



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0002836
(43) 공개일자 2010년01월07일

(51) Int. Cl.

A61K 36/68 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0062877

(22) 출원일자 2008년06월30일

심사청구일자 2008년06월30일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

신동훈

서울시 강남구 대치동 670 동부센트레빌 101-2103

최수정

서울시 서대문구 연희3동 88-25 리치빌 301호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

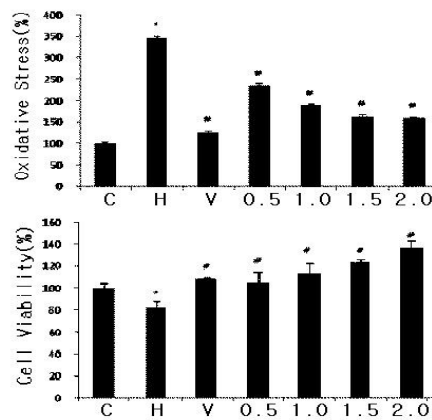
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 뇌 신경 세포 보호물질을 포함하는 질경이 추출물을포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 뇌 신경 세포 보호물질을 포함하는 질경이 추출물을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 뇌 신경 세포 보호물질로서 4-비닐-2-메톡시페놀을 포함하고, 산화적 스트레스(oxidative stress) 유발을 감소시키며 세포 활성(cell viability)을 증대시킬 뿐만 아니라 치매 모델 동물실험의 대안행동(alternative behavior) 및 스텝쓰루 레턴시(step through latency) 수동회피검사에서 기억 학습 능력을 유지시키는 질경이 추출물이 포함된 인체에 무해한 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이주현

서울시 동대문구 전농2동 103-382호 3층

조홍연

서울시 성북구 돈암1동 동부센트레빌 아파트 103동 1002호

김혜경

충남 서산시 해미면 대곡리 360 한서대학교 식품생물공학과

김영준

서울시 강남구 도곡동 역삼한신아파트 1동 502호

허호진

경상남도 진주시 가좌동 900 경상대학교 식품공학과

김은기

인천광역시 남구 용현동 253번지 인하대학교 생물공학과

김복용

강원도 춘천시 퇴계동 856-3 퇴계농공단지내

특허청구의 범위

청구항 1

질경이 추출물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신경질환은 아밀로이드 베타 펩타이드-유도 산화적 스트레스에 의한 뇌 신경 세포 손상이 유발되는 질환인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신경질환은 알츠하이머병인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 질경이 추출물은 에탄올 추출물인 조성물.

청구항 5

4-비닐-2-메톡시페놀을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 4-비닐-2-메톡시페놀은 질경이 추출물에서 획득된 것인 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 신경질환은 아밀로이드 베타 펩타이드-유도 산화적 스트레스에 의한 뇌 신경 세포 손상이 유발되는 질환인 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 신경질환은 알츠하이머병인 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서, 4-비닐-2-메톡시페놀은,

- i) 질경이 추출물에 극성이 다른 유기용매를 이용하여 분획하고 그 분리물을 수득하는 단계;
- ii) 상기 i) 단계에서 수득한 분리물을 오픈 실리카겔 컬럼을 통해서 뇌손상 저해 활성 성분을 수득하는 단계; 및
- iii) 상기 ii) 단계에서 수득한 활성 회분을 역상 컬럼을 이용한 HPLC를 사용하여 4-비닐-2-메톡시페놀을 수득하는 단계를 포함하는 제조 방법에 의하여 얻어진 것인 조성물.

청구항 10

질경이 추출물을 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물.

청구항 11

4-비닐-2-메톡시페놀을 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 뇌 신경 세포 보호물질을 포함하는 질경이 추출물을 포함하는 퇴행성 신경질환용 조성물에 관한 것으

