



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0102942
(43) 공개일자 2019년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/115 (2016.01) A23L 33/105 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/115 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0028773
(22) 출원일자 2018년03월12일
심사청구일자 2018년03월12일
(30) 우선권주장
1020180023695 2018년02월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
다오영농조합법인
경상남도 하동군 화개면 화개로 519 ()
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
재단법인 하동녹차연구소
경상남도 하동군 화개면 섬진강대로 3748-14
(72) 발명자
정소암
경상남도 하동군 화개면 목압길 38
김재중
경상남도 하동군 화개면 화개로 519
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 신태양

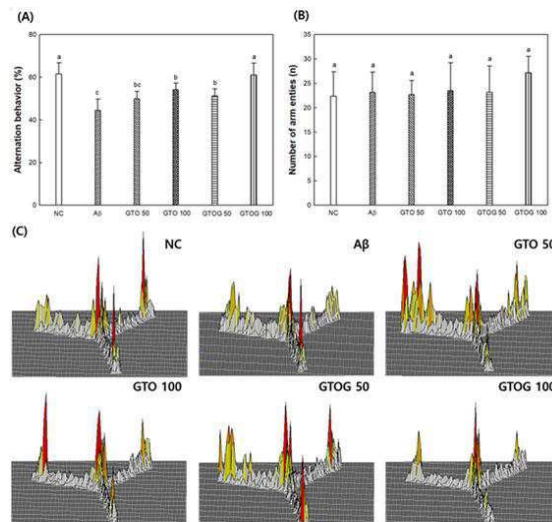
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품

(57) 요약

본 발명은 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품에 관한 것으로, 상온에서 스크류 압착법으로 착유하는 차씨오일을 포함함으로써, 신경세포 보호 효과 및 인지기능 개선 효과가 있고, 마늘 침출물을 더욱 추가함으로써 공간인지기억, 단기 기억능력 및 장기 기억능력을 더욱 개선한 효과가 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/212 (2013.01)

(72) 발명자

김종철

경상남도 하동군 화개면 섬진강대로 3748-14

조경환

경상남도 하동군 하동읍 중앙로 103, 101동 201호
(송보파인빌)

배성경

경상남도 진주시 내동면 남강휴먼빌 105동 501호

정가희

경상남도 하동군 금남면 경충로 1

허호진

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교 농업생명과학대학 식품공학과, 453동 101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0006156

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 (재)경남지역사업평가단

연구사업명 지역주력산업육성(R&D) 기술개발

연구과제명 차씨오일(tca seed oil)을 이용한 인지기능개선 건강보조식품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 다오영농조합법인

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

차나무의 씨를 착유한 차씨오일을 포함하는,
인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 차씨오일은 상온에서 스크류에 의한 압착으로 착유하는,
인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품.

청구항 3

제 2항에 있어서,
상기 차씨오일 100중량부에 마늘 침출물 5~40중량부를 추가적으로 포함하는,
인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품.

청구항 4

제 3항에 있어서,
상기 마늘 침출물은 차씨오일 100중량부에 마늘 10~30중량부를 중탕기에 투입한 후 60~80℃의 온도에서 1~5시간 동안 중탕 가열하여 수득하는,
인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품에 관한 것으로, 보다 상세하게는 차씨오일과 차씨오일을 이용한 마늘침출물을 이용하여 인지기능을 향상시킬 수 있는, 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 녹차나무(*Camellia sinensis*)는 차나무라고도 하며, 사철푸른 떨기나무이다. 뿌리는 아래로 곧게 뻗고 깊이가 2~4 m이며, 결뿌리는 길이가 15~20 cm이고, 가는 뿌리가 많다. 잎은 품종이나 위치에 따라 변이가 크지만 어긋나고 길이 6~20 cm, 폭 3~4 cm의 긴 타원 모양이며 가장자리에 둔한 톱니가 있고 끝과 밑부분이 뾰족하다. 잎의 질은 단단하고 약간 두꺼우며 표면에 광택이 있다. 꽃은 10~11월에 흰색 또는 연분홍색으로 피고 잎겨드랑이 또는 가지 끝에 1~3개가 달린다. 열매는 삭과이고 둥글며 모가 져고, 다음해 봄부터 자라기 시작하여 가을에 익기 때문에 꽃과 열매를 같은 시기에 볼 수 있다. 열매가 익으면 터져서 갈색의 단단한 종자가 나온다. 녹차는 잎을 따서 증기로 찌거나 뜨거운 바람으로 산화효소를 비활성화시킨 다음 말린다. 이러한 녹차의 씨에는 카페인, 기름 22%(씨 속에 18%), 테아사포닌($C_{57}H_{90}O_{26}$)이 있다. 테아사포닌은 테아사포게놀($C_{18}H_{34}O_7$), 글루쿠론산($C_{18}H_{34}O_7$), 갈락토오스, 아라비노오스, 크실로오스, 안젤리크산으로 물분해된다. 씨에는 또한 33%의

녹말, 8.5%의 단백질이 있다. 줄기, 뿌리, 씨에는 스테로이드사포닌이 있는데 특히 씨에 많다(9~10%).

[0003] 최근 건강에 대한 관심으로 녹차의 선호현상이 두드러져 소비가 증가함에 따라 녹차의 수요가 많아 녹차나무 (*Camellia sinensis* L.)의 재배가 급속히 늘어나면서 녹차씨앗의 생산량도 증가하고 있으나 이에 대한 이용 방안이 없어 폐기되고 있는 실정이다. 녹차씨앗은 천식과 뇌명, 만성 위장약, 산후회복, 수술 후의 빠른 상처 치유 등 문헌상에 이에 대한 민간요법이나 한방 치료적 여러 효과들이 나타나 있으며 수량이 많고 기름이 풍부하여 중국 등지에서는 일부 식용으로 이용되고 있고 우리나라의 경우 일부 화장품의 원료로 이용되고 있다. 녹차씨앗에는 지방이 풍부하고 사포닌 등 각종 천연화합성분들이 풍부하게 함유되어 있다.

[0004] 대한민국등록특허공보 제10-0755427호(2007.09.04.)에는 피부 탄력 증진 효과를 갖는 녹차씨 오일을 함유하는 화장료 조성물이 개시되어 있다.

[0005] 상기 녹차씨 오일은 수증기 증류법으로 추출되며, 피부탄력 효과가 있는 장점이 있지만, 아직까지 차씨 오일이 퇴행성질환 및 인지기능 개선에 도움이 되는지에 관한 연구는 전무한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-0755427 B1 2007.09.04.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 차씨오일과 차씨오일을 이용한 마늘침출물을 이용하여 인지기능을 향상시킬 수 있는, 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 다음과 같은 수단을 제공한다.

[0009] 본 발명은 차나무의 씨를 착유한 차씨오일을 포함하는, 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품을 제공한다.

[0010] 상기 차씨오일은 상온에서 스크류에 의한 압착으로 착유한다.

[0011] 상기 차씨오일 100중량부에 마늘 침출물 5~40중량부를 추가적으로 포함한다.

[0012] 상기 마늘 침출물은 차씨오일 100중량부에 마늘 10~30중량부를 증탕기에 투입한 후 60~80℃의 온도에서 1~5시간 동안 증탕 가열하여 수득한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품은 신경세포 보호 효과가 있고, 인지기능 개선 효과가 있다.

[0014] 또한, 본 발명에 따른 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품은 마늘 침출물을 더욱 추가함으로써 공간인지구역, 단기 기억능력 및 장기 기억능력을 더욱 개선한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 실시예 1에서 제조한 녹차씨유의 DPPH 라디칼 소거 활성 능력을 나타내는 도면이다.

도 2는 실시예 1에서 제조한 녹차씨유의 MDA 생성 저해 능력을 나타내는 도면이다.

도 3은 실시예 1에서 제조한 녹차씨유의 AChE의 저해 활성을 나타내는 도면이다.

도 4는 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스 녹차씨유의 PC12 신경세포의 생존율을 MTT assay로 측정한 도면이다.

도 5는 PC12 신경세포에서 유도된 활성산소종의 생성에 대한 억제 활성을 측정한 도면이다.

도 6은 Y-maze, passive avoidance, Morris water maze 실험방법을 설명하는 도면이다.

도 7은 기억력과 학습능력이 감퇴된 마우스 모델을 대상으로 8분 동안 Y-maze에서 의 마우스 행동을 관찰한 결과이다.

