



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0082504
(43) 공개일자 2022년06월17일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/194 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 25/28 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 31/194 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0172462
(22) 출원일자 2020년12월10일
심사청구일자 2020년12월10일</p> | <p>(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)</p> <p>(72) 발명자
김명욱
경남 진주시 가호로44번길 7 102동 303호 (호탄동, 대동아파트)</p> <p>(74) 대리인
특허법인 피씨알</p> |
|---|---|

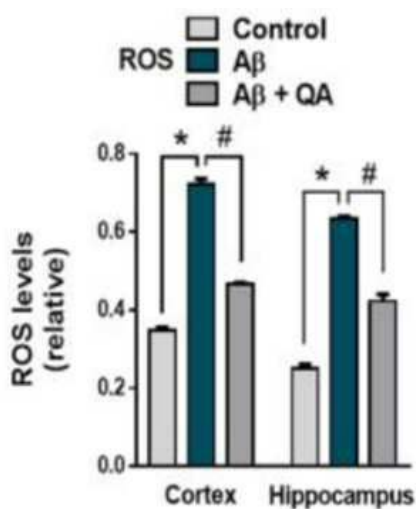
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 퀴노바산을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 퀴노바산을 포함하는 조성물로, 본 발명의 조성물을 섭취 또는 투여할 경우, 퇴행성 뇌질환을 예방, 개선 및 치료할 수 있으며, 인지기능을 증진시킬 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711119484

과제번호 2020M3E5D9080660

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 뇌질환극복연구사업(R&D)

연구과제명 면역제어 타겟 신규 물질발굴 및 효능 검증 신개념 파킨슨병 예방치료제 개발에 응
용

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경상대학교

연구기간 2020.07.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

퀴노바산(Quinovic acid)을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨 병(parkinson's disease), 헌팅턴병(huntington's disease), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 경도인지 장애(mild cognitive impairment), 노인성 치매(senile dementia), 루게릭병 (amyotrophic lateral sclerosis), 투렛 증후군(tourette syndrome), 근육긴장이상(dystonia), 진행성 핵상안근마비 (progressive supranuclear ophthalmoplegia) 및 전두측두치매(frontotemporal dementia(FTD))로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

퀴노바산(Quinovic acid)을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨 병(parkinson's disease), 헌팅턴병(huntington's disease), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 경도인지 장애(mild cognitive impairment), 노인성 치매(senile dementia), 루게릭병 (amyotrophic lateral sclerosis), 투렛 증후군(tourette syndrome), 근육긴장이상(dystonia), 진행성 핵상안근마비 (progressive supranuclear ophthalmoplegia) 및 전두측두치매(frontotemporal dementia(FTD))로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

퀴노바산(Quinovic acid)을 포함하는 인지기능 증진용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 퀴노바산을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리나라 전체 인구 중 65세 이상 인구가 차지하는 고령화율이 2019년 기준 15.36%를 기록하였다. 이에 따라 퇴행성 질환의 대표적 질환인 알츠하이머성 치매를 앓는 인구가 급속도로 늘어나고 있다. 중앙치매센터가 발간한 '대한민국 치매 현황 2019' 보고서에 따르면, 국내 65세 이상 노인 인구 중 75만 488명이 치매환자로 추정되며 치매 유병률은 10.16%에 달한다. 이는 노인 10명 중 1명이 치매를 앓는 꼴이며, 향후 치매환자가 2024년에는 100만명, 2039년에는 200만명, 2050년에는 300만 명을 넘어설 것으로 예상되고 있다.

[0003] 알츠하이머성 치매 등 퇴행성 뇌질환을 일으키는 원인으로 크게 두 가지 단백질의 활동이 주목 받고 있다. 상기 두 가지 단백질은 아밀로이드 베타(amyloid- β) 단백질의 응집에 의한 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)와 타

우 단백질이 응집해 형성되는 타우 탱글(tau tangle)이다. 상기 아밀로이드 베타가 뇌에 쌓이게 되면, 시냅스가 점차 사라져서 결국 기억을 잃는다. 따라서 아밀로이드 베타가 쌓였을 때 나타나는 반응들을 억제할 수 있는 물질이 있다면, 퇴행성 뇌질환을 예방 또는 치료하는 좋은 치료제로 사용될 수 있을 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 등록공보 제10-1064258호(2011.09.14)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 퀴노바산을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 퀴노바산을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

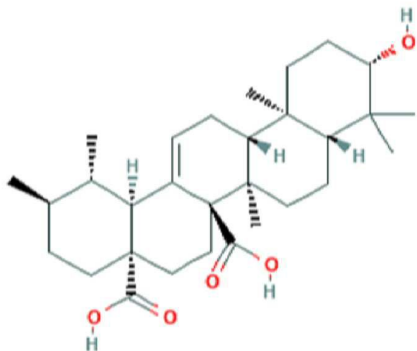
[0007] 또 다른 양상은 퀴노바산을 포함하는 인지기능 증진용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 퀴노바산을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 상기 퀴노바산은 생약성분 중 하나로, 식물들로부터 추출할 수 있는 성분일 수 있고, 화학식 $C_{30}H_{46}O_5$ 인 화합물로 화학구조는 하기 화학식 1일 수 있다.

화학식 1



[0010]

[0011] 상기 퇴행성 뇌질환은 아밀로이드 베타(Amyloid Beta, $A\beta$)가 축적되는 것을 통해 나타나는 것일 수 있고, 콜레스테롤이 뇌의 피질과 해마에 축적되므로 나타나는 것일 수 있으며, 산화 스트레스로 인해 나타나는 것일 수 있다. 또한, 퇴행성 뇌질환은 뇌의 염증이 나타나는 것일 수 있다.

[0012] 일 구체예에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨 병(parkinson's disease), 헌팅턴병(huntington's disease), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 경도인지 장애(mild cognitive impairment), 노인성 치매(senile dementia), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis), 투렛 증후군(tourette syndrome), 근육긴장이상(dystonia), 진행성 핵상안근마비(progressive supranuclear ophthalmoplegia) 및 전두측두치매(frontotemporal dementia(FTD))로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0013] 본 발명에서 '예방'은 퇴행성 뇌질환이 발생하는 것을 지연시키거나 억제하는 모든 행위를 의미한다. 상기 예방은 뇌의 해마와 피질에 신경 염증을 억제하는 것일 수 있고, 콜레스테롤 축적을 억제하는 것일 수 있으며, ROS를 감소시키는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명에서 '치료'는 퇴행성 뇌질환의 증상이 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

상기 치료는 뇌의 해마와 피질에 신경 염증을 완화하는 것일 수 있고, 콜레스테롤 축적을 완화하는 것일 수 있으며, ROS를 감소하는 것일 수 있다. 또한, 공간 인지능력 및 장기 기억을 회복하는 것일 수 있다.

- [0015] 본 발명에서 상기 약학 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 제형화 할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 퀴노바산을 포함하는 조성물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등을 사용할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0017] 다른 양상은 퀴노바산을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 일 구체예에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨 병(parkinson's disease), 헌팅턴병(huntington's disease), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 경도인지 장애(mild cognitive impairment), 노인성 치매(senile dementia), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis), 투렛 증후군(tourette syndrome), 근육긴장이상(dystonia), 진행성 핵상안근마비(progressive supranuclear ophthalmoplegia) 및 전두측두치매(frontotemporal dementia(FTD))로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 '퀴노바산', '퇴행성 뇌질환' 및 '예방'에 관한 설명은 상기에 기재되어있는 것과 동일하다.
- [0020] 본 발명에서 '개선'은 퇴행성 뇌질환의 증상을 완화하거나, 퇴행성 뇌질환의 진행을 억제하는 모든 행위를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로써 퀴노바산 외에, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어, 말토오스, 수크로오스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어, 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 향미제로서 천연 향미제[타우마린, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0022] 예를 들어, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 퀴노바산 외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액 및/또는 감초 추출액 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 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, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0024] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 일 구체예에 따르면 상기 식품 조성물은 건강기능식품, 기능성 음료, 야채주스, 발효유일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 또 다른 양상은 퀴노바산을 포함하는 인지기능 증진용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0027] 본 발명에서 '인지기능'은 무엇을 알아차리고 함축적인 사고로 깨닫게 되는 지적인 과정을 총칭하는 것으로, 공간을 인지하는 것일 수 있고, 학습 능력, 판단 능력 및 기억력 등을 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 '증진'은 인지기능이 향상되는 것을 의미하는 것으로, 공간 인지 능력, 학습 능력, 판단 능력 및 기억력 등의 향상을 의미하는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명에서 '퀴노바산', '식품 조성물'에 관한 설명은 상기에 기재되어 있는 것과 동일하다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 퀴노바산을 포함하는 조성물을 섭취 또는 투여할 경우, 퇴행성 뇌질환을 예방, 개선 및 치료할 수 있으며, 인지기능을 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 퀴노바산(Quinovic acid: QA) 처리 농도에 따른 세포의 생존도를 비교한 데이터이다.