로, 더욱 상세하게는 질경이가 가지는 아밀로이드 베타 펩타이드-유도 산화적 스트레스에 의한 뇌 신경 독성에 대하여 저해기능을 갖는 유효성분을 포함하는 질경이 추출물을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 최근 우리나라는 평균수명의 연장 및 출산을 감소로 인하여 65세 이상 노령인구가 2000년 기준 전체인구의 7.2%로 고령화 사회에 이미 진입을 하였고, 이러한 추세라면 2019년에는 14.4%로 고령사회에, 2026년에는 20.0%로 초고령 사회에 도달할 것으로 전망되고 있다. 이러한 사회적 조건의 변화에 의해, 과거 주요한 사망원인인 전염성 질병에 의한 사망자 수는 급격하게 줄어들고 있는 반면에, 암, 뇌혈관질환, 대사증후군에 의한 사망자 수는 꾸준히 증가하고 있다. 특히, 평균수명이 증가하고 사회의 고령화가 진행되면서 노화에 관한 관심 및 노화와 관련된 질병 특히, 뇌신경세포 손상과 관련된 퇴행성 신경질환 등에 대한 관심이 증대되고 있다. 미국의 경우 알츠하이머병(Alzheimer's disease, 이하 'AD'라 함)은 전체 인구의 사망 원인 중 심혈관질환, 악성종양 및 뇌졸중에 이어 제4위를 차지하며, 치료경비 면에서도 암 및 심장병에 이어 제 3위를 점유하고 있어 사회 경제적으로 미치는 영향도 상당한 것으로 보인다.
- <3> 이러한 알츠하이머병의 특징은 환자의 사후 뇌의 세포 조직병리학 검사로 확인되어지는 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangles)과 노인반(amyloid plaques)을 형성하는 것으로, 이는 tau 단백질의 과다한 인산화와 아밀로이드 베타 펩타이드(amyloid β , 이하 ' $A\beta$ '라 함)의 축적으로 각각 일어난다고 알려져 있다.
- <4> 유전성 AD 환자에서는 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, 이하 'APP'라 함) 또는 프레세닐린(presenilin) 유전자의 돌연변이로 A β 가 증가하고 모두 AD로 진행되는 것으로 보아 $A\beta$ 가 AD를 유발하는 가장 중요한 인자로 알려져 있다. $A\beta$ 는 전구물질인 APP를 분해 효소인 베타 시크리타제(BACE1, beta-site APP-cleaving enzyme 1)가 먼저 자르고, 생성된 C 말단을 프레세닐린을 포함한 감마 시크리타제가 잘라서 생긴 40 또는 42개의 단백질 조각을 이루게 된다. 뇌신경의 불활성화와 괴사는 APP의 비정상적 대사산물인 $A\beta$ 에 의한 세포독성으로 생각되어진다. 이의 신경독성은 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인한 뇌신경세포 파괴에서 시작된다. AD에서 뇌신경세포 괴사의 원인은 산소 유리 라디칼(oxygen free radical)의 생성, 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)과 같은 산화적 손상(oxidative injury)이 뇌신경세포 파괴 및 병인론(pathogenesis)과 관련되어 있을 것으로 추정된다.
- <5> 최근의 AD 연구는 $A\beta$ 에 의한 뇌세포 파괴, 그리고 이들 단백질의 구조, 생리작용 및 뇌 안에서의 축적에 의한 신경전달물질 아세틸콜린(acetylcholine, ACh)의 수준(level) 감소 등이 중심이 되고 있다. 현재까지 AD 약물 개발의 주 표적은 병에서 나타나는 신경전달물질 이상으로 콜린성 신경세포를 표적으로 한 콜린에스테라제 억제제들(Aricept, Exelon, Reminyl 등)과 글루타메이트 길항제인 메만틴(Memantine)이 FDA 승인을 얻어 현재 시판 중에 있다. 하지만 이들 약물은 일시적으로 증상만 완화시킬 뿐이므로 병을 근본적으로 치료하거나 병의 진행 자체를 억제하는 약물 개발 기술이 절실히 요구되고 있다.
- <6> 한편, 질경이(*Plantago asiatica*)는 질경이과(Plantaginaceae)에 속하는 다년생 초본으로 우리나라, 중국 및 일본 등의 동아시아와 중앙아시아 등지에 자생하는 약초로 노방초라고 할만큼 생명력이 강하고 번식력이 우수하다. 꽃이 필때의 전초를 말린 것을 차전초(車前草), 씨를 차전자(車前子)라 하며 한방에서는 강력한 이뇨제로 신장염, 방광염 및 요도염들에 널리 사용되어 왔으며, 무기질, 단백질, 비타민류 및 다당류 등이 많이 함유되어 있으며, 이들 성분들은 항염증작용에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- <7> 질경이의 주요 생리활성 성분으로 이리도이드 글리코사이드(iridoid glycoside)인 오큐빈(aucubin)과 플란타글루코사이드(plantaglucoside), 각종 스테롤(sterol)류, 아데닌(adenin), 콜린(choline), 점액질(mucilage) 및 각종 지방산이 함유되어 있는 것으로 밝혀져 있다. 질경이와 관련된 주요 연구로 보간제로 작용하는 질경이의 주요 생리 활성성분으로 H_2O 분해으로부터 오큐빈(aucubin)을 분리·확인하였으며, 또한 이 성분의 항균작용, 담즙 분비작용, 완하작용, 간독성 방어 작용 및 혈압 강하 작용 등이 보고된 바 있다. 또한 질경이를 포함한 여러 종류의 생약제를 이용한 항암효과와 간장 내 활성 산소 생성과 항산화 효소계 조절효과에 관한 연구가 있었으나, 질경이 추출물을 아밀로이드 베타 유도 산화적 스트레스에 의한 뇌 신경세포의 독성 저해 효과에 대한 연구결과는 거의 없었다.
- <8> 이에 본 발명자들은 고령화 질환 중 그 심각성이 날로 증대되는 뇌세포 괴사를 포함한 뇌질환의 예방 및 치료용 파이토케미칼(phytochemicals)을 탐색하고 이를 의약, 식품의약 및 건강기능식품의 원료로 소재화함에 있어 식용식물자원을 탐색 대상으로 하여 최종 물질의 안전성을 확보함과 동시에 건강기능식품의 소재로 실용화될 확률을 높이하고자 하였다. 이에 수십 종의 국내산 식·약용류 식물을 대상으로 $A\beta$ 에 의한 산화적 스트레스로부터

뇌신경 세포에 보호기능을 갖는 천연신소재를 탐색하던 중, 고유 식용식물자원인 질경이로부터 아밀로이드 베타 펩타이드-유도 산화적 스트레스에 의한 뇌신경 세포 손상 보호물질을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

