



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0027438

(43) 공개일자

2014년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0009429(분할)

(22) 출원일자

2014년01월27일

심사청구일자

2014년01월27일

(62) 원출원

특허 10-2012-0075972

원출원일자

2012년07월12일

심사청구일자

2012년07월12일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

김선여

서울특별시 강남구 남부순환로 3032, 105동 603호 (대치동, 미도아파트)

강동호

서울특별시 마포구 신수로 107, 103동 1803호 (신수동, 신촌삼익아파트)

김슬아

경상남도 김해시 가야로451번길 9, 104동 201호 (동상동, 롯데캐슬가야1단지아파트)

(74) 대리인

유수미

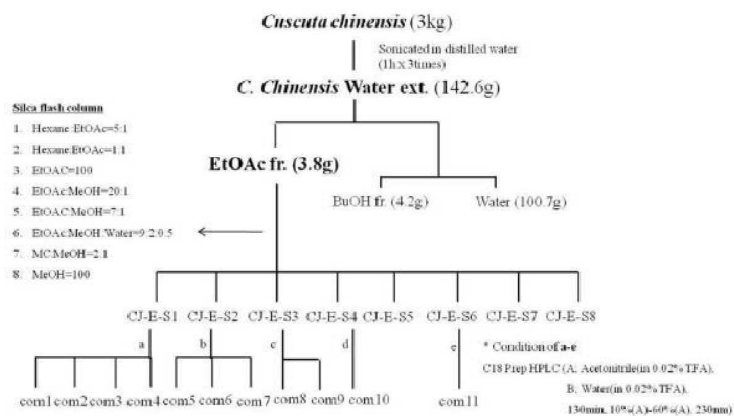
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 토사자 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 토사자 추출물 및 이로부터 분리된 화합물은 신경성장인자의 분비를 유도하여 신경세포의 성장을 도움으로써 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물 또는 건강기능식품에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

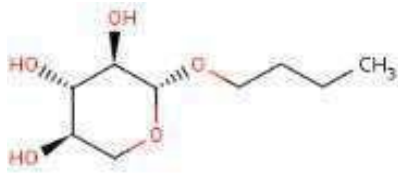


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 부틸 β-D-자일로사이드(butyl β-D-xyloside)을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물:

[화학식 1]



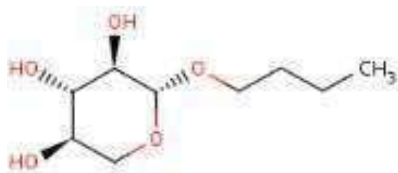
청구항 2

제1항에 있어서, 퇴행성 뇌질환이 알츠하이머병, 파킨슨씨병 또는 노인성 치매인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1의 부틸 β-D-자일로사이드(butyl β-D-xyloside)을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 개선 또는 예방용 건강기능식품:

[화학식 1]



청구항 4

제3항에 있어서, 퇴행성 뇌질환이 알츠하이머병, 파킨슨씨병 또는 노인성 치매인 것을 특징으로 하는 건강기능 식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 토사자 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 경제구조의 선진화 및 출산율의 저하와 함께 의료기술의 발달로 평균수명이 연장되어 노인 인구가 급증하는 고령화 사회가 되면서 노인성 질환이 늘고 있다. 특히 퇴행성 신경계 뇌질환인 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 파킨슨씨병(Parkinson's disease, PD) 등은 사회적 이슈로 크게 부각되고 있다. 하지만, 현재 이러한 질환에 대해서 현대의학의 발달에도 불구하고 아직까지 그 병리기전 조차 명확히 밝혀지지 않았고, 단지 증상의 진행을 늦추거나 완화시키는 수준에 머물러 있다.

[0003] 신경계에서 신경세포의 성장, 분화 및 사멸은 각기 정상적인 발생과 조직의 고유한 기능 확립 및 항상성 유지에

중요한 조절과정이지만, 연령이 높아질수록 노화가 진행됨에 따라 이러한 기능이 점차 약해짐으로써 퇴행성 신경계 뇌질환으로 발전하게 된다. 신경계 뇌질환에 의해 손상된 신경세포의 재생 및 성장에 영향을 줄 수 있는 요인은 여러 가지가 있지만, 그 중에서도 척추동물의 중추신경계(central nervous system, CNS) 및 말초신경계(peripheral nervous system, PNS)에서 신경세포의 형질 및 기능의 발달, 유지를 하는 신경영양인자들(neurotrophic factors, NFs), 즉 신경성장인자(nerve growth factor, NGF), 뇌 유래 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor), 신경인자 NT-3(neurotrophin-3) 등이 있으며, 이 중에서 특히 신경성장인자인 NGF에 의한 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다.

[0004] 신경성장인자인 NGF는 1966년에 레비-몬탈치니(Levi-Montalcini)에 의해서 처음으로 마우스 육종에서 분리 및 발견되었다[Levi-Montalcini, *Harvey Lect*, **60**, pp217-259, 1966]. NGF의 최근까지 알려진 기능은 신경세포의 분열 및 성장을 촉진하고 퇴화에 의한 사멸을 억제한다고 보고되었고[Tuszynski M. H. et al., *Exp. Neurol.*, **137**, pp157-173, 1996; Barde Y. A., *Neuron*, **2**, pp1525-1534, 1989; Thoenen H. et al., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **109**, pp145-178 1987], 절삭에 의해서 유도된 퇴행성 및 노화에 따른 신경세포외측에 대한 전뇌의 콜린성 신경세포를 보호한다고 알려져 있다[Hefti f. et al., *Brain Res.*, **293**, pp305-311, 1984]. 또한 외부에서 주입한 NGF가 말초신경 손상 후 발생학적 변화를 약화시킨다는 보고[Zettler C. et al., *Brain Res.*, **538**, pp251-262, 1991]에 의하면, NGF는 신경손상 후 신경 재생과정에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다.

