



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0104183
(43) 공개일자 2009년10월06일

(51) Int. Cl.

A61K 36/54 (2006.01) A61K 36/8964 (2006.01)

A61K 36/9062 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0029484

(22) 출원일자 2008년03월31일

심사청구일자 2008년03월31일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

임사비나

서울 강남구 삼성2동 롯데캐슬프리미어 104동 806호

김용식

서울 서초구 잠원동 한신13차아파트 327동 301호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

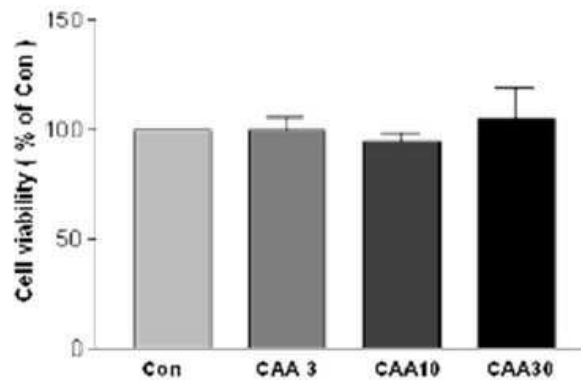
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물을 함유하는 퇴행성뇌신경 질환 예방 및 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 및/또는 치료용 약학 조성물 및 건강 기능 식품에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

구헌중

서울 광진구 구의1동 251-18

정미영

서울 동대문구 이문3동 쌍용아파트 114동 1301호

특허청구의 범위

청구항 1

계지, 지모 및 양강의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는,

파킨슨병, 알츠하이머병, 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택된 질병의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 혼합 추출물 내의 계지:지모:양강의 중량비(w/w)는 1 내지 6 : 1 내지 3 : 1 내지 6인 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 물, 및 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매에 의하여 추출된 것인 약학 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 및 시럽제로 이루어진 군에서 선택된 경구 투여제 또는 멸균된 주사액, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군에서 선택된 비경구 투여제 형태인 약학 조성물.

청구항 5

계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물을 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 및 개선용 건강 기능 식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 중추신경계의 퇴행성 질환에 대해 효과를 갖는 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

- <2> 파킨슨병은 대표적인 퇴행성 신경 질환으로, 병리생리학적으로는 흑질 치밀부(substantia nigra pars compacta, SNpc)의 도파민 신경세포의 사멸과 그 결과 선조체(striatum)의 도파민 결핍으로 인한 진전(tremor), 근육경직(rigidity), 비정상적 자세(postural instability), 운동완서(bradykinesia), 또는 운동불능(akinesia) 등의 증상을 나타낸다.
- <3> 파킨슨병에서의 도파민 신경세포의 선택적인 손상기전은 아직 명확히 밝혀져 있지는 않으나, 전자전달계(electron transport chain)의 Complex I, 즉 NADH-ubiquinone 산화환원 효소의 차단으로 인한 도파민성 신경의 변성, 도파민의 자동산화 혹은 MAO에 의한 대사과정에서의 생성되는 활성산소, 세포 내 칼슘농도의 변화, 내인성 excitotoxin의 독성, 또는 이에 따른 염증반응 등이 중요한 병인으로 작용하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 도파민 신경세포의 손상에 대한 염증반응의 역할은 파킨슨병 환자의 흑질 부위에 신경교세포, 특히 활성화된 미세아교세포(microglia)의 발현이 증가되어 있는 소견과도 일치할 것으로 보인다. 파킨슨병 환자의 흑질 치밀부에는 다른 조직과 달리 미세아교세포가 높은 농도로 존재하여 중추 염증반응에 취약한 것으로 보고되고 있으며, 흑질 치밀부의 도파민성 신경세포에서 염증반응과 세포독성에 관련 있는 COX-2의 발현과 prostaglandin E2 생성이 증가된다는 보고는 퇴행성 신경질환, 특히 파킨슨병의 병태생리에 미세아교세포의 활성화와 그리고 이에 따른 염증반응이 도파민 신경세포의 손상에 관여할 가능성이 관심을 받고 있는 실정이다.
- <4> 신경교세포 중 성상세포(astrocyte)는 신경계에 존재하는 세포의 일종으로 전체 뇌 세포의 90%를 차지하며, 신경세포의 기능을 유지하는데 관여하는 것으로 잘 알려져 있으나, 최근에는 성상세포의 새로운 기능이 보고되어 있다. 한편 신경교세포의 하나인 미세아교세포는 성상세포와 함께 중추 염증반응에서 여러 종류의 케모카인류

(chemokines)와 유도 산화질소 합성 효소 (inducible nitric oxide synthase, iNOS), 시클로옥시게나아제-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 등의 유전자 발현이 증가되어 다양한 염증 매개물질을 생성하는 것이 잘 알려져 있으며, 이렇게 증가된 염증매개물질은 다양한 기전을 통해 직접 또는 이차적으로 신경세포의 세포사멸을 초래하는데 관여할 수 있음이 보고되고 있다.

<5> 한편 천연식물에 존재하는 플라보노이드를 포함한 여러 물질들은 강력한 항산화, 항염증 효과가 있으며, 항암작용을 발휘하는 것이 알려져 있으며, 특히 플라보노이드 화합물이 in vitro와 일부 동물실험에서 많은 연구가 되었으나, 신경계의 손상을 보호할 수 있는지의 여부, 또는 신경계 기능의 개선에 대한 효과는 제대로 밝혀져 있지 않은 실정이다.

