



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0009873
(43) 공개일자 2014년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/233 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0076867

(22) 출원일자 2012년07월13일

심사청구일자 2012년07월13일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

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

(72) 발명자

함대현

서울특별시 동대문구 장안벚꽃로 167 (장안동, 래미안장안2차아파트) 217동 802호

이혜정

경기도 용인시 수지구 신봉2로 26, 109동 502호(신봉동, LG자이1차아파트)

이봄비

서울특별시 동대문구 경희대로1나길 50, 플러스빌 102호 (회기동)

(74) 대리인

손민

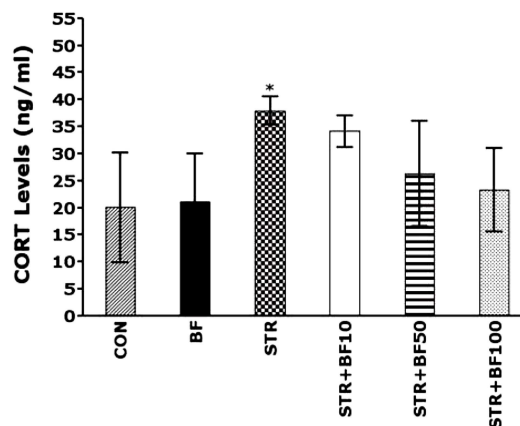
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 시호 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신분열증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품

(57) 요약

본 발명은 정신분열증의 예방 또는 치료에 효과적인 천연 추출물로서, 시호 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신분열증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

시호 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신분열증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시호추출물은 메탄올 또는 에탄올로 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 추출은 초음파추출, 상온추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 증기 추출인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

시호 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신분열증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 시호 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신분열증의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인간이 내·외적 환경의 자극에 의해 신체적·심리적인 스트레스를 받게 되면 인체는 스트레스에 적응하기 위해 뇌에서 청반 노르에피네프린(LC-NE; locus ceruleus norepinephrine)과 부신피질 자극 호르몬 방출 인자(CRF; corticotropin releasing factor)을 분비한다. LC-NE는 교감 신경계를 활성화시키고 부교감 신경계의 작용을 억제하여 혈압, 심박동, 호흡을 증가시키며, 기관지를 확장시킬 뿐 아니라 발한 작용을 증가시킨다. 시상하부에서 분비된 CRF는 뇌하수체 전엽으로부터 부신피질 자극 호르몬(adrenocorticotrophic hormone; ACTH)을 일반 체순환으로 방출한다. 이 ACTH가 혈액을 따라 옮겨가서 부신피질의 ACTH 수용체에 결합하게 되면, cAMP라고 불리는 2차 신호전달자를 합성하게 된다. cAMP에 의해 활성화된 단백질 인산화 효소 PKA(protein kinase A)는 미토콘드리아에 위치한 당질코르티코이드(glucocorticoid) 합성 단백질을 활성화 시킨다. 그러면 당질코르티코이드 합성 단백질이 콜레스테롤을 이용하여 스트레스 호르몬들을 만들어 낸다. CRF-ACTH-당질 코르티코이드까지 연결되는 스트레스 경로를 일반적으로 시상하부-뇌하수체-부신(Hypothalamus-Pituitary gland-Adrenal gland; HPA) 축이라고 한다.

[0003] 신체가 허용할 수 있는 수준의 스트레스는 우리 몸의 적절한 자극제로 작용을 하게 되지만, 허용 범위를 벗어난 강하고도 지속적으로 가해지는 심리적 육체적 스트레스는 당질코르티코이드를 장시간 동안 과량 분비하게 유도한다. 이렇게 장기간 과량 분비되는 당질코르티코이드는 몸의 면역력을 떨어뜨리게 되므로, 외부 감염에 의한 저항성을 떨어뜨리게 되고, 우리 몸에 다양한 질병을 유발하게 한다. 면역력 감퇴뿐만 아니라 특별히 뇌세포 손상 및 재생을 억제하여 불면증, 무기력증, 기억력 감퇴, 우울증 유발은 물론 정신질환까지 일으킨다.