[0005] 그럼에도 불구하고, NGF는 분자량의 크기 때문에 뇌의 BBB(blood brain barrier)를 통과하지 못해서 외부에서의 유입이 어렵기 때문에 직접적으로 퇴행성 뇌질환의 발병으로 인한 뇌의 NGF 분비기능 저하 및 신경세포의 사멸 증상을 치료하지는 못한다. 따라서, 뇌에서의 신경성장인자 합성을 증가시키거나 나아가서는 신경성장인자와 유사작용을 하는 물질의 개발이 시급한 실정이다.

[0006] 한편, 토사자는 메꽃과에 속하는 한해살이 덩굴성 식물인 새삼의 씨로서 동아시아 각지에 분포하며, 신과 간을 보기하고 시력의 개선 기능을 갖는 예로부터 상용되어 온 한약재로, 최근 보고된 논문에 의하면 성기능 장애의 치료[Quan, Shanghai Scientific and Technical, 2000], 면역기능 강화[Lin M. K. et al., *Immunobiology*, **216**, pp1103-1109, 2011], 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아 DNA 손상 보호[Wang X. M. et al., *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, **21**, pp437-440, 2001]의 기능을 한다고 알려져 있다. 그러나 토사자의 퇴행성 뇌 질환에 대한 치료 효능에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 토사자 추출물이 신경성장인자의 분비를 유도함으로써 신경세포의 성장을 도와서 퇴행성 뇌질환에 효과가 있음을 알아내고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 토사자 추출물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 토사자 추출물로부터 분리된 화합물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 토사자 추출물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0011] 토사자는 메꽃과의 한해살이풀인 새삼의 달걀형의 열매에 들어 있는 씨로서, 본 발명에서 새삼은 갯새삼(*Cuscuta chinensis* Lam.), 미국새삼(*Cuscuta pentagona* Engelm.), 새삼(*Cuscuta japonica* Choisy), 실새삼(*Cuscuta australis* R. Br.) 등을 포함한다.

[0012] 상기 토사자 추출물은 토사자를 물, C₁-C₄의 알코올, 또는 물과 C₁-C₄의 알코올의 혼합용매, 바람직하게는 물로 추출하여 제조할 수 있다.

[0013] 본 명세서에서 C₁-C₄의 알코올은 탄소수 1 내지 4개의 직쇄형 또는 분지형 알코올을 의미하며, 예를 들어

메탄올, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, n-부탄올 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 상기 추출은 공지된 추출방법, 예컨대 냉침, 열수 추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출 등의 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 추출 온도는 당업자가 추출방법에 따라 적절한 온도 범위를 채택할 수 있으며, 예를 들어 20 내지 100℃에서 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 또한, 추출 시간은 추출방법에 따라 당업자가 적절한 추출 시간을 채택할 수 있으며, 이에 국한되지 않으나 약 1 시간 내지 10 일의 범위에서 단회 또는 복수회로 수행될 수 있다. 바람직하게는 상기 추출은 상온에서 약 1시간씩 2-3회 초음파 추출함으로써 수행될 수 있다.

[0015] 생성된 추출물은 통상의 방법에 따라 여과하거나 원심분리하여 불순물을 제거한 액상 형태로 얻거나, 얻어진 액상 형태의 추출물을 통상의 방법에 따라 감압농축 및/또는 건조하여 분말 형태로 얻을 수 있다.

[0016] 상기 토사자 추출물은

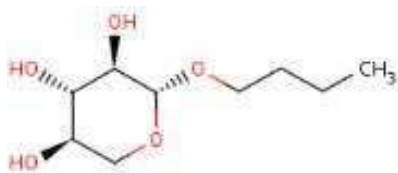
[0017] (i) 토사자를 물로 추출하고 감압농축시켜 토사자의 물 추출물을 수득하는 단계; 및

[0018] (ii) 상기 토사자의 물 추출물을 물에 재현탁하고 에틸아세테이트로 분획하여 에틸에스테르 분획물을 수득하는 단계를 포함하여 제조될 수도 있다.

[0019] 상기 단계 (ii)에서 수득한 에틸에스테르 분획물은 유효성분의 함량이 높으며, 상기 단계 (ii) 다음에 에틸에스테르 분획물을 감압농축 및/또는 건조시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 다른 한편으로, 본 발명은 토사자 추출물로부터 분리된 하기 화학식 1의 부틸 β-D-자일로사이드(butyl β-D-xyloside)(이하, ‘화합물 11’ 이라고도 함)을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 상기 화합물 11은 도 1에서 보듯이, 상기 에틸에스테르 분획물을 컬럼 크로마토그래피한 다음 HPLC하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 상기 에틸에스테르 분획물을 실리카겔 컬럼 상에서 에틸아세테이트, 메탄올 및 물의 혼합 용매를 사용하여 컬럼 크로마토그래피하고, 역상 컬럼 상에서 아세토니트릴과 물을 구배 모드(gradient mode)로 사용하여 고압 액체 크로마토그래피하여 제조할 수 있다.

