



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0041331

(43) 공개일자 2015년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/488 (2006.01) A61K 36/539 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0119726

(22) 출원일자 2013년10월08일

심사청구일자 2013년10월08일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김호철

서울 동대문구 천장산로11길 17, 204동 1103호 (이문동, 이문삼성래미안아파트)

송정빈

서울 성동구 무학봉길 92, (하왕십리동)

최진규

서울 광진구 독섬로36길 19, 804동 501호 (자양동, 자양8차현대홈타운)

(74) 대리인

안소영

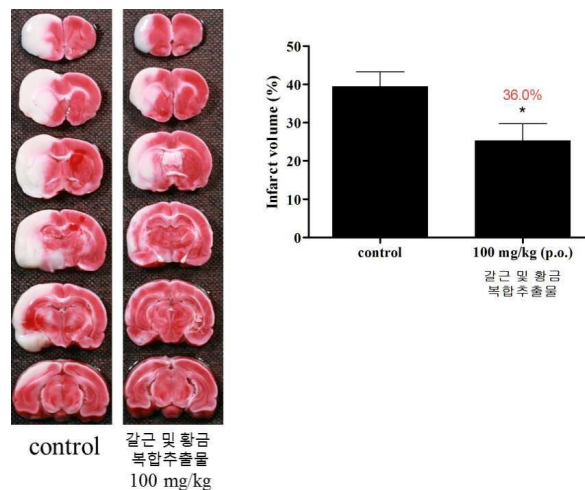
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **갈근 및 황금의 복합 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 갈근 및 황금 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 및/또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 우수한 뇌신경세포 보호 효과를 가지는 동시에 체중 증가 효과 및 운동신경기능 향상 효과도 뛰어나, 효과적으로 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있다.

대표도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B110072

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 한의약선도기술개발사업

연구과제명 신경보호효과를 이용한 중풍치료 한약제제

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교산학협력단

연구기간 2012.12.01 ~ 2013.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

갈근 및 황금 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 갈근 및 황금 복합추출물은 갈근 65 내지 95 중량% 및 황금 5 내지 35 중량%를 포함하는 혼합물로부터 추출된 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 갈근 및 황금 복합추출물은 갈근 87.91 중량% 및 황금 12.09 중량%를 포함하는 혼합물로부터 추출된 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 약학적 조성물.

청구항 5

갈근 및 황금 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 갈근 및 황금 복합추출물은 갈근 65 내지 95 중량% 및 황금 5 내지 35 중량%를 포함하는 혼합물로부터 추출된 건강기능식품.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴 무도병, 피크(Pick)병 및 크로이펠츠-야콥(Creutzfeld-Jacob)병으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 건강기능식품.

발명의 설명

기술분야

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

배경기술

[0002] 대뇌에 일시적인 뇌허혈이 유발되는 경우, 산소와 포도당의 공급이 차단되어 뇌신경세포에서는 ATP 감소 및 부종(edema)이 발생하며, 결국 뇌의 광범위한 손상이 유발된다. 뇌신경세포의 사멸은 뇌허혈이 있는 후 상당한 시간 경과 후에 나타나는데, 이를 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)라고 한다.

[0003] 뇌허혈에 의한 뇌졸중 치료는 시간적 시기(time window)를 기준으로 구분된다. 일반적으로 발병 후 4.5시간 내에는 혈전 용해제를 투여하여 관류(perfusion)시킨다. 발병 후 수일 동안은 지연성 신경세포사 기전으로 뇌신경세포의 사멸이 일어나며 이것을 막기 위하여 신경보호제(neuroprotectant)를 투여한다. 급성기 이후에는 생존한 뇌신경세포의 가소성을 향상시켜 사지의 마비와 같은 운동 기능의 장애를 치료하여 기능의 회복을 촉진하는 치료를 시행한다.

[0004] 현재까지 FDA 승인을 받고 시판 중인 뇌허혈 치료제로서는 조직 플라즈미노겐 활성자(tissue plasminogen

activator, t-PA)가 유일하다. t-PA는 혈전용해제로서 뇌허혈을 유발시키는 혈전을 녹여 빠른 산소 및 포도당의 공급을 유도하는 물질이다. 따라서 직접적으로 뇌신경세포를 보호하는 것이 아니기 때문에 빠른 사용이 필요하며, 혈전용해제라는 특징 때문에 과량으로 사용 또는 자주 사용하는 경우에는 혈관벽이 얇아져 결국 출혈성 뇌혈관질환을 유발하는 부작용이 있을 수 있다.

