(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0041882
(43) 공개일자 2013년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/605 (2006.01) *A61K 36/60* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0038325(분할)
(22) 출원일자 2013년04월08일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2010-0135671
원출원일자 2010년12월27일
심사청구일자 2010년12월27일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
오명숙
서울특별시 송파구 잠실동 리센츠 260-2601
김효근
경기도 남양주시 도농동 롯데아파트 801동 501호
(74) 대리인
이원희

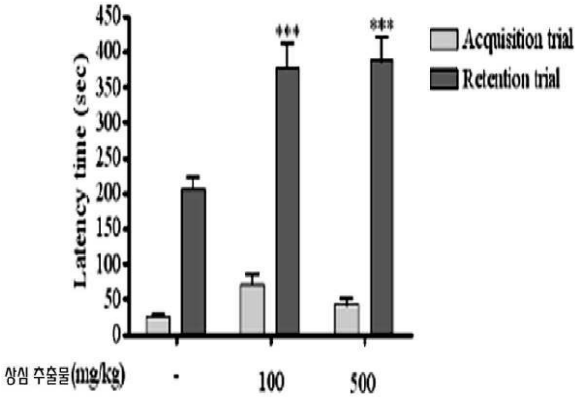
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **상심 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 상심(학명:*Morus alba*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매(dementia) 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 상심 추출물은 대뇌피질(Cortical) 및 해마(hippocampal)에서 베타아밀로이드(Amyloid-β; Abeta)에 대한 세포 보호효과, ER 스트레스(Endoplasmic reticulum stress)독성인 탑시가진(Thapsigargin)에 대한 세포 보호효과, 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential)유지, ROS(reactive oxygen species)생성 감소, bcl-2의 증가, bax의 감소 및 캐스파제-3(Caspase-3) 활성 감소를 통한 항-자가사멸(anti-apoptosis)효과 및 MAP-2 양성세포수를 통한 뉴런에 대한 보호효과를 가짐으로써, 치매예방 및 치료용 약학적 조성물, 또는 상기 목적의 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

상심(학명:*Morus alba*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매(dementia) 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C_1 내지 C_2 저급 알코올, 또는 이들의 혼합물로 추출된 것을 특징으로 하는 치매 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 C_1 내지 C_2 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 치매 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 치매는 알츠하이머(AD; Alzheimer's disease)인 것을 특징으로 하는 치매 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

상심 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 추출물은 물, 에탄올 또는 이들의 혼합물로 추출된 것을 특징으로 하는 치매 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 치매는 알츠하이머인 것을 특징으로 하는 치매 예방 및 개선용 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 상심(학명:*Morus alba*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매(dementia) 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 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 2019년에서는 이 비율이 14%

를 넘어 고령사회에 진입할 것으로 전망되고 있다. 이와 같이 고령화 문제가 사회적인 이슈로 대두 됨에 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 질병보다도 만성 퇴행성 질병이 더욱더 큰 문제로 대두 되고 있다는 점이다. 특히 만성 퇴행성 질병 중에서 뇌혈관 질환에 의한 사망은 단일질환에 의한 사망률 중에서 2위를 기록하고 있는 매우 중요한 질환이다.

[0003] 치매(dementia)는 직업, 사회생활 및 대인관계에서 정상적인 일상생활에 장애를 주는 정도로 기억장애가 있으면서 언어장애, 방향감각 상실, 계산력 저하, 성격 및 감정의 변화 등 4가지 중 1가지 이상이 나타날 때 치매로 진단된다. 치매는 정상적인 노화와는 구분해야 할 병적인 증상이며, 그 원인에 따라 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease), 혈관성 치매(vascular dementia), 기타 알콜 중독, 외상, 파킨슨병의 후유증이 원인이 되는 치매로 구별된다. 또한, 최근의 역학 연구에 의하면 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 및 심장질환 등의 뇌혈관 질환의 위험인자들이 혈관성 치매뿐만 아니라 알츠하이머성 치매의 발병률을 증가시킨다는 보고는 있었지만, 아직까지 정확한 병인이나 치료법은 알려지지 않은 실정이다.

[0004] 알츠하이머병(AD; Alzheimer's disease)은 신경세포(neuron) 상실과, 아밀로이드 전구체 단백질로부터 유래된 39-43 아미노산 펩티드인 아밀로이드 β단백질(amyloid-beta;Aβ)을 주요 구성성분으로 하는 세포외 노인성 반(senile plaque)을 특징으로 한다. 시험관 내 및 생체 내 연구 결과 Aβ 또는 Aβ 펩티드 단편은 독성 효과를 갖는 것으로 보고되어 Aβ가 AD의 발병에 중요한 역할을 함을 시사한다(Butterfield *et al.*, *Free Radical Biology and Medicine,* 2002,32:1050-1060 ; ButterfIeld *et al.*,*Free Radical Biology and Medicine,* 2007, 43:658-677). 배양시, Aβ는 신경세포 사멸을 직접적으로 유도하며 신경세포를 흥분 독성 및 산화성 손상에 취약하게 한다. NMDA(N-methyl-D-aspartate receptor)수용체는 Aβ결합의 선택적 기질이나 Aβ-유발되는 글루타메이트 흥분 독성의 매개자로 작용한다. NMDA수용체는 특히 Ca^{2+}에 고도로 투과성인 리간드-게이트/볼티지-감수성 양이온 채널이다. $[Ca^{2+}]_i$의 광범위한 상승은 직접적으로 세포 기능부전, 과잉흥분 또는 사멸에 이르게 한다. 따라서 Aβ의 신경 독성 효과가 비-경쟁적 NMDA수용체 길항제인(5R.10S)-(+)-5-메틸-10,11-디하이드로-5H-디벤조[a,d]사이클로헵텐-5,10-이민 말레이트(MK-801)[5R.10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,b)cyclohepten-5,10-imine maleate]에 의해 감소된다는 보고에 의해 증명되는 바와 같이, Aβ노출에 의한 NMDA수용체를 통한 Ca^{2+}유입은 Aβ-유도된 신경 독성에서 결정적인 역할을 한다. 활성산소(Reactive Oxygen species; ROS)의 형성 또한, 퇴행성 뇌질환의 발병에 관여하는 것으로 믿어진다. 몇몇 증거가 신경세포 항상성을 방해하는 광범위한 분자 적 형상을 통해 신경퇴화를 촉발하거나 용이하게 함으로써, Aβ-매개 된 신경병에서 활성 인자로서 산화성 스트레스의 관여를 뒷받침한다. 그러나 NMDA수용체 길항제와 신경세포 채널의 직접적 차단제의 임상적 유익성은, 그들이 확인할만한 효능을 결여하고 있거나 심각한 부작용을 가지므로, 논란의 여지가 있다.

