(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월01일
(11) 등록번호 10-1423875
(24) 등록일자 2014년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/12 (2006.01) *A61K 36/56* (2006.01)
A61K 36/539 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0039460
(22) 출원일자 2013년04월10일
심사청구일자 2013년04월10일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020060019222 A
KR1020010081188 A
KR1020070100871 A
KR1020050075508 A

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
김호철
서울 동대문구 천장산로11길 17, 204동 1103호 (이문동, 이문삼성래미안아파트)
송정빈
서울 성동구 무학봉길 92, (하왕십리동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

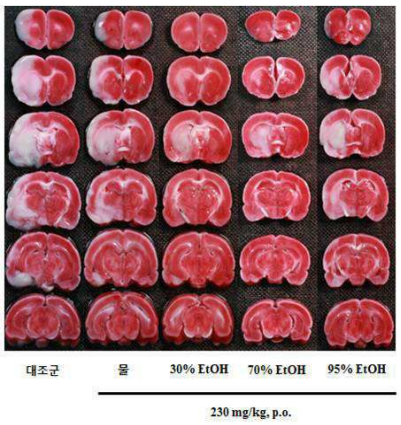
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 이정아

(54) 발명의 명칭 **복합 추출물을 함유하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명의 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물은 뇌 신경세포를 보호하는 효과가 우수하여, 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

최진규

서울 광진구 뚝섬로36길 19, 804동 501호 (자양동, 자양8차현대홈타운)

김영식

서울 송파구 백제고분로37길 8, (석촌동)

이성현

경기 남양주시 퇴계원면 도제원로 22, 103동 1303호 (성원아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	B110072
부처명	보건복지부
연구사업명	한의약선도기술개발사업
연구과제명	신경보호효과를 이용한 중풍치료 한약제제 개발
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교산학협력단
연구기간	2012.12.01 ~ 2013.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

고사리삼(*Sceptridium ternatum*), 밀몽화(*Buddleja officinalis*) 및 황금(*Scutellaria baicalensis*)의 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 복합 추출물은 물 또는 알코올을 추출용매로 하여 추출된 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 알코올은 10 내지 95% 에탄올인 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴 무도병, 피크(Pick)병 및 크로이펠츠-야콥(Creutzfeld-Jacob)병으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 복합추출물은 고사리삼, 밀몽화 및 황금을 중량기준 5 내지 10 : 5내지 10 : 1의 혼합비로 혼합하여 추출한 것인 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

고사리삼(*Sceptridium ternatum*), 밀몽화(*Buddleja officinalis*) 및 황금(*Scutellaria baicalensis*)의 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 복합 추출물은 고사리삼, 밀몽화 및 황금을 중량기준 5 내지 10 : 5 내지 10 : 1의 혼합비로 혼합하여 추출한 것인 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 통계청에서 2003년 10월 발표한 우리나라 노령 인구의 비율을 살펴보면, 우리나라는 지난 2000년 65세 이상 인구가 총인구에서 차지하는 비중이 7.2%에 이르러 고령화 사회에 들어섰으며, 오는 2019년에는 이 비율이 14%를 넘어 고령사회에 진입할 것으로 전망되고 있다. 이와 같이 최근 고령화 문제가 사회적인 이슈로 대두됨에 따라 고령인구의 특성이나 주거, 보건, 문화, 여가 등 노인복지 등에 대한 국민의 관심이 높아지고, 이에 대한 통계 수요도 늘어나고 있다. 이러한 변화의 핵심은 노령화 인구의 증가로 인해서 지난 50여 년간 사망의 주된 원인이 되었던 급성 전염성 질병보다는 만성 퇴행성 질병이 더욱더 큰 문제로 대두되고 있다는 점이다. 특히, 만성 퇴행성 질병 중에서 뇌혈관 질환에 의한 사망은 단일질환에 의한 사망률 중에서 2위를 기록하고 있는 매우 중요한 질환이다.

[0003] 이러한 뇌혈관 질환은 크게 2가지 형태로 분류될 수 있다. 하나는 뇌출혈 등에서 볼 수 있는 출혈성 뇌질환이고, 다른 하나는 뇌혈관의 폐쇄 등에 의해 나타나는 허혈성 뇌질환이다. 출혈성 뇌질환은 교통사고 등

에 의해서 주로 나타나며, 허혈성 뇌질환은 주로 노인에게 자주 나타나는 질환이다.

[0004] 대뇌에 일시적인 뇌허혈이 유발되는 경우, 산소와 포도당의 공급의 차단되어 신경세포에서는 ATP 감소 및 부종(edema)이 발생하며, 결국 뇌의 광범위한 손상이 유발된다. 신경세포의 사멸은 뇌허혈이 있은 후 상당한 시간 경과 후에 나타나는데, 이를 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)라고 한다. 지연성 신경세포사는 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil)을 이용한 일과성 전뇌 허혈모델(transient forebrain ischemic model)을 통한 실험에서 살펴보면, 5분간 뇌허혈 유도 4일 후 해마(hippocampus)의 CA1 영역에서 신경세포사가 관찰되는 것으로 보고되고 있다(Kirino T, Sano K. *Acta Neuropathol.*, 62: 201-208, 1984; Kirino T. *Brain Res.*, 239: 57-69, 1982).

[0005] 지금까지 가장 널리 알려진 뇌허혈에 의한 신경세포사 기전으로는 2가지가 있다. 하나는 뇌허혈에 의해서 세포 바깥에 과도한 글루타메이트(glutamate)가 축적되게 되며, 이러한 글루타메이트가 세포 내로 유입되어 결국 과도한 세포 내 칼슘의 축적으로 신경세포사가 유발된다는 흥분성 신경세포사 기전(Kang TC, et al., *J. Neurocytol.*, 30: 945-955, 2001)이고, 다른 하나는 허혈-재관류시에 갑작스러운 산소 공급으로 인한 생체 내 라디칼의 증가로 인해 DNA 및 세포질에 손상을 입어 유발된다는 산화성 신경세포사이다(Won MH, et al., *Brain Res.*, 836: 70-78, 1999; Sub AY., Chen YM., *J. Biomed. Sci.*, 5: 401-414, 1998; Flowers F, Zimmerman JJ. *New Horiz.* 6: 169-180, 1998).

