



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0115951
(43) 공개일자 2013년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/70 (2006.01) A61K 36/258 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01) A61P 25/24 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0038799

(22) 출원일자 2012년04월13일

심사청구일자 2012년04월13일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

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

(72) 발명자

함대현

서울시 동대문구 장안동 329-3 (9/1) 래미안 장안2차아파트 217동 802호

이혜정

경기도 용인시 수지구 신봉동 873 LG자이1차아파트 109동 502호

이봄비

서울특별시 동대문구 회기동 109-96번지 플러스빌 102호

(74) 대리인

손민

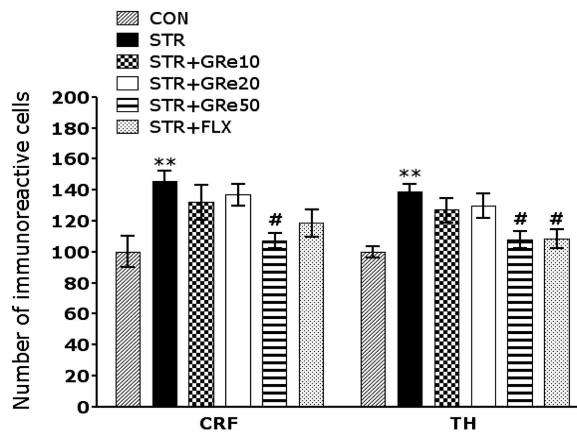
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 진세노사이드 Re를 유효성분으로 포함하는 우울증, 불안 장애 또는 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품

(57) 요약

본 발명은 진세노사이드 Re를 포함하는 우울증, 불안장애 및 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로서, 랫트에 구금스트레스를 유도하여 강제 수영 테스트, 고가식 십자미로 테스트, 능동회피조건 테스트(active avoidance conditioning test)를 수행하여 진세노사이드 Re 투여에 의한 우울증, 불안장애 및 기억력 감퇴의 치료 또는 개선 효과를 확인하였다. 또한 진세노사이드 Re를 투여한 경우 뉴런의 타이로신 수산화효소(TH)의 발현이 증가하는 것을 억제하였으며, 두뇌 성장 호르몬(BDNF) mRNA 발현은 감소하는 효과를 확인하였다. 따라서 진세노사이드 Re는 우울증, 불안장애 및 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물 또는 개선용 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

진세노사이드 Re를 포함하는 우울증, 불안장애 또는 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 진세노사이드 Rg3, Rb2, Rg1, Rd 또는 Rb1을 추가로 포함하며, 상기 추가되는 진세노사이드의 함량이 진세노사이드 Re의 함량보다 적은 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 우울증 또는 불안장애는 5-HT에 의해서 유도되는 것이며 진세노사이드 Re는 5-HT의 흡수를 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드 Re는 인삼으로부터 추출된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 인삼은 70℃ 내지 150℃의 고온에서 2 시간 내지 6 시간 동안 가열 처리한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 인삼은 고려인삼(*Panax ginseng*), 미국삼(*Panax quinquefolia*), 전칠삼(삼칠, *Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonica*), 삼엽삼(*Panax trifolia*), 히말라야삼(*Panax pseudoginseng*), 베트남삼(*Panax vietnamensis*), 파낙스 엘레가티오르(*Panax elegatior*), 파낙스 완지아누스(*Panax wangianus*), 또는 파낙스 비핀라티피두스(*Panax bipinratifidus*)의 전초, 뿌리, 줄기, 또는 잎임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

진세노사이드 Re를 포함하는 우울증, 불안장애 또는 기억력 감퇴의 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 진세노사이드 Re는 인삼으로부터 추출된 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술분야

본 발명은 진세노사이드 Re를 유효성분으로 포함하는 우울증, 불안 장애 또는 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조

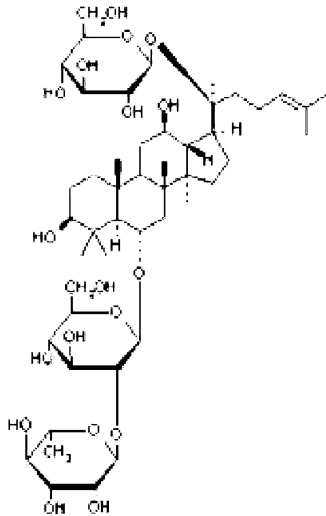
[0001]

성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인삼의 주된 활성물질은 인삼 사포닌(ginseng saponin) 구획으로부터 추출된 진세노사이드(ginsenosides)라고 알려져 왔다. 그 중 진세노사이드 Re는 하기와 같은 구조를 가진 화합물이다.

[0003] [화학식 1]



[0005] 인삼은 신체적, 화학적, 생물학적 요인들의 유해한 영향에 대한 신체의 저항력을 높여주며 비정상적인 생리기능의 방향성과 관계없이 신체의 항성성을 회복시켜 주는 것을 도와주는 강장제(adatogen) 물질로서 분류되며 인삼의 효과에 대해 많은 연구가 있어왔다.

[0006] 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd 및 Rg3와 같은 PD-타입 진세노사이드가 항-산화 활성을 갖는다고 보고된바 있으며(Choi, J.H., S.Y. Yoon, E.J. Choi, Y.S. Ryu, H.S. Ko, D.S. Yim, Y. Her, Y.S. Lee, M.R. Song, and J.H. Cheong. 2007. Anxiolytic and Antidepressant Activities of Ginsenoside Rb1. *Biomolecules & Therapeutics*. 15: 27-32.) 반면에 Re, Rg1, Rg2, 및 Rf와 같은 PT-타입 진세노사이드는 학습과 기억 기능에 있어서 향상 효과를 보인다고 보고된바 있다(Wang, Y.Z., J. Chen, S.F. Chu, Y.S. Wang, X.Y. Wang, I N.H. Chen, and J.T. Zhang. 2009. Improvement of memory in mice and increase of hippocampal excitability in rats by ginsenoside Rg1's metabolites ginsenoside Rh1 and protopanaxatriol. *J. Pharmacol. Sci.* 109: 504-510.). PT-type 진세노사이드의 주요 활성 성분으로서 진세노 사이드 Re는 인삼의 열매 속에서 주로 추출할 수 있으며, 면역시스템을 강화하는 효과, 심근세포괴사 보호 효과, 소화기능을 향상시키는 효과, 당뇨병과 비만을 치료하는 효과에 대해서는 이미 보고된 바 있다.

[0007] 우울증과 불안 장애는 가장 보편적인 정신적 기능 장애로서 우울증은 일차적으로는 만성적인 우울상태를 나타내며 대부분이 수면장애, 낮은 자존감, 수치심, 자살 성향 등을 동반한다. 따라서 우울증은 복합적인 장애로 여겨지며, 이의 발병원인과 관련된 메커니즘은 불명확하다. 불안 장애는 주로 불안한 감정으로 드러나는 정신 질환이다. 불안 장애의 주된 특징은 자율 신경계 장애(autonomic nerves disturbance), 근육 경직(muscle rigidity), 운동 장애(exercise disturbance) 등과 같은 증후군(syndromes)과 결합한 발동 혹은 불안, 긴장증(catatonia), 두려움 등과 같은 지속적인 긴장 정서들이다.

[0008] 우울증과 불안 장애는 거의 서로 함께 나타난다고 보고된바 있다(Mineka, S., and R. Zinbarg. 2006. A contemporary learning theory perspective on the etiology of anxiety disorders: it's not what you thought it was. *Am. Psychol.* 61: 10-26).