[0005] 신경보호제 기전으로 작용하는 뇌허혈 치료제로서는 미즈비시 社의 edaravone이 최초로 도입되었다. edaravone은 합성 항산화제로서 신경보호제에 해당한다. edaravone은 시간적 시기가 매우 제한되어 있으며(중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌신경세포 사멸을 막기 위해서는 뇌졸중 유발 후 6시간 내에 투여해야 하는 것을 보고되어 있음. Edaravone Reduces Early Accumulation of Oxidative Products and Sequential Inflammatory Responses After Transient Focal Ischemia in Mice Brain, Ning Zhang et al.) 신독성(renal toxicity)이 있다고 보고된 바 있으나(A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: is edaravone an effective neuroprotective therapy?, Paul A Lapchak), 대체 약물이 없어 연간 3,000억원의 매출을 올리고 있다.

[0006] 따라서 뇌허혈에 의한 질환 치료에 있어서 시간적 시기의 제약이 적고 신경보호제 기능 및 급성기 이후의 운동신경 기능 회복 촉진 기능을 모두 갖는 약물의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 뇌허혈에 대해 뇌신경세포 보호 효과를 갖는 동시에 운동신경 기능 향상 및 체중을 증가시키는 효과를 갖는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 갈근 및 황금 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 갈근(葛根)은 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 등목인 쑥(*Pueraria lobata*)의 수피를 제거한 뿌리이다.

[0010] 황금은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본인 황금(黃芩, *Scutellaria baicalensis*)의 수피를 제거한 뿌리이다.

[0011] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 갈근 및 황금 복합추출물은 갈근 및 황금이 100:1 내지 1:100의 중량비로 포함된 혼합물로부터 추출된 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 갈근 및 황금 복합추출물은 갈근 65 내지 95 중량% 및 황금 5 내지 35 중량%를 포함하는 혼합물로부터 추출된 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상기 갈근 및 황금 복합추출물은 갈근 87.91 중량 % 및 황금 12.09 중량%를 포함하는 혼합물로부터 추출된 것일 수 있다. 상기 조성 비율은 본 발명자들이 우수한 뇌신경세포 보호 효과를 발휘하면서 체중 증가 및 운동신경기능 향상 효과를 나타내는 조성 비율에 대해 연구한 결과 발견한 조성 비율에 해당한다.

[0012] 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴 무도병, 피크(Pick)병 및 크로이츠펔츠-야콥(Creutzfeldt-Jacob)병으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다. 그러나 퇴행성 뇌질환의 종류는 이에 해당되지 않으며, 본 발명의 조성물로 혜택을 볼 수 있는 질병은 모두 포함된다.

[0013] 본 발명의 약학적 조성물은 갈근 및 황금 복합추출물을 유효성분으로 포함하며, 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 갈근 및 황금 복합추출물은 조성물의 총중량에 대하여 0.0001 내지 100 중량%로 첨가할 수 있다.

[0014] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 비경구, 더욱 바람직하게는 정맥내로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0015] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(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.

- [0016] 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 조성물은 1일 0.0001 내지 2000 mg/kg, 바람직하게는 0.1 내지 1000 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량의 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0018] 본 발명은 갈근 및 황금 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 갈근 및 황금 복합추출물은 갈근 및 황금이 100:1 내지 1:100의 중량비로 포함된 혼합물로부터 추출된 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 갈근 및 황금 복합추출물은 갈근 65 내지 95 중량% 및 황금 5 내지 35 중량%를 포함하는 혼합물로부터 추출된 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상기 갈근 및 황금 복합추출물은 갈근 87.91 중량 % 및 황금 12.09 중량%를 포함하는 혼합물로부터 추출된 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 건강기능식품은 갈근 및 황금 복합추출물을 유효성분으로 포함하며, 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 갈근 및 황금 복합추출물은 건강기능식품의 총중량에 대하여 0.0001 내지 100 중량%로 첨가할 수 있다.
- [0021] 또한, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 본 발명이 적용될 수 있는 식품의 예로는 음료, 껌, 비타민 복합제, 드링크제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0022] 본 발명의 건강기능식품을 음료 형태로 제조하는 경우, 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, 수크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 또한, 상술한 것 이외의 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0023] 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.
- [0024] 본 발명의 건강기능식품은 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물 및 건강기능식품은 뇌허혈에 대한 뇌신경세포 보호 효과를 갖는 동시에 체중 증가 효과 및 운동신경기능 향상 효과도 뛰어나다. 즉 뇌허혈에 의한 뇌졸중 치료에 있어서, 시간적 시기(time window)상 발병 후 수일간 일어나는 지연성 신경세포사를 막는 뇌신경세포 보호 효과를 갖는 동시에, 급성기 이후에 감소된 체중을 증가시키고 운동신경기능을 회복시키는 효과도 갖는 것이다. 체중 증가 및 운동신경기능 향상 효과는 뇌신경세포 보호 효과와는 다른 기전으로 일어나는 것으로서, 이러한 효과들을 동시에 갖는 약물은 지금까지 개발된 바 없다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물 및 건강기능식품의 효과는 중대뇌동맥 폐쇄 모델 랫트에서 확인되었다. 지금까지 가장 널리 알려진 뇌허혈에 의한 뇌신경세포사 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 뇌신경세포사가 유발된다는 흥분성 뇌신경세포사 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 뇌신경세포사이다(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). 중대뇌동맥 폐쇄 모델은 산화성 뇌신경세포사 및 흥분성 뇌신경세포사가 모두 일어나 뇌허혈에 의한 뇌신경세포사의 예방 또는 치료 효과를 확인하기에 적합한 모델에 해당한다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 조성물은 우수한 뇌신경세포 보호 효과를 가지는 동시에 체중 증가 효과 및 운동신경기능 향상 효과를 가지므로, 효과적으로 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환의 예방, 치료 또는 개선을 위해 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 7일차에 Sham 군, 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 30 mg/kg 투여군 및 100 mg/kg 투여군의 체중 증가량을 나타낸 도이다.