[0006] 이러한 기전적인 연구를 바탕으로 해서 뇌허혈시에 나타나는 신경세포사를 효과적으로 억제하는 물질을 탐색하거나, 물질에 대한 기전을 밝히는 연구가 많이 수행되고 있다. 그러나 아직까지 효과적으로 뇌허혈에 의한 신경세포사를 억제하는 물질은 거의 없는 실정이다.

[0007] 지금까지 유일하게 뇌허혈 치료제로 FDA 공인 시판 중인 조직 플라즈미노겐 활성자(tissue plasminogen activator)는 혈전용해제로서 뇌허혈을 유발시키는 혈전을 녹여 빠른 산소 및 포도당의 공급을 유도하는 물질이다. 따라서 직접적으로 신경세포를 보호하는 것이 아니기 때문에 빠른 사용이 필요하며, 혈전용해제라는 특징 때문에 과량으로 사용 또는 자주 사용하는 경우에는 혈관벽이 얇아져 결국 출혈성 뇌혈관질환을 유발하게 된다.

[0008] 또한, 초기의 칼슘 유입을 효과적으로 억제하기 위한 칼슘채널 억제제(calcium channel blocker)인 MK-801의 경우 임상적 테스트가 실행되었으나 그 부작용으로 인해 약품을 폐기한 바 있다.

[0009] 한편 국내의 경우, 다수의 천연물질이 뇌졸중 예방에 효과가 있는 건강식품으로 시판되고 있으나, 이들 대부분은 과학적인 검증을 거치지 않은 것이 많으며, 오히려 건강식품 남용의 원인이 되기도 하여 사회적인 문제가 되고 있다.

[0010] 따라서 오랫동안 사용되어 그 안정성이 입증된 천연자원들을 객관적으로 검증하여 뇌질환 치료 또는 예방 효과를 갖는 천연물질을 개발하고자 하는 노력이 시급히 요구되고 있다.

[0011] 고사리삼(*Sceptridium ternatum*)은 양치식물 고사리삼목 고사리삼과(Ophioglossaceae)의 여러해살이풀로 꽃고사리라고도 한다. 국내에서는 제주, 지리산, 덕유산, 경남, 경북, 강원, 경기도 일대의 높은 산에 자생한다. 생육환경은 습기가 많고 토양이 비옥한 반그늘의 풀숲에서 자란다. 한의학에서는 고사리삼의 전초(全草)를 음지궐(陰地蕨) 또는 화궐(花蕨)이라고 하며 약재로 사용한다. 한의학적으로 청열해독(淸熱解毒), 평간식풍(平肝熄風), 지해(止咳), 지혈(止血), 명목거예의 효능이 있어 폐열해수(肺熱咳嗽), 해혈(咳血), 백일해(百日咳), 전광(癲狂), 간질(癎疾), 창양종독(瘡瘍腫毒), 나력, 독사교상(毒蛇咬傷), 목적화안(目赤火眼), 목생예장 등을 치료하는데 사용되었다.

[0012] 밀몽화 (*Buddleja officinalis*)는 마전과(Loganiaceae)에 속한 낙엽관목으로 주로 건조한 꽃 또는 꽃봉오리를 약용으로 사용하며, 거풍(祛風), 량혈(凉血), 윤간(潤肝) 명목(明目)의 효능이 있는 것으로 알려져 목적종통다노수명(目赤腫痛多淚羞明), 청맹예장, 풍현란안(風弦爛眼)을 치료하는데 사용되었다.

[0013] 황금(*Scutellaria baicalensis*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 다년생 본초인 황금(Scutellaria baicalensis GEORGI)의 뿌리를 껍질을 제거하여 건조한 것으로 우고닌(wogonin), 바이칼린(baicalin), 바이칼레인(baicalein) 등 여러 종류의 플라보노이드들이 함유된 것으로 알려져 있다. 한의학에서 황금은 열(熱)이나 화(火)로 비유되는 염증성 질환을 치료하는 작용을 가진 약물로서 열을 내려준다하여 청열사화(淸熱瀉火)하는 효능을 가진다고 알려져 있다. 일반적으로 황금은 성질이 매우 고한(苦寒)하여 장(腸)과 폐(肺)의 열성질환을 치료하는데 뿐 아니라 외부의 사기가 인체에 침범하여 생기는 신열(身熱), 해수(기침), 열성설사, 황달, 토혈(吐血) 등의 질환에 주로 적용되어 왔으며, 또한 지사(止瀉), 해열, 항염증 및 항암작용이 있는 것으로도 알려져

있다.

[0014] 그러나 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물을 이용한 연구는 보고된 바 없다. 이에 본 발명자들은 고사리삼, 밀몽화, 황금의 복합추출물의 효과에 대하여 연구하던 중 이러한 복합 추출물이 뇌 신경세포를 보호하고 다양한 원인으로 인한 뇌 세포의 사멸을 억제함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 한국특허출원 제 10-2004-0067771호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 또한, 본 발명의 목적은 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명은 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 상기 복합추출물이 물 또는 알코올을 추출용매로 하여 추출된 것인 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 또한 본 발명은, 상기 알코올이 30 내지 95% 에탄올인 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 또한 본 발명은, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴 무도병, 피크(Pick)병 및 크로이펠츠-야콥(Creutzfeld-Jacob)병으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 또한 본 발명은 상기 복합추출물이 고사리삼, 밀몽화 및 황금을 중량기준 5 내지 10 : 5 내지 10 : 1의 혼합비로 하여 추출한 것인 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 또한 본 발명은, 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0024] 또한 본 발명은 상기 복합추출물이 고사리삼, 밀몽화 및 황금을 중량기준 5 내지 10 : 5 내지 10 : 1의 혼합비로 하여 추출한 것인 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물은 뇌 신경세포를 보호하는 효과가 우수하여, 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 30%, 70%, 95% 에탄올 추출 용매를 이용한 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 중대뇌동맥폐색모델(MCAo)에 처리 후, 뇌조직 절편을 TTC 염색법으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 30%, 70%, 95% 에탄올 추출 용매를 이용한 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 중대뇌동맥폐색모델(MCAo)에 처리 후, 경색 부피(infarct volume)의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 30% 에탄올 추출 용매를 이용한 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 중대뇌동맥폐색모델(MCAo)에

