진세노사이드 Rb1 및 Rg3, Compound K, 또는 인삼유래 사포닌 추출물을 유효성분으로 하는 조성물이 신경병증성 통증 억제 및 치료제로서 개발된다면 만성적인 통증에 시달리는 환자의 통증을 감소시킬 수 있다는 점에서 통증 치료 약물개발에 활용될 수 있다.

도면

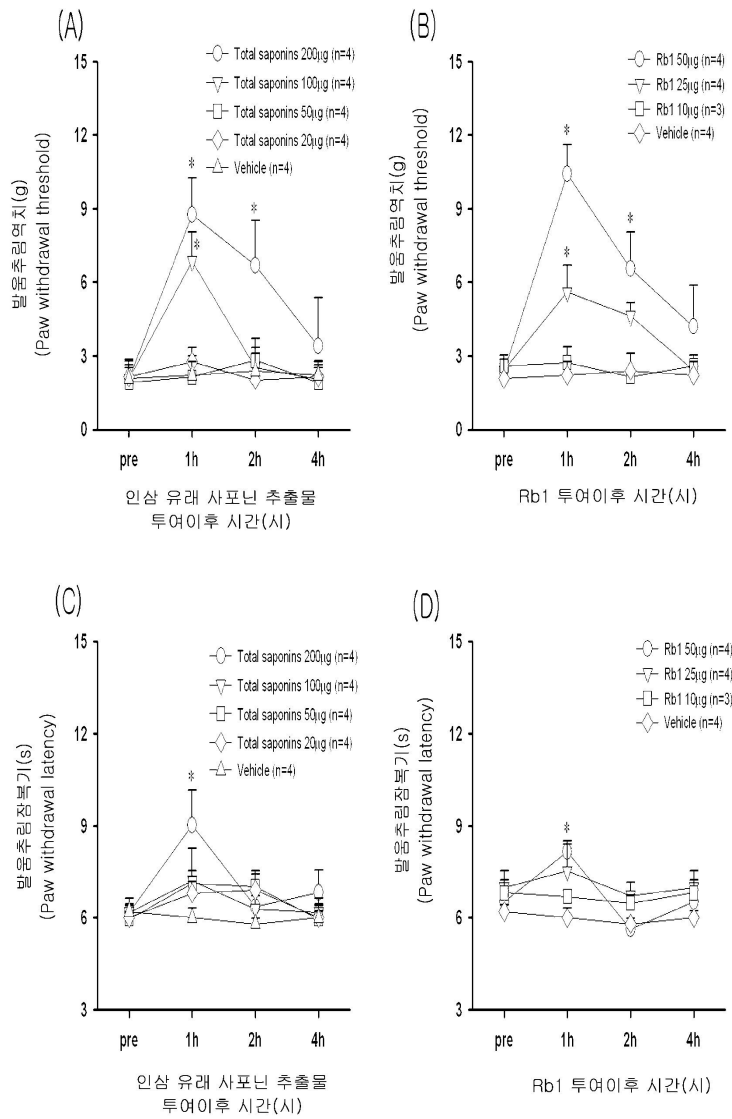
도면1



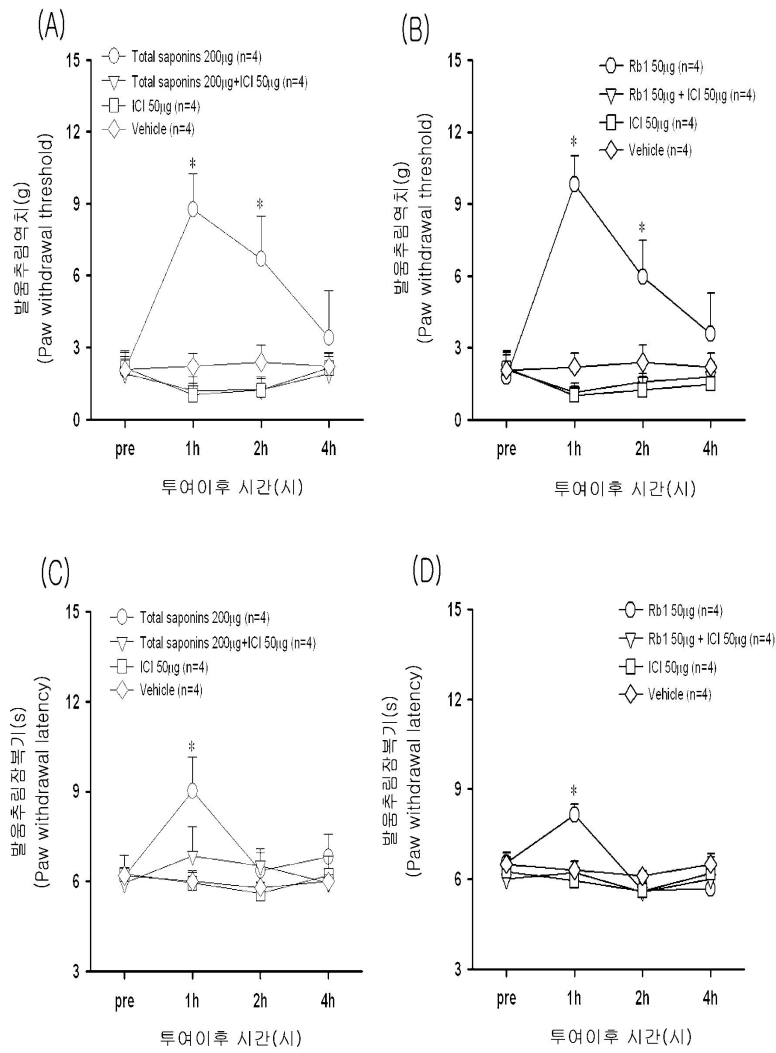