<6> 중추신경계 (Central nervous system, CNS)는 혈액장벽 (blood-brain barrier, BBB)에 의해 면역 시스템으로부터 차단되어 면역 반응과 염증 반응을 수행하지 않는 것으로 알려져 왔으나, 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 발작 (stroke), 외상성 뇌손상 (traumatic brain injury) 등과 같은 질환에 신경 염증 (neuroinflammation)이 중요한 역할을 한다는 것이 알려지고 있다 (McGeer PL et al., 2004; Kim et al., 2006). 미세아교세포는 뇌손상에 대한 일차적인 방어기제로 작용하여 뇌실질의 미세환경에 항상성을 부여하며 결과적으로 손상된 조직의 치유에 도움을 주지만, 활성화된 미세아교세포로부터 과도하게 분비된 여러 물질들은 뇌조직의 손상을 야기한다고 알려져 있다. 정상적인 상태에서 미세아교세포는 신경세포와 성상세포에 의해 그 활성이 억제되어 있으며, 중추신경계의 정상적인 균형이 깨어지는 상황에서 미세아교세포는 빠르게 활성화되는데, 일단 활성화된 미세아교세포는 그 고유역할인 포식작용과 항원 제시 (antigen presentation)를 하게 된다. 포식작용 외에 미세아교세포는 다양한 물질을 분비하는 것으로 알려져 있다. 가장 대표적인 물질은 사이토킨(cytokine)이고, 그 외에도 케모킨, NO, 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS), 프로스타노이드류 (prostanoids) 등을 분비한다 (Kazuyuki Nakajima et al., 2004; Kim et al., 2006; Miquel Vila et al., 2001).

<7> COX (cyclooxygenase)는 프로스타노이드 합성의 rate-limiting enzyme으로 COX-1과 COX-2 두 종류의 이성질체가 있다. COX-1은 많은 세포유형에서 구성적으로(constitutively) 발현되는 반면, COX-2는 일반적으로 박테리아 내독소, 인터루킨-1 등과 같은 염증자극에 의해서 발현이 야기된다. COX-2는 뇌에서 활성화된 미세아교세포와 성상세포에서 발현되고, COX-2 발현은 여러 병리적인 조건에서 조절된다. 그리고 PD(파킨슨병)의 마우스 모델에서 COX-2가 도파민 반응(dopaminergic) 세포사멸에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Rattanavijit Vijitruth et al., 2006; Peter Teismann et al., 2002; Kang et al., 2004).

<8> BV2 세포 (brain microglia cell line)에 대표적인 염증 유발물질로 알려진 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide, LPS)를 처리하면 BV2 세포가 활성화되어 NO와 ROS의 생성이 증가되고 이로 인해 BV2 세포의 손상을 초래할 수 있다 (Chang et al., 2004). iNOS는 NO를 생성하는 효소로 정상적인 뇌에서는 거의 발현되지 않고 병적인 상태에서 미세아교세포 등에서 발현된다. 또한, COX-2는 프로스타글란딘류를 생성함으로써 염증을 유발하는 역할을 한다. CNS 염증과 관련이 있는 PD 환자의 brain에서는 iNOS와 COX-2의 발현이 정상적인 사람보다 현저하게 증가되어 있다고 알려져 있다(Stephane Hunot et al., 2003; Peter Teismann et al., 2003). 최근의 연구 결과에 따르면, NO는 세 가지 주요한 NOS 이성질체인 뉴런 NOS(nNOS), 내피 NOS(eNOS), 유도 NOS(iNOS)에 의해 아르기닌(arginine)으로부터 생성되는 자유라디칼이다. nNOS와 eNOS는 Ca^{2+} /칼모듈린(calmodulin)에 의해 조절되지만, iNOS는 인터루킨(interleukin), 인터페론(interferon), LPS와 같은 염증성 자극에 의해 전사 수준에서 조절된다. nNOS나 eNOS에 의해 소량 생성된 NO는 혈관확장, 신경전달, 병원체에 대한 세포파괴 등과 같은 정상적인 생리기능을 담당하지만, 대식세포에서 iNOS에 의해 과다 생성된 NO는 슈퍼옥사이드(superoxide)와 반응하여 퍼옥시니트라이트(peroxynitrite)를 형성하고 이는 강력한 산화제로 작용하여 세포에 손상을 입히고, 염증성 자극에 의해 활성화된 대식세포에서 NF κ B를 활성화시켜 염증반응, 암, 동맥경화 등 만성질환에 관련하는 것으로 알려져 있다 (Lawrence T. et al., *Nat Med.*, 7, pp1291-1297, 2001; Riehemann K. et al., *FEBS Lett.*, 442, pp89-94, 1999; Kang JL. et al., *Mol. Cell. Biochem.*, 215, pp1-9, 2000; El-Mahmoudy A. et al., *International Immunopharmacology*, 2, pp1603-1611, 2002).

<9> NO는 염증과 암을 포함한 다양한 병리생리학적 과정에서 iNOS에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. NOS는 염증, 혈관확장, 신경전달, 중양세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 NO를 생성하며, 염증 상태에서는 대식세포에서 iNOS에 의해 NO를 다량 생성하여 여러 만성질환을 일으키는 것으로 알려져 있다(Kim KM. et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 30(7), pp747-756, 2001; Stamler J S. et al., *Science*, 258, pp1898-1902, 1992). iNOS의 발현은 NF κ B 활성으로 유도되며 이는 대식세포에서 LPS나 사이토

카인(cytokine)에 의해 염증성 매개물들이 과잉 생산되는 중요한 매카니즘이 된다. 대식세포에서 NO의 생성은 iNOS의 발현과 직접적으로 연관되어 있고, LPS는 그램(Gram) 음성 세균의 세포벽 물질로서 면역 세포 등을 자극하여 NO의 생성을 상승적으로 증가 시킨다.

<10> 세균감염 하에서 항생제로 치료 시, 박테리아를 죽이면서 세포외막으로부터 방출되는 LPS는 엔도톡신 쇼크(endotoxin shock)을 일으키며, 이러한 과정에 의해 심하게 파괴될 경우, 계속해서 생성되는 LPS를 중화시키지 못하게 된다 (Dunn, D. L., *Surg. Clin. North. Am.*, 74, 1994). 그러므로 약물 처리를 하여 LPS의 작용을 감소시킴으로써 효과를 볼 수 있을 것이다. 현재까지의 비스테로이드성 항염증 약물(nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID)의 사용으로 인한 염증의 감소는 흔히 상당한 기간 동안 통증의 완화를 초래해 왔으며, 비마약성 진통제(아스피린 등)의 대부분 역시 항염증 효과를 가지므로 급성 및 만성 염증 질환의 치료에 적절히 사용되어 왔다. 그러나 부작용 때문에 장기적으로 사용하기가 곤란하며, 결과적으로 현재까지의 치료법에 부작용의 심각성이 너무 크기 때문에 새롭거나 개선된 치료제 개발은 필수적이고 시급하다고 할 수 있다. 이러한 부작용을 극복하는 문제와 관련 지어 최근에는 민간에서 사용되는 천연물에서 그 활성 성분을 찾으려는 노력이 진행되고 있다.

