



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0079175
(43) 공개일자 2011년07월07일

(51) Int. Cl.

A61K 36/074 (2006.01) *A61K 36/07* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0136155

(22) 출원일자 2009년12월31일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

박형진

강원 춘천시 우두동 1082 강변코아루아파트
104-1002

강태천

강원 춘천시 우두동 1082 강변코아루아파트 111동
502호

성재모

강원 춘천시 후평동 864 한신아파트 2동 302호

(72) 발명자

박형진

강원 춘천시 우두동 1082 강변코아루아파트
104-1002

강태천

강원 춘천시 우두동 1082 강변코아루아파트 111동
502호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

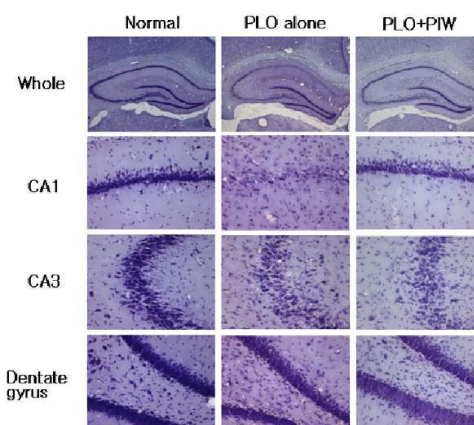
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 말뚝진흙버섯 자실체 추출물을 유효성분으로 함유하는 발작을 수반하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 발작을 수반하는 뇌질환에 유효한 말뚝진흙버섯(*Phellinus igniarius*)의 열수추출물 또는 유기용매 분획물과 그 제조방법 그리고 그 추출물과 분획물을 유효성분으로 함유하는 발작을 수반하는 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로 본 발명에 따르면, 말뚝진흙버섯의 추출물 또는 분획물로부터 흥분독성 신경세포 사멸(excitotoxic neuronal death)을 예방하는 한편 염증성 면역반응의 조절과 혈관성 뇌부종의 억제를 통해 신경세포의 사멸을 방지함으로써 발작을 수반하는 뇌질환 또는 간질발작발현(epileptogenic) 질환의 예방 및 치료에 유효한 물질을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

성재모

강원 춘천시 후평동 864 한신아파트 2동 302호

서상원

강원도 춘천시 우두동 삼성아파트 103동 601호

오광

강원도 춘천시 후평동 529-4 에리트아파트 107동 303호

김지은

강원도 춘천시 교동 31-1

여성일

강원도 춘천시 교동 113-295

유혜진

경기도 고양시 덕양구 행신동 샘터마을 102동 190 2호

특허청구의 범위

청구항 1

말뚝진흙버섯(Phellinus igniarius) 자실체 유래의 열수추출물, 유기용매 분획물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 발작을 수반하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

말뚝진흙버섯(Phellinus igniarius) 자실체 유래의 열수추출물, 유기용매 분획물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 발작으로 유발된 조롱박피질 신경세포의 사멸을 억제하는 과정에서 흥분독성 신경세포 사멸 또는 염증성 면역반응에 의한 신경세포 사멸 또는 부종성(edematous) 신경세포 사멸 기전 억제용 조성물.

청구항 3

말뚝진흙버섯(Phellinus igniarius) 자실체 유래의 열수추출물, 유기용매 분획물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 발작으로 인한 흥분독성 신경세포 사멸 또는 염증성 면역반응에 의한 신경세포 사멸 또는 부종성(edematous) 신경세포 사멸 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

말뚝진흙버섯(Phellinus igniarius) 자실체 유래의 열수추출물, 유기용매 분획물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 발작을 수반하는 뇌질환 또는 반복적 발작, 뇌 외상, 발열성 경련, 뇌염, 뇌졸중, 뇌 암, 뇌 저산소증, 뇌 저포도당증 또는 알츠하이머씨(Alzheimer's) 병 등 간질발작발현성(epileptogenic) 질환으로 인한 신경세포 사멸의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 5

말뚝진흙버섯(Phellinus igniarius) 자실체 유래의 열수추출물, 유기용매 분획물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 신경세포 사멸에 따른 기억상실 또는 치매의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 6

말뚝진흙버섯(Phellinus igniarius) 자실체 유래의 열수추출물, 유기용매 분획물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 뇌 면역반응 조절용 또는 혈관뇌장벽 보호 또는 뇌부종 억제용 조성물.

청구항 7

말뚝진흙버섯(Phellinus igniarius) 자실체 유래의 열수추출물, 유기용매 분획물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 조성물로 이루어진 경구용 또는 비경구용 건강보조식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

본 발명의 목적은 발작을 수반하는 뇌질환 또는 간질발작발현 질환에 유효한 물질을 말뚝진흙버섯으로부터 추출

[0001]

하여 이들 질환의 예방 및 치료제를 제공하는 데있다.

