(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0094065
(43) 공개일자 2013년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0015418
(22) 출원일자 2012년02월15일
심사청구일자 2012년02월15일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
김호철
서울특별시 동대문구 이문2동 삼성래미안 1차 204동 1103호
이성현
경기도 남양주시 퇴계원면 성원아파트 103동 1303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

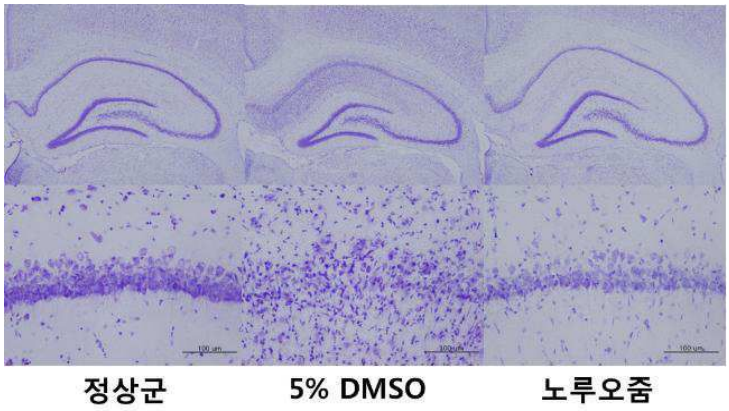
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **노루오줌 추출물을 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 노루오줌 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 노루오줌 추출물은 뇌신경세포 보호효과를 가지며, 따라서 다양한 퇴행성 뇌질환을 예방 및/또는 치료하는 작용효과를 나타낸다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이호연

서울특별시 동대문구 휘경동 191-11 203호

박주연

경기도 남양주시 진건읍 용정리 369-1 금강아파트 103동 1202호

김범정

서울특별시 동대문구 회기동 77-13호 2통 3반

송정빈

서울특별시 성동구 왕십리2동 966-32

박상욱

서울특별시 동대문구 회기동 3-160 A동 3층 11호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S111010L040100

부처명 산림청

연구사업명 산림과학기술개발사업

연구과제명 한의학적 산림치유 개념 정립을 통한 한국형 산림치유 컨텐츠, 프로그램 개발 및 임상효과 규명

주관기관 경희대학교

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

노루오줌(*Astilbe chinesis*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

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

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 노루오줌 추출물은 노루오줌 뿌리로부터 추출된 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 노루오줌 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로부터 선택되는 추출용매로 추출된 약학적 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 노루오줌 추출물을 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 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 등에 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 과

도한 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 조직플라즈미노겐 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 및 예방 효과를 갖는 천연물질은 개발하고자 하는 노력이 시급히 요구되고 있다.

[0011] 노루오줌(Astilbe chinesis)은 장미목 범의귀과에 속하는 식물로서 한국, 일본, 만주, 중국, 아무르, 우술리에 분포하며, 높이는 30~70 cm이고, 긴 갈색털이 있으며, 근경은 굵고 옆으로 짧게 뻗는다. 꽃은 7, 8월에 피고 홍자색이며, 원추화서는 원줄기 끝에 달리고 길이 30 cm 정도로서 많은 꽃이 달리며 짧은 털이 있는 것을 특징으로 한다. 노루오줌의 다른 이름으로는 금모삼칠(金毛三七), 홍승마(紅升麻), 호마(虎麻), 홍두우(紅頭牛)라고 불리기도 하며, 한방에서는 뿌리 이외의 부분을 소승마, 뿌리 부분을 적승마라 하여 약재로 사용한다.

[0012] 지상부의 전초에는 청산이 들어 있고 꽃에는 쿼세틴이 들어 있다. 일반적으로 노루오줌 속 식물에는 2-하이드록시페닐아세트산이 함유되어 있고 트리테르펜산인 아스틸브산, 플라보노이드인 아스틸빈 등이 들어 있다고 알려져 있다.

[0013] 이러한 노루오줌은 혈액순환을 좋게 하고, 어혈(瘀血)을 풀어주며, 열을 내리고, 독을 풀어주며, 경련을 멎게 하고, 통증을 억제하는 효능이 있어서 과로로 오는 병, 근육과 뼈마디가 시리고 아픈 증상, 타박상, 관절통, 수술후 통증, 뱀에게 물린 독을 푸는데 사용된다(한국의 약용식물, 교학사, 2000, p204, 배기환 저).