<11> 따라서 본 시험은 말초에서 항염증 효과가 연구된 CAA가 우수한 항염증 효과를 발휘하여 CAA에 존재하는 활성 성분이 충분히 뇌로 이행될 수 있다면, 퇴행성 중추신경계 질환에 대해서도 치료 또는 보호효과가 있을 것으로 예상되는 한방 복합제제의 항염증 효능을 관찰함으로써 향후 파킨슨병 치료 약물로서의 개발 가능성을 평가하고자 하였다.

<12> 이에 본 발명자들은 LPS로 자극한 BV2 세포에서 본 발명의 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물이 NO 생성 억제 등의 산화적 스트레스 억제 효과와 iNOS, COX-2의 발현에 미치는 영향을 밝힘으로써, 우수한 중추신경계 퇴행성 질환 개선 효과를 가짐을 확인하였고, 생약 혼합 추출물의 중추신경계 퇴행성 질환에 대하여 효과를 파킨슨병 모델 동물실험을 통해 관찰한 결과, 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 및 치료 효과가 우수함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<13> 본 발명은 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물인 CAA이 NO 생성을 감소시켜 세포 내 산화적 스트레스를 감소시키고, 도파민 신경의 손상을 보호하는 효과를 갖는다는 것을 확인하여, 퇴행성 뇌신경 질환에 대한 효과를 규명함으로써 완성된 것이다.

<14> 이에, 본 발명은 계지, 지모 및 양강을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 및 치료용 약학 조성물 및 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

<15> 상기 목적에 따라, 본 발명은 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 중추신경계의 퇴행성 질환 예방 및 치료용 약학 조성물 및 식품 조성물을 제공한다.

<16> 상기 혼합 추출물 내의 계지:지모:양강의 중량비(w/w)는 1 내지 6 : 1 내지 3 : 1 내지 6일 수 있으며, 바람직하게는 1: 0.2 내지 0.8 : 0.5 내지 1.5, 더욱 바람직하게는 2:1:2인 것이 좋다.

<17> 본 발명에서 정의되는 혼합 추출물이 퇴행성 뇌신경 질환에 유효한 작용을 발휘하기 위하여, 상기 추출물의 추출에 사용되는 추출 용매는 물, 및 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매일 수 있으며, 바람직하게는 물과 에탄올 혼합 용매, 더욱 바람직하게는 60 내지 90 중량% 농도의 에탄올 수용액일 수 있다.

<18> 또한, 상기 추출 용매의 사용량은 계지, 지모 및 양강의 중량에 대하여 약 2 내지 20 부피배, 바람직하게는 약 8 내지 15 부피배인 것이 좋다. 본 발명의 혼합 추출물은 80 내지 100 ℃, 바람직하게는 100 ℃에서 약 1 시간 내지 2 일, 바람직하게는 1 시간 내지 5 시간 동안, 1회 내지 5회, 바람직하게는 2회 내지 3회 반복하여 수득할 수 있다. 상기의 용매 사용량, 추출 온도, 추출 시간, 및 추출 횟수는 추출물을 고수율로 수득하고, 추출물의 중추신경의 퇴행성 질환 개선 활성을 갖는 유효성분의 함량을 높이기 위하여 결정된 범위이다. 본 발명의 추출물 제조에 사용 가능한 추출법은 특별한 제한이 없으며, 예컨대, 열수 추출, 환류냉각 추출, 초음파 추출 등의 방법, 바람직하게는 열수 추출 방법으로 수행되는 것일 수 있다. 이와 같이 얻어진 추출물은 실온에서 방냉한

후 여과하고 여과한 추출물을 혼합하여 회전진공농축기로 감압 농축한 다음, 동결 건조하여 사용할 수 있다.

