



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년06월20일
(11) 등록번호 10-1991434
(24) 등록일자 2019년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) A23L 19/10 (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01) A23L 5/30 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 19/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0010759
(22) 출원일자 2018년01월29일
심사청구일자 2018년01월29일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130085935 A*
KR1020150092961 A*
KR1020150092978 A*
KR1020160013731 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
건양대학교 산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
조현정
대전광역시 중구 계룡로 922 남광하우스토리2차 202동 1203호
최나은
충청남도 아산시 배방읍 용연로 53, 용연마을 40 3동 1302호
류진협
대전광역시 중구 계룡로 922 남광하우스토리2차 202동 1203호
(74) 대리인
특허법인도담, 김대영

전체 청구항 수 : 총 1 항

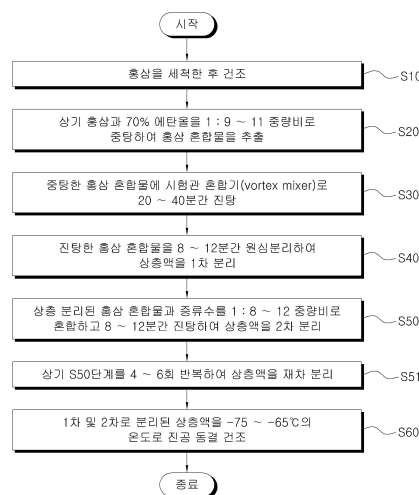
심사관 : 염금희

(54) 발명의 명칭 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법

(57) 요약

본 발명의 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법은 홍삼을 세척한 후 건조하는 S10단계;와, 상기 홍삼과 70% 에탄올을 1 : 9 ~ 11 중량비로 중탕하여 홍삼 혼합물을 추출하는 S20단계;와, 중탕한 홍삼 혼합물에 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20 ~ 40분간 진탕하는 S30단계;과, 진탕한 홍삼 혼합물을 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 S40단계;와, 상층 분리된 홍삼 혼합물과 증류수를 1 : 8 ~ 12 중량비로 혼합하고 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 S50단계; 및 1차 및 2차로 분리된 상층액을 -75 ~ -65℃의 온도로 진공 동결 건조하는 S60단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 29/065 (2016.08)

A23L 5/32 (2016.08)

A23L 5/34 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2300/10 (2013.01)

A23Y 2220/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017-B-G014-010109

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 산학공동기술개발지원사업

연구과제명 천연물을 이용한 인지기능개선 물질 개발

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교산학협력단

연구기간 2017.08.01 ~ 2018.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

홍삼을 세척한 후 건조하는 S10단계;

상기 홍삼과 70% 에탄올을 1 : 9 ~ 11 중량비로 중탕하여 홍삼 혼합물을 추출하는 S20단계;

중탕한 홍삼 혼합물에 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20 ~ 40분간 진탕하는 S30단계;

진탕한 홍삼 혼합물을 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 S40단계;

상층 분리된 홍삼 혼합물과 증류수를 1 : 8 ~ 12 중량비로 혼합하고 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 S50단계; 및

1차 및 2차로 분리된 상층액을 -75 ~ -65℃의 온도로 진공 동결 건조하는 S60단계;

상기 진공 동결건조한 홍삼 추출물에 식용발효 락토바실러스속을 혼합한 미생물 혼합액을 $0.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ cfu/g 농도로 투입하는 S70단계;