도 2는 아밀로이드 베타(Amyloid Beta: A β)처리 후, 퀴노바산의 처리 농도에 따른 세포 생존도를 비교한 데이터이다.

도 3의 A는 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 유리 콜레스테롤의 양을 확인한 데이터이고, B는 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 처리에 따른 총 콜레스테롤의 양을 확인한 데이터이다.

도 4는 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따라 콜레스테롤 축적과 관련된 요인의 변화를 확인한 데이터로, A는 HMGCR, B는 p53의 발현을 확인한 것이다.

도 5는 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 ROS(Reactive Oxygen Species)의 변화를 확인한 데이터이다.

도 6은 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 GSH(glutathione)의 변화를 확인한 데이터이다.

도 7은 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 GSH: GSSG(산화 GSH)의 비율을 나타낸 데이터이다.

도 8은 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 Nrf2의 변화를 확인한 데이터이다.

도 9는 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 HO-1의 변화를 확인한 데이터이다.

도 10은 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 GFAP의 변화를 확인한 데이터이다.

도 11은 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 Iba-1의 변화를 확인한 데이터이다.

도 12는 신경염증 완화 여부를 보기 위해 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 IL-1 β 의 변화를 확인한 데이터이다.

도 13은 신경염증 완화 여부를 보기 위해 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 p-Jnk의 변화를 확인한 데이터이다.

도 14는 신경염증 완화 여부를 보기 위해 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 p-NF- κ B의 변화를 확인한 데이터이다.

도 15는 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 미토콘드리아 세포사멸 마커인 Bax의 변화를 확인한 데이터이다.

도 16은 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 미토콘드리아 세포사멸 마커인 Bcl-2의 변화를 확인한 데이터이다.

도 17은 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 미토콘드리아 세포사멸 마커인 Cyt-C의 변화를 확인한 데이터이다.

도 18은 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 미토콘드리아 세포사멸 마커인 Casp-3의 변화를 확인한 데이터이다.

도 19는 니슬 소체(Nissl body)를 염색하여 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따른 뇌의 밀도를 본 데이터이다.

도 20은 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따라 시냅스 조절 마커인 PSD-95의 변화를

확인한 데이터이다.

도 21인 뇌의 피질과 해마에서 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따라 시냅스 조절 마커인 SYP의 변화를 확인한 데이터이다.

도 22는 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따라 마우스의 플랫폼을 찾아내는 시간을 훈련 받는 5일간 기록한 데이터이다.

도 23은 5일간 훈련 받은 후, 6일차에 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따라 마우스의 플랫폼을 찾아내는 시간을 나타내는 데이터이다.

도 24는 6일차에 프로브 테스트(Probe test)시 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따라 마우스가 플랫폼이 있었던 사분면에 머물렀던 시간을 나타낸 데이터이다.

도 25는 6일차에 프로브 테스트(Probe test)시 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따라 마우스가 플랫폼이 있었던 자리를 교차한 횟수를 나타낸 데이터이다.

도 26은 Y 미로 실험시 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여에 따라 마우스가 새로운 공간을 파악하고 순차적으로 미로에 들어간 상대적 빈도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 실험예 1. 약물준비

[0035] 동물 실험에서는 인간 A β (1-42) 펩타이드(Sigma Chemicals Co.에서 구입)를 멸균 식염수 용액에서 1mg/ml의 저장 농도로 만들고, 37℃에서 배양하여 응집시켜 마우스 당 5 μ l씩 투여하였다.

[0036] 세포실험에서는 올리고머 A β (1-42)(Oligomeric amyloid-beta: A β O)는 논문[Ali, T.; Yoon, G.H.; Shah, S.A.; Lee, H.Y.; Kim, M.O. Osmotin attenuates amyloid beta-induced memory impairment, tau phosphorylation and neurodegeneration in the mouse hippocampus. Scientific reports 2015, 5, 11708, doi: 10.1038/srep11708.]에 개시된 대로 준비하였다. 간단히 설명하자면, A β (1-42) 펩타이드는 100% 헥사플루오소프로판올(HFIP; Hexafluoroisopropanol)에 용해하였다. 그 후, HFIP를 진공에서 증발시키고 디메틸설폭사이드(DMSO) 첨가하여 5mM 현탁액을 생성하였다. 5mM HFIP가 처리된 A β (1-42) 현탁액을 페놀 레드가 없는 F-12 배양 배지(Gibco by Life Technologies, USA에서 구입)를 100 μ M로 처리하여 5℃에서 24시간동안 배양하였다. 배양된 용액을 4℃에서 10분간 14,000rpm으로 원심 분리하고 A β O를 포함하는 상청액을 수집하였다. 세포 처리를 위해 A β O는 최종농도 5 μ M로 사용하였다.

[0037] 퀴노바산(QA: Quinovic acid)은 논문[Saleem, S.; Jafri, L.; ul Haq, I.; Chang, L.C.; Calderwood, D.; Green, B.D.; Mirza, B. Plants Fagonia cretica L. and Hedera nepalensis K. Koch contain natural compounds with potent dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory activity. J. Ethnopharmacol. 2014, 156, 26-32, doi: 10.1016/j.jep.2014.08.017.]에 보고된 대로 분리하였다. 분리한 퀴노바산을 동물 실험에서는 멸균된 식염수에 용해시켜 50mg/kg으로 복강주사(intraperitoneal, IP)로 투여하고, 세포실험에서는 DMSO에 용해시켜 사용하였다.

[0039] 실험예 2. 세포 배양

[0040] 인간 신경 모세포종 SH-SY5Y 세포(한국 세포주 은행에서 구매)는 1% 페니실린-스트렙토마이신과 10% 우태아 혈청(FBS)이 보충된 MEM+F12(1:1)에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 세포가 60-70% 포화되었을 때 실험에 사용하였다.