[0014] 그러나 노루오줌 추출물의 뇌신경세포 보호작용에 대한 연구는 보고된 바가 없으며, 특히 동물모델을 이용한 신경보호 작용에 대한 연구는 알려져 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 노루오줌 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 목적은 노루오줌 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 노루오줌 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 퇴행성 뇌질환으로는 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴 무도병, 피크(Pick)병, 및 크로이펠츠-야콥(Creutzfeld-Jacob)병으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0019] 상기 노루오줌은 노루오줌 전체를 사용하거나 꽃, 열매, 잎, 줄기 및/또는 뿌리로 이루어진 일부를 사용할 수

있으며, 뿌리가 바람직하다.

[0020] 상기 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출할 수 있으며, 상기 알코올은 C1 ~ C4의 저급 알코올인 것이 바람직하다.

[0021] 또한, 본 발명은 노루오줌 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 노루오줌 추출물은 뇌신경세포보호 효과를 가짐으로써, 퇴행성 뇌질환을 개선, 예방 또는 치료하는 작용효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 4-혈관폐색모델에서 랫트의 정상군, 5% DMSO를 투여한 대조군 및 본 발명의 노루오줌 추출물을 투여한 실험군의 뇌조직 절편을 크레실 바이올렛(cresyl violet) 염색법으로 관찰한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2는 4-혈관폐색모델에서 정상군, 대조군 및 실험군에서의 정상 뇌세포 수를 비교한 그래프이다.

도 3은 광화학적 색전 마우스 모델에서 마우스에 5% DMSO를 투여한 대조군, 및 본 발명의 노루오줌 추출물을 투여한 실험군의 뇌조직 절편을 TTC 염색법으로 관찰한 결과를 나타내는 사진이다.

도 4는 광화학적 색전 마우스 모델에서 대조군 및 실험군에서의 뇌조직 손상율(뇌경색비율)을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명은 노루오줌 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0026] **노루오줌 추출물의 제조방법**

[0027] 상기 노루오줌 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0028] (1) 노루오줌을 건조 후 파쇄하는 단계;

[0029] (2) 파쇄된 노루오줌에 추출용매를 가하여 추출물을 추출하는 단계;

[0030] (3) 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및

[0031] (4) 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.

[0032] 상기 단계 (1)에 사용되는 노루오줌은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 또한, 상기 노루오줌은 노루오줌 전체를 사용하거나 꽃, 열매, 잎, 줄기, 및/또는 뿌리로 이루어진 일부를 사용할 수 있으며, 뿌리가 가장 바람직하다.

[0033] 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 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하다.

[0034] 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 노루오줌의 5 내지 15배 중량 또는 부피의 추출용매를 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 10배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다.

[0035] 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 않는

다.

[0036] **약학적 조성물**

[0037] 상기의 제조방법으로 얻어진 노루오줌 추출물은 4-혈관폐색모델(4-VO) 및 광화학적 색전 마우스 모델(PTB)를 통하여 뇌허혈에 의한 신경세포 손상에 대하여 뇌신경세포 보호효과가 우수함이 확인되었다.

[0038] 이에 본 발명은 뇌신경세포 보호효과를 가지는 노루오줌 추출물을 유효성분으로 포함함으로써, 신경세포사에 의하여 유발되는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0039] 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴 무도병, 피크(Pick)병, 및 크로이펠츠-야콥(Creutzfeld-Jacob)병으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0040] 본 발명의 노루오줌 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0041] 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.

[0042] 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.

[0043] 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.

[0044] 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.

[0045] 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 0.0001 내지 100 ㎎/㎏으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량의 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 조성물은 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0047] 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 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0048] **<실시예> 노루오줌(*Astilbe chinensis*) 추출물의 제조**

[0049] 경기도 포천에서 채집한 1년생 노루오줌의 뿌리 100g을 세절하여 1ℓ의 70% 에탄올 수용액에 침지하여 80℃에서 3시간 동안 1번 진탕 추출한 후 여과지에 여과하였다. 상기 추출액을 진공감압농축기를 이용하여 감압 하에 농축함으로써 건조한 노루오줌 추출물 6.44g을 제조하였다.

