(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0017388
(43) 공개일자 2017년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/79 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/79 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0111231
(22) 출원일자 2015년08월06일
심사청구일자 2016년06월01일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
조익현
서울특별시 서초구 신반포로 32, 19-509
김은정
서울특별시 동대문구 천장산로7길 10-14, 305호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 8 항

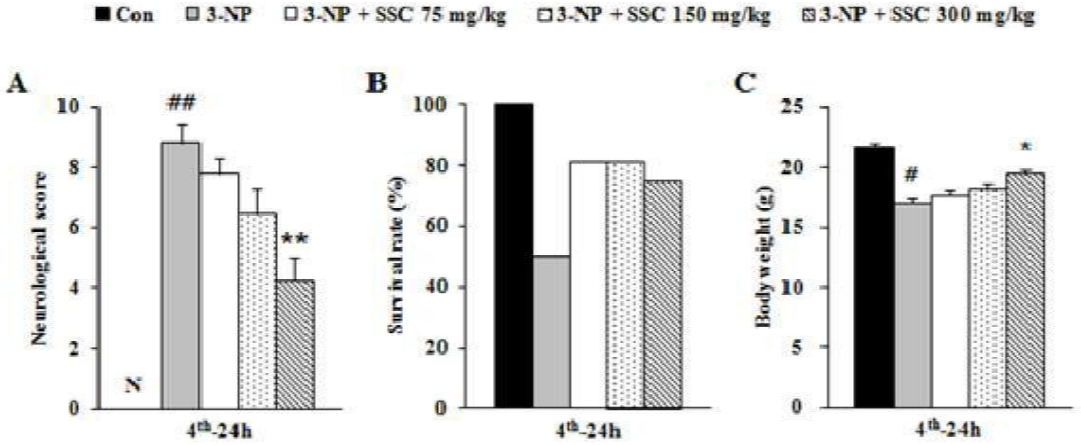
(54) 발명의 명칭 **오미자 줄기 추출물을 함유하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 오미자 줄기 추출물을 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

본 발명의 오미자 줄기 추출물은 신경세포 사멸을 억제하고, 숙신산 탈수소 효소의 활성을 증가시키며, 미세아교세포의 활성을 억제하며, 도파민성 신경세포를 증가시키며, 염증에 의한 신경손상 회복 효과를 보이는 등 뇌신경세포 보호 효과가 뛰어나므로 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23V 2200/322 (2013.01)
A61K 2236/33 (2013.01)
(72) 발명자
최종희
경상북도 경주시 외동읍 신기앞길 59-2

임성규
경상북도 문경시 우지공평로 285

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A2A1A11051240
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업/도약연구
연구과제명 단핵구계열세포 특이적 JAK-STAT3 신호기전의 활성화에 의한 헌팅턴질환의 발생 및 병리기능 연구
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

오미자 줄기 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물 또는 알코올을 추출용매로 하여 추출된 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 추출은 물 용매로 하여 추출된 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신경계 질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨 질환, 헌팅턴병, 피크병, 크로이펠츠-야콥병, 전두측두치매, 루이치매, 근육위축가쪽경화증, 피질기저퇴행증, 다계통위축병, 진행성핵상마비, 신경계자가면역질환, 다발성경화증 염증성 및 신경병증성 통증, 또는 뇌혈관질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 파킨슨질환, 헌팅턴병 또는 다발성경화증인 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

오미자 줄기 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 신경계 질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨 질환, 헌팅턴병, 피크병, 크로이펠츠-야콥병, 전두측두치매, 루이치매, 근육위축가쪽경화증, 피질기저퇴행증, 다계통위축병, 진행성핵상마비, 신경계자가면역질환, 염증성 및 신경병증성 통증, 또는 뇌혈관질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 신경계 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 신경계 질환은 파킨슨 질환, 헌팅턴병 또는 다발성경화증인 신경계 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 중추신경계는 신경세포와 신경교세포로 이루어져 있다. 신경교세포는 뇌 속에 가장 많이 분포되어 있는 세포로서 전체 뇌세포의 90%, 부피로는 뇌 전체의 50%를 차지하고 있다. 이 세포들은 그 자체로는 신경충격을 생성시키지 못하지만 신경원들이 고유의 기능을 수행하는데 도움을 주며, 뇌 조직이 손상되었을 때 이를 회복시키는데도 매우 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 상기 신경교세포는 다시 성상세포(astrocytes), 미세아교세포(microglia) 및 희소돌기아교세포(oligodendroc ytes)의 세 종류로 구성되어 있다.

[0003] 이들 중에서 미세아교세포(microglia)는 미세교세포, 또는 소교세포로도 불리며 중추신경계(central nervous system, CNS)에 상재하는 면역세포로서 전체 뇌 세포의 5-10%를 차지한다.

[0004] 상기 미세아교세포는 중추신경계에서 일차 방어라인으로서 기능한다. 미세아교세포는 중추신경계에서 염증 매개자의 주요 세포 내공급원이다. 미세아교세포는 일산화질소(NO), 반응성 산소종(reactiveoxygen species, ROS), 전염증성 사이토카인 및 프로스타글란딘을 생산함으로써 신경염증에 관여한다. 활성화된 미세아교세포는 손상된 신경조직 영역으로 이동하여 미생물 및 세포파편(cell debris)을 포식하고 파괴한다.

[0005] 그러나 염증세포로서의 미세아교세포의 역할은 항상 유익한 것만은 아니다. 조절되지 않은 미세교세포의 활성화와 지속적인 과도한 신경염증은 신경계 질환(neurodegenerative diseases)을 포함하는 다양한 중추신경계 병리의 원인으로 여겨지고 있다. 즉, 기능적으로 활성화된 미세아교세포는 염증매개물질을 생성 및 분비하여 신경세포 사멸을 초래하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 즉, 중추신경계에 존재하는 면역세포인 미세아교세포는 다양한 외인성, 내인성 물질로 인해 활성화될 수 있으며, 활성화된 미세아교세포는 염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-1β, 일산화질소, 프로스타글란딘, 초과산화물 등의 물질을 생산, 방출한다. 이러한 물질들의 생성은 단기적으로는 면역반응을 유발하지만, 그 과도한 생산이나 지속적인 생산은 근접한 신경세포들의 사멸을 유도하여 결국 신경퇴행을 비롯한 신경계 질환을 유발한다는 것이다. 또 사멸 중인 신경세포가 방출하는 물질들이 미세아교세포의 활성을 다시 유발하게 되므로, 신경퇴행은 지속적인 악순환에 빠지게 된다. 실제로 미세아교세포의 활성이 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 크로이츠펠트야콥병(Creutzfelt-Jakob Disease, CJD), 다발성경화증 등의 다양한 신경계 질환과 관계가 있음이 보고되었다.

[0007] 한편, 오미자(*Schisandra chinensis*)는 지름 약 1 cm의 짙은 붉은 빛깔을 지니는 오미자 나무의 열매로써, 시잔드린, 고미신, 시트럴, 사과산, 시트르산 등의 성분이 들어 있어 심장을 강하게 하고 혈압을 내리며 면역력을 높여 주어 강장제로 쓴다. 폐 기능을 강하게 하고 진해·거담 작용이 있어서 기침이나 갈증 등을 치료하는 데 도움이 된다고 알려져 있다. 또한, 말린 열매를 찬물에 담가 붉게 우러난 물에 꿀·설탕을 넣어 음료로 마시거나 화채나 녹말편을 만들어 먹는 것으로 알려져 있다.

[0008] 그러나, 오미자는 오미자 열매와 관련된 약효 및 효능에 관한 연구만이 진행되고 있을 뿐이며, 오미자 잎, 오미자 줄기 등의 다른 약용 부위에 관한 연구 개발은 이루어진 적이 없다. 특히, 열매와 잎 또는 줄기가 가지는 생리 활성 물질 등이 매우 상이하고, 일반적으로 오미자가 열매로써만 이용되고 있음을 고려할 때 오미자의 타 부위 추출물에 관한 연구 개발이 이루어질 필요성이 있다.

[0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 신경계 질환에 효과가 있는 천연 추출물에 관한 연구개발을 수행하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국특허출원 제10-2004-0067771호

(특허문헌 0002) 한국특허출원 제10-2012-0086959호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 오미자 줄기 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 목적은 오미자 줄기 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은 오미자의 줄기 추출물의 효과에 대하여 연구하던 중 오미자 줄기 추출물이 신경염증을 감소시키고, 미세아교세포 활성을 억제하며, 뇌신경세포를 보호하는 등의 작용 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0014] 본 발명은 오미자(*Schisandra chinensis*) 줄기 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0015] 본 발명의 오미자 줄기 추출물은 신경 세포 사멸을 억제하고, 숙신산 탈수소 효소의 활성을 증가시키며, 미세아교세포의 활성을 억제하며, 도파민성 신경세포를 증가시키며, 염증에 의한 신경 손상 회복 효과를 보이는 등 뇌신경세포 보호 효과가 뛰어나므로 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0016] 특히, 오미자 줄기 추출물은 오미자 열매와 대비하여서도 신경계 질환의 예방 및 치료에 현저한 효과를 가지며, 지금까지 약용 또는 건강기능식품으로 사용되지 않았던 부위인 줄기의 추출물을 사용함으로써 경제적으로도 높은 효용성을 지닌다.