[0005] 상심(학명:*Morus alba*, 영문명:white Mulberry)은 뽕나무과(Moraceac)에 속한 낙엽교목인 뽕마무의 열매가 자홍색을 나타낼 때 채취하여 건조한 후 한약재로 사용되며 한방에서는 어지러움과 이명, 구갈, 소갈 등의 치료에 이용하는 것으로 알려져 있으며(강병수 등, 본초학, 영림사, 서울, 한국 2000), 일본에서는 양혈거풍의 효능과 풍열을 다스리며 강장, 진통약, 불면증, 이명, 어지러움, 요통, 변비 등의 치료에 응용하는 것으로 알려져 있다(Namba, T., The Encyclopedia of Wakan-Yaku with Color Pictures Vol. 1 Hoikusha, Osaka, Japan, 1993). 동의보감에는 소갈을 다스리고 오장을 이롭게 하며 뽕나무의 정(精)이 모여 있다고 적고 있다(동의보감국역위원회, 동의보감, 남산당, 서울, 한국, 2000). 상심은 각종 비타민류, 유기산류, 당류 등의 성분이 보고되어 있고 활성 성분에 대한 연구보고는 알려져 있지 않다.

[0006] 이에 본 발명자는 치매에 대해 치료 및 예방효과를 갖는 천연물질 개발에 노력하던 중, 상심 추출물이 대뇌피질(Cortical) 및 해마(hippocampal) 세포에서 베타아밀로이드(Amyloid-β; Abeta) 유발 독성에 대한 세포 보호효과, ER 스트레스(Endoplasmic reticulum stress) 독성인 탑시가진(Thapsigargin)에 대한 보호효과, 미토콘드리

아 막전위(mitochondrial membrane potential), ROS(reactive oxygen species), bcl-2, bax 및 캐스파제-3(Caspase-3) 측정을 통한 항-자가사멸(anti-apoptosis) 효과 및 MAP-2 양성세포수를 통한 뉴런에 대한 보호효과를 확인함으로써 치매 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 상심(학명:*Morus alba*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매(dementia) 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 치매 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 상심(학명:*Morus alba*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매(dementia) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 아울러, 본 발명은 상심 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 상심(학명:*Morus alba*) 추출물은 베타아밀로이드(Amyloid-β; Abeta) 유발 독성에 대한 세포 보호효과 및 탑시가진(Thapsigargin)에 대한 세포 보호 효과를 확인하였고, 항-자가사멸 효과 및 뉴런에 대한 보호효과를 확인함으로써, 상기 상심 추출물은 치매(dementia) 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 상기 목적의 건강식품의 개발에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 상심(학명:*Morus alba*) 추출물을 처리한 후, 수동회피시험(Passive avoidance task)의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 상심 추출물을 처리한 후, 신경전구세포(doublecortin; DCX)의 변화를 나타낸 도이다.

도 3은 상심 추출물을 처리한 후, 신경돌기(neurite)의 성장의 변화를 나타낸 도이다.

도 4는 상심 추출물을 처리한 후, NGF(nerve growth factor; 신경성장인자) 레벨을 측정한 그래프이다.

도 5는 상심 추출물을 처리한 후, 세포생존율을 나타낸 그래프이다.

도 6은 베타아밀로이드(Amyloid-β; Abeta) 독성처리에 대한 상심 추출물 전처리의 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 7은 상심 추출물의 항-자가사멸효과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 MAP-2 양성세포수를 나타낸 그래프이다.

도 9는 상심 추출물에 대한 탑시가진(tapsigargin)을 이용한 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명은 상심(학명:*Morus alba*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매(dementia) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 상심은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.

[0015] 상기 치매는 알츠하이머(Alzheimer's disease)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0016] 상기 상심 추출물은 하기와 같은 단계로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0017] 1) 건조한 상심을 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0018] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0019] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축하는 단계.

[0020] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출 용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물, 바람직하게는 C_1 내지 C_2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 70% 에탄올 수용액을 사용하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 용매의 양은 상심 건조 중량의 5 내지 15배로 하는 것이 바람직하고 7 내지 10배로 하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 방법은 열수추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출시 온도는 10℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며 상온인 것이 더욱 바람직하다. 상기 추출 시간은 30분 내지 3시간이 바람직하고, 1 ~ 2시간이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 횟수는 1 ~ 5회인 것이 바람직하고 3회인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0021] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0022] 본 발명자들은 상심 추출물의 단순인지기능 향상 효과를 확인하기 위하여, 수동회피실험(passive avoidance test)를 실시한 결과, 상심 추출물을 투여시 유의적인 기억증진 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 1 참조).

[0023] 또한, 상심 추출물의 단순인지기능 향상 효과를 확인하기 위하여, 신경전구세포(doublecortin) 및 신경돌기(neurite)의 변화를 면역조직화학염색을 통하여 측정한 결과, 상심 추출물을 투여시 신경전구세포 및 신경돌기의 유의적인 증가를 나타내는 것을 확인하였다(도 2 및 도 3 참조).

[0024] 또한, 상심 추출물의 단순인지기능 향상 효과를 확인하기 위하여, NGF(nerve growth factor;신경성장인자) 레벨을 측정한 결과, 상심추출물을 투여시 NGF가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 4 참조).

[0025] 따라서, 본 발명의 상심 추출물은 수동회피실험 결과 유의적인 기억증진 효과를 나타내고, 신경전구세포 및 신경돌기의 유의적인 증가를 나타내며, NGF의 유의적인 증가를 나타내므로 인지기능장애 관련 질환의 예방 및 개선, 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0026]

[0027] 또한, 상심 추출물의 세포에서의 보호효과를 확인하기 위하여, 베타아밀로이드(Amyloid-β; Abeta) 유발 독성에 따라 세포 생존율을 측정한 결과, 상심 추출물을 투여하면 세포 생존율이 대조군에 비하여 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 5 및 도 6 참조).