[0042] 실험예 3. MTT 어세이

- [0043] 세포의 생존력 및 용량 최적화 수준을 평가하기 위하여, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석을 사용하였다. SH-SY5Y 세포는 1% 페니실린-스트렙토마이신 및 10% FBS로 증강된 웰 당 100ml MEM+F12(1:1) 배지가 들어있는 96 웰 플레이트에 웰 당 2×10^4 개 세포를 접종하여 성장시켰다. 세포는 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양되었고, 배지는 정기적으로 교체하였다. 배지 포화도 60-70%에서 배지를 변경하였고, 세포는 적정 용량을 확인하기 위해 퀴노바산(0, 5, 10, 30, 55, 70, 85, 100 및 115 μM)을 다른 농도로 단독 처리하거나 5 μM의 Aβ와 동시처리하고 24시간동안 37℃에서 배양하였다. DMSO의 최종농도는 각 웰당 0.25% 미만으로 유지되게 하였다.
- [0044] 대조 배양 웰은 유지 배지를 포함하거나 0.2% DMSO(Vehicle Control)를 첨가하였습니다. 배양 후, 웰 당 10 μL의 MTT를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 형성된 포르마잔은 배지를 제거하고 10~15분 더 배양한 후 100 μL의 DMSO를 첨가하여 용해하였다. 흡광도는 마이크로 플레이트 리더 ApoTox-Glo™(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 550-570nm에서 측정하였다. 실험은 3회 수행하였다.
- [0046] **실험예 4: 마우스 준비**
- [0047] 8주령된 C57BL/6J 수컷 마우스(약 25-30g)를 Samtako Bio Korea에서 구입하였다. 마우스를 21~25℃, 12시간 명암주기로 물과 음식을 자유 섭취할 수 있는 환경을 제공하여 일주일 동안 순응기간을 가졌다. 순응기간을 가진 마우스를 한 그룹당 12마리씩으로, 식염수를 처리한 대조군, Aβ와 멸균 식염수 처리군, Aβ와 퀴노바산 처리군으로 나눴다. 연구의 모든 실험은 대한민국 경상대학교(GNU) 생명 과학 및 응용 생명 과학과의 동물 윤리위원회(IACUC)의 지침과 원칙을 따랐다.
- [0049] **실험예 5: 마우스 모델과 약물 투여**
- [0050] Aβ(1-42) 뇌실내(i.c.v: intracerebroventricular) 투여의 경우, 마우스를 체중 100g 당 0.5ml Rompum: Zoletil로 마취시키고, 응집된 Aβ(1-42) 및 식염수를 해밀턴 미세 주사기(Hamilton micro syringe)를 사용하여 마우스의 뇌실내(i.c.v)로 5ul/5min을 투여하였다.
- [0051] 퀴노바산은 마우스에 Aβ(1-42)를 투여한 다음날부터 50mg/kg로 3주간 격일로 복강주사 하였다.
- [0053] **실험예 6. 동물 행동 분석**
- [0054] 공간 학습과 기억력은 Aβ(1-42)를 뇌실내로 주입한 후 14-20일 후 모리스 수중 미로(Morris water maze: MWM)와 Y미로를 사용하여 조사하였다. 실험하는 동안 동물의 경로는 자동 추적 시스템 소프트웨어(SMART, Panlab Harward-Apparatus, Bioscience Company, Holliston, USA)를 사용하여 기록하였다.
- [0055] 모리스 수중 미로(MWM) 실험을 하기 위해서, 직경 100cm, 깊이 40cm로, 불투명한 물로 채워진 원형 풀에 직경 10cm, 높이 14cm인 투명한 플랫폼을 원형 풀의 4분면 중 한 곳에 임의로 띄어놓았다. 마우스는 실험 시작 하루 전날 플랫폼 없이 60초 동안 수영을 하여 수영장에 처음 적응시켰다.
- [0056] 장기기억(reference memory)을 테스트하기 위해서, 마우스는 1일에 3개의 트레이닝 세션(120초/시행)으로 5일동안 훈련하였다. 플랫폼은 각 시험마다 다른 사분면으로 위치를 변경하여 배치하였다. 동물은 사분면 중 하나의 중앙에 배치하고 플랫폼을 찾으려 하였다. 허용된 시간을 초과한 마우스는 수동으로 플랫폼이 있는 곳으로 안내하여 10초동안 머물게 하였다. 6일차에 마우스 그룹 간의 공간 기억 보유를 분석하기 위해서 플랫폼을 제거하고, 마우스를 사분면 중 하나에서 60초동안 플랫폼을 찾으려 하는 프로브 시험(probe test)을 하였다. 플랫폼이 있었던 사분면에서 소요된 시간과 플랫폼의 위치를 교차한 횟수를 기록하고 분석하였다.
- [0057] Y-미로(Y-Maze)는 마우스의 인지 및 작업 기억을 테스트하기 위해 자발적인 행동 변화(탐사 행동/ 새로운 팔 미로 탐색 선호도)를 평가하기 위해 사용하였다. 실험에 사용된 Y 미로는 팔의 길이가 75cm, 넓이 15cm, 높이 10cm이며, 팔 가운데 각도가 120° 인 Y자형 미로를 사용하였다.
- [0058] 동물들은 미로의 팔 중 한쪽에 풀어놓고, 8분 동안 자유롭게 탐색할 수 있게 하였다. 실험은 하루 3번 수행되었고, 각 실험마다 마우스는 다른 팔에 배치되어 시작되었다. 마우스 신체 진입의 85%가 성공적인 진입으로 기록

되었다. 자발적인 행동 변화의 %는 하기와 같은 식으로 분석되었다.

[식 1]

$100 \times [(\text{연속적으로 3개의 다른 팔에 차례로 진입한 횟수}) / (\text{총 팔의 진입한 횟수} - 2)]$

실험예 7. 조직 수집과 샘플 준비

행동 평가를 마치고, 마지막 i.p 주사 후, 동물을 마취시켰다. 생화학적 분석을 위해 즉시 뇌를 제거하고 피질과 해마 부위를 드라이아이스에서 분리하여 -80°C 에 보관하였다. 단백질을 추출을 위해 두뇌 영역을 pro-prep(단백질 추출 용액)에서 균질화한 다음 4°C 에서 30분동안 13,000rpm으로 원심분리한 후, 상층액을 수집하였다.

면역 조직 화학적 및 형태학적 분석을 위해 마우스를 0.9% 식염수로 경심 관류(transcardial perfusion)를 시킨 후, 4% 파라포름알데히드(PFA: paraformaldehyde)로 재관류시켰다. 뇌를 제거하고 4°C 에서 72시간 동안 차가운 파라포름알데히드에 담가 고정시킨 다음 뇌가 튜브 바닥에 가라앉을 때까지 20% 수크로스에 옮겼다. 뇌 조직을 O.C.T.(TissueTek O.C.T. Compound Medium, Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, USA) 에서 동결시켰다. CM 3050C 저온 유지 장치(Leicam, Germany)를 사용하여 $14\mu\text{m}$ 관상 평면 조직 절편을 얻고 양전하 젤라틴 코팅 슬라이드에 해동시켰다.

실험예 8. 면역 블롯팅과 면역 형광법

면역 블롯팅과 면역 형광법은 논문 [Khan, M.S.; Muhammad, T.; Ikram, M.; Kim, M.O. Dietary Supplementation of the Antioxidant Curcumin Halts Systemic LPS-Induced Neuroinflammation-Associated Neurodegeneration and Memory/Synaptic Impairment via the JNK/NF-kappaB/Akt Signaling Pathway in Adult Rats. Oxidative medicine and cellular longevity 2019, 2019, 7860650, doi: 10.1155/2019/7860650. 및 Alam, S.I.; Rehman, S.U.; Kim, M.O. Nicotinamide Improves Functional Recovery via Regulation of the RAGE/JNK/NF-kappaB Signaling Pathway after Brain Injury. J Clin Med 2019, 8, doi: 10.3390/jcm8020271.]에 설명된 대로 수행하였다. 면역 블롯팅의 경우, β -액틴 발현을 모든 실험에 대한 내부 대조군으로 사용하였다. 레이저 스캐닝 공초점 현미경(FluoView FV 1000 MPE)을 사용하여 면역 형광 시각화를 수행하였다. 두 기술의 데이터는 컴퓨터 기반 Image J 소프트웨어와 GraphPad Prism(버전 7.0)을 사용하여 평가하였다. 값은 평균 $\pm$ 표준 오차(standard errors of the mean: SEM)로 나타내었다. 면역 블롯팅과 면역 형광법에 사용된 항체는 하기 표 1과 같다.

표 1

1차 항체	구입처	웨스턴 블롯	면역조직화학
Mouse anti- β -Amyloid Antibody (B-4)	Santa CruzBiotechnology	1:1000	-
Mouse anti-BACEAntibody (61-3E7)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	-
Mouse anti-p53 Antibody (DO-1)	Santa CruzBiotechnology	1:1000	-
Rabbit anti-p53 Antibody	Cell Signaling	-	1:2000
Mouse anti-HMGCRAntibody (C-1)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	1:100
Rabbit anti Keap1 Antibody (H-190)	Santa CruzBiotechnology	1:1000	-
Mouse anti-Nrf2 Antibody (A-10)	Santa CruzBiotechnology	1:1000	1:100
Mouse anti-Heme Oxygenase 1 Antibody (A- 3)	Santa CruzBiotechnology	1:1000	-
Rabbit anti- HemeOxygenase 1 Antibody(E9H3A)	Cell Signaling	-	1:1500
Mouse anti-p-JNK Antibody (G-7)	Santa CruzBiotechnology	1:1000	-
Mouse anti-p-NFB p65 Antibody (27.Ser 536)	Santa CruzBiotechnology	1:1000	-

Mouse anti-IL-1 α Antibody (E7-2-hIL1 α)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	-
Mouse anti-GFAP Antibody (2E1)	Santa Cruz Biotechnology	1:300	1:100
Mouse anti-Iba-1 Antibody (1022-5)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	-
Rabbit anti-Iba-1 Antibody (PA5-27436)	Thermo Fisher Scientific	-	1:100
Mouse anti-Bax Antibody (2D2)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	-
Mouse anti-Bcl2 Antibody (100)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	-
Mouse anti-caspase-3 Antibody (E-8)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	-
Mouse anti-Cytochrome C(A-8)	Santa Cruz Biotechnology	1:300	-
Mouse anti-PSD-95 Antibody (6D677)	Santa Cruz Biotechnology	1:300	-
Mouse anti-SYP Antibody (H-8)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	-