배경 기술

- [0002] 뇌신경세포의 손상은 크게 두가지 기전에 의해 유발되는데 첫째는 뇌세포막 전압의 변화에 의한 유리아미노산의 증가에 의한 것이며, 둘째는 직접적인 산화성 스트레스(Oxidative stress)에 의한 세포독성(cytotoxicity)의 증가에 의한 것이다(Coyle, J.T et al (1993), Oxidative Stress, glutamate and neurodegenerative disorders. science 262:689-695)
- [0003] 퇴행성 뇌신경계 질환은 노인성 질환으로 치매와 뇌졸중을 들수 있으며 노인성 치매와 노인성 뇌졸중 환자는 매년 증가하고 있다.
- [0004] 노인성 치매는 기억력의 상실, 학습능력의 저하가 주 증상으로 환자와 그가족까지 고통을 겪어야 하는 질환이다.
- [0005] 이처럼, 뇌신경세포 손상의 원인이 되는 산화성스트레스로 유발하기 위해 H_2O_2 또는 glutamate를 독성물질로써 이용하는데 이는 H_2O_2 가 활성산소화합물류(reactive oxygen sresies;ROS)의 하나로서 세포내외에서 다양한 원인에 의해 생성되며 대사와과정중 또다른 ROS를 생성한다는 실험결과에 따른 것이다.(Cross, .S.A.R and Jones, O.T.G, 1991, Enzymatic mechanisms of Superoxide Productions, Biochem, Biophys. Acta, 1057:281-298)
- [0006] 또한, 최근의 연구결과에 의하여 발작(stroke), 외상(trauma) 및 허혈성손상(ischemic jnjury)의 경우 glatamate가 이온항성 수용체(ionotrophic receptor)를 활성화시켜 산화성스트레스를 일으켜 glatamate성 신경에 이상을 초래하여 발병되는 것으로 나타났다고 보고(Halliwel. B and Gulteridge, J.M(1985a), oxygen radicals and the hervous system, Trends Neurosci. 5:22-26. Halliwel, B and Gulteridge J.M.(1985b) 뇌조직에서의 혈류량이 감소되면 신경접합부에서 glutamate가 유리되어 증가하고 이것들이 신경세포내로 유입은 감소되고 세포외의 농도를 증가시켜 독성을 유발하고 신경세포는 사멸한다는 것이다.(Benveniste, H. Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N.H.(1984), Elevation of extracellular concentrations of glutamate and as parate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitered by intracerebral microdialysis. J.N. eurochem. 43:1369-1374) 이와같은 glutamate에 의한 신경독성은 글루타메이트의 길항물질, Na^+ 및 Ca^{2+} 채널 차단제, 항산화제에 의해 방지될 수 있다.
- [0007] 우리나라에서는 이와 같이 직접적인 산화성스트레스에 의한 세포독성 증가에 의한 건망증, 치매, 뇌졸중 같은 퇴행성 뇌신경계 질환은 H_2O_2 나 glutamate에 의해 유발된 신경독성을 약화시키는 천연물질을 사용하여왔다.
- [0008] 이와 달리, 발작(seizure)은 중추신경계에서 신경세포들이 과도하게 흥분하여 뇌세포막 전압의 변화에 의해 “흥분과 억제의 정상적인 균형”이 변화하여 나타나는 현상이며 과도한 흥분이 발생하는 부위에 따라 크거나 작은 경련을 수반하는 것이다. 이러한 발작은 인구의 5-10%에서 사는 동안 최소한 1회 이상 경험한다. 간질(epilepsy)은 이러한 종류의 원인질환에 의해 발작이 반복되어 만성화된 질환이다. 간질발작을 유발하는 원인은 수없이 많으나 뇌 염, 뇌 외상, 발열성 질환, 뇌졸중, 뇌 암, 유전질환, 약물 등이. 간질발작은 크게 부분발작과 전신발작으로 나뉜다. 부분발작은 대뇌피질의 일부분에서 시작되는 발작을 의미하며, 전신발작은 부분발작 없이 대뇌양쪽반구 피질의 광범위한 부분에서 동시에 일어나는 발작을 의미한다. 부분발작이 전신발작으로 진행되는 경우도 있다.
- [0009] 간질발작 중 성인에서 가장 많이 볼 수 있는 것은 측두엽간질증후군이며 그 원인으로는 해마의 경화가 가장 중요하다. 이 증후군에서 발작이 발생하면 배에서 이상한 느낌이 치밀어 오르는 명치조짐이 나타나며 씹거나 삼키거나 만지작거리는 등의 자동증을 흔히 동반한다. 동작 후에는 대부분 혼돈이 발생하고 이차전신발작으로 진행되는 경우도 자주 나타난다. 해마경화는 반복적 발작, 뇌 외상, 발열성 경련, 뇌염, 뇌 저산소증, 뇌 저포도당증 등 여러 위해자극의 병리학적 최종 결과이다. 경화된 해마에서는 특히 CA1 영역의 피라밋 세포가 소실되며, 신경세포 사이의 비정상적인 연결 및 성상아교세포의 증식이 관찰된다. 한편 해마경화가 만성 간질발작의 원인이 되는데 그 이유는 과립세포에서 기원한 이끼섬유(mossy fiber)가 연결할 피라밋 세포가 사라졌음으로 인해 다시 과립세포의 수상돌기에 연결하여 회귀성 흥분성 신경회로를 형성하기 때문인 것으로 알려졌다. 따라서 발작은 해마경화를 유발하고 해마경화는 다시 발작을 유발하는 악순환이 발생하게 된다. 해마경화증에서는 궁극적으로 해마의 크기가 작아진다. 간질발작의 후유증으로는 기억상실 외에도 우울증과 불안증 등 정신과적 질환이 나타

날 수도 있으며 심한 경우 사망에 이르기도 한다.