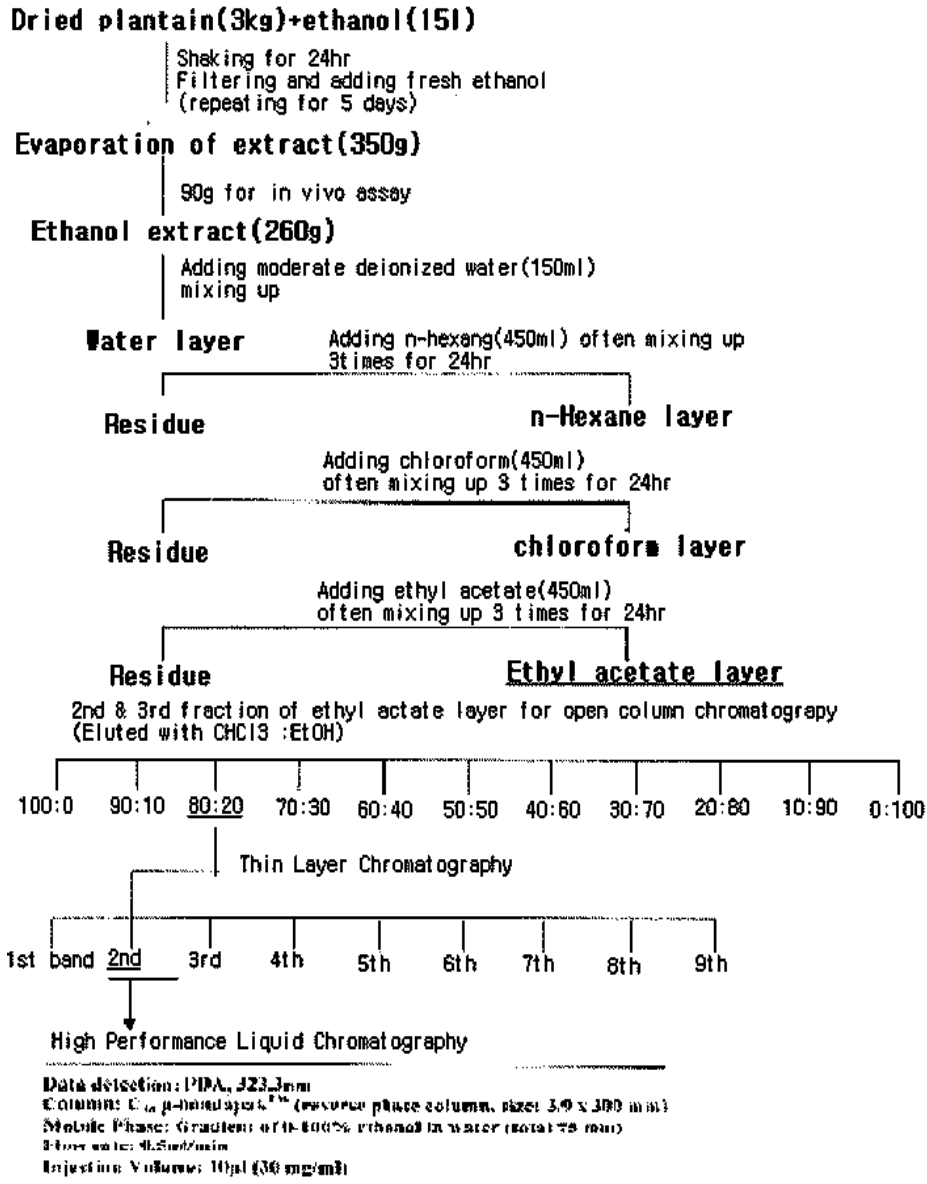
해결 하고자하는 과제

- <9> 본 발명의 목적은 질경이 추출물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- <10> 본 발명의 다른 목적은 4-비닐-2-메톡시페놀을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- <11> 본 발명의 또 다른 목적은 질경이 추출물 또는 4-비닐-2-메톡시페놀을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <12> 하나의 양태로서, 본 발명은 질경이 추출물 또는 4-비닐-2-메톡시페놀을 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- <13> 이하 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- <14> 본 발명에서 퇴행성 신경질환이란, 신경 특히, 뇌신경과 관련된 여러 가지 질병을 총칭하는 용어를 의미한다. 바람직하게는 상기 퇴행성 신경 질환은 아밀로이드 베타 펩타이드-유도 산화적 스트레스에 의한 뇌 신경 세포 손상이 유발되는 질환을 일컬으며, 구체적으로는 알츠하이머병, 치매, 근위축측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 파킨슨씨병(Parkinson's disease), 심근경색증(myocardial infarction) 또는 헌팅턴병일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 알츠하이머병이다.
- <15> 구체적으로, 알츠하이머병 모델의 신경세포의 미토콘드리아에 아밀로이드 베타가 축적됨이 발견되었고, 미토콘드리아에서 활성 산소의 생성이 증가되면서 산화에 의한 손상(oxidative damage)이 유발됨이 보고되었으며, 이러한 산화에 의한 손상이 알츠하이머병의 발병과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다(Manczak *et al.*, Hum Mol Genet. 15(9): 1437-49); Reddy, *J Neurochem.* 96(1): 1-13(2006)).
- <16> 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 질경이 추출물은 당해 업계에 널리 공지된 추출방법을 제한 없이 사용하여 제조될 수 있다. 따라서 추출시간, 용매 및 온도 등의 조건은 당업자가 적절히 조절할 수 있다. 바람직하게는 에탄올을 사용하여 추출한다.
- <17> 이와 같은 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 질경이 추출물은 아밀로이드 베타 펩타이드-유도 산화적 스트레스에 의한 신경 세포 손상에 대한 보호활성을 갖는다.
- <18> *In vitro* 상에서, 질경이 에탄올 추출물을 극성에 따라 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 순으로 각각 분획한 후 산화적 스트레스 유발정도 및 MTT 환원 어세이를 통해 세포 활성(viability)를 측정된 결과 에틸아세테이트의 분획이 가장 우수한 신경세포 보호활성을 보임을 확인하였다.
- <19> 또한 *in vivo* 상에서, 마우스에 아밀로이드 베타를 주사하여 치매모델을 확립한 후 질경이 추출물을 400 mg/kg 및 800 mg/kg로 투약한 군의 경우 대안행동(alternative behavior) 및 스텝쓰루 레턴시(step through latency) 수동회피검사에서 치매군보다 우수한 효과를 확인하였다.
- <20> 상기 질경이 추출물에 함유되는 아밀로이드 베타 펩타이드-유도 산화적 스트레스에 의한 신경 세포 손상에 대한 보호활성을 갖는 유효성분은, 4-비닐-2-메톡시페놀이며 이 또한 본 발명에 따른 조성물에 포함될 수 있다. 4-비닐-2-메톡시페놀은 이에 제한되는 것은 아니나, 하기와 같은 방법으로 추출·분리하여 제조된다.
- <21> 먼저 질경이(*Plantago asiatica*)를 마쇄하여 얻은 질경이 조말에 에탄올을 가하여 질경이 에탄올 추출물을 조제하고, 에탄올 추출물에 극성이 다른 유기용매를 이용하여 분획하고 그 분리물을 수득하는 단계; 상기 단계에서 수득한 물질을 오픈 실리카겔 컬럼을 사용하여 뇌손상 저해 활성 성분을 수득하는 단계; 및 이전 단계에서 수득한 활성 획분을 역상 컬럼을 이용한 HPLC를 사용하여 분리하는 단계를 포함하여 아밀로이드 베타 펩타이드-유도 산화적 스트레스에 의한 뇌 신경 독성 저해 활성을 갖는 질경이 에탄올 추출물 제조 방법에 의한다. 이러한 제조방법을 도식화하면 다음과 같다.