도 2는 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 14일차에 Sham 군, 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 30 mg/kg 투여군 및 100 mg/kg 투여군의 체중 증가량을 나타낸 도이다.

도 3은 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 21일차에 Sham 군, 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 30 mg/kg 투여군 및 100 mg/kg 투여군의 체중 증가량을 나타낸 도이다.

도 4는 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 28일차에 Sham 군, 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 30 mg/kg 투여군 및 100 mg/kg 투여군의 체중 증가량을 나타낸 도이다.

도 5는 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 1일 전(baseline)에 Sham 군, 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 100 mg/kg 투여군의 rotarod test 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 7일차에 Sham 군, 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 100 mg/kg 투여군의 rotarod test 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 14일차에 Sham 군, 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 100 mg/kg 투여군의 rotarod test 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 21일차에 Sham 군, 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 100 mg/kg 투여군의 rotarod test 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 28일차에 Sham 군, 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 100 mg/kg 투여군의 rotarod test 결과를 나타낸 도이다.

도 10의 좌측 도는 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 28일차에 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 100 mg/kg 투여군의 뇌조직 절편을 TTC 염색법으로 관찰한 결과를 나타내는 사진이다. 도 10의 우측 도는 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈 유발 28일차에 대조군, 갈근 및 황금 복합추출물 100 mg/kg 투여군의 뇌조직 손상율(뇌경색비율)을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명자들은 다양한 한약재 추출물들의 뇌졸중 또는 퇴행성 뇌질환 치료 효과를 관찰한 결과, 갈근 및 황금 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물이 중대뇌동맥 폐쇄 모델(MCAo)에서 뇌허혈에 의한 뇌신경세포 손상에 대하여 뇌신경세포 보호 효과가 우수하고, 체중 증가 효과 및 운동신경기능 향상 효과가 뛰어난 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0031] <실시예> 갈근 및 황금 복합추출물의 제조

[0032] 갈근과 황금은 약수당(서울 동대문구)에서 구입하였다. 각각 분쇄한 갈근 87.91 g 및 황금 12.09 g을 혼합하여 혼합물을 준비하였다. 상기 혼합물에 10배량의 30% 에탄올 1L을 넣고 90 ℃에서 3 시간 동안 1차 열수 추출하여 실온에서 약 2-3시간 방치한 다음 여과한 액을 1차 추출액으로 하였다. 다시 추출기에 30% 에탄올 1L을 넣고 90 ℃에서 3 시간 동안 2차 열수 추출하여 실온에서 약 2-3시간 방치한 다음 여과한 액을 2차 추출액으로 하였다. 1차 추출액과 2차 추출액을 혼합하여 50-60 ℃에서 약 20 brix가 될 때까지 감압농축 하였다. 얻어진 농축액을 예비동결기로 -45℃에서 20분간 예비 동결한 후, 동결건조기로 동결건조하여 분말상태로 제조하였다(수득율 약 25%).