[0017] 상기 오미자 줄기 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합용매를 추출용매로 하여 추출된 추출물일 수 있으며, 상기 알코올은 바람직하게는 C_1 내지 C_4의 저급 알코올일 수 있다. 바람직하게 본 발명의 오미자 줄기 추출물은 오미자 줄기 열수 추출물이다.

[0018] 상기 신경계 질환은 뇌졸중(stroke), 치매(dimentia), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease; 무도병), 피크병(Pick disease), 크로이펠츠-야콥병(Creutzfeld-Jacob disease), 전두측두치매(frontotemporal dementia), 루이치매(dementia with Lewy bodies), 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis; 루게릭병), 피질기저퇴행증(corticobasal degeneration), 다계통위축병(multiple system atrophy), 진행성핵상마비(progressive supranuclear palsy), 신경계자가면역질환(autoimmune disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 염증성 및 신경병증성 통증(inflammatory and neuropathic pain), 뇌혈관질환(neurovascular disease) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0019] 바람직하게, 신경계 질환은 헌팅턴병, 파킨슨병, 다발성경화증일 수 있다.

[0020] 오미자 줄기 추출물의 제조에 있어서, 추출은 진탕 추출, Soxhlet 추출 또는 환류추출 방법을 이용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 추출온도는 40 내지 100 ℃인 것이 바람직하다. 또한, 추출시간은 0.5 내지 24시간인 것이 바람직하며, 추출회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하다.

[0021] 상기 추출에서 사용되는 추출용매로는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 알코올은 C_1~C_4의 저급 알코올을 사용하는 것이 바람직하며, 메탄올 또는 에탄올이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 추출 용매는 물 추출이 가장 바람직하다. 또한, 준비된 오미자 줄기의 5 내지 15배 중량 또는 부피의 추출용매를 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 10배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다.

[0022] 상기 추출물은 감압농축될 수 있으며, 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하며, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조 방법을 이용하는 것이 바람직하다. 다만, 이에 한정되지 않는다.

[0023] 본 발명의 오미자 줄기 추출물 유효성분으로 함유하는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%로 추출물을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0024] 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.

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 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 1,000mg/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.

[0029] 본 발명의 조성물은 신경계 질환 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0030] 또한 본 발명은 오미자 줄기 추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0031] 본 발명의 건강기능식품은 오미자 줄기 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 함량은 사용 목적(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.

[0032] 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.

[0033] 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.

[0034] 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.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 오미자 줄기 추출물은 신경세포 사멸을 억제하고, 숙신산 탈수소 효소의 활성을 증가시키며, 미세아교세포의 활성을 억제하며, 도파민성 신경세포를 증가시키며, 염증에 의한 신경손상 회복 효과를 보이는 등 뇌신경세포 보호 효과가 뛰어나므로 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 건강기능 식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 3-니트로프로피온산(3-NP, 3-nitropropionic acid)를 이용한 헌팅턴병 동물 모델 유도 및 신경학적인 행

동이상의 기준에 따른 등급 분류를 나타낸다.

도 2는 3-NP에 의해 유도된 헌팅턴병 모델에서 신경학적 행동 및 생존율에 대한 오미자 줄기 추출물의 보호 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 3-NP에 의해 유도된 헌팅턴병 모델에서 신경세포 사멸에 대한 오미자 줄기 추출물의 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 3-NP에 의해 유도된 헌팅턴병 모델에서 숙신산 탈수소 효소 (succinate dehydrogenase, SDH) 억제에 대한 오미자 줄기 추출물의 회복 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 3-NP에 의해 유도된 헌팅턴병 모델에서 미세아교세포 활성화에 대한 오미자 줄기 추출물의 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 3-NP에 의해 유도된 헌팅턴병 모델에서 세포자살(apoptosis)에 대한 오미자 줄기 추출물의 억제 효과를 나타낸다.

도 7은 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘 (MPTP, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)로 유도된 파킨슨 질환 동물 모델을 나타낸다.

도 8은 MPTP로 유도된 파킨슨 질환 동물 모델에서 오미자 줄기 추출물 처리에 따른 행동 개선 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 9는 MPTP로 유도된 파킨슨 질환 동물 모델에서 면역조직학적인 검사를 통한 오미자 줄기 추출물의 신경보호 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 10은 마이엘린 희소돌기아교세포 당단백질(MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein) 펩타이드에 의해 유도된 다발성경화증 동물 모델을 나타낸다.

도 11은 마이엘린 희소돌기아교세포 당단백질(MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein) 펩타이드에 의해 유도된 다발성경화증 동물 모델에서 행동학적 검사를 통한 오미자 줄기 추출물의 신경보호 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0038] **실시예 1. 오미자 줄기(Stem of *Schisandra chinensis*)의 열수 추출물의 제조**

[0039] 건조한 오미자 줄기(경상북도 문경시 동로면) 200 g을 환류추출기에 증류수 2.0 L와 함께 넣고 1.5시간 동안 방치한 다음에, 가열하여 탕액이 끓기 시작하는 시점부터 1.5시간 동안 더 가열하였다. 상기 추출액을 여과지로 감압하여 여과한 후에, 진공감압농축기를 사용하여 여과액을 농축하고 동결건조기를 이용하여 분말시료를 제조하였다.

[0040] **실시예 2. 3-니트로프로피온 산 (3-NP) 유도 헌팅턴병 동물모델에서의 치료 및 예방 효과 확인**

[0041] **(1) 3-NP 유도 헌팅턴병 동물 모델의 제조**

[0042] 헌팅턴병 동물 모델에서 오미자 줄기 추출물의 신경보호 효능을 확인하기 위해, 신경독성물질인 3-NP를 이용하여 헌팅턴병(Huntington's disease) 동물모델을 제조하였다. 구체적으로, 동물모델은 출생 후 8-9주령의 수컷 C57BL/6 마우스(Narabiotechnology, 대한민국)를 준비하여 일주일 동안 안정시켰다. 마우스에 3-NP (Sigma, 미국)를 생리식염수 100 ㎕에 희석하여 12시간 간격으로 4회(60, 60, 80 및 80 mg/kg)에 걸쳐서 복강으로 투여하였다.

[0043] 신경학적인 행동이상의 기준을 뒷다리 움켜짐, 뒷다리 근육 긴장이상, 활동성, 흉추 후만 자세 및 자세변경 등으로 나누었으며, 각 기준에 있어서 심한 정도에 따라서 0, 1 및 2 등급으로 분류하였다. 제조된 헌팅턴병 해당 분류 결과를 도 1에 나타내었다. 점수가 높을수록 신경학적 행동증상이 심함을 뜻하며, 생존율과 몸무게는 3-NP를 마지막(4회째)으로 투여하고 24시간 후 확인하였다.

[0044] **(2) 헌팅턴병 동물 모델에서 신경학적 행동 및 생존율에 대한 오미자 줄기 추출물의 보호 효과 확인**

[0045] 오미자 줄기 추출물(75, 150 및 300 mg/kg)은 생리식염수에 희석하여 개체 당 투여량이 100 ㎕이 되도록 하여, 헌팅턴병 동물 모델을 유도하기 5일 전부터 동물모델 유도 후 3일째까지 매일 1회씩 구강으로 투여하였다.

[0046] 본 발명의 오미자 줄기 추출물의 헌팅턴병 동물모델에 대한 신경보호 효능을 확인하기 위해, 실험군은 대조군(CON군); 3-NP와 추출물을 투여하지 않은 정상 대조군, 3-NP군; 3-NP로 동물모델을 유도한 군, 3-NP+추출물(SSC)군; 3-NP로 동물모델을 유도하고 추출물을 구강으로 투여한 군, 추출물군; 추출물을 구강으로 투여한 군으로 나누어 실험을 수행하였다. 이하에서 수행되는 실험들에서 오미자 줄기 추출물의 투여는 동일하게 적용되었다.

[0047] 3-NP를 마지막으로(4회째) 투여한 후 24시간 후에 상기의 신경학적인 행동이상의 기준을 사용하여 행동학적인 변화에 대한 오미자 줄기 추출물의 효능을 확인하였다.