<22> [반응식1]



<23>

<24> 상기 추출물로서 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알콜 또는 부탄올 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 에탄올이다. 또한 극성이 다른 유기용매로 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트를 사용한다.

<25> 한편, 본 발명에 따른 퇴행성 신경질환예방 또는 치료용 조성물은 질경이 추출물 또는 4-비닐-2-메톡시페놀외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 더 나아가 본 발명의 조성물은 질경이 추출물 또는 4-비닐-2-메톡시페놀과 함께 신경 세포 보호 및 신경독성 억제 또는 예방의 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

<26> 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액 및 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있으며, 이들 약제학적으로 허용되는 담체, 약제학적 조성물의 제제, 이들 제제를 제조하는 방법의 실례는 공지된 방법에 의한다.

- <27> 이들 약학적 조성물은 본 명세서에 기술된 바와 같이, 신경퇴행 및/또는 이와 연관된 증상을 비롯한 다양한 질환을 치료하기 위하여 본 발명의 질경이 추출물을 개체에 투여하는데 유용하다. 질경이 추출물은 이런 약제학적 조성물이 투여되는 개체에서 퇴행성 신경질환을 치료하는데 유효한 양으로 제공되며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 상기한 바와 같이, 당업자는 적절한 양을 편의하게 결정할 수 있다.
- <28> 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내, 근육 내, 혈관 내 또는 피하투여) 할 수 있으며, 바람직하게는 경구 또는 정맥 내 투여이다.
- <29> 경구투여를 위해서, 질경이 추출물 제제는 캡슐, 정제, 분말, 과립 또는 현탁액으로 제공될 수 있다. 이들 제제는 락토오스, 만니톨, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 통상적인 첨가제를 함유할 수 있다. 이들 제제에는 또한 결합제 예를 들면, 결정성 셀룰로오스, 셀룰로오스 유사체, 아카시아, 옥수수 전분 또는 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스가 제공될 수도 있다. 이들 제제에는 또한 이염기성 인산칼슘 또는 무수성 나트륨 전분 글리콜레이트가 제공될 수도 있다. 최종적으로 이들 제제에는 윤활제, 예를 들면 활석 또는 스테아르산 마그네슘이 제공될 수 있다.
- <30> 비경구 투여를 위하여, 질경이 추출물 제제는 무균 수용액, 바람직하게는 개체의 혈액과 등장성인 무균 수용액과 혼합될 수 있다. 이들 제제는 생리적합성 물질, 예를 들면, 염화나트륨, 글리신 등을 함유하고 생리 조건에 적합한 완충된 pH를 보유하는 물에 고체 활성성분을 용해시켜 수용액을 생산하고 상기 용액이 무균이 되도록 함으로써 제조될 수 있다.
- <31> 본 발명의 조성물은 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- <32> 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품의 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 질경이 추출물로 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 질경이 추출물 또는 4-비닐-2-메톡시페놀을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다.
- <33> 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 검류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- <34> 본 발명의 질경이 추출물은 주변에서 손쉽게 구할 수 있을 뿐만 아니라 독성, 부작용 등의 우려가 거의 없는 천연산물이며, 특히 산화적 스트레스에 의한 신경 세포 손상에의 보호물질을 포함하고 있다는 사실이 본 발명을 통해 새로이 밝혀졌다. 따라서 본 발명에 따른 질경이 추출물 또는 4-비닐-2-메톡시페놀을 포함하는 조성물은 신경 퇴행성 질환, 바람직하게는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

효 과

- <35> 상술한 바와 같이 본 발명의 질경이 추출물은 퇴행성 신경 질환과 상관관계가 있는 것으로 알려진 산화적 스트레스를 감소시키고 세포활성을 증대시킬 뿐만 아니라 치매 모델에서 기억 학습 능력을 유지시키며 인체에 부작용을 발생시키지 않으므로 이를 포함하는 조성물은 상기 질병의 예방 및 개선을 위한 약학적 또는 건강 기능식품용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <36> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시 예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시 예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- <37> 산화적 스트레스(oxidative stress)는 DCF-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 어세이를 이용하여 형광분광광도계(spectrofluorometer)를 통해서 측정하여 질경이 추출물의 저해활성을 확인하였으며, 세포활성(Cell viability)은 MTT 환원 어세이를 통해 측정하였다.
- <38> **[실시예1]** 질경이 에탄올 추출물의 뇌 신경세포 보호 활성 확인