[0004] 또한, 지속적으로 과도하게 자극된 스트레스는 CORT 및 CRF를 과량으로 분비시키고, 이는 도파민의 전구물질인 TH 또한 과도하게 분비시킨다. 이에 증가된 CRF 및 TH는 정신분열증의 원인으로 작용하기도 하는데, 이는 정신분열증 환자에서는 시그널 전달의 혼란의 원인 중 하나로 TH 등이 뇌의 신호 전달의 장애로 작용할 가능성이 있기 때문이다.

[0005] 정신분열증은 망상, 환각, 와해된 언어(이상 양성 증상), 둔감한 정서(flat affect), 자극에 대한 행동 유발 저하(avolition), 말과 언어 부족, 사회적 위축행동(social withdrawal, 이상 음성 증상), 주의, 계획, 추상적 사고의 결함 및 단-장기 기억 결손(인지기능 장애)을 나타내는 광범위한 정신질환이다.

[0006] 현재까지, 정신분열증의 치료약은 양성 증상을 그 표적 증상으로 하여 개발되어 왔다. 그러나, 정신분열증의 만성화 및 사회복귀의 어려움에는 음성 증상 또는 인지 장애가 깊이 연관되어 있어 이러한 증상의 개선 작용을 갖는 약제가 강력히 요구되고 있다. 따라서, 양성 증상뿐만 아니라 음성 증상 또는 인지 장애를 개선시키는 것은 정신분열증에 대해 유용한 치료 방법이 될 것으로 여겨진다. 최근 수년간, 양성 증상뿐만 아니라 음성 증상 또는 인지 장애에도 개선 작용을 나타내는 약제가 개발되어 왔으나 여전히 그 수가 적고 효과가 충분하지 않다.

[0007] 따라서, 스트레스로 인한 정신질환 유발을 효과적으로 억제하기 위해서는 스트레스 경로를 명확하게 이해하고 스트레스를 유발시키는 다양한 신호전달을 조절할 수 있는 물질의 개발이 필요하다.

[0008] 이에 본 발명자는, 이상과 같은 정신분열증을 예방 또는 치료를 하기 위한 천연 약재를 연구하던 중, 시호 추출물이 생체 내 실험(in vivo)에서 정신분열증 예방 또는 치료에 효능이 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 정신분열증을 예방 또는 치료할 수 있는 시호 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물 또는 건강기능식품을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 시호 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신분열증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에서 사용되는 용어 "시호"는, 쌍떡잎 식물 산형화목 미나리과의 여러해살이 풀로 복시호 또는 뽕미나리라고도 한다. 뿌리에는 사포닌과 지방유 등이 함유되어 있어, 한방에서는 해열, 진통, 강장제나 호흡기, 소화기, 순환기 질환 치료 약재로 사용되고 있다.

[0012] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물"은, 시호로부터 액체의 용매를 사용하여 추출된 특정 성분을 의미한다. 상기 용매로는, 물, C₁₋₄ 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 유효성분을 효율적으로 추출하기 위하여 메탄올로 추출하는 것이 바람직하다. 메탄올의 농도는 21 내지 80%가 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명의 시호 추출물은, 시호를 추출한 것으로 추출방법은 초음파추출, 상온추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 및 증기 추출로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 사용할 수 있다. 유효성분을 효율적으로

추출하기 위해서 초음파 추출법을 이용하는 것이 바람직하다.

- [0014] 본 발명에서 사용되는 용어 "정신분열증"은, 현실에 왜곡된 지각, 비정상적인 정서체험, 사고·동기·행동의 총체적인 손상과 괴리 등을 수반하는 정신장애를 의미한다. 정신분열증은 망상, 환각, 비조직적 언어와 행동 등의 증상과 더불어 사회적 기능에 장애를 일으킨다. 본 발명에 따른 시호 추출물은 이러한 질병의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0015] 본 발명에서는 시호 추출물을 함유하는 조성물이 정신분열증의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하였다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 정신분열증 치료의 지표가 되는 체중변화와 혈청 CORT 농도 변화, CRF 및 TH 수치 변화 효과를 확인함으로써, 정신분열증의 예방 또는 치료 효능이 있음을 확인하였다.
- [0016] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 시호 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 시호 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 정신분열증의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0018] 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 시호 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 시호 추출물의 일일 투여량은 바람직하게는 1 mg/kg 내지 500 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 시호 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신분열증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0021] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH

조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0022] 또한 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0023] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0024] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 시호 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량%에 1 내지 15 중량% 포함되도록 첨가하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0025] 본 발명은 정신분열증의 예방 또는 치료에 효과적인 천연 추출물로서, 정신분열증의 예방 또는 치료 조성물로 약학적으로 이용 가능할 뿐 아니라 건강기능식품으로서도 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은, 본 발명의 일 실시예에 따른 반복된 구속 스트레스의 실험 계획표를 나타낸 것이다.

도 2는, 본 발명의 일 실시예에 따른 반복된 구속 스트레스 군 및 시호 추출물 처리 군의 체중변화 효과를 나타낸 그래프이다.

도 3은, 본 발명의 일 실시예에 따른 반복된 구속 스트레스 군 및 시호 추출물 처리 군의 혈액 내 CORE 레벨 변화에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는, 본 발명의 일 실시예에 따른 (A) CON-CRF 군, (B) STR-CRF 군, (C) STR+BF100-CRF 군, (D) CON-TH 군, (E) STR-TH 군, 및 (F) STR+BF100-TH 군의 시상하부의 실방핵(PVN) 내의 CRF 표출 및 청반(LC, locus coeruleus) 속의 TH 표출 이미지를 나타낸 것이다.

도 5는, 본 발명의 일 실시예에 따른 반복된 구속 스트레스 처리 후 시상하부의 실방핵(PVN) 내의 CRF 표출에 대한 시호 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 6은, 본 발명의 일 실시예에 따른 반복된 구속 스트레스 처리 후 청반(LC) 내의 TH의 표출에 대한 시호 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 하기 제조에 및 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 제조에 및 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0028] 실시예: 시호 추출물 제조

[0029] 시판되는 시호를 구입하여 작게 분쇄한 분쇄물 500 g을 80% 메탄올을 사용하여 환류냉각기내 초음파기를 이용하여 상온($25\pm 2^{\circ}\text{C}$)에서 24시간 동안 3회 초음파 추출하였다. 추출액을 여과지를 이용하여 불용성물질을 제거한 후 환산압력 조건하에서 회전 진공 증발기(rotary vaccum evaporator)를 이용하여 농축하였다. 농축된 추출물은 순환 냉각기를 이용하여 냉각시켰으며, 감압 동결 건조시켜 93.1 g의 추출물을 얻었다(수율 18.62% w/w).

[0030] **실험예: in vivo 실험**

[0031] 모든 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준오차(SE)로 나타내었으며, 평균 분산 데이터 사이 또는 이들 안에서의 차이점을 SPSS를 사용한 분산해석(ANOVA)의해 분석하였으며, 그 이후에 Tukey's post hoc 테스트를 수행하였다. 통계적 유의성은 $p<0.05$ 로 맞추었다. 체중 증가 통계 분석은 단면의 반복 측정 인자로 one-way ANOVA를 사용하여 분석한 후 Tukey's post hoc 테스트를 수행하였다. 면역조직화학 데이터 및 CORT 농도 분석도 같은 방법으로 분석하였다.

[0032]

[0033] 1) 실험동물 및 시료투여

[0034] 가) 실험동물

[0035] 260 내지 280 g의 수컷 쥐(samtaco animal Co., Seoul, Korea)를 7일간의 적응기간을 거쳐 실험에 사용하였으며, 적응기간 동안 온도($22\pm 2^{\circ}\text{C}$)와 습도($55\pm 15\%$)가 조절된 사육실에서 폴리카보네이트(polycarbonate) 사육상자에 5마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기(light:dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 멸균된 식수와 일반적인 식이를 자유롭게 공급하였다. 본 실험에 사용된 모든 실험동물은 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals[Department of Health, Education, and Welfare Publication(National Institute of Health)80-23]에 준하여 취급하였다.