- <19> 본 발명의 계지, 지모 및 양강의 혼합 추출물은 계지, 지모 및 양강의 혼합물을 상기 추출 용매, 추출 조건 및 추출 방법으로 추출하여 얻어진 것이거나, 계지, 지모 및 양강 각각을 상기 추출 용매, 추출 조건 및 추출 방법으로 추출하여 얻어진 각각의 추출물을 혼합한 것일 수 있다.
- <20> 본 발명에 사용되는 계지(桂枝, *Cinnamomi Ramulus*)는 녹나무과(Lauraceae)의 육계나무(*Cinnamomum cassia* BLUME, *Cinnamomum loureirii* Nees)의 헛가지를 말린 것을 의미하며, 특이한 향기와 달고 매운맛을 지녀 한방에서는 감기, 진통, 진경 등에 많이 배합하여 사용해 왔다 (현대생약학, 생약학연구회, 학창사, pp 154-158, 1993).
- <21> 지모 (*Anemarrhenae Rhizoma*)는 중국이 원산지이고, 한국에서는 중부지방에서 재배되는 다년초이다. 본 발명에서는 지모의 근경을 건조하여 사용하였으며, 그의 대표적인 것은 아네마레나 아스포테로리디스 본지 (*Anemarrhena asphodelorides* BUNGE)로 이의 근경은 약전(KP, JP)에서 소염, 해열, 지사, 이뇨, 요통, 진정에 사용되고 있다. 이 약용식물에는 아스포닌(Asphonin) 6% 이외에도, 살사사포닌(Sarsasaponin), 말코게닌(Markogenin; 2-hydroxy sarsasapogenin) 등의 스테로이드 사포게닌, 플라보노이드(Flavonoids), 탄닌 등이 함유되어 있다. 동의보감이나 본초강목 등에서는 지모를 골증노열(骨蒸勞熱)에 사용하였는데, 골증노열(骨蒸勞熱)이란 용어를 해석하면 골중(骨中)에서 골소송증(Osteoporosis)이 발증되어 만성적인 동통을 호소하는 것을 의미한다.
- <22> 양강(*Alpinia Officinarum*)은 생강과에 속하는 다년생 초본인 양강의 뿌리줄기를 말린 것으로 구부러진 원주형 또는 원추형이고 길이 2-7mm, 지름 1-2mm이고 때로는 몇 개의 결뿌리가 달려있다. 표면은 적갈색 또는 암갈색이고 회백색의 마디가 있고 마디사이에 세로주름이 있으며 재질은 단단하고 쉽게 꺾이지 않는다. 정유의 주요 성분은 시네올(cineole), 계피산(cinnamic acid), 메틸 에스테르(methyl ester)등이며, 맛은 맵고 쓰고, 성질은 따뜻하며 비, 위에 작용한다. 비위를 따뜻하게 하여 한사(寒邪; 찬기운)가 위장에 정체되어 설사, 구토하며, 통증을 일으키는 것에 사용된다.
- <23> 본 발명에 있어서, 중추신경계 퇴행성 질환은 모든 중추신경계의 퇴행성 질환을 포함하고, 특히 퇴행성 뇌신경 질환을 포함하는 의미로서 사용된다.
- <24> 본 발명에 따른 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물은 중추신경계 퇴행성 질환에 대한 효과를 나타내는 것을 특징으로 하며, 이로 인하여 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌졸중, 중풍 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 중추신경계 퇴행성 질환에 대하여 예방, 경감, 치료 및/또는 개선 효과를 나타낼 수 있다.
- <25> 본 발명에서는 계지, 지모 및 양강의 혼합 추출물인 CAA의 중추신경계 퇴행성 질환에 대한 효과를 알아보기 위하여, BV2 마우스 미세신경교 세포주를 선택하여 LPS로 산화적 스트레스를 유발시키고, CAA를 처리하여 산화적 스트레스와 iNOS, COX-2 활성 등에 미치는 영향을 조사한 결과, 본 발명의 CAA가 미세신경교세포에서 염증반응의 생성물인 NO를 효과적으로 감소시키어, 세포내 산화적 스트레스를 감소시키고, iNOS, COX-2 단백질의 발현 정도를 억제하였으며, 6-하이드록시도파민 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA)에 의하여 유도된 파킨슨병 모델 마우스에서 감소된 티로신 탈수소효소 (TH)와 도파민 전달체 (dopamine transporter, DAT)의 발현을 증가시키고, iNOS 및 COX-2 단백질의 발현 정도를 억제함을 확인하여, CAA의 중추신경 퇴행성 질환 개선 및/또는 치료 효과를 확인하였다.
- <26> 계지, 지모 및 양강은 오랫동안 생약으로 사용되어 오던 약재로서 이로부터 추출된 본 발명의 혼합 추출물 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없다.
- <27> 본 발명의 계지, 지모 및 양강의 혼합 추출물을 함유하는 약학 조성물은 유효성분인 계지, 지모 및 양강의 혼합 추출물을 중추신경계 퇴행성 질환의 예방, 경감, 치료 및/또는 개선 효과를 나타내기에 유효한 양으로 함유하며, 예컨대, 약학 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 80 중량%로 포함할 수 있다. 이와 같은 본 발명의 약학 조성물 내의 유효성분으로서의 혼합 추출물의 함량은 소망하는 용도 및 효과에 따라서 적절하게 조절 가능하다.
- <28> 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 투여 가능하며, 투여는 관련 분야에 알려진 모든 투여 방법으로 가능하며, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 동맥, 골내, 근육, 피하, 자궁 내, 경막 또는 뇌혈관 내(뇌실내, intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등의 경구 투여제; 및 멸균된 주사용액으로서 수용액, 비수용성제, 현탁제, 및 유제, 동결건조제제, 좌제 등의 비경구 투

여제 등의 형태로 적용 형태에 알맞게 제형화하여 사용될 수 있다.

- <29> 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 이와 같이 본 발명의 약학 조성물에 추가적을 포함되는 첨가제의 종류와 양은 관련 기술 분야에서 통상적으로 알려진 바에 따른다.
- <30> 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제 등의 첨가제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 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 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 제제화할 경우에는 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제 등도 사용 가능하다. 경구 투여를 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용액, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용액, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- <31> 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물을 1일 0.0001 내지 1000mg/kg으로 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <32> 본 발명의 추출물의 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. 또한, 본 발명의 추출물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- <33> 본 발명은 상기한 바와 같은 계지, 지모 및 양강의 혼합 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 용도 외에도, 중추신경계 퇴행성 질환 예방 및 치료용 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다.
- <34> 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 상기한 바와 같은 계지, 지모 및 양강의 혼합 추출물을 함유하는 중추신경계 퇴행성 질환 예방 및 개선용 건강 기능 식품을 제공한다. 상기 건강 기능 식품은 각종 식품, 음료, 식품 첨가물을 모두 포함하는 개념이다.
- <35> 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 혼합 추출물의 양은 특별한 제한이 없으며, 최종 식품 종류, 형태 및 소망하는 효과에 따라서 적절하게 조절 가능하다. 예컨대, 본 발명의 건강 기능 식품 조성물의 경우, 전체 식품 중량에 대하여 상기 혼합 추출물을 0.01 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 20 중량%로 포함할 수 있으며, 건강 기능 음료 조성물의 경우 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 포함할 수 있다.
- <36> 본 발명의 건강 기능 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 포함된 성분에 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 성분으로서 함유할 수 있다. 통상적으로 사용되는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 들 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- <37> 상기 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물: 예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제 (치즈, 초콜릿

등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

- <38> 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그다지 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

효 과

- <39> 상술한 바와 같이, 본 발명의 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물은 중추신경계 퇴행성 질환 관련 실험에서 뛰어난 개선 효과를 나타내므로, 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물을 포함하는 조성물은 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 및 치료용 의약품 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <40> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

- <41> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

- <42> **실시예 1. 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물의 제조**

- <43> 계지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물을 제조하기 위하여, 경희의료원에서 구입한 계지, 지모 및 양강을 불순물을 제거하여 세절한 후 계지 60g, 지모 30g, 양강 60g (중량비(w/w) = 2:1:2)을 준비하여 80%(v/v) 에탄올 수용액을 가한 후 환류 장치를 이용하여 90℃에서 3시간 동안 2회 내지 3회 반복하여 추출하고, 와트만지(whatman No.2)에 여과한 후 감압 농축하여 에탄올 추출물을 수득하였다. 상기 에탄올 추출물을 60 내지 70℃ 온도에서 감압 농축 후, -44℃조건 하에서 2 내지 3일 동안 동결 건조하여 최종적으로 분말 상태의 계지, 지모 및 양강의 혼합 추출물 18.3g (12.22%)을 수득하였다. 이와 같이 얻어진 혼합 추출물을 제통단이라 명명(이하 CAA 이라함)하여 본 발명의 시료로 사용하였다.