도 8은 차씨오일의 단기 기억 개선 효과를 평가하기 위해 진행한 Passive avoidance test 결과이다.

도 9는 학습 및 장기 기억 개선을 평가하기 위하여 진행한 Morris water maze test 결과이다.

도 10은 차씨오일을 섭취한 마우스의 뇌 조직에 존재하는 지질과산화 중간 생성물인 MDA의 함량을 비교해 보기 위해 각 그룹의 MDA 함량을 측정하여 나타낸 도면이다.

도 11은 마우스의 뇌와 간을 적출하여 SOD의 활성을 측정하여 그 결과를 나타낸 도면이다.

도 12는 차씨오일을 섭취한 마우스의 뇌 조직에 존재하는 환원형 GSH의 함량을 측정하여 나타낸 도면이다.

도 13은 Aβ로 유도된 마우스의 뇌를 적출하여 AChE 활성을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 Aβ를 통해 인지기능 장애가 유발된 마우스의 뇌를 적출하여 ACh 함량을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

먼저, 본 발명에 따른 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품을 설명한다.

본 발명의 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품은,

차나무의 씨를 착유한 차씨오일을 포함한다.

상기 차씨오일은 상온에서 스크류에 의한 압착으로 착유하는 것이 바람직하다.

상기 차씨오일은 지방, 단백질, 카페인 및 사포닌 등을 함유하고 있으며 arginine, aspartic acid, leucine 등의 아미노산과 oleic acid, palmitic acid, linoleic acid 등의 지방산으로 구성되어 있다. 특히 비타민E와 리놀레산이 다량 함유되어 있다.

상기 차씨오일은 차나무(*Camellia sinensis* L.)의 씨를 상온에서 스크류 압착법으로 착유하는 것이 바람직하다. 상기 상온 스크류 압착법은 상온에서 스크류가 수평으로 이동하면서 차씨를 밀어내며 착유하는 방식으로 시간당 12.5kg을 착유할 수 있으며, 수율은 약 18% 이다.

차씨오일을 이용해 DPPH 라디칼 소거시험으로 항산화 효과를 측정하였고 1,000 μg/mL에서 9.42%로 나타났다. 또한 산화 스트레스에 의해 생성되는 지질 과산화물(MDA) 생성 억제효과를 시험해 본 결과, 5,000 μg/mL에서 40.06%의 저해활성을 보였다. 즉, MDA 생성을 억제함으로써 신경 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었으며 신경 전달물질인 아세틸콜린을 분해하는 아세틸콜린 분해효소(AChE)의 저해활성을 측정한 결과, 500 μg/mL에서 32.96%의 저해활성을 나타냈다. 즉, 아세틸콜린의 분해를 억제함으로써 인지기능 개선에 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 신경세포의 보호효과를 확인하고자 PC12 신경세포를 이용해 시험을 진행하였다. 우선 신경세포에 산화적 스트레스를 유발하여 세포 독성을 주었을 때 차씨오일이 신경세포를 보호하는 효과가 있는지 확인하고자 세포독성 확인 시험을 진행하였다. 그 결과, 과산화수소수로 유발한 세포 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 차씨오일 2,000 μg/mL 에서 무처리군 대비 61.59%의 세포 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 신경세포 내 활성산소종(ROS) 생성 억제 효과를 확인하기 위해 DCF-DA 시험법을 수행하였으며 H₂O₂로 ROS 유발한 처리군에서는 무처리군 대비 139.57%의 ROS의 생성을 나타냈고, 2,000 μg/mL 에서 무처리군 대비 106.37%의 ROS 생성을 나타내었다. 이는 H₂O₂로 유발된 ROS를 차씨오일이 억제시킴으로써 신경세포 보호 효과도 있음을 확인할 수 있었다.

본 발명의 인지기능개선효과를 나타내는 차씨오일을 포함하는 건강보조식품은,

상기 차씨오일 100중량부에 마늘 침출물 5~40중량부를 추가적으로 포함할 수 있다.

상기 마늘 침출물은 차씨오일 100중량부에 마늘 10~30중량부를 중탕기에 투입한 후 60~80℃의 온도에서 1~5시간

동안 중탕 가열하여 수득하는 것이 바람직하다.

- [0027] 상기 중탕 가열은 상기 차씨오일과 슬라이스한 마늘이 수용된 용기가 직접 화기에 닿지 않도록 중탕기에 물을 넣은 후, 상기 물을 가열함으로써 수행될 수 있다.
- [0028] 상기 마늘 침출물은 여과한 후에 사용할 수 있다.
- [0029] 이때 60~80℃의 온도에서 중탕 가열하는 이유는 마늘의 유용성분이 60~80℃에서 차씨오일에 잘 우러나오는 지용성 성분이기 때문이다.
- [0030] 본 발명에 따른 차씨오일 단독 또는 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물은 Y-maze test, passive avoidance test, Morris water maze test를 통해 인지기능 개선 효과를 확인하였다. 실험동물의 뇌 조직을 이용하여 MDA, SOD, reduced GSH의 함량을 측정하여 antioxidant system을 평가하고, 신경전달에 영향을 미치는 AChE 저해활성과 ACh함량을 측정하여 cholinergic system 보호효과를 확인하였다.
- [0031] 본 발명에 따른 차씨오일 단독 또는 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물은 공간인지기능, 단기 기억능력, 장기 기억능력이 개선되는 것을 확인하였고, 뇌 조직에서 지질과산화물을 억제하고 항산화 기능을 가진 SOD와 GSH의 함량을 높여 antioxidant system을 개선시켰으며, AChE의 저해활성을 높였고, 신경전달물질인 ACh의 함량을 증가시켜 cholinergic system 보호효과를 확인하였다.
- [0032] 차씨오일을 섭취한 그룹(GTO 50, 100)과 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 그룹(GTOG 50, 100)을 비교하였을 때, 두 그룹 모두 인지기능 장애 그룹(Aβ 그룹)에 비하여 인지기능을 개선하는 효과가 있다.
- [0033] 특히 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 그룹(GTOG 50, 100)이 차씨오일을 섭취한 그룹(GTO 50, 100) 보다 인지기능개선 능력이 뛰어난 효과가 있다.
- [0034] 또한, 뇌조직을 이용한 *ex vivo* 실험에서 역시 마찬가지로 특히 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취하는 경우가 차씨오일을 섭취하는 경우에 비해 더 뛰어난 antioxidant system 과 cholinergic system 의 개선효과를 나타낸다.
- [0035] 본 발명은 차씨오일에 마늘 침출물을 첨가함으로써 인지기능개선 능력을 더욱 향상시킨 것에 특징이 있다.
- [0036] 본 발명의 건강보조식품은 차씨오일 단독 또는 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물 자체가 될 수 있다. 이 경우 건강보조식품은 페이스트 또는 액상 또는 분말형태이다.
- [0037] 또한, 본 발명의 건강보조식품은 차씨오일 단독 또는 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물에 각종 부재료 및 식품 첨가물들이 첨가될 수 있다. 이때 건강보조식품은 식품 총 중량에서 차씨오일 단독 또는 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 0.1 내지 90중량%를 함유할 수 있다.
- [0038] 식품 첨가물로 예를 들어 단당류, 이당류, 다당류, 당알콜 등의 당류와, 타우마틴, 스테비아 추출물, 사카린, 아스파르트름 등의 향미제와, 영양제, 비타민, 식용 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제(예, 치즈, 초콜릿 등), 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등이 이용될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 건강보조식품은 다양한 형태로 제형이 가능하므로 그 형태는 특별히 제한되지 않는다. 따라서 음료, 과립, 정제, 파우더, 환, 캡슐 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 형성된다. 이러한 음료, 과립, 정제, 파우더, 환, 캡슐 제형을 갖는 건강보조식품은 휴대가 간편하고 언제 어디서나 수시로 섭취하기가 용이하다.
- [0040] 또한, 건강보조식품 외에도 차씨오일 단독 또는 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 첨가하여 선식, 면류, 과자류, 육류, 생선류, 나물류, 찌개류 또는 밥류 등을 포함하는 다양한 식품 조성물의 형태로 제조될 수 있음은 물론이다.
- [0041] 본 발명의 건강보조식품의 제형의 일 예로, 음료는 차씨오일 단독 또는 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물 0.1 내지 40중량%, 정제수 60 내지 99.9중량%일 수 있다. 또한, 음료에 첨가물로 타우린, 구연산, 비타민C, 탄수화물 등을 더 첨가할 수 있다. 상기 탄수화물은 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등이다.
- [0042] 이외에도 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제가 추가 성분으로서 함유될 수 있다. 향미제로서 타우마틴, 스테비아 추출물 등의 천연 향미제를 사용할 수 있다.