- <39> 질경이 에탄올 추출물의 산화적 스트레스에 의한 뇌신경 독성으로부터 뇌 신경세포 보호 활성을 확인하기 위해, 신경세포 괴사 저해능을 질경이 에탄올 추출물의 농도별로 측정하였다.
- <40> PC12 세포를 항진균제/항생제를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 세포수가 10^4 - 10^6 cell/ml가 되었을 때 100 μ M의 H_2O_2 를 처리하여 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유도하였다.
- <41> C군은 탈이온수(deionized water)처리군, H군은 H_2O_2 100 μ M 처리군, V는 H_2O_2 처리 전 48시간동안 Vit. C 100 μ M으로 사전 배양(pre-incubated)한 군이며, 다른군들은 H_2O_2 처리 전 48시간동안 각기 다른 농도(0.5~2.0 mg/ml)로 사전 배양한 군이다. 산화적 손상(oxidative injury) 유발 정도는 DCF-DA 어세이를 이용하여 형광분광광도계(spectrofluorometer)를 통해서 측정하여 질경이 추출물의 저해활성을 확인하였다(도1 참조). 세포 활성(cell viability)은 MTT 환원 어세이를 통해 측정하였다.
- <42> 도1에서 보는 바와 같이, H_2O_2 에 의한 산화적 스트레스 유발정도는 질경이 에탄올 추출물의 농도에 비례하여 감소됨을 확인하였으며, 또한 세포활성(cell viability)은 비타민 C 전 처리군에 비해 질경이 에탄올 추출물 처리군이 좋은 활성을 보임을 확인하였다.
- <43>
- <44> **[실시예2]** 질경이 에탄올 추출물 제조 및 뇌 신경세포 보호물질 분리
- <45> 1. 질경이 에탄올 추출물에 극성이 다른 유기용매를 이용하여 분획
- <46> 선정된 질경이(*Plantago asiatica*)를 핸드 믹서로 곱게 마쇄한 후 3 kg의 질경이 조말을 에탄올 5배 부피로 24 시간동안 흔들어(shaking) 5회 추출한 후 감압 농축하여 질경이 에탄올 추출물을 조제한다. 추출물로부터 에탄올을 완전히 제거한 후 극성에 따라 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸 아세테이트(ethyl acetate) 순으로 각각 3회씩 분획한 후 산화적 스트레스 유발 정도 및 세포활성(cell viability(%))을 확인하였다. C군은 탈이온수(deionized water)처리군, H군은 H_2O_2 100 μ M 처리군, V는 H_2O_2 처리 전 48시간동안 Vit. C 100 μ M 사전 배양(pre-incubated)한 군이며, 다른군들은 H_2O_2 처리 전 48시간동안 각각 다른 처리(H1은 헥산을 사용해 분획한 첫번째 층; H2는 헥산을 사용해 분획한 두번째 층; H3는 헥산을 사용해 분획한 세번째 층; C1은 클로로포름을 사용해 분획한 첫번째 층; C2는 클로로포름을 사용해 분획한 두번째 층; C3는 클로로포름을 사용해 분획한 세번째 층; E1은 에틸아세테이트를 사용해 분획한 첫번째 층; E2는 에틸아세테이트를 사용해 분획한 두번째 층; 및 E3은 에틸아세테이트를 사용해 분획한 세번째 층)를 한 군들이다. 도 2에서 보는 바와 같이 에틸아세테이트층의 두번째 분획층(E2) 및 세번째 분획층(E3)이 가장 높은 산화적 스트레스 저해 활성 및 가장 높은 세포 활성을 보임을 확인하였다 (도2 참조).
- <47> 2. 분리된 에틸아세테이트 분획을 오픈 실리카겔 컬럼을 통해 분획
- <48> 상기 단계에서 가장 높은 저해 활성을 보인 에틸아세테이트층의 E2 및 E3층을 오픈 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(open silica gel column chromatography)를 시행하여 33개의 소분획으로 분획하였다. 33분획의 구성비율은 $CHCl_3$:EtOH 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 및 0:100의 11개 분획에 대해 각각의 분획을 3번씩 시행하여 얻은 분획이다.
- <49> 도3의 C군은 탈이온수(deionized water)처리군, H군은 H_2O_2 100 μ M 처리군, V는 H_2O_2 처리 전 48시간동안 Vit. C 100 μ M 사전 배양(pre-incubated)군이며, 다른군들은(총33분획) H_2O_2 처리 전 48시간동안 샘플 추출물로 사전 배양한 군이다.
- <50> 총 33개의 소분획에 대한 산화적 스트레스(%)를 유도하여 그 유도 정도가 작은 5개 분획을 선별하였다. 도3의 세포활성(cell viability(%))의 5번 샘플은 $CHCl_3$:EtOH의 90:10비율의 두번째 분획, 8번 샘플은 $CHCl_3$:EtOH = 80:20의 두번째 분획, 9번 샘플은 $CHCl_3$:EtOH = 80:20의 세번째 분획, 15번 샘플은 $CHCl_3$:EtOH = 60:40의 세번째 분획, 16번 샘플은 $CHCl_3$:EtOH = 50:50의 첫번째 분획 및 18번째 샘플은 $CHCl_3$:EtOH = 50:50의 세번째 분획이다.
- <51> 상기에서 선별한 5개 분획의 cell viability(%)를 실험한 결과는 도3과 같으며, 이를 통해 저해활성이 가장 좋은 분획은 오픈 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피의 회분 중 클로로포름(chloroform)과 에탄올(ethanol)의 비율

이 80:20(v/v)의 3번째 분획(fraction)임을 알 수 있었다 (도3 참조).

<52> 3. TLC를 이용한 활성물질 분리

<53> 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피의 획분 중 저해활성이 좋은 CHCl_3 : EtOH = 80:20 (v/v) 획분을 얇은층 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)로 분리하였다. TLC에 의해 9개의 밴드를 확인하였으며, 그 R_f 값은 0.07, 0.19, 0.28, 0.41, 0.54, 0.59, 0.77, 0.92 및 0.96이다.

<54> TLC로 분리한 각각의 획분에 따른 H_2O_2 에 의한 산화적 스트레스 유발 정도(도4 참조)와 A β 에 의한 세포활성(cell viability)을 측정하였다 (도5 참조). 그 결과 가장 활성이 좋은 2nd 밴드 (R_f value 0.19)를 확인하였다.

<55> 도4의 산화적 스트레스 유발정도(oxidative stress(%))의 경우 C군은 탈이온수(deionized water)처리군, H군은 H_2O_2 100 μM 처리군, V는 H_2O_2 처리 전 48시간동안 Vit. C 100 μM 사전배양(pre-incubated)군이며, 다른군들은 H_2O_2 처리 전 48시간동안 샘플 추출물로 사전배양한 군이다.

<56> 도 5의 세포활성(cell viability(%))의 경우 C군은 탈이온수(deionized water)처리군, A군은 A β 100 μM 처리군, V는 A β 처리 전 48시간동안 Vit. C 100 μM 사전배양(pre-incubated)군이며, 다른군들은 A β 처리 전 48시간동안 샘플 추출물로 사전배양한 군이다. 각 숫자는 R_f 값을 나타낸다.

<57> 4. HPLC를 통한 활성물질 확인

<58> 가장 높은 활성을 나타낸 2nd 밴드(R_f value 0.19) 부분의 활성성분(active compound)을 분리 해내기 위하여 HPLC 어세이를 실시하였다. 이때 HPLC 사용 조건은 다음과 같다. Data detection: PDA, 323.3 nm, Column: C₁₈ μ bondapakTM (reverse phase column, size: 3.9 x 300 mm), Mobile phase: gradient of 0-100% ethanol in water (total 75 min), Flow rate: 0.5 ml/min, Injection volume: 10 μl (30 mg/ml)

<59> HPLC로 분리하여 분자량이 105.17 m/z를 갖는 4-vinyl-2-methoxyphenol을 확인하였다 (도6 참조).