[0024] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 경구적으로(예를 들면, 복용 또는 흡입) 또는 비경구적으로(예를 들면, 주사, 침착, 이식, 좌약) 투여될 수 있으며, 주사는 예를 들면, 정맥주사, 피하주사, 근육내주사 또는 복강내주사일 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 투여 경로에 따라, 정제, 캡슐제, 과립제, 파인 서브틸라(fine subtilae), 분제, 설하 정제, 좌약, 연고, 주사제, 유탁액제, 현탁액제, 시럽제, 분무제 등으로 제형화될 수 있다. 상기 여러 가지 형태의 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 각 제형에 통상적으로 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체(carrier)를 사용하여 공지기술에 의해 제조될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는 부형제, 결합제, 분해제(disintegrating agent), 윤활제, 방부제, 향산화제, 등장제(isotonic agent), 완충제, 피막제, 감미제, 용해제, 기제(base), 분산제, 습윤제, 현탁화제, 안정제, 착색제 등을 포함한다.

[0025] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약제의 형태에 따라 다르지만, 본 발명의 추출물 또는 화합물을 약 0.01 내지 95 중량%로 포함한다.

[0026] 본 발명의 약제학적 조성물의 구체적인 투여량은 치료되는 사람을 포함한 포유동물의 종류, 체중, 성별, 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 다를 수 있다. 바람직하게는, 경구투여의 경우에는 하루에 체중 1kg당 활성성분

0.01 내지 50 mg이 투여되고, 비경구투여의 경우에는 하루에 체중 1kg당 활성성분 0.01 내지 10 mg이 투여된다. 상기 총 일일 투여량은 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 한번에 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

- [0027] 다른 한편으로, 본 발명은 토사자 추출물 또는 그로부터 분리된 부틸 β-D-자일로사이드를 포함하는 퇴행성 뇌 질환의 개선 또는 예방용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0028] 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액제, 에멀전, 시럽제 등의 경구형 제제 형태이거나, 캔디, 과자, 껌, 아이스크림, 면류, 빵, 음료 등 일반적인 식품에 첨가될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 건강기능식품은 형태에 따라 통상적인 방법으로 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 감미제, 방향제, 보존제, 계면활성제, 윤활제, 부형제 등을 적절히 사용하여 제조될 수 있다.
- [0030] 상기 건강기능식품의 제조에 있어서 본 발명의 추출물 또는 화합물의 함량은 건강기능식품의 형태에 따라 다르지만, 약 0.01 내지 95 중량%의 농도이다. 본 발명의 건강기능식품은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명에 따른 토사자 추출물 및 이로부터 분리된 부틸 β-D-자일로사이드는 신경성장인자의 분비를 유도하여 신경세포의 성장을 도움으로써 퇴행성 뇌질환, 특히 알츠하이머병, 파킨슨씨병 또는 노인성 치매의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물 또는 건강기능식품에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 토사자로부터 토사자 추출물을 수득하고, 토사자의 에틸에스테르 분획물을 분리한 다음, 이로부터 화합물들을 분리하는 공정의 일례를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 실시예 3에서 분리된 화합물 11의 ^1H NMR 스펙트럼이다.
- 도 3은 실시예 3에서 분리된 화합물 11의 ^{13}C NMR 스펙트럼이다.
- 도 4는 실시예 3에서 분리된 화합물 11의 HR-ESI-MS 스펙트럼이다.
- 도 5는 실시예 1에서 수득한 토사자 추출물의 신경성장인자 분비량 및 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 실시예 2에서 수득한 토사자의 에틸에스테르 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물의 신경성장인자 분비량 및 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 실시예 3에서 수득한 부틸 β-D-자일로사이드의 신경성장인자 분비량 및 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 8에서 (A)는 대조군으로 배양액만을 처리했을 때, (B)는 신경성장인자(NGF) 50ng/ml를 처리했을 때, (C), (D) 및 (E)는 C6 세포주에 β-D-자일로사이드를 1, 10 및 100 μM로 각각 처리하여 얻은 조건배지(conditioned media)를 PC12 세포주에 처리하고 4일 동안 배양한 후, 세포의 신경축색돌기의 형태학적 변화를 현미경 100배율로 관찰한 사진이다.
- 도 9에서 (A)는 대조군으로 배양액만을 처리했을 때, (B)는 신경성장인자(NGF) 50ng/ml를 처리했을 때, (C), (D) 및 (E)는 PC12 세포주에 β-D-자일로사이드를 1, 10 및 100 μM로 각각 처리하고 4일 동안 배양한 후, 세포의 신경축색돌기의 형태학적 변화를 현미경 100배율로 관찰한 사진이다.
- 도 10은 배양액만 처리한 군, β-D-자일로사이드를 각각 1, 10 및 100 μM의 농도로 처리한 군에서 단백질 NGF의 발현량을 나타낸 전기영동사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0034] **실시예 1: 토사자 추출물의 제조**

[0035] 건조된 토사자 3kg을 2000ml 비이커에 1kg씩 넣고 증류수 1000ml를 가하여 1시간 동안 초음파 추출하였다. 이 과정을 3번 반복한 후, 얻은 추출액을 여과지로 여과하여 토사자의 찌꺼기를 제거한 다음, 얻은 여과액을 감압 농축하고 동결건조기를 사용하여 건조시켜 142.6g의 토사자 추출물을 얻었다.

[0036] **실시예 2: 토사자의 에틸아세테이트 분획물의 제조**

[0037] 상기 실시예 1에서 수득한 토사자 추출물 142.6g을 300ml의 물에 현탁한 후, 에틸아세테이트 3ℓ를 가하여, 분액 깔대기에 넣고 에틸아세테이트 불용성층(하층)과 에틸아세테이트 가용성층(상층)으로 분획하여 에틸아세테이트 가용부를 수집하였다. 하층(물층)과 동일한 부피의 에틸아세테이트 용매로 상기와 동일한 방법을 5회 반복하여 용액의 색이 없어질 때까지 최대한 에틸아세테이트 층에 용해가 가능한 물질을 얻어낸 후, 동결 건조하여 토사자의 에틸아세테이트 분획물 3.8g을 수득하였다.