- [0043] 과립, 정제, 파우더, 환, 캡슐 등의 제형은 차씨오일 단독 또는 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물 10 내지 60중량%를 함유하고, 기타 점착제, 향미료, 비타민, 탄수화물 등을 더 추가로 함유할 수 있다.
- [0044] 일 예로, 환은 차씨오일 단독 또는 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물 40중량%와, 점착제 50중량%와, 탄수화물 8중량%와, 향미료 2중량%를 혼합하여 반죽한 후 통상의 제환기에서 녹두알 크기의 환을 성형한 다음 열풍건조기에서 건조시켜 제조한다. 상기 점착제로 물엿 또는 꿀, 밀가루 풀을 이용할 수 있다.
- [0045] 제환기 대신 과립기를 이용하여 직경 0.5 내지 1.5mm의 과립상으로 성형할 수 있음은 물론이다. 또한, 제조된 과립을 적당량씩 압출 성형하여 정제로 하거나, 캡슐에 충전하여 캡슐 형태로 제조할 수 있다.
- [0046] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것은 아니다.

실시예 1

- [0047] 경남 하동군 화개면에서 수매한 단일 로트(Lot)번호의 차씨(*Camellia sinensis* L.) 원료를 상온 스크류 압착법을 이용해 착유하여 차씨오일을 제조하였다. 상기 상온 스크류 압착법은 상온에서 스크류가 수평으로 이동하면서 차씨를 밀어내며 착유하는 방식으로, 시간당 12.5kg을 착유할 수 있으며, 수율은 약 18%이다.
- [0048] [실험예 1]
- [0049] 실시예 1에서 제조한 녹차씨유의 DPPH 라디칼 소거 활성 능력을 알아보기 위해 1000, 500, 200, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 5% DMSO에 희석하여 실험을 진행하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다. DPPH radical 소거활성은 0.1 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 80% methanol에 용해시킨 후, 517 nm에서 흡광도 값이 1.000 ± 0.020 이 나오도록 80% methanol에 희석시켜 사용하였다. 시료용액 0.1 mL에 흡광도 값을 맞춘 DPPH 용액 2.9 mL를 가한 후 vortex mixer로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼은 비교적 안정한 자유 라디칼로서 이를 이용한 라디칼 소거 활성 실험은 여러 가지 천연물로부터 폴리페놀 및 항산화 물질의 확인하는 데 사용되고 있다. Positive control로 사용된 vitamin C는 활성산소의 포착제로 hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$)와 반응하여 명확하게 소거하며 그 효과는 강한 환원성에 의한 항산화 작용에 기인한 것으로 positive control로 많이 사용된다.
- [0050] 도 1에 의하면, 실험결과는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 9.42%, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 9.04%로 나타났다.
- [0051] [실험예 2]
- [0052] 활성산소종과 같은 산화적 스트레스에 대한 녹차씨유의 지질과산화물(malondialdehyde, MDA) 생성 억제 효과를 ICR mouse로부터 적출한 뇌 조직을 활용하여 분석 확인하였다. 뇌 조직에서의 지질성분은 주로 신경세포막에서 산화적 스트레스에 취약한 상태로 존재하고 있으며, 외부 스트레스에 의한 세포막 손상 및 여러 가지 단백질의 산화에도 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 마우스 뇌 조직에서 세포막의 지질과산화 중간생성물인 MDA 생성 억제 효과를 살펴보았다. 실시예 1에서 제조한 녹차씨유의 MDA 생성 저해 능력을 알아보기 위해 5000, 1000, 500, 200, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 5% DMSO에 희석하여 실험을 진행하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. ICR-mouse (8 주령, male)는 실험동물 공급업체 (Samtako, Osan, Korea)로부터 구입하여 7일간의 환경 적응 기간을 유지했다. 모든 실험동물은 한 개의 사육케이스에 2마리씩 넣어 항온 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 항습 (50-55%)을 일정하게 유지하였고, 12시간 간격으로 낮과 밤을 교대시키는 동일한 환경에서 충분한 양의 식수와 사료를 공급하며 사육하였다 (경상대학교 동물실험인가번호 GNU-120831-M0067). 상기 환경에서 1주간 사육한 mouse 뇌 조직을 적출하여, 10 volume의 ice cold 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)에 균질화 시켜 원심분리한 후, 상등액을 털어 -80°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 시료 0.2 mL에 뇌 조직 상등액 0.1 mL, 10 μM FeSO_4 0.1 mL 및 0.1 mM ascorbic acid 0.1 mL를 혼합하여 37°C 에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후 30% trichloroacetic acid 0.1 mL와 1% thiobarbituric acid 0.3 mL를 첨가하여 water bath (80°C)에서 20분간 가열한 후, 532nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0053] 도 2에 의하면, 실험 결과는 5,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 40.06%, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 13.30%의 저해활성을 보였다.

- [0054] [실험예 3]

- [0055] 인지기능을 조절할 수 있는 뇌 신경전달물질인 아세틸콜린(acetylcholine, ACh)은 산화적 스트레스를 비롯한 다양한 원인에 의하여 대뇌 피질과 해마 부위에서 급격히 감소하는 특징이 있다. 또한, ACh은 뇌신경 말단

(cholinergicsystem)에서 AChE에 의해 분해되며 AChE의 활성이 지나치게 증가하게 될 경우 인지기능의 감소를 유발할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 이에 따라 실시예 1에서 제조한 녹차씨유의 AChE의 저해 활성을 알아보기 위해 500, 200, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 5% DMSO에 희석하여 실험을 진행하였다. AChE 저해활성 측정은 acetylcholine iodide를 기질로 사용하여 측정하였다. 효소는 PC12 세포배양액을 원심분리 (1,500 rpm, 6분, 4 $^{\circ}\text{C}$)하였으며, 상등액을 제거하였다. 남은 pellet에 균질화 buffer [1M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 혼합액에 10 mM tris-HCl로 pH 7.2로 조정] 2 mL를 첨가하여 Glass-Col homogenizer로 균질화한 하였으며, 균질화 된 세포배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 30분, 4 $^{\circ}\text{C}$)하였다. 그 후 상등액을 덜어 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면서, 효소실험을 위하여 사용하였다. 추출한 효소액의 단백질 함량을 측정하기 위하여 Quant-iT™ Protein Assay kit (InvitrogenCo., Carlsbad, Ca., USA)를 이용하여 측정하였다. 효소액 10 μL 에 시료용액 10 μL 를 넣어 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 pre-incubation 시킨 후 50 mM sodium phosphate buffer에 용해시킨 Ellman's reaction mixture [0.5 mM acetylthiocholine, 1 mM 5,5' dithiobis (2-nitro benzoic acid)] 70 μL 를 첨가한 후 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

[0056] 도 3에 의하면, 실험 결과는 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 32.96%, 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 20.39%의 저해활성을 보였다.

[0057] [실험예 4]

[0058] 인체에서의 산화적 스트레스는 뇌 조직 등으로 이동된 많은 양의 산소가 불균형 대사되어 상대적으로 많은 활성 산소종 등이 잔존하는 것으로부터 일어나게 되는데, 뇌 조직은 신경세포로서 신호전달이라는 기능적 특성상 상대적으로 많은 양의 불포화 지방산을 함유하고 있을 뿐만 아니라 낮은 수준의 항산화 효소를 가지고 있어 산화적 스트레스에 의한 세포 손상에 매우 민감한 것으로 보고되고 있다. 알츠하이머성 치매와 같은 뇌신경 퇴행성 질환은 여러 가지 산화적 스트레스에 의해 뇌신경세포의 손상 및 사멸이 진행되며, 천연 항산화 물질인 flavonoid 등과 같은 폴리페놀성 화합물은 이러한 산화적 스트레스로부터 신경세포의 보호 효과가 우수하다고 알려져 있다. H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스 녹차씨유의 PC12 신경세포의 생존율을 MTT assay로 측정하여 도 4에 나타내었다. 본 실험에서 사용한 PC12 cell (KCLB 21721, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 신경세포의 특성을 나타내는 세포로 rat의 pheochromocytoma에서 유도된 것을 사용하였다. PC12 세포는 25 mM HEPES, 25 mM sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin 및 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin이 포함된 RPMI 1640배지에 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂조건에서 배양하였다. PC12 세포에 대한 보호효과는 MTT assay kit를 이용하였다. MTT reduction assay는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 노란색의 수용성 기질을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 mitochondrial activity를 이용하는 측정방법이다. 실험 방법은 시료 30 μL 를 PC12 세포에 48시간동안 pre-incubation한 뒤, 200 μM H₂O₂를 3시간동안 처리하였다. 이 상태의 PC12 세포에 MTT stock solution (10 $\mu\text{L}/\text{well}$)을 처리하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 incubation 시킨 후, DMSO 100 μL 를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 최종 흡광도는 microplate reader (model 680, Bio-rad, Tokyo, Japan)에서 570 nm (determination)와 655nm (reference wave)에서 측정하였다. Positive control은 vitamin C (200 μM)를 사용하였고, 세포 생존율은 control에 대한 % unit 으로 나타냈다.