[0028] 또한, 본 발명자들은 상심 추출물의 세포에서의 보호효과를 확인하기 위하여, ER 스트레스(Endoplasmic reticulum stress) 독성인 탑시가진(Thapsigargin)을 이용하여 세포 생존율을 측정한 결과, 탑시가진에 의하여 감소된 세포 생존율이 상심 추출물 동시처리에 의하여 보호되는 것을 확인하였다(도 9 참조)

[0029] 또한, 본 발명자들은 상심 추출물의 항-자가사멸(anti-apoptosis) 효과를 확인하기 위하여, 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential), ROS(reactive oxygen species), bcl-2 및 bax를 측정한 결과, 상심 추출물 전처리 군에서는 세포사멸 신호전달에 영향을 미치는 미토콘드리아 막전위 교란의 억제, 세포사멸을 촉진하는 ROS의 감소, 세포사멸을 유도하는 단백질인 bax의 감소 및 항-세포사멸 단백질인 bcl-2의 증가를 확인하였다(도 7 참조).

[0030] 아울러, 본 발명자들은 상심 추출물의 뉴런에 대한 보호효과를 확인하기 위해 MAP-2 양성세포수를 측정한 결과, Abeta에 의해 감소된 MAP-2 양성세포수가 상심 추출물 전처리에 의해 보호되는 것을 확인하였다(도 8 참조).

[0031] 따라서, 본 발명의 상심 추출물은 베타아밀로이드 및 탑시가진의 독성에 대한 세포를 보호하고, 항-자가사멸 효과가 있으며, 뉴런에 대한 보호효과를 가지므로 치매 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0032] 상기 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 상심 추출물을 0.1 내지 90 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0033] 상기 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0034] 상기 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 상기 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상심 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 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, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 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.

[0036] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 1 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 ㎎/kg으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0037] 또한, 본 발명은 상심 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0038] 상기 치매는 알츠하이머인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0039] 본 발명의 상심 추출물은 베타아밀로이드 및 탑시가진의 독성에 대한 세포를 보호하고, 항-자가사멸 효과가 있으며, 뉴런에 대한 보호효과를 가지므로 치매 예방 및 개선용 건강식품의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0040] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스켓, 떡, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0041] 본 발명의 상심 추출물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기

범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 상심 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 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, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0043] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(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. 그 밖에 본 발명의 추출물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0044] 이하, 본 발명은 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0045] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] **<실시예 1> 상심(학명:*Morus alba*) 추출물의 제조**

[0047] 정도약업사(서울)에서 구입한 상심에 100 g에 70% 에탄올 1000 mL를 가하여 24시간 동안 교반(stirring) 상태에서 침출시킨 후 왓트만 필터 종이 #2(Whatman filter paper #2)를 이용하여 여과시켰다. 여액을 50℃에서 감압농축(Rotavapor R-200, heating bath B-490, BUCHI; Flawil, 스위스)하여 얻은 시료를 동결건조하여 -20℃에서 보관하였으며, 실험시 용시조제하여 사용하였으며, 수득율은 20.53% 였다.

[0048] **<실험예 1> 상심의 단순인지 기능 향상 효과 확인**

[0049] **<1-1> 실험동물 준비**

[0050] 실험동물은 수컷 ICR 마우스(mice)(25 ~ 30 g, 오리엔트)를 사용하였다. 상심은 10% 디메틸 술폭시드(Dimethyl sulfoxide; DMSO)에 현탁 시킨 후 사용하였다. 약물은 모두 실험 당일에 조제하여 사용하였고, 표 1에 나타난 바와 같이 총 3개의 그룹으로 나누어 시행하였다. 각각의 그룹을 7일간 용매 및 시료를 경구투여 하였으며 6 및 7일째 되는 날에 각각 경구투여 1시간 후, 수동회피시험에서 트레이닝 트리이얼(training trial)과 어큐지션 트라이얼(acquisition trial)을 시행하였고, 8일째 리텐션 트리이얼(retention trial)을 시행하였다.

표 1

[0051]

군	p.o.
대조군	10% DMSO
ME-100 mg/kg	상심 100 mg/kg 을 포함하는 10% DMSO
ME-500 mg/kg	상심 500 mg/kg 을 포함하는 10% DMSO

[0052] **<1-2> 수동회피실험(Passive avoidance task)**

[0053] 트레이닝 트라이얼 및 테스트(test)는 두 개의 분리되고 독립적인 밝고 어두운 정사각형 상자에서 시행하였다. 밝은 구역(20 × 20 × 20 cm)은 50 W 백열전구로 조명하였다. 밝은 구역 및 어두운 구역(20 × 20 × 20 cm)은 1 cm 간격으로 떨어져 2 mm 스테인리스 스틸 봉(stainless steel rods)이 설치되었으며 구역의 길이만큼 펼쳐 놓았다. 상기 구역은 길로틴 문(guillotine door)(5×5 cm)로 분리하였다. 실험쥐는 처음 밝은 구역에

놓이고 구역 사이에 있는 문은 10초 후에 열린다. 실험쥐가 어두운 구역에 들어가면 문은 자동으로 닫히고, 스테인리스 스틸 봉을 통해 즉시 전기 충격(electrical foot shock)(0.3 mA)을 3초간 주었다(Acquisition trial). 어퀴지션 트라이얼을 시행하고 24시간 후, 실험쥐는 리텐셜 트라이얼을 측정하기 위해 밝은 구역에 놓았다. 시간은 어퀴지션 트라이얼 및 리텐셜 트라이얼 모두 실험쥐가 밝은 방에서 어두운 방으로 네 발이 모두 들어갔을 때까지 걸린 시간을 측정하였다. 실험쥐는 어퀴지션 트라이얼을 하기 1시간 전에 용매 및 상심 추출물을 경구투여 하였다.

[0054] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 상심 추출물을 100 및 500 mg/kg로 7일간 경구투여시 통계적으로 유의적인 기억 증진(memory enhancing) 효과가 나타나는 것을 확인하였다(도 1).