[0048] 그 결과를 도 2의 A에 나타내었다. 도 2의 A에서 확인되는 바와 같이, 3-NP군의 행동학적인 증상은 8.8 ± 0.64이였으나, 3-NP+추출물군에서의 행동학적인 증상은 3-NP군에 비하여 추출물의 투여 농도에 의존적으로 감소하는 경향이었으며 특히, 300 mg/kg를 투여한 군에서는 현저한 감소를 보였다. 즉, 추출물 75 mg/kg 투여군에서 7.8 ± 0.55, 150 mg/kg 투여군에서 6.5 ± 0.86 및 300 mg/kg 투여군에서 4.3 ± 0.77였다.

[0049] 또한, 생존율 변화를 확인하여 그 결과를 도 2의 B에 나타내었다. 도 2의 B에 나타낸 바와 같이, 3-NP군의 생존율은 50%였으나, 3-NP+추출물(SSC)군에서의 생존율은 3-NP군에 비하여 크게 증가하였다. 즉, 추출물 75 mg/kg 투여군에서 81.3%, 150 mg/kg 투여군에서 81.3% 및 300 mg/kg 투여군에서 75%였다.

[0050] 또한, 체중 변화를 확인하여 그 결과를 도 2의 C에 나타내었다. 도 2의 C에서 확인되는 바와 같이, 3-NP군의 체중은 17 ± 0.43 g로 CON군에 비하여 뚜렷이 감소하였으며, 추출물 300 mg/kg 투여군에서 체중이 19.4 ± 0.37 g로 크게 증가하는 것이 확인되었다.

[0051] **(3) 헌팅턴병 동물 모델에서 신경 세포 사멸에 대한 오미자 줄기 추출물의 보호 효과 확인**

[0052] 3-NP를 마지막으로(4회째) 투여한 다음 24시간 후에 마우스를 에틸에테르(ethyl ether)로 흡입마취하고, 4% 파라포름알데하이드(PFA, paraformaldehyde)를 포함한 0.1 M 인산 완충액(phosphate buffer, pH 7.4)을 심장으로 관류하여 고정하고, 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 인산완충식염수(PBS, phosphate buffered saline)로 2번 씻어준 후, 4% PFA 에 담구어 4℃에서 하루 정도 더 고정하였다. 그런 다음에 10, 20 및 30% 수크로스용액(sucrose solution)으로 바꾸어 4℃에서 48시간 동안 보관하여 동결손상을 방지하였다. 동결절편기(Leica Cryostat CM3050S, 독일)를 이용하여 줄무늬체(선조체, striatum)를 포함한 부위를 30 μm 두께로 관상절단(coronal section)하여 PBS나 동결보존액에 담구어 냉동고에 보관하였다.

[0053] 뇌에서 3-NP에 의한 신경세포 사멸 정도를 확인하기 위해 cresyl violet 염색을 수행하였다. 즉, 뇌 조직을 젤라틴으로 코팅된 슬라이드 글라스에 붙이고 24시간 동안 건조하였다. 건조된 조직을 자일렌(xylene)과 에탄올을 이용하여 재함수(rehydration)하고, cresyl violet 염료로 염색하고 퍼마운트(permount)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

[0054] 그 결과를 도 3의 A 내지 E에 나타내었다. CON군의 줄무늬체에서는 신경세포가 정상적으로 관찰되었으나(도 3A), 3-NP군의 줄무늬체에서는 뚜렷한 신경세포의 사멸이 관찰되었다(도 3B, 점선부분). 이러한 신경세포의 사멸은 3-NP+추출물군(SSC)에서는 뚜렷이 감소하였다(도 3C-3E).

[0055] 이러한 결과를 정량적으로 확인하기 위하여, 3-NP에 의한 신경세포 사멸을 나타내는 병변을 가진 뇌의 비율을 확인하여 그 결과를 도 3의 F에 나타내었다. CON군에서 0 ± 0%, 3-NP군에서 55 ± 5%, 추출물 75 mg/kg 투여군에서 36.6 ± 3.3%, 150 mg/kg 투여군에서 20 ± 0% 및 300 mg/kg 투여군에서 0 ± 0%였다.

[0056] 또한, 정상적인 줄무늬체의 면적에 대한 신경세포사멸이 일어난 부위의 면적을 측정하여 그 결과를 도 3의 G에 나타내었다. 3-NP군은 28 ± 7.6%였는데 비하여 추출물(SSC)군 75 mg/kg 투여군에서 27.3 ± 12.9%, 150 mg/kg 투여군에서 9.1 ± 5.8% 및 300 mg/kg 투여군에서 0 ± 0%으로 농도 의존적으로 감소하였다.

[0057] 또한, 3-NP에 의한 신경세포 사멸에 대한 추출물의 보호효과를 신경세포의 주요한 단백질 수준에서 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 실험을 수행하였다. 3-NP를 마지막으로(4회째) 투여한 다음 24시간 후에 마우스를 에틸에테르로 흡입 마취한 후에 대뇌의 줄무늬체를 적출하여 단백질용해완충액(protein lysis buffer; 50 mM Tris-cl, pH 7.5, 150 mM Nacl, 1 % Triton X-100, 10 % glycerol 및 단백질분해효소저해제혼합물)을 넣고 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 소혈청알부민(BSA, bovine serum albumin, sigma, 미국)을 사용한 Bradford (Bio-rad, 미국) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 다음에, 단백질 30 μg을 10% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl

Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% 탈지유(nonfat dry milk)가 포함된 TBS-T (Tris-buffered saline, 20 mM Tris, pH 7.4, 0.1 % Tween 20 및150 mM Nacl)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBS-T로 씻은 후 신경세포 미세소관 구성물질인 β-Ⅲ-tubulin을 신경세포 마커로 사용하였다. β-Ⅲ-tubulin (Sigma, 미국)을 1:2,000으로 희석시켜 4℃에서 하루 동안 반응시킨 후 TBS-T로 10분씩 3회 씻고 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBS-T에 씻은 뒤 ECL system (Amersham Pharmacia Biotechnology, 미국)로 밴드를 확인하고 정량화하였다.

[0058] 그 결과를 도 3의 H 및 I에 나타내었다. β-III-tubulin의 단백질 발현은 정도는 cresyl violet 염색의 결과와 일치하여, 추출물 투여에 따라 β-III-tubulin의 발현이 증가하는 것이 확인되었다.

[0059] **(4) 헌팅턴병 동물 모델에서 숙신산 탈수소 효소 (succinate dehydrogenase, SDH) 억제에 대한 오미자 줄기 추출물의 회복 효과 확인**

[0060] 3-NP를 마지막으로(4회째) 투여한 다음 24시간 후에 마우스를 에틸에테르(ethyl ether)로 흡입마취하고, 대뇌를 적출하였다. 적출한 대뇌를 OCT compound를 사용하여 동결한 다음에, 동결절편기를 이용하여 5 ㎛ 두께로 잘라 젤라틴으로 코팅된 슬라이드 글라스에 붙여서 완전히 건조시킨 다음에 냉동고에 보관하였다. 오미자 줄기 추출물이 3-NP에 의한 숙신산 탈수소 효소의활성 감소를 억제시키는지 확인하기 위해 조직을 SDH액(mPMS, NBT, 0.24M disodium succinate stock, Azide/EDTA/PO4 buffer stock 혼합액)에 5-10분간 염색하였다. 염색 후에 세척 및 건조시키고 자일렌 과정을 거친 후 퍼마운트(permount)로 봉입하여 현미경으로 관찰하고 SDH의 활성도를 정량화하였다.

[0061] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4의 A 내지 D는 염색 결과를 보여주며, E는 이를 정량화한 결과를 나타낸다. 도 4에서 확인되는 바와 같이, 3-NP군의 줄무늬체에서는 SDH의 활성도는 CON군(100%)에 비하여 유의하게 감소하였고(92.6%), 이러한 감소는 3-NP+추출물군(300 mg/kg)에서 유의하게 증가하였다(97.9%). 추출물의 단독투여는 SDH의 활성도에 유의한 영향을 미치지 않았다.

[0062] **(5) 헌팅턴병 동물 모델에서 미세아교세포 활성화에 대한 오미자 줄기 추출물의 억제 효과 확인**

[0063] 3-NP를 마지막으로(4회째) 투여한 다음 24시간 후에 상기의 방법으로 마우스를 마취하고, 고정하고, 동결절편을 제작하고, 신경계의 면역세포인 미세아교세포(microglia)의 마커인 Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1; 1:2,000, WAKO, 일본)에 대한 항체를 이용하여 면역염색을 수행하였다.

[0064] 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5의 A 내지 H에 나타낸 바와 같이, 3-NP군의 줄무늬체에서는 Iba-1에 대한 면역양성반응의 정도는 CON군에 비하여 유의하게 증가하였고, 3-NP+추출물군(300 mg/kg)에서 유의하게 감소하였다. 또한, 추출물의 단독투여는 Iba-1에 대한 면역양성반응에 유의한 영향을 미치지 않았다.