- <44> **실시예 2. 세포 배양**

- <45> 본 실험에 사용된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium)배지, 우 태아 혈청(fetal bovine serum; FBS), 100% 페니실린(penicillin)/스트렙토마이신(streptomycin)은 Invitrogen(Carlsbad, CA)에서 구입하였고, 모든 다른 시약들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. iNOS, COX-2 단일 클론항체와 퍼옥시다제 컨쥬게이트된 이차항체(peroxidase-conjugated secondary antibody)는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA)로부터 구입되었다. 또한, 본 실험에 사용된 BV2 마우스 미세아교 세포주는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였다. BV2 세포들은 10% FBS와 1% 페니실린(penicillin)/스트렙토마이신(streptomycin)를 포함하는 DMEM 배지에 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

- <46> **실험예 1. 세포 독성 측정**

- <47> 상기 실시예 1에서 제조된 CAA의 세포독성을 알아보기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다(Alley MC. et al., *Cancer. Res.*, 48, pp 589-601, 1988).

- <48> 살상세포를 유도하지 않는 적절한 투여량을 알아보기 위하여, 세포독성효과는 3-[4,5-디메틸티아졸-2yl]-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드 MTT 법(3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide MTT assay)를 이용하여 96-웰 플레이트(2×10⁴ 세포/웰)에 상기 실시예 2에서 배양된 세포를 주입하여 부착시키고, CAA를 도 1에 나타난 농도별로 처리하여 48시간동안 배양된 세포로 평가하였다. 배양이 끝난 후, PBS에 0.5 mg/ml의 농도로 녹인 MTT 용액을 배지에 첨가시켜 37℃에서 4시간동안 반응시켰다. 배지를 제거한 후 DMSO를 넣어 포마즌(formazan) 색소를 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존력을 측정하였다.

- <49> CAA의 세포독성을 알아보기 위해, BV2 세포에 CAA를 3 내지 30 μg/ml의 농도로 48시간 동안 처리하였으며, MTT 법을 사용하여 세포생존을 실험을 수행하여 얻어진 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에서 보는 바와 같이, 대조군과 비교하여 CAA (3내지 30 μg/ml)로 처리된 세포의 생존율이 차이가 없음을 확인할 수 있으며, 따라서 CAA는 BV2 세포에 대해 세포독성이 거의 없다는 것을 알 수 있다.

<50> 실험예 2. 산화적 스트레스 억제 효과

<51> NO 생성 억제 효과

<52> LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 BV2 세포에서 CAA가 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다 (Green LC. et al., *Anal. Biochem.*, 126, pp 131-138, 1982).

<53> NO 생성 정도는 그린(Green) 등의 방법으로 NO 생성의 지표인 배지에 생성된 NO의 양을 측정하여 결정하였다. 24-웰 플레이트(8×10^5 세포/웰)에 실시예 2에서 배양된 세포를 주입하여 부착시키고, 실시예 1에서 제조된 CAA를 도 2에 나타난 농도별 (10, 30 및 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 2시간 배양한 후, LPS (1 $\mu\text{g/ml}$, Sigma)를 첨가하여 20시간 배양하였다. 100 μl 의 배지 상등액에 50 μl 의 1% 설파닐아미드(in 5% phosphoric acid)와 50 μl 의 0.1% 나프틸렌디아민 디히드로클로라이드(naphthylenediamine dihydrochloride)를 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때, 표준곡선은 NaNO_2 를 농도별로 조제하여 사용하였다.

<54> 상기 실험 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 보는 바와 같이, CAA는 투여량에 의존하여 NO 생성을 저해하는 것으로 나타났다. 따라서 산화적 스트레스 유발 상황에서 CAA는 NO 생성을 농도 의존적으로 억제함을 확인할 수 있었다.

<55> 실험예 3. 염증 억제 효과

<56> iNOS, COX-2 단백질 발현 정도 측정

<57> LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 대식 세포를 활성화시키는 것으로 잘 알려진 iNOS, COX-2 단백질의 유전자 발현에 미치는 CAA의 영향을 알아보기 위하여, 다음과 같은 과정으로 실험하였다 (Liang YC. et al., *Carcinogenesis*, 20, pp 1945-1952, 1999).

<58> BV2 세포를 100 mm 배양 디쉬에 1×10^6 세포수로 부착시킨 후, 다양한 농도의 CAA (10 내지 30 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하고 30분 후에 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$, Sigma)를 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 배양이 끝난 후 신속히 차가운 PBS로 수세하고 세포용해 완충용액(lysis buffer) 0.5 ml에 용해시켰다. 얼음 위에서 30분 동안 반응시킨 후 용해액을 13,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 회수하여 시료의 단백질 농도를 측정하였다. iNOS, COX-2 단백질의 발현 변화는 웨스턴 블로팅(Western blotting)으로 확인하였다.

<59> 각 시료로부터 얻은 같은 양의 단백질을 SDS/10% 폴리 아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에서 전기영동 하였으며, 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 전이시켰다. 막은 항-iNOS, 항-COX-2, 항-actin (1:1000, Santacruz)으로 4℃에서 밤새 반응시킨 후, 세 번 수세하여 이차 항체 (Santacruz) 로 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 특정 밴드는 유도된 케밀루미네스센스 감지 장치(chemiluminescence's detection system)를 사용하여 감지하였다.