[0010] 간질발작의 치료는 크게 원인질환의 제거와 약물을 이용한 발작의 억제이다. 간질발작의 원인이 분명한 경우에는 그 원인질환을 수술 등을 이용해 제거하나 대부분의 경우 원인질환이 불분명하므로 항 간질발작 억제제를 이용하여 발작의 재발을 억제한다. 만일, 발작의 억제와 함께 흥분독성 신경세포 사멸을 방어할 수 있는 약물이 환자들에게 제공될 수 있다면 반복적인 발작에 의해 신경세포가 사멸하며 그것이 간질의 원인이 되는 악순환의 고리를 끊을 수 있고, 반복적인 발작에 의해 해마에서 신경세포가 사멸하여 점차 기억이 상실되는 간질발작의 후유증을 경감시킬 수 있을 것으로 기대된다. 간질발작으로 인한 해마 신경세포의 사멸이 주로 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 경유하는 glutamate의 독성에 기인하는 것으로 알려졌다으므로 NMDA 수용체 차단제인 dizocilpine(MK-801)을 이용하여 발작으로 유발한 신경세포의 사멸을 억제하려는 시도가 있었다. Brandt 등 (Neuroscience 118: 727-740, 2003)은 동물실험에서는 kainate로 간질지속상태(status epilepticus)를 유발하고 발작 후 90분에 dizocilpine을 투여하면 변연계의 손상이 거의 완전히 보호되었다고 보고한 바 있다. 그러나 아직까지 그 물질이 사람에서 실용화되지는 않고 있다.

[0011] 대한민국 특허등록 10-467471호는 퇴행성 뇌신경계 노인질환의 원인이 되는 상기 세포독성물질로 부터 유의성있는 신경세포 보호물질로서 상황버섯(*Phellinus linteus*)효사체의 액체배양물을 개시하고 있다.

[0012] 또한, 최근 대한민국 특허공개번호 10-2009-29106호에는 상황버섯(*P. linteus*)의 자실체 추출물에 포함된 DHP 유도체가 신경세포 보호물질로서 유효하다는 사실을 개시한 바 있다.

[0013] 그러나, 상기 문헌들에서는 뇌염, 뇌외상, 발열성질환, 뇌졸중, 뇌암, 유전질환, 약물복용이 원인이 되어 중추 신경계 이상에 의한 발작을 수반하는 뇌질환에 대하여는 전혀 개시된 바 없다.

[0014] 특히, 말뚝진흙버섯(*Phellinus igniarius*)은 상황버섯(*P. linteus*)과 더불어 담자균류(Basidiomycota), 구멍장이버섯과(Hymenochaetaceae), 진흙버섯 속(*Phellinus*)에는 속한다. 그러나, 아직까지 말뚝진흙버섯이 발작을 수반하는 뇌질환의 예방 및 치료등에 사용되었다는 증거는 찾아볼 수 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0015] 따라서, 본 발명의 목적은 발작을 수반하는 뇌질환에 유효한 말뚝진흙버섯 자실체의 추출물 또는 분획물을 제공하는 데있다. 본 발명의 다른 목적은 말뚝진흙버섯의 추출물 또는 분획물로부터 발작으로 인한 흥분성 신경세포 사멸, 기억상실, 뇌의 염증성 면역반응, 혈관뇌장벽 파괴, 혈관성 뇌부종 등의 기전을 억제하는데 유효한 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 반복적 발작, 뇌 외상, 발열성 경련, 뇌염, 뇌졸중, 뇌 암, 뇌 저산소증, 뇌 저포도당증 등 간질발작발현성 질환으로 인한 발작 또는 신경세포 사멸의 예방용 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0016] 본 발명의 상기 목적은 말뚝진흙버섯의 자실체로부터 본 발명 조성물을 제조하는 단계와; 실험동물로 Sprague-Dawley계 흰쥐의 뇌손상을 유발하고 상기 천연약물을 투여하는 단계와; 상기 실험동물의 뇌표본을 제작하고 해마(hippocampus)의 손상과 아교세포의 활성화, 조롱박피질(piriform cortex)의 손상과 아교세포의 활성화를 관찰하는 단계와; 상기 조롱박피질에서 혈장유출 및 뇌혈관장벽을 관찰, 평가하는 단계를 통하여 달성하였다.