도면2



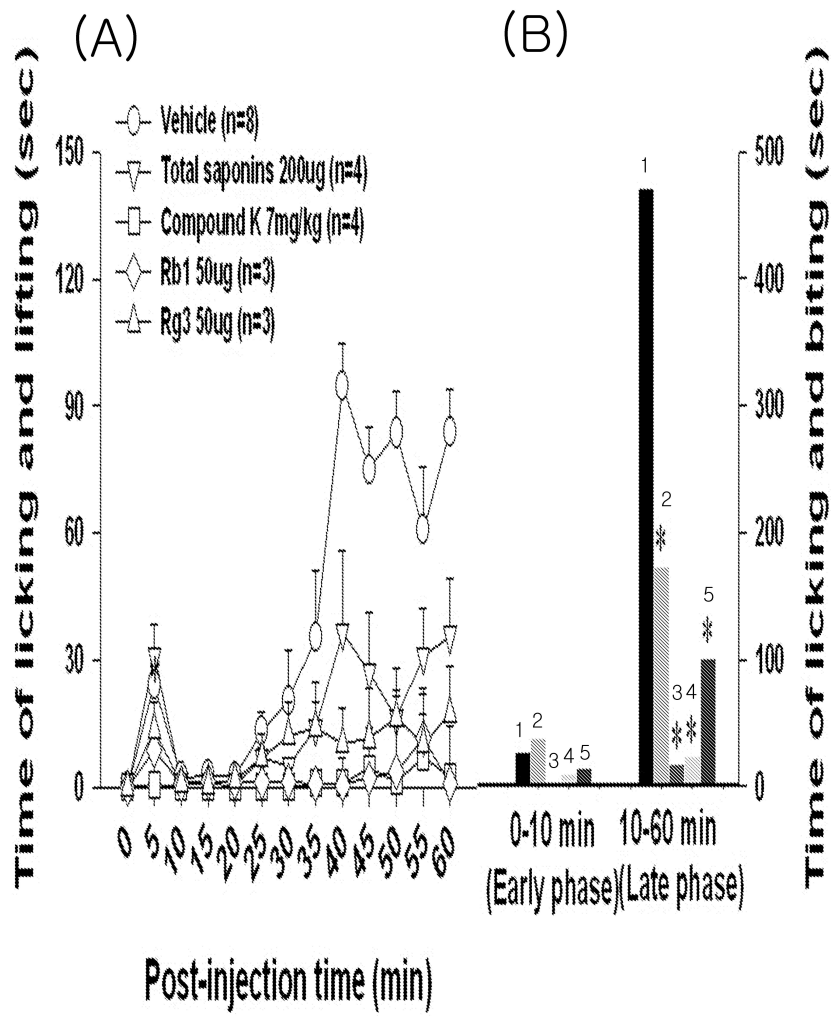
도면3



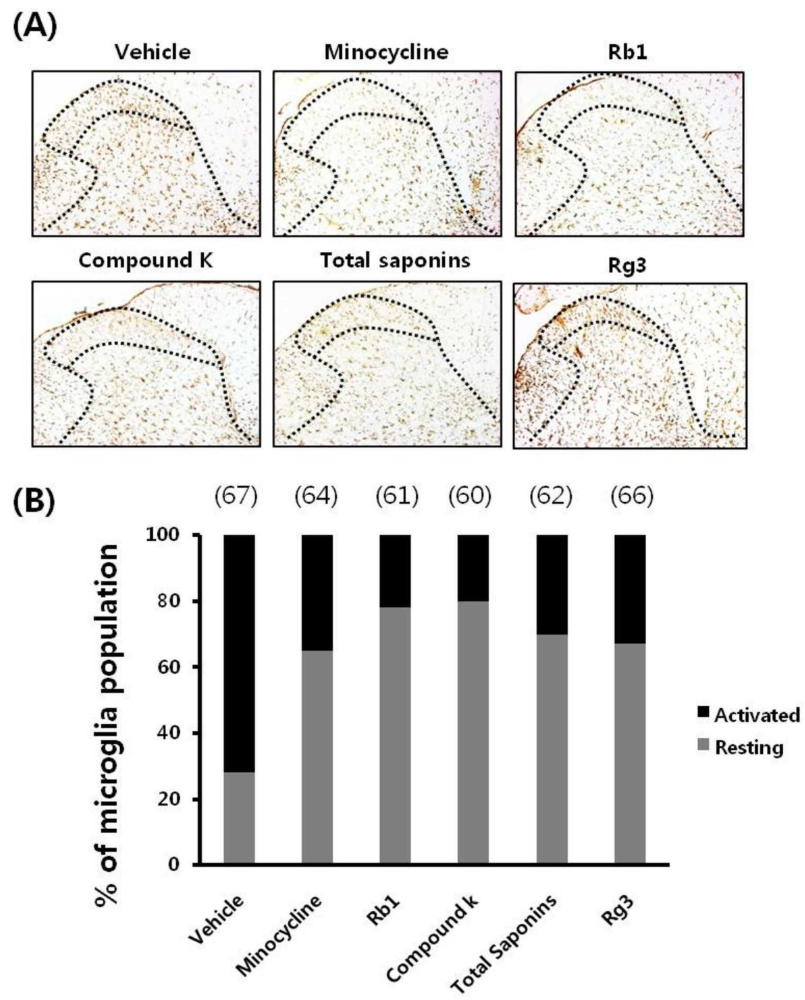
도면4