[0038] 한편 물 가용성층은 다시 순차적으로 부탄올과 물을 가하여 분획하여, 부탄올 분획물 4.2g과 물 분획물 100.7g을 얻었다.

[0039]

[0040] **실시예 3: 토사자의 에틸아세테이트 분획물로부터 활성성분의 분리**

[0041] 상기 실시예 2에서 수득한 토사자의 에틸아세테이트 분획물 3.8g을 하기 용출용매로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(25cm × 4cm, 230 - 400 (40 - 63μm, 60 Å) mesh, Merck)하여 8개의 소분획을 얻었다.

- [0042] 1. hexan:에틸아세테이트 = 5:1
- [0043] 2. hexan:에틸아세테이트 = 1:1
- [0044] 3. 에틸아세테이트 = 100
- [0045] 4. 에틸아세테이트:메탄올 = 20:1
- [0046] 5. 에틸아세테이트:메탄올 = 7:1
- [0047] 6. 에틸아세테이트:메탄올:물 = 9:2:0.5
- [0048] 7. 메틸렌클로라이드:메탄올 = 2:1
- [0049] 8. 메탄올 = 100

[0050] 에틸아세테이트:메탄올:물 = 9:2:0.5을 용출용매로 사용하여 얻은 소분획(CJ-E-S6)을 RP-18 정제 고압 액체 크로마토그래피(RP-18 Prep HPLC)하여 화합물을 분리하였다. HPLC 조건은 다음과 같았다.

[0051] 컬럼: 250 × 21.20mm, 10 μM, PhenomenexTM Luna C-18 (2)

[0052] 용출용매: 10-60% 기울기 MeCN/H₂O를 포함하는 0.02% TFA, 10mL/분

[0053] 분리된 화합물 11(2.6mg)을 NMR 및 HR-ESI-MS를 이용하여 동정한 결과, 부틸 β-D-자일로사이드(butyl β-D-xyloside)로 확인되었다[Philippe D. et al., *Bioengineering*, **43**, pp1075-1080, 1993].

[0054] **참조예 1: 세포주 배양**

[0055] 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 마우스 유래 신경교종세포 C6 세포주 및 갈색세포종 PC12를 각각 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin) 및 10% 우태혈청(fetal bovine serum)을 함유한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지(Gibco BRL사, 미국)와 1% 페니실린-스트렙토마이신, 10% 우태혈청 및 2% 말혈청(horse serum)을 포함한 RPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium) 1640 배지에서 배양하였다.

[0056] **참조예 2: 시료 제조**

[0057] 실시예 1, 2 및 3에서 수득한 토사자 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 부틸 β-D-자일로사이드를 각각 DMSO (디메틸설폭사이드, dimethyl sulfoxide, Sigma사, 미국)에 녹여서 최종농도가 100mg/ml이 되도록 한 후, 1회용 주사기를 이용하여 막여과지(0.2μm, millipore)를 통과시켜 무균상태로 제조하였다.

[0058] **실험예 1: 신경성장인자 분비량 측정 및 MTT 검정**

[0059] 각 시료의 신경교종세포(glioma)에서의 신경성장인자(NGF) 분비량을 측정하기 위해서, C6 세포주를 24웰 플레이트의 각 웰에 1×10^5 개의 개수로 분주하고 24시간 경과 후, 기존의 배지를 제거하고 다양한 농도의 시료가 첨가된 2% 우태혈청의 DMEM 배지 500μl로 교환해 주었으며, 다시 24시간 동안 배양한 후 배지를 얻었다.

[0060] 얻은 배지를 1500rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액만을 모아서 Total NGF DuoSet/kit(R&D systems)를 이용하여 신경성장인자 분비량을 측정하였다.

[0061]

[0062] 상층액을 얻고 남은 세포를 사용하여 세포 생존율을 측정하기 위해서 각 웰에 농도 0.05mg/ml의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma사, 미국) 용액을 400μl씩 넣고, 1시간 동안 세포배양기에서 배양하면서 환원반응을 유도한 다음, MTT 용액을 제거하고 DMSO를 첨가하여 포르마잔(formazan) 결정을 완전히 용해시켰다. 생성된 용액을 96웰 플레이트의 각 웰에 200μl씩 넣고 ELISA 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0063] 실험 결과를 도 5 내지 도 7에 나타내었다. 도 5 내지 도 7에서 보듯이, 토사자 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 부틸 β-D-자일로사이드는 세포독성 없이 신경성장인자 분비 유도 효능이 우수한 것으로 나타났다.

[0064] **실험예 2: 신경축색돌기 성장 측정**

[0065] PC12 세포주를 배양하여 직경 60mm의 배양용기(TPP사, 스위스)에 2×10^4 개의 개수로 분주하고 24시간 후에, 실험예 1에서처럼 C6 세포주에 각각의 농도별로 β-D-자일로사이드를 처리하여 얻은 배지를 처리하고, 24시간이 지난 후부터 매일 일정한 시간에 위상차 현미경(CK-25, 올림푸스사, 미국)을 이용하여 세포체로부터 뻗은 신경축색돌기를 관찰하고, 현미경 사진을 찍은 후에 사진 상에서 그 길이를 측정하였다.