100, 200, 300mg/kg 처리 후, 뇌조직 절편을 TTC 염색법으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 30% 에탄올 추출 용매를 이용한 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 중대뇌동맥폐색모델(MCAo)에 100, 200, 300mg/kg 처리 후, 경색 부피(infarct volume)의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 30% 에탄올 추출 용매를 이용한 밀몽화, 황금의 단일추출물과 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 중대뇌동맥폐색모델(MCAo)에 각각 처리 후, 뇌조직 절편을 TTC 염색법으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 30% 에탄올 추출 용매를 이용한 밀몽화, 황금의 단일 추출물과 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 중대뇌동맥폐색모델(MCAo)에 각각 처리 후, 경색 부피(infarct volume)의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합추출물을 100, 200mg/kg으로 광화학적 색전 마우스 모델(PTB)에 경구 투여한 후, 뇌조직 절편을 TTC 염색법으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합추출물을 100, 200mg/kg으로 광화학적 색전 마우스 모델(PTB)에 경구 투여한 후, 경색 부피(infarct volume)의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 Aβ25-35 플라크 유발 독성에 대한 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합추출물(0.1, 1, 10㎍/ml)의 세포 보호 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 6-OHDA 유발 독성에 대한 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합추출물(0.1, 1, 10, 100㎍/ml)의 세포 보호 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0028] 본 발명의 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합추출물은 뇌허혈에 의한 신경세포 손상뿐만 아니라 Aβ25-35 플라크 유발 독성 및 6-OHDA 유발 독성에 의한 뇌신경세포 보호 효과가 뛰어나므로 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

[0029] 상기 복합 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합용매를 추출용매로 하여 추출된 추출물일 수 있으며, 상기 알코올은 바람직하게는 C1 내지 C4의 저급 알코올일 수 있다.

[0030] 상기 저급 알코올은 더욱 바람직하게는 에탄올일 수 있으며, 10 내지 95%, 바람직하게는 30 내지 95%의 에탄올일 수 있다.

[0031] 상기 퇴행성 뇌질환은 신경세포사에 의하여 유발되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴 무도병, 피크(Pick)병 및 크로이펠츠-야콥(Creutzfeld-Jacob)병으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0032] 본 발명의 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물은 고사리삼, 밀몽화, 황금을 중량기준 5 내지 10 : 5 내지 10 : 1의 혼합비로 하여 추출된 것일 수 있으며, 재료 혼합 후 추출한 것 뿐만 아니라 각각의 성분을 추출한 후 혼합한 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 추출물 혼합 조성물도 포함할 수 있다.

[0033] 상기 고사리삼, 밀몽화, 황금의 복합추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0034] (1) 고사리삼, 밀몽화, 황금을 건조 후 파쇄하는 단계;

[0035] (2) 파쇄된 고사리삼, 밀몽화, 황금에 추출용매를 가하여 추출물을 추출하는 단계;

[0036] (3) 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및

[0037] (4) 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.

[0038] 상기 단계 (1)에 사용되는 고사리삼, 밀몽화, 황금은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.

[0039] 상기 단계 (2)의 추출은 진탕 추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출 방법을 이용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 추출온도는 40 내지 100 ℃인 것이 바람직하며, 60 내지 80 ℃인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 추출시간은

2 내지 24시간인 것이 바람직하며, 추출회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하다.

[0040] 상기 단계 (2)에 사용되는 추출용매로는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 알코올은 C1~C4의 저급 알코올을 사용하는 것이 바람직하며, 메탄올 또는 에탄올을 사용하는 것이 가장 바람직하다. 또한, 상기 단계 (1)에서 준비된 고사리삼, 밀몽화, 황금의 5 내지 15배 중량 또는 부피의 추출용매를 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 10배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다.

[0041] 상기 단계 (4)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하며, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조 방법을 이용하는 것이 바람직하다. 다만, 이에 한정되지 않는다.

[0042] 본 발명의 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합추출물 유효성분으로 함유하는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%로 복합 추출물을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0043] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0044] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이드, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다.

[0045] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0046] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필레글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사를 통하여 투여될 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 추출물은 1일 0.1 내지 1000mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량의 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 조성물은 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0049] 또한 본 발명은 고사리삼, 밀몽화, 황금의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0050] 본 발명의 건강기능식품은 고사리삼, 밀몽화, 황금의 복합추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 함량은 사용목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 복합추출물은 식품의 총중량에 대하여 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있다.

[0051] 또한, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 본 발명의 복합추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 음료, 껌, 비타민 복합제, 드링크제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0052] 본 발명의 건강기능식품은 건강기능음료일 수 있으며, 상기 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트릴톨 등의 당알콜이다. 또한, 상술한 것 이외의 향미제(사카린, 아스파르탐 등)을 사용할 수 있다.

[0053] 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제,

착색제 및 증진제(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.

[0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 또는 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0055] **실시예 1. 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합 추출물 제조**

[0056] 고사리삼, 밀몽화, 황금을 각각 세절하여 [표 1]과 같은 구성과 중량비가 되도록 측정한 후 3ℓ의 물, 30%, 70%, 95% 에탄올 수용액에 침지하여 80℃에서 1차 3시간, 2차 2시간 동안 환류 추출한 후 여과지에 여과하였다. 상기 추출액을 감압 농축한 후 동결건조하여 물 추출물 43.9g(수율 20.5%), 30% 에탄올 추출물 32.3g(수율 15.1%), 70% 에탄올 추출물 39.6g(수율 18.5%), 95% 에탄올 추출물 37.6 g(수율 18.5%)을 제조하였다.

[0057] [표 1]

[0058]

	고사리삼	밀몽화	황금
원물 중량(g)	100	100	14
원물 중량비(추출물비)	7.32(10)	7.32(10)	1(3)

[0059] **비교예 1 및 2. 밀몽화 또는 황금의 단일 추출물 제조**

[0060] 신경 보호 효과가 있는 것으로 알려진 밀몽화(*Buddleja officinalis*), 황금(*Scutellaria baicalensis*)의 단일 추출물과 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합 추출물의 뇌신경세포 보호 효과를 확인하기 위하여 밀몽화, 황금의 단일 추출물을 아래 [표 2]의 조성에 따라 제조하였다.