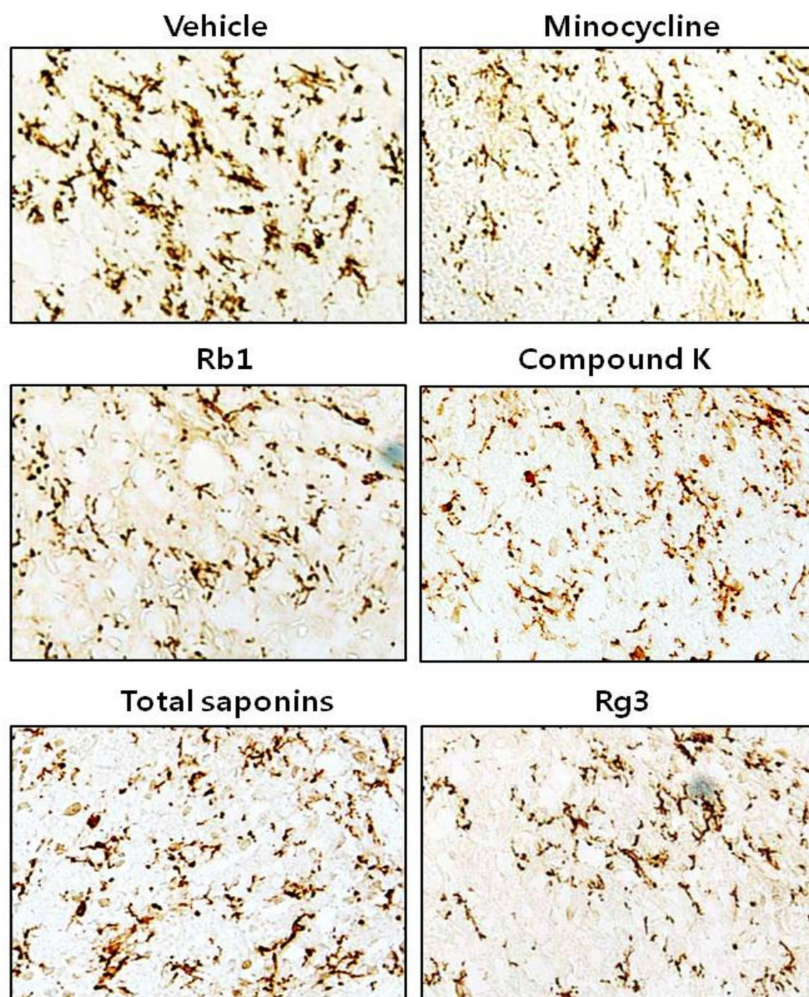
도면5



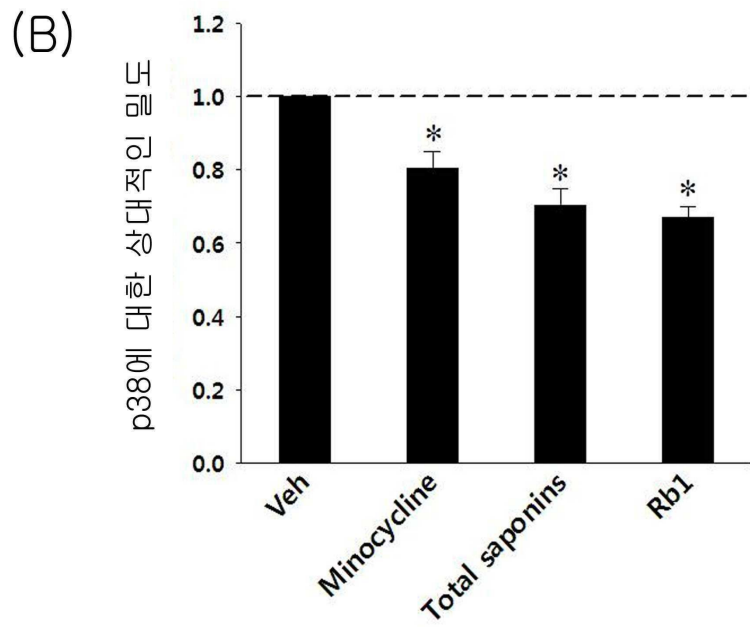
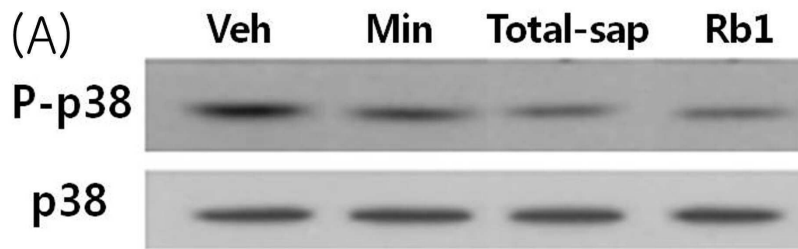
도면6



