



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0086810
(43) 공개일자 2018년08월01일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>A61K 31/7034</i> (2006.01) <i>A23L 33/10</i> (2016.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>A61K 31/7034</i> (2013.01)
<i>A23L 33/10</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0010719</p> <p>(22) 출원일자 2017년01월23일
심사청구일자 없음</p> | <p>(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
이봄비
서울특별시 동대문구 경희대로1나길 50 (회기동)
함대현
서울특별시 강남구 도곡로78길 22 대치삼성아파트 112동 302호(대치동, 삼성아파트)
이혜정
서울특별시 용산구 장문로 27 4동 1001호 (이태원동, 청화아파트)</p> <p>(74) 대리인
손민</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 4 항

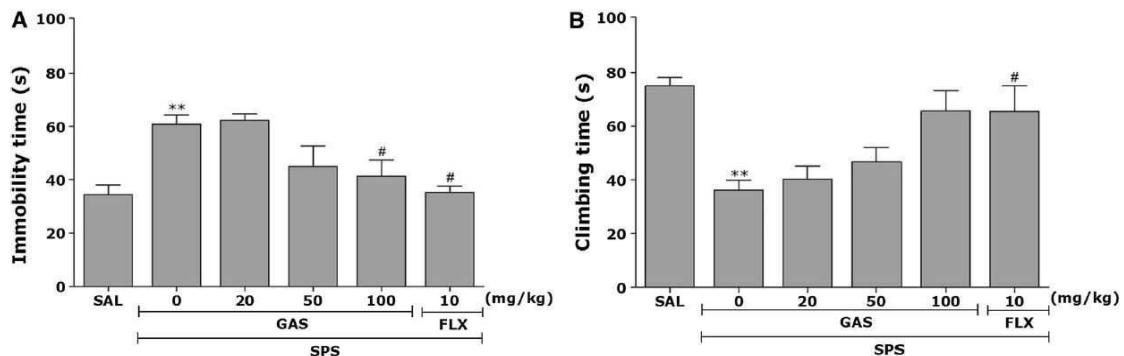
(54) 발명의 명칭 가스트로딘(gastrodin)을 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 가스트로딘(gastrodin)을 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 가스트로딘을 유효성분으로 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 가스트로딘은 우수한 PTSD 치료 효과를 나타내므로, 약학 조성물 또는 건강기능식품에 유효성분으로 포함되어 PTSD의 치료제 또는 개선제 등의 개발에 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2063051

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업, 기본연구지원사업

연구과제명 뇌신경세포신생과 신경연접가소성형성을 이중 표적하는 한방약침자극에 의한 손상된 기억
기능 회복 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

가스트로딘(gastrodin)을 유효성분으로 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 가스트로딘은 50 내지 100 mg/kg로 개체에 투여되는 것인, 약학 조성물.

청구항 4

가스트로딘(gastrodin)을 유효성분으로 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 가스트로딘(gastrodin)을 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 가스트로딘을 유효성분으로 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 외상 후 스트레스 장애(Post-traumatic stress disorder; PTSD)는 외상 및 스트레스 관련 장애로 재분류된 불안 장애로서, 생명을 위협하는 상황에 반응하여 야기될 수 있다. 주로 일상 생활에서 경험할 수 있는 사건에서 벗어난 사건들, 예로 천재지변, 화재, 전쟁, 신체적 폭행, 고문, 성폭행, 인질사건, 학대, 그 밖의 대형사고 등을 겪은 뒤에 발생한다. 증상이 나타나는 시기는 개인에 따라 다른데, 충격 후 즉시 시작될 수도 있고 수일, 수주, 수개월 또는 수년이 지나고 나서도 나타날 수 있다.

[0004] PTSD의 증상은 과민반응(hyperalertness, hyperarousal)과 충격의 재경험(re-experience or intrusion), 감정 회피(avoidance) 또는 마비(emotional numbness) 등으로 나타난다. 또한, 두통이나 소화불량, 구토, 위통, 수전증, 호르몬의 변화로 인하여 알레르기과 같은 현상이 발생할 수 있고, 이별 불안, 학교 공포, 외부인 공포 등 다양하게 나타날 수 있다. 비현실적인 감정 때문에 알코올과 약물에 의존하여 남용 및 중독으로 이어지는 경우가 있고, 자율신경계 장애가 나타나며, 때로는 환각이 보이고, 해리성 장애나 공황 발작이 같이 나타날 수 있다.