[0050] **<실험예 1> 4-혈관폐색모델(4-VO)에서 노루오줌 추출물의 뇌신경세포 보호효과 확인**

[0051] 뇌허혈에 의한 신경세포 손상에 대한 노루오줌 추출물의 신경세포 보호효과를 측정하기 위하여, 1979년 펄시넬

리(Pulsinelli)가 개발한 4-혈관폐색(4-Vessel Occlusion) 모델을 사용하였다(Pulsinelli WA, Brierley JB, *Stroke.*, 10, 267-272, 1979)

[0052] 실험동물로 170g 내외의 5주령의 위스터계(Wistar, 샘타코, 대한민국) 수컷 랫트를 구입하여 사료와 물을 충분히 공급하면서 실험환경에 적응하도록 하였다. 1주일 정도의 적응기간을 준 후, 본 실험을 수행하였다.

[0053] 상기 랫트를 질소와 산소의 혼합가스(질소 70%, 산소 30%)에 포함된 5% 이소플루란(isoflurane)으로 마취시킨 다음 정위고정장치(stereotaxic apparatus)에 수평면으로 머리를 기준으로 하여 꼬리를 아래로 약 30 ° 경사지게 고정시켰다. 코와 입 주위는 플라스틱 원추흡입기(cone)로 마취기에 연결하고 1.5% 이소플루란으로 마취상태를 유지시켰다.

[0054] 꼬리를 수술대에 고정하고 경추를 신전시킨 상태로 실험하였다. 먼저 랫트의 목 정중선 절개를 하여 후두골 하단의 1번 경추부를 수술확대경을 이용하여 근육이 다치지 않게 주의하면서, 1 ㎜ 이하의 미세한 전기소작침을 1번 경추의 우상공(alar foramina)을 통하여 밑으로 척추동맥이 통과하고 있는 터널로 집어넣어, 간헐적인 전류를 통전시켜 척추동맥을 소작하였다. 수술 현미경을 이용하여 뼈 속으로 지나가는 터널에 존재하는 척추동맥이 완전히 소작되어서 폐쇄되었다는 것을 확인한 다음 수술용 클립으로 봉합하였다.

[0055] 그 후, 인후(咽喉)부위를 수술하기 위하여 총경동맥에 봉합사로 고리를 만들어 허혈을 유발하고 재관류할 수 있도록 장치하였다. 그리고 허혈 유발시 미세혈관의 순환을 봉쇄하기 위하여 실로 뒤쪽으로는 기관(氣管, trachea), 식도(esophagus), 외부 경정맥(external jugular vein), 총경동맥(common carotid arteries)들이 위치하도록 앞쪽으로는 경부(cervical), 척추주위(paravertebral) 근육들이 지나가도록 꿰뚫은 다음 수술용 클립으로 상처를 봉합하였다

[0056] 봉합 후 24시간이 지난 다음 수술용 클립을 제거한 다음 총경동맥을 동맥류(動脈瘤, aneurysm) 클립으로 10분 동안 조여서 허혈을 유발하였다. 만약 1분 이내에 대광반사(對光反射, 눈에 빛을 비추었을 때의 반사작용)가 소실되지 않으면 경부봉합을 단단하게 하였고, 이때 대광반사가 소실되지 않은 랫트들은 완전한 양측 평행적인 해마의 CA1 신경손상이 유발되지 않았기 때문에 제외시켰고, 경련을 일으키는 랫트들도 제외시켰다. 허혈 유발 10분 후 총경동맥에서 동맥류 클립을 떼어내어 허혈을 중지시키고 재관류시켰다. 재관류 직후와 90분 후 각각 <실시예>에서 제조한 노루오줌 추출물을 100 mg/kg의 농도로 각각 랫트 체중 10 g당 0.1 ㎖씩의 부피로 5% DMSO 으로 희석하여 복강 내 주사하였으며, 대조군은 같은 부피의 5% DMSO를 투여하였다.