[0065] 또한, 추출물이 Iba-1에 대한 단백질 발현에도 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 상기 기재된 방법에 의하여 웨스턴블롯 실험을 수행하고 정량화하였다.

[0066] 그 결과를 도 5의 I 내지 J에 나타내었다. 도 5의 I 내지 J에서 확인되는 바와 같이, Iba-1 단백질 발현의 정도는 면역염색의 결과와 일치하였다.

[0067] **(6) 헌팅턴병 동물 모델에서 세포자살(apoptosis)에 대한 오미자 줄기 추출물의 억제 효과 확인**

[0068] 3-NP를 마지막으로(4회째) 투여한 다음 24시간 후에, 상기의 방법으로 마우스를 마취하고, 고정하고, 동결절편을 제작하고, 자살세포의 마커인 clevead caspase-3 대한 항체를 이용하여 면역염색을 수행하였다.

[0069] 그 결과를 도 6의 A 내지 H에 나타내었다. 3-NP군의 줄무늬체에서는 cleaved caspase-3에 대한 면역양성반응의 정도는 CON군에 비하여 유의하게 증가하였고, 3-NP+추출물군(300 mg/kg)에서 유의하게 감소되었다. 추출물의 단독투여는 cleaved caspase-3에 대한 면역양성반응에 유의한 영향을 미치지 않았다.

[0070] 또한, 추출물이 cleaved caspase-3에 대한 단백질 발현에도 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여 상기의 방법에 의하여 웨스턴 블롯 실험을 수행하고 정량화하였다.

[0071] 그 결과를 도 6의 I 및 J에 나타내었다. cleaved caspase-3의 단백질 발현은 정도는 면역염색의 결과와 일치하여, 오미자 줄기 추출물 투여에 따라 감소되는 것이 확인되었다.

[0072] **실시예 3. 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘(MPTP) 유도 파킨슨병 동물모델에서의 치료 및 예방 효과**

확인

[0073] **(1) MPTP 유도 파킨슨병 동물 모델의 제조**

[0074] 오미자 줄기 추출물의 파킨슨병 동물모델에 대한 신경보호 효능을 확인하기 위하여, 신경독성 물질인 MPTP를 사용하여 파킨슨병 동물 모델을 제조하였다. 구체적으로, 동물 모델은 출생 후 7주령의 수컷 C57BL/6 마우스((주)오리엔트, 대한민국)를 준비하여 일주일 동안 안정시켰다. 마우스에 MPTP를 100 ㎕를 생리식염수에 희석하여 20 mg/kg의 농도로 2시간 간격으로 4회에 걸쳐서 복강으로 투여하여, 파킨슨병을 유도하였다.

[0075] 오미자 줄기 추출물(37.5, 75 및 150 mg/kg)은 생리식염수에 희석하여 개체 당 투여량이 100 ㎕이 되도록 하여, 파킨슨병 동물 모델을 유도하기 5일 전부터 동물모델 유도 후 7일째까지 매일 1회씩 구강으로 투여하였다.

[0076] **(2) MPTP 유도 파킨슨병 동물 모델에서 행동학적인 검사를 통한 오미자 줄기 추출물의 신경보호 효능 확인**

[0077] MPTP 유도 파킨슨병 동물 모델 유도 후, 3-5일째에 마우스의 운동성을 검사하기 위해 로타로드(Rota-rod) 검사, 폴 검사(Pole test) 및 둥지만들기(Nest-building test)를 실시하였다.

[0078] 로타로드 검사는 직경 6cm 간격의 칸막이가 있는 회전 가능한 원통형의 봉에 마우스를 올려놓고 속도를 15 rpm으로 작동하게 한 후, 트레드밀이 돌아가도록 하여 마우스가 균형을 잃고 바닥에 떨어지기까지의 시간(초)을 최대 5분간 측정하였다. 바닥에는 감지기가 있어서 마우스가 떨어지면 자동으로 시간을 측정할 수 있도록 하였다.

[0079] 폴 검사는 직경 10 mm와 높이 50 cm의 막대를 수직으로 세워 놓고, 마우스의 머리를 위로 향하게 하여 수직 막대의 끝에 두고 마우스가 바닥으로 완전히 내려오는 시간을 최대 2분간 측정하였다.

[0080] 또한 마우스의 정상적인 행동 검사를 위해 둥지만들기검사를 실시하였다. 케이지 내에 마우스 한 마리를 넣고 찢어질 수 있는 종이 형태의 두꺼운 시트(Nestlet, 중앙) 한 장을 둔다. 마우스가 시트를 찢어서 둥지 형태로 만들 수 있는 충분한 시간(18시간)을 준 후, 5가지로 등급을 나누어 확인하였다. 즉, 시트를 거의 손대지 않음(1 단계(grade 1)), 부분적(50-90%)으로 찢어짐(2 단계(grade 2)), 시트는 대부분 찢어졌지만 둥지를 식별할 수 없음(3 단계 (grade 3)), 시트의 90% 이상이 찢어지고 둥지로 식별되지만 평면의 둥지 모양(4 단계 (grade 4)) 및 시트의 90% 이상이 찢어지고 마우스의 몸보다 높은 벽을 가진 분화구 형태의 둥지(5 단계 (grade 5))로 구분하였다.

[0081] 상기 실험을 도 7에 나타내었다, 도 7의 A는 로타로드 검사를 나타내며, 도 7의 B는 폴 검사를 나타내며, 도 7의 C는 둥지만들기 검사를 나타낸다.

[0082] 실험 결과를 정량화하여 도 8에 나타내었다. 도 8의 A는 로타로드 검사를 나타내며, 도 8의 B는 폴 검사를 나타내며, 도 8의 C는 둥지만들기 검사 결과를 나타낸다.

[0083] 도 8의 A에 나타낸 바와 같이, 정상군(283.8초)에 비해서 MPTP 투여군에서 로타로드 운동성이 감소하였고(168.7초), MPTP와 오미자 줄기 추출물을 함께 투여한 군에서는 농도 의존적으로 운동 장애를 억제하였다(37.5 mg/kg에서 198.6초, 75 mg/kg에서 209.7초, 150 mg/kg에서 253.9초).

[0084] 도 8의 B에 나타낸 바와 같이, 폴 검사에서 수직 막대를 내려오는 시간을 측정한 결과, 정상군(5.2초)에 비해 MPTP 투여군에서 현저한 서동이 관찰되었다(7.0초). MPTP와 오미자 줄기 추출물을 함께 투여한 군에서는 운동능력 감퇴를 개선하였다(37.5 mg/kg에서 6.2초, 75 mg/kg에서 5.7초, 150 mg/kg에서 5.8초).

[0085] 도 8의 C에 나타낸 바와 같이, 둥지만들기검사를 시행한 결과, MPTP 투여군은 정상군(4.4점)에 비하여 둥지만드는 정도가 떨어졌다(2.5점). 그러나 오미자 줄기 추출물 투여군에서는 둥지만드는 행동을 개선하였다(37.5 mg/kg에서 2.8점, 75 mg/kg에서 3.4점, 150 mg/kg에서 4.0점).

[0086] **(3) MPTP 유도 파킨슨병 동물 모델에서 면역조직학적인 검사를 통한 오미자 줄기 추출물의 신경보호 효능 확인**

[0087] 동물모델 유도 후 7일째에 마우스를 에틸에테르(ethyl ether)로 흡입마취하고 4 % 파라포름알데하이드(PFA, paraformaldehyde)를 포함한 0.1 M 인산 완충액(phosphate buffer, pH 7.4)을 심장으로 관류하여 고정하고, 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 인산완충식염수(PBS, phosphate buffered saline)로 2번 씻어준 후, 4% PFA에 담구어 4℃에서 하루 정도 더 고정하였다. 그런 다음에 10, 20 및 30% 수크로스용액(sucrose solution)으로 바꾸어 4℃에서 48시간 동안 보관하여 동결손상을 방지하였다. 동결절편기(Leica Cryostat CM3050S, 독일)를 이용하여 줄무늬체(선조체, striatum)와 흑질부(substantia nigra)를 포함한 부위를 30 um 두께로 관상절단(coronal section)하여 PBS나 동결보존액에 담구어 냉동고에 보관하였다.