미생물이 투입된 홍삼 추출물을 밀폐된 발효실에서 30 ~ 35℃의 온도범위로 3 ~ 7일간 발효하는 S80단계; 및

발효된 홍삼추출물을 건조한 후 액상의 용매를 첨가하여 5 ~ 50%(w/v) 농도로 재구성하는 S90단계;를 포함하고,

상기 S50단계를 4 ~ 6회 반복하여 상층액을 재차 분리하는 S51단계를 더 포함하며,

상기 S20단계는, 상기 홍삼을 잘게 자른 후, 초음파를 이용해 100℃의 온도에서 100kHz의 조건으로 60분간 초음파 처리하여 홍삼의 입자를 균질화 시킨 후, 마이크로웨이브로 20분 동안 1000W의 세기로 홍삼에 포함된 Rg3함량을 증가시킨 홍삼과 70% 에탄올을 1 : 9 ~ 11 중량비로 중탕하는 것을 특징으로 하는 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 홍삼으로부터 세포독성이 없으면서 알콜로부터 세포사멸에 대한 보호 효과와 인지기능 개선효과 및 대표적인 치매 원인 단백질의 생성을 억제함으로써 항치매 개선 효능을 나타내는 추출물을 생성할 수 있는 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 심혈관 및 뇌혈관계 질환은 인간의 건강과 생명을 위협하는 주요 질환으로서 이들 질환은 높은 사망률, 높은 치사율, 높은 회복불능성 및 높은 재발률을 수반하는 것을 특징으로 한다. 최근의 통계 자료에 따르면, 중국내 심혈관 및 뇌혈관계 질환으로 인한 사망이 매해 사망자수의 약 절반에 달하고 있다.
- [0003] 심혈관 및 뇌혈관계 질환의 대중성은 사회의 발전 및 생활수준의 향상과 밀접한 관계가 있으며, 심적 압박감, 부적절한 식습관, 운동부족, 과도한 흡연과 음주, 비만 등은 모두 심혈관 및 뇌혈관계 질환의 원인이다.
- [0004] 특히 치매(dementia)는 뇌의 위축과 신경세포의 감소 및 노인 반(senile plaque)의 출현으로 인한 뇌신경의 비가역적인 파괴가 원인이 되어 기억력과 언어장애, 행동장애 등의 다양한 후천적 인지기능 장애 증상을 수반하는 증후군을 일컫는다.
- [0005] 치매는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 혈관성 치매 및 파킨슨 질환에 의한 퇴행성 질환, 갑상선 기능 감소증에 의한 대사성 질환, 뇌종양 또는 감염성 질환 등에 기인하는 기타 치매로 분류된다.
- [0006] 알츠하이머 질환자의 뇌 조직에서는 신경세포 주위에서 생성되는 노인 반과 세포내부에서 생성되는 neurofibrillary tangle과 같은 병리학적 특징을 관찰할 수 있다. Neurofibrillary tangle은 tau 단백질의 과인산화에 의하여 형성되며, 노인 반은 세포 밖으로 분비된 β -amyloid($A\beta$)가 신경세포 주변에서 응집되어 형성된다.
- [0007] 알츠하이머 질환은 familial type과 sporadic type으로 분류되며, 전체 질환의 90% 이상이 주로 65세 이상의 노인에게 나타나는 sporadic type이다. 발병원인으로는 familial type의 경우, amyloid precursor protein(APP), presenilin 1, presenilin 2 등의 유전자에 돌연변이가 알려져 있으며 sporadic type의 경우는 그 원인이 노화 및 ApoE4 대립형질인 것으로 보고되었다. $A\beta$ 의 축적에 의한 노인 반은 familial type과 sporadic type 모두에서 공통적으로 나타나는 병리현상이다. $A\beta$ 는 베타 아밀로이드 전구 단백질인 APP(Amyloid precursor protein)가 2 종류의 protease에 의해 분해되어 생기는데, 아미노 말단을 절단하는 것이 β -secretase, 카르복시 말단을 절단하는 것이 γ -secretase이다. 알츠하이머 질환 치료제 개발을 위한 표적 중 하나인 γ -secretase는 presenilin(PS), nicastrin, anterior pharynx defective gene의 단백질 산물인 APh-1, presenilin enhancer gene의 단백질 산물인 PEN-2 등으로 이루어진 complex 구조로 존재한다. 그러나 이 효소는 Notch1, APLP1, ErbB4, Jagged, CD44 등 많은 물질을 기질로 반응하므로 APP 특이적인 저해제를 개발해야하는 문제점을 안고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2004-0087352호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은, 홍삼으로부터 세포독성이 없으면서 알코올 치매 개선 효능을 나타내는 추출물을 생성할 수 있는 알코올성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 특징에 따르면, 제 1발명은, 알코올성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법에 관한 것으로, 이를 위해 홍삼을 세척한 후 건조하는 S10단계;와, 상기 홍삼과 70% 에탄올을 1 : 9 ~ 11 중량비로 중탕하여 홍삼 혼합물을 추출하는 S20단계;와, 중탕한 홍삼 혼합물에 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20 ~ 40분간 진탕하는 S30단계;과, 진탕한 홍삼 혼합물을 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 S40단계;와, 상층 분리된 홍삼 혼합물과 증류수를 1 : 8 ~ 12 중량비로 혼합하고 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 S50단계; 및 1차 및 2차로 분리된 상층액을 -75 ~ -65℃의 온도로 진공 동결 건조하는 S60단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0011] 또한 상기 S50단계를 4 ~ 6회 반복하여 상층액을 재차 분리하는 S51단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0012] 삭제
- [0013] 상기 S60단계 이후, 상기 진공 동결건조한 홍삼 추출물에 물을 첨가하여 5~ 50%(w/v) 농도로 재구성하는 S70단계;를 더 포함한다.
- [0014] 삭제
- [0015] 상기 S60단계 이후, 상기 진공 동결건조한 홍삼 추출물에 식용발효 락토바실러스속을 혼합한 미생물 혼합액을 $0.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ cfu/g 농도로 투입하는 S70단계;와, 미생물이 투입된 홍삼 추출물을 밀폐된 발효실에서 30 ~ 35℃의 온도범위로 3 ~ 7일간 발효하는 S80단계; 및 발효된 홍삼추출물을 건조한 후 액상의 용매를 첨가하여 5~ 50%(w/v) 농도로 재구성하는 S90단계;를 더 포함한다.
- [0016] 삭제
- [0017] 상기 S20단계는 상기 홍삼을 잘게 자른 후, 초음파를 이용해 100℃의 온도에서 100kHz의 조건으로 60분간 초음파 처리하여 홍삼의 입자를 균질화 시킨 후, 마이크로웨이브로 20분 동안 1000W의 세기로 홍삼에 포함된 Rg3함량을 증가시킨 홍삼과 70% 에탄올을 1 : 9 ~ 11 중량비로 중탕한다.
- [0018] 삭제