[0006] PTSD의 치료에는 인지치료, 행동치료, 최면치료, 집단치료, 약물치료, 신경차단 치료요법 등의 방법이 사용되며, 약물치료에는 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressant), 단가아민 산화효소억제제(MAO inhibitor) 또는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(Selective Serotonin Reuptake Inhibitors; SSRIs) 등의 항우울제가 주로 사용된다.

- [0007] 상술한 SSRIs의 대표적인 예로, 프로작(Prozac)이란 상품명을 갖는 플루옥세틴(Fluoxetine)을 들 수 있다. 플루옥세틴이 PTSD의 치료에 사용될 수 있음은 여러 문헌을 통해 공지된 바 있으며(Journal of Traumatic Stress, 1991 Jul, 4(3):419-423.; Neurosciences (Riyadh). 2011 Jul, 16(3):257-62.), 새로운 품목의 다양한 PTSD 치료약이 존재하지만, 그 중에서도 플루옥세틴은 수많은 국가에서 가장 널리 처방해 주는 약제로 알려져 있다. 다만, SSRIs는 인지 장애, 체중 증가, 성기능 장애, 진정, 의존증 및 금단 증상을 포함하여 그 효능을 제한하는 부작용을 나타냄에 따라, 장기간의 치료 시 보다 안전한 약물을 사용하고자 하는 노력이 이루어지고 있다.
- [0008] 최근에는 PTSD, 우울증, 불안장애 등의 치료를 위한 천연 제품이나 약용 식물의 개발에 관심이 쏠리고 있으며, 이에 따라 미강 추출물을 유효성분으로 포함하는 우울증 또는 인지장애의 예방 또는 치료용 조성물(한국 등록특허공보 제10-1620163호), 비타민나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신적 스트레스, 우울증 또는 치매 치료 및 예방을 위한 조성물(한국 공개특허공보 제10-2016-0045256호), 복합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증의 예방 또는 치료용 약학조성물(한국 등록특허공보 제10-1470241호) 등이 개발된 바 있다. 그러나, 그 효과에 대해서는 여전히 의문이 제기되고 있다.
- [0010] 한편, 가스트로딘(Gastrodin)은 천마(*Gastrodia elata Blume*)에 포함된 주요 생리 활성성분으로서, 신경 쇠약, 어지럼증, 간질, 편두통 및 치매의 치료를 위해 널리 사용되어왔다. 가스트로딘은 혈액 뇌 장벽(blood-brain barrier)을 통과하여 중추 신경계에 침투하는데(Wang Q. et al., 2008, J Pharm Biomed Anal 46:399-404), 배양된 피질 뉴런에서 저산소증에 대한 신경 보호 작용을 나타내며, 아밀로이드- β -펩타이드에 의해 유도되는 신경 독성으로부터 해마 뉴런을 보호하고(Zhao X. et al., 2012, Brain Res 1482:13-21), 일시적인 뇌 허혈 이후에 야기된 뇌 손상을 개선시킬 수 있음이 규명되었으나(Zeng X. et al., 2006, Planta Med 72:1359-1365), PTSD 등의 정신병적인 증상의 치료 또는 개선제로서의 가스트로딘에 대한 연구는 미미한 실정이었다.
- [0012] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 외상 후 스트레스 장애를 치료하기 위한 약물을 개발하고자 예의 노력연구한 결과, 가스트로딘은 외상 후 스트레스 장애를 갖는 랫트 모델의 불안/우울 행동 증상을 경감시키고, PTSD 매개 인자의 발현을 감소시킴으로써 상기 증상을 완화시킴을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 하나의 목적은 가스트로딘(gastrodin)을 유효성분으로 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 하나의 목적은 가스트로딘을 유효성분으로 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 가스트로딘(gastrodin)을 유효성분으로 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0018] 다른 하나의 양태는 가스트로딘을 유효성분으로 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 가스트로딘은 우수한 PTSD 치료 효과를 나타내므로, 약학 조성물 또는 건강기능식품에 유효성분으로 포함되어 PTSD의 치료제 또는 개선제 등의 개발에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 외상 후 스트레스 장애(Post-traumatic stress disorder; PTSD) 모델을 제작하기 위한 실험의 개략도이며, 단일의 지속적 스트레스(Single prolonged stress; SPS)를 통한 불안-유사 증상의 유도 과정 및 이부프로펜의 투여 시기를 나타낸다. 이때, IMO는 고정(immobilization), FS는 수영(forced swim), Rest는 휴식, Ether는 에테르 증기의 노출, OFT는 열린 공간 테스트(Open field test), EPM은 고가식 십자 미로(Elevated plus maze) 테스트를 의미한다.