[0033] <실험예 1> 중대뇌동맥 폐쇄 모델(MCAo) 제작

[0034] <1-1> 실험동물의 준비

- [0035] 실험동물로 300 g 내외의 8주령의 스프라그-다울리계(sprague-dawley, 샘타코, 대한민국) 수컷 랫트를 구입하여 사료와 물을 충분히 공급하면서 실험환경에 적응하도록 하였다. 1주일 정도의 적응기간을 준 후, 동물실험을 수행하였다.
- [0036] <1-2> 중대뇌동맥 폐쇄 모델 제작
- [0037] 국소 뇌허혈에 의한 뇌신경세포 손상을 일으킨 중대뇌동맥 폐쇄 모델을 제작하기 위하여, 응용된 혈관 내 봉합사 삽입법(intraluminal suture method)을 사용하였다(Zea Longa, *et al.*, *Stroke*, 20: 84-91, 1989).
- [0038] 구체적으로, 먼저 22 mm의 4-0 나이론 봉합사의 끝 부분에서 약 5-8 mm 길이를 실리콘으로 코팅하여 프로브(probe)로 하되 지름이 0.36 mm가 되게 제작하여 실험에 사용하였다. 실시예 <1-1>에서 준비한 랫트를 70% N₂O와 30% O₂가 섞인 혼합가스에 5%의 이소플루란(isoflurane)으로 전신마취를 한 후, 한쪽은 채혈을 위한 주사기를, 다른 한쪽은 혈압측정용 프로브(probe)를 삽입하여 혈압을 관찰하였으며, 채혈을 한 후 혈당 및 혈액가스를 분석하여 관찰하였다.
- [0039] 목 전방 부위 중앙의 피부를 절개하고 오른쪽 경동맥과 외경동맥(ECA)을 분리하였다. 외경동맥 분지인 상부갑상선동맥과 후두동맥을 전기소작기로 소작하고 내경동맥의 분지인 익돌근구개동맥을 전기소작하고 외경동맥을 자른 후, 상기 프로브가 형성된 나이론 봉합사를 외경동맥에서 내경동맥으로 삽입하되 총경동맥분지에서 약 18~19 mm 정도 삽입한 후 실로 고정하였다. 피부절개부위를 다시 봉합한 후 마취에서 자연회복 시켰다. 수술은 체온이 37±0.5℃가 되게 유지하면서 관찰하였다. 수술 90분 후 상기와 같은 방법으로 재마취하여 프로브를 후퇴시켜 재관류시켰다. 수술 당일부터 7일간 1일 1회 moxifloxacin (50 mg/kg)을 생리식염수로 희석하여 kg 당 5ml씩 복강투여 하였다.
- [0040] 한편 상기 모든 절차를 동일하게 수행하되 혈관내 봉합사 삽입을 하지 않아 뇌허혈이 유발되지 않은 랫트들을 Sham 군으로 하였다.
- [0041] <실험예 2> 체중 증가 효과 확인
- [0042] <실험예 1>에서 제작된 중대뇌동맥 폐쇄 모델을 3개 군으로 나누어, 뇌허혈 유발 후 3일째 되는 날부터 14일간, 첫 번째 군에는 갈근 및 황금 복합추출물을 5% 다이메틸설폭사이드(DMSO)가 함유된 생리식염수로 희석하여 30 mg/kg씩 1일 1회 경구투여 하였다(이하 30 mg/kg 투여군). 두 번째 군에는 상기와 동일한 갈근 및 황금 복합추출물 희석물을 100 mg/kg씩 1일 1회 경구투여 하였다(이하 100 mg/kg 투여군). 세 번째 군은 대조군으로 하였다. 대조군 및 Sham 군에는 5% 다이메틸설폭사이드(DMSO)가 함유된 생리식염수를 kg 당 5 ml로 1일 1회 경구투여 하였다.
- [0043] 각 군의 랫트들에서 뇌허혈을 유발한 당일, 뇌허혈 유발 후 7, 14, 21, 28일째 되는 날에 동물의 체중을 매 회 동일한 시간에 측정하였다. 체중 증가량(body weight gain)은 뇌허혈 유발 후 7, 14, 21, 28일째 되는 날의 체중과 뇌허혈 유발 당일의 체중의 차이로 계산하여 평가하였다.
- [0044] 뇌허혈 유발 7일차에, 대조군은 수술 당일에 비하여 체중 증가량은 -41.9 ± 13.8 g으로 나타나 심한 체중 감소를 보였다. 30 mg/kg 투여군의 체중 증가량은 -37.2 ± 14.5 g으로 나타나 대조군보다는 체중 감소 정도가 적었다. 100 mg/kg 투여군의 체중 증가량은 12.4 ± 4.9 g로 나타나, 대조군에 비하여 유의한 체중 증가를 보였다 ($p<0.01$)(도 1 참조).
- [0045] 뇌허혈 유발 14일차에, 대조군은 수술 당일에 비하여 8.4 ± 17.8 g의 체중 증가량을 보였다. 30 mg/kg 투여군의 체중 증가량은 16.4 ± 21.5 g으로 나타나 대조군보다 체중이 더 증가했다. 100 mg/kg 투여군의 체중 증가량은 56.5 ± 5.3 g으로 나타나 대조군의 체중 증가량보다 572.6 % 유의하게 증가했다 ($p<0.05$)(572.6=((56.5-8.4)/8.4)*100)(도 2 참조).
- [0046] 뇌허혈 유발 21일차에, 대조군은 수술 당일에 비하여 38.6 ± 20.2 g의 체중 증가량을 보였다. 30 mg/kg 투여군의 체중 증가량은 57.1 ± 19.9 g으로 나타나 대조군보다 체중이 더 증가했다. 100 mg/kg 투여군의 체중 증가량은 88.8 ± 7.1 g으로 나타나 대조군의 체중 증가량보다 130.1% 유의하게 증가했다 ($p<0.05$)(도 3 참조).
- [0047] 뇌허혈 유발 28일차에, 대조군은 수술 당일에 비하여 58.9 ± 18.0 g의 체중 증가량을 보였다. 30 mg/kg 투여군의 체중 증가량은 79.1 ± 14.8 g으로 나타나 대조군보다 체중이 더 증가했다. 100 mg/kg 투여군의 체중 증가량은 101.9 ± 7.8 g으로 나타나 대조군의 체중 증가량보다 73.0% 유의하게 증가했다 ($p<0.05$)(도 4 참조).
- [0048] 상기 결과로부터 본 발명의 복합추출물 투여가 뇌허혈에 따른 체중 감소 효과를 극복하게 할 수 있음을 알 수