- [0009] 현재의 주된 항우울제(anti-depression pharmaceuticals)는 5-하이드록시트립타민(5-hydroxytryptamine, 5-HT), 노르에피네프린(norepinephrine, NE) 및 도파민(dopamine, DA)의 흡수(uptake)를 억제하는 Prozac , Paxil , Zoloft 등인데, 이것들은 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI), 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제(serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI)), 노르에피네프린과 도파민 재흡수 억제제(norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor (NDRI))에 속한다. 이러한 항우울 제약들이 작용하는 기전(mechanism)은 우울증의 증상들을 완화하기 위하여 5-HT와 같은 신경전달물질(neurotransmitters)의 양을 증가하는 것에 의한다. 그러나 유통중인 항우울 제약들은 증가하는 자살률, 두통, 현기증, 어지럼증, 불면, 과다한 졸림, 이명, 갈증, 충동, 체중증가, 혈압증가, 위상함(stomach upset), 역류성 구역(regurgitation nausea), 구토, 소화불량, 설사, 변비, 다리통증, 피부발진, 초조, 발작, 다한증, 부종, 성욕, 발기부전 등과 같은 다른 종류의 부작용들을 갖는다.
- [0010] 현재의 주된 항불안제(anti-anxiety medicine)는 그 증상들을 감소하고 안정시키기 위해 억제신경전달물질(inhibitory neurotransmitter)인 감마 아미노 부티르 산(gamma-aminobutyric acid, GABA)의 활동을 조절하는 기전(mechanism)을 갖는 벤조디아제핀(benzodiazepine)이다. 그러나 벤조디아제핀은 불면, 과민반응, 근육통, 허약, 구역, 운동 장애, 흐린 시력, 피곤증, 교란, 망상 등을 포함하는 많은 부작용들을 갖는다.
- [0011]
- [0012] 기억력 감퇴란 뇌세포 사멸 등으로 인해 뇌기능에 장애가 나타나는 것으로 콜린성 신경계의 기능 저하와 기억력 저하 사이의 상관관계에 관한 연구결과가 보고된 바 있다.
- [0013] 현재의 주된 기억력 감퇴 치료제로는 뇌에서 아세틸콜린의 분해효소인 아세틸콜린 에스테라제(AchE)의 활성을 억제할 수 있는 아세틸콜린분해 억제제(Acetylcholinesterase inhibitor), 또는 아세틸콜린의 농도를 일정수준으로 유지해 줄 수 있는 아세틸콜린 합성전구체(acetylcholine precursor) 및 아세틸콜린 수용체 활성화제(Receptor agonist) 등의 물질들이 대부분이다. 그 예로, 아세틸콜린분해 억제제로는 FDA의 승인을 받아 국내에서도 시판 사용중인 타크린(tacrine), 아리셉트(aricept) 및 갈란타민(galantamine), 아세틸콜린 합성전구체로는 레시틴(lecitin) 및 아세틸콜린 수용체 활성화제로는 RS-86, 니코틴(nicotine) 등이 있다. 그러나 기억력 감퇴가 진행될 때 아세틸콜린성 신경세포 뿐 아니라 신경 세포의 대다수를 차지하는 글루탐산성 신경 세포들도 퇴화하기 때문에, 아세틸콜린의 활성 증진에 중점을 둔 상기 방법은 일시적이고 미약하다는 문제점이 있다.
- [0014] 따라서 상기와 같은 부작용이 없고 효과가 지속적인 우울증, 불안 장애 및 기억력 감퇴 치료 약물에 대한 개발이 필요한 실정이다. 최근에는 우울증, 불안 장애 및 기억력 감퇴 치료를 위한 천연 제품이나 약용 식물의 개발에 좀 더 관심이 쏠리고 있는 실정이다.
- [0015] 동물모델에 스트레스 자극을 주어 우울증, 불안 장애 및 기억력 감퇴와 같은 증상을 치료할 수 있는지 여부에 대한 연구가 되고 있는 실정이며, 구급 스트레스에 노출된 랫트에 있어서 강제 수영 시험(FST), 고가식 십자미로실험(EMP) 및 능동 회피 조건(AAT) 테스트를 사용하여 우울증, 불안 장애 및 기억력 감퇴에 대한 치료효과가 시험되고 있는 실정이다.
- [0016] 우울증 치료효과가 있는지 여부는 강제수영시험(FST)을 이용하여 측정할 수 있으며, 항불안 효과가 있는지 여부는 고가식 십자미로실험(EMP)을 이용하여 측정할 수 있다고 보고된 바 있다. 또한, 능동 회피 조건(AAT) 테스트에 의해서 기억증진효과에 대해서 측정할 수 있다고 보고된 바 있다(Vyas, A., R. Mitra, B.S. Rao, and S. Chattarji. 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. J. Neurosci. 2: 6810-6818).

[0017] 또한, 시상하부 부신피질자극호르몬-방출 시스템은 시상하부-뇌하수체-부신(HPA) 축 증폭의 조절 및 반복되는 구급 스트레스에 의해서 유도되는 우울증 및 불안증 관련 행동과 관련이 있다는 것이 보고된바 있다 (Daniels, W.M., L. Richter, and D.J. Stein. 2004. The effects of repeated intra-amygdala CRF injections on rat behavior and HPA axis function after stress. Metab. Brain Dis. 19:15-23).

[0018] 이에 본 발명자들은 강제수영시험(FST), 고가식 십자미로실험(EMP), 능동 회피 조건(AAT) 테스트를 실시하여 인삼 사포닌(ginseng saponin) 구획으로부터 추출된 진세노사이드 Re가 우울증, 불안 장애 및 기억력 감퇴 치료 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

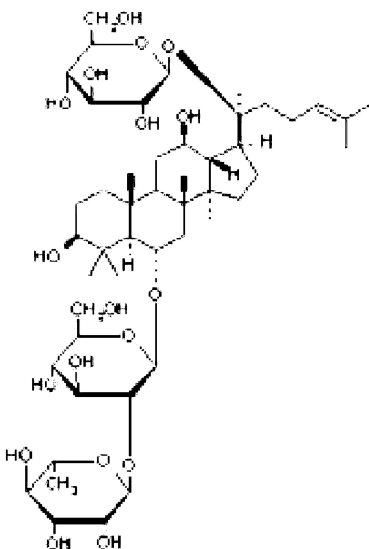
[0019] 본 발명은 진세노사이드 Re를 유효성분으로 포함하는 우울증, 불안 장애 또는 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 진세노사이드 Re를 포함하는 우울증, 불안 장애 및 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어 "진세노사이드 Re"는 하기와 같은 화학구조식을 갖는 화합물로서 인삼의 주요 성분 중의 하나이다.

[0022] [화학식 1]



[0023]

[0024] 인삼의 주된 활성물질은 인삼 사포닌(ginseng saponin) 구획으로부터 추출된 진세노사이드(ginsenosides)라고 알려져 있으며 크로마토그래피상의 영상 순서에 따라서 진세노사이드 Rx(X=a, b, c, d, e, 등등)로 명명된다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 진세노사이드 Re는 인삼에서 추출할 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 이미 알려져 있는 합성 방법에 의해서 합성하여 사용할 수 있다. 본 발명에서 진세노사이드 Re를 추출하기 위해서 사용하는 인삼은 70℃ 내지 150℃의 고온에서 2 시간 내지 6 시간 동안 가열 처리한 것을 사용하는 것이 바람직하다.

- [0026] 진세노사이드 Re를 인삼으로부터 추출하는 경우, 사용할 수 있는 인삼은 고려인삼(*Panax ginseng*), 미국삼(*Panax quinquefolia*), 전칠삼(삼칠, *Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonica*), 삼엽삼(*Panax trifolia*), 히말라야삼(*Panax pseudoginseng*), 베트남삼(*Panax vietnamensis*), 파낙스 엘레가티오르(*Panax elegatior*), 파낙스 완지아누스(*Panax wangianus*), 또는 파낙스 비핀라티피두스(*Panax bipinratifidus*)의 전초, 뿌리, 줄기, 또는 잎일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출"은 인삼을 액체의 용매를 사용하여 분리하는 것으로서 상기 용매로는 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올과 같은 C₁ 내지 C₄의 알콜, 에틸아세테이트, 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "우울증"은 정신 질환의 일종으로서 주로 슬픔, 무미, 감정의 상실, 무쾌감증(쾌감의 결여), 비탄, 동요 또는 지체, 죄의식과 무가치하다는 생각을 특징으로 하며 심각한 경우에는 자살, 환각 및 망상 등의 증상을 동반한다.
- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "불안 장애"는 정신 질환의 일종으로서 실제적인 위협에 기인하지 않고 공격(공황 장애)이나 지속적인 상태(일반화된 불안 장애)로서 나타나는 심리적이고 육체적인 불안 징후들의 다양한 조합과 관련이 있다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는 용어 "기억력 감퇴"는 뇌기능 장애로 인하여 나타나는 현상으로서 치매 등의 질병에서 나타난다.
- [0031] 본 발명의 우울증, 불안 장애 또는 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물은 우울증에 의해서 나타나는 증상, 불안장애로 나타나는 증상 및 기억력 감퇴 증상을 치료할 수 있다. 본 발명의 우울증 또는 불안장애는 5-HT에 의해서 유도되는 것이며 진세노사이드 Re는 5-HT의 흡수를 억제하면서 부작용을 발생시키지 않는 것이 바람직하다.
- [0032] 본 발명의 우울증, 불안 장애 또는 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물은 총 중량에 대하여 진세노사이드 Re를 0.001 중량 % 내지 99.9 중량 %, 바람직하게는 0.1 중량 % 내지 99 중량 %, 더욱 바람직하게는 1 중량 % 내지 50 중량 % 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 우울증, 불안 장애 또는 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물은 진세노사이드 Rg3, Rb2, Rg1, Rd 또는 Rb1을 추가로 포함할 수 있다. 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 치료용 약학적 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위에서 추가할 수 있다. 또한, 추가성분의 함량은 진세노사이드 Re 함량보다 적은 것이 바람직하다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 의한 강제 수영 테스트에 의하면 랫트에 있어서 관측된 부동 행동은 인간에 있어서 저하된 사기 또는 무기력한 우울증의 상태와 유사하다. 본 발명의 일 실시예에 의하면 강제 수영 테스트를 사용하여 연구하였고(Getachew, B., S.R. Hauser, R.E. Taylor, and Y. Trizabi. 2008. Desipramine blocks alcohol-induced anxiety- and depressive-like behaviors in two rat strains. *Pharmacol.Biochem, Behav.*91:97-103), 반복되는 구급 스트레스에 따른 부동성의 증가는 강제 수영 테스트에서 명백하게 2일 동안 관찰되었다.
- [0035] 이러한 결과는 구속 스트레스는 강제 수영 테스트에 있어서 첫째날 보다 둘째날에 부동성의 기간을 증가시킨다