[0057] 허혈 유발 1주일 후에 랫트를 우레탄 1.2 g/kg를 복강 내 투여하여 마취시켜 개흉한 다음, 심장 우심방을 절개하여 좌심실에 바늘을 주입한 후 헤파린 처리한 5.0 % 질산나트륨 생리식염수를 10분 동안 심장에 관류시키고, 4.0 % 포르말린 고정액으로 관류시켰다. 그 후 랫트의 뇌를 떼어내어 2시간 동안 0.1 M 인산으로 완충된 포르말린 고정액에 후-고정시킨 다음, 30 % 수크로오즈 용액에 담가 하룻밤 동안 방치하였다. 고정된 뇌에서 정수리점(bregma) -2.5 ㎜ 와 -4.0 ㎜ 사이의 등쪽 해마(dorsal hippocampus) 부위에 있는 관상조각(coronal block)을 절개하고 -70 ℃에서 동결한 후 슬라이딩 마이크로톰을 이용하여 30 ㎛ 간격으로 절단하여 해마를 포함하는 조직 절편을 제조하였다.

[0058] 상기의 방법으로 제조된 절편을 크레실 바이올렛(cresyl violet)에 염색하여 고정한 다음 등쪽 해마 CA1 중 지연성 신경원세포 사망(delayed neuronal death)에 의해 가장 손상되기 쉬운 부분인(Crain BJ et al., *Neuroscience*, 27, 387-402, 1988) 중간대(middle zone) 1,000 ㎛ 부분 내에 존재하는 손상된 신경세포 수를 관찰하였다. 세포 수의 관찰은 고배율(×400)에서 정상적인 형태를 보이는 추체세포(pyramidal cell)의 수를 3인의 관찰자가 한 개의 뇌조직에서 3개의 다른 조직 절편의 좌우양측 2개, 총 6 부위에서 관찰한 값을 평균하였다.

[0059] 정상군으로는 뇌허혈을 유발하지 않은 랫트의 뇌 해마 조직을, 대조군으로는 5% DMSO를 투여한 랫트의 뇌 해마 조직을, 실험군으로는 본 발명의 노루오줌 추출물을 투여한 랫트의 뇌 해마 조직을 사용하였다.

[0060] 실험결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 대조군의 경우 정상군과 다르게 조직이 이완되면서 세포들이 주변 세포로부터 유리되는 현상을 관찰할 수 있었으며, 세포체(cell body) 역시 본래의 추체상(pyramidal) 형태를 잃고 응축되어 단일 세포의 형태로 되어있음을 확인할 수 있었다. 또한, 핵 염색질이 농축되고 핵막이 붕괴하는 현상이 관찰됨으로써 세포사멸(apoptosis)이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

[0061] 반면, 본 발명의 노루오줌 추출물 100 ㎎/㎏을 복강투여한 실험군은 정상군의 신경세포와 유사한 형태를 나타내었으며, 잘 뻗어나가는 핵주위질(perikaryon)과 중앙에 위치하는 둥근 핵으로 인하여 쉽게 구별되었다. 또한, 대다수의 세포들이 세포사멸로부터 방어되어 정상적인 추체 형태를 이루었으며, 주변세포들과의 연결(junctio

n)을 계속하여 유지하고 있음을 확인하였다.

[0062] 또한, 도 2의 그래프에서 보는 바와 같이, 정상군의 가로×세로 1 ㎟ 당 세포수 평균이 378.00±4.15 세포수/㎟이었으나, 대조군은 74.00±5.96 세포수/㎟으로 나타나 신경세포 사멸이 많이 일어났음을 확인할 수 있었다. 반면, 본 발명의 노루오줌 추출물 100 ㎎/㎏을 투여한 실험군에서는 세포수 평균이 190.00±62.26 세포수/㎟로 대조군에 비하여 38.16%의 우수한 신경세포 보호효과를 나타냄을 확인하였다.

[0063] **<실험예 2> 광화학적 색전 마우스 모델(PTB)에서 노루오줌 추출물의 뇌신경세포 보호효과 확인**

[0064] 국소 뇌허혈에 의한 신경세포 손상에 대한 노루오줌 추출물의 신경세포 보호효과를 측정하기 위하여 응용된 광화학적 색전 모델을 사용하였다(Lee, et al., *Surgical Neurology*, 67: 620-625, 2007).

[0065] 실험동물로 22g 내외의 8주령 C57BL/6(샘타코, 대한민국) 수컷 마우스를 구입하여 사료와 물을 충분히 공급하면서 실험환경에 적응하도록 하였다. 1주일 정도의 적응기간을 준 후, 본 실험을 수행하였다.