효 과

[0017] 본 발명에 따르면 말뚝진흙버섯의 자실체로부터 발작을 수반하는 뇌질환의 예방과 치료용 조성물을 제공하는 효과가 있고, 상기 조성물은 발작으로 인한 뇌 신경세포 사멸, 혈관성 부종, 혈관뇌장벽 파괴, 염증성 면역반응등 기전을 억제하는데 유용한 물질을 제공할 수 있을 뿐만 아니라,간질발작발현 질환으로 인한 발작 등의 예방 및 치료제로도 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하지만, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 제시한 것일 뿐이므로 이에 의해 본 발명의 권리범위를 제한하지는 않는다.
- [0019] <실시예 1> 말뚝진흙버섯으로부터 공시재료의 제조
- [0020] 말뚝진흙버섯의 자실체 300 g을 분말로 만든 다음 그 10배가 되는 3,000 mL의 증류수에 넣고 100℃에서 2시간 끓여 물 추출물을 얻었다. 감압건조기를 이용하여 57℃에서 추출물의 양을 1,000 mL로 줄인 다음 -20℃의 냉 에탄올 2,000 mL과 혼합하고 -20℃에서 3시간 방치한다. 상기 에탄올 혼합물을 원심분리(10,000 rpm, 20분)한 후 침전물을 채취하고 70% 에탄올로 세척한다. 70% 에탄올로 세척한 침전물을 다시 원심분리하여 침전물을 채취하고 그 침전물을 증류수에 용해한 다음 동결건조하여 분말을 얻고 이를 본 발명의 공시재료로 사용하였다. 한편 물 추출한 후 남은 잔류버섯가루에 에탄올 3,000 mL를 넣고 에탄올 추출물을 얻고 감압건조기를 이용하여 에탄올 추출물의 양을 500 mL로 줄인 다음 물을 500 mL 추가하여 전체 용량을 1,000 mL로 만들고 다시 45℃에서 감압건조하여 최종적으로 500 mL로 만든 다음 동결건조하여 분말을 얻고 이를 본 발명의 다른 공시재료로 사용하였다. 또, 본 발명의 열수추출물의 분말과 에탄올 추출분획분말을 1:1로 혼합하여 본 발명의 또 다른 공시재료로 사용하였다. 이하, 본 발명의 실시 및 실험에는 열수추출물의 분말을 공시재료로 사용한 것을 도면으로 제시하였으나, 나머지 2종의 공시재료의 실험결과도 유의적인 차이를 나타내지 아니하였다.
- [0021] <실시예 2> 실험동물에서 뇌손상에 대한 추출물의 효과 관찰
- [0022] 실험동물로는 Sprague-Dawley계의 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐를 정상군과 뇌손상을 유발한 경련군으로 나누고 경련군을 대조군과 상기 실시예에서 얻은 본 발명 공시재료의 투여군으로 나눈다. 실험동물의 뇌손상에 대한 본 발명 공시재료의 투여효과를 검증하였다.
- [0023] 실험예 1: 실험동물의 뇌손상 유발 및 말뚝진흙버섯의 추출물 또는 분획물 투여
- [0024] 상기 흰쥐에게 LiCl를 127 mg/kg 씩 복강 내로 투여한다. 다음날 scopolamine을 2 mg/kg 씩 복강 내로 투여하고 그 30분 후에 pilocarpine을 25 mg/kg 씩 복강 내로 투여하여 경련을 유발한다. 경련지수가 4-5이면 경련발생 2시간 후에 diazepam을 1 mg/kg 씩 복강 내로 투여하여 더 이상 경련이 발생하지 않도록 조절한다. 상기 실시예1에서 얻은 말뚝진흙버섯의 추출물 또는 분획물을 증류수에 용해하여 100 mg/kg 씩 pilocarpine 투여 20분 전에 복강 내로 주사한다.
- [0025] 실험예 2: 실험동물의 뇌 표본제작 및 관찰
- [0026] 발작 유발 3일 후 흰쥐를 urethane으로 마취하고 심장을 경유하여 phosphate buffered saline에 이어 4% paraformaldehyde 용액으로 관류하여 뇌를 고정한다. 뇌를 적출하여 동일한 고정액에서 2시간 후 고정된 다음 30% sucrose 용액 속에 하루 밤 동안 재운다. 고정된 뇌로부터 30 μ m 두께의 동결절편을 제작한다. 통상적인 조직화학법에 따라 절편을 염색물질로 염색하거나 또는 항체를 사용해 뇌조직을 면역염색하고 광학현미경을 이용하여 디지털 영상을 얻어 손상의 정도를 분석하였다.
- [0027] 실험예 3: 해마(hippocampus)의 손상 관찰
- [0028] 해마 절편을 cresyl violet로 염색하여 뇌세포의 손상정도를 관찰하고 Fluoro-Jade B로 염색하여 사멸한 뇌 세포를 확인하였다.
- [0029] 실험예 4: 해마에서 아교세포(glia cell)의 활성화 관찰
- [0030] 해마 절편을 Iba-1으로 염색하여 미세아교세포의 활성도를 관찰하였다. 인접 부위의 절편을 glial fibrillary acidic protein(GFAP)으로 염색하여 성상아교세포의 활성도를 관찰하였다.