[0088] 줄무늬체와 흑질부의 조직을 3% 과산화수소를 포함한 PBS에 20분 동안 담구어 내재성 퍼옥시다아제(endogenous peroxidase)의 활성을 제거하고, PBS로 수세하였다. 조직을 블로킹용액[5% normal goat/or horse serum, 2% bovine serum albumin, 2% fetal bovine serum (FBS), and 0.1 % Triton X-100]에 담구어 2시간 동안 반응시킨 후, 도파민성 신경세포의 마커인 TH 항체(tyrosine hydroxylase; 1:1,000; Millipore, 미국)와 함께 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 조직을 PBS로 세척하고 2차 항체(rabbit IgG; 1:200; Vector, 미국)와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체와 반응 후에 PBS로 세척하고, ABC액(Avidin Biotin Complex, Vector, 미국)과 함께 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 마지막으로 DAB (diaminobenzidine)을 가지고 발색하고, 퍼마운트(permount)로 봉입한 후 현미경으로 관찰하였다.

[0089] 그 결과를 도 9의 A 내지 J에 나타내었다.

[0090] CON군의 흑질부에서는 TH 면역양성반응 신경세포가 뚜렷하게 관찰되었으며, 조직절편 당 평균 147.7 ± 5.8개였으나, MPTP군에서는 평균 83.8 ± 6.4개로 CON군과 비교하였을 때 유의하게 감소하였다. 그러나 MPTP+추출물군의 흑질부에서는 TH 면역양성반응 신경세포가 추출물의 투여 농도에 의존적으로 증가하였다. 즉, 추출물 37.5 mg/kg 투여군에서 106.7 ± 12.3개, 75 mg/kg 투여군에서 124.4 ± 6.5개 및 150 mg/kg 투여군에서 138 ± 6.6개였다.

[0091] 또한, 조직절편 당 평균 강도를 100%로 노멀라이제이션 했을 때의 결과 및 TH 면역양성반응 신경세포의 정량적 수치를 도 9의 K 및 L에 나타내었다.

[0092] 조직절편 당 평균 강도를 100%로 노멀라이제이션 했을 때의 결과를 살펴보면, CON군의 줄무늬체에서는 TH 면역양성반응도 뚜렷하게 관찰되었으며, MPTP군에서는 평균 41.6 ± 0.9%로 CON군과 비교하였을 때 유의하게 감소하였다. 그러나 MPTP+추출물군의 줄무늬체에서는 TH 면역양성반응이 추출물의 투여 농도에 의존적으로 증가하였다. 즉 추출물 37.5 mg/kg 투여군에서 67.3 ± 4.5%, 75 mg/kg 투여군에서 81.8 ± 2.7 및 150 mg/kg 투여군에서 88.6 ± 2.8%였다. 또한, 추출물군의 흑질부와 줄무늬체에서의 TH 면역양성반응의 정도는 정상군과 일치하였다.

[0093] 또한 앞서 살핀 바와 같이, TH 면역양성반응 신경세포의 정량적 수치를 확인한 결과, 오미자 줄기 추출물 투여에 따라 그 수치가 증가하는 것이 확인되었다.

[0094] **실시예 4. 마이엘린 희소돌기아교세포 당단백질(MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein) 펩타이드 유도 다발성 경화증 동물모델에서의 치료 및 예방 효과 확인**

[0095] **(1) 마이엘린 희소돌기아교세포 당단백질(MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein) 펩타이드 유도 다발성 경화증 동물모델의 제조**

[0096] 본 발명의 오미자 줄기 추출물의 다발성경화증 동물모델에 대한 신경보호 효능을 확인하기 위해, MOG 펩타이드을 사용하여 실험적 다발성 경화증 관련 자가면역성 뇌척수염(EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) 동물 모델을 제조하였다. 구체적으로, 동물 모델은 출생 후 8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Narabiotechnology, 대한민국)를 준비하여 일주일 동안 안정시켰다. 마우스에 MOG 펩타이드35-55 (Sigma-Aldrich, 미국) 200 ug이 포함된 에멀전(emulsion)과 결핵균(mycobacterium tuberculosis; Difco, 미국) 400 ug이 포함된 IFA (Incomplete Freund's adjuvant; Difco, 미국)를 혼합하여 도합 0.1 ml의 에멀전을 EAE군의 양쪽 허리부위에 피하로 주사하였고, 동시에 백일해독소(PTX, pertussis toxin; List Biologic, 미국) 200 ng을 복강으로 주사하였다. 48시간 후에 동일한 양의 백일해독소를 복강으로 다시 주사하였다.

[0097] 상기 MOG에 의해 유도된 만성 EAE 동물모델의 임상 증상의 척도를 8가지로 구분하여 확인하였으며, 이를 도 10에 나타내었다. 도 10에서 확인되는 바와 같이, 반응이 없음(0 단계), 꼬리 끝이 처짐(1 단계), 꼬리 전체가 처짐(2 단계), 한쪽 뒷다리의 약한 마비(3 단계), 양쪽 뒷다리의 마비(4 단계), 한쪽 앞 다리까지 마비(5 단계), 앞쪽 양쪽 다리까지 마비(6 단계) 및 죽음(7 단계)으로 구분하였다.

[0098] **(2) 마이엘린 희소돌기아교세포 당단백질(MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein) 펩타이드 유도 다발성 경화증 동물모델에서 행동학적인 검사를 통한 오미자 줄기 추출물의 신경보호 효능 확인**

[0099] 오미자 줄기 추출물의 다발성경화증 동물모델에 대한 신경보호 효능을 확인하기 위해, 실험군은 CON군; MOG 펩타이드와 추출물을 투여하지 않은 정상 대조군, EAE군; MOG 펩타이드로 EAE를 유도한 군, 및 EAE+추출물군; MOG 펩타이드로 EAE를 유도하고 추출물을 구강으로 투여한 군으로 구분하였다.

[0100] 오미자 줄기 추출물(37.5, 75 및 150 mg/kg)을 생리식염수에 희석하여 개체 당 투여량이 100 ㎕이 되도록하여,

EAE를 유도한 다음 임상증상이 나타나기 시작하는 시점(6-8일째)부터 30일째까지 매일 1회씩 구강으로 투여하였다.

[0101] 상기 마우스의 EAE가 유도된 날부터 30일 동안 매일 상기의 임상 증상의 척도를 사용하여 행동학적인 변화에 대한 오미자 줄기 추출물의 효능을 확인하여, 그 결과를 도 11에 나타내었다. 도 11의 A는 일자 별 임상 점수 변화를 보여주는 것이며, 도 11의 B는 임상 점수의 합을 나타낸다.

[0102] 도 11에서 확인되는 바와 같이, EAE군의 행동학적인 증상은 EAE 유도 후, 7일째에서 8일째 사이에 나타나기 시작하여 15일째에서 17일째 사이에 최고조(3.75)에 도달하였으며, 그 이후에도 지속되었다. EAE 유도 후 8일째부터 30일째까지의 스코어의 합은 63.75였다. 그러나 EAE+추출물군에서의 행동학적인 증상은 EAE군에 비하여 감소하는 경향이었으며 특히, 150 mg/kg를 투여한 군에서는 유의한 감소를 보였다. EAE 유도 후 8일째부터 30일째까지의 스코어의 합은 오미자 줄기 추출물 37.5 mg/kg 투여군에서 47 ± 7.9, 75 mg/kg 투여군에서 52.8 ± 6.9 및 150 mg/kg 투여군에서 37.25 ± 9.0 였다.

[0103] **제제예 1. 의약품의 제조**

[0104] **1.1 산제의 제조**

오미자 줄기 추출물	100mg
유당	100mg
탈	10mg

[0105]

[0106] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0107] **1.2 정제의 제조**

오미자 줄기 추출물	100mg
옥수수전분	100mg
유당	100mg
스테아린산 마그네슘	2mg

[0108]

[0109] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0110] **1.3 캡슐제의 제조**

오미자 줄기 추출물	100mg
옥수수전분	100mg
유당	100mg
스테아린산 마그네슘	2mg

[0111]

[0112] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 정제를 제조한다.

[0113] **1.4 액제의 제조**

오미자 줄기 추출물	100mg
설탕	20g
이성화당	20g
레몬향	적량

[0114]

[0115] 정제수를 가하여 전체 1,00ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0116] **제제예 2. 건강기능식품의 제조**

오미자 줄기 추출물	100mg
비타민 혼합물	적량
비타민 A 아세테이트	70 ㎍
비타민 E	1.0 ㎎
비타민 B1	0.13 ㎎
비타민 C	10 ㎎
비오틴	10 ㎍
니코틴산아미드	1.7 ㎎
엽산	50 ㎍
무기질 혼합물	적량
산화아연	0.82 ㎎
탄산칼슘	24.8 ㎎

[0117]

[0118] 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 성분을 혼합한 다음, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조(예, 영양캔디 등)에 사용할 수 있다.