<60> 본 실험 수행 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 보는 바와 같이, 24시간 동안 CAA를 처리한 경우 BV2 세포의 iNOS, 및 COX-2 단백질 발현이 현저하게 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

<61> 실험예 4. 6-OHDA를 이용한 파킨슨병 모델동물에서 도파민 신경계 손상에 대한 보호 효과

<62> CAA가 6-OHDA를 이용한 파킨슨병 모델동물에서 도파민 신경세포의 손상을 보호할 수 있는지 여부, 및 이들 모델동물에서 도파민 신경세포의 손상과 관련되어 증가되는 염증반응을 억제할 수 있는지 여부를 알아보기 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다.

<63> 4-1. TH, DAT 단백질 발현 정도

<64> 뇌실내 6-OHDA 투여와 CAA 추출물의 투여는 6주령의 생쥐(ICR mouse, Orient, 수컷)를 사용하였다. 사육조건은 National Institute of Health (NIH) 와 The Korean Academy of Medical Sciences의 동물사육지침을 따랐다. 생쥐에 norepineprine의 재흡수를 막기 위하여 6-OHDA 투여 30분전에 desipramine (25mg/kg, Sigma)을 복강으로 주사하였다. 6-OHDA (10 $\mu\text{g/ul}$, Sigma, USA)는 0.02% 아스코르브산 (Sigma)에 녹이고 1 N NaOH를 이용하여 pH를 7.4로 맞춘 후, 6-OHDA 60 μg (10 $\mu\text{g/ul}$, Sigma, USA)을 생쥐의 뇌실에 주입하였다. 대조군은 6-OHDA 대신 pH 7.4의 saline을 동일하게 주입하였다.

<65> CAA 추출물 (50, 100 mg/kg)을 복강으로 6-OHDA 주입 1시간 전, 주입 3시간, 7시간, 24시간, 48시간 후로 총 5

번 투여하였다. 대조군은 추출물 대신 0.5% DMSO를 동량 주입하였다. 병변 제작 7일 후 조직 균등액을 제조하여 4℃에서 5분간 13000rpm으로 침전시킨 후 상청액을 취하여 bradford 방법에 의하여 단백을 정량하고, 10 ug을 Western blot 하였다. 단백질을 10% SDS PAGE gel을 이용하여 니트로셀룰로오스 (Bio-Rad Laboratories., CA, USA)에 transfer한 후, 모노클로날 마우스 항티로신 하이드록실라아제 (TH; Chemicon International, Temecula, USA; 1:3000), 모노클로날 마우스 항 니트로 티로신 (Upstate, USA; 1:1000)을 이용하여 확인하였다. 반응이 끝난 후에는 HRP (Horse radish peroxidase)가 결합된 이차항체를 host에 따라 (anti-mouse IgG; 1:2000) 1시간 동안 반응시킨 후 ECL (enhanced chemiluminescence)을 이용하여 확인하였다.

<66> 6-OHDA 투여에 의한 선조체와 흑질에서의 도파민 신경계의 손상 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 6-OHDA 투여 7일 후 선조체와 흑질 조직을 분리하여 TH Western blotting을 실시하였다.

<67> 본 실험 수행 결과를 도 4a에 나타내었다. 도 4a에서 보는 바와 같이, 선조체 (A)에서의 TH 발현은 6-OHDA를 투여한 경우 대조군에 비해 71.7%의 감소를 보였으나, CAA 추출물 50 mg/kg 및 100mg/kg의 처리군에서는 대조군에 비해 각각 3.6%, 12.0%의 감소를 보였다. 같은 시점에서 흑질(B)에서의 TH 발현은 6-OHDA 처리군에서는 대조군에 비해 60.9% 정도 감소되었다. 그러나 CAA 처리군에서는 TH 발현 정도가 대조군과 비슷한 수준으로 회복되었다. 이상의 결과로부터 CAA 추출물은 6-OHDA에 의한 선조체와 흑질에서의 TH 발현이 감소되는 것을 유의하게 억제함을 알 수 있다.

<68> 6-OHDA 투여에 의한 선조체와 흑질에서의 도파민 신경계의 손상 정도를 TH 이 외의 다른 marker인 DAT의 발현을 측정하여 다시 확인하였다. 6-OHDA 투여 7일 후 선조체와 흑질 조직을 분리하여 DAT Western blotting을 실시하여 그 결과를 도 4b에 나타내었다. 도 4b에서 보는 바와 같이, 그 결과 TH 발현 정도와 비슷한 양상으로, 6-OHDA 투여에 의해 DAT 발현이 선조체 (A)와 흑질 (B)에서 감소됨을 보였다. 한편 CAA 추출물을 투여한 경우 6-OHDA에 의해 감소되는 DAT 발현이 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있다.

<69> 이 들 결과로부터 CAA 추출물을 반복 투여하여 6-OHDA에 의한 도파민 신경계의 손상을 효과적으로 보호할 수 있음을 확인할 수 있다.

<70> 4-2. iNOS, COX-2 단백질 발현 정도

<71> 6-OHDA 투여 후 활성화된 미세아교세포에 의해 발현이 증가된다고 알려진 iNOS가 CAA 추출물에 의해 감소되는지를 알아보기 위하여, 6-OHDA 투여 7일 후 선조체와 흑질에서 iNOS Western blotting을 실시하여 그 결과를 도 5a에 나타내었다.

<72> 도 5a에서 보는 바와 같이, iNOS 단백질 발현은 선조체 (A)의 경우 대조군에 비해 6-OHDA 투여군에서 6.5배가 증가되었고, 흑질 (B)에서는 대조군에 비해 11.3배의 증가를 보였다. 그러나, CAA 추출물을 50 mg/kg 및 100 mg/kg의 양으로 처리한 처리군에서는 iNOS발현이 대조군과 비슷한 수준으로 억제되는 것을 확인 할 수 있다.

<73> 또한, 파킨슨병 모델 동물과 환자에서 도파민 신경세포 사멸과 관계가 있을 것으로 보고되고 있는 COX-2의 발현이 뇌내강으로 투여한 6-OHDA에 의해서 증가되는지 여부와, CAA 추출물이 이를 효과적으로 억제할 수 있는지 여부를, 6-OHDA 투여 7일 후에 선조체와 흑질에서 COX-2 Western blotting으로 검토하였다.