[0070] 실험예 9. 니슬 염색법

[0071] 니슬 염색은 뇌 조직 신경 형태 및 병리를 분석하기 위하여 수행하였다. 간단히 말해서, 뇌 절편을 PBS(0.01M)에서 15분동안 두 번 세척한 다음 몇 방울의 빙하 아세트산으로 증가된 결정 0.5% 크레실 바이올렛 염색액에서 8-10분동안 배양하였다. 조직을 증류수로 세척하고 에틸알코올(70, 95, 100%)로 15분 동안 분화시켰다. 탈수 후, 조직을 자일렌(xylene)으로 각각 3분동안 2회 세척하고, 비형광 봉입제(mounting medium)로 덮었다. 형광 현미경으로 면역 조직 화학적 분석을 수행하고, TIF 이미지를 캡처하였다. 또한, 뇌의 피질-전체 영역과 해마-전체 영역에서 살아남은 뉴런의 수를 Image J 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0073] 실험예 10. 콜레스테롤, GSH 및 ROS 어세이

[0074] 뇌 균질물의 총 콜레스테롤 및 유리 콜레스테롤 수치는 분석 키트(ab65390, Abcam)를 사용하여, 분석 키트의 매뉴얼을 사용하여 정량화하였다. 글루타치온(GSH) 수준 및 GSH/산화 GSH(GSSG) 비율은 형광측정 GSH 분석 키트(Bio-Vision Inc., Milpitas, CA, USA, cat. No. K264-100)로 측정하였다.

[0075] ROS 수준은 논문[Ikram, M.; Saeed, K.; Khan, A.; Muhammad, T.; Khan, M.S.; Jo, M.G.; Rehman, S.U.; Kim, M.O. Natural Dietary Supplementation of Curcumin Protects Mice Brains against Ethanol-Induced Oxidative Stress- Mediated Neurodegeneration and Memory Impairment via Nrf2/TLR4/RAGE Signaling. Nutrients 2019, 11, doi: 10.3390/nu11051082.]에 설명된 대로 실험하였다. 간단히 정리하면, 마우스 뇌의 균질물을 얼음이 냉각된 Locke의 완충액(1:20)에 희석하여 5.0mg/조직/ml의 최종 농도 용액을 얻었다. 형광을 얻기 위해 1ml 용액(Locke's buffer, pH7.4 및 균질한 0.2ml)을 10ml의 5mM 디클로로디하이드로플루오레세인 다이아세테이트(dichlorodihydrofluorescein diacetate: DCFH-DA)(Santa Cruz Biotechnology, CAS #4091-99-0)와 함께 30분동안 배양하였다. DCFH-DA는 디클로로플루오레세인(dichlorofluorescein:DCF)으로 산화되어 형광 생성물을 생성하였다. 분석의 형광 강도는 96웰 형광 마이크로 플레이트 리더 ApoTox-Glo™(Triplex Assay, Promega, Madison, WI, USA))을 사용하여 측정되었다(콜레스테롤:Ex/Em=535/587nm, GSH:Ex/Em=340/420nm 및 ROS:Ex/Em= 484/530nm).

[0077] 실험예 11. 통계학적 분석

[0078] 면역 블롯 밴드(X선 스캔 필름)와 면역 형광 이미지 밀도는 Image J로 분석하였으며, 모든 실험 결과는 Turkey's post hoc test에 이어 one way analysis of variance(ANOVA)를 사용하였고, GraphPad Prism 소프트웨어(ver.7.0, 캘리포니아 주 샌디에고)에 의해 통계적으로 평가하였다. 결과는 평균±평균 오차(standard errors of the mean: SEM)으로 표시하였다.

[0079] * $p \leq 0.05$ (대조군의 경우) 및 # $p \leq 0.05$ (퀴노빅 산 처리 군의 경우)로 표시된 통계적 차이는 둘 다 A β 독성 그룹과 비교할 때 유의한 것으로 간주하였다.

[0081] 실시예 1. 퀴노바산 처리량에 따른 세포 생존력

[0082] 퀴노바산 처리량에 따른 세포의 생존력을 확인하기 위해서, SH-SY5Y 세포에 퀴노바산을 처리하였을 때 세포의 생존율을 확인하였다. 도 1을 보면, 퀴노빅 산 처리시 100 μ M까지는 퀴노바산을 처리하지 않은 대조군과 유의한 차이가 없었으나, 퀴노빅 산 115 μ M 처리시에는 퀴노바산을 처리하지 않은 대조군보다 세포 생존도가 떨어지는 것을 확인하였다.

[0083] 도 2를 보면 알 수 있듯, 아밀로이드 베타(A β , Amyloid Beta) 5 μ M 처리시, 세포의 생존율이 현저히 줄어드는 것을 확인하였으며, 아밀로이드 베타와 함께 퀴노바산을 처리시 퀴노바산 55 μ M 내지 85 μ M까지는 처리량에 비례하여 세포 생존도가 높아지며, 100 μ M 부터는 세포 생존도가 베타 아밀로이드만 처리한 세포와 유의미한 차이가 없다는 것을 확인하였다.

[0085] 실시예 2. 뇌 콜레스테롤 억제 효과 확인

[0086] 아밀로이드 베타 및 퀴노바산을 주입하였을 때, 뇌의 피질(cortex)과 해마(hippocampus)에서 콜레스테롤 및 유리 콜레스테롤의 변화를 알아보기 위해 콜레스테롤 어세이를 실행하였다. 그 결과 도3과 같이, 아밀로이드 베타를 투여하였을 때, 뇌의 피질과 해마에서 유리 콜레스테롤 및 총 콜레스테롤의 양이 증가하는 것을 확인하였으며, 아밀로이드 베타와 퀴노바산을 투여시 정상 쥐와 같이 유리 콜레스테롤 및 총 콜레스테롤의 양이 감소하는 것을 확인하였다.

[0087] 도4와 같이, p53의 발현량과 HMGCR의 발현량이 아밀로이드 베타 투여시 뇌의 피질과 해마에서 증가하는 것을 확인하였고, 되는 p53의 발현량과 HMGCR의 발현량이 아밀로이드 베타 및 퀴노바산을 투여하였을 때는 감소하는 것을 확인하였다.

[0088] p53은 콜레스테롤 대사를 변화시키기 위해 HMGCR(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase)을 포함한 MVA(mevalonate) 경로의 중요한 효소 활성을 조절하므로, 상기 결과를 통해 p53 및 HMGCR의 억제를 통해 콜레스테롤 축적을 억제한다는 것을 확인하였다.

[0090] 실시예 3. 산화스트레스에 대한 세포 보호 효과 확인

[0091] 도 5와 같이, ROS assay를 통해 아밀로이드 베타로부터 발생한 ROS 수치가 아밀로이드 베타와 퀴노바산을 투여한 마우스의 뇌에서는 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

[0092] 뇌의 활성산소를 제거해주는 글루타치온(GSH: glutathione)의 양은 도 6를 보면 알 수 있듯이, 아밀로이드 베타를 주입하였을 때는 감소하였다가 아밀로이드 베타 및 퀴노바산을 주입한 마우스에서는 글루타치온이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 도7에 나타난 바와 같이, 아밀로이드 베타 투여시 글루타치온의 환원된 형태(GSH)와 산화된 형태(GSSG)의 비율이 감소하는 반면, 아밀로이드 베타 및 퀴노바산을 투여시 GSH와 GSSG의 비율이 다시 증가하는 것을 확인하였다.

[0093] 도 8 및 도 9는 면역형광법을 통해 나타난 결과로, 아밀로이드 베타 투여로 인해 산화스트레스가 발생하였을 때, Nrf-2 및 HO-1이 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 아밀로이드 베타 및 퀴노바산 투여시 Nrf 및 HO-1이 증가되는 것을 확인하였다.

[0094] 따라서, 도 5 내지 도 9의 결과를 통해서 아밀로이드 베타로 인해 증가한 산화스트레스가 퀴노바산으로 인해 감소 또는 억제된다는 것을 확인하였다.