있었다.

[0049] <실험예 3> 운동신경 기능 향상 효과 확인

[0050] <실험예 1>에서 제작된 중대뇌동맥 폐쇄 모델을 2개 군으로 나누어, 뇌허혈 유발 후 3일째 되는 날부터 14일간, 첫 번째 군에는 갈근 및 황금 복합추출물을 5% 다이메틸설폭사이드(DMSO)가 함유된 생리식염수로 희석하여 100 mg/kg씩 1일 1회 경구투여하였다(이하 100 mg/kg 투여군). 두 번째 군은 대조군으로 하였다. 대조군 및 Sham 군에는 5% 다이메틸설폭사이드(DMSO)가 함유된 생리식염수를 kg 당 5 ml로 1일 1회 경구투여 하였다.

[0051] 각 군의 랫트들에서 운동기능에 미치는 효과를 확인하기 위하여 뇌허혈 유발 1일 전(baseline)과 유발 7, 14, 21, 28일 후 rotarod test를 실시하였다. Rotarod의 회전봉이 5에서 30 rpm까지 5분간 회전하는 가속회전법을 사용하였고, 랫트를 봉의 가운데에 균형을 잡아 놓은 후, 회전을 시작한 시간부터 랫트가 떨어질 때까지의 시간(latency time)을 측정하여 평가하였다. 각 랫트마다 5회 실시하여 최고치와 최저치를 제외한 중간 3개 값의 평균을 수치로 사용하였다.

[0052] 뇌허혈 유발 1일 전(baseline) rotarod test를 평가한 결과, Sham 군 296.7 ± 2.2초, 대조군 261.9 ± 18.5초, 30 mg/kg 투여군 260 ± 18.0초, 100 mg/kg 투여군 282.8 ± 7.1초로 각 군 간의 차이가 없었다(도 5 참조).

[0053] 뇌허혈 유발 7일차에 rotarod test를 평가한 결과, 대조군에서는 137.2 ± 30.3초 동안의 평균 유지시간을 보였고, 100 mg/kg 투여군에서는 198.9 ± 24.2초의 유지시간을 보여 대조군에 비해 45% 유지시간을 증가시켰다(도 6 참조).

[0054] 뇌허혈 유발 14일차에 rotarod test를 평가한 결과, 대조군에서는 129.3 ± 20.8초 동안의 유지시간을 보였고, 100 mg/kg 투여군에서는 210.2 ± 23.6초의 유지시간을 보여 대조군에 비해 62.6% 유의하게 유지시간을 증가시켰다 (p<0.05)(도 7 참조).