도 2는 SPS에 의하여 PTSD가 유도된 랫트에서, 체중 및 혈청 코르티코스테론 수준에 대한 가스트로딘(gastrodin; GAS)의 영향을 보여주는 그래프이다. A는 체중, B는 혈청 코르티코스테론(Serum Cort)에 관한 것이다. SAL은 식염수를 처리한 양성 대조군 랫트, SPS는 SPS를 처리한 음성 대조군 랫트, SPS+GAS20은 SPS 및 20 mg/kg GAS를 처리한 랫트, SPS+GAS50은 SPS 및 50 mg/kg GAS를 처리한 랫트, SPS+GAS100은 SPS 및 100 mg/kg GAS를 처리한 랫트, SPS+FLX는 SPS 및 플루옥세틴(Fluoxetine)을 처리한 랫트를 의미한다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 는 SAL 그룹과 비교 시, # $p < 0.05$ 는 SPS 그룹과 비교 시의 통계적 유의성을 나타낸다.

도 3은 SPS에 의하여 PTSD가 유도된 랫트에서, 우울-유사 증상에 대한 GAS의 영향을 보여주는 그래프이다. A는 부동 지속 기간(immobility time), B는 등반 행동의 지속 기간(climbing time)에 관한 것이다. ** $p < 0.01$ 는 SAL 그룹과 비교 시, # $p < 0.05$ 는 SPS 그룹과 비교 시의 통계적 유의성을 나타낸다.

도 4는 SPS에 의하여 PTSD가 유도된 랫트에서, 노르에피네프린(norepinephrine; NE)의 발현 수준 변화에 대한 GAS의 영향을 보여주는 ELISA 결과에 관한 것이다. * $p < 0.05$ 는 SAL 그룹과 비교 시, # $p < 0.05$ 는 SPS 그룹과 비교 시의 통계적 유의성을 나타낸다.

도 5는 SPS에 의하여 PTSD가 유도된 랫트에서, 티로신 수산화효소(tyrosine hydroxylase; TH) 및 뉴로펩타이드 Y(neuropeptide Y; NPY)의 발현 수준 변화에 대한 GAS의 영향을 보여주는 면역조직화학염색 결과에 관한 것이다. A는 TH 또는 NPY에 대하여 양성 면역반응을 나타낸 세포의 모습, B는 TH-면역반응 세포의 수, 및 C는 NPY-면역반응 세포의 수에 관한 것이다. 스케일바(Scale bar)는 200 μm 를 나타내며, * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$ 는 SAL 그룹과 비교 시, # $p < 0.05$ 는 SPS 그룹과 비교 시의 통계적 유의성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0025] 실시예 1. 실험동물의 사용

[0026] 동물 실험에는 200-220g의 수컷 SD(Sprague-Dawley) 랫트(6주령, Samtako Animal Company; Seoul, Korea)를 이용하였다. 모든 랫트는 폴리카보네이트 케이지(polycarbonate cage)당 다섯 마리가 머무르는, 접근이 제한된 설치류 시설에서 보관하였다. 동물실은 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도, $55 \pm 15\%$ 의 상대습도가 유지되도록 조절하였고, 케이지는 12시간의 빛을 받도록 조절하였으며, 실험 기간 동안 멸균된 음용수 및 표준 식사 식단을 임의로 섭취할 수 있도록 제공하였다. 모든 동물 실험은 공급자로부터 동물을 제공받은 최소 7일 이후에 시작하였고, 국립 보건원(NIH Publications 80-23, 1996년 개정)의 실험동물 사용에 관한 가이드라인에 따라 수행하였으며, 경희대학교 동물관리위원회의 승인을 받아 수행하였다.