- [0031] 실험예 5: 조롱박피질(piriform cortex)의 손상 관찰
- [0032] 조롱박피질 절편을 cresyl violet로 염색하여 출혈, 부종 및 뇌세포의 손상정도를 관찰하고 Fluoro-Jade B로 염색하여 사멸하는 뇌세포를 확인하였다.
- [0033] 실험예 6: 조롱박피질에서 아교세포(glial cell)의 활성화 관찰
- [0034] 조롱박피질을 Iba-1으로 염색하여 미세아교세포의 활성도를 관찰하였다. 인접 부위의 절편을 GFAP으로 염색하여 성상아교세포의 활성도를 관찰하였다.
- [0035] 실험예 7: 조롱박피질에서 혈장 유출 및 뇌혈관장벽 관찰
- [0036] 조롱박피질 절편을 혈청 IgG에 대한 면역조직화학법으로 염색하여 혈장 단백질이 뇌조직 내로 유출한 것을 확인하는 한편 동일한 부위의 절편을 뇌혈관장벽 표지물질인 SMI 71에 대한 면역조직화학법으로 염색하여 뇌혈관장벽의 손상을 확인하였다.
- [0037] 상기 실시예에 따른 실험결과에서 명백한 바와 같이 해마의 손상에 대한 말뚝진흙버섯 추출물의 효과를 살펴보면, 실험동물에게 지속적 간질발작을 유발하고 해마 조직을 cresyl violet 및 Fluoro-Jade B로 염색한 결과 CA1 영역에서 신경세포의 사멸이 유발되었다(도 1). 말뚝진흙버섯의 자실체추출물을 전처치하면 발작으로 유발한 해마 CA1 영역의 신경세포 사멸이 크게 억제되었다(도 1과 2). 또한 말뚝진흙버섯 추출물이 발작으로 유발한 미세아교세포의 활성화는 크게 억제하였으나(도 3), 성상아교세포의 활성화에는 다소 억제하는 경향을 나타내었다(도 4). 본 발명에서 말뚝진흙버섯 추출물이 발작으로 유발된 해마 CA1 영역의 신경세포 사멸을 매우 강력하게 억제한 결과로 보아 말뚝진흙버섯 자실체추출물이 glutamate-NMDA 수용체를 거치는 흥분독성 신경세포 사멸기전에 억제적인 영향을 미칠 것으로 추정된다. 또한 말뚝진흙버섯 추출물을 투여하면 발작으로 유발된 해마 CA1 영역의 미세아교세포 활성화가 억제된 것으로 보아 말뚝진흙버섯 추출물은 염증성 면역반응을 경유한 신경세포 사멸기전에도 억제적 영향을 미치는 것으로 생각되었다. 이러한 결과들로부터 말뚝진흙버섯 추출물이 발작에 의한 해마경화를 방지하며 또한 해마경화의 억제를 통하여 해마에서 기원한 간질발작의 발생을 예방할 수 있을 것으로 판단된다.
- [0038] 한편, 조롱박피질의 손상에 대한 말뚝진흙버섯 추출물의 효과를 살펴보면, 말뚝진흙버섯 추출물이 다른 뇌부위의 신경세포 사멸에도 영향을 미치는지를 알아보기 위해 조롱박피질에서의 변화를 관찰한결과, 도 5에 제시한 바와 같이 발작을 유발하고 조롱박피질 조직을 cresyl violet 및 Fluoro-Jade B로 염색했던 바 조롱박피질에서도 신경세포의 사멸이 관찰되었다. 또한 출혈, 부종 그리고 미세아교세포의 활성화도 관찰되었다. 말뚝진흙버섯의 자실체추출물을 전처치하면 발작으로 유발된 신경세포의 사멸, 뇌조직의 부종 그리고 미세아교세포의 활성화 등이 억제되었다. 따라서, 발작 후 조롱박피질에 발생하는 부종의 원인은 혈관으로부터 혈장의 유출에 기인하는 것으로 판단되었다. 조롱박피질 조직에서 혈장이 유출 여부를 알아보기 위해 조롱박피질 조직을 혈청 IgG에 대한 면역조직화학 염색법으로 관찰한 결과 뇌조직의 염색강도가 강하게 나타났으며 말뚝진흙버섯 자실체추출물을 전처치하면 뇌조직의 염색 강도가 경미하여졌다(도 7). 이러한 결과는 발작에 의해 다량의 혈장이 뇌조직 속으로 유출되었음을 의미하며 이러한 현상이 말뚝진흙버섯 추출물의 투여에 의해 크게 감소하였음을 의미한다. 한편 조롱박피질 조직에서 혈관뇌장벽에 대한 면역조직화학 염색 결과 말뚝진흙버섯 추출물을 투여하면 발작 이후에도 혈관뇌장벽이 비교적 잘 보존되었다(도 8). 이러한 결과로 보아 말뚝진흙버섯 추출물은 혈관뇌장벽이 손상되지 않도록 보호하여 발작으로 유발된 혈장 유출을 억제하는 것으로 생각된다.
- [0039] 본 발명에서 말뚝진흙버섯 자실체추출물이 발작으로 유발한 조롱박피질 신경세포의 사멸을 억제하는 과정에는 흥분독성 신경세포 사멸 기전(mechanism) 외에도 염증성 면역반응과 혈관부종을 경유하는 신경세포 사멸 기전도 억제하는 것으로 생각된다. 이러한 결과들은 말뚝진흙버섯 자실체추출물이 간질발작에 의한 대뇌피질 세포의 사멸을 방지하며 또한 대뇌피질 세포의 사멸을 억제하여 대뇌피질에서 기인한 간질발작의 발생을 예방할 수 있음을 의미하는 것으로 판단되었다.