[0055] 뇌허혈 유발 21일차에 rotarod test를 평가한 결과, 대조군에서는 160.7 ± 33.9초 동안의 유지시간을 보였고, 100 mg/kg 투여군에서는 214.7 ± 19.0초의 유지시간을 보여 대조군에 비해 33.6% 유지시간을 증가시켰다(도 8 참조).

[0056] 뇌허혈 유발 28일차에 rotarod test를 평가한 결과, 대조군에서는 172.3 ± 21.1초 동안의 유지시간을 보였고, 100 mg/kg 투여군에서는 220.9 ± 18.7초의 유지시간을 보여 대조군에 비해 28.2% 유지시간을 증가시켰다(도 9 참조).

[0057] <실험예 4> 뇌신경세포 보호효과 확인

[0058] <4-1> 뇌경색 부피 측정

[0059] <실험예 1>에서 제작된 중대뇌동맥 폐쇄 모델을 2개 군으로 나누어, 뇌허혈 유발 직후에, 첫 번째 군에는 갈근 및 황금 복합추출물을 5% 다이메틸설폭사이드(DMSO)가 함유된 생리식염수로 희석하여 100 mg/kg을 경구투여 하였다(이하 100 mg/kg 투여군). 두 번째 군은 대조군으로 하고, 5% 다이메틸설폭사이드(DMSO)가 함유된 생리식염수를 kg 당 5 ml로 경구투여 하였다.

[0060] 재관류로 뇌허혈이 유발된지 24시간 후에 경추탈골 시키고, 2분 이내에 뇌를 적출하여 2 mm 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(paraformaldehyde)로 고정시켜 조직을 관찰하였다. 모든 수술과정은 수술현미경하에서 시행하였으며, 마취는 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 수학적 식 1로 계산하였다. 이때, 교정된 뇌경색의 부피(㎟)는 하기 수학적 식 2로 계산하였다.

[0061] [수학적 식 1]

[0062] 뇌경색 비율(%) = (A-B/A)×100

[0063] A: 정상 좌반구의 부피(㎟)

[0064] B: 교정된 뇌경색의 부피 (㎟)

[0065] [수학식 2]

[0066] 교정된 뇌경색의 부피(㎖) = (정상 좌반구의 부피)-(손상 반구의 정상 부위 부피)

[0067] <4-2> 뇌신경세포 보호 효과 확인

[0068] TTC로 뇌조직을 염색하면 손상으로 인하여 조직이 사멸한 부위는 염색이 되지 않아 흰색으로 나타나며, 정상 부위의 조직은 염색이 되어 흑적색으로 나타난다.

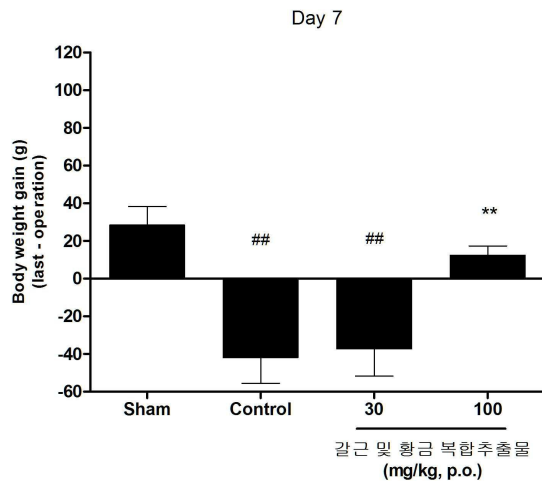
[0069] 도 10에 나타난 바와 같이, 100 mg/kg 투여군은 뇌신경세포가 사멸된 부분의 면적이 대조군에 비하여 적은 것을 육안으로 확인할 수 있었다 (도 10 좌측 도 참조).

[0070] 뇌경색 면적의 크기를 비교해 본 결과, 대조군은 뇌경색 비율(%)이 약 39.4 ± 3.9 %로 나타난 반면 100 mg/kg 투여군에서는 25.2 ± 4.5 %로 나타나, 대조군에 비해 뇌경색 비율이 36.0 % 감소함을 알 수 있었다 ($p < 0.05$)(도 10 우측 도 참조).