[0119] **제제예 3. 건강기능성 음료의 제조**

오미자 줄기 추출물	100mg
구연산	1000 ㎎
올리고당	100 g
매실농축액	2 g
타우린	1 g
정제수를 가하여 전체	900 ㎖

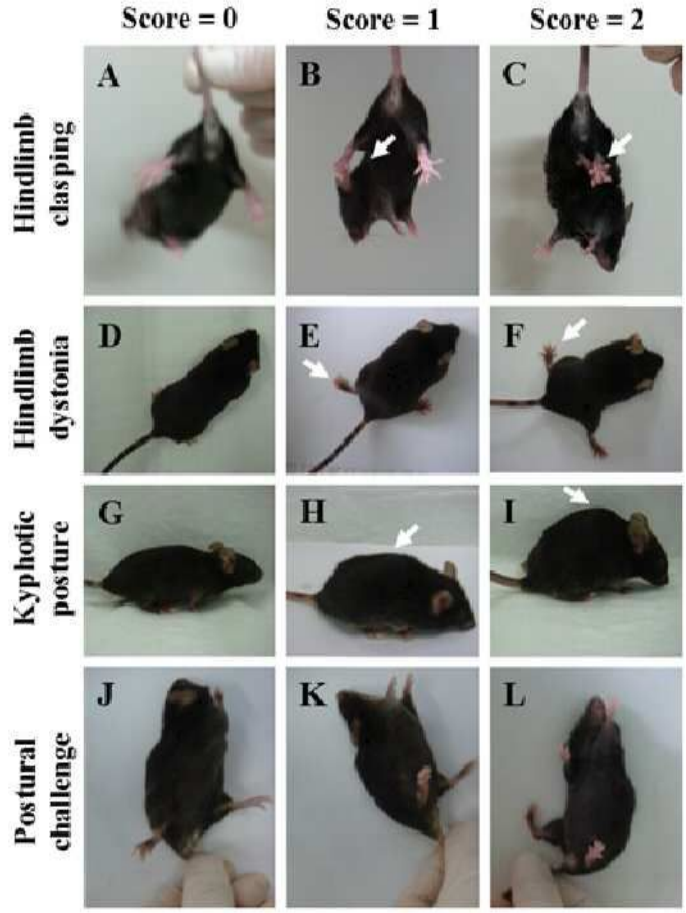
[0120]

[0121] 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.

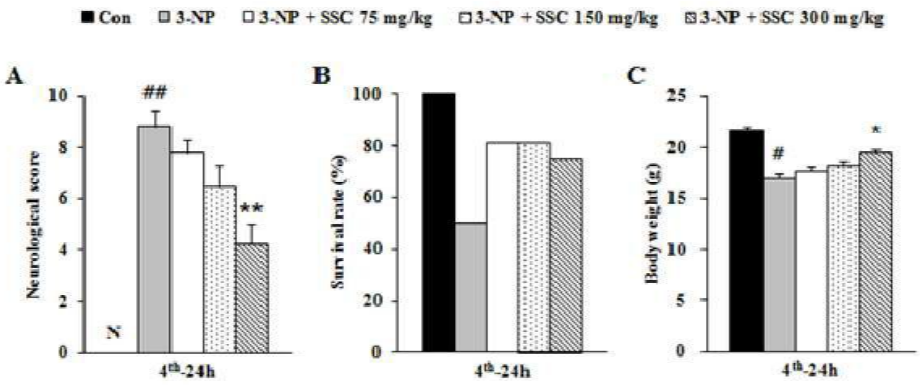
[0122] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

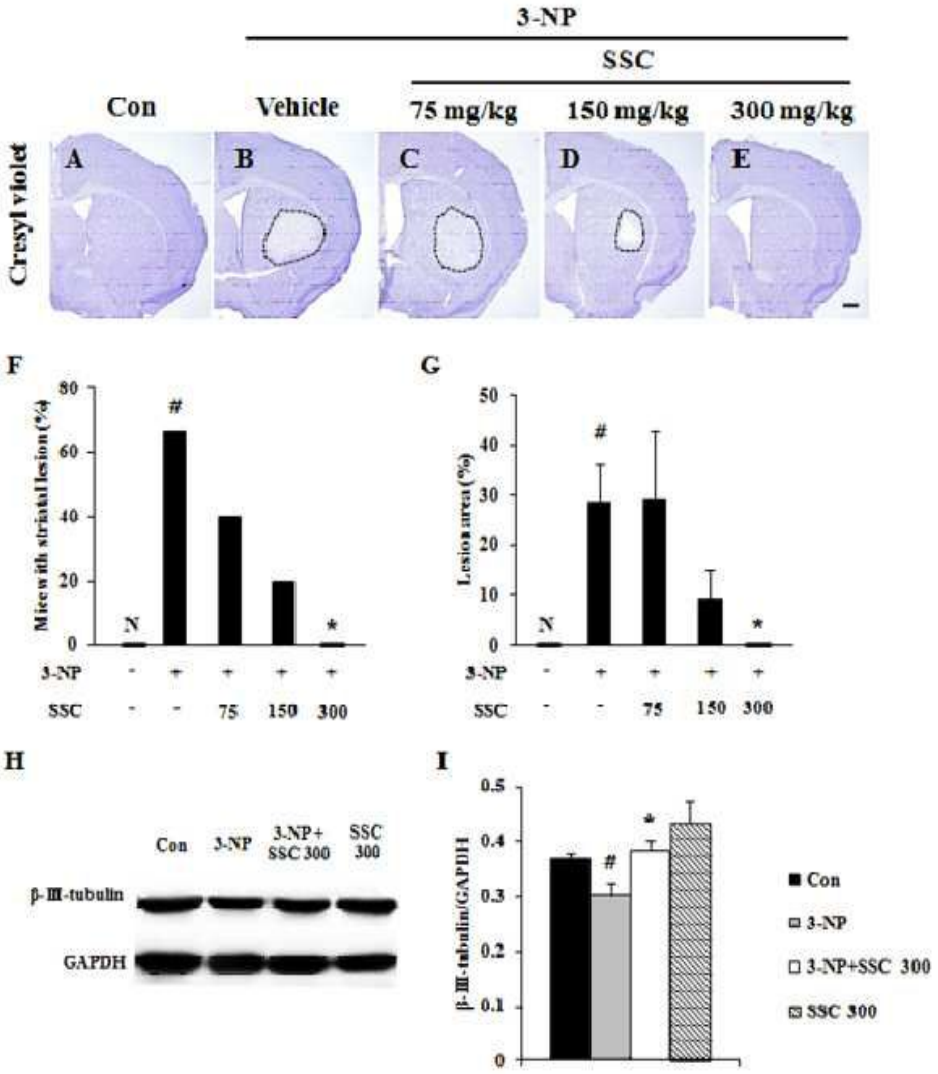
도면1


Score = 0
Score = 1
Score = 2
Hindlimb clasping
Hindlimb dystonia
Kyphotic posture
Postural challenge
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

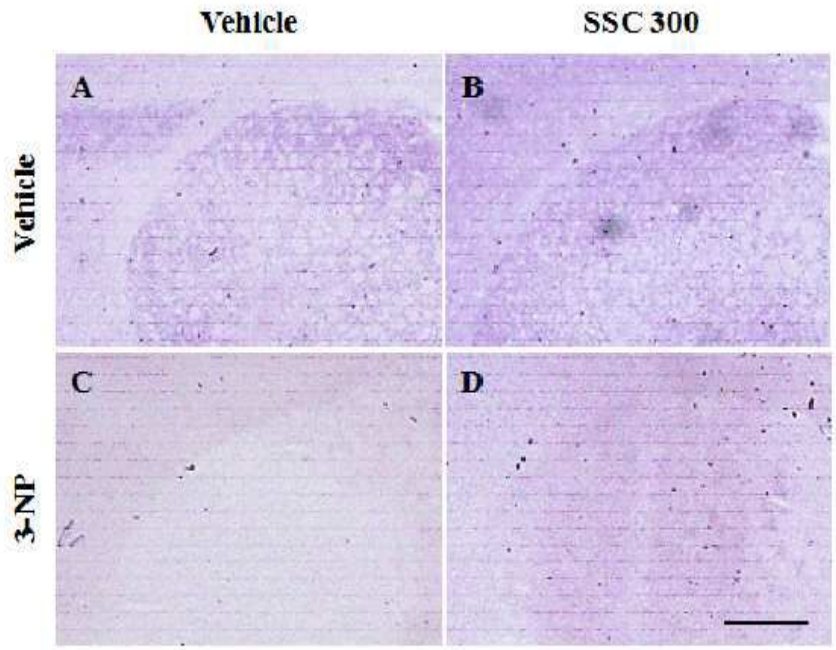
도면2

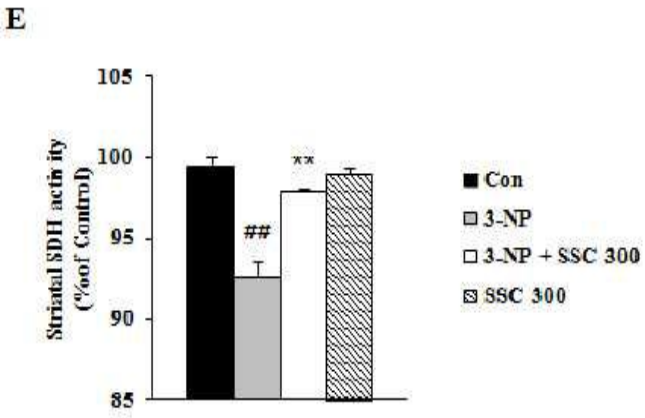

Con
3-NP
3-NP + SSC 75 mg/kg
3-NP + SSC 150 mg/kg
3-NP + SSC 300 mg/kg
A
Neurological score
##
**
N
4th-24h
B
Survival rate (%)
4th-24h
C
Body weight (g)
#
*
4th-24h