는 이전의 연구결과(Marks, W., N.M. Fournier, and L.E. Kalynchuk LE. 2009. Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behavior in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength. *Physiol.Behav.* 98: 67-72)와 일치한다. 둘째날에 있어서 부동 시간을 측정하는 것이 우울증 반응의 측정수단으로서 사용되어 왔으며, 둘째날에 있어서 부동 시간의 감소는 우울증 치료 활성을 나타낸다(Siuciak, J.A., D.R. Lewis, S.J. Wiegand, and R.M. Lindsay. 1997. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol.Biochem.Behav.* 56:131-137).

[0036] 본 발명의 일 실시예에 의하면 강제 수영 테스트에서 GRe(진세노사이드 Re)의 투여는 부동성을 감소시키고 회피행동을 증가시키지만, 수영행동에 있어서는 어떠한 영향을 미치지 않았다. 이를 통해 GRe가 운동 기능의 어떠한 변정도 초래하지 않으면서 우울증치료 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 의하면 고가식 십자미로실험(EMP)에서, GRe의 투여는 open arm으로 들어가는 횟수의 증가 및 전체 시간에 대한 open arm에서 보내는 시간 비율의 증가를 나타내었다. 이를 통해 GRe의 불안증의 치료 효과를 확인하였다. 또한 고가식 십자미로실험에서 관찰되는 불안은 해마에서 5-HT 과다흐름과 관계 있다고 보고된바 있다(Carvalho, M.C., S. Masson, M.L. Brandao, and M.A. de Souza Silva. 2008. Anxiolytic like effects of substance P administration into the dorsal, but not ventral, hippocampus and its influence on serotonin. *Peptides.* 29: 1191-1200). 반복되는 구금 스트레스는 해마와 같은 뇌의 특정 부분에 있어서 자극에 대한 행동 및 생리학상의 반응과 연관되어 있는 5-HT의 방향 전환 및 방출을 증가시켰다. 그러나 GRe의 투여를 통해서 해마에 있어서 반복되는 구금 스트레스 노출에 따른 5-HT 방출의 증가를 저해할 수 있었다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에서는 타이로신수산화효소(TH)는 중추 신경 시스템에 있어서 우울증, 불안증 및 인지 장애와 같은 스트레스 관련 정신병리상태와 관련된 스트레스-유도 활성화와 관련된 효소이다. 청반(LC)의 A6 노르아드레날린 뉴런에서 기본적으로 유래되는 노르아드레날린 신경전달물질 시스템은 스트레스 반응과 관련된 중추 신경 시스템에 있어서 주요 회로이다. 청반에서 TH 발현은 스트레스에 대한 반복되는 노출에 따라서 증가하였다. 본 발명의 일 실시예에서는 반복되는 구금 스트레스에 대한 반응으로서 청반에서의 TH 면역반응성은 대조군에 있어서 보다 STR 그룹에 있어서 더 증가하였다. 그러나 GRe의 투여를 통해서 증가된 TH 면역반응성을 회복할 수 있었다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에서는 해마체에 있어서 감소된 BDNF의 발현은 인지 장애의 발병과 관련이 있다는 것을 나타낸다(Naert, G., G. Ixart, T. Maurice, L. Tapia-Arancibia, and L. Givalois. 2011. Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. *Mol.Cell Neurosci.* 46: 55-66). 본 발명의 일 실시예에 의하면 반복되는 구금 스트레스는 학습 및 기억 감퇴뿐만 아니라 랫드의 해마에서의 BDNF mRNA의 발현 감소를 야기하였다. 그러나, GRe의 투여로 인하여 구금스트레스를 받은 랫드의 해마에서의 감소된 BDNF mRNA의 발현 레벨이 회복됨을 알 수 있었다.

[0040] 따라서 본 발명의 실시예에 의하면 반복되는 구금 스트레스는 강제 수영 테스트에 있어서 부동기간을 증가시켰고, 스트레스를 받지 않은 정상 대조군과 비교하여 고가식 십자미로실험에서 open arm을 감소시켰다. 또한 능동회피 조건 테스트에 있어서 인지기능의 손상과 관련이 있다. GRe의 투여는 우울증 및 불안증과 같은 정후를 감소시켰고 반복되는 구금 스트레스에 따른 인지 손상을 감소시켰다. 이러한 결과는 GRe의 중추 신경 시스템에 있어서 노르아드레날린 시스템과 관계있는 시상하부의 CRF의 조절에 의한 것임을 알 수 있었다. 따라서 GRe는 우울증, 불안 장애 및 기억력 감퇴와 같은 스트레스 연관 장애를 치료하기 위한 대체 약품의 개발에 있어서 유용한 물질일 수 있다.

[0041] 본 발명의 실시예에 의하면 GRe(10, 20 또는 50 mg/kg)의 복용량 의존 활동을 검사하였고 50 mg/kg 투여시 반복

되는 구급 스트레스-유도로 인한 우울증, 불안증 및 기억 장애 제어에 있어서 가장 효과적이라는 것을 발견하였다. 또한 본 발명의 실시예에 의하면 반복되는 구급 스트레스에 의해서 시상하부에 있어서 부신피질자극호르몬-방출(CRF) 회로는 활성화되며 행동 테스트에 의해서 관측된 불안증 및 우울증 유사 행동이 발생한다는 것을 나타내었다.

[0042] 또한, 시상하부의 실방핵(PVN)에 있어서 CRF의 발현 및 분비는 현재 연구에서 대조군과 비교하여 STR 그룹에서 상당히 증가하였다. 이것은 만성 스트레스에 의해서 유도되는 우울증 및 불안증 유사 행동의 기초가 되는 CRF의 변동을 보여주는 이전의 연구(Maccari, S., and S. Morley-Fletcher. 2007. Effects of prenatal restraint stress in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. Psychoneuroendocrinology. 32: S10-15. Review)와 일치한다.

[0043] GRe의 투여는 시상하부의 실방핵(PVN)에서 CRF의 면역반응성의 증가를 크게 차단하였다. 이러한 랫트에 있어서 반복되는 구급 스트레스에 따른 GRe의 시상하부의 CRF의 조절 결과는 GRe의 우울증의 치료 효과 및 불안완화 효과와 관련이 있다는 것을 알 수 있었다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 진세노사이드 Re를 포함하는 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.

[0045] 본 발명의 조성물을 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.

[0046] 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, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 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 진세노사이드 Re에 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 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를들어, 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 진세노사이드 Re의 일일 투여량은 바람직하게는 1 mg/kg 내지 500 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Re를 포함하는 우울증, 불안장애 또는 기억력 감퇴의 개선용 건강기능식품을 제공한다.