<60> [실시예3] 동물을 이용한 활성 효과 확인

<61> *In vivo* 상에서 질병이 추출물의 활성을 측정하기 위하여 마우스(mice)에 A β 를 410 pmol/마리로 주사하여 치매 모델을 확립하였다.

<62> 기억력 및 학습능력 활동량을 측정하기 위한 alternative behavior(Y-maze test)의 실험 및 기억력 및 학습능력의 변화를 확인하기 위한 step through latency(수동회피검사)의 실험 방법은 표1과 같다.

표 1



<63>

<64>

In vivo 어세이로서 두 시험은 함께 진행하였는데, 쥐를 총 4그룹으로 나누어 대조군 그룹과 음성 대조군 그룹은 4주간 일반 사료를 먹었고, 나머지 두 그룹은 PA를 400 및 800 mg/kg per day의 농도로 먹게 하였다. 실험에 앞서 아밀로이드 베타 펩타이드(Aβ)를 투여하는데 있어서, 대조군 그룹은 Aβ(42-1), 나머지 그룹은 Aβ(1-42)를 투여하여 실험을 진행하였다.

<65>

Alternative behavior 실험을 위한 Y-미로(maze) 테스트에서, ICR-수컷 마우스(male mouse)에 샘플을 섞은 물을 약 3주간 *ad lib*(무제한 임의식이법)의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로 아밀로이드 베타 펩타이드(Aβ)를 뇌실 내 (intracerebroventricular; ICV) 주사하여 각각 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-미로에서 행동 실험을 실시하였다. Y-미로는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록했다. 마우스를 미로에 넣고 아무런 자극 없이 8분 동안 자유롭게 움직이도록 두고, 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다.

<66>

기억력 및 학습능력의 변화를 확인하기 위한 step through latency(수동회피검사, passive avoidance test) 실험은 위의 조건처럼 ICR-수컷 마우스에 먹이와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*(무제한 임의 식이법)의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로 Aβ를 각각 테스트 전에 ICV injection하여 기억력 및 학습능력의 변화 실험을 실시하였다. 이 실험은 실제 실험에 들어가기 전날에 기억상자와 같은 장소에서 트레이닝을 시킨 다음 행동실험을 실시하였다. 모든 마우스들은 실험 전날 실험 상자에서 적응 훈련(명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후, 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1마리당 300 sec 동안 실험한다.

<67>

도7의 C군은 비독성 역상 Aβ(42-1)을 주사한 군, A군은 Aβ(1-42)을 주사한 군, PA400 및 PA800은 질경이(plantain, 400 mg/kg, 800 mg/kg per day)를 섭취시킨 후 Aβ(1-42)를 주사한 군으로, 질경이 추출물 투약군에서의 경우 Aβ 투약군에 비해 기억 학습 능력이 유의할 정도로 향상, 유지됨을 확인하였다 (도7 참조).

도면의 간단한 설명

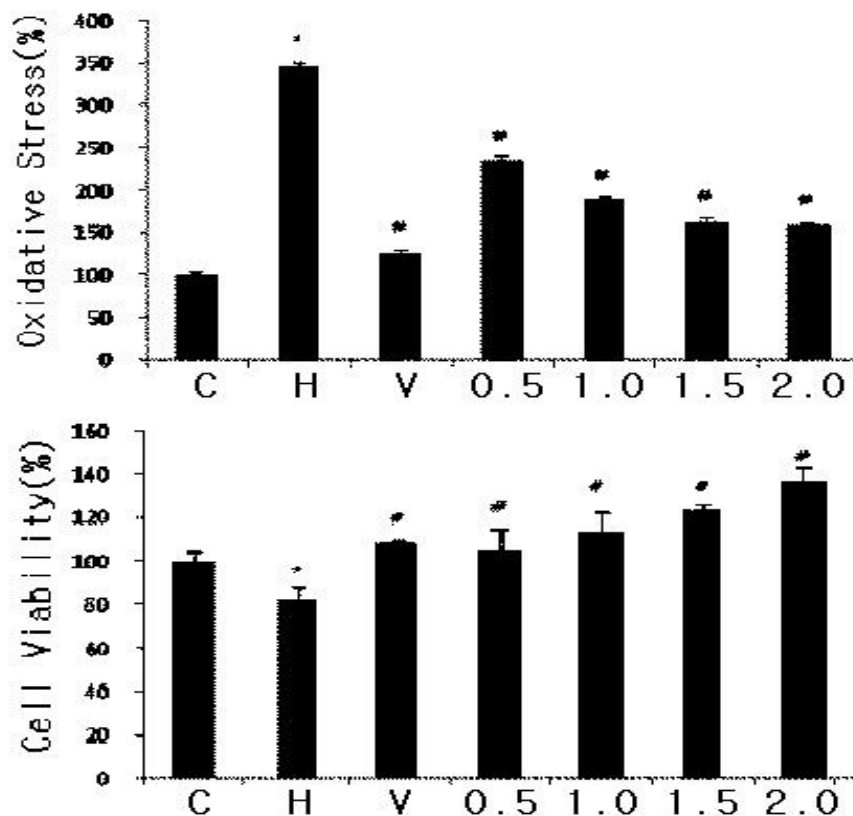
<68>

도1은 질경이 에탄올 추출물의 산화적 스트레스에 의한 뇌 신경 세포의 손상 저해활성을 나타낸 도이다. (데이터는 평균±S.D.을 나타내며, **P*<0.01 C군과 비교한 값, #*P*<0.01 H군과 비교한 값이다.)