[0027] 서로 다른 그룹에 속한 6-7마리의 랫트에 약물을 처리하여 PTSD에 대한 치료 효과를 확인하였다. 랫트에서 가스트로딘(gastrodin; GAS)의 표준 투여 용량 및 투여 기간은 기존 연구에 근거하여 설정하였다. 가스트로딘(20 또는 40 mg/kg, 체중, Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louise, MO, USA) 및 양성 대조군 약물인 플루옥세틴(10 mg/kg, FLX; Fluoxetine hydrochloride, Eli Lilly and Company, Basingstoke, Hampshire)은 복강 내 주사(intraperitoneally; i.p.)를 통해 1 ml/kg씩 14일 동안 투여하였다. 약물은 투여 직전 준비하였다.

[0029] 실시예 2. 단일의 지속적 스트레스(Single prolonged stress)

[0030] 외상 후 스트레스 장애(Post-traumatic stress disorder; PTSD)를 유발하기 위한 단일의 지속적 스트레스

(Single prolonged stress; SPS) 모델은 기존의 공지된 방법에 따라 수행하였다(Serova LI. et al., Neuroscience. 2013;236:298-312.). 먼저, 랫트를 구속 튜브(높이 20cm, 직경 7cm)에 2시간 동안 고정(immobilization; IMO)시켰다. 이후, 상기 랫트를 24℃의 담수가 2/3 정도 채워진 유리 실린더(높이 50cm, 직경 20cm)에서 20분 동안 수영(forced swim; FS)하도록 하였다. 랫트를 건조시키고 15분 동안 회복시킨 다음 의식이 없어질 때까지 에테르 증기에 노출시켰다. SPS 과정은 오전 10시에서 오후 4시 사이에 수행하였다. SPS 스트레스 요인을 준 이후, 랫트를 케이지 당 1마리씩 두었고, PTSD 유사 증상이 나타날 수 있도록 14일간 방해하지 않았다.

[0031] 체중 증가 및 혈청 코르티코스테론(CORT; corticosterone) 수준 변화 등의 매개 변수는 PTSD의 SPS 모델에 의한 정신병적 발달의 영향을 관찰하기 위해 측정하였다. 14일의 방해받지 않는 조건이 끝나고 24시간 후에, 불안 등의 행동을 관찰하는 행동 테스트를 수행하였다. SPS와 행동 테스트의 전체 실험 일정은 도 1에 나타내었다. 한 테스트에서 다른 테스트로의 이월을 피하기 위해 각 테스트를 별도로 수행하거나, 각 테스트 사이에 수행하였다. 행동 테스트 및 체중 측정 이후에 모든 랫트를 희생시켰고, 뇌 조직을 즉시 수집하여 -70℃에서 보관하였다.

[0033] 실시예 3. 강제 수영 부하 실험(Forced swimming test; FST)

[0034] 강제 수영 부하 실험(Forced swimming test; FST)은 기존의 공지된 방법을 변형하여 수행하였다(Porsolt RD. et al., Pharmacol Biochem Behav 36:963-971). 투명한 플렉시글라스 실린더(Plexiglas cylinder, 20 cm 직경 × 50 cm 높이)에 25℃ 물을 30cm 깊이로 채웠다. 이 깊이에서, 랫트는 꼬리나 뒷다리가 실린더의 바닥에 닿지 않는다. 먼저 15분 간의 예비 테스트를 수행하였고, 24시간 후에 이어서 5분 간의 테스트를 수행하였다. 실험동물은 5분 동안 강제 수영시킨 이후, 도피 행동(등반과 수영)을 모니터하였다. 실험동물의 행동은 계속적으로 오버헤드 비디오 카메라(overhead video camera)를 사용하여 전체 테스트 시간 동안 기록하였다.

[0035] 부동 행동은 실험동물이 도피 행동을 보이지 않는 시간 길이(전체 테스트 시간에서 등반과 수영 행동을 하는데 소비되는 시간을 뺀 시간; 전체 테스트 시간 - 등반과 수영 행동으로 소비한 시간)로 산출하였다. 마우스가 발버둥치지 않고 물속에 남아있는 경우에 움직이지 않는 것으로 판단하였고, 이는 머리를 물 위에 두는 데 필요한 움직임만을 만들었다. 수영 챔버의 측면을 따라 앞다리가 위로 향하는 움직임을 보이는 경우에 등반 행동으로 정의하였으며, 다른 사분면으로 넘어가는 것을 포함하여 수영 전체의 움직임을 수영 행동으로 정의하였다.