- [0049] 본 발명의 건강기능식품에 사용 가능한 진세노사이드 Re는 상기 우울증, 불안장애 또는 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물에서 설명한 바와 동일하다.
- [0050] 본 발명의 건강기능식품을 통해 개선가능한 우울증, 불안장애 또는 기억력 감퇴의 증상은 상기 우울증, 불안장애 및 기억력 감퇴의 치료용 약학적 조성물에서 설명한 바와 동일하다.
- [0051] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은, 상기 진세노사이드 Re를 포함하는 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되는 모든 행위를 의미한다.
- [0052] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 이의 염, 알긴산 및 이의 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 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0053] 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.
- [0054] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

발명의 효과

- [0055] 본 발명은 천연물질에서 유래되는 진세노사이드 Re를 포함하는 우울증, 불안장애 및 기억력 감퇴의 치료 또는 개선용 조성물로서 약학적으로 이용 가능할 뿐 아니라 건강기능식품으로서도 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1은, 렛트에 대한 반복되는 구금 스트레스를 유도한 경우에 있어서 GRe 투여한 경우에 있어서 우울증, 불안장애 또는 기억력 감퇴의 치료 또는 개선 효과에 대한 실험 스케줄을 나타낸 것이다.
- 도 2는, 렛트에 대한 강제 수영 테스트에서의 부동성 시간을 조사한 결과를 나타낸 것이다. 이때 * $p < 0.05$ vs. Day 1 group (B); * $p < 0.05$ vs. CON group (C); ** $p < 0.01$ vs. CON group 및 # $p < 0.05$ vs. STR group (D)이다.
- 도 3은, 렛트에 대한 강제 수영 테스트에서의 등산 행동의 시간을 조사한 결과를 나타낸 것이다. 이때 * $p < 0.05$ vs. Day 1 group (B); * $p < 0.05$ vs. CON group (C); ** $p < 0.01$ vs. CON group 및 # $p < 0.05$ vs. STR group (D)이다.
- 도 4는, 렛트에 대한 고가식십자미로실험에서의 open arm에서 보내는 시간 및 open arm로 들어가는 횟수를 나타낸 것이다. 이때 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CON group; # $p < 0.05$ vs. STR group 이다.
- 도 5는, 렛트에 대한 능동 회피 조건 테스트에서의 조건부 회피 반응으로서 반대 방향의 방향으로 들어가는데 걸

리는 대기 시간(A) 및 탈출 실패(B)를 나타낸 것이다. 이때 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CON group; # $p < 0.05$ vs. STR group 이다.

도 6은, 랫트에 대한 시상하부의 PVN에서의 CRF발현 및 LC에서의 TH 발현을 나타낸 것이다. 이 때 CON-CRF (A), STR-CRF (B), STR+GRe50-CRF (C), CON-TH (D), STR-TH (E) 및 STR+GRe50-TH (F) 이다. 단위 바는 50 μ m를 나타낸다.

도 7은, 10일 동안의 반복되는 구금 스트레스를 가한 랫트에 대한 시상하부의 PVN에서의 CRF발현에 GRe가 미치는 영향 및 LC에서의 TH 발현에 GRe가 미치는 영향을 나타낸 것이다. 이때 ** $p < 0.001$ vs. CON group, # $p < 0.01$ vs. STR group 이다.

도 8은, 10일 동안의 반복되는 구금 스트레스를 가한 랫트의 해마에서의 두노뇌 성장 요소(BDNF) mRNA의 RT-PCR 밴드(A) 및 이의 상대적인 강도(B)를 나타낸 것이다. 이때 ** $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$ vs. CON group, # $p < 0.05$ vs. STR group 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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

실시예 1: 재료 및 방법

동물 준비

240-280 g의 숫컷 스프래그 다우리(SD, Sprague-Dawley) 랫트를 Samtaco Animal Co.(Seoul, Korea)으로부터 구매하였다. 랫트는 폴리카보네이트 케이지 당 최대 5마리씩 제한된 접근 시설에 구금하여 보관하였다. 케이지의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지되었으며 상대 습도는 $55\% \pm 15\%$ 로 유지하였다. 케이지는 매일 12 시간 동안 인공 불빛에 의해서 점화하였다. 멸균 식수 및 표준 수유 식단이 실험 동안 각각의 케이지에 임의로 공급하였다. 동물 실험은 1996년에 개정된, 실험실 동물의 관리 및 사용(NIH 간행물 번호 80-23)에 대한 국립 연구소 건강 가이드에 의거하여 실시하였다. 모든 동물은 동물이 도착한 후에 적어도 7일이 지난 후에 사용하였다.

진세노사이드 Re

홍삼(RG, 한국 담배 인삼 공사에서 구입)으로부터 ginsenoside Re를 분리하였다. 홍삼을 2시간 동안 80°C 에서 환류조건하에 80% 에탄올로 4번 추출하였다. 다음으로, Diaion HP-20 (Mitsubishi Jasei, Kasei, 일본) 흡착 크로마토그래피에 의해서 사포닌 성분을 추출하였다. 사포닌 추출물을 냉동-건조시키고 미세한 가루로 만들었다. 사포닌 추출물 가루를 물에 녹이고 사포닌 중량의 200배(v/w) 물로 벤젠 에틸렌 수지(Mitsubishi Kasei, Kasei, 일본 2.8×20 cm)에 흡착하였다. 수지상에 흡착한 전체 사포닌은 수지 중량의 10배의 물로 세척하고, 비사포닌 성분을 수지 중량의 8배의 20% 에탄올로 추출하였다. 그 후 진세노사이드 Re를 수지 중량의 8배인 30% 에탄올로 추출하였다. 모든 분석은 자동화된 구매 조절기, WatersTM 510 펌프 및 워터 484 UV 검측기(MA, USA)가 부착된 HPLC 시스템에서 수행하였다. 분리는 Waters Nova-Pak C₁₈(3.9×150 mm, 5 μ m) (MA, US A)를 컬럼으로 이동상은 분배 용출에 있어서 아세트나이트릴과 물의 혼합물을 사용하였다.

실험군의 분류

하기와 같이 무작위로 7마리 랫트로 구성된 6군을 나누었다.

- GRe(진세노사이드 Re) 대신에 식염수(0.9% NaCl)를 매일 투여한 비스트레스 군 (CON, n=7)

- GRe 대신에 식염수를 매일 투여한 구금스트레스 군 (STR, n=7)

- 구금스트레스 및 10 mg/kg GRe-투여 군 (STR + GRe 10, n=7)

- [0068] - 구금스트레스 및 20 mg/kg GRe-투여 군 (STR + GRe 20, n=7)
- [0069] - 구금스트레스 및 50 mg/kg GRe-투여 군 (STR + GRe 50, n=7)
- [0070] - 구금스트레스 및 10 mg/kg 플루옥세틴-투여 군 (양성 군으로서 STR + FLX, n=7).
- [0071] 플루옥세틴(FLX)은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louise, MO, USA)으로부터 구매하였다. 랫트는 10일 동안 매일 구금스트레스를 주기 전에 GRe 또는 플루옥세틴을 30 분 동안 복막 내로 투여하였다. 그리고 GRe 및 플루옥세틴은 사용 전에 0.9 % 생리 식염수에 녹여서 사용하였다.
- [0072] 구금 스트레스는 AM 10:00 부터 PM 12:00 까지 하루에 한 번씩 2시간 동안 가하였고 랫트 구금 백(bags)에서 10 일 연속적으로 가하였다. 랫트를 한쪽 끝은 원추형이고 3 mm의 몇 개의 숨을 쉬기 위한 구멍을 갖고 있고 다른 쪽 끝은 열려있는 투명한 플라스틱 튜브 (20 × 7 cm)에 배치하였다. 동물은 충분한 공기를 갖고 있으나 튜브 안에서 움직이기는 어려웠다.
- [0073] **통계 분석**
- [0074] 모든 측정은 독립적인 관측자에 의해서 수행되었다. 수치의 결과는 수단의 평균 ± 표준 오차로 표현되었다. FST 테스트에서 행동 값 내에서, Student's t-test를 사용하여 첫째 날과 둘째 날을 비교하여, 분산평균의 적절한 가정을 만들기 위해서 Levene's test를 사용하였다.
- [0075] 평균 분산 데이터 사이 또는 이들 안에서의 차이점이 SPSS (Version 13.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, 미국)를 사용하여 분산 분석(ANOVA)에 의해서 분석하였고 그 이후에 Tukey's post-hoc 테스트를 수행하였다. 통계학적인 중요성은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.
- [0076] **실시예 2-1: 강제 수영 테스트 (FST)**
- [0077] 강제 수영 테스트는 랫트에서 잠재적인 우울증 치료 물질의 활성을 측정하기 위해서 사용된다. 오랜 기간 동안 물에 쥐를 강제 침수하는 것은 부동 동작을 일으킨다. GRe는 회피반응 및 수영과 같은 탈출 반응 증가를 수반하면서 부동 동작을 감소시킨다.
- [0078] 25℃에서 투명한 플렉시글라스 실린더(20 cm 지름 × 50 cm 높이)에 물을 30 cm 높이로 채웠다. 이 깊이에서, 랫트는 랫트의 꼬리 또는 두 다리가 실린더의 바닥에 닿지 않는다. 첫째 날 모든 군에 있어서 랫트를 물이 가득 찬 실린더에 넣고 15분 동안 시험하였다. 시험 후에, 랫트를 건조하였고 랫트의 흠 케이지에 돌려보냈다.
- [0079] 24시간 후, 랫트를 연속 2일 동안 5 min/day 동안 강제 수영을 하게 하였고 탈출 행동(회피반응 및 수영) 여부를 관찰하였다. 부동 시간을 5분간의 시험 시간 동안 측정하였다.
- [0080] 회피 행동은 수영 수조의 측면에 있어서 앞발의 위쪽-방향 움직임으로 정의되었고 수영은 다른 사분면을 건너는 것을 포함하는 수영 수조에 걸친 행동으로 간주하였다.
- [0081] 부동 행동은 동물이 탈출 행동을 보이지 않는 시간의 길이로 측정하였다(예를 들어, 테스트 전체 시간 부동의 행동은 동물이 탈출 행동보이지 않는 시간의 길이로 측정하였다(예를 들어, 시험 전체 시간 - 회피반응 및 수영 행동에 들어는 시간). 동물의 행동은 계속적으로 머리 위의 비디오카메라에 의해서 기록하였다.
- [0082] 테스트 후, 랫트를 수조에서 제거하고, 타월로 건조하고 흠 케이지에 다시 돌려보냈다.
- [0083] **실시예 2-2: 강제 수영 테스트 (FST) 결과**
- [0084] 구금 스트레스 노출이 강제 수영 테스트와 관련된 우울증 증상을 가속화시키는지 여부를 측정하였다. 강제 수영 테스트의 첫 2일 동안의 부동성의 증가(예를 들어, 1일에서의 부동 비율과 비교한 2일에서의 부동 비율)가 2일 동안 비-스트레스 랫트와 비교하여 스트레스를 받은 랫트에서 더 높은지 여부를 측정하였다. 대조군(CON)에 있는 정상 쥐는 강제 수영 테스트의 첫 2일 동안의 부동성의 증가가 측정되지 않았다(도 2A; Student's t-test,