[0066] 신경축색돌기가 보이지 않으면 0으로, 세포중심체와 길이가 같으면 1로, 세포중심체 지름의 2배 길이로 성장하면 2로 정하고, 그 이상의 길이가 되면 3으로 수치화하였다. 이때 대조군은 신경성장인자 50ng/ml를 처리한 군으로 하였고, 측정값은 평균±표준편차이며, 각 군에 대한 값은 대조군과 각 시료군을 비교하여 스튜던트 t-검정법으로 분석하였다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

[0067] 도 8에서 (A)는 대조군으로 배양액만을 처리했을 때, (B)는 신경성장인자(NGF) 50ng/ml를 처리했을 때, (C), (D) 및 (E)는 C6 세포주에 β-D-자일로사이드를 1, 10 및 100 μM로 각각 처리하여 얻은 조건배지(conditioned media)를 PC12 세포주에 처리하고 4일 동안 배양한 후, 세포의 신경축색돌기의 형태학적 변화를 현미경 100배율로 관찰한 사진이다.

[0068] β-D-자일로사이드를 PC12 세포주에 각각 1, 10 및 100 μg/ml이 되게 처리하고, 신경축색돌기의 측정은 대조군 대 비율로 나타내었으며, 대조군은 신경성장인자 50ng/ml를 처리한 군으로 하였다.

[0069] 도 9에서 (A)는 대조군으로 배양액만을 처리했을 때, (B)는 신경성장인자 (NGF) 50ng/ml를 처리했을 때, (C), (D) 및 (E)는 PC12 세포주에 β-D-자일로사이드를 1, 10 및 100 μM로 각각 처리하고 4일 동안 배양한 후, 세포의 신경축색돌기의 형태학적 변화를 현미경 100배율로 관찰한 사진이다.

[0070] 도 8 및 도 9에서 보듯이, β -D-자일로사이드를 처리한 군은 대조군과 비교하여 신경축색돌기의 성장이 우수한 것으로 나타났다.

[0071] 실험예 3: 신경성장인자 단백질 발현 확인

[0072] C6 세포주를 직경 60mm의 배양용기에 5×10^5 개의 개수로 분주하고 24시간 후에, β -D-자일로사이드를 농도별로 처리하고 24시간이 지난 후, 상층액을 제거하고 남은 세포를 배양용기에서 트립신-EDTA(Gibco BRL사, 미국)와 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)를 이용하여 이탈시킨 후, 7500rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다.

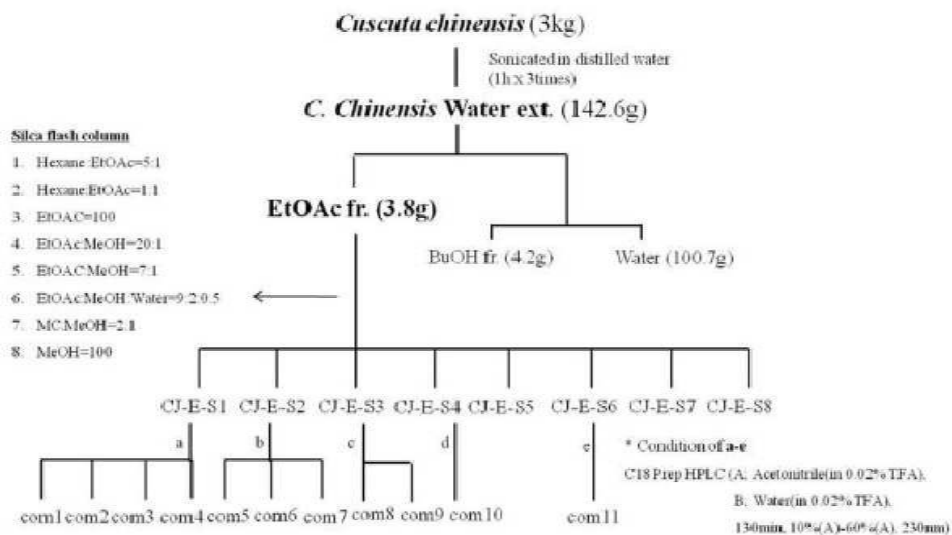
[0073] 세포 침전물 각각에 RIPA(Radio Immuno Precipitation Assay) (150mM sodium chloride, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate) 버퍼와 단백질 1% 가수분해효소 억제제를 포함하는 용해 완충용액(lysis buffer)을 $60\mu\text{l}$ 씩 넣어서 세포를 용해시킨 후, 14000rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액만을 모아서 Brad-ford법으로 정량하여 계산한 후, 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔에 총 단백질량이 $40\mu\text{g}$ 이 되도록 전기영동시킨 후에 항체(NGF, α -tubulin)를 넣고 4°C에서 방치시켰다. 12시간 후 2차 항체(HRP conjugate)를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, ECL로 감광하여 필름을 현상하였다.

[0074] 비교단백질로는 분자량이 50kDa인 α -튜불린(α -tubulin)을 사용하였고, 이것을 기준으로 배양액만 처리한 군, β -D-자일로사이드를 각각 1, 10 및 $100\mu\text{M}$ 의 농도로 처리한 군을 비교한 결과를 도 10에 나타내었다.