[0059] 도 4에 의하면, H₂O₂를 처리한 처리구에서는 control group 대비 56.35%의 cell viability를 나타냈고, 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 61.59%의 cell viability를 나타내었다.

[0060] [실험예 5]

[0061] DCF-DA assay는 PC12 세포에서 유도된 활성산소종의 생성에 대한 억제 활성을 측정하기 위해 수행하였다. H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스 녹차씨유의 PC12 신경세포의 생존율을 MTT assay로 측정하여 도 5에 나타내었다. PC12 세포 내 산화적 스트레스 생성량 측정을 위하여 DCF-DA assay를 이용하였다. 산화적 스트레스로 인해 세포 내 생성된 ROS는 비형광성을 나타내는 DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 산화시켜 형광물질인 DCF로 전환시키는데 이렇게 전환된 형광물질의 양을 측정하여 세포 내 형성된 ROS를 측정하는 방법이다. 실험 방법은 세포 105-106 cell/well에 시료 20 μL 를 48시간 동안 pre-incubation 하였다. 후에, 200 μM H₂O₂를 2시간 동안 처리하였고, 다음 250 μM DCF-DA를 넣어 50분 간 배양하여 fluorescence microplate reader (Infinite 200, Tecan Co., San Jose, CA, USA)를 사용하여 485 nm (determination)와 535 nm (reference)에서 fluorescence level을 측정하였다.

[0062] 표 5에 의하면, H₂O₂를 처리한 처리구에서는 control group 대비 139.57%의 산화적 스트레스의 생성을 나타냈고, 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 control 그룹 대비 106.37%의 산화적 스트레스 생성을 나타내었다.

실시예 2

- [0063] 실시예 1에서 제조한 차씨오일 100중량부에 슬라이스한 마늘 20중량부를 증탕기에 투입한 후 70℃의 온도에서 3시간 동안 증탕 가열한 후 여과하여 마늘 침출물은 수득하였다. 실시예 1에서 제조한 차씨오일 100중량부에 상기 마늘 침출물 30중량부를 혼합하여 혼합물을 제조하였다.
- [0064] [실험예 6] 인지기능 장애 mouse 동물모델에서의 기억/인지기능 능력 개선 효과 검증(Y-maze, passive avoidance, Morris water maze)
- [0065] 4주령 ICR계 male mouse를 실험동물 공급업체(Samtako Bio Korea, Korea)로부터 구입하여 7일 동안 적응 후, control 그룹(NC 그룹)과 인지기능 장애 그룹(Aβ), 실시예 1의 차씨오일을 섭취한 그룹(GTO 50, 100; 각각 50, 100 mg/kg of body weight)과 실시예 2의 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 그룹(GTOG 50, 100; 각각 50, 100 mg/kg of body weight)으로 분류하여 각 군마다 6마리씩 6군으로 나누어 4주간 실험을 진행하였다. NC그룹과 Aβ 그룹은 3주간 정수된 물을 섭취시켰고, GTO 그룹과 GTOG 그룹은 각각의 샘플을 3주간 섭취시켰다. 샘플의 섭취가 끝난 후, 신경 염증을 통한 인지장애의 유도는 amyloid β_{1-42} (Aβ)를 25 μ l Hamiltion 마이크로 주사기를 사용하여 마우스의 bregma 부위에 410 pM 농도로 생리식염수에 녹여 처리하였고, 주사기의 바늘은 bregma에서 45°로 기울여 삽입하였다. Aβ를 처리한 마우스를 3일 간 적응 시킨 후, *in vivo* 실험을 진행하였다. 모든 실험은 경상대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 : GNU-170605-M0023)하에 수행하였다.
- [0066] - Y-maze test
- [0067] 검은색 플라스틱 재질로 3개의 arm으로 구성된 Y-maze는 각 arm의 길이, 높이, 너비는 33cm, 15cm, 10cm로 구성되어 있으며, 각 arm을 A, B, C로 정한 후 한쪽 arm에 마우스를 놓고 8분 동안 마우스가 들어간 arm의 이동경로를 기록하였다. 3개의 서로 다른 arm에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하고, 변경 행동력(alternation behavior)은 총 통과횟수(total arm entry)와 점수를 평가하였다.
- [0068] - Passive avoidance test
- [0069] 조명이 있는 light chamber와 조명이 없는 dark chamber 2개의 구역으로 구분되어 있으며 바닥은 stainless steel로 우러져있다. Mouse는 light chamber에서 조명을 켜지 않은 채 1분 동안 적응시킨 후 조명을 켜고 2분 동안 적응시킨 후 마우스가 dark chamber로 이동하자마자 electric shock을 0.5mA, 1초 동안 가했다. 학습 시험을 시킨 다음날 각 mouse들을 대상으로 기억 시험(test trial)을 실시하였다. 조명을 켜 chamber에 mouse를 놓고 mouse의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time)을 최대 300 sec 까지 측정하였다.
- [0070] - Morris water maze test
- [0071] 원형 수조(wlrrud 150cm, 높이 60cm) 안에 물을 30cm 높이로 채우고(23±2℃), 수조 4분면의 한 구역에 escape platform을 설치하고 식용 오징어 먹물(Cebesa, Valencia, Spain)을 풀어주었다. 실험 첫날은 수조에서 실험동물이 platform 없이 60초간 자유롭게 수영하도록 하여 적응훈련을 시킨 후, 4일 동안은 platform을 수면 아래로 1cm로 놓고 보이지 않게 설정한 수조에서 매번 입수하는 위치(N, S, E, W zone)를 다르게 하고 하루 4번씩 반복하여 훈련시켰으며 video-tracking system을 이용하여 기록하였다(hidden trial). 실험동물이 60초 안에 platform에 도달하는 경우에는 15초 동안 platform에 머물게 하였으며, platform을 찾지 못할 경우에는 손으로 위치를 안내해 주어 platform에 위치하도록 하고 20초 동안 있도록 훈련시켰다. 실험 5일째(probe trial)에는 platform을 제거하고 working memory를 측정하기 위하여 60초 동안 platform이 있었던 구역(W zone)에 머무르는 시간(s)을 기록하는 probe test를 실시하였다.
- [0072] Y-maze, passive avoidance, Morris water maze 실험방법을 도 6에 나타내었다.
- [0073] 기존에 인지기능 장애를 일으킨다고 알려져 있는 trimethyltin(TMT)는 뇌의 해마 부위에 비가역적인 손상을 일으킴으로써 Alzheimer(AD)치매와 유사한 증상을 나타내는 약물로 알려져 있으며, 기억력과 학습능력이 감퇴되고, 인지 결함을 나타내는 것으로 알려져 있다. 하지만 이러한 TMT는 실제 AD 환자에게 나타나는 경향을 나타내기는 하지만 유도하는 방법이 인위적이고, AD를 일으키는 주원인에 대한 연구를 진행하기가 어려운 단점이 있다. 이에 따라 실제 AD 환자의 발병원인으로 꼽히는 amyloid beta (Aβ)를 인지기능을 담당하는 해마 부위에 직접 투여함으로써 나타나는 신경 염증 모델을 이용한 인지기능 개선 평가를 통해 차씨오일의 개선효과를 확인하고자 하였다.
- [0074] [실험예 6-1] Y-maze