$p=0.036$). 이것은 1일(도 2C)에서의 부동성의 수치로 정규화되고 2일에서의 부동성의 수치로 정량화하였다.

[0085] 대조군에 있어서 정상 렛트는 부동성의 증가를 나타내지 않는다는 것을 확인하였다. 10일 동안 반복되는 구금 스트레스를 주입함에 의해서 STR 그룹에 있어서 렛트에서 부동성의 레벨을 분석하였다. 반복되는 구금 후 24시간 후에, STR 그룹에 있어서 스트레스를 받은 렛트는 강제 수영 테스트에 있어서 (도 2B; Student's t-test, $p<0.05$) 첫 2일 동안에 부동성에 있어서 상당한 증가를 나타내었다.

[0086] STR 그룹의 렛트의 정규화된 부동 기간은 대조군(도 2C; Student's t-test, $p<0.05$)과 비교하여 강제 수영 테스트 동안에 부동 기간이 상당히 증가하는 것을 나타내었다.

[0087] 본 실험에서는 또한 구금 스트레스에 의해서 유도된 우울증 유사 행동에 있어서 부동성에 미치는 GRe의 개선 효과를 측정하였다. STR+GRe50 그룹에 있는 렛트는 STR 그룹($p<0.05$)과 비교하여 강제 수영 테스트에서 5분 동안 부동시간의 상당한 감소를 보여주었고, GRe 투여는 우울증 유사 행동의 감소에 효과적이라는 것을 나타내었다. 상기 결과는 또한 STR+GRe50 그룹에서 우울증 유사 행동에 대한 부동성의 감소가 STR+FLX 그룹에서와 거의 유사하다는 것을 나타내었다(도 2D).

[0088] 마찬가지로, "회피 행동"으로 나타나는 또 다른 핵심 행동에 대해서 조사하였다. 강제 수영 테스트에서 첫 2일 동안에 대조군에 있는 렛트에서 회피 행동이 증가한다는 것을 발견하였다(도 3A; Student's t-test, $p=0.012$). 더 나아가서, 반복되는 구금 스트레스에 처한 렛트는 상당한 등산 행동의 감소를 나타내었다(도 3B; Student's t-test, $p<0.05$).

[0089] 회피 행동에 대한 정상화된 값을 측정하기 위해서, 1일에 회피 행동에 보낸 시간과 2일에 회피 행동에 보낸 시간의 비율을 측정하였다. 구금 스트레스를 받은 렛트(STR 그룹)는 대조군과 비교하여(도 3C; Student's t-test, $p<0.05$) 강제 수영 테스트 동안에 상당한 회피 행동의 감소를 나타내었다.

[0090] 강제 수영 테스트에서 STR 그룹과 비교하여 ($p<0.05$) STR+GRe50 그룹에서의 렛트는 5분 동안 상당한 회피 행동의 회복을 보여주었으며, GRe의 투여는 우울증 유사 행동을 감소시킨다는 것을 나타내었다. 이것은 또한 STR+GRe50 그룹에 있어서 회피 행동의 회복은 거의 STR+FLX 그룹(도 3D)의 회복과 유사하다는 것을 나타내었다. 그러나, 반복 구금 스트레스는 강제 수영 테스트 동안 어떠한 그룹에서도 수영 행동에 있어서는 중요한 차이를 유도하지 않았다.

[0091] 실시예 3-1. 고가식 십자미로 (EPM) 테스트

[0092] 고가식 십자미로 테스트는 약물제제의 불안증세 증가 또는 불안증세 완화 효과를 측정하기 위해서 널리 행해지는 행동 테스트이다(Walf, A.A., and C.A. Frye. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat. Protoc. 2: 322-328).

[0093] 12일 동안, 고가식 십자미로 테스트를 수행하였다. 이 장치는 각각의 타입의 두 arm이 서로 반대방향에 위치하는 두 개의 open arm (각각 50×10 cm), 두 개의 closed arm (각각 50×10 cm) 및 중앙 플랫폼(10×10 cm)으로 구성된다. 상기 미로는 블랙 플렉시 글라스로 구성되어 있고 바닥에서 50 cm 높이로 만들었다. open arm 쪽의 탐험은 간접적인 회미한 불빛(2×60 W)으로 수행하였다.

[0094] 각각의 시도의 시작에서, 동물은 closed arm을 마주보고, 미로의 중앙에 배치되었다. 5분간의 테스트 시간 동안, 하기의 매개변수를 기록하였다:

[0095] a) open arm에 들어가는 횟수, b) closed arm에 들어가는 횟수, c) open arm에서 보내는 시간, 및 d) closed arm에서 보내는 시간.

[0096] 동물이 arm에 들어갔다는 것은 동물의 네 발이 arm에 위치하고 있는 상태로 정의된다. 각각의 렛트들이 실험을 마친 후에 알콜로 미로를 세척하였다. 미로에서의 행동은 미로의 중심 위의 천장에 장착된 비디오 카메라를 사용하여 기록되었고 S-MART 프로그램(PanLab, Barcelona, Spain)으로 전달되었다. 고가식 십자미로에서 open arm 탐험에 의해서 표시되는 불안의 감소는 open arm 또는 closed arm로 들어가는 전체 횟수에 대한 open arm로 들어가는 횟수의 증가로 정의된다. 또한 open arm 또는 closed arm에서 보내는 전체 시간에 대한 open arm에서 보내는 시간 비율의 증가로 정의된다. 또한, 전체 arm에 들어가는 횟수는 렛트의 이동 능력의 변화에 대한 지표로서 사용된다.

[0097] 실시예 3-2. 고가식 십자미로 (EPM) 테스트 결과

[0098] 고가식 십자미로 테스트에서 open arm 탐험의 감소에 의해서 표현되는 불안증에 대한 GRe투여의 효과를 측정하였다(도 4). 사후분석비교에 의해서 대조군(도 4)과 비교하여 10일 동안의 반복되는 구금 스트레스 후의 미로의 open arm에서 보낸 시간의 비율의 상당한 감소를 확인하였다. 그러나 STR+GRe50 그룹에 있어서 STR 그룹($p<0.05$; 도 4A)과 비교하여, 미로의 open arm에 있어서, 랫트는 반복되는 구금에 의해서 미로의 open arm에서 보낸 시간의 비율에 상당한 회복을 나타내었다.