<74> 본 실험 수행 결과를 도 5b에 나타내었다. 도 5b에서 보는 바와 같이, 선조체(A)에서의 경우, 6-OHDA를 투여한 경우 대조군에 비해 COX-2 단백질의 발현 수준이 2.8배가 증가되었으나, CAA 추출물을 50mg/kg 및 100mg/kg의 양으로 처리한 처리군에서는 대조군에 비해 각각 1.8배, 1.3배 정도의 발현 증가를 보여, 6-OHDA에 의하여 유도된 COX-2 단백질 발현 증가 정도가 감소하였음을 알 수 있다. 한편 흑질 (B)에서도, 6-OHDA를 처리한 경우 대조군에 비해 1.6배 정도의 증가되었으나, CAA 추출물의 경우 모두 1.1배 정도의 발현을 보여, 6-OHDA에 의하여 유도된 COX-2 단백질 발현 증가 정도가 감소하였음을 알 수 있다. 이상의 결과로부터 CAA 추출물이 6-OHDA 투여에 의한 COX-2의 발현 증가를 유의하게 억제하는 것을 알 수 있다.

<75> 하기에 본 발명의 제지, 지모 및 양강의 생약 혼합 추출물을 포함하는 약학 조성물의 제조예를 설명하나, 이들 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 제조예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<76> **제조예 1. 산제의 제조**

<77> 실시예 1의 추출물 20 mg

<78> 유당 100 mg

<79>	탈크	10 mg
<80>	상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.	
<81>	제조예 2. 정제의 제조	
<82>	실시에 1의 추출물	10 mg
<83>	옥수수전분	100 mg
<84>	유당	100 mg
<85>	스테아린산 마그네슘	2 mg
<86>	상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.	
<87>	제조예 3. 캡슐제의 제조	
<88>	실시에 1의 추출물	10 mg
<89>	결정성 셀룰로오스	3 mg
<90>	락토오스	14.8 mg
<91>	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
<92>	통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.	
<93>	제조예 4. 주사제의 제조	
<94>	실시에 1의 추출물	10 mg
<95>	만니톨	180 mg
<96>	주사용 멸균 증류수	2974 mg
<97>	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	26 mg
<98>	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.	
<99>	제조예 5. 액제의 제조	
<100>	실시에 1의 추출물	20 mg
<101>	이성화당	10 g
<102>	만니톨	5 g
<103>	정제수	적량
<104>	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.	
<105>	제조예 6. 건강 식품의 제조	
<106>	실시에 1의 추출물	1000 mg
<107>	비타민 혼합물	적량
<108>	비타민 A 아세테이트	70 µg
<109>	비타민 E	1.0 mg
<110>	비타민 B1	0.13 mg
<111>	비타민 B2	0.15 mg
<112>	비타민 B6	0.5 mg

<113>	비타민 B12	0.2 μ g
<114>	비타민 C	10 mg
<115>	비오틴	10 μ g
<116>	니코틴산아미드	1.7 mg
<117>	엽산	50 μ g
<118>	판토텐산 칼슘	0.5 mg
<119>	무기질 혼합물	적량
<120>	황산제1철	1.75 mg
<121>	산화아연	0.82 mg
<122>	탄산마그네슘	25.3 mg
<123>	제1인산칼륨	15 mg
<124>	제2인산칼슘	55 mg
<125>	구연산칼륨	90 mg
<126>	탄산칼슘	100 mg
<127>	염화마그네슘	24.8 mg
<128>	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
<129>	제조예 7. 건강 음료의 제조	
<130>	실시예 1의 추출물	1000 mg
<131>	구연산	1000 mg
<132>	올리고당	100 g
<133>	매실농축액	2 g
<134>	타우린	1 g
<135>	정제수를 가하여 전체	900 ml
<136>	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
도면의 간단한 설명		
<137>	도 1은 실험예 1에 따른 본 발명의 혼합 추출물의 세포 독성 실험 결과를 보여주는 그래프이다.	
<138>	도 2는 실험예 2에 따른 본 발명의 혼합 추출물의 NO 생성 억제 실험 결과를 보여주는 그래프이다.	
<139>	도 3은 실험예 3에 따른 본 발명의 혼합 추출물의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 실험 결과를 보여주는 그래프이다.	
<140>	도 4a는 실험예 4-1에 따른 본 발명의 혼합 추출물의 선조체와 흑질 조직에서의 TH 발현 증가 실험 결과를 보여주는 것으로, A는 선조체에서의 결과이고, B는 흑질에서의 결과를 보여준다.	
<141>	도 4b는 실험예 4-1에 따른 본 발명의 혼합 추출물의 선조체와 흑질 조직에서의 DAT 발현 증가 실험 결과를 보여주는 것으로, A는 선조체에서의 결과이고, B는 흑질에서의 결과를 보여준다.	
<142>	도 5a는 실험예 4-2에 따른 본 발명의 혼합 추출물의 선조체와 흑질 조직에서의 iNOS 단백질 발현 증가 억제 실험	

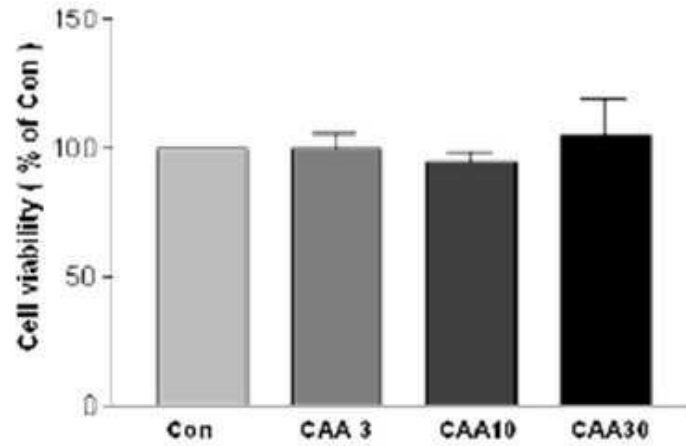
험 결과를 보여주는 것으로, A는 선조체에서의 결과이고, B는 흑질에서의 결과를 보여준다.