[0055] **<1-3> 면역조직화학염색**

[0056] 면역조직화학염색을 위하여 상기 실험예 <1-1> 실험동물을 1X PBS (phosphate buffer saline)로 심장관류 시키고 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시킨 후 뇌를 적출한 후, 같은 용액에 하루를 고정시키고 30% 스쿠로스(sucrose) 용액에 넣어 4℃에서 동결 절편하기 전까지 이틀에 한 번씩 용액을 갈아주면서 보관하였다. 그 후, 동결 절편기(cryostat)에서 뇌 조직을 -20℃에서 OCT(optimal cutting temperature) 화합물을 떨어뜨려 충분히 얼린 후, 30 ㎛ 두께의 절편으로 만들어 보존액에 넣어 4℃에서 보관하였다. 면역조직염색은 해마(hippocampus) 부분을 가지고 수행하였고, PBS로 세척한 조직을 1 % H_2O_2로 15분간 처리 후 비특이적 반응을 막기 위하여 0.05M PBS, 1.5 % 정상 염소 혈청(normal goat serum), 0.5 mg/ml 소 혈청 알부민(bovine serum albumin), 0.3 % 트리톤(triton) X-100과 일차 항체(goat anti-DCX primary antibody, 1:500)를 24시간 동안 4℃에서 반응시켰다. 일차 항체를 제거한 후, 조직을 페록시다아제(peroxidase)가 연결된 이차 항체(1:200)에 90분 동안 반응시킨 다음, ABC를 완충액에 희석하여 상온에서 약 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 3회 세척한 다음, 0.02 % DAB와 0.0 1 % H_2O_2로 발색시킨 것을 에탄올과 자일렌(xylene) 탈수과정을 거쳐 슬라이드 샘플을 만들었다.

[0057] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이 상심 100 및 500 mg/kg로 7일간 경구 투여시 신경전구세포(doublecortin; DCX)가 유의적으로 상승하였고, 신경돌기(neurite)도 유의적인 상승을 확인하였다. 따라서 상심의 장기투여시 단순 인지 기능 향상에 효과가 있음을 확인하였다(도 2 및 도 3).

[0058] **<1-4> NGF(nerve growth factor;신경성장인자) 레벨 측정**

[0059] 상심의 인지능력 개선효과를 확인하기 위해 NGF 레벨을 측정하였다. NGF 레벨을 측정하기 위하여 상기 실험예 <1-1>의 실험동물의 뇌를 적출한 후, 해마(hippocampus) 부분을 호모게네이션시켰다. Chemicon International(Temecula, CA, 미국)사에서 구입한 Chemikine™ NGF sandwich enzyme-linked immunosorbentassay(ELISA) 킷트를 이용하여 NGF 레벨을 측정하였다.

[0060] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 상심 100 및 500 mg/kg로 7일간 경구 투여시 NGF가 유의적으로 상승하는 것을 확인하였다. 따라서, 상심의 장기투여시 NGF 레벨 및 이에 따른 단순인지기능 향상에 효과가 있음을 확인하였다(도 4).

[0061] **<실험예 2> 시험관내(*in vitro*)상심 추출물의 항알츠하이머 효과 확인**

[0062] **<2-1> 대뇌피질(Cortical)에서의 세포보호 효과**

[0063] 베타아밀로이드(Amyloid-β; Abeta)의 축적에 의하여 생성되는 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)는 뇌에 축적되어 뇌신경세포를 죽이는 물질로 알려져 있으며, 알츠하이머 연구에 이용되는 물질이다. Abeta(25-35)를 인위적으로 집합(aggregate)시킨 물질을 이용하여 대뇌피질 세포에 대한 독성을 일으켜 상심 추출물의 세포보호효과를 MTT 에세이(assay)를 이용하여 측정하였다. 구체적으로, 먼저, 스프래그 다우리 랫트(Sprague-Dawley rats)(오리엔트 바이오, 서울)의 18일 된 태아에서 대뇌피질 부위만 분리한 뒤, 기계적으로 분해하여 세포를 획득한 후, 폴리-L-라이신(Poly-L-lysine)으로 미리 코팅한 96 웰 플라이트(well plate)에 1×10^4 /웰로 세포를 접종한 후 7일을 배양하였다. 그 후, 0.1% DMSO/B27 프리(free) 신경세포 기본배지(neurobasal media)에 상심

추출물을 0.1, 1, 10 또는 100 ㎍/mL로 처리 30 분 후, 베타아밀로이드(Abeta, 8 ㎍)를 처리 또는 비-처리하여 총 24시간 배양하고, 1mg/mL MTT처리 3시간 후, DMSO로 포르마잔(formazan)을 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0064] 그 결과, 도 5 및 도 6에 나타낸 바와 같이 대뇌피질 세포에서 상심 추출물 단독으로 0.1, 1, 10 또는 100 ㎍/mL의 농도로 처리하였을 때, 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 또한, Abeta 독성처리의 경우 세포 생존율은 대조군에 비하여 73.68±1.11%로 감소하였으며 상심 추출물 전처리 군의 경우 10 또는 100 ㎍/mL의 농도에서 세포보호효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 5 및 도 6).

[0065] **<2-2> 해마(hippocampal)에서의 세포보호 효과**

[0066] 상심 추출물의 세포보호 효과를 확인하기 위해, 스프래그 다우리 랫트(오리엔트 바이오, 서울)의 18일 된 태아에서 해마부위만 분리한 뒤, 기계적으로 분해하여 세포를 획득한 후, 폴리-L-라이신으로 미리 코팅한 96 웰 플라이트에 1×10^4 /웰로 세포를 접종한 후 7일을 배양하였다. 그 후, 0.1% DMSO/B27 프리 신경세포 기본배지에 상심 추출물을 0.1, 1, 10 또는 100 ㎍/mL로 처리 30 분 후, 베타아밀로이드(Abeta, 8 ㎍)를 처리 또는 비-처리하여 총 24시간 배양하고, 1mg/mL MTT처리 3시간 후, DMSO로 포르마잔을 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0067] 그 결과, 해마 세포에서 상심 추출물 단독으로 0.1, 1, 10 또는 100 ㎍/mL의 농도로 처리하였을 때 1, 10 또는 100 ㎍/mL 농도에서 세포 생존율이 대조군에 비하여 증가한 것을 확인하였다. 또한 Abeta는 대조군에 비하여 52.97±0.97% 해마 세포의 생존을 억제하였으며, 상심 추출물 0.1, 1, 10 또는 100 ㎍/mL의 농도 전처리에서 통계적으로 유의한 보호 효과를 확인하였다.

[0068] **<2-3> 상심 추출물의 항-자가사멸(anti-apoptosis) 효과**

[0069] 상심 추출물의 항-자가사멸 효과를 확인하기 위하여, 해마세포를 PLL코팅한 60 mm 접시에 접종한 후 7일을 배양하고, 0.1% DMSO/B27 프리 신경세포 기본배지에 10 ㎍/mL의 상심 추출물을 30분간 처리한 후, Abeta(8 ㎍)를 처리하여 총 18시간 배양하고 난 뒤, 미토콘드리아의 특이적으로 염색되는 JC-1을 이용하여 빨강 파장과 녹색 파장의 형광을 측정하여 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential)를 관찰하였다.