[0099] 또한, 사후분석비교에 의하면 대조군($p<0.05$)과 비교하여, 10일 동안에 반복되는 구금 스트레스에 노출된 후에 미로의 open arm로 출입하는 횟수에 있어서 상당한 감소를 확인하였다.

[0100] STR+GRe50 그룹에 있어서 랫트는 또한 STR 그룹($p<0.05$; 도 4B)과 비교하여, 미로의 open arm로 출입하는 전체 횟수에 있어서 상당한 회복을 나타내었다. 고가식 십자미로 테스트에 있어서 closed arm로 출입하는 횟수에 있어서의 상당한 차이가 그룹 사이에서 관찰되지 않았기 때문에, 반복되는 구금스트레스에 의한 랫트의 불안증 유사 행동이 이들의 운동 능력의 차이로부터 기인한다는 것을 알 수 있었다.

[0101] 실시예 4-1. 능동 회피 조건 테스트 (AAT)

[0102] 능동 회피 조건 테스트는 혐오사건을 피하기 위한 동물의 능력을 측정한다. 또한 학습과 기억과 연관된 접근법을 제공한다(Grauer, S.M., V.L. Pulito, R.L. Navarra, M.P. Kelly, C. Kelley, R. Graf, B. Langen, S. Logue, J. Brennan, L. Jiang, E. Charych, U. Egerland, F. Liu, K.L. Marquis, M. Malamas, T. Hage, T.A.Comery, and N.J. Brandon. 2009. Phosphodiesterase 10A inhibitor activity in preclinical models of the positive, cognitive, and negative symptoms of schizophrenia. J. Pharmacol. Exp. Ther. 331: 574-590). 이 실험에서는 Gemini Avoidance System(SD Instruments)을 사용하였다. 각각의 랫트는 두 개의 스테인리스 강철 막대(3 mm diameter, 1 cm apart) 및 두 개의 28 V DC 라이트로 구성된 쌍방향 셔틀 박스(23 cm × 50 cm × 23 cm)에 각각 배치하였다. 전기 충격은 격리된 충격 발생기(Behbood Pardaz Co. Iran)에 의해 마루에 전송시켰다.

[0103] 셔틀 박스에 5분의 적응 기간 후에, 랫트는 변수 간격(범위 = 7.5-22.5 s)에 의해서 50개의 회피 산책로를 겪었다. 각각의 산책로는 10초 동안 경고 톤 및 자극 라이트(조절 자극)로 구성되었다. 만약 동물이 각각 시도의 최초 10초 동안 아치 밑의 통로를 통해 건너면, 경고 톤 및 빛은 종료하였다. 조건부 회피 반응은 각각 시도의 최초 10초 안에 반대 방향으로 건너는 것에 의해서 정의되었다.

[0104] 정확하게 24 시간 후에 랫트를 다시 셔틀 박스에 놓았다. 각각의 시도는 랫트가 위치하고 있는 측면 및 마루를 통한 10초간의 경고 톤 및 전기 충격(0.5 mA; 비조절 자극)으로 구성되었다. 전기 충격이 시작된 후, 동물이 아치 밑의 통로를 건너면, 경고 톤 및 전기 충격을 종료하였다. 탈출 반응은 각각의 시도의 최초 10초 안에 반대 방향으로 건너는 것으로 정의된다. 기억력 유지 테스트(탈출 반응)는 20 회피 산책로로 수행하였다. 만약 전기 충격이 가해진 후 10초 안에 탈출 반응이 없다면, 전기 충격 및 어조-조절 자극은 끊기고 탈출은 실패로 기록하였다.

[0105] 실시예 4-2. 능동 회피 조건 테스트 (AAT) 결과

[0106] 반복되는 구금 스트레스-유도와 인지 기억 장애와의 상관관계를 증명하고, 또한 진세노사이드 Re의 기억 감퇴치유 효과를 확인하기 위해서, 구금 스트레스 및 진세노사이드 Re를 처리한 랫트에 능동 회피 조건 테스트를 수행하였다. STR 그룹의 랫트는 대조군 랫트와 비교하여($p<0.05$; 도 5A) 반대 방향으로 들어가기 위한 대기 시간의 감소현상을 나타내었다. 반면에, STR+GRe20 및 STR+GRe50 그룹의 랫트는 STR 그룹과 비교하여 반대 방향의 방향으로 들어가기 위한 대기 시간의 증가현상을 나타내었다.

[0107] 24시간 후, 반대 방향의 방향으로 들어가기 위한 대기 시간에 미치는 GRe 투여의 효과는, 능동 회피 조건 테스트에 있어서 셔틀 박스의 바닥에 전기 쇼크를 가하여 측정하였다. 기억력과 관련하여, STR 그룹에서의 랫트는 대조군의 대기시간과 비교하여($p<0.01$; 도 5B), 탈출 실패에 대한 반대 방향의 방향으로 들어가기 위한 대기시간의 상당한 증가를 나타내었다. 그러나, STR+GRe50 그룹에 있어서, STR 그룹의 대기시간과 비교하여($p<0.05$), 반대

방향의 방으로 들어가기 위한 대기시간의 상당한 감소를 나타내었다.

[0108] 본 실험에 따르면, 구금 스트레스에 반복되는 노출은 랫트에 있어서 단기-기억을 손상시켰다. 그리고 GRe 투여로 인하여 구금 스트레스-유도 기억 손실을 약하게 하였다. STR 그룹의 랫트에서는 조건부 능동 회피 반응(Conditioned avoidance response)이 감소하였고 탈출실패가 증가하였다. 또한, STR+GRe50 그룹에서 관찰되는 조건부 능동 회피 반응 또는 탈출실패의 퍼센트는 대조군의 퍼센트와 동일하였다. STR+GRe50 그룹에 있어서 스트레스-관련 기억 손상의 인지 기능의 회복은 STR+FLX 그룹과 실질적으로 유사하였다.

[0109]

[0110] **실시예 5-1. 부신피질자극호르몬-방출 요소 (CRF) 및 타이로신 수산화효소의 면역조직화학**

[0111] 면역조직학적 연구를 위해서, 동물을 소독 펜토바르비탈(80 mg/kg, 복막내 주사)로 사멸시키고, 정상 식염수(0.9 %)로 대동맥을 통해서 관류시킨 후, 0.1 M 인산-완충 식염수(PBS)에 4% 파라포름알데하이드 300 ml(랫트당)로 처리하였다.

[0112] 랫트의 뇌를 제거한 후, 밤 동안의 사후 고정을 통해서, 4℃, 0.1 M PBS에서 20% 수크로스로 동결보존하였다. 30 μ m 두께로 뇌의 관상단면을 마이크로톰(Leica CM1850; Leica Microsystems Ltd., Nussloch, 독일)을 사용하여 시상하부 및 청반(LC, locus coeruleus)에 걸쳐 절단하였다.

[0113] 절단 부분을 아비딘-비오틴-퍼옥시데이즈 복합체(ABC) 방법을 사용하여 CRF 및 TH 발현을 위해서 항체로 염색하였다. 절단 부분은 PBS로 5분 동안 3번 세척하였다. 그리고 나서 4℃에서 72시간 동안 PBST(PBS plus 0.3% Triton X-100)에서 일차적으로 고트(goat) 항-CRF 항체(1:2000 희석, Santa Cruz Biotechnology Inc., California, CA, 미국) 및 sheep) 항-TH 항체(1:2000 희석, Chemicon International Inc., Temecular, CA, 미국)로 배양하였다.

[0114] 절단 부분을 PBS에서 5분 동안 세척하였고 실온에서 120분 동안 비오틴결합된 레빗(rabbit) 항-고트 IgG 이차 항체(항-CRF 항체를 위해서) 및 비오틴결합된 고트 항-sheep IgG 이차 항체(항-TH 항체를 위해서)로 배양하였다. 이차 항체는 Vector Laboratories Co. (Burlingame, CA, 미국)에서 구매하였고 2% 정상 혈청을 포함하는 PBST에서 1:200으로 희석하였다.

[0115] 면역반응이 있는 부분을 식별하기 위해서, 절단 부분은 ABC 시약(Vectastain Elite ABC kit; Vector Labs. Co., Burlingame, CA, 미국)에서 90분 동안 배양하였고, 5분 동안 PBS에서 세 번 세척하였고, 1분 동안 3,3'-다이아미노벤지딘 (DAB; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, 미국) 및 0.01% H₂O₂을 포함하는 용액에서 배양하였다.