<143>

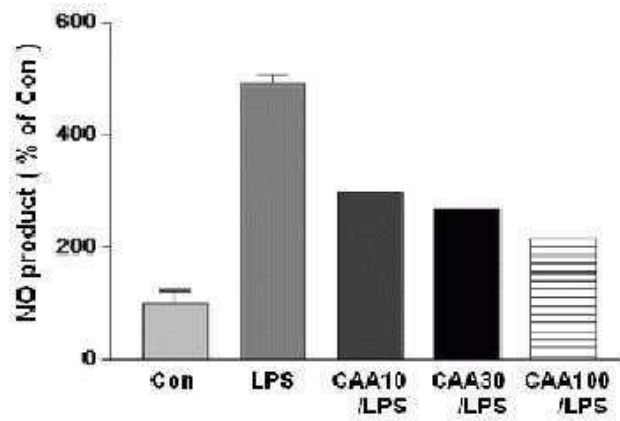
도 5b는 실험예 4-2에 따른 본 발명의 혼합 추출물의 선조체와 흑질 조직에서의 COX-2 발현 증가 억제 실험 결과를 보여주는 것으로, A는 선조체에서의 결과이고, B는 흑질에서의 결과를 보여준다.

도면

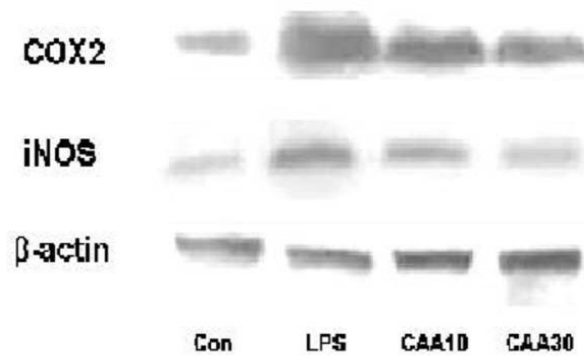
도면1



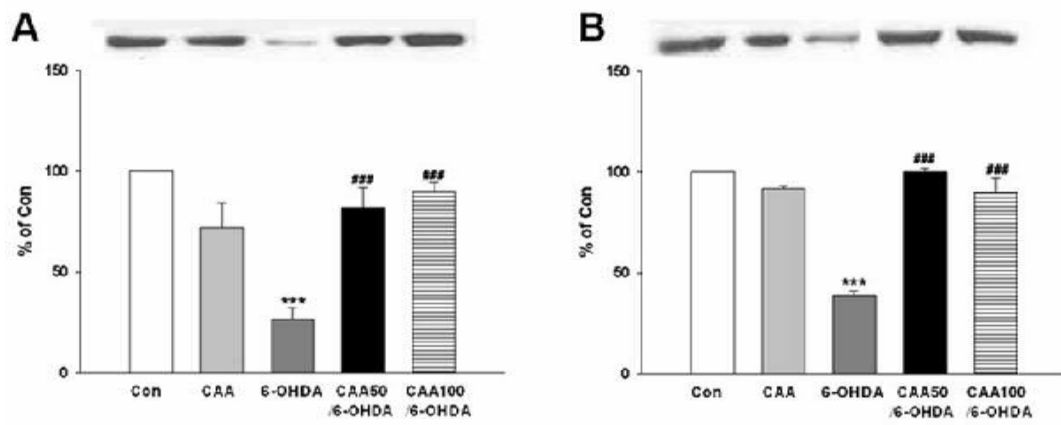
도면2



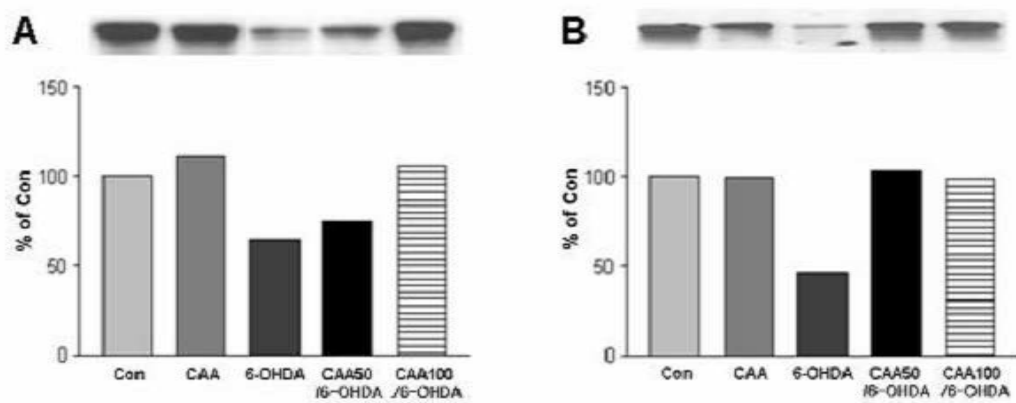
도면3



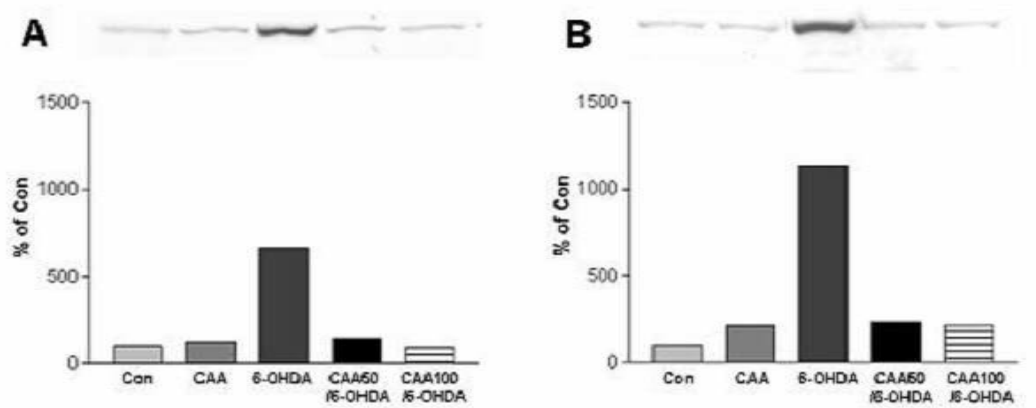
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