- [0075] Y-maze test는 단기기억 형태의 순간 공간인지를 평가하기 위한 방법으로, 뇌의 해마 부위에 비가역적인 손상을 일으킴으로써 Alzheimer 치매와 유사한 신경 염증 증상을 나타내는 Aβ를 이용하여 기억력과 학습능력이 감퇴된 마우스 모델을 대상으로 8분 동안 Y-maze에서 의 마우스 행동을 관찰한 결과는 도 7과 같다. Aβ 그룹은 NC 그룹(60.41%) 대비 44.89%로 공간 인지기능에 대한 기억력 저하를 나타내었다. 이에 반해 실시예 1의 차씨오일을 섭취한 GT0 50과 GT0 100 그룹은 각각 49.85%와 54.11%로 Aβ 그룹과 비교하였을 때, 농도가 증가함에 따라 유의적으로 기억력이 개선되는 것은 확인하였다. 실시예 2의 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 GTOG 50과 GTOG 100 그룹은 GT0 그룹과 비교하였을 때 각각 51.32%와 60.99%로 인지기능 개선 효과가 높은 것으로 나타났다. 도 7B는 8분 동안 마우스들이 Y-maze의 각 구역을 통과한 총 횟수를 나타낸 것으로 마우스의 기본적인 운동능력에는 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. Aβ에 중독된 실험동물은 자발성 간질, 공격성, 과민성 등 변연계 손상으로부터 나타나는 신경적 과잉행동을 나타내는데, 각 군들 중 대표적인 한 마리 쥐의 행동 패턴을 도 7C를 통해 나타내었다.
- [0076] [실험예 6-2] Passive avoidance test
- [0077] Passive avoidance test는 amygdala 와 관련된 단기간 학습과 기억 인지기능을 평가하는 방법으로, N-methyl-d-aspartic acid (NMDA) 수용체의 역할과 관련이 있다. 신경 염증 스트레스는 amygdala에서 신경세포 손상과 사멸을 유발하고 인지기능 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다. 차씨오일의 단기기억 개선 효과를 평가하기 위해 Passive avoidance test를 진행하였고 그 결과를 도 8에 나타내었다. Aβ 그룹은 NC 그룹(296.67 sec) 대비 168.67 sec로 현저한 단기 기억력 저하를 나타냈다. 이에 비하여 실시예 1의 차씨오일을 섭취한 GT0 50과 GT0 100그룹에서 각각 200.50 sec, 258.33 sec로 나타났고, 실시예 2의 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 GTOG 50과 GTOG 100 그룹에서 각각 231.83 sec, 279.33 sec로 나타나, Aβ 그룹과 비교하였을 때, 유의적으로 단기 기억력을 개선시키는 것으로 나타났다.
- [0078] [실험예 6-3] Morris water maze test
- [0079] Morris water maze test는 일반적으로 설치류의 공간 및 장기 학습 기억 기능을 평가하는데 사용되는 실험으로 마우스가 도달하는 플랫폼을 수면 아래에 숨긴 채 주변의 다양한 기호를 이용하여 플랫폼이 있던 위치를 찾아가는 hidden test와 플랫폼을 제거하여 학습 및 기억을 평가하는 probe test로 진행되는 실험 방법이다. Morris water maze test는 마우스의 해마의 NMDA 수용체 기능과 장기기억의 저장과 관련이 있다. 산화적인 스트레스에 의해 해마가 손상될 경우, 이러한 학습 및 장기기억의 이상이 나타난다.
- [0080] 학습 및 장기기억 개선을 평가하기 위하여 Morris water maze test를 실시하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다. Hidden test의 경우 모든 그룹에서 플랫폼을 찾아가는 시간이 감소되는 것을 확인할 수 있으며, 마지막 4일차에서 Aβ 그룹은 NC 그룹(33.37 sec) 대비 43.82 sec로 현저한 장기기억 및 학습능력이 저하됨을 나타냈다. 이에 비하여 실시예 1의 차씨오일을 섭취한 GT0 50과 GT0 100그룹에서 각각 39.38 sec, 36.66 sec로 나타났고, 실시예 2의 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 GTOG 50과 GTOG 100 그룹에서 각각 37.74 sec, 34.30 sec로 나타나, Aβ 그룹과 비교하였을 때, 뛰어난 학습기억력을 나타내는 것을 확인할 수 있다. Morris water maze test에서 hidden trial이 끝난 후, 기준에 있던 플랫폼을 제거하고 플랫폼이 있던 위치에서 가장 멀리 떨어진 곳에 마우스를 두고 플랫폼이 있었던 구역에 머무는 시간을 측정한 결과는 도 9B와 같다. NC 그룹(58.64%) 대비 44.49%로 플랫폼이 있던 W zone에 머무르는 시간이 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 실시예 1의 차씨오일을 섭취한 GT0 50과 GT0 100그룹에서는 각각 49.85%, 54.11%로, 실시예 2의 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 GTOG 50과 GTOG 100 그룹에서는 각각 51.22%, 57.93%로 나타났고, hidden trial과 유사한 경향을 나타내었다. Probe test에서 나타난 마우스의 움직임을 도 9C에 나타내었다.
- [0081] 이러한 behavior test 결과들을 종합해 볼 때, 차씨오일은 뛰어난 기억 및 학습 능력을 회복하는 효과가 우수한 것으로 나타났고, 이는 학습 및 기억력 증진효과 Alzheimer 치매와 같은 신경 퇴행성 질환에 대한 뛰어난 기능성 소재가 되는 장점이 있다.
- [0082] [실험예 7] Cholinergic system이 손상된 동물 모델에서의 조직 항산화 개선 및 cholinergic system 보호를 통한 neurotransmitter 장애 개선효과 확인
- [0083] - 마우스 뇌 조직 중의 malondialdehyde (MDA) 함량 측정
- [0084] PBS를 이용하여 추출한 마우스 뇌조직 균질액 160μl에 1% phosphoric acid 960μl을 혼합한 후 0.67% thiobabitoric acid 320μl을 넣고 95℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액은 5,000rpm에서 10분간 원심 분리하고, 532nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다. MDA 함량은 mg protein 당 μmole의 농도로 표시하였다.