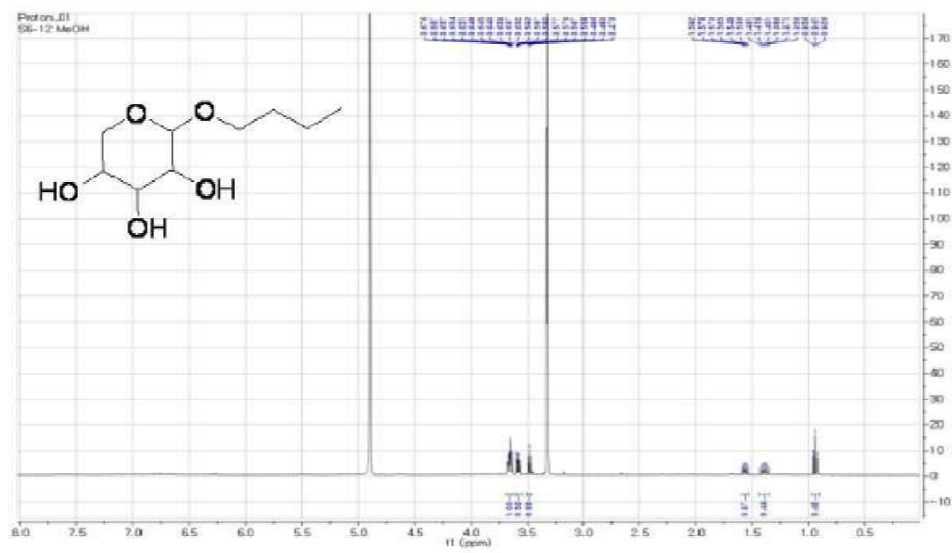
[0075] 도 10으로부터 β -D-자일로사이드가 C6 세포에서 단백질 NGF의 발현을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