[0066] 마우스에 450 mg/kg의 chloral hydrate를 복강 주사하여 마취시킨 후, 정위 두부 고정장치(SG-4N, Narishige, Tokyo, Japan)에 두개골을 고정한다. 병변을 만들 부위의 두피를 1.5 cm 정도 절개하고 골막을 분리하여 두개골을 노출한 후, 직경 4 ㎜의 광섬유 광원(CL 6000 LED; Carl Zeiss, Gottingen, Germany)의 중심을 전정(bregma)의 측방 2 ㎜ 지점에 유성펜으로 표시해둔다. 염료 중 하나인 rose bengal(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 10 mg/ml의 농도로 마우스 당 0.1 ml을 복강주사하였다. 5분 후 발광체(illuminator)를 두개골에 밀착하여 열 발생이 없는 LED 광원을 사용하여 15분 동안 조사하였다. 유발 직후 상기 <실시예>에서 제조한 노루오줌 추출물을 200 mg/kg 의 농도로 각각 마우스 체중 10 g당 0.1 ㎖씩의 부피로 5% DMSO 으로 희석하여 복강 내 주사하였으며, 대조군은 같은 부피의 5% DMSO를 투여하였다. 피부절개부위를 다시 봉합한 후 자연 회복시킨다. 유발 후 24시간 후에 마우스를 희생시켜, 2분 이내에 뇌를 적출한 다음 2 ㎜ 두께로 5개의 절편을 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 뇌조직은 디지털 카메라로 하나씩 촬영한 후 그 이미지를 컴퓨터로 옮겼고, 이미지 분석프로그램(Axiovision Rel. 4.7)을 이용하여 뇌경색 부피를 측정하였다.

[0067] 노루오줌 추출물의 뇌조직 및 뇌신경세포 보호 효과를 측정한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군에 비하여 본 발명의 노루오줌 추출물을 투여한 실험군은 TTC로 염색 되지 않은 부위의 면적이 적었고, TTC로 염색된 흑적색 부위의 면적이 넓은 것을 알 수 있었다. 참고로, TTC로 뇌조직을 염색하면 손상으로 인하여 조직이 사멸한 부위는 염색이 되지 않아 흰색으로 나타나며, 정상 부위의 조직은 염색이 되어 흑적색으로 나타난다.

[0068] 또한, 도 4의 그래프에서 보는 바와 같이, 5% DMSO를 투여한 대조군은 뇌경색 부피가 60.49±3.77 ㎣로 나타났고, 노루오줌 추출물 200 mg/kg 투여한 실험군에서는 40.27±2.68 ㎣로 나타났다. 대조군에 비하여 실험군의 뇌경색 부피가 33.4 % 더 낮았으며, 이로써 노루오줌 추출물의 우수한 신경세포 보호효과를 확인하였다.

[0069] **<제조예 > 약학적 제제의 제조**

[0070] 1. 산제의 제조

[0071] <실시예>의 노루오줌 추출물 300mg

[0072] 유당 100mg

[0073] 탈크 10mg

[0074] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0075] 2. 정제의 제조

[0076] <실시예>의 노루오줌 추출물 50mg

[0077] 옥수수전분 100mg

[0078] 유당 100mg

[0079] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0080] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0081] 3. 캡슐제의 제조

[0082] <실시예>의 노루오줌 추출물 50mg

[0083] 옥수수전분 100mg

[0084] 유당 100mg

[0085] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0086] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 정제를 제조한다.