산업이용 가능성

[0040] 본 발명의 말뚝버섯의 자실체추출물은 발작으로 인한 뇌 신경세포 사멸, 혈관성 부종, 혈관뇌장벽 파괴, 염증성 면역반응을 억제하며 간질발작발현 질환으로 인한 발작을 억제하기 위한 예방 및 치료제로 개발될 가능성이 매우 높다. 특히, 신경세포의 흥분성을 억제하는 통상적인 간질발작 치료약물과는 달리 발작으로 인한 뇌 신경세포의 사멸, 혈관성 부종, 혈관뇌장벽 파괴, 염증성 면역반응 등을 억제한다는 측면에서 본 발명에서 얻은 물질이 약품으로 개발될 경우 그 수요는 국내외적으로 대단히 클 것으로 예상되므로 천연물 의약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 흰쥐의 해마에서 간질지속상태로 유발한 흥분독성 신경세포 사멸에 미치는 말뚝진흙버섯 추출물의 효과를 보여주는 조직사진이다. 해마 조직을 cresyl violet로 염색한 결과 해마 특히 CA1 영역에서 발작(PLO alone)으로 인한 신경세포 사멸이 말뚝진흙버섯 추출물(PLO+PIW)에 의해 거의 완벽하게 보호되었다. 다른 부위에서는 그 효과가 경미하게 나타났다.

[0042] 도 2는 흰쥐의 해마 CA1 영역에서 간질지속상태로 유발한 흥분독성 신경세포 사멸이 말뚝진흙버섯 추출물에 의해 보호됨을 좀 더 극명하게 보여주는 조직사진이다. 해마 CA1 영역 부위를 fluoro-jade B로 염색한 결과 발작(PLO alone)으로 인해 죽어가는 신경세포의 수가 말뚝진흙버섯 추출물(PLO+PIW)에 의해 크게 감소함을 보여준다.

[0043] 도 3은 흰쥐의 해마에서 간질지속상태로 유발한 미세아교세포의 활성화에 미치는 말뚝진흙버섯 추출물의 효과를 보여주는 조직사진이다. 해마 조직을 Iba-1로 염색한 결과 해마 전역에서 발작(PLO alone)으로 인해 미세아교세포가 크게 활성화되며 이런 미세아교세포의 활성화가 말뚝진흙버섯 추출물(PLO+PIW)에 의해 억제됨을 보여준다.

[0044] 도 4는 흰쥐의 해마에서 간질지속상태로 유발한 성상아교세포의 활성화에 미치는 말뚝진흙버섯 추출물의 효과를 보여주는 조직사진이다. 해마 조직을 glial fibrillary acidic protein에 대한 면역조직화학법으로 염색한 결과 해마 전역에서 발작(PLO alone)으로 인해 성상아교세포가 크게 활성화되며 이런 성상아교세포의 활성화가 말뚝진흙버섯 추출물(PLO+PIW)에 의해 억제됨을 보여준다.

[0045] 도 5는 흰쥐의 조롱박피질에서 간질지속상태로 유발한 혈관성 부종에 수반된 신경세포 사멸이 말뚝진흙버섯 추출물에 의해 보호됨을 보여주는 조직사진이다. 조롱박피질을 cresyl violet와 fluoro-jade B로 염색한 결과 발작(PLO alone)에 의해 출혈과 부종 그리고 신경세포의 사멸이 발생하였으며 이러한 발작의 영향이 말뚝진흙버섯 추출물(PLO+PIW)에 의해 크게 억제됨을 보여준다.

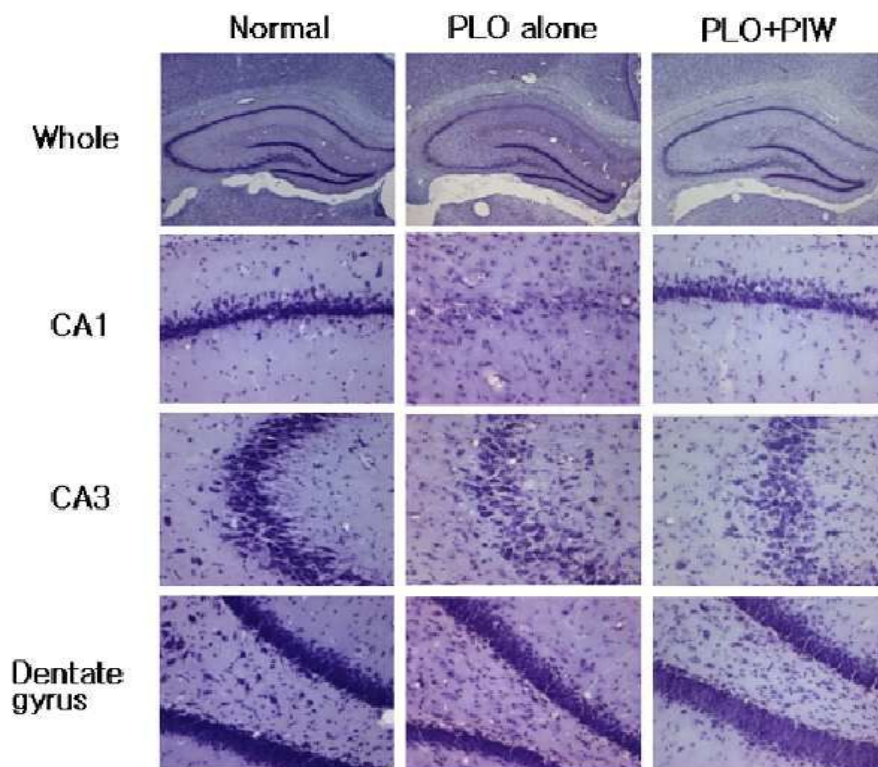
[0046] 도 6은 흰쥐의 조롱박피질에서 간질지속상태로 유발한 미세아교세포의 활성화에 미치는 말뚝진흙버섯 추출물의 효과를 보여주는 조직사진이다. 조롱박피질 조직을 Iba-1로 염색한 결과 피질 전역에서 발작(PLO alone)으로 인해 미세아교세포가 크게 활성화되며 이런 미세아교세포의 활성화가 말뚝진흙버섯 추출물(PLO+PIW)에 의해 억제됨을 보여준다.