[0070] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 세포사멸 신호전달에 영향을 미치는 미토콘드리아 막전위가 상심 추출물 전처리에 의하여 유지되는 것을 확인하였다(도 7).

[0071] **<2-4> 상심 추출물의 항-자가사멸(anti-apoptosis) 효과**

[0072] 상심 추출물의 항-자가사멸 효과를 확인하기 위하여, 해마세포를 PLL코팅한 60 mm 접시에 접종한 후 7일을 배양하고, 0.1% DMSO/B27 프리 신경세포 기본배지에 10 ㎍/mL의 상심 추출물을 30분간 처리한 후, Abeta(8 ㎍)를 처리하여 총 18시간 배양하고 난 뒤, 세포를 모아 미토콘드리아(mitochondrial)와 시티졸(cytosol)로 나눠 단백질을 뽑아 항체를 이용하여 변화를 관찰하였다.

[0073] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 세포사멸 신호전달에 영향을 미치는 미토콘드리아 막전위가 상심 추출물 전처리에 의하여 유지됨으로써, 이로 인해 시토크롬 C(cytochrome C)의 시토졸내의 농도가 Abeta군에 비하여 상심 추출물 전처리 군에서 낮은 것을 확인하였다(도 7).

[0074] **<2-5> 상심 추출물의 항-자가사멸(anti-apoptosis) 효과**

[0075] 상심 추출물의 항-자가사멸 효과를 확인하기 위하여, 해마세포를 DCF-DA 형광 염료(dye)를 이용하여, 약물 및 독성 처리한 후 생성되는 ROS(reactive oxygen species)의 양, bcl-2 및 bax를 측정하였다.

[0076] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 대조군과 비교하여 Abeta를 처리하였을때, 세포사멸(apoptosis)을 촉진하는 ROS의 증가, 항-세포사멸 단백질(anti-apoptosis protein)인 bcl-2의 감소 및 세포사멸 유도 단백질(pro-atpotosis protein)인 bax가 증가하는 것을 확인한 반면, 상심 추출물을 전처리한 경우에는 ROS 생성 감소,

bcl-2의 증가 및 bax의 감소를 확인하였다(도 7).

[0077] **<2-6> 상심 추출물의 항-자가사멸(anti-apoptosis) 효과**

[0078] 상심 추출물의 항-자가사멸 효과를 확인하기 위하여, 해마세포를 PLL코팅한 60 mm 접시에 접종한 후 7일을 배양하고 0.1% DMSO/B27 프리 신경세포 기본배지에 10 ㎍/mL의 상심 추출물을 30분간 처리한 후, Abeta(8 ㎍)를 처리하여 총 24시간 배양하고 난 뒤, 세포를 모아 캐스파제-3 활성(caspase-3 activity) 및 클리브지 캐스파제-3 폼(cleavaged caspase-3 form)을 각각 킷트(Bio Vision, 미국) 및 웨스턴블랏을 이용하여 확인하였다.

[0079] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 상심 추출물의 전처리에 의하여 세포사멸에 관여하는 캐스파제-3 활성(caspase-3 activity) 및 클리브지 캐스파제-3 폼(cleavaged caspase-3 form)의 생성이 감소하는 것을 확인함으로써, 상심 추출물의 항-자가사멸 효과를 확인하였다(도 7).

[0080]

[0081] **<2-7> MAP-2 양성세포수 확인**

[0082] 신경단위 표지(Neuronal marker)인 MAP-2 항체를 이용하여, 뉴런에 대한 보호효과를 측정하기 위해, 해마 세포를 PLL코팅한 24 웰에 접종한 후 7일을 배양하고, 0.1% DMSO/B27 프리신경세포 기본배지에 10 ㎍/mL의 상심 추출물을 30분간 처리한 후, Abeta(8 ㎍)를 처리하여 총 24시간 배양하였다. 반응이 끝난 후 고정 및, MAP-2 항체(antibody)를 이용하여 염색하였으며 양성세포수를 세어 대조군과 비교하였다.

[0083] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 Abeta에 의해 유의하게 감소한 MAP-2 양성세포수가 상심 추출물 전처리에 의하여 보호된 것을 확인하였다(도 8).

[0084] **<2-8> 탑시가진(Thapsigargin)에 대한 효과**

[0085] ER 스트레스(Endoplasmic reticulum stress) 독성인 탑시가진을 이용하여 세포 생존율을 확인하기 위해, 해마세포를 PLL코팅한 96 웰 플라이트에 1×10^4 /웰로 접종한 후 7일을 배양하고, 0.1% DMSO/B27 프리 신경세포 기본배지에 상심 추출물을 0.1, 1, 10 또는 100 ㎍/mL로 처리한 후, 탑시가진(25 nM)를 처리 또는 비처리하여 총 48시간 배양하였다. 1 mg/mL MTT처리 3시간 후, DMSO로 포르마잔을 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0086] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 탑시가진에 의하여 감소된 세포 생존율은 상심 추출물을 동시처리에 의하여 보호되는 것을 확인하였다(도 9).

[0087] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0088] **<1-1> 산제의 제조**

[0089]	본 발명의 상심 추출물	2 g
[0090]	유당	1 g

[0091] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0092] **<1-2> 정제의 제조**

[0093]	본 발명의 상심 추출물	100 mg
[0094]	옥수수전분	100 mg
[0095]	유 당	100 mg
[0096]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0097] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0098] **<1-3> 캡슐제의 제조**

[0099] 본 발명의 상심 추출물 100 mg

[0100] 옥수수전분 100 mg

[0101] 유 당 100 mg

[0102] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0103] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0104] **<1-4> 환의 제조**

[0105] 본 발명의 상심 추출물 1 g

[0106] 유당 1.5 g

[0107] 글리세린 1 g

[0108] 자일리톨 0.5 g

[0109] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0110] **<1-5> 과립의 제조**

[0111] 본 발명의 상심 추출물 150 mg

[0112] 대두 추출물 50 mg

[0113] 포도당 200 mg

[0114] 전분 600 mg

[0115] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0116] **<제조예 2> 식품의 제조**

[0117] 본 발명의 상심 추출물을 포함하는 식품들은 다음과 같이 제조하였다.