[0037] 실시예 4. 코르티코스테론(corticosterone; CORT) 및 노르에피네프린(norepinephrine; NE) 측정

[0038] PTSD가 유도된 14일 이후, 혈중 CORT 농도 및 뇌 조직 내 NE 농도를 측정하였다. 행동 실험 이후에 마취하지 않은 랫트의 목을 베어 희생시켰고, 상행 대동맥을 통해 혈액을 신속하게 수집하였다. 해마는 무작위 순서로 랫트의 뇌에서 빠르게 제거하였고, 전두엽이 가해지는 스트레스를 피하기 위해 특별히 주의를 기울였다.

[0039] 혈액 샘플을 4000g에서 10분간 원심 분리하고, 혈청을 채취하였다. 코르티코스테론(CORT; corticosterone) 농도는 래빗 폴리클로날 CORT 항체(rabbit polyclonal CORT antibody, Abcam Corticosterone ELISA kit; Cambridge, MA, USA)를 사용하는 경쟁적 효소-연결 면역 흡착 어세이(enzymelinked immunosorbent assay; ELISA)를 통해 측정하였다. 뇌 조직 샘플은 사용 시까지 -80℃에 보관하였다.

[0040] 해마는 137 mM NaCl, 20 mM Tris(pH 8.0), 1% NP40, 10% 글리세롤(glycerol), 1 mM PMSF, 10 mg/ml 아프로티닌(aprotinin), 1 mg/ml 류페틴(leupeptin) 및 0.5 mM 바나듐산 나트륨(sodium vanadate)이 포함된 용해 버퍼에서 조직 균질화기를 사용하여 얼음 위에서 균질화를 수행하고, 4℃에서 1분간 진탕배양하였다. 상기 균질액을 원심분리하고 상등액을 수집하였으며, 단백질 농도는 BSA를 표준으로 하여 측정하였다.

[0041] 노르에피네프린(norepinephrine; NE) 농도는 마우스 모노클로날 NE 항체(NE ELISA kit; Novus Biologicals, LLC., Littleton, CO, USA)를 사용하는 경쟁적 효소-연결 면역 흡착 어세이(enzymelinked immunosorbent assay; ELISA)를 통해 측정하였다. 뇌 조직 샘플은 사용 시까지 -80℃에 보관하였다. 적절한 발색 후, ELISA 판독기(MultiRead 400; Authos Co., Vienna, Austria)를 사용하여 450 nm에서 광학밀도를 측정하였다.