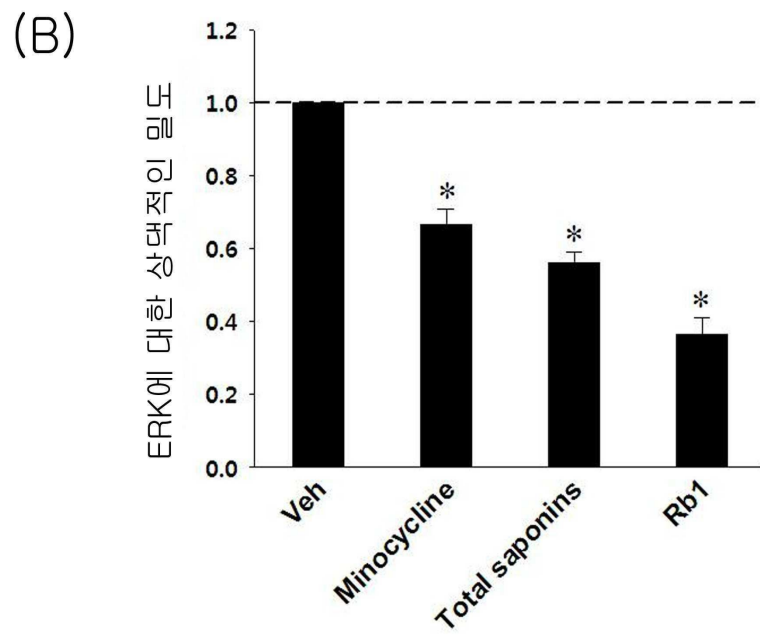
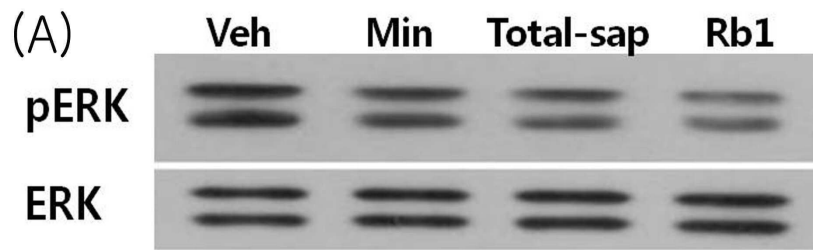
도면7



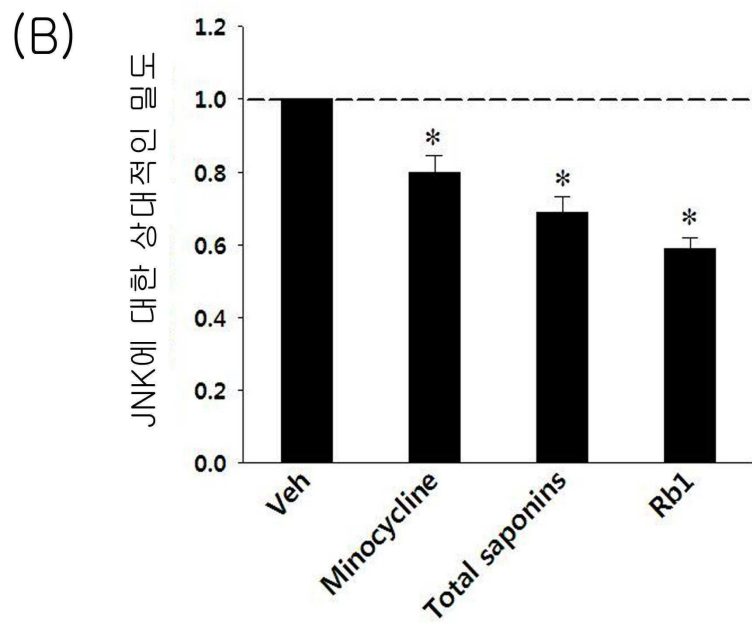
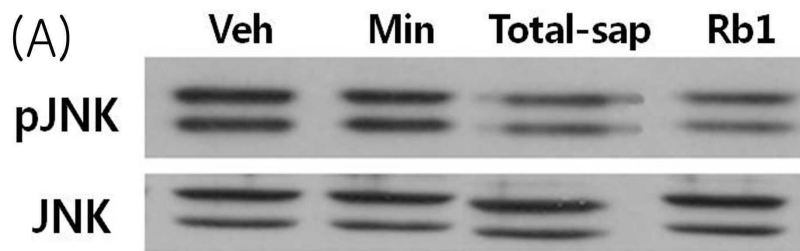
도면8



도면9



도면10



도면11