[0118] **<2-1> 밀가루 식품의 제조**

[0119] 본 발명의 상심 추출물 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0120] **<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0121] 본 발명의 상심 추출물 0.1 ~ 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0122] **<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조**

[0123] 본 발명의 상심 추출물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0124] **<2-4> 유제품(dairy products)의 제조**

[0125] 본 발명의 상심 추출물 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0126] **<2-5> 선식의 제조**

[0127] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0128] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0129] 본 발명의 상심 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0130] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 상심 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다:

[0131] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0132] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0133] 본 발명의 상심 추출물(3 중량부),

[0134] 영지(0.5 중량부), 및

[0135] 지황(0.5 중량부).

[0136] **<제조예 3> 음료의 제조**

[0137] **<3-1> 건강음료의 제조**

[0138] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 상심 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0139] **<3-2> 야채 주스의 제조**

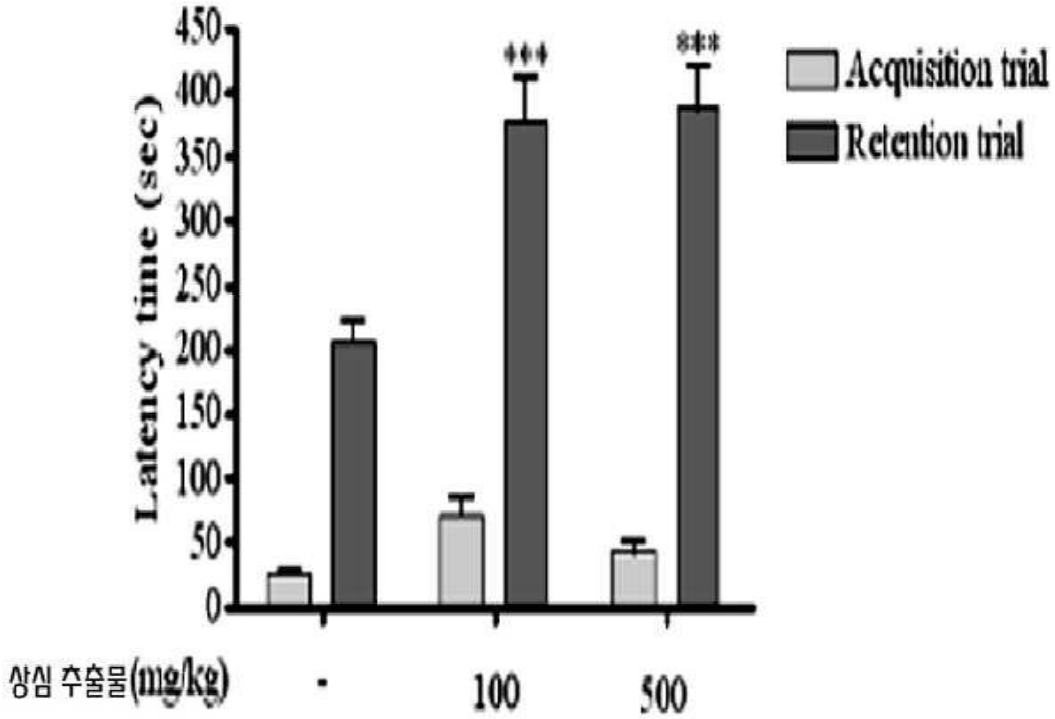
[0140] 본 발명의 상심 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ㎖에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0141] **<3-3> 과일 주스의 제조**

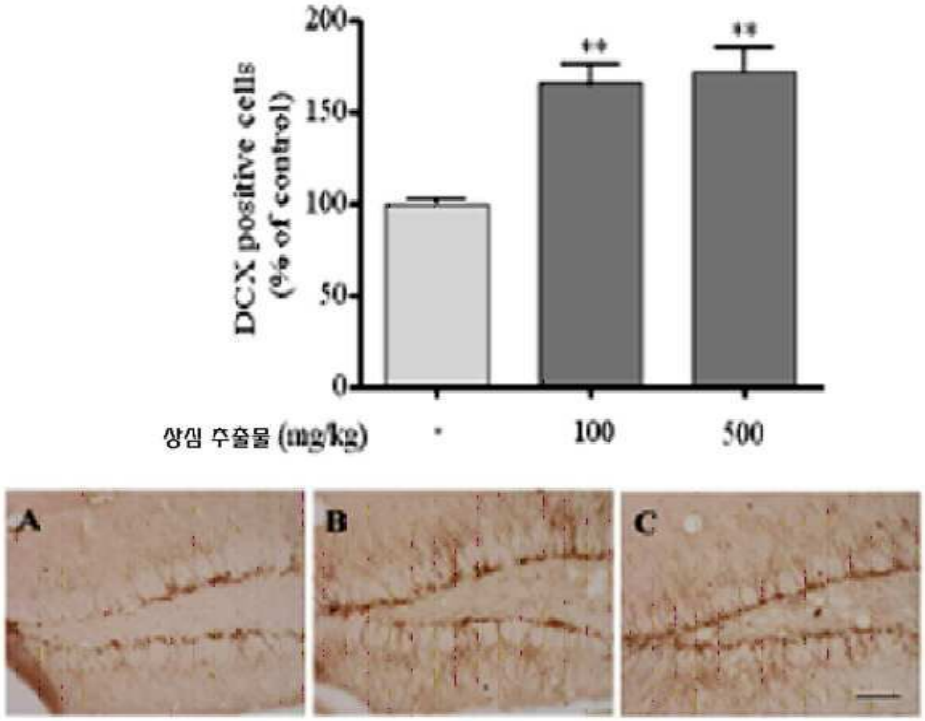
[0142] 본 발명의 상심 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ㎖ 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