- [0085] - 마우스 뇌 조직 중의 superoxide dismutase (SOD) 함량 측정
- [0086] 적출한 마우스의 뇌를 10 volume의 lysis buffer를 넣고 Glass-Col homogenizer로 균질화한 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여, 상등액을 버리고 pellet을 취하였다. 1×Cell Extraction Buffer [10× SOD Buffer 1 ml, 20% triton ×-100 0.2 ml, 증류수 8.8 ml, 200 mM PMSF 10 μ l] 을 넣고 30분간 5분 단위로 vortexing 해 준 후, 1,000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 실험에 이용하였다. SOD 함량 측정은 SOD determination kit (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 사용하며 SOD (U/mg protein)로 나타내었다.
- [0087] - 마우스 뇌 조직 중의 reduced GSH 함량 측정
- [0088] 마우스 뇌 조직 중의 reduced glutathione (GSH) 함량은 마우스 뇌에 10 volume의 phosphate buffer를 넣고 균질화한 후 15 분간 원심분리(10,000 g)하여 상등액을 얻어 실험에 사용하고, 이 상등액에 동일한 양의 5% metaphosphoric acid를 넣어 간섭효과를 주는 단백질을 2,000g에서 spin down하여 제거하였고, 다시 한 번 상등액을 얻어 0.26M tris-HCl (pH 7.8)과 0.65N NaOH, 1mg/ml 농도의 OPT (in methanol)을 넣고 15분간 상온에서 빛을 차단하여 반응시킨 후, 1분 간격으로 fluorescence strength를 측정하였다. Fluorescence는 fluorometer (infinite F200)을 이용하여 320nm (excitation filter)와 420nm (emission filter)의 파장에서 측정하였고, Reduced GSH의 함량은 표준곡선에 대입하여 나타내었다.
- [0089] - 마우스 뇌 조직 중의 AChE 활성 측정
- [0090] Behavioral test 종료 후, 마우스의 뇌를 적출하여 10 volume의 PSB를 넣고 Glass-Col homogenizer로 균질화한 후 12,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하였다. 그 상등액을 효소 실험을 위하여 사용하였다. 효소 5 μ l에 50mM sodium phosphate buffer 65 μ l을 넣고 37℃에서 15분간 pre-incubation 시킨 후, 반응 혼합물에 Ellman' reaction mixture 70 μ l를 첨가한 후 405nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 마우스 뇌 조직 중의 AChE 활성은 정상군 대비 % 활성으로 나타내었다.
- [0091] - 마우스 뇌 조직 중의 ACh 함량 측정
- [0092] 상등액에 alkaline hydroxylamine reagent [3.5 N sodium hydroxide and 2 M hydroxylamine in HCl]를 첨가하고 1분 동안 상온에서 반응 시킨 후, 0.5 N HCl (pH 1.2) 와 0.37 M FeCl₃ in 0.1 N HCl을 첨가하고 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.
- [0093] 통계처리는 Window 용 SAS 9.4 version을 이용하여 분산분석(analysis of variance)을 실시하며, Duncan의 다중범위 검정법 (Duncan' s multiple range test)으로 유의성을 검정하였다.
- [0094] [실험예 7-1] 마우스 뇌 조직 중의 malondialdehyde (MDA) 함량 측정
- [0095] 조직을 구성하는 세포에서의 과산화 현상은 세포막 주요구성 성분인 인지질을 구성하는 불포화지방산에 산소 유리기와 결합하여 생기게 되며, 과산화지질은 세포막의 불포화지방산과 지단백질에서 유리기와 연쇄 반응하여 부산물로 malondialdehyde (MDA)를 생산한다. MDA는 산화적 스트레스 시 뇌조직의 각 영역에서 증가하는 것으로 알려져 있다. 특히 뇌세포는 다른 장기에 비하여 불포화 지방산의 함량이 높아 산화적 손상을 받기 쉬우며, 뇌 신경세포에 산화적 스트레스를 가하게 되면 염증반응에 이은 신경독성을 일으켜 신경세포의 사멸이 촉진된다. 결국 이런 산화적 스트레스가 뇌 조직을 구성하는 세포에서의 과산화 현상은 세포막 주요구성 성분인 인지질을 내에서 지속되면 기억 손상 및 손실에 의한 장애를 일으킬 것으로 예상하고 있다. MDA 양의 감소는 치료의 항산화 작용으로 인해 산화적 스트레스가 감소한 결과로 해석할 수 있으며, 본 실험에서는 차씨오일을 섭취한 마우스의 뇌 조직에 존재하는 지질과산화 중간 생성물인 MDA의 함량을 비교해 보기 위해 각 그룹의 MDA 함량을 측정하여 도 10에 나타내었다. NC 그룹은 40.88 nmol/mg protein이었으며, A β 그룹은 이보다 증가한 54.52nmol/mg protein으로 나타났다. 실시예 1의 차씨오일을 섭취한 GTO 50과 GTO 100그룹의 MDA 함량은 각각 47.61, 44.63 nmol/mg protein으로 나타났고, 실시예 2의 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 GTOG 50과 GTOG 100 그룹의 MDA 함량은 각각 44.30, 37.55 nmol/mg protein으로 A β 그룹과 비교하였을 때 모두 MDA 생성을 억제하였다.
- [0096] [실험예 7-2] 마우스 뇌 조직 중의 superoxide dismutase (SOD) 함량 측정
- [0097] Superoxide dismutase (SOD)는 항산화 효소 중 하나로 세포에 존재하는 superoxide를 과산화수소로 전환시켜주는 효소로 SOD에 의해 생성된 과산화수소는 catalase나 peroxidase 등에 의하여 산소와 물 분자로 분해시켜 독성을 없애 주는 역할을 하여 생체를 보호하는 기능을 가지고 있다. 마우스의 뇌와 간을 적출하여 SOD의 활성

을 측정하여 그 결과를 도 11에 나타내었다. 뇌의 SOD 함량에서 A β 그룹은 NC 그룹(44.18 U/mg of protein) 대비 30.73 U/mg of protein으로 유의적인 차이가 나타났다. 이에 반해 실시예 1의 차씨오일을 섭취한 GTO 50과 GTO 100그룹은 각각 35.99 U/mg of protein과 38.84 U/mg of protein으로, 실시예 2의 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 GTOG 50과 GTOG 100 그룹은 각각 34.70 U/mg of protein과 44.26 U/mg of protein으로 나타나, A β 그룹에 비해 유의적인 차이가 나타났다.

[0098] [실험예 7-3] 마우스 뇌 조직 중의 reduced GSH 함량 측정

[0099] Hippocampus에서 reactive oxygen species (ROS)의 형성이 증가하며 A β 가 glutathione system의 변화를 유발하여 초기에 보상적 기전에 의해 산화형 glutathione이 증가하고 glutathione-S-transferase (GTS)의 활성이 감소하는 것으로 나타난다. 뇌 조직의 glutathione은 산화적 세포 손상에 대한 방어 작용을 나타내는 효소인 GSH-peroxidase와 GST의 기질로 사용되는 물질로 활성산소, 과산화지질 그리고 친전자성 물질들이 세포 내에서 최종적으로 무독화되는 과정에 관여하며 세포 내 지질과산화 물질과 이물질의 제거, 아미노산 수송 및 저장, 간 해독 등 다양한 기능을 수행한다. 본 실험에서는 차씨오일을 섭취한 마우스의 뇌 조직에 존재하는 환원형 GSH의 함량을 측정하여 도 12에 나타내었다. A β 그룹은 NC 그룹(2.79 μ g GSH/mg of protein)에 비해 2.02 μ g GSH/mg of protein로 감소되었고, 실시예 1의 차씨오일을 섭취한 GTO 50과 GTO 100그룹의 환원형 GSH 함량은 각각 2.14 μ g GSH/mg of protein, 3.22 μ g GSH/mg of protein으로, 실시예 2의 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 GTOG 50과 GTOG 100 그룹은 각각 2.54 μ g GSH/mg of protein, 3.48 μ g GSH/mg of protein로 나타나, A β 그룹과 비교하였을 때 모두 환원형 GSH의 함량이 증가하였다.

[0100] [실험예 7-4] 마우스 뇌 조직 중의 AChE 활성 측정

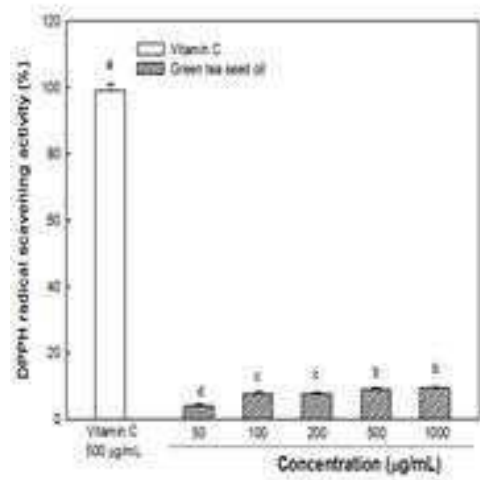
[0101] Acetylcholine (ACh)은 뇌조직의 모든 신경세포에서 발견되는 신경전달물질로서 시냅스와 시냅스 사이의 신경전달에 관계하는 중요한 신경전달물질로 알려져 있다. ACh의 합성과 분해에 관련된 효소로는 각각 choline acetyltransferase (ChAT)와 AChE가 있으며, 뇌조직의 신경전달이 원활하게 이루어지려면 ACh 수준에 영향을 미치는 ChAT 와 AChE 활성이 매우 중요하다. 그러나 AChE의 과도한 증가는 ACh의 함량을 감소시키고 amyloid 화합물의 신경독성을 증가시켜 치매가 유발될 가능성이 높아진다고 보고되어 있다. 이러한 이유로 퇴행성 치매 환자의 치료에 있어 AChE 효소를 억제해 ACh의 농도를 증가시키는 방법도 이용되고 있다. 본 실험에서는 차씨오일을 식이 하였을 때 AChE 활성 억제 정도를 측정하고자, 마우스의 뇌를 적출하여 각 군의 AChE 활성 정도를 측정하였다. A β 로 유도된 마우스의 뇌를 적출하여 AChE 활성을 측정한 결과를 도 13에 나타내었다. NC group의 활성을 100%로 나타내었고 이에 대비해 A β 그룹은 129.23%로 유의적인 차이가 나타났다. 이에 반해 실시예 1의 차씨오일을 섭취한 GTO 50과 GTO 100은 각각 121.89%와 111.32%로 나타났고, 실시예 2의 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 GTOG 50과 GTOG 100은 각각 114.34%와 106.13%로 보여, A β 그룹에 비해 유의적인 차이가 나타났다.