도면

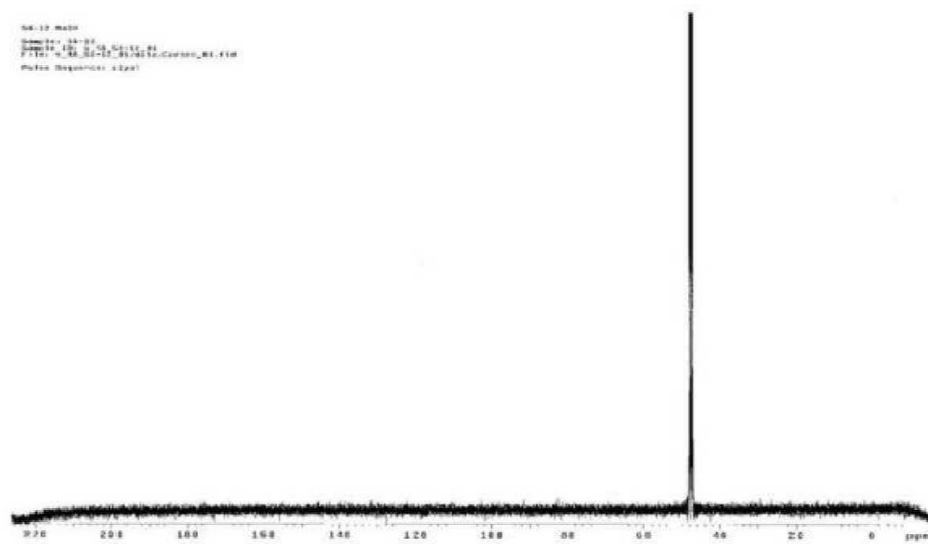
도면1



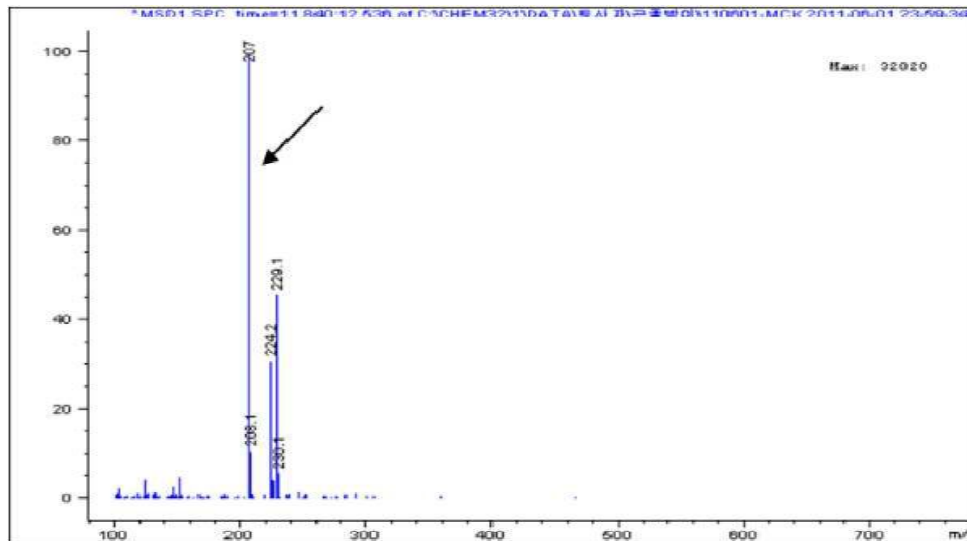
도면2



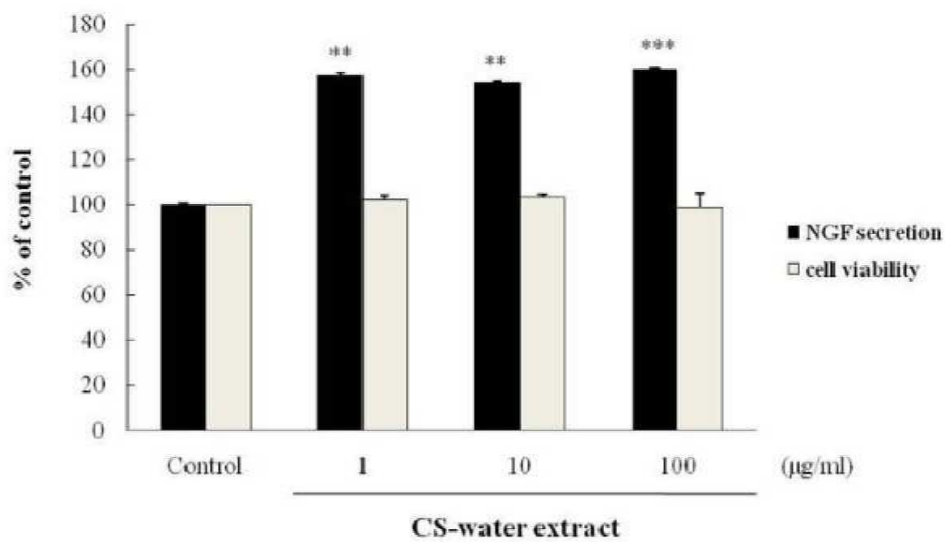
도면3



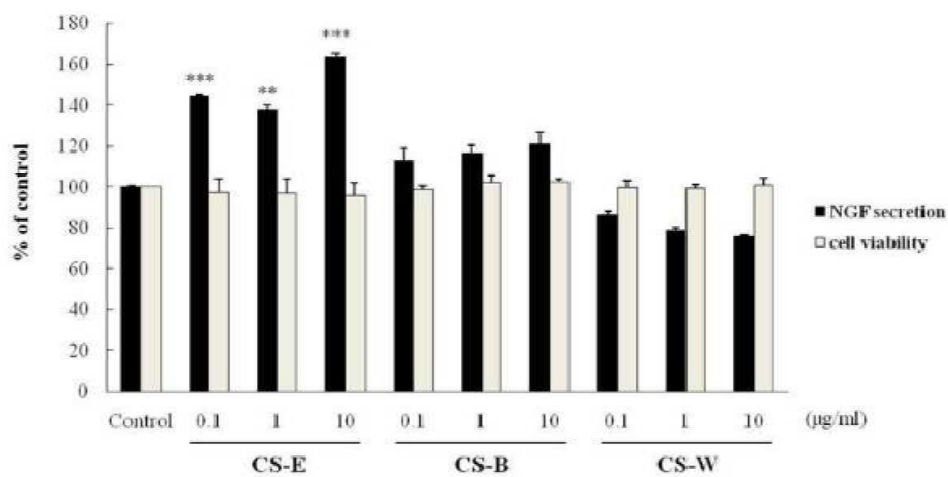