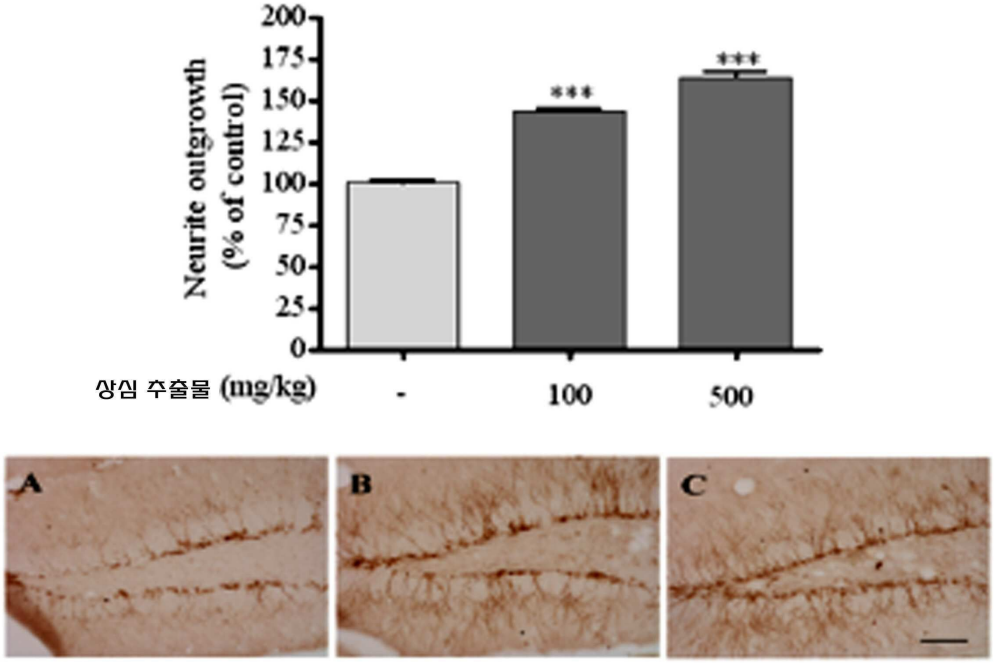
도면1


Latency time (sec)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
***
***
Acquisition trial
Retention trial
상심 추출물(mg/kg)
-
100
500

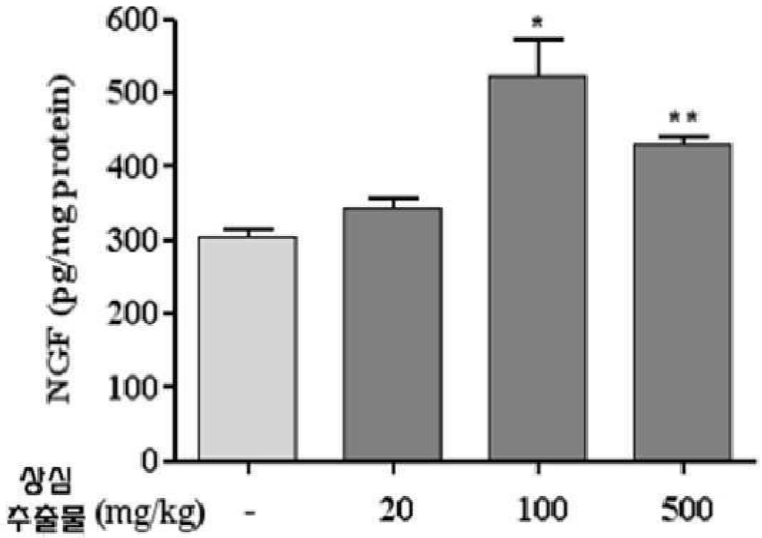
도면2


DCX positive cells
(% of control)
200
150
100
50
0
**
**
상심 추출물 (mg/kg)
-
100
500
A
B
C

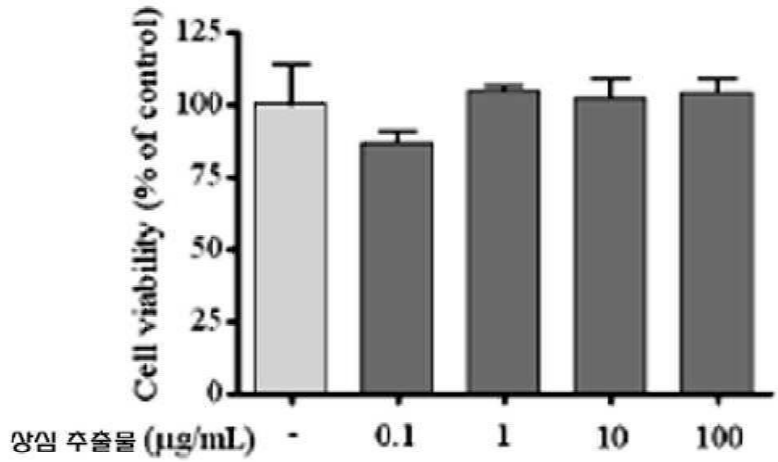
도면3


Neurite outgrowth
(% of control)
200
175
150
125
100
75
50
25
0
***
***
상심 추출물 (mg/kg)
-
100
500
A
B
C