[0036] 나) 시료투여

[0037] 상기 실시예에서 제조한 시호 추출물을 시료로 사용하였다. 상기 실험동물은 무체가 비슷한 군을 각각 7마리씩 나누었으며, 시료투여는 시호 추출물 대신 saline을 투여한 정상대조군(CON), 시호 추출물을 투여한 약물투여군(BF), 구속 스트레스를 가하기 전에 saline을 투여한 구속 스트레스군(STR), 구속 스트레스 동물에게 10 mg/kg 시호 추출물을 투여한 군(STR+BF10), 구속 스트레스 동물에게 50 mg/kg 시호 추출물을 투여한 군(STR+BF50) 및 구속 스트레스 동물에게 100 mg/kg 시호 추출물을 투여한 군(STR+BF100)으로 총 6개의 군으로 나누어 실험을 하였다. 시호 추출물 또는 saline은 15일 동안 매일 구속 스트레스를 가하기 30분 전에 복강내로 주입하였다. 구체적인 시료투여 조건은 하기의 표 1과 같다.

표 1

[0038]

실험군	투여 조건 및 용량
CON	saline(0.9% 염화나트륨)
BF	시호 추출물(BF) 100 mg/kg
STR	구속 스트레스 + saline
STR+BF10	구속 스트레스 + BF 10 mg/kg
STR+BF50	구속 스트레스 + BF 50 mg/kg
STR+BF100	구속 스트레스 + BF 100 mg/kg

[0039] 실험동물은 구속 스트레스를 발생시키기 위해 한쪽 끝이 원뿔모양이고 한쪽 끝은 몸을 움직일수 없는 열린 투명의 플라스틱 관(20×7 cm)에 15일 동안 하루에 4시간씩 넣어두었다. 상기 CON 군을 제외하고는 모든 군에서 구속 스트레스를 발생시켰으며, 구속 스트레스 실험 계획은 도 1에 나타내었다.

[0040] 2) 구속 스트레스에 의한 체중변화 측정

[0041] 구속 스트레스에 노출된 쥐의 체중 변화를 확인하기 위하여 14일 동안 매일 체중을 측정하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 구속 스트레스에 노출된 쥐는 구속 첫날부터 체중 감소를 보였으며, 스트레스가 유도된 체중의 초기 감소는 일반적으로 회복되지 않고 한 동안 지속되거나 악화되었다. STR군은 CON군과 비교하여 14일 동안 서서히 체중 감소를 보였으며, Tukey's post-hoc 시험으로 CON 군(12일째 $p<0.05$, 14일째 $p<0.001$)과 비교하여 STR 군에서는 12일째부터 14일째까지 체중 감소하였음을 확인하였으며, 이 기간 동안 반복된 구속 스트레스를 가하기 전 100 mg/kg 시호 추출물(BF)를 투여한 쥐(12일째 $p<0.05$, 13일째 $p<0.01$, 14일째 $p<0.01$)는 STR 군에 비교하여 체중 감소가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0042] 3) 부신피질 호르몬(CORT) 측정

[0043] 가) 실험방법

[0044] 부신피질 호르몬 측정에 사용하기 위해 희생된 동물의 혈액 샘플은 복대동맥으로부터 혈청 CORT 분석을 위하여 채취하였다. 혈액을 10분 동안 4000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 분리하여 -20°C 에서 사용 전까지 보관하였다. CORT 농도는 래빗 다클론성 CORT 항체(OCTEIA Corticosterone kit; Alpco Diagnostics Co., Windham, NH, USA)를 사용하여 면역효소법(ELISA, enzyme-linked immunoassay)으로 분석하였다. 샘플 및 공액(conjugate)은 각 시약(well)에 추가하였으며, 플레이트는 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 시약(well)은 버퍼로 몇 차례 세척한 후 프로퍼 컬러로 발색 처리하였다. 흡광도는 ELISA 리더기를 사용하여 450 nm으로 측정하였다.