도면4



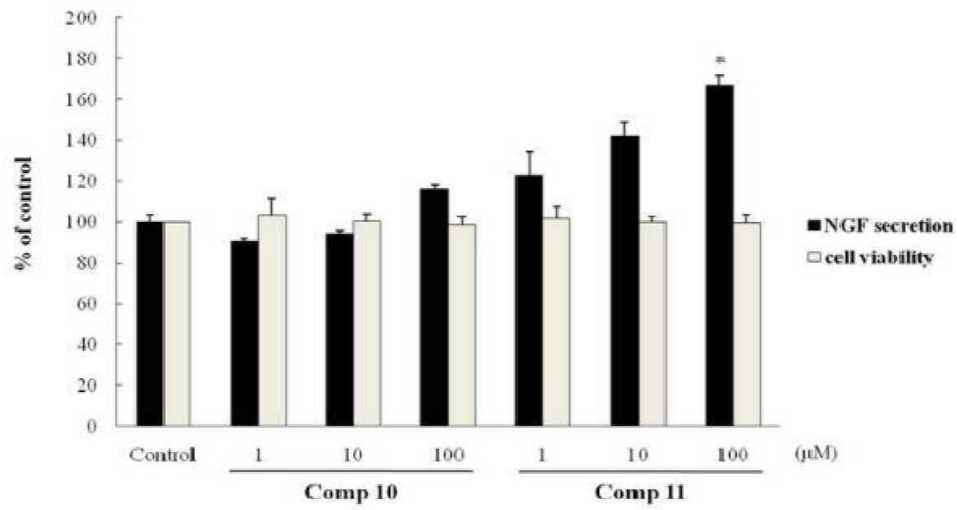
도면5



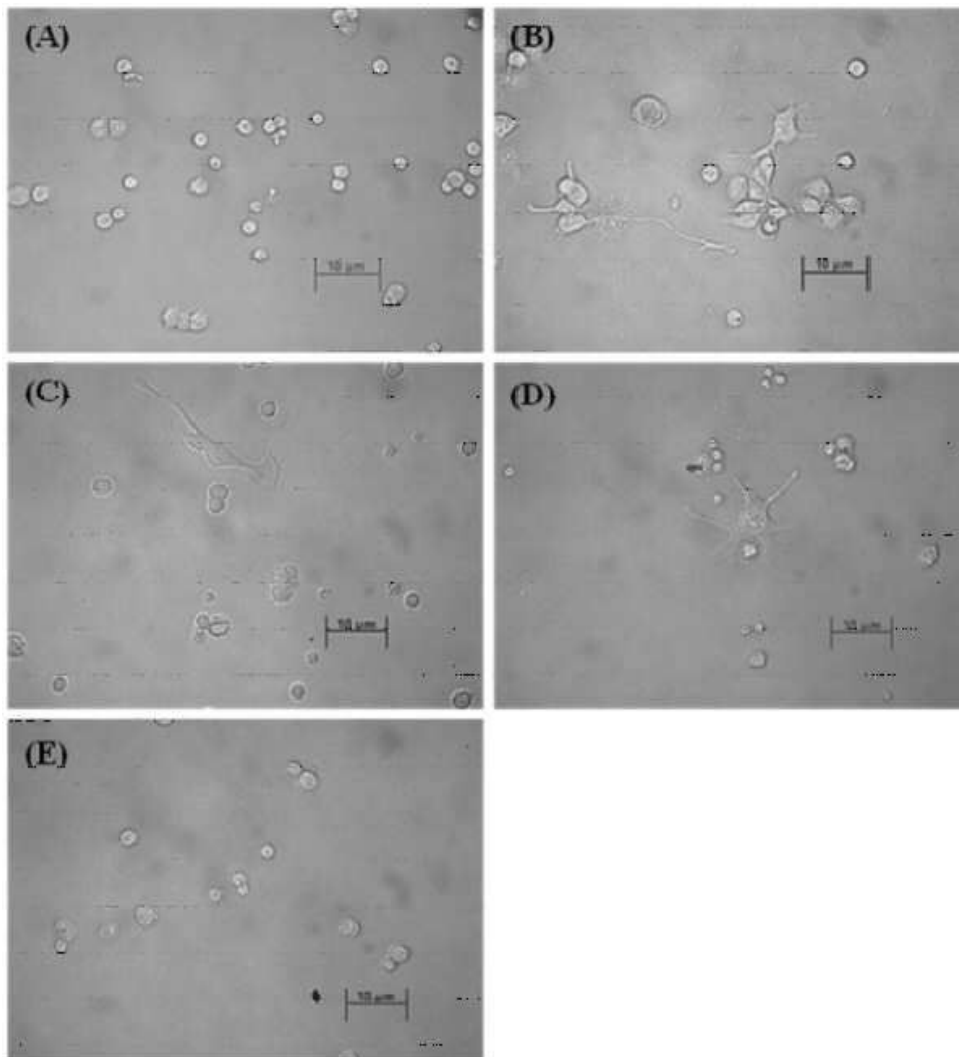
도면6



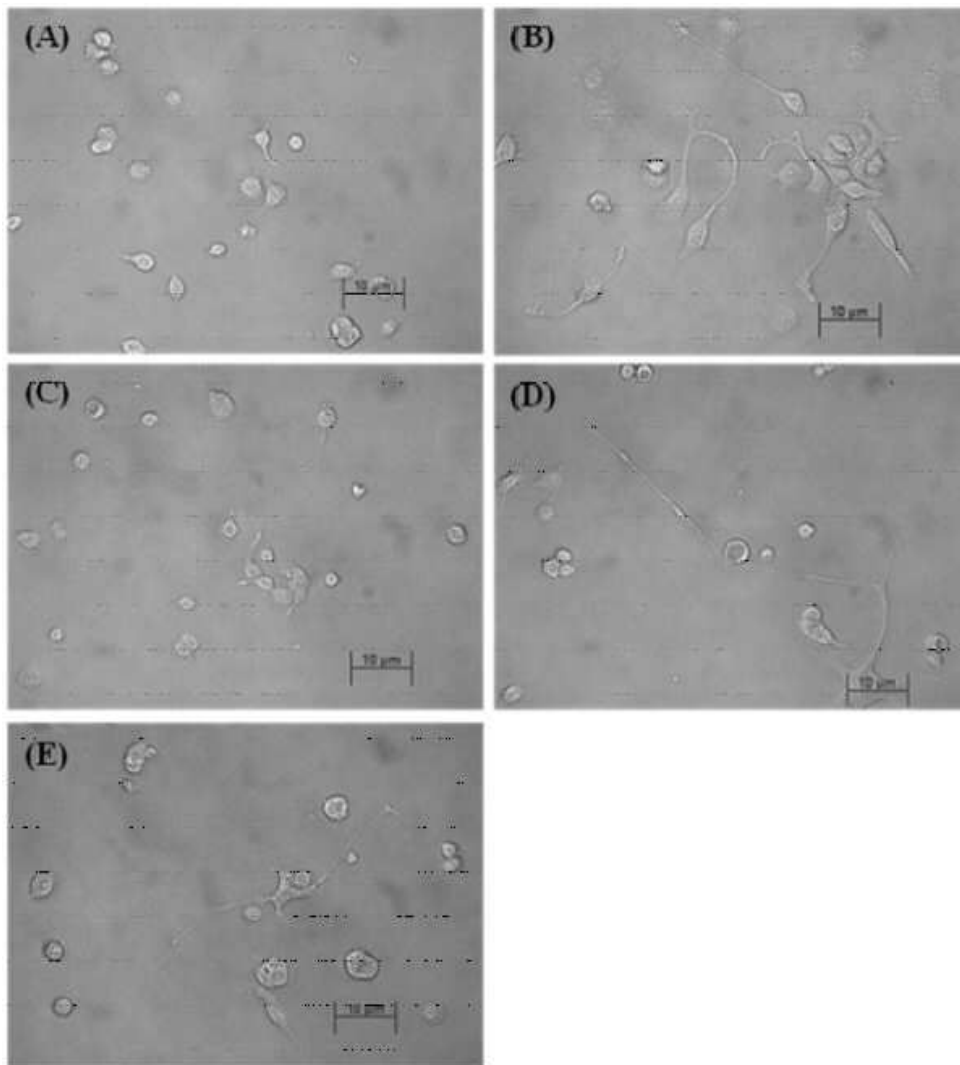
도면7



도면8



도면9



도면10