[0043] 실시예 5. 티로신 수산화효소 및 뉴로펩타이드 Y에 대한 면역조직화학

- [0044] 면역조직화학(immunohistochemical)을 수행하기 위하여, 각 그룹의 3마리 랫트를 펜토바비탈 나트륨(sodium pentobarbital, 80 mg/kg, 복강 내 주사)을 이용하여 마취시켰고, 식염수(saline, 0.9%)에 이어, 0.1 M PBS(phosphate-buffered saline)에 포함된 4%의 파라포름알데히드를 이용하여 상행 대동맥을 관류시켰다. 무작위의 순서로 뇌를 제거하였고, 밤새 고정시킨 후, 0.1 M PBS에 포함된 20% 수크로스(sucrose)를 이용하여 4℃에서 동결보존하였다. 30 μ m 두께의 관상 절편을 저온 유지 장치(Leica CM1850; Leica Microsystems Ltd., Nussloch, Germany)를 사용하여 해마를 통해 연속적으로 절단하였고, Paxinos와 Watson의 랫트 뇌도보(Paxinos G, Watson C. New York: Academic Press; 1986. p.54-85.)에 따라 절편을 얻었다.
- [0045] 이후, 아비딘-바이오틴-퍼옥시다제 복합체(avidin-biotin-peroxidase complex; ABC) 방법을 사용하여 상기 절편의 티로신 수산화효소(tyrosine hydroxylase; TH) 및 뉴로펩타이드 Y(neuropeptide Y; NPY) 발현을 면역염색하였다. 0.3% 트리트론 X-100이 포함된 PBS(PBST)에 포함된 항-TH 항체(1:2000 희석; #AB1542, Chemicon International Inc., Temecular, CA, USA) 및 래빗 항-NPY 항체(1:2000 희석, #22940, Immunostar, Hudson, WI, USA)로 섹션을 4℃에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 이차 항체는 Vector Laboratories Co.(Burlingame, CA, USA)에서 제공받았고, 2% 고트(goat) 일반 혈청이 포함된 PBST에서 1:200로 희석하였다. 면역반응도를 가시화하기 위하여, 섹션을 ABC 시약(Vectastain Elite ABC kit; Vector Labs. Co., Burlingame, CA, USA)에서 90분 동안 인큐베이션하였고, DAB(3,3'-diaminobenzidine, Sigma) 및 0.01% H₂O₂가 포함된 용액으로 1분 동안 인큐베이션하였다. 조직을 PBS 및 증류수로 행군 뒤, 슬라이드 위에 마운팅하였다.
- [0046] 이미지를 AxioVision 3.0 이미징 시스템(Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germany)을 이용하여 촬영하였고, Adobe Photoshop(Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA)을 이용하여 가공하였다. 섹션을 200× 확대하여 관찰하였고, 청반(locus coeruleus; LC)에서 발현된 TH, 뇌실방핵(paraventricular nucleus; PVN)에서 발현된 NPY를 측정하였다. LC 및 시상하부(hypothalamus) 영역 내의 TH- 및 NPY-표지된 세포의 수는 동물당 5개의 섹션 각각에서 계수되었다. 면역 양성 세포의 수는 Paxinos와 Watson의 주축성(stereotactic) 랫트 뇌도보에 따라 쥐 두뇌 당 LC와 시상 하부 측정하였다.
- [0047] TH- 및 NPY-면역양성 세포의 수는 그들의 밀도가 배경 수준 이상의 어두운 정도에 도달했을 때만 계산하였다. 이미지 간의 밝기 및 대비는 면역 반응 세포의 주관적인 선택 가능성을 배제하기 위하여 조정하지 않았다.
- [0049] **실시예 6. 통계학적 분석**
- [0050] 모든 측정은 실험 조건을 알지 못하는 독립적 조사관을 통해 수행하였다. 결과는 평균±표준 오차(SE)로 표시하였다. 정상적으로 분산된 데이터 내 또는 사이의 차이점은 SPSS(버전 13.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)를 사용한 분산 분석 (ANOVA)을 사용하여 분석한 후, Tukey's post hoc 테스트를 수행하였다. 통계적 유의성은 p<0.05로 설정하였다.
- [0052] **실험예 1. 몸무게 및 혈청 CORT 수준의 변화에 대한 가스트로딘의 영향 분석**
- [0053] PTSD에 대한 가스트로딘(gastrodin; GAS)의 치료 효과를 확인하기 위하여, 단일의 지속적 스트레스(Single prolonged stress; SPS)를 준 이후에 각 그룹에 속한 랫트의 몸무게를 14일 동안 측정하였고, 실시예 4의 방법에 따라 혈청 코르티코스테론(CORT; corticosterone)의 농도를 측정하였다.
- [0054] 그 결과, 도 2의 A에서 볼 수 있듯이, 대조군 랫트(SAL; saline 처리 그룹)에 비하여, SPS 그룹은 14일까지 점진적인 몸무게 감소를 나타내었다. 그러나, SPS 그룹과 비교 시, 20 또는 100 mg/kg GAS가 처리된 개체는 체중 감소의 유의한 차이를 나타내지 않았다.
- [0055] 또한, 도 2의 B에서 볼 수 있듯이, SPS는 혈청 CORT 농도를 상당히 증가시키며, 그 양은 SAL 그룹에 비하여 245.13% 증가됨을 확인하였다. 그러나, GAS(50 또는 100 mg/kg)의 투여는 SPS에 의하여 유도된 혈청 CORT 수준을 상당히 감소시킴을 확인하였다.
- [0056] 상기 결과를 통해, SPS 과정은 랫트에서 불안-유사 증상을 유도함을 확인함에 따라, SPS를 통해 PTSD가 야기된 랫트 모델을 제작할 수 있음을 확인하였다.

[0058] 실험예 2. 우울-유사 증상에 대한 GAS의 영향 분석

[0059] PTSD에 대한 가스트로딘의 치료 효과를 확인하기 위하여, SPS를 준 이후에 각 그룹에 속한 랫트의 우울-유사 행동을 실시예 3의 방법에 따라 분석하였다. SPS를 처리한 30분 후에, GAS 또는 식염수를 처리하였다.