[0116] 마지막으로, 증류수에서 간단한 세척 후에 조직을 PBS로 세척하였고, 각각 슬라이드에 탑재하였다. 슬라이드를 건조시켰고 커버를 덮었다. AxioVision 3.0 이미지 시스템(Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, 독일)을 사용하여 영상을 얻었고 Adobe Photoshop(Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, 미국)을 사용하여 처리하였다. 절단 부분을 확대하여($\times 200$), $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ 안의 세포의 수를 측정하였다.

[0117] **실시예 5-2. 부신피질자극호르몬-방출 요소 (CRF) 및 타이로신 수산화효소의 면역조직화학 결과**

[0118] 부신피질자극호르몬-방출 요소(CRF)-유사 면역반응성은 시상하부의 실방핵(paraventricular nucleus;PVN)을 포함하는 세포체의 시상하부 부분에서 분석하였다(도 6). STR 그룹에서 랫트의 뇌는, 시상하부의 실방핵(PVN)에 있어서, 부신피질자극호르몬-방출 요소 면역반응 점유의 수가 145.60%로 증가하였다. 반복되는 구금 스트레스로 인하여, 대조군과 비교하였을 때 CRF 발현에 있어서 상당한 증가를 나타내었다. STR 그룹과 비교하여(도 7), CRF-면역반응성 뉴런 수는 STR+GRe50 그룹에 있어서($p < 0.05$) 시상하부 실방핵 부분에 있어서 상당히 감소하였다. 반복되는 구금 스트레스에 의한 CRF-면역반응성의 증가는 GRe 투여에 의해서 상당히 복원되었고, STR+GRe50 그룹에 있어서 CRF-면역반응성 뉴런의 수는 대조군과 비교하여 상당히 유사하였다.

[0119] 타이로신수산화효소(TH)-유사 면역반응성은 청반(LC; locus coeruleus)을 포함하는(도 6), 아드레날린 지역의 세포 기관에서 분석하였다. STR 그룹에 있어서, 랫트의 뇌는 청반에 있어서 타이로신수산화효소 면역반응 점유의 수가 138.76%까지 증가하였다. 반복적으로 구금 스트레스에 노출된 랫트는 대조군($p < 0.01$)과 비교하여, 타이로신수산화효소 발현에 있어서 상당한 증가를 보여주었다. STR 그룹의 뉴런의 수와 비교하여(도 7) STR+GRe50

그룹 ($p < 0.05$)에 있어서, TH-1 면역반응성 뉴런의 상당수가 중심 아드레날린 지역에서 감소하였다.

[0120] 이러한 결과는, 반복되는 구금 스트레스를 가한 랫트에 있어서 TH-면역반응성 뉴런수의 증가가 GRe 투여에 의해서 회복된다는 것을 나타낸다. 그리고, STR+GRe50 그룹에 있어서 TH-면역 양성 뉴런수가 STR+FLX 그룹의 TH-면역 양성 뉴런의 수와 유사하다는 것을 나타내었다.

[0121] 실시예 6-1. 전체 RNA 제조 및 RT-PCR 분석방법

[0122] 각각의 그룹에 있어서의 네 마리의 랫트로부터 해마를 채취하였다. 전체 RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, 미국)을 사용하여 뇌의 샘플로부터 얻었고 공급자의 지시에 따라 RNA를 추출하기 위해서 사용하였다. 상보적인 DNA는 역 전사효소로 전체 RNA로부터 합성하였다.

[0123] BDNF mRNA 발현 레벨은 역 전사-중합효소 사슬 반응(RT-PCR)에 의해서 측정하였다. RT-PCR은 PTC-100 프로그램화된 열 조절자(MJ Research, Inc., Watertown, MA, 미국)를 사용하여 수행하였다.

[0124] 작동 조건은 다음과 같았다:

[0125] 글리세르알데하이드-3-인산 탈수소효소(GAPDH)에 대해서는 95℃에서 30초 동안 30 주기로 변성, 58℃에서 30초 동안 어닐링, 및 72℃에서 30초 동안 연장,

[0126] BDNF에 대해서는 95℃에서 30초 동안 27 주기로 변성, 57℃에서 30초 동안 어닐링, 및 72℃에서 30초 동안 연장하였다.

[0127] 모든 프라이머는 공지된 mRNA 시퀀스 및 웹사이트를 통해서 제공되는 프라이머 디자인 소프트웨어(프라이머 3; The Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, 미국; www.genome.wi.mit.edu)를 사용하여 디자인하였다. 다음의 시퀀스를 사용하였다:

[0128] GAPDH (409 bp)에 대해서는, (정방향) 5' -ATC CCA TCA CCA TCT TCC AG-3' 및 (역방향) 5' -CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'

[0129] ; BDNF (153 bp)에 대해서는, (정방향) 5' -CAG GGG CAT AGA CAA AAG-3' 및 (역방향) 5' -CTT CCC CTT TTA ATG GTC-3' .

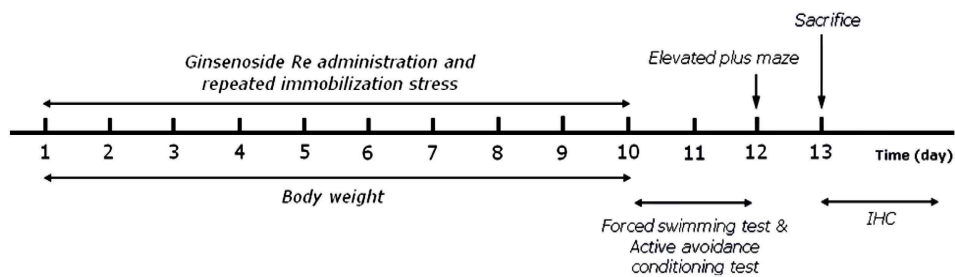
[0130] PCR에 의한 생성물은 1.2% 아가로스 겔에서 분리되었고, 에티듐 브로마이드로 염색하였고, 각각의 밴드의 밀도는 이미지-분석 시스템 (i-MaxTM7, CoreBio System Co., Seoul, 한국)을 사용하여 분석하였다. 상보적인 DNA 발현 레벨은 GAPDH에 대한 각각의 BDNF 밴드의 상대 밀도로 계산되었다.

[0131] 실시예 6-2. 전체 RNA 제조 및 RT-PCR 분석방법 결과

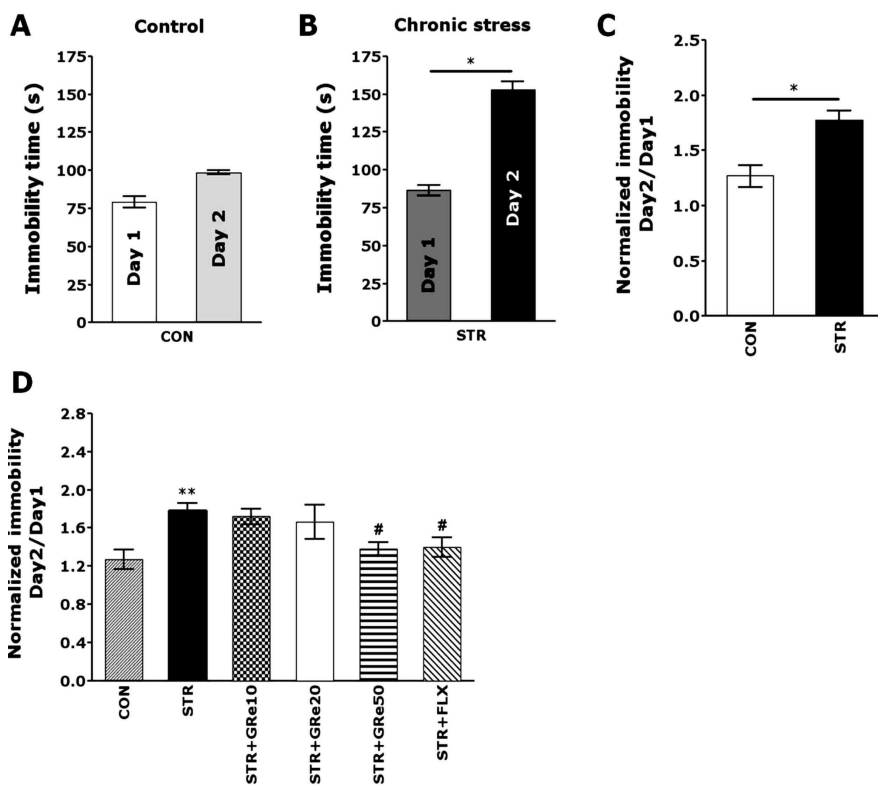
[0132] BDNF mRNA의 발현 레벨에 있어서 GRe 투여의 효과는 RT-PCR 분석(도 8)을 사용하여 반복적인 구금 스트레스 유도 해마 변경으로 랫트에서 조사하였다. BDNF mRNA 발현 레벨은 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소(GAPDH) mRNA에 의하여 평균화되었고 하우스 키핑 유전자는 내부 조절제로서 사용되었다. 랫트의 시상하부에 있어서 STR그룹에 있어서 BDNF mRNA 표현은 대조군($p < 0.01$)과 비교하여 상당히 감소하였다. STR그룹에 있어서 BDNF mRNA의 감소된 발현은 STR+GRe50 그룹($p < 0.05$)에서 회복되었다. 회복된 레벨은 거의 대조군에서의 정상 랫트와 유사하였다. STR+GRe50 그룹에 있어서 뉴런의 마커의 발현 레벨의 회복은 거의 STR+FLX 그룹과 유사하였다.