[0061] [표 2]

[0062]

	원물 중량(g)	밀몽화	황금
비교예 1	**밀몽화 단일 추출물**	**233**	**0**
비교예 2	**황금 단일추출물**	**0**	**300**

[0063] 보다 구체적으로 밀몽화 추출물 제조를 위하여 국내 약수당(중국)에서 구입한 밀몽화 100g을 세절하여 3ℓ의 30% 에탄올 수용액에 침지하고 80℃에서 1차 3시간, 2차 2시간 동안 환류 추출한 후 여과지에 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 농축한 후 동결건조하여 밀몽화 추출물을 제조하였다.

[0064] 또한 황금 추출물의 제조를 위하여 국내 대우약업사(중국 감숙성)에서 구입한 황금 100g을 세절하여 3ℓ의 30% 에탄올 수용액에 침지하고 80℃에서 1차 3시간, 2차 2시간 동안 환류 추출한 후 여과지에 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 농축한 후 동결건조하여 황금 추출물을 제조하였다.

[0065] **실험예 1. 복합추출물의 뇌신경세포 보호효과 확인- 중대뇌동맥폐색모델(MCAo)**

[0066] **1.1 실험동물의 준비**

[0067] 실험동물로 300 g 내외의 8주령의 스프라그 다울리계(sprague-dawly, 샘타코, 대한민국) 수컷 랫트를 구입하여 사료와 물을 충분히 공급하면서 실험환경에 적응하도록 하였다. 1주일 정도의 적응기간을 준 후, 동물실험을 수행하였다.

[0068] **1.2 뇌신경세포 보호효과 확인을 위한 중대뇌동맥폐색모델의 제조**

[0069] 국소 뇌허혈에 의한 신경세포 손상에 대한 복합추출물의 신경세포 보호 효과를 측정하기 위하여 응용된 혈관 내 봉합사 삽입법(intraluminal suture method)을 사용하였다(Zea Longa, et al., Stroke, 20: 84-91, 1989). 먼저 22 ㎜의 4-0 나이론 봉합사의 끝 부분에서 약 5-8㎜ 길이를 실리콘으로 코팅하고 지름이 0.36 ㎜가 되게 제작하여 실험에 사용하였다. 70% N_2O와 30% O_2가 섞인 혼합가스에 5%의 이소플루란(isoflurane)을 첨가하여 랫트에게 주입하여 전신마취를 한 후, 한쪽은 채혈을 위한 주사기를, 다른 한쪽은 혈압측정용 프로브(probe)를 삽입하여 혈압을 관찰하였으며, 채혈을 한 후 혈당 및 혈액가스를 분석하여 관찰하였다. 목 전방 부위 중앙의 피부

를 절개하고 오른쪽 경동맥과 외경동맥(ECA)을 주위조직과 신경들로부터 조심스럽게 분리하였다. 외경동맥 분지인 상부갑상선동맥과 후두동맥을 전기소작기로 소작하고 내경동맥의 분지인 익돌근구개동맥을 전기소작하였다. 외경동맥을 자르고 프로브를 외경동맥에서 내경동맥으로 삽입하되 총경동맥분지에서 약 18~19㎜ 정도 삽입한 후 실로 고정하였다. 피부절개부위를 다시 봉합한 후 마취에서 자연회복시켰다. 모든 실험군은 같은 날 동일한 개체수로 제조하였으며, 체온이 37±0.5℃가 되도록 유지하면서 수술하고 관찰하였다. 수술 90분 후 상기와 같은 방법으로 랫트를 재마취하고 프로브를 후퇴시켜 재관류시켜 중대뇌동맥폐색모델을 제조하였다.

[0070] **1.3 복합 추출물의 신경보호 효과확인**

[0071] 실시예 1에서 제조된 고사리삼, 밀몽화, 황금의 복합추출물을 230mg/kg 농도로 랫트 체중 100g당 0.5 ㎖씩의 부피로 5% 다이메틸설폭사이드(DMSO)가 함유된 생리식염수로 희석하여 랫트에 허혈유발 직후 단회 경구 투여하였으며, 대조군은 같은 부피의 5% 다이메틸설콕사이드가 함유된 생리식염수를 단회 경구 투여하였다. 뇌허혈에 의해 유발되는 뇌조직의 손상에 대한 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물의 보호 효과를 관찰하기 위하여, 상기 실험예 1.2에서 제조된 중대뇌동맥 폐색 모델을 이용하여 TTC 염색을 수행하였다. 보다 구체적으로 TTC 염색을 위하여 재관류 24시간 후에 경추탈골 시키고, 2분 이내에 뇌를 적출하여 2㎜ 두께로 6개의 절편을 얻었다. 2% TTC(triphenyltetrazolium chloride) 용액이 들어 있는 12 웰 플레이트(well plate)에 조직을 충분히 담그고 37℃에서 30분 동안 방치한 후, 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehide)로 고정시켜 조직을 관찰하였다. 모든 수술과정은 수술현미경하에서 시행하였으며, 이소플루란을 2%로 계속 유지하면서 체온이 37℃ 이하로 떨어지지 않도록 램프를 이용하여 체온을 유지시켰다. 염색된 뇌 조직은 디지털 카메라로 하나씩 촬영한 후 컴퓨터로 옮겼고, 이미지 분석프로그램인 옵티마스 6.5(Optimas 6.5, Bioscan)를 이용하여 뇌경색 비율(%)을 하기 수학식 1로 계산하였다. 이때, 교정된 뇌경색의 부피(㎣)는 하기 수학식 2로 계산하였다.