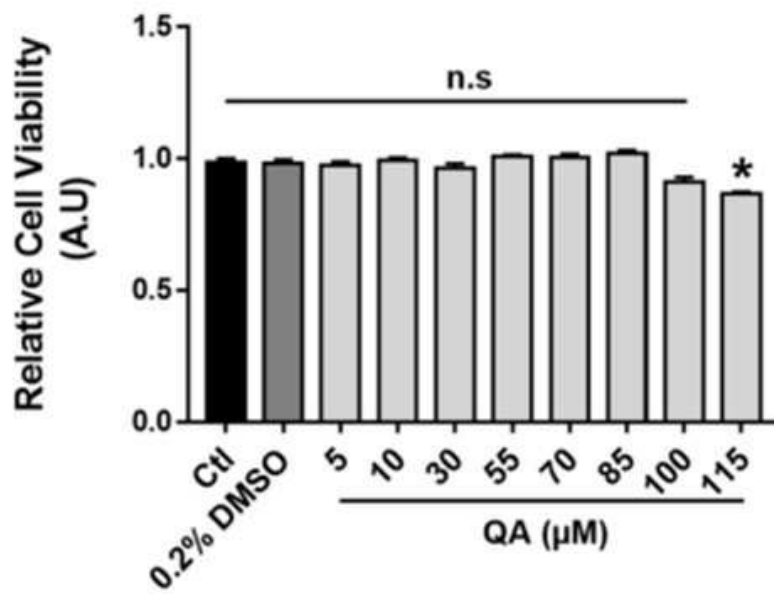
[0096] 실시예 4. 신경 염증 완화 효과 확인

[0097] 뇌의 콜레스테롤 축적으로 인해 발생한 산화스트레스는 뇌에서 염증을 일으킨다. 따라서 퀴노바산이 염증을 억제하는 것을 확인하기 위해서 면역 블롯팅을 통해 뇌의 염증 지표들을 확인하였다.

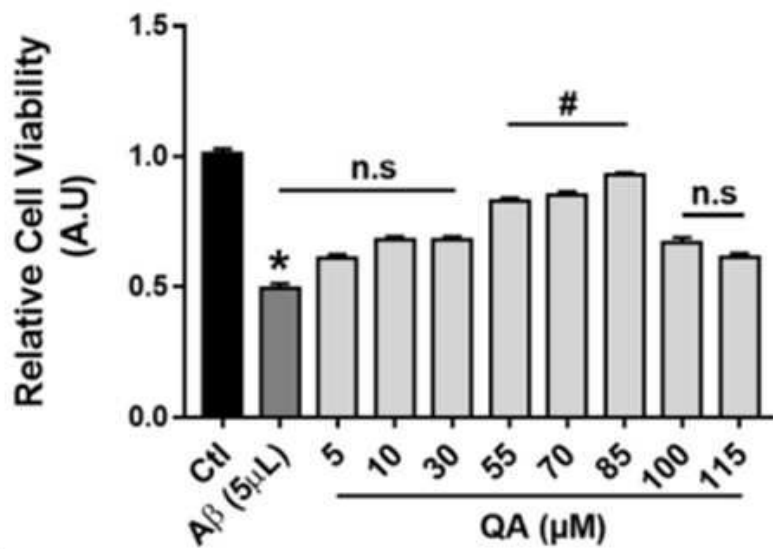
- [0098] 그 결과 도 10 내지 도 11에 나타난 것과 같이, GFAP 및 Iba-1가 아밀로이드 베타 투여하였을 때 증가하였다는 것과 퀴노바산을 투여했을 때 감소하는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해서 아밀로이드 베타에 의해 신경교식증(astrogliosis)과 소교세포증(microgliosis)이 증가한다는 것과 아밀로이드 베타에 의해 증가된 신경교식증(astrogliosis)과 소교세포증(microgliosis)이 퀴노바산에 의해 감소한다는 것을 확인하였다.
- [0099] 또한, 도 12 내지 도 14와 같이 아밀로이드 베타를 통해 IL-1 β , p-Jnk 및 p-NF- κ B가 증가하는 것과, 아밀로이드 베타와 퀴노바산을 처리하였을 때 IL-1 β , p-Jnk 및 p-NF- κ B가 감소하는 것을 확인하였다.
- [0100] 이를 통해 퀴노바산이 아밀로이드 베타로 인해 발생한 신경염증을 완화하는 효과가 있다는 것을 확인하였다.
- [0102] **실시예 5. 미토콘드리아 이상기능으로 인한 신경퇴행과 세포 사멸 억제 효과 확인**
- [0103] 신경퇴행성 질환에서 미토콘드리아의 이상기능은 잘 알려진 징후이다. 따라서 미토콘드리아 이상 기능에 퀴노바산의 효과를 알아보기 위해 면역 블롯팅과 니슬 염색법을 실행하였다.
- [0104] 그 결과는 도 15 내지 도 19로 나타내었다.
- [0105] 도 15 내지 도 16을 보면, 아밀로이드 베타를 투여하였을 때, 뇌에서 세포사멸 전구체(pro-apoptotic)인 Bax 단백질은 증가하고, 세포사멸을 억제하는 Bcl-2가 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 아밀로이드 베타와 퀴노바산을 투여하였을 때, Bax 단백질은 감소하고 Bcl-2는 증가하는 것을 확인하였다.
- [0106] 도 17 내지 도 18을 보면, 아밀로이드 베타를 투여했을 때, 미토콘드리아 기능을 악화시키는 사이토크롬-C(cytochrome-C)가 증가한다는 것과 세포사멸이 유발되어 카스파제-3(Caspase-3)이 증가한다는 것을 확인하였다. 또한, 아밀로이드 베타와 퀴노바산을 투여하였을 때, 사이토크롬-C 및 카스파제-3이 대조군과 비슷할 정도까지 감소하는 것을 확인하였다.
- [0107] 니슬 염색법을 해본 결과, 도 19와 같이 아밀로이드 베타만 투여하였을 때는 뇌의 밀도가 현저히 감소하는 반면, 아밀로이드 베타와 퀴노바산을 투여한 경우 뇌의 밀도 감소가 아밀로이드 베타 투여시보다 확연히 줄어드는 것을 확인하였다.
- [0108] 따라서, 퀴노바산을 투여시 아밀로이드 베타에 의해 미토콘드리아의 이상기능이 억제되는 것과 그로 인한 세포 사멸효과가 억제되고, 뇌의 퇴행성 진행이 억제되는 것을 확인하였다.
- [0110] **실시예 6. 시냅스 및 기억 기능 장애에 대한 효과 확인**
- [0111] SYP(Synaptophysin)과 PSD-95(postsynaptic density protein 95)를 확인하기 위해, 면역블롯팅을 하였다.
- [0112] 그 결과 도 20 내지 도 21과 같이 아밀로이드 베타를 투여한 마우스에서는 PSD-95와 SYP가 감소된 반면, 아밀로이드 베타와 퀴노바산을 투여한 마우스에서는 아밀로이드 베타만 투여한 마우스 대비 PSD-95와 SYP가 증가한 것을 확인하였다.
- [0113] 도 22 내지 도 25에 나타나 듯, MWM(Morris water maze) 테스트를 통해 아밀로이드 베타와 퀴노바산을 투여한 마우스가 아밀로이드 베타만 투여한 마우스 대비 플랫폼을 찾는 학습 효과가 3일차부터 차이가 났으며, 플랫폼을 찾아 탈출하는 시간이 현저히 줄었다. 또한, 프로브 테스트에서 원래 플랫폼이 있었던 사분면과 플랫폼의 자리를 돌아다닌 횟수가 현저히 증가한 것을 확인하므로, 아밀로이드 베타로 인한 학습능력 및 공간 기억의 퇴화가 퀴노바산에 의해 억제된다는 것을 확인하였다.
- [0114] 또한, 도 26 내지 27에 나타나 있듯이 Y 미로 테스트를 통해서 아밀로이드 베타를 투여한 마우스는 새로운 공간에 대한 호기심이 낮은 반면, 아밀로이드 베타 및 퀴노바산을 투여한 마우스는 새로운 공간에 들어가며 새로운 공간에 대한 호기심이 나타나는 것을 확인하였고, 이를 통해 공간을 운용하는 기억이 활성화 된다는 것을 확인하였다.