[0060] 그 결과, 도 3의 A에서 볼 수 있듯이, SAL 그룹과 비교 시, SPS에 노출된 랫트는 부동 지속 기간이 증가되는, 우울-유사 표현형을 나타냄을 확인하였다. 그러나, SPS 그룹과 비교 시, SPS + GAS100 그룹의 랫트는 부동 지속 기간이 감소됨을 확인하였다.

[0061] 또한, 도 3의 B에서 볼 수 있듯이, SAL 그룹과 비교 시, SPS에 노출된 랫트는 등반 행동의 지속 기간이 감소함을 확인하였고, 또 다른 우울-유사 표현형을 나타냄을 확인하였다. 그러나, SPS 그룹과 비교 시, SPS+GAS100 그룹의 랫트는 감소된 등반 행동의 시간이 회복됨을 확인하였다.

[0062] 상기 결과를 통해, GAS 투여는 SPS에 의해 유도된 우울-유사 행동을 유의하게 회복시키며, 그 효과는 SPS+FLX 그룹(10 mg/kg Fluoxetine 투여)에서 관찰되는 정도와 유사함을 확인하였다.

[0064] 실험예 3. 노르에피네프린의 발현 수준 변화에 대한 GAS의 영향 분석

[0065] PTSD에 대한 GAS의 치료 효과를 확인하기 위하여, SPS를 준 이후에 각 그룹에 속한 랫트에서 노르에피네프린의 발현 수준을 실시예 4의 방법에 따라 분석하였다. 노르에피네프린(norepinephrine; NE)은 신경전달물질로서, 그 분비량이 너무 적거나 많으면 우울 또는 충동성이 야기되므로, 적정의 분비량을 유지하는 것이 중요하다.

[0066] 그 결과, 도 4에서 볼 수 있듯이, SAL 그룹과 비교 시, SPS 그룹의 해마에서 발현되는 NE의 양은 약 247.32% 증가함을 확인하였다. 그러나, SPS 그룹과 비교 시, SPS+GAS 그룹에서는 증가된 NE의 발현양이 감소하며, SPS+GAS100 그룹의 NE 발현 감소 효과는 SPS+FLX 그룹(10 mg/kg Fluoxetine 투여)에서 관찰되는 정도와 유사함을 확인하였다.

[0067] 상기 결과를 통해, GAS는 노르에피네프린의 발현을 감소함으로써 항-우울 행동을 이끌어 낼 수 있음을 알 수 있었다.

[0069] 실험예 4. 티로신 수산화효소 및 뉴로펩타이드 Y 발현 수준 변화에 대한 GAS의 영향 분석

[0070] PTSD에 대한 GAS의 치료 효과를 확인하기 위하여, SPS를 준 이후에 각 그룹에 속한 랫트에서 PTSD 매개인자의 일종인, 티로신 수산화효소(tyrosine hydroxylase; TH) 및 뉴로펩타이드 Y(neuropeptide Y; NPY)의 발현을 실시예 5의 방법에 따라 분석하였다.

[0071] 구체적으로, 행동 실험을 진행한 이후에, 면역조직화염색을 통해 랫트의 뇌 조직 샘플을 분석하였다. 청반(locus coeruleus; LC)을 포함하는 중추 아드레날린성 부위(central adrenergic regions)에서 TH-면역반응 뉴런 점유를 관찰하였다.

[0072] 그 결과, 도 5의 A 및 B에서 볼 수 있듯이, SAL 그룹과 비교 시, SPS 그룹에서 TH에 대하여 면역반응하는 뉴런의 수는 약 163.52% 증가함을 확인하였다. 그러나, SPS 그룹과 비교 시, SPS+GAS100 그룹(100 mg/kg GAS 투여)에서는 중추 아드레날린성 부위에서 TH 면역반응 뉴런의 수는 상당히 감소함을 확인하였다. 아울러, SPS+GAS100 그룹의 TH 발현 감소 효과는 SPS+FLX 그룹(10 mg/kg Fluoxetine 투여)에서 관찰되는 정도와 유사함을 확인하였다.

[0073] 또한, 뇌실방핵(paraventricular nucleus; PVN)을 포함하는 다양한 시상 하부 부위(central adrenergic regions)에서 NPY-면역반응 뉴런 점유를 관찰하였다.