[0072] [수학식 1]

[0073] 뇌경색 비율(%) = (A-B/A)×100

[0074] A: 정상 좌반구의 부피(㎣)

[0075] B: 교정된 뇌경색의 부피 (㎣)

[0076] [수학식 2]

[0077] 교정된 뇌경색의 부피(㎣) = (정상 좌반구의 부피)-(손상 반구의 정상 부위 부피)

[0078] 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0079] 도 1에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합추출물을 투여한 실험군은 물, 30%, 70%, 95% 추출 용매 모두에서 신경세포가 보호되어 상대적으로 TTC 로 염색되지 않은 부분이 적었으며, TTC 로 염색된 흑적색 부위의 면적이 넓게 나타났다. 구체적인 대뇌동맥 폐쇄로 유발한 뇌신경세포 사멸에 대한 복합 추출물의 보호 작용을 평가한 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 추출 용매로 물을 사용한 경우 유의한 정도의 경색 부피(infarct volume) 감소를 확인할 수 없었으나 30%, 70%, 95% 에탄올 추출 용매를 사용한 복합 추출물은 모두 유의한 정도의 경색 부피 감소 효과를 확인할 수 있었다. 보다 구체적으로 물 추출물, 30% 에탄올 추출물, 70% 에탄올 추출물, 95% 에탄올 추출물 230 mg/kg(p.o.)에서 경색부피가 각각 32.5±8.9, 25.4±9.1, 23.9±10.7, 27.9±10.3%로 나타나, 대조군 40.6±5.4%와 비교하였을 때 18.3, 36.1, 40.0%, 29.9%로 물 추출물을 제외하고 유의적인 뇌신경 보호 효과를 보였다($p<0.05$, $p<0.01$). 이를 통해 고사리삼, 밀몽화, 황금의 에탄올 복합 추출물은 뇌신경 보호 효과를 나타내어 허혈성 뇌 손상으로부터 뇌를 보호할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0080] **실험예 2. 복합 추출물의 용량에 따른 신경보호 효과확인**

[0081] 상기 실험예 1 에서 뇌신경 보호 효과가 확인된 고사리삼, 밀몽화, 황금의 복합 추출물의 용량에 따른 효과를 확인하기 위하여, 실시예 1에서 제조한 30% 에탄올 복합추출물을 100mg/kg, 200mg/kg, 300mg/kg(p.o)의 용량으로 랫트 체중 100g당 0.5 ㎖씩의 부피로 5% 다이메틸설폭사이드(DMSO)가 함유된 생리식염수로 희석하여 단회 경구 투여하였으며, 대조군은 같은 부피의 5% 다이메틸설콕사이드가 함유된 생리식염수를 단회 경구 투여하였다. 상기 실험예 1.3과 같은 방법으로 용량에 따른 복합 추출물의 신경보호 효과를 확인하였다.

[0082] 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0083] 도 3 에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합 추출물을 투여한 실험군은

100mg/kg, 200mg/kg, 300mg/kg(p.o) 용량 모두에서 신경세포가 보호되어 상대적으로 TTC로 염색되지 않은 부분이 적었으며, TTC 로 염색된 흑적색 부위의 면적이 넓게 나타났다. 구체적인 대뇌동맥 폐쇄로 유발한 뇌신경세포 사멸에 대한 복합 추출물의 보호 작용을 평가한 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 경색 부피가 각각 21.1±8.6, 25.1±9.6, 29.2±5.9%로 대조군 40.6±5.4%와 비교하였을 때 모든 용량에서 48.1, 38.2, 28.1%의 유의적인 뇌신경 보호 효과를 보였으며 100mg/kg에서 가장 뛰어난 뇌신경 보호 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다 ($p<0.001$).

[0084] **실험예 3. 복합 추출물과 단일 추출물의 뇌신경보호 효과 비교**

[0085] 실시예 1 및 비교예 1, 2에서 제조된 복합 및 단일 추출물은 모두 30% 에탄올로 추출하였으며 100mg/kg(p.o)의 용량으로 랫트 체중 100g당 0.5 ㎖씩의 부피로 5% 다이메틸설폭사이드(DMSO)가 함유된 생리식염수로 희석하여 단회 경구 투여한 후, 실험예 1과 같이 TTC 염색 및 뇌경색 부피를 비교하였다.

[0086] 결과를 [표 3] 및 도 5, 도 6 에 나타내었다.

[0087] [표 3]

[0088]

		용량(p.o.)	뇌신경 보호효과 (%)
비교예 1	밀몽화 추출물	100 mg/kg	8.4
비교예 2	황금 추출물	100 mg/kg	18.6
실시예 1	복합 추출물	100 mg/kg	48.0

[0089] 도 5, 도 6에 나타낸 바와 같이, 뇌경색 비율(%)은 대조군 40.6±1.7, 밀몽화 36.7±2.9, 황금 32.6±4.4%로 나타났으며, 고사리삼, 밀몽화 및 황금의 복합 추출물 투여군에서는 21.1±3.1%로 나타났다. 이와 함께 상기 [표 3]에 나타낸 바와 같이, 밀몽화, 황금 단일 추출물 100 mg/kg(p.o.)에서도 대조군과 비교하여 뇌신경 보호효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 기존에 신경보호 효과가 있는 것으로 알려져 있는 밀몽화와 황금 추출물의 경우 각각 8.4%, 18.6%의 뇌신경 보호효과만을 나타냄과 비교하여, 본 발명의 복합추출물은 뇌신경 보호효과가 뛰어난 고사리삼을 추가로 포함함으로써 48.0%의 현저히 높은 뇌신경 보호 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0090] **실험예 4. 복합추출물의 뇌신경세포 보호효과- 광화학적 색전 마우스 모델(PTB)**

[0091] **4.1 실험동물의 준비**

[0092] 실험동물로 22g 내외의 8주령 C57BL/6(샘타코, 대한민국) 수컷 마우스를 구입하여 사료와 물을 충분히 공급하면서 실험환경에 적응하도록 하였다. 1주일 정도의 적응기간을 준 후, 동물실험을 수행하였다.

[0093] **4.2 마우스 모델 제조**

[0094] 복합 추출물의 국소 뇌허혈에 의한 신경세포 손상에 대하여 신경세포 보호 효과를 측정하기 위하여 응용된 광화학적 색전 모델을 사용하였다(Lee, et al., Surgical Neurology, 67: 620-625, 2007).