도면

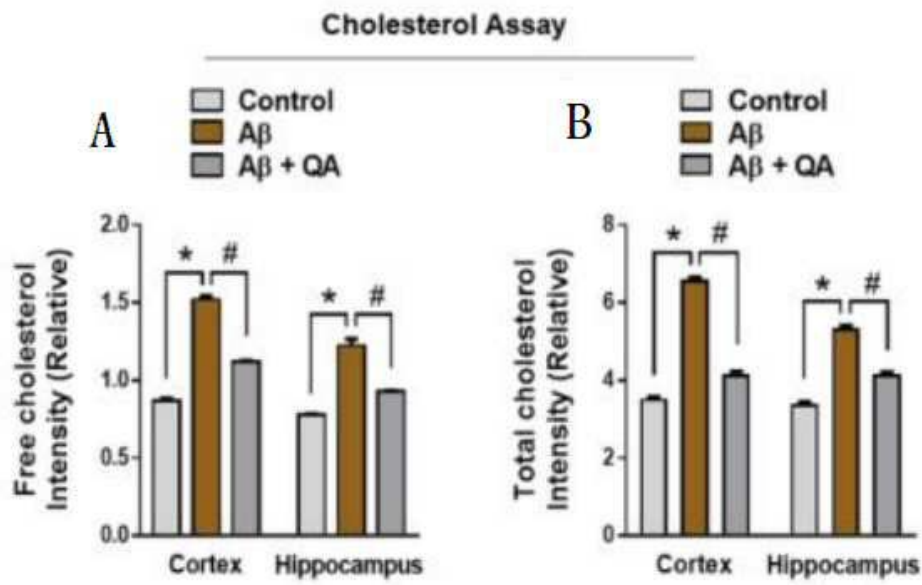
도면1



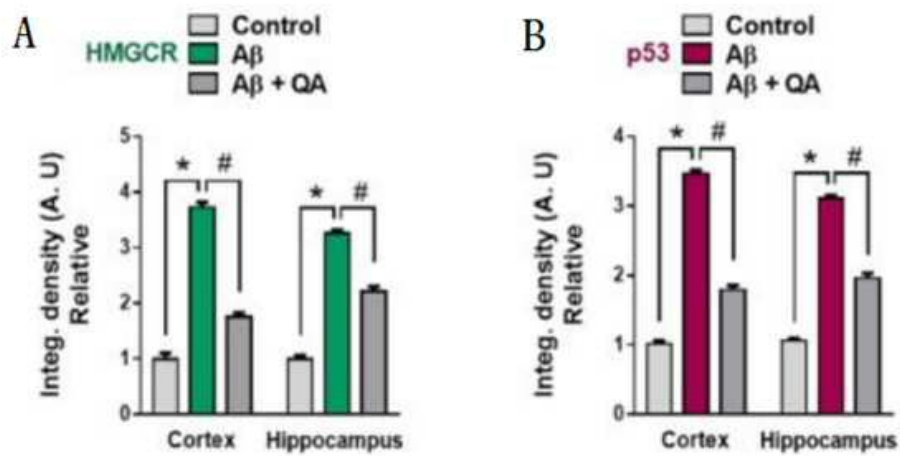
도면2



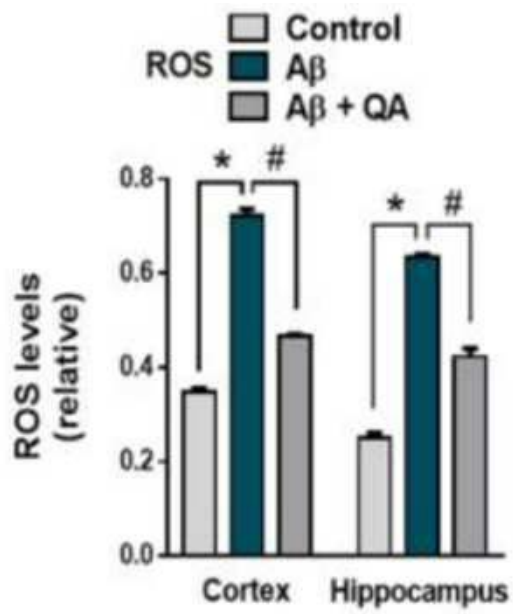
도면3



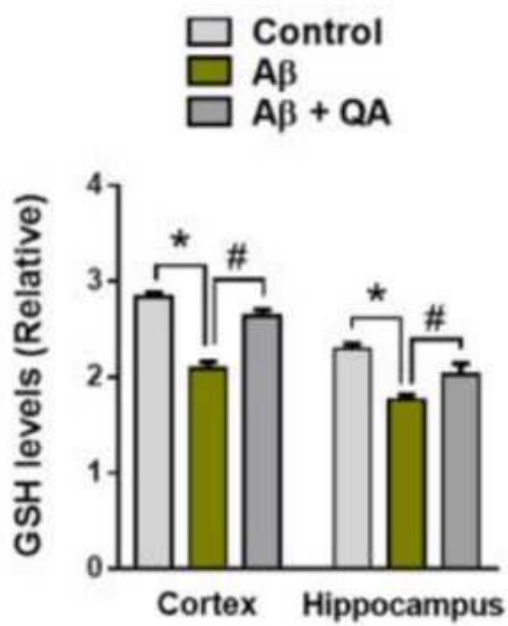
도면4



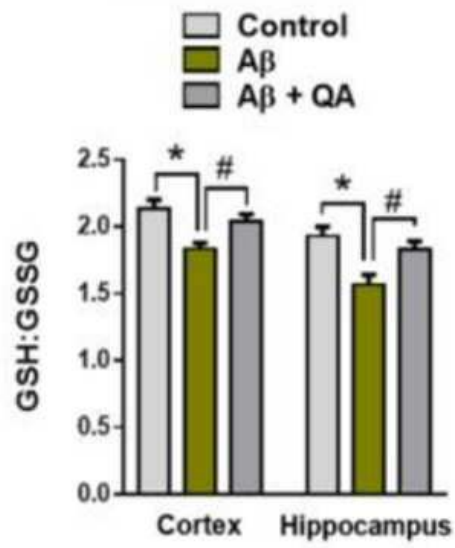
도면5



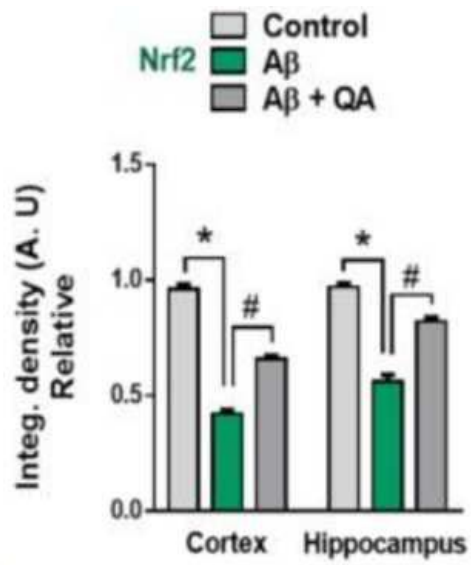
도면6



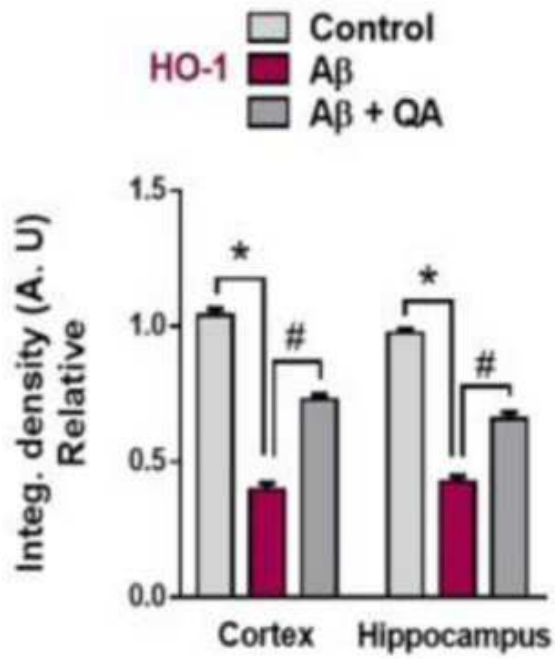
도면7



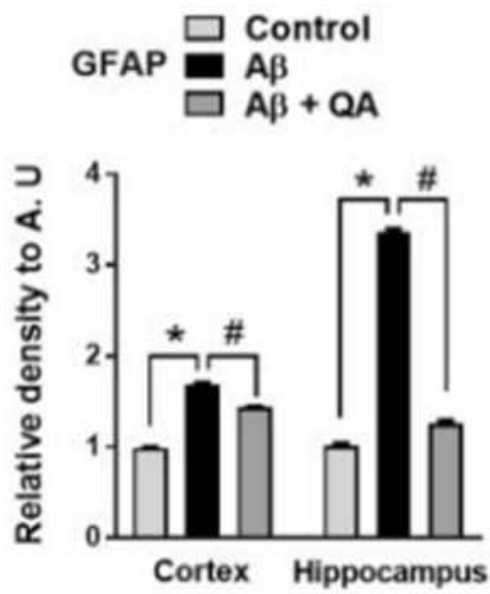