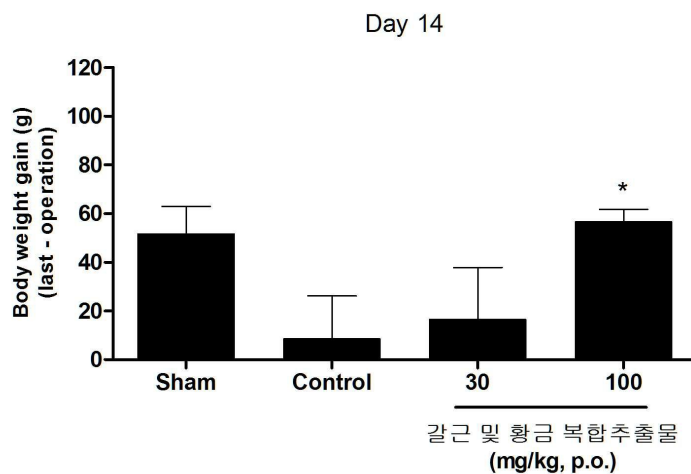
[0071] 상기 결과로부터 본 발명의 갈근 및 황금 복합추출물이 유의한 뇌신경세포 보호효과를 가짐을 알 수 있었다.

도면

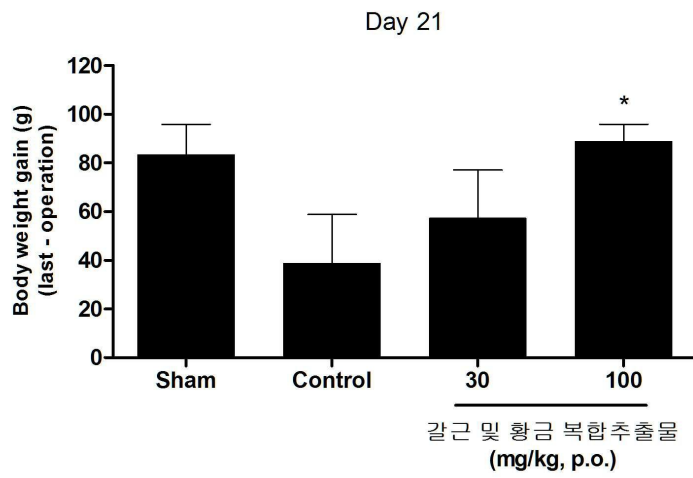
도면1



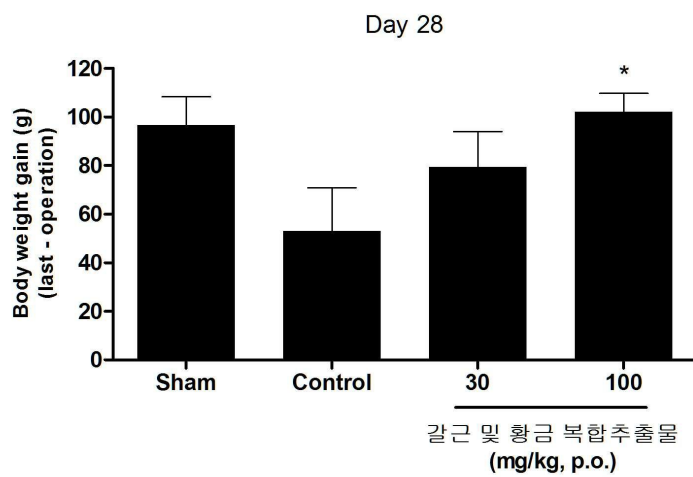
도면2



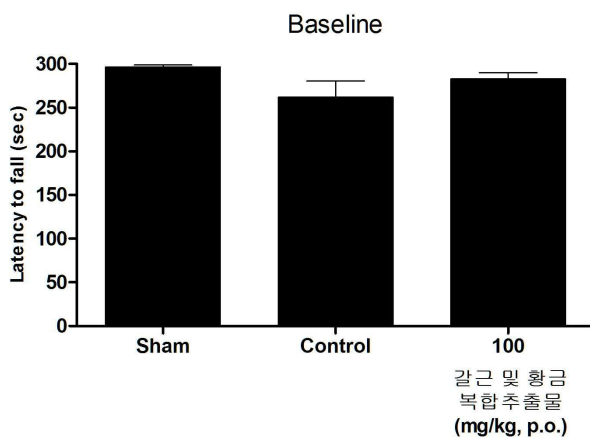