[0095] 마우스에 450 mg/kg의 클로랄 하이드레이트(chloral hydrate)를 복강주사하여 마취 한 후, 정위 두부 고정장치(SG-4N, Narishige, Tokyo, Japan)에 두개골을 고정하였다. 병변을 만들 부위의 두피를 1.5 cm정도 절개하고 골막을 분리하여 두개골을 노출한 후, 직경 4 mm의 광섬유 광원(CL 6000 LED; Carl Zeiss, Gottingen, Germany)의 중심을 전정(bregma)의 측방 2 mm 지점에 유성펜으로 표시해두었다. 그리고 10 mg/ml 농도의 로즈벵갈(rose Bengal; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 마우스 당 0.1 ml 복강주사 하였다. 5분 후 조명기(illuminator)를 두개골에 밀착하고 열 발생이 없는 LED 광원을 사용하여 15분 동안 조사하였다. 유발 직후 복합 추출물을 120, 400, 1200 mg/kg 의 농도로 각각 마우스 체중 10 g당 0.1 ㎖씩의 부피로 5% DMSO로 희석하여 경구 투여하였으며, 대조군은 같은 부피의 5% DMSO 를 투여하였다. 피부절개부위를 다시 봉합한 후 자연회복시켰다.

[0096] 유발 24시간 후에 마우스를 희생시켜, 2분 이내에 뇌를 적출하였으며 2 ㎜ 두께의 5개 뇌절편을 얻었다. 2% TTC(triphenyltetrazolium chloride) 용액이 들어 있는 플레이트에 조직을 충분히 담그고 37℃에서 30분 동안 방치한 후 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehide)로 고정시켜 조직을 관찰하였다. 염색된 뇌 조직은 디지털 카메라로 하나씩 촬영한 후 컴퓨터로 옮겼고, 이미지 분석프로그램인 Axiovision Rel. 4.7 를 이용하여 뇌경색

부피를 측정하였다. 뇌경색 비율(%)을 상기 수학식 1로 계산하였다. 이때, 교정된 뇌경색의 부피(㎣)는 상기 수학식 2로 계산하였다.

[0097] **4.3 복합 추출물의 뇌신경세포 보호 효과**

[0098] 고사리삼, 밀몽화, 황금을 각각 상기 실시예 1의 [표 1]과 같은 구성과 중량비가 되도록 측정한 후, 30% 에탄올로 추출한 복합추출물을 100 mg/kg, 200 mg/kg 농도로 마우스 체중 100 g당 0.5 ㎖씩의 부피로 5% 다이메틸설폭사이드(DMSO)가 함유된 생리식염수로 희석하여 단회 경구 투여하였으며, 대조군은 같은 부피의 5% 다이메틸설콕사이드가 함유된 생리식염수를 단회 경구 투여하였다. 상기 실험예 1.3과 같은 방법으로 용량에 따른 복합 추출물의 신경보호 효과를 확인하였다.

[0099] 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0100] 도 7 에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물을 투여한 실험군은 100mg/kg, 200mg/kg (p.o)용량 모두에서 신경세포가 보호되어 상대적으로 TTC로 염색되지 않은 부분이 적었으며, TTC 로 염색된 흑적색 부위의 면적이 넓게 나타났다. 구체적인 뇌신경세포 보호 작용을 평가한 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 100, 200 mg/kg (p.o.) 투여군에서 경색 부피가 각각 10.9±2.9, 9.1±2.5%로 대조군 14.1±1.7%와 비교하였을 때 모든 용량에서 경색 부피가 감소되었음을 확인할 수 있었으며, 특히 200mg/kg 투여군에서 35.8%의 유의적인 뇌신경 보호 효과를 확인할 수 있었다.

[0101] **실험예 5. 복합추출물의 뇌신경세포 보호 효과 확인- Aβ25-35 플라크 유발 독성에 대한 복합추출물의 세포 생존율**

[0102] **5.1 세포주의 준비**

[0103] HT22 세포주를 한국 세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB; Seoul, Korea)로부터 수득하였다. Aβ-펩타이드 25-35을 Sigma-Aldrich, Inc (St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

[0104] **5.2 Aβ25-35 플라크 합성 및 세포 배양**

[0105] Aβ-펩타이드 25-35의 활성화 형태(플라크)를 얻기 위해 멸균 증류수에서 섬유성 Aβ25-35 펩타이드를 재현탁하고 37℃에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 1mM Aβ25-35 스톡 솔루션을 표본으로 하여 -80 ℃에서 저장하여 Aβ25-35 플라크를 준비하였다.

[0106] 알츠하이머 치매 등에 응용되는 마우스 해마 신경세포주 (Mouse hippocampal cell line; HT22)를 1% 100U/ml 페니실린-스트렙토마이신, 10% 열처리로 불활성화된 FBS (fetal bovine serum)가 보충된 DMEM 배지(Gibco, Invitrogen)를 이용하여 95% 습식 (humidified), 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃ 로 유지하여 증식시켰다.

[0107] **5.3 복합 추출물의 뇌신경 보호 효과 확인**

[0108] 해마 세포에 병변을 일으키는 Aβ25-35 플라크 유발 독성에 대한 복합추출물의 세포 보호 효과를 확인하기 위해, 해마 세포주인 HT22 세포를 96 웰 플라이트에 $2x10^4$/웰로 접종한 후 하룻동안 배양하고, 고사리삼, 밀몽화, 황금을 각각 실시예 1의 [표 1]과 같은 구성과 중량비가 되도록 측정한 후 30% 에탄올로 추출한 복합추출물을 FBS 프리 DMEM 배지에 녹여 0.1, 1, 10, μg/ml 농도로 전처리한 후, Aβ25-35 플라크(10μM)를 처리 또는 비처리하여 배양하였다. 처리 24시간 후 세포 독성을 분석하기 위한MTT를 0.5 mg/mL 농도로 2시간 처리한 후, 100% DMSO로 포르마잔을 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

[0109] 결과를 도 9에 나타내었다.

[0110] 도 9에 나타낸 바와 같이, 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합추출물 전처리는 복합 추출물을 처리하지 않은 미처리 대조군과 비교하여 0.1, 1, 10μg/ml 모든 처리 농도에서 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 10 ㎍/mL 농도에서 Aβ25-35 플라크 독성에 대하여 18.6%의 가장 높은 보호효과를 확인하였다. 이러한 결과를 통해 본 발명의 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물은 일반적인 허혈에 의한 뇌세포 손상뿐만 아니라 알츠하이머 치매를 유발하는 Aβ-펩타이드에 의한 세포 독성에 대해서도 뇌세포를 보호할 수 있음을 알 수 있다.