[0102] [실험예 7-5] 마우스 뇌 조직 중의 acetylcholine (ACh) 함량 측정

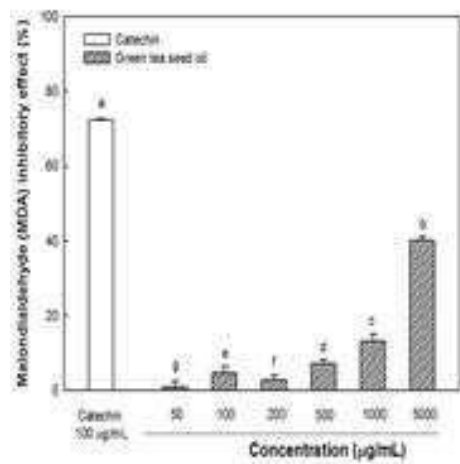
[0103] 뇌에서 신경전달 물질로 이용되는 ACh은 신경 말단에서 분비되며, 신경의 자극을 근육에 전달하는 화학물질이다. ACh가 분비되면 혈압강하, 심장박동억제, 장관 수축 등의 생리작용을 나타낸다. 신경 말단에서 분비된 ACh는 자극의 전달이 끝나면 ChAT에 의해 choline과 acetate로 분해된다. choline은 ChAT의 작용에 따라 효소적으로 합성되어 다시 ACh가 된다. A β 를 통해 인지기능 장애가 유발된 마우스의 뇌를 적출하여 ACh 함량을 측정한 결과를 도 14에 나타내었다. A β 그룹은 NC 그룹(3.52 mmole/mg of protein) 대비 2.81 mmole/mg of protein으로 유의적인 차이가 나타났다. 이에 반해 실시예 1의 차씨오일을 섭취한 GTO 50과 GTO 100은 각각 3.00 mmole/mg of protein과 3.09 mmole/mg of protein으로 나타났고, 실시예 2의 차씨오일과 마늘 침출물을 혼합한 혼합물을 섭취한 GTOG 50과 GTOG 100은 각각 2.86 mmole/mg of protein과 3.46 mmole/mg of protein으로 나타나 A β 그룹에 비해 유의적인 차이가 나타났다.