도면3



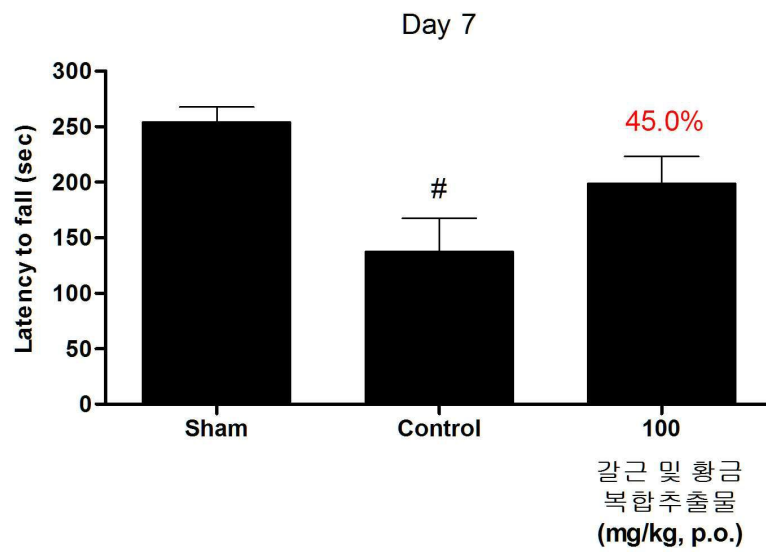
도면4



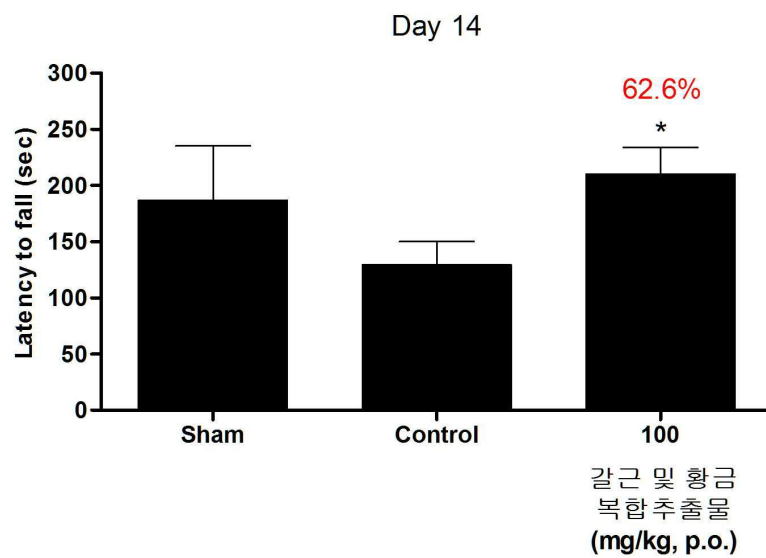
도면5



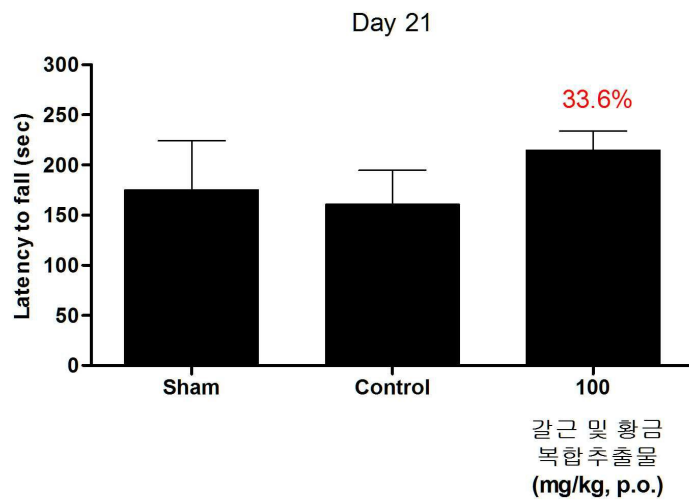
도면6



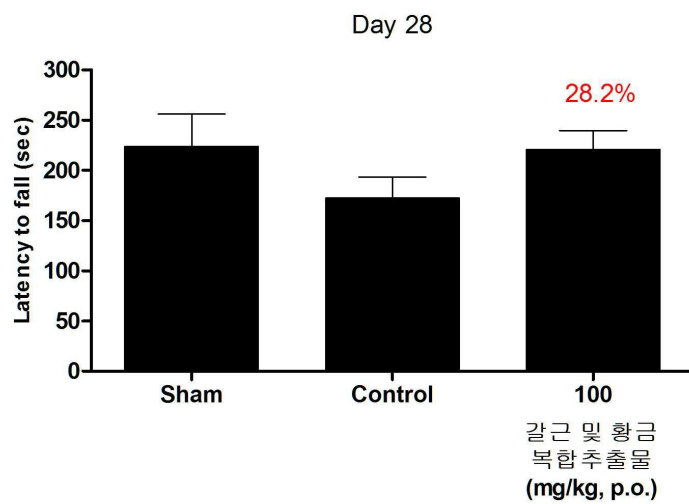
도면7



도면8



도면9



도면10