[0111] **실험예 6. 복합추출물의 뇌신경세포 보호 효과 확인-6-OHDA 유발 독성에 대한 복합추출물의 세포 생존율**

[0112] **6.1 세포주의 준비**

[0113] SH-SY5Y 세포주를 한국 세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB; Seoul, Korea)로부터 수득하였다. 6-

hydroxydopamine (6-OHDA) 을 Sigma-Aldrich, Inc (St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

[0114] **6.2 세포 배양**

[0115] 도파민신경계 연구에 많이 응용되는 사람 신경아세포종(Human neuroblastoma cell line; SH-SY5Y)을 1% 100U/ml 페니실린-스트렙토마이신, 5% 열처리로 불활성화된 FBS (fetal bovine serum)가 보충된 DMEM 배지 (Gibco, Invitrogen)를 이용하여 95% 습식 (Humidified), 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃로 유지하여 증식시켰다.

[0116] **6.3 복합 추출물의 뇌신경 보호 효과**

[0117] 주입한 부위에 도파민 신경계 병변을 일으키는 6-OHDA 유발 독성에 대한 복합추출물의 세포 보호 효과를 확인하기 위해, SH-SY5Y 세포를 96 웰 플라이트에 $4x10^4$/웰로 접종한 후 하룻동안 배양하고, 고사리삼, 밀몽화, 황금을 각각 실시예 1의 [표 1]과 같은 구성과 중량비가 되도록 측정한 후 에탄올로 추출한 복합추출물을 FBS 프리 DMEM 배지에 녹여 0.1, 1, 10, 100μg/ml 농도로 전처리하였다. 전처리 18시간 후, 6-OHDA(150 μM)를 처리 또는 비처리하여 배양하였다. 6-OHDA 처리 6시간 후 세포 독성을 분석하기 위한 MTT를 0.5 mg/mL 농도로 2시간 처리한 후, 100% DMSO로 포르마잔을 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

[0118] 결과를 도 10에 나타내었다.

[0119] 도 10 나타낸 바와 같이 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합추출물 전처리는 복합 추출물을 처리하지 않은 미처리 대조군과 비교하여 0.1, 1, 10, 100μg/ml 모든 처리 농도에서 세포 생존율이 증가하였으며, 특히 10, 100 ㎍/mL의 농도에서 각각 25.2, 24.4% 유의한 보호효과를 확인하였다. 이러한 결과를 통해 본 발명의 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물은 일반적인 허혈에 의한 뇌세포 손상뿐만 아니라 도파민 신경계 병변을 일으키는 6-OHDA에 의한 세포 독성에 대해서도 뇌세포를 보호할 수 있음을 알 수 있다.

[0120] **제제예 1. 의약품의 제조**

[0121] **1.1 산제의 제조**

[0122] 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물 100mg

[0123] 유당 100mg

[0124] 탈 10mg

[0125] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0126] **1.2 정제의 제조**

[0127] 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물 100mg

[0128] 옥수수전분 100mg

[0129] 유당 100mg

[0130] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0131] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0132] **1.3 캡슐제의 제조**

[0133] 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물 100mg

[0134] 옥수수전분 100mg

[0135] 유당 100mg

[0136] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0137] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 정제를 제조한다.

[0138] **1.4 주사제의 제조**

[0139] 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물 100mg

[0140] 주사용 멸균 증류수 적량

[0141] pH 조절제 적량

[0142] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0143] **1.5 액제의 제조**

[0144] 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물 100mg

[0145] 설탕 20g

[0146] 이성화당 20g

[0147] 레몬향 적량

[0148] 정제수를 가하여 전체 1,00ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0149] **제제예 2. 건강기능식품의 제조**

[0150] 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물 100mg

[0151] 비타민 혼합물 적량

[0152] 비타민 A 아세테이트 70 ㎍

[0153] 비타민 E 1.0 mg

[0154] 비타민 B1 0.13 mg

[0155] 비타민 B2 0.15 mg

[0156] 비타민 B6 0.5 mg

[0157] 비타민 B12 0.2 ㎍

[0158] 비타민 C 10 mg

[0159] 비오틴 10 ㎍

[0160] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0161] 엽산 50 ㎍

[0162] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0163] 무기질 혼합물 적량

[0164] 황산제1철 1.75 mg

[0165] 산화아연 0.82 mg

[0166] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0167] 제1인산칼륨 15 mg

[0168] 제2인산칼슘 55 mg

[0169] 구연산칼륨 90 mg

[0170] 탄산칼슘 100 mg

[0171] 염화마그네슘 24.8 mg

[0172] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분

을 혼합한 다음, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조(예, 영양캔디 등)에 사용할 수 있다.

[0173] **제제예 3. 건강기능성 음료의 제조**

[0174] 고사리삼, 밀몽화, 황금 복합 추출물 100mg

[0175] 구연산 1000 mg

[0176] 올리고당 100 g

[0177] 매실농축액 2 g

[0178] 타우린 1 g

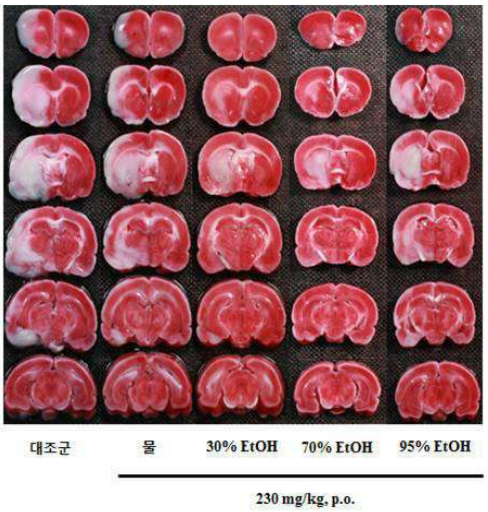
[0179] 정제수를 가하여 전체 900 mℓ

[0180] 통상의 건강기능성 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.