도면8



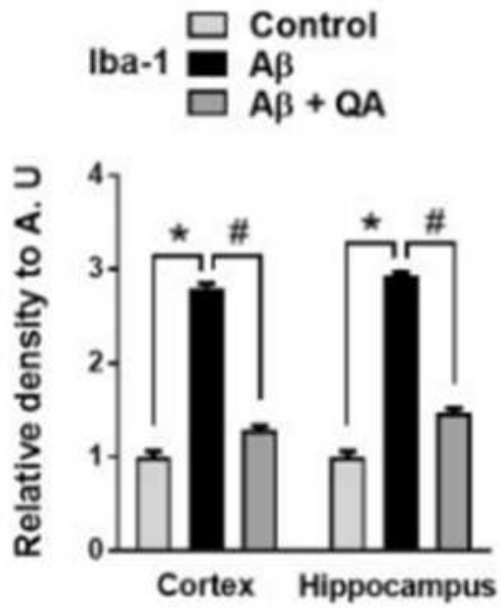
도면9



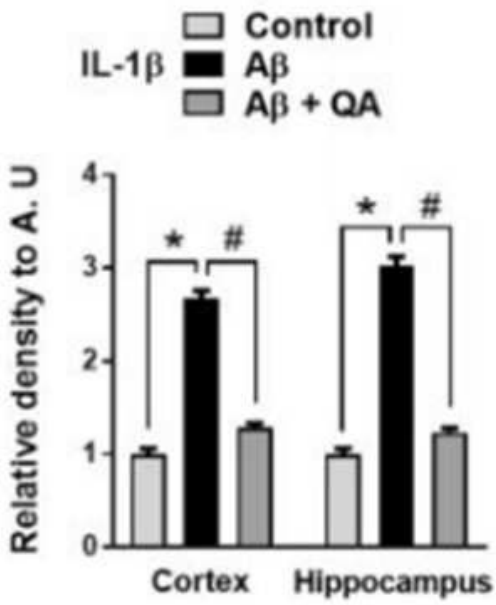
도면10



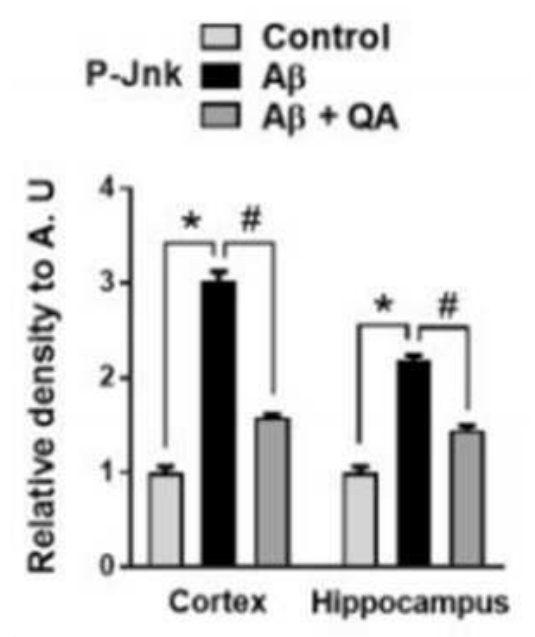
도면11



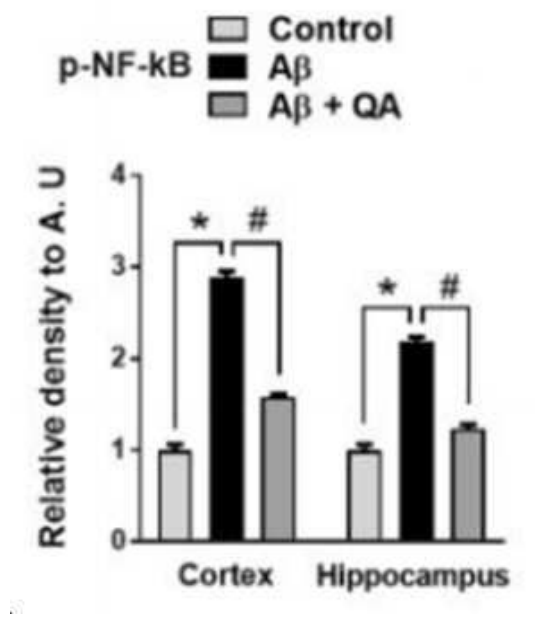
도면12



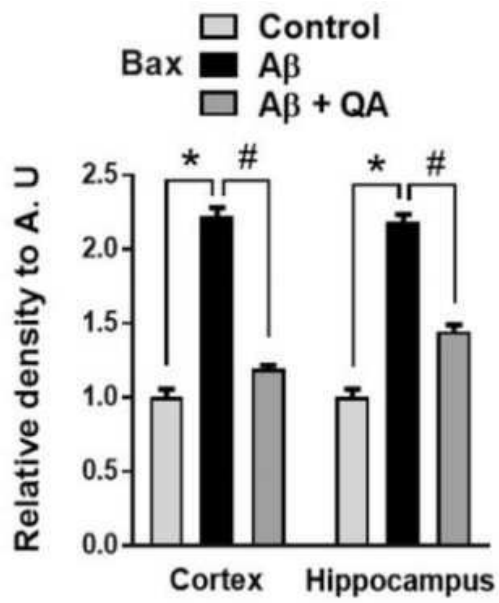
도면13



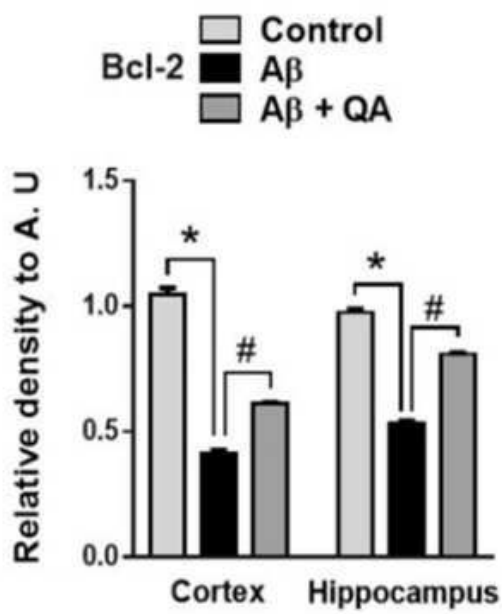
도면14



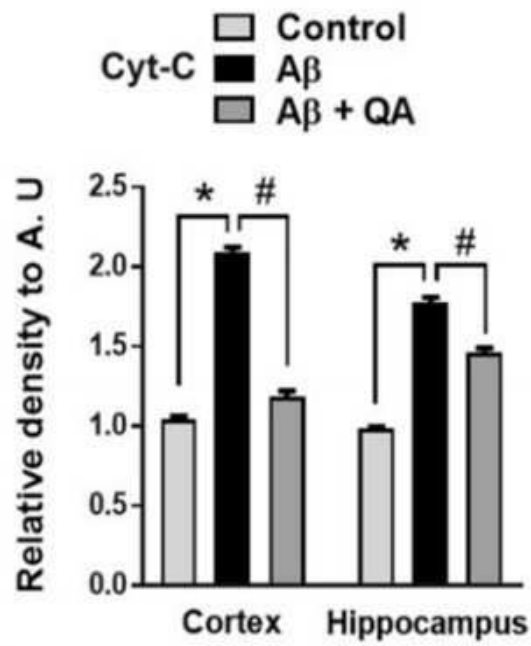
도면15



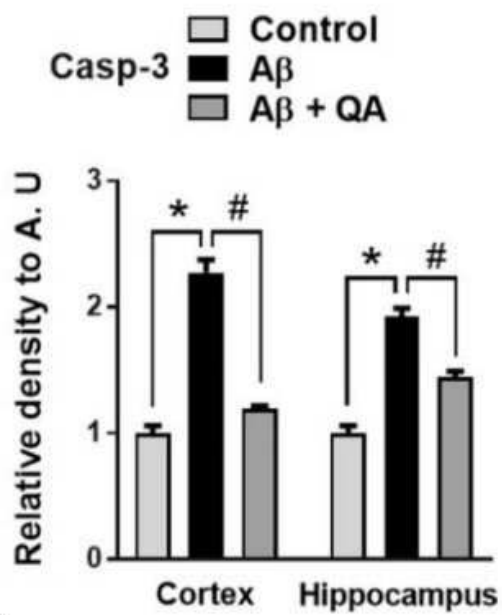