[0074] 그 결과, 도 5의 A 및 C에서 볼 수 있듯이, SAL 그룹과 비교 시, SPS 그룹에서 NPY에 대하여 면역반응하는 뉴런의 수는 약 69.60% 감소함을 확인하였다. 그러나, SPS 그룹과 비교 시, SPS+GAS100 그룹(100 mg/kg GAS 투여)에서는 시상 하부 부위에서 NPY 면역반응 뉴런의 수는 상당히 증가함을 확인하였다. 아울러, SPS+GAS100 그룹의 NPY 발현 감소 효과는 SPS+FLX 그룹(10 mg/kg Fluoxetine 투여)에서 관찰되는 정도와 유사함을 확인하였다.

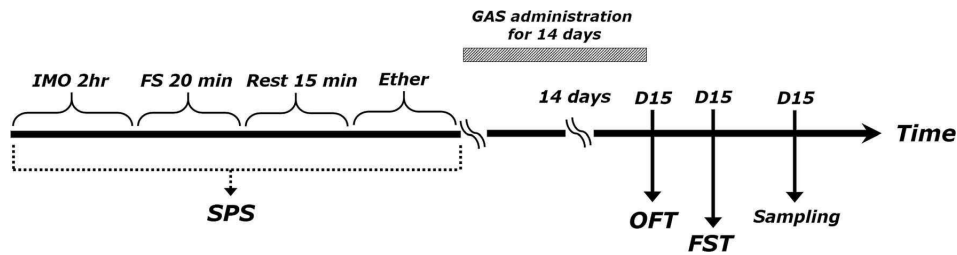
[0075] 상기 결과를 통해, GAS는 SPS에 의해 발현이 증가하거나 감소된 티로신 수산화효소 또는 뉴로펩타이드 Y의 발현을 정상화시킴으로써 항-우울 행동을 이끌어 낼 수 있음을 알 수 있었다.

[0077]

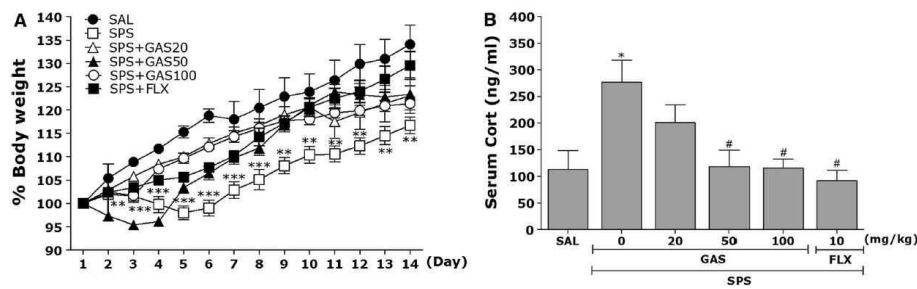
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

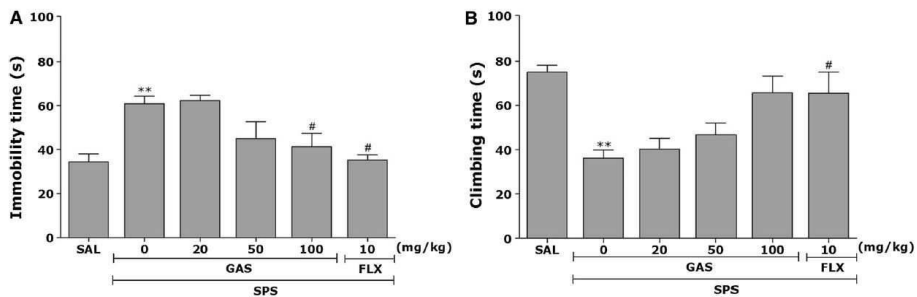
도면1



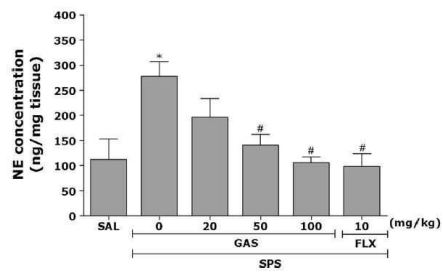
도면2



도면3



도면4



도면5