[0045] 나) 측정결과

[0046] 혈청 CORT 농도는 각 군에 14일 동안 구속 스트레스에 노출시킨 후 측정하였으며, 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 극심한 구속 스트레스는 혈청 CORT의 큰 증가를 유도했으며, 쥐에게 반복적으로 가해진 구속 때문에 부신의 둔감화로 인해 농도는 서서히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 반복된 구속 스트레스를 가한 STR 군은 CON 군과 비교하여 188.936%($p<0.05$)의 상당히 큰 혈청 CORT 농도 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 시호 추출물(BF) 투여군은 STR 군과 비교하여 구속 스트레스로 유도된 혈청 CORT 농도 증가를 미세하게 억제하는 효과를 보였다.

[0047] 4) 부신피질 자극 호르몬 방출인자(CRF) 및 티로신수산화효소(TH) 면역조직화학 측정

[0048] 가) 실험방법

[0049] 면역조직화학 측정을 위하여, 실험동물은 펜토바비탈나트륨(solium pentobarbital, 80 mg/kg)을 복강내 주사하여 마취시킨 후 상행대동맥을 통하여 식염수(0.9%)를 살포한 후 0.1 M 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)가 함유된 혼합액 300ml(per rat)을 주입하였다. 뇌는 제거하여 하룻밤 동안 고정해놓았으며, 20% 슈크로즈(sucrose)가 함유된 0.1M 인산완충식염수로 4°C 에 냉동하였다. 시상하부를 통하여 관상단면(coronal section)을 크리오스탯(cryostat)을 사용하여 $30\ \mu\text{m}$ 두께로 잘라냈으며, 잘라낸 단면은 CRF 및 TH 염색을 위하여 아비딘-비오틴 과산화효소 복합체법(avidin-biotin-peroxides complex method)을 사용하여 면역염색하였다. 상기 면역염색은, 관상단면을 인산완충식염수로 각 5분 동안 세 차례 세척한 후, 1차 염소(goat) 항-CRF 항체(1:2000 희석) 및 양(sheep) 항-CRF 항체(1:2000 희석)와 함께 PBST(인산완충식염수 + 0.3% triton x-100)로 4°C 에서 72시간 동안 배양하였다. 그 후 단면은 인산완충식염수로 5분 동안 세척하고 상온에서 120분 동안 비오틴결합(biotinylated) 토끼(rabbit) 항-염소(goat) IgG 2차 항체(항-CRF 항체를 위한) 및 비오틴결합 염소(goad) 항-양(sheep) IgG 2차 항체(항-TH 항체를 위한)와 함께 배양하였다. 두 2차 항체는 Vector Laboratories Co.로부터 얻었으며, 2% 혈청이 함유된 PBST로 1:200으로 희석하였다. 면역반응성 가시화를 위해, 단면은 90분 동안 ABC(avidin-biotin complex, Vectastain Elite ABC kit; Vetcor Labs. Co., Burlingame, CA, USA) 시약으로 90분 동안 배양한 후 인산완충식염수로 각 5분 동안 세 차례 세척하였다. 그 후 3,3'-디마이노벤지딘(diaminobenzidine) 및 0.01% 과산화수소 용액으로 1분간 배양하고, 인산완충식염수로 세척한 후 증류수로 세척하여 슬라이드에 고정시켰다. 슬라이드는 공기 건조하고 유리로 덮었

다(cover-slipped). 이미지는 Axio vision 3.0 이미징 시스템을 사용하여 포착하였고, 포토샵을 사용하여 나타내었다. 단면은 100배 확대하여 나타내었으며, 세포 수는 $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ 그리드로 세었다. 세포는 한 쥐당 세 단면에서 산출하였다.

[0050] 나) 측정결과

[0051] CRF 유사 면역반응성은 주로 PVN(실방핵, paraventricular nucleus)을 갖는 시상하부의 세포체를 통하여 분석하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이, STR 군으로부터 채취한 쥐 뇌의 PVN 내의 CRF 면역반응성 신경세포의 수는 212.40%로 증가하였다. 반복된 구속 스트레스에 노출된 쥐는 CON 군($p < 0.001$)에 비교하여 CRF 표출 증가를 보였으며, STR+BF100 군($p < 0.01$)에서의 CRF 면역반응성 신경 세포의 수는 STR 군과 비교하여 시상하부에서 상당히 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 반복된 스트레스로 인한 CRF 면역반응성 증가 현상은 시호 추출물 투여를 통해 상당히 크게 회복되었으며, STR+BF100 군에서의 CRF 면역반응성 신경 세포 수는 CON 군과 가까운 수치를 나타내었다.