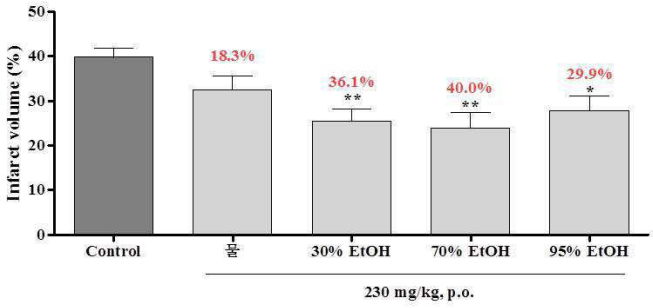
[0181] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

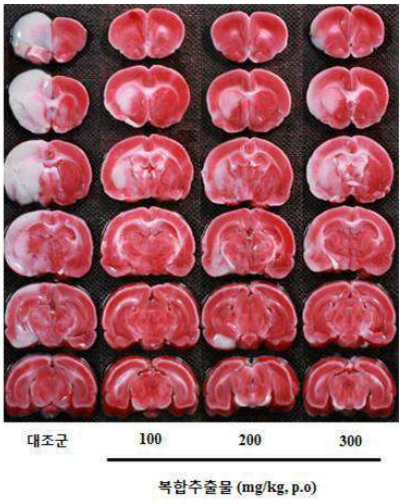
도면1



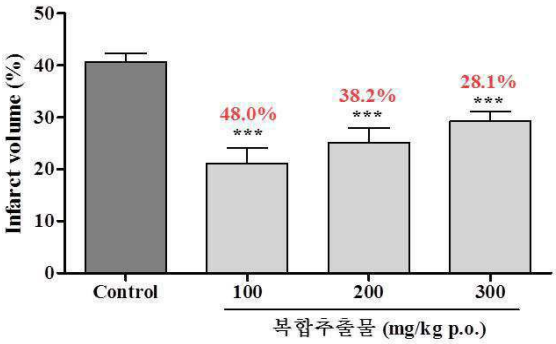
도면2



도면3


대조군
100
200
300
복합추출물 (mg/kg, p.o)

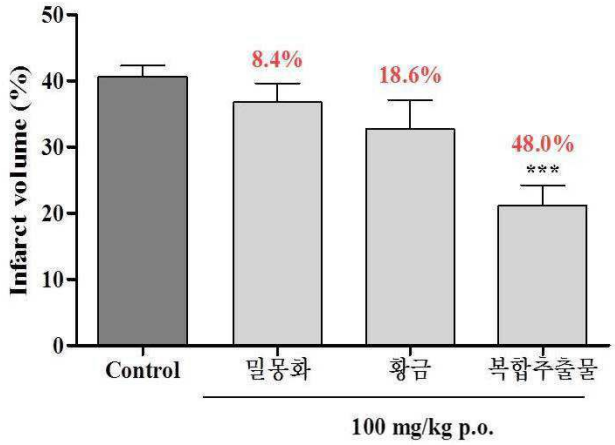
도면4


Infarct volume (%)
50
40
30
20
10
0
48.0%
***
38.2%
***
28.1%
***
Control
100
200
300
복합추출물 (mg/kg p.o.)

도면5

대조군
밀몽화
황금
복합추출물
100 mg/kg, p.o

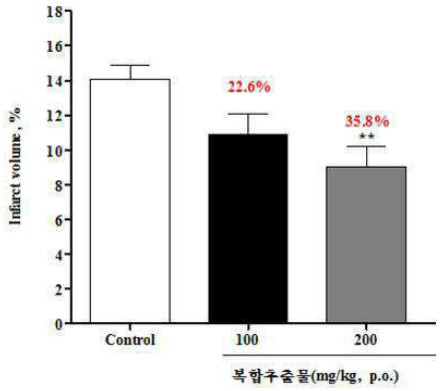
도면6


Infarct volume (%)
50
40
30
20
10
0
8.4%
18.6%
48.0%
***
Control
밀몽화
황금
복합추출물
100 mg/kg p.o.

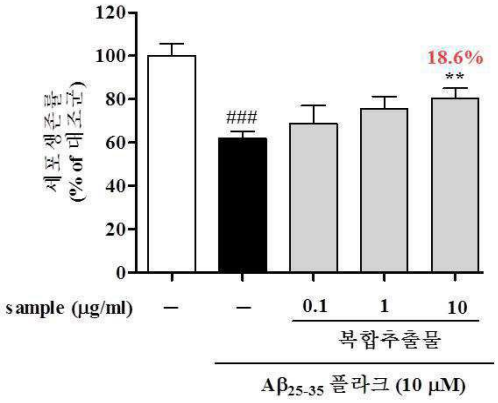
도면7

대조군
100
200
복합추출물(mg/kg, p.o.)

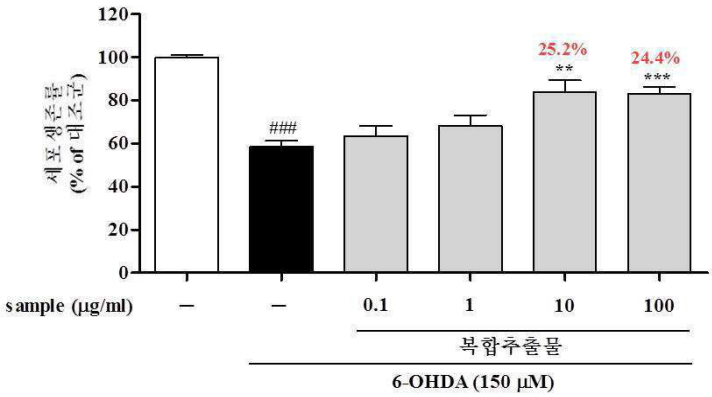
도면8


Infarct volume, %
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
22.6%
35.8%
**
Control
100
200
복합추출물(mg/kg, p.o.)

도면9


120
100
80
60
40
20
0
세포 생존률
(% of 대조군)
18.6%
**
###
sample (μg/ml)
–
–
0.1
1
10
복합추출물
Aβ25-35 플라크 (10 μM)

도면10


120
100
80
60
40
20
0
세포 생존률
(% of 대조군)
25.2%
**
24.4%
***
###
sample (μg/ml)
–
–
0.1
1
10
100
복합추출물
6-OHDA (150 μM)