도면3

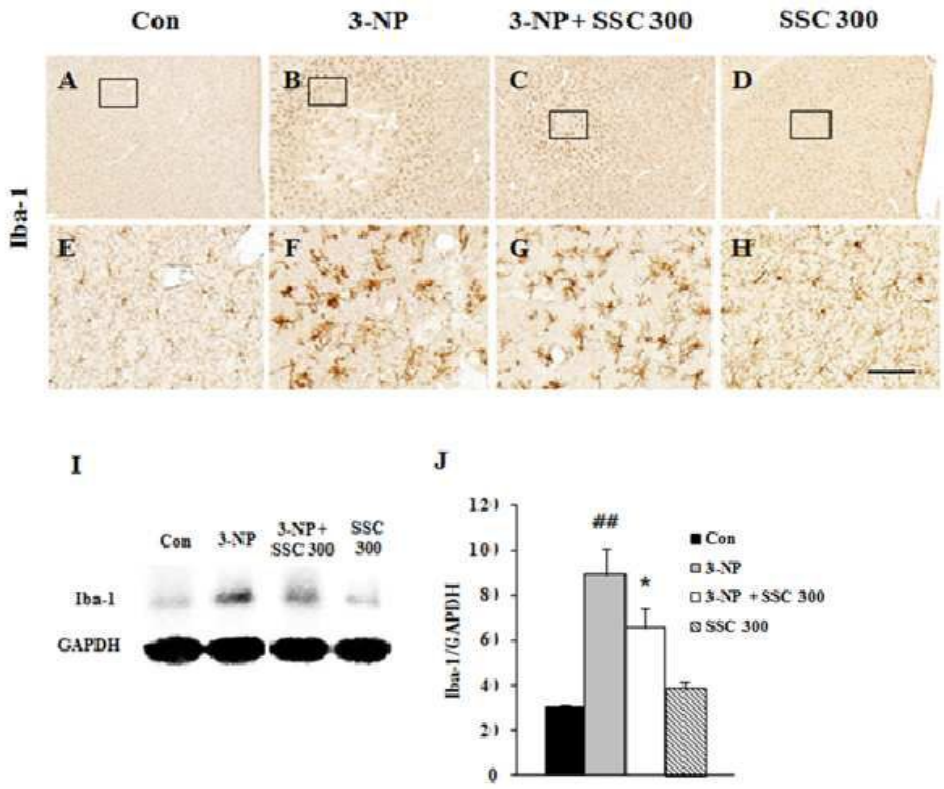

3-NP
SSC
Con
Vehicle
75 mg/kg
150 mg/kg
300 mg/kg
Cresyl violet
A
B
C
D
E
F
Mice with striatal lesion (%)
N
#
*
3-NP
SSC
75
150
300
G
Lesion area (%)
H
Con
3-NP
3-NP+ SSC 300
SSC 300
β-III-tubulin
GAPDH
I
β-III-tubulin/GAPDH
Con
3-NP
3-NP+SSC 300
SSC 300

도면4

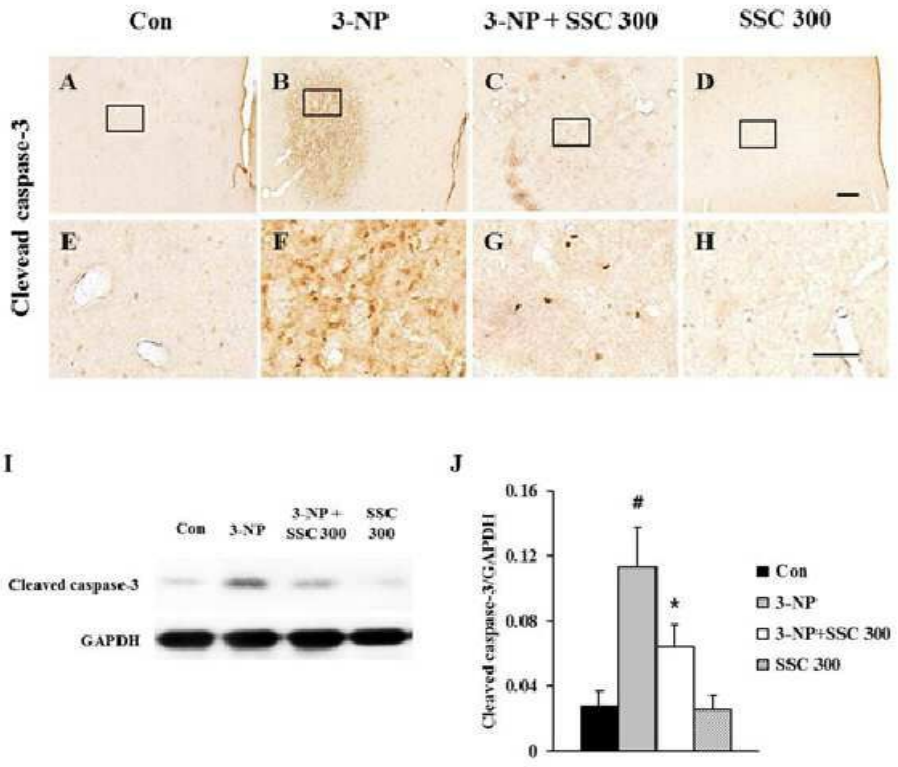

Vehicle
SSC 300
A
B
Vehicle
C
D
3-NP


E
105
100
95
90
85
Striatal SDH activity (%of Control)
##
**
Con
3-NP
3-NP + SSC 300
SSC 300

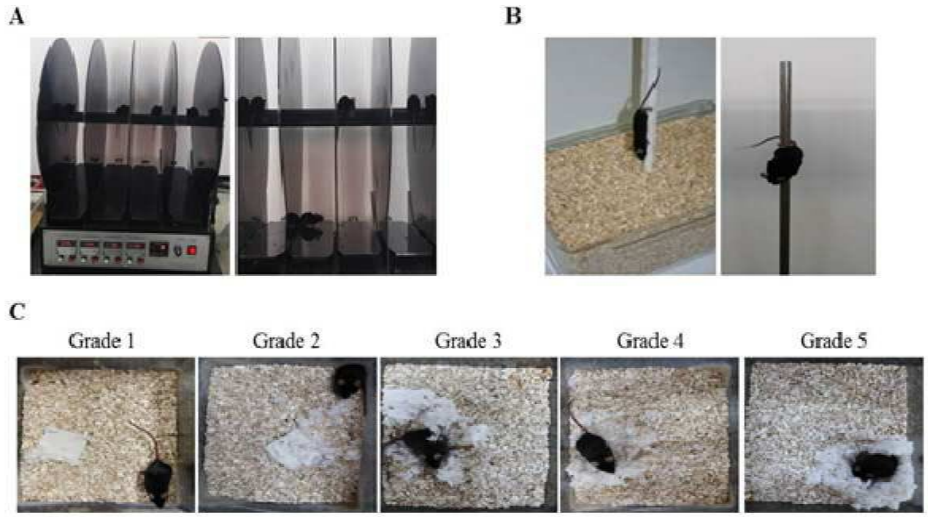
도면5


Con
3-NP
3-NP+SSC300
SSC300
Iba-1
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
Con
3-NP
3-NP+ SSC 300
SSC 300
Iba-1
GAPDH
Iba-1/GAPDH
##
*
Con
3-NP
3-NP +SSC 300
SSC 300