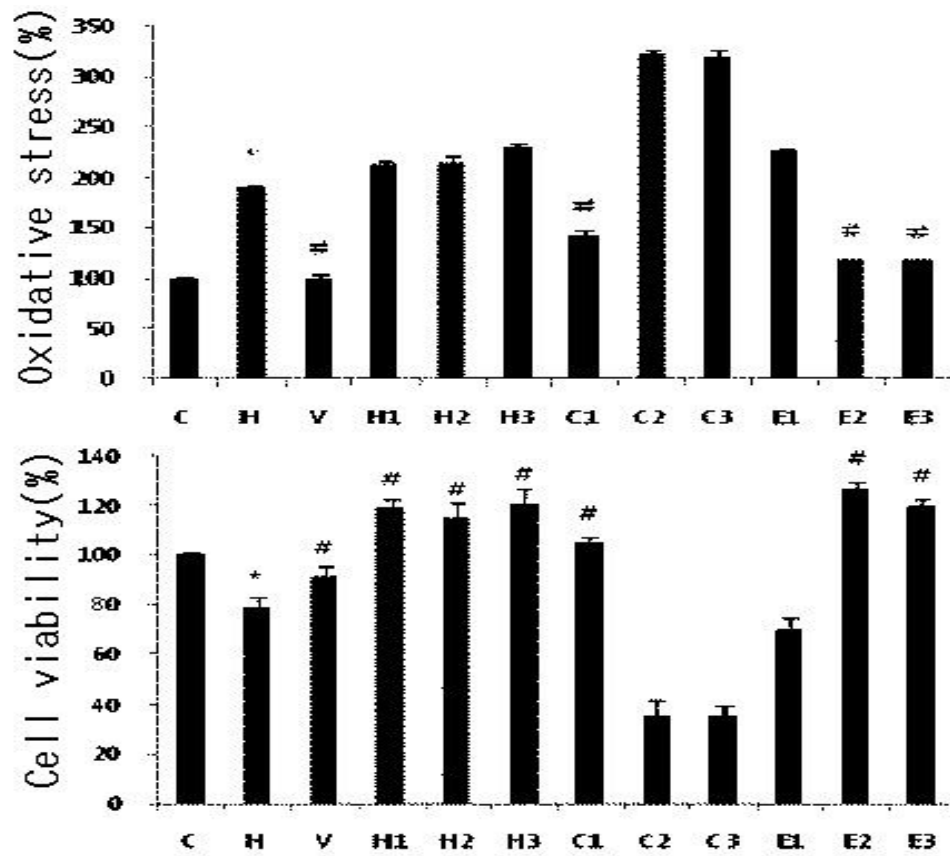
- <69> 도2는 질경이 에탄올 추출물에 극성이 다른 유기용매를 이용하여 분획한 후, 각 분획에 대한 뇌 신경세포 독성에의 저해 활성을 나타낸 도이다. (테이타는 평균±S.D.을 나타내며, * $P<0.01$ C군과 비교한 값, # $P<0.01$ H군과 비교한 값이다.)
- <70> 도3은 용매분별(solvent partition)을 통해 분리된 에틸아세테이트 분획을 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리한 결과를 나타낸 도이다. (테이타는 평균±S.D.을 나타내며, * $P<0.01$ C군과 비교한 값, # $P<0.05$ H군과 비교한 값이다.)
- <71> 도4는 TLC를 이용하여 활성물질을 분리한 획분들의 H_2O_2 에 의한 산화적 스트레스 유발정도를 확인한 도이다. (테이타는 평균±S.D.을 나타내며, * $P<0.01$ C군과 비교한 값, # $P<0.01$ H군과 비교한 값, ## $P<0.05$ H군과 비교한 값이다.)
- <72> 도5는 TLC를 이용하여 활성 물질을 분리한 획분들에 A β 를 가한 후 세포 활성(cell viability(%))를 확인한 도이다. 각 숫자는 R_f값을 나타낸다. (테이타는 평균±S.D.을 나타내며, * $P<0.05$ C군과 비교한 값, # $P<0.01$ A군과 비교한 값, ## $P<0.05$ A군과 비교한 값이다.)
- <73> 도6은 가장 높은 활성을 나타낸 2nd 밴드의 활성성분을 확인하기 위한 HPLC 결과를 나타낸 도이다.
- <74> 도7은 *in vivo*상 치매모델에서의 질경이 추출물의 보호효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다. (테이타는 평균±S.D.를 나타내며, * $P<0.01$ C군과 비교한 값, # $P<0.01$ A군과 비교한 값, ## $P<0.05$ A군과 비교한 값이다.)