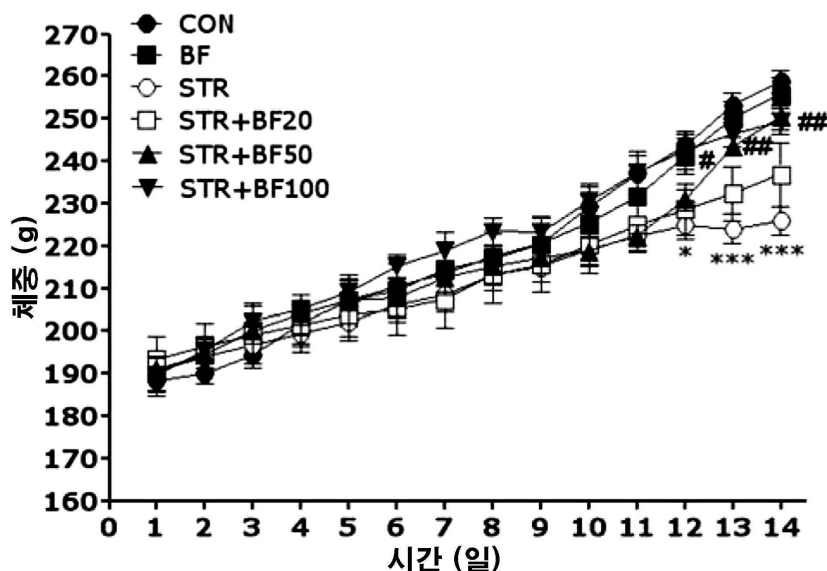
[0052] TH 유사 면역반응성은 LC(청반, locus caeruleus)을 포함하는 교감신경의 세포체를 통하여 분석하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타난 바와 같이, STR 군으로부터 채취한 쥐 뇌의 LC 내 TH 면역반응성 신경 세포의 수는 325.00%로 증가하였다. 반복된 구속 스트레스에 노출된 쥐는 CON 군($p < 0.001$)과 비교하여 TH 표출 증가를 보였으며, STR+BF100 군($p < 0.01$)에서의 TH 면역반응성 신경세포 수는 STR 군과 비교하여 시상하부에서 상당히 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 반복된 구속 스트레스로 인한 TH 면역반응성 증가는 시호 추출물(BF) 투여를 통해 상당히 크게 회복되었으며, STR+BF100 군에서의 TH 면역반응성 신경세포의 수는 CON 군과 가까운 수치를 나타내었다.