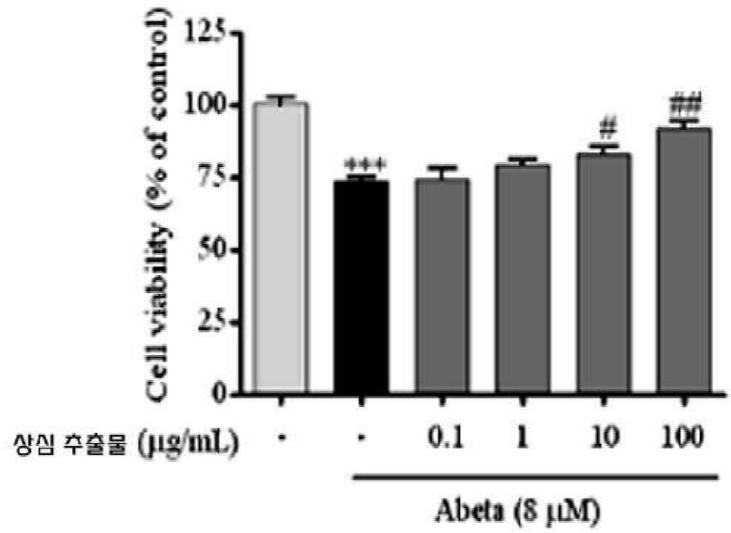
도면4


NGF (pg/mg protein)
600
500
400
300
200
100
0
*
**
상심
추출물 (mg/kg)
-
20
100
500

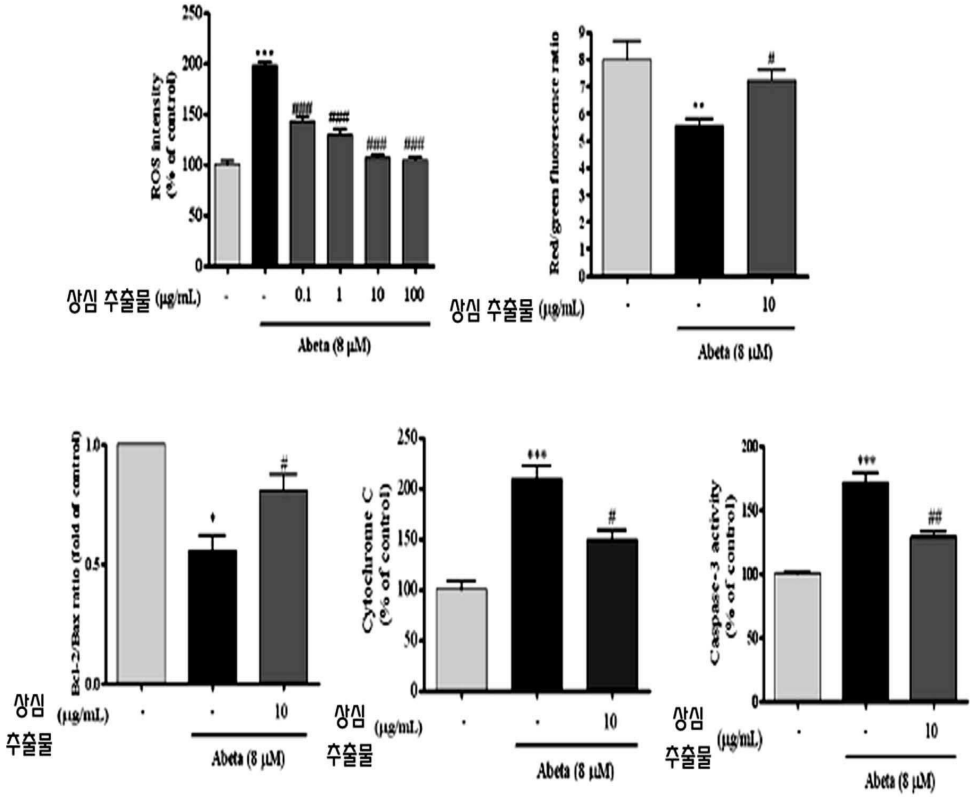
도면5


Cell viability (% of control)
125
100
75
50
25
0
상심 추출물 (μg/mL)
-
0.1
1
10
100

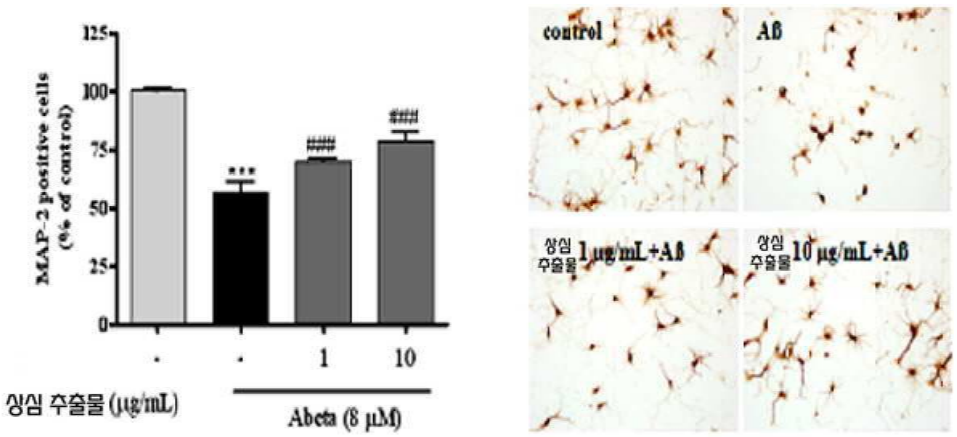
도면6


Cell viability (% of control)
125
100
75
50
25
0
+++
#
##
상심 추출물 (μg/mL)
-
-
0.1
1
10
100
Abeta (8 μM)

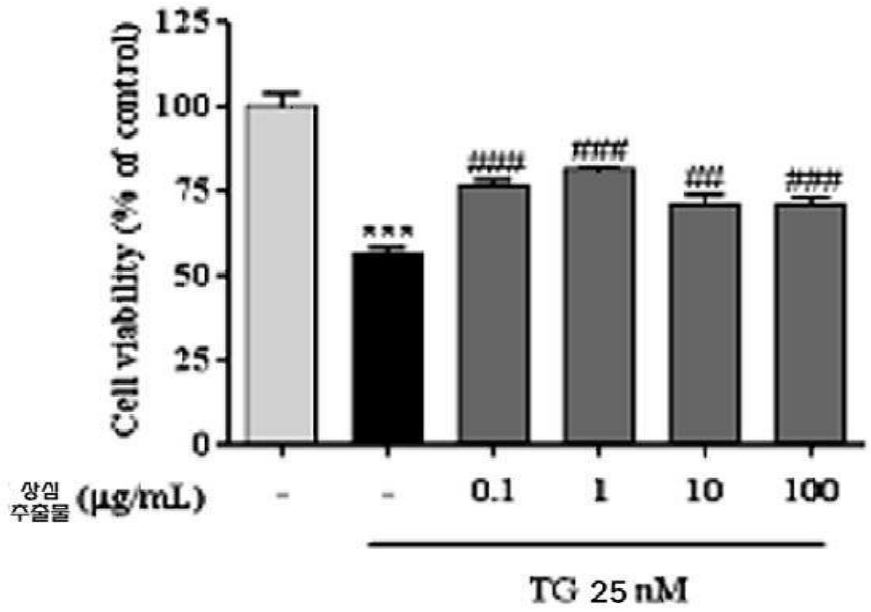
도면7


ROS intensity (% of control)
상심 추출물 (μg/mL)
Abeta (8 μM)
Red/green fluorescence ratio
Bcl-2/Bax ratio (fold of control)
Cytochrome C (% of control)
Caspase-3 activity (% of control)

도면8


MAP-2 positive cells (% of control)
상심 추출물 (μg/mL)
Abeta (8 μM)
control
Aß
상심 추출물 1 μg/mL+Aß
상심 추출물 10 μg/mL+Aß

도면9


Cell viability (% of control)
125
100
75
50
25
0
***
#####
####
###
####
상심 주출물 (μg/mL)
-
-
0.1
1
10
100
TG 25 nM