도면

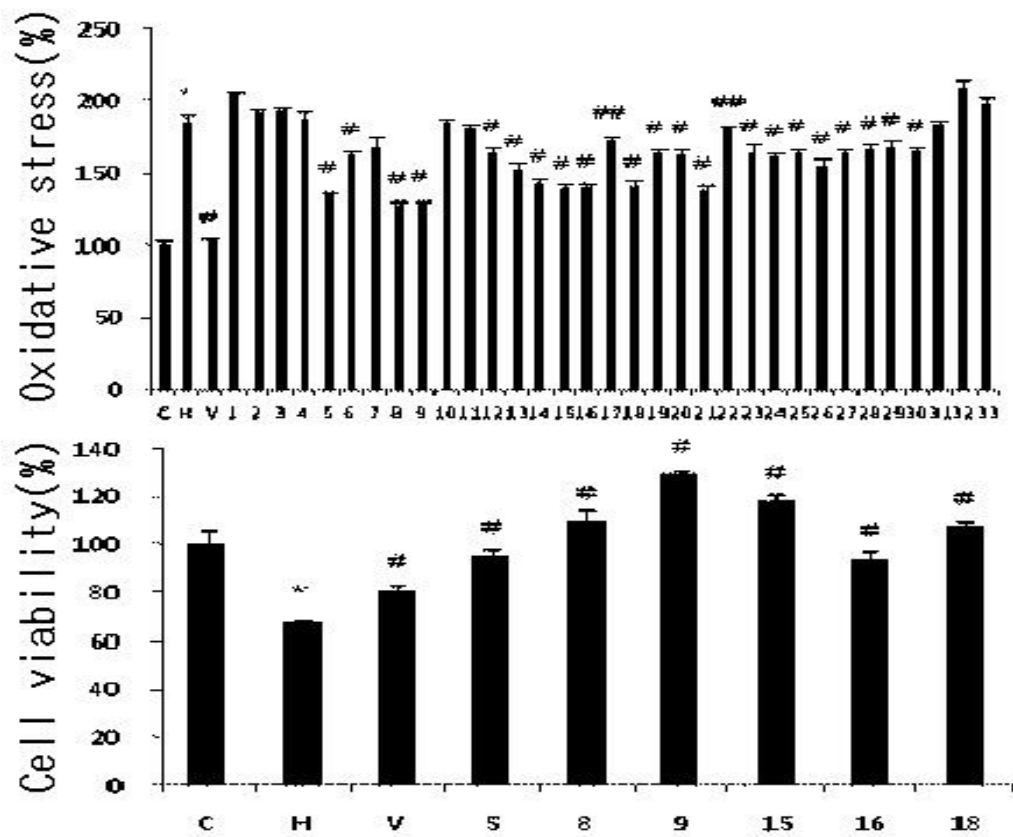
도면1



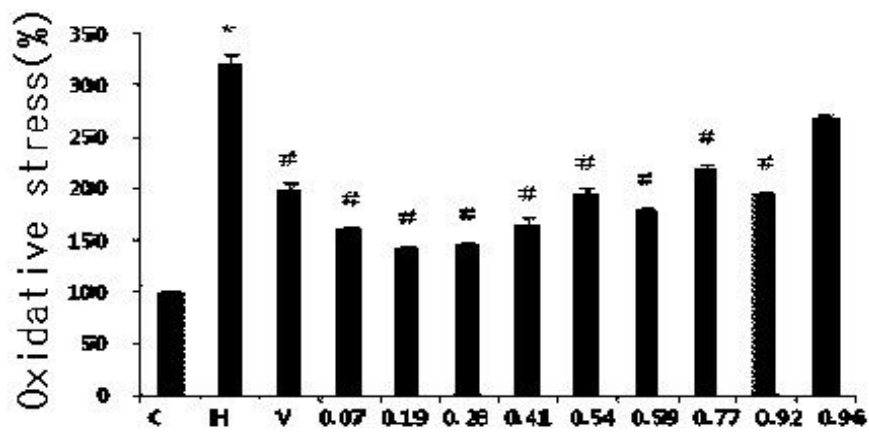
도면2



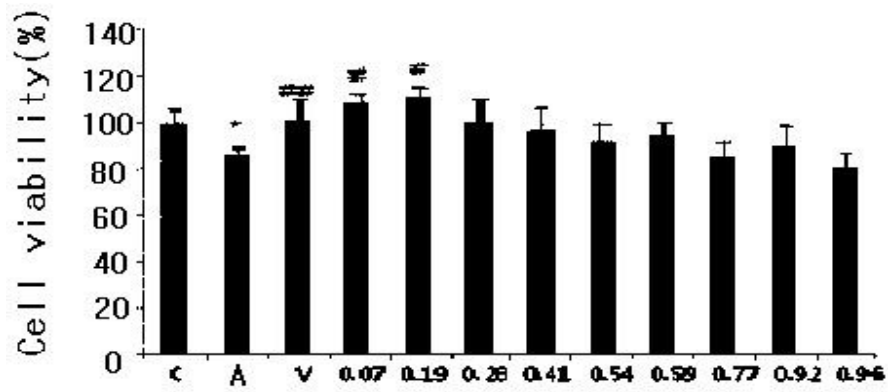
도면3



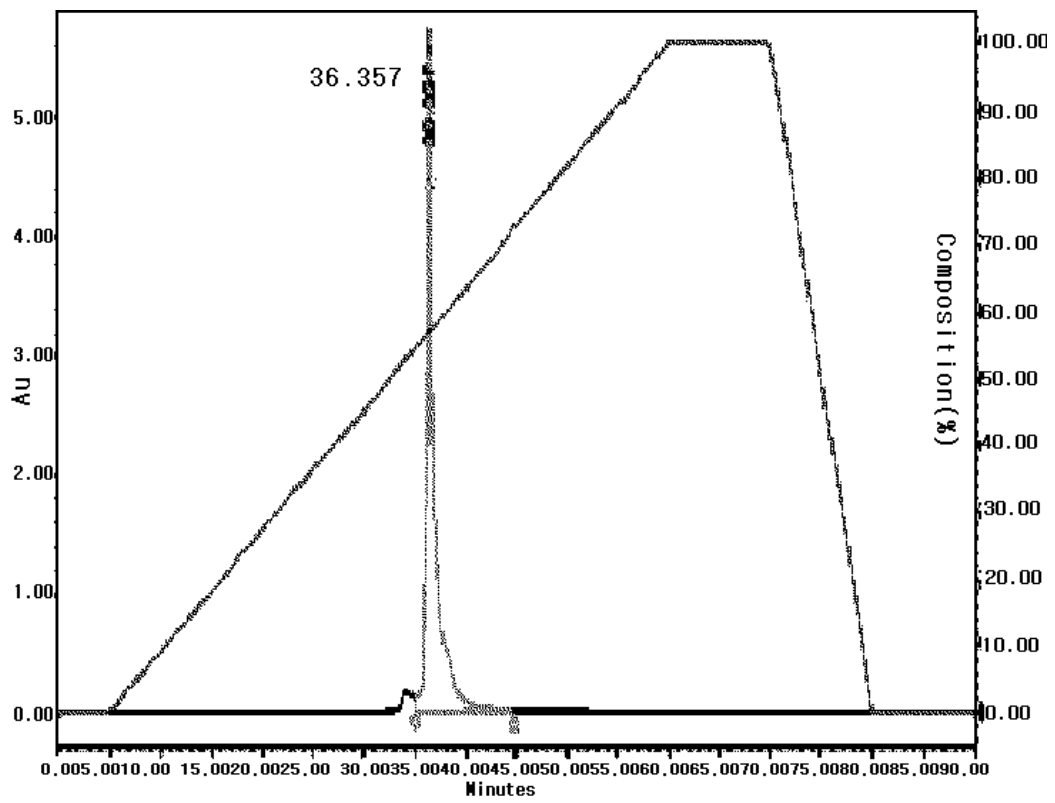
도면4



도면5



도면6



도면7