도면16



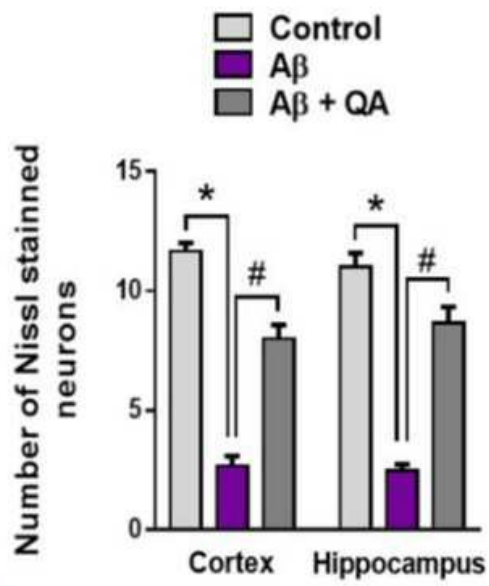
도면17



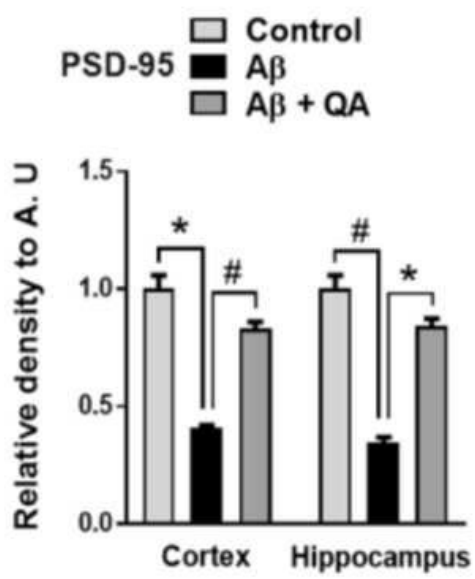
도면18



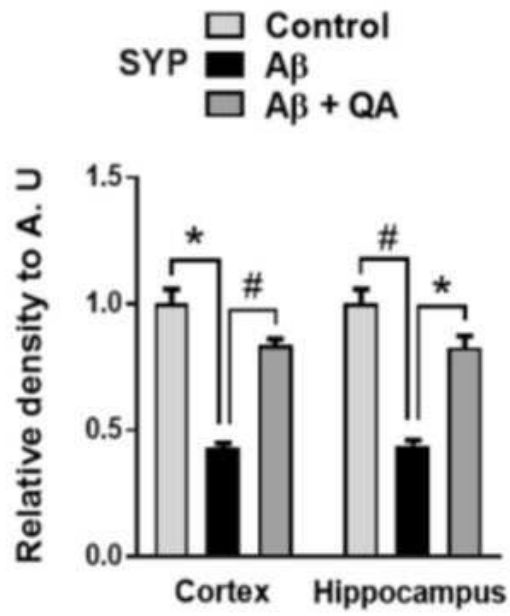
도면19



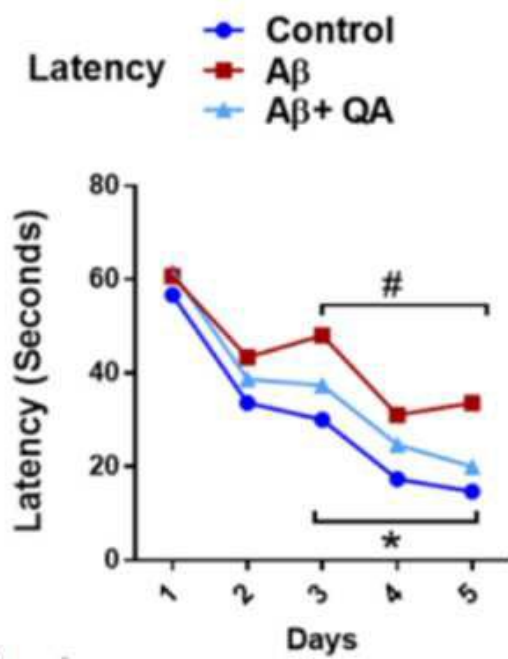
도면20



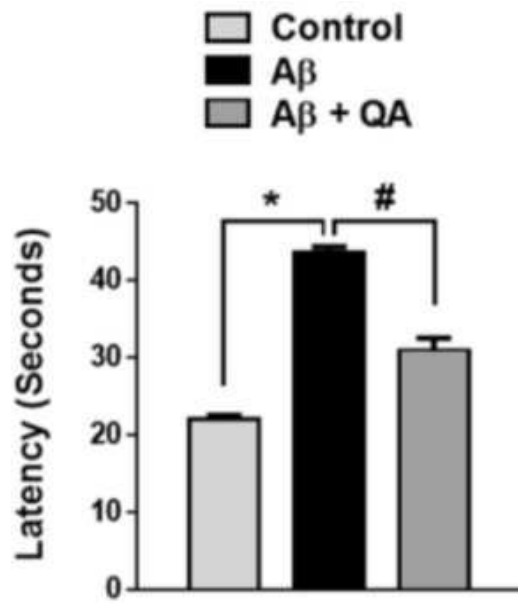
도면21



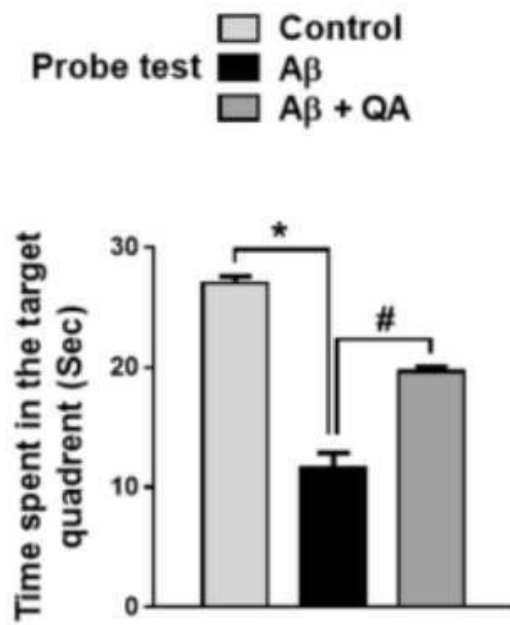
도면22



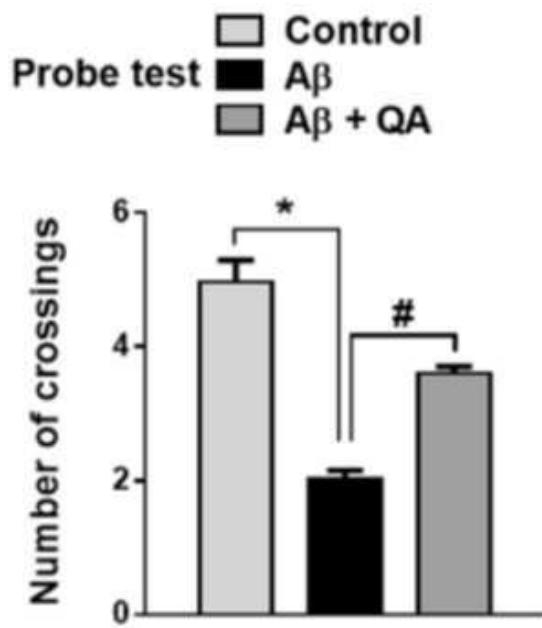
도면23



도면24



도면25



도면26