도면

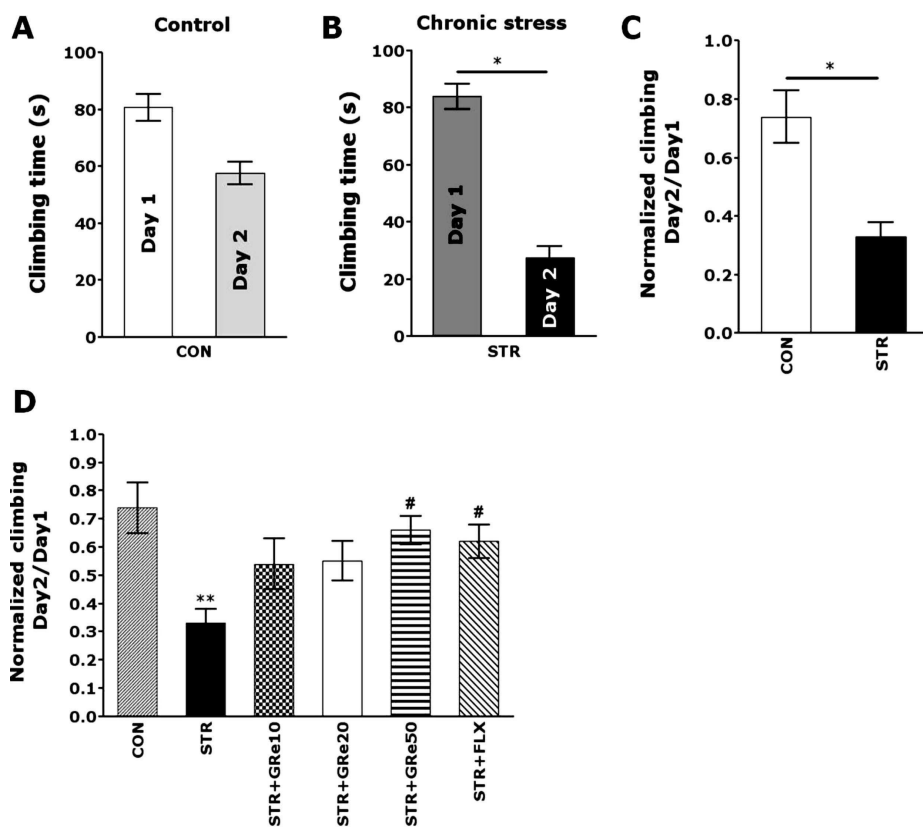
도면1



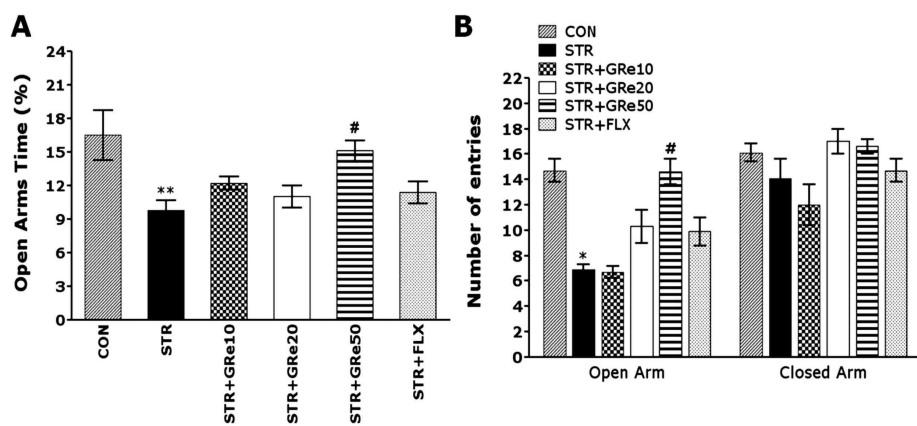
도면2



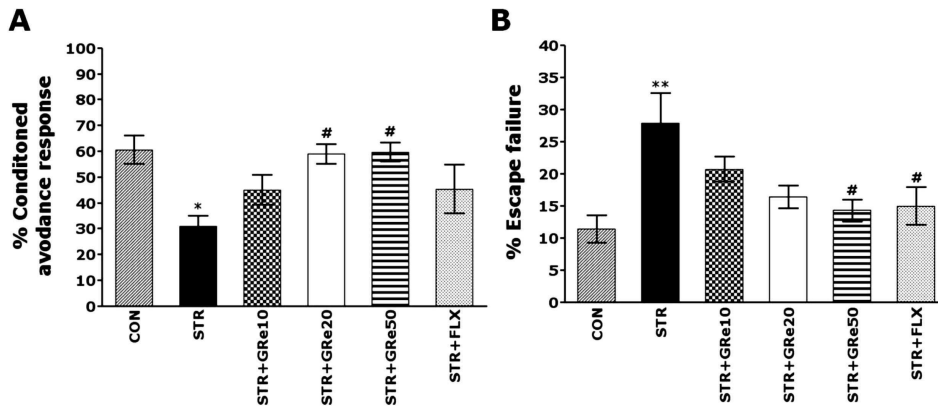
도면3



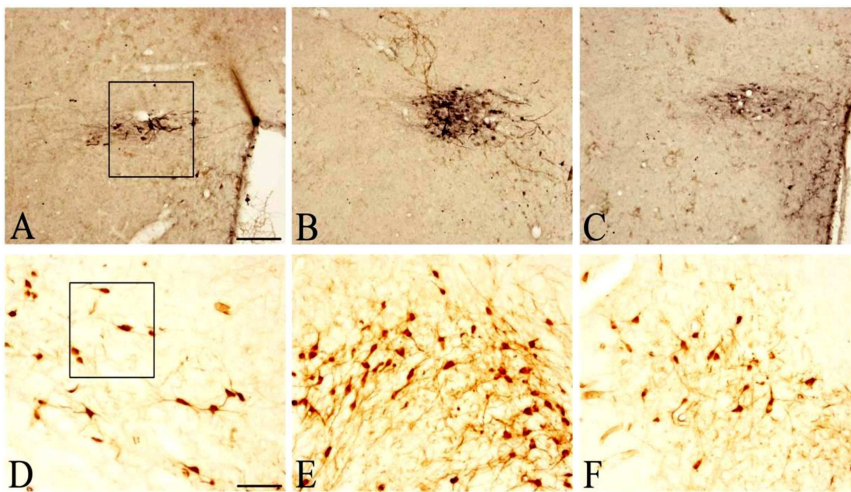
도면4



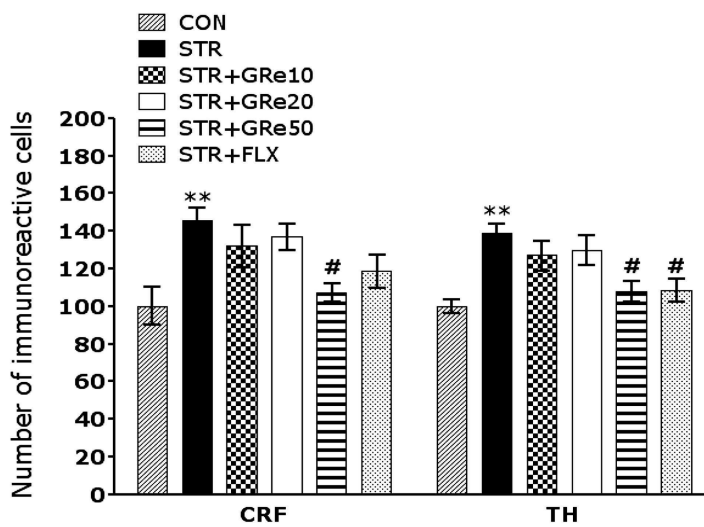
도면5



도면6



도면7



도면8