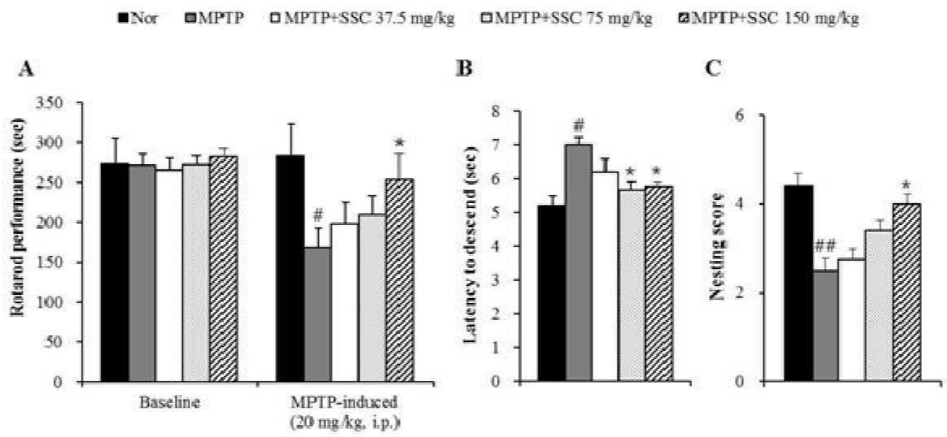
도면6


Con
3-NP
3-NP+SSC 300
SSC 300
Clevead caspase-3
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
Con
3-NP
3-NP+ SSC 300
SSC 300
Cleaved caspase-3
GAPDH
Cleaved caspase-3/GAPDH
#
*
Con
3-NP
3-NP+SSC 300
SSC 300

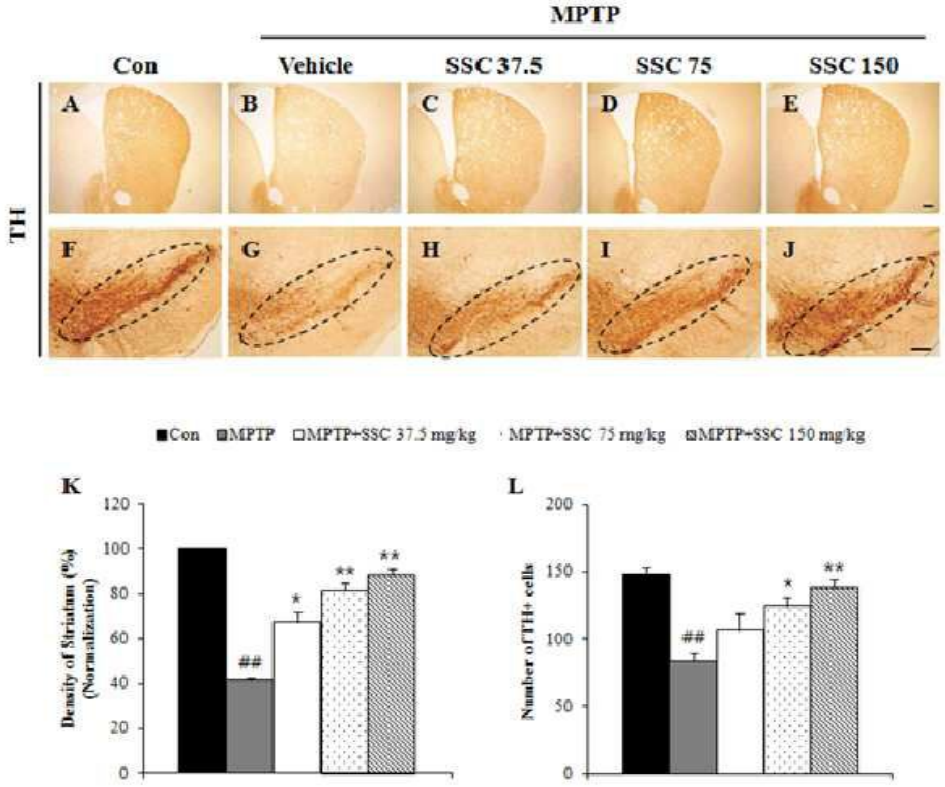
도면7


A
B
C
Grade 1
Grade 2
Grade 3
Grade 4
Grade 5

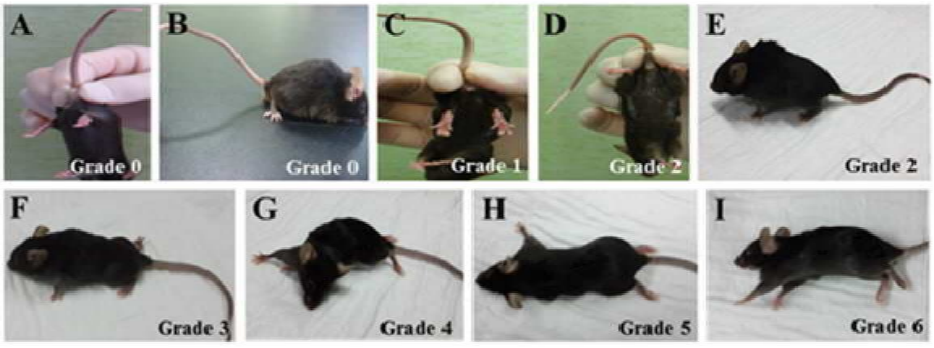
도면8


Nor
MPTP
MPTP+SSC 37.5 mg/kg
MPTP+SSC 75 mg/kg
MPTP+SSC 150 mg/kg
A
B
C
Rotarod performance (sec)
Latency to descend (sec)
Nesting score
Baseline
MPTP-induced
(20 mg/kg, i.p.)

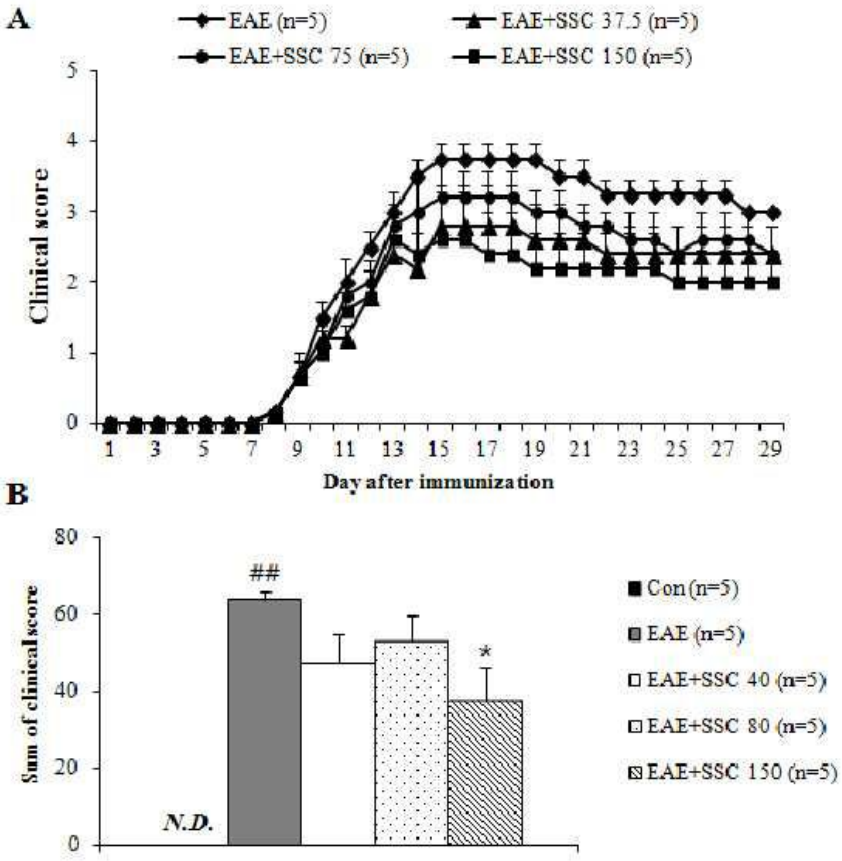
도면9


MPTP
Con
Vehicle
SSC 37.5
SSC 75
SSC 150
TH
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
Con
MPTP
MPTP+SSC 37.5 mg/kg
MPTP+SSC 75 mg/kg
MPTP+SSC 150 mg/kg
K
Density of Striatum (%)
(Normalization)
120
100
80
60
40
20
0
##
*
**
**
L
Number of TH+ cells
200
150
100
50
0
##
*
**

도면10


A
Grade 0
B
Grade 0
C
Grade 1
D
Grade 2
E
Grade 2
F
Grade 3
G
Grade 4
H
Grade 5
I
Grade 6

도면11


A
EAE (n=5)
EAE+SSC 37.5 (n=5)
EAE+SSC 75 (n=5)
EAE+SSC 150 (n=5)
Clinical score
Day after immunization
B
Sum of clinical score
##
*
N.D.
Con (n=5)
EAE (n=5)
EAE+SSC 40 (n=5)
EAE+SSC 80 (n=5)
EAE+SSC 150 (n=5)