[0047] 도 7은 흰쥐의 조롱박피질에서 간질지속상태로 유발한 혈액 단백질의 유출에 미치는 말뚝진흙버섯 추출물의 효과를 보여주는 조직사진이다. 조롱박피질 조직을 cresyl violet로 염색한 결과(윗줄) 발작(PLO alone)으로 인해 출혈과 부종 발생하며 이런 현상이 말뚝진흙버섯 추출물(PLO+PIW)에 의해 억제됨을 보여준다. 한편 조롱박피질 조직을 혈청 IgG에 대한 면역조직화학법으로 염색한 결과(아랫줄) 발작(PLO alone)에 의해 혈장 IgG가 다량 뇌 조직으로 유출되었으며 이런 현상이 말뚝진흙버섯 추출물(PLO+PIW)에 의해 억제됨을 보여준다.

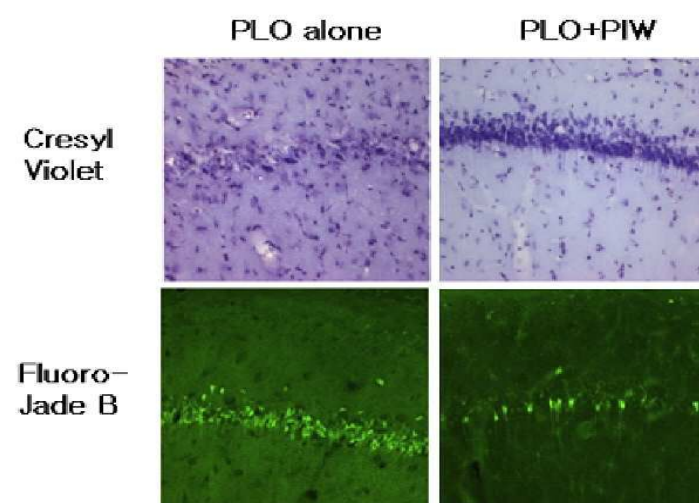
[0048] 도 8은 흰쥐의 조롱박피질에서 간질지속상태로 유발한 혈관뇌장벽(blood brain barrier, BBB)의 손상에 미치는 말뚝진흙버섯 추출물의 효과를 보여주는 조직사진이다. 조롱박피질 조직을 BBB의 표지물질인 SMI 71에 대한 면역조직화학법으로 염색한 결과 말뚝진흙버섯 추출물(PLO+PIW)을 전처리하면 발작 이후에도 BBB가 피질 전역에서 보존되고 있음을 보여준다. 본 발명에서는 발작(PLO alone)으로 인해 BBB가 손상되었음이 분명히 관찰되지 않았다. 그 이유는 본 발명에서 사용한 1차 항체가 polyclone성 이므로 혈장단백의 간섭이 심해 BBB의 손상이 분명히 보이지 않기 때문이다. 그러나 발작 시 BBB가 파괴됨은 이미 잘 알려져 있는 사실이다.