[0087] 4. 주사제의 제조

[0088] <실시예>의 노루오줌 추출물 50mg

[0089] 주사용 멸균 증류수 적량

[0090] pH 조절제 적량

[0091] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0092] 5. 액제의 제조

[0093] <실시예>의 노루오줌 추출물 1,000mg

[0094] 설탕 20g

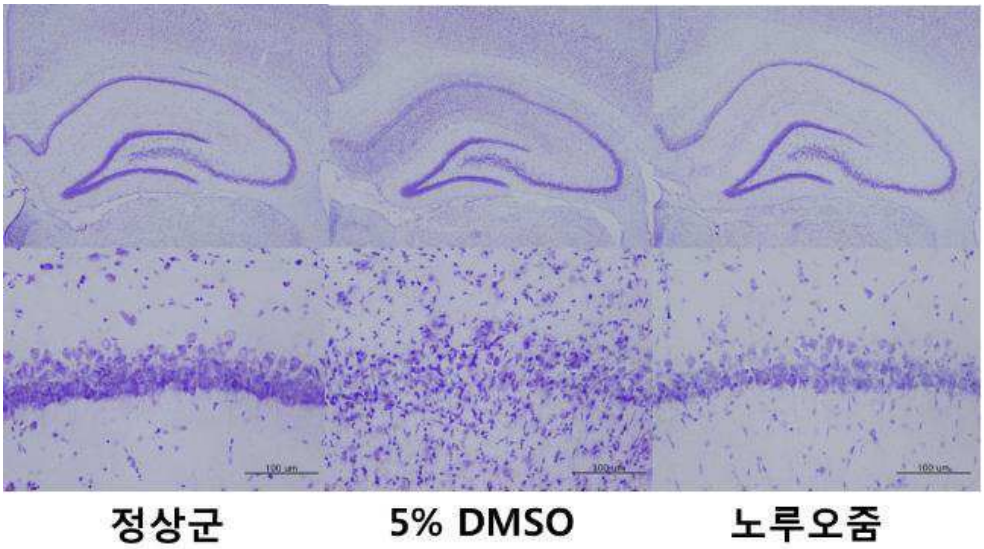
[0095] 이성화당 20g

[0096] 레몬향 적량

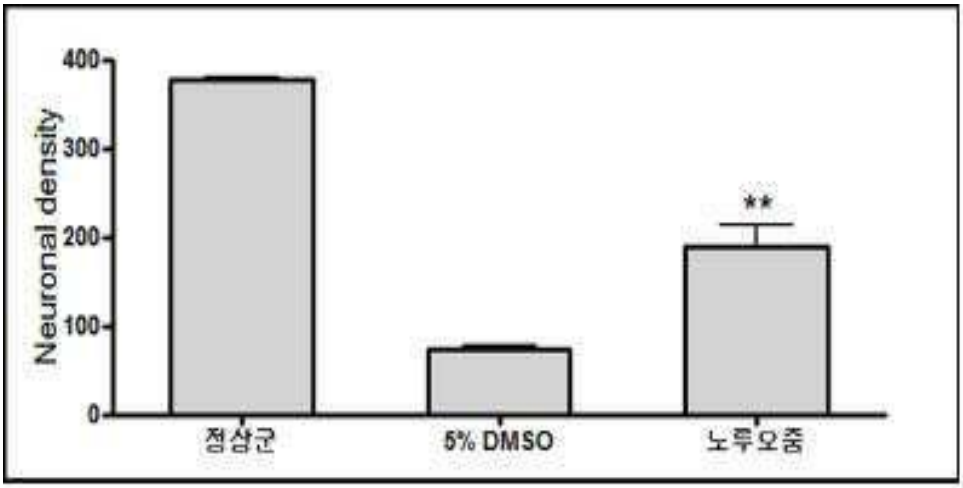
[0097] 정제수를 가하여 전체 1,00ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

도면

도면1


정상군
5% DMSO
노루오줌

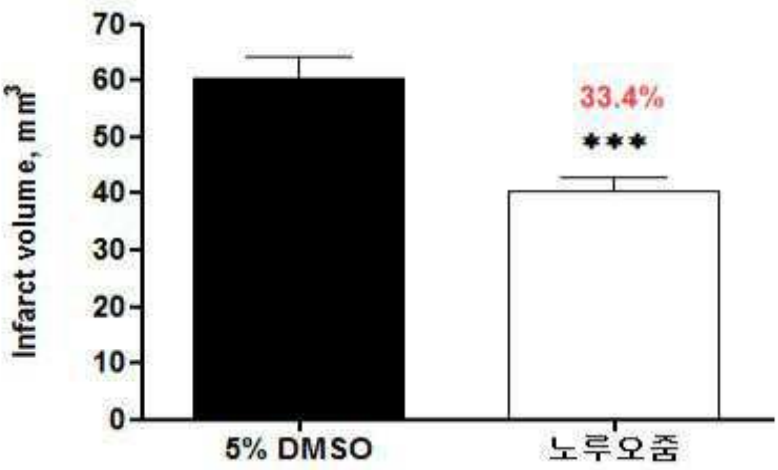
도면2


Neuronal density
400
300
200
100
0
**
정상군
5% DMSO
노루오줌

도면3


5% DMSO
노루오줌
200 mg/kg

도면4


Infarct volume, mm3
70
60
50
40
30
20
10
0
33.4%
***
5% DMSO
노루오줌