도면

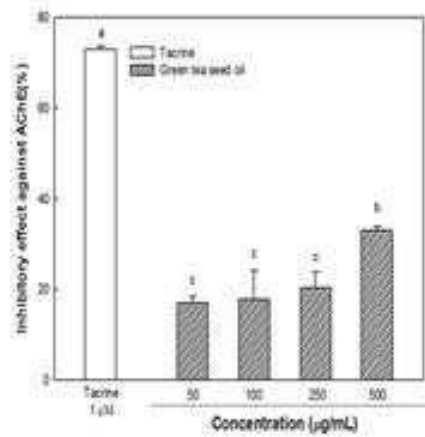
도면1



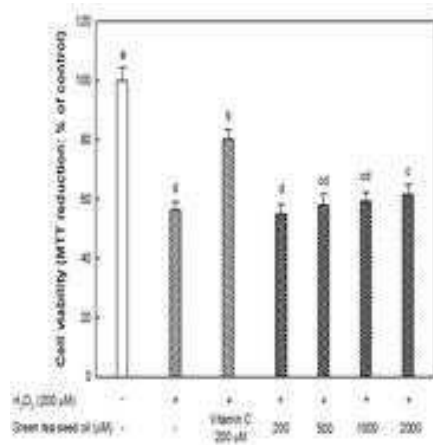
도면2



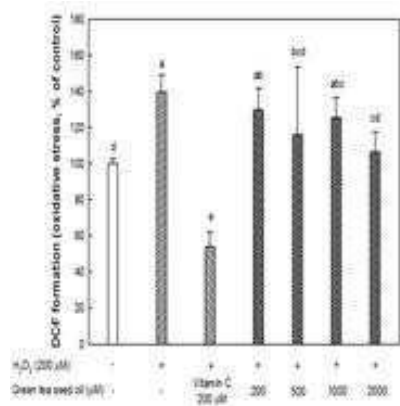
도면3



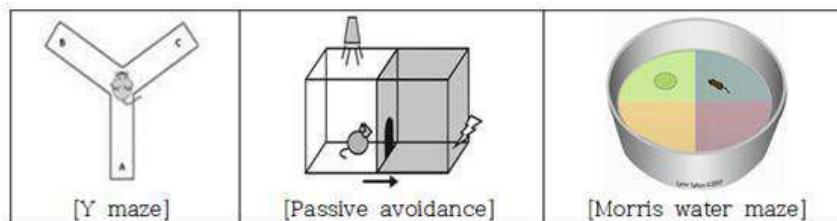
도면4



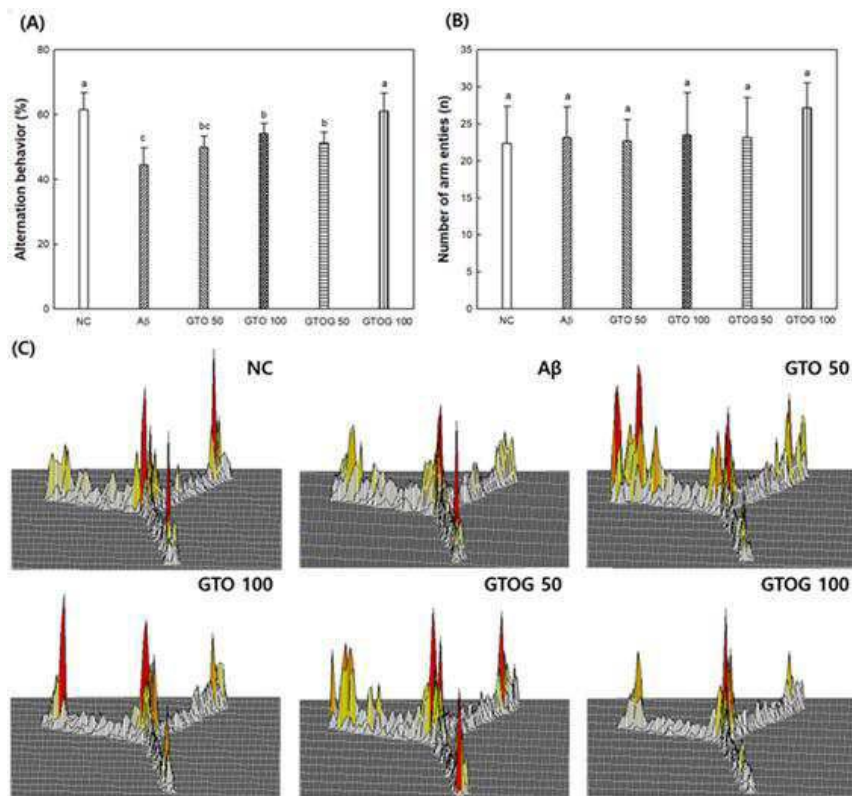
도면5



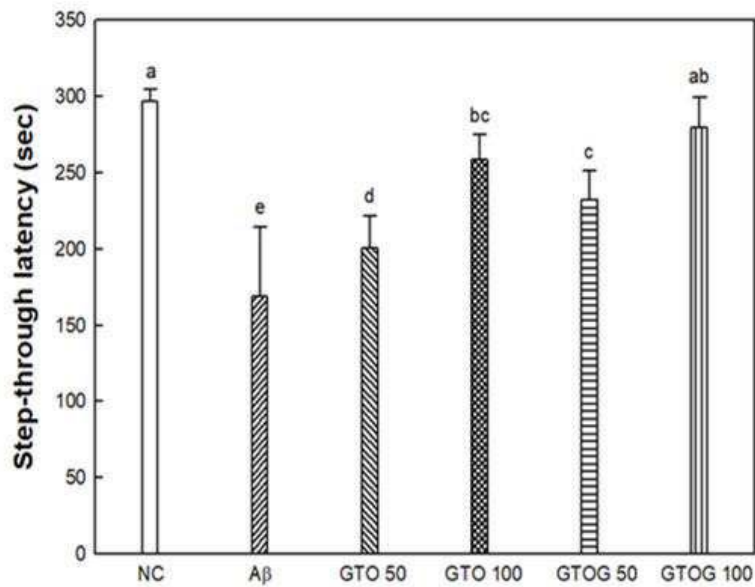
도면6



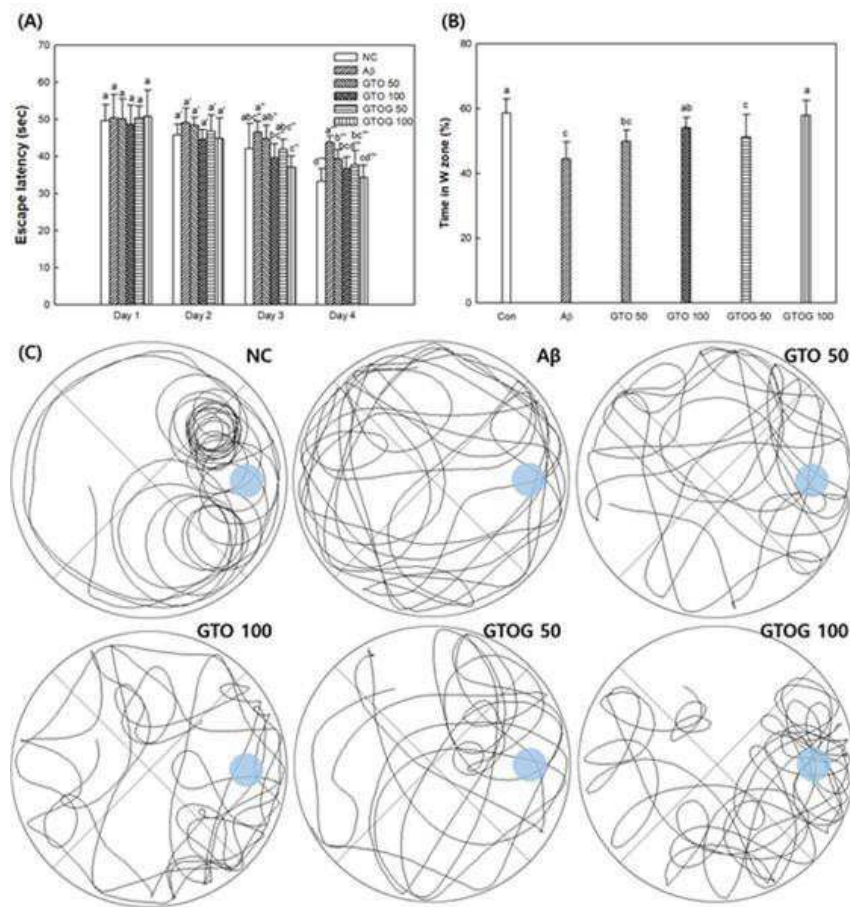
도면7



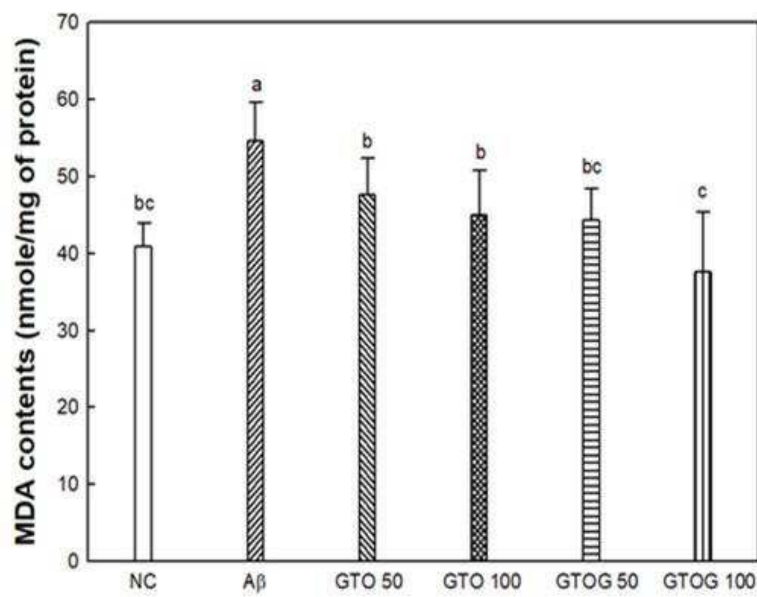
도면8



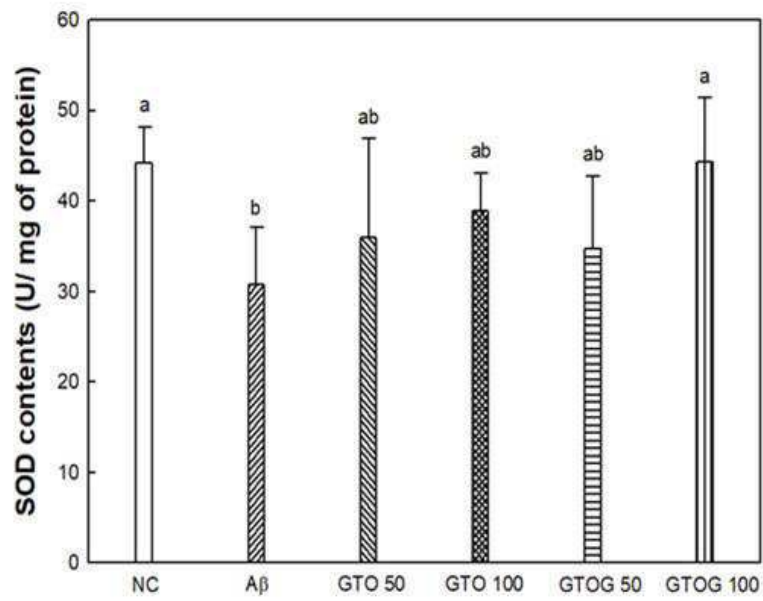
도면9



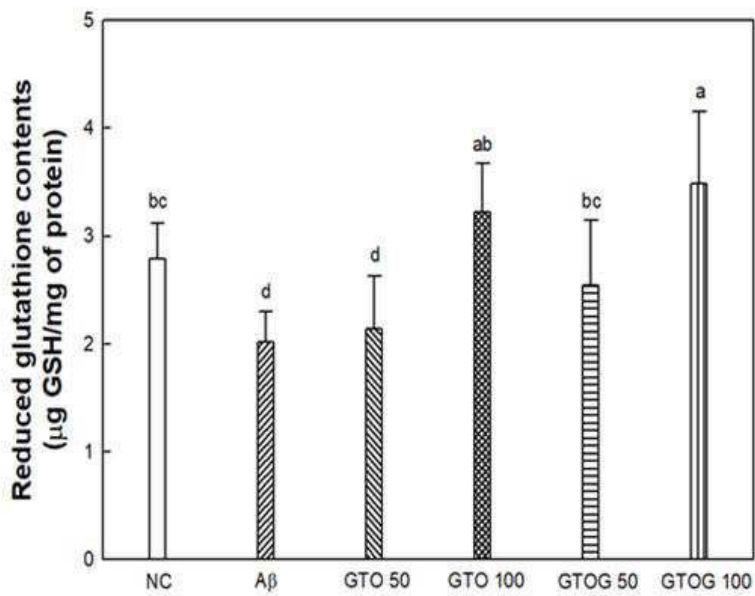
도면10



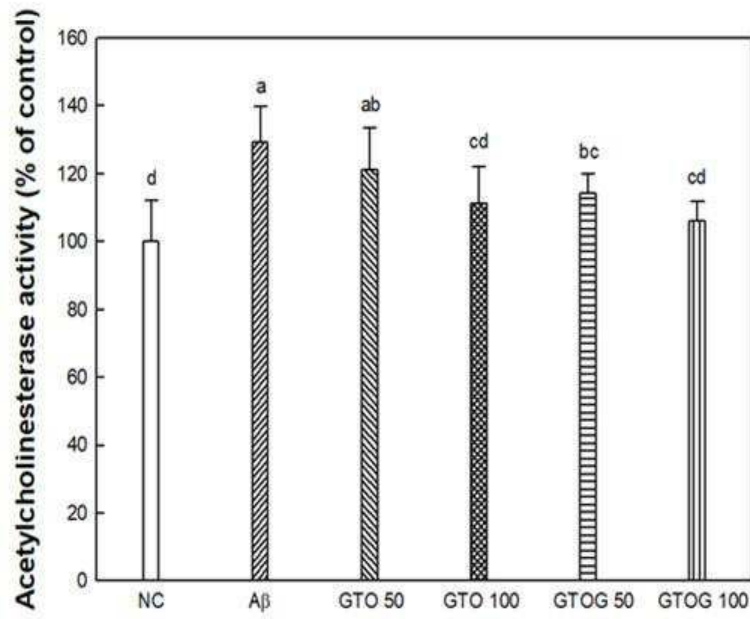
도면11



도면12



도면13



도면14