도면

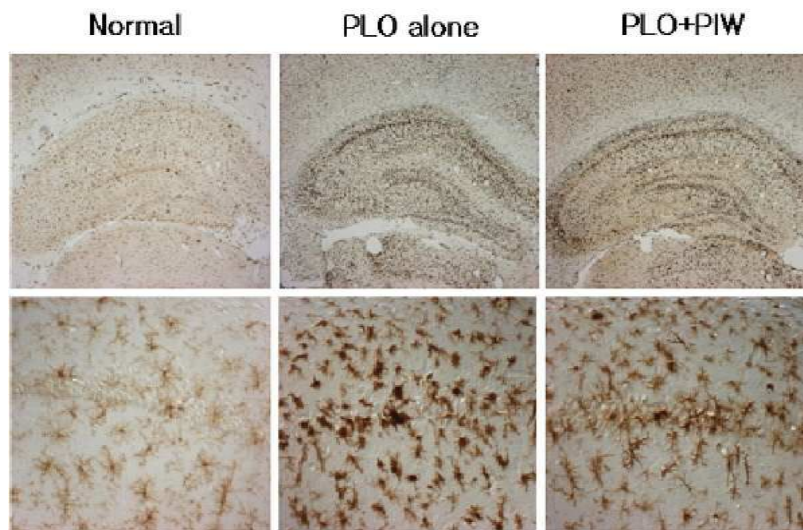
도면1



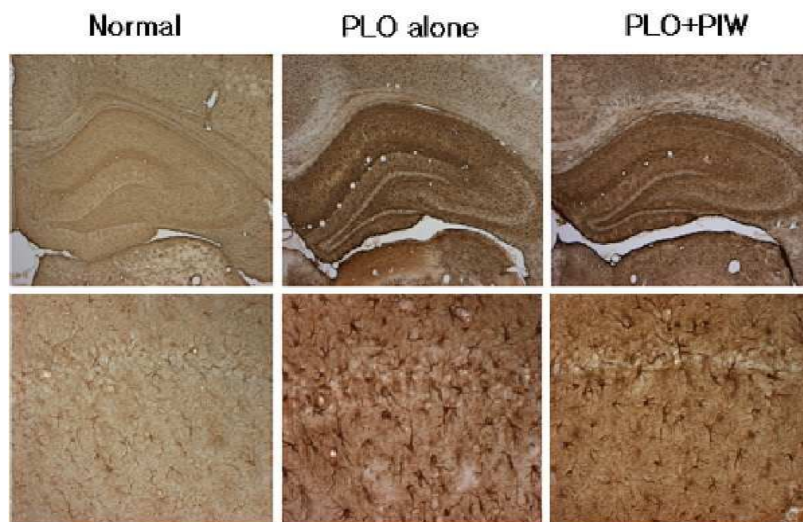
도면2



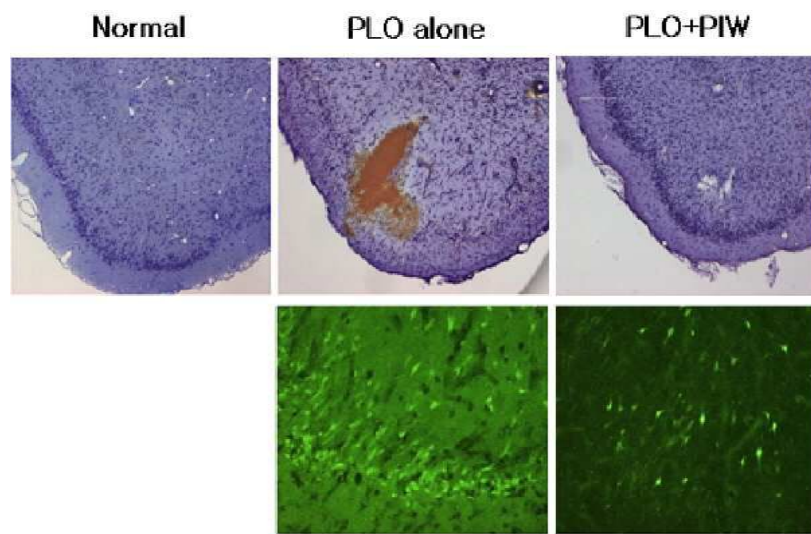
도면3



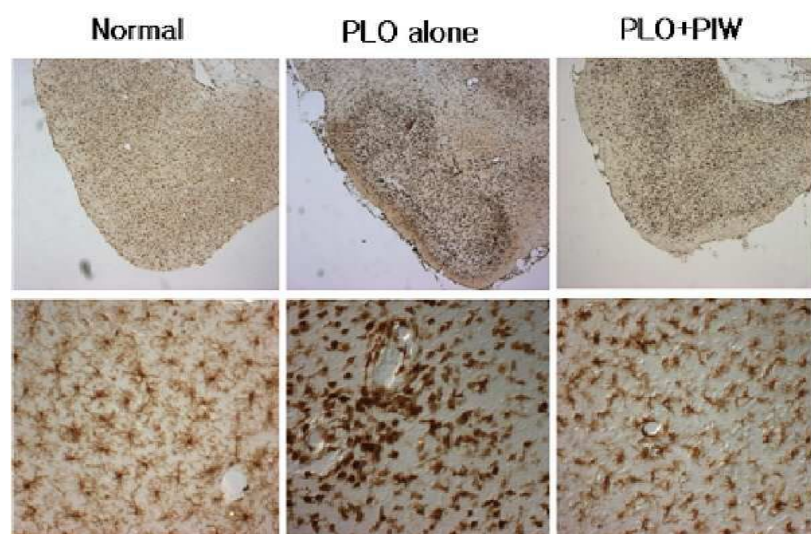
도면4



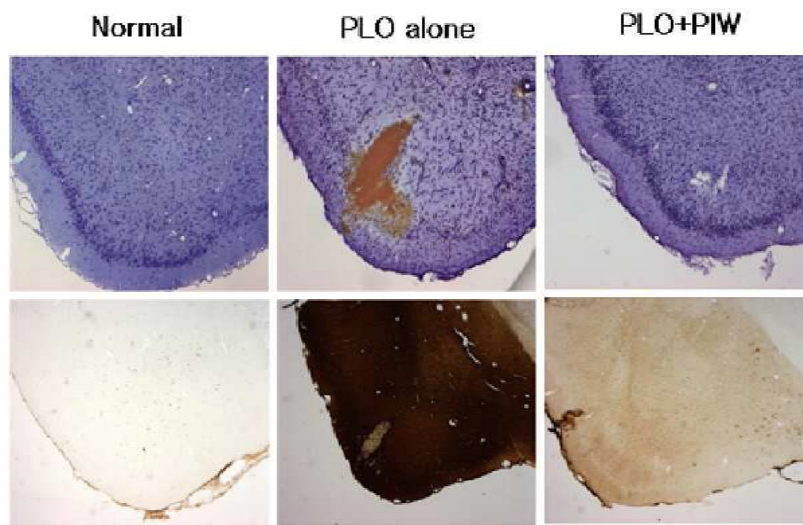
도면5



도면6



도면7



도면8