도면

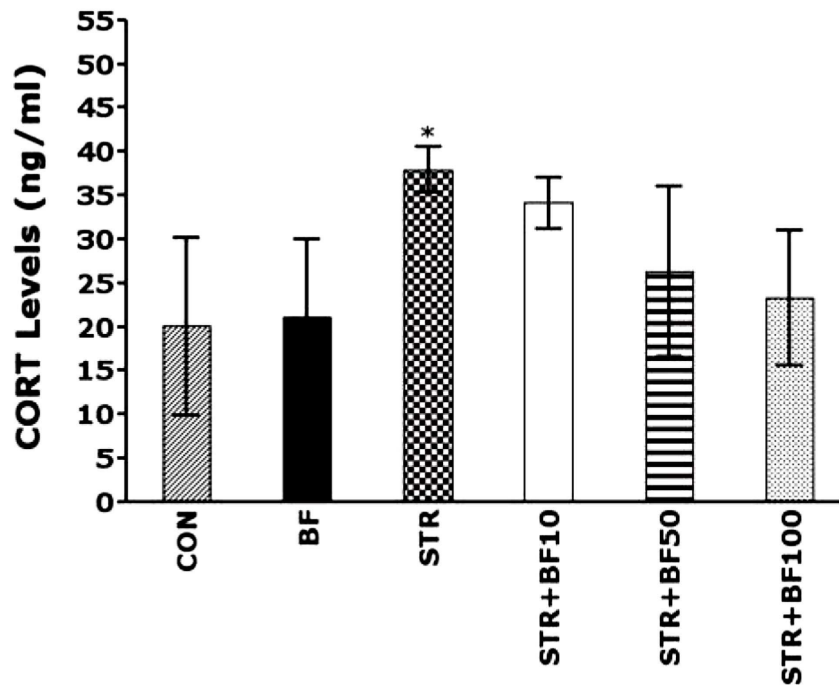
도면1



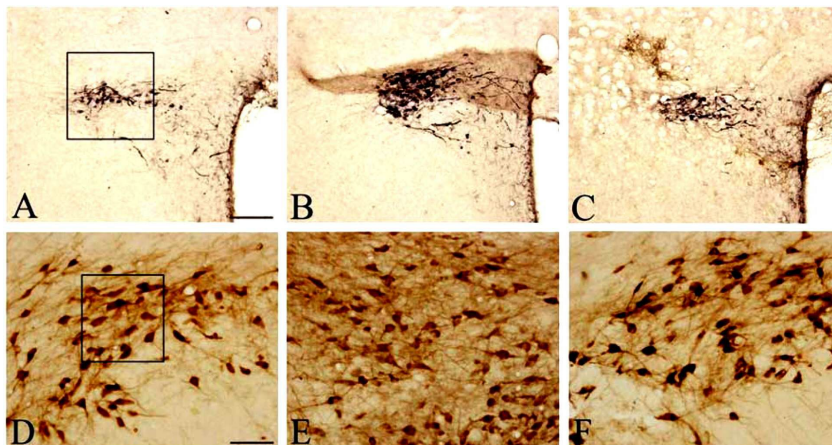
도면2



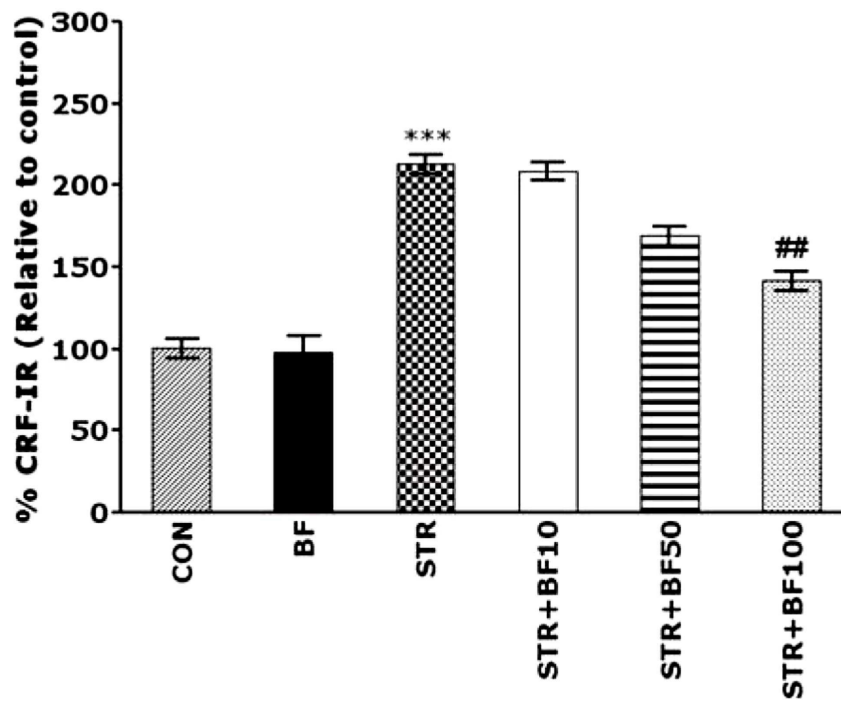
도면3



도면4



도면5



도면6