발명의 효과

- [0019] 본 발명의 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법에 따르면, 홍삼으로부터 세포독성이 없으면서 알코올 치매 개선 효능을 나타내는 추출물을 생성할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명의 제 1실시예에 따른 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법의 순서도,
 도 2는 본 발명의 제 2실시예에 따른 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법의 순서도,
 도 3은 본 발명의 제 3실시예에 따른 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법의 순서도,
 도 4는 알코올성 치매모델 rat의 행동실험에서 Rg3-KRG의 효과를 나타내는 그래프,
 도 5는 알코올성 치매를 유도한 rat의 뇌조직에서 Rg3-KRG의 치매 원인 단백질 생성억제 효과를 나타내는 그래프,
 도 6은 알코올성 치매를 유도한 rat의 뇌조직에서 Rg3-KRG의 Apoptosis 연관 단백질 생성억제 효과를 나타내는 그래프,
 도 7은 알코올성 치매를 유도한 rat의 혈장에서 Rg3-KRG의 간보호 효과를 나타내는 그래프,
 도 8은 알코올 처리한 신경세포(PC12) 생존률에서 Rg3-KRG의 효과를 나타내는 그래프,
 도 9는 알코올 처리한 신경세포(PC12)의 Bcl-2, BID, Bax, Caspase-3 level에서 Rg3-KRG의 효과를 나타내는 그래프,
 도 10은 알코올 처리한 신경세포(PC12)의 세포사멸에서 Rg3-KRG의 효과를 나타내는 그래프,
 도 11은 알코올과 아밀로이드 베타 올리고머를 처리한 신경세포(PC12)의 세포 생존률에서 Rg3-KRG의 효과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하의 본 발명의 목적들, 다른 목적들, 특징들 및 이점들은 첨부된 도면과 관련된 이하의 바람직한 실시예들을 통해서 쉽게 이해될 것이다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다.
- [0022] 오히려, 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.
- [0023] 여기에 설명되고 예시되는 실시예들은 그것의 상보적인 실시예들도 포함한다.
- [0024] 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 '포함한다(comprise)' 및/또는 '포함하는(comprising)'은 언급된 구성요소는 하나 이상의 다른 구성요소의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.
- [0025] 아래의 특정 실시예들을 기술하는데 있어서, 여러가지의 특정적인 내용들은 발명을 더 구체적으로 설명하고 이해를 돕기 위해 작성되었다. 하지만 본 발명을 이해할 수 있을 정도로 이 분야의 지식을 갖고 있는 독자는 이러한 여러 가지의 특정적인 내용들이 없어도 사용될수 있다는 것을 인지할 수 있다. 어떤 경우에는, 발명을 기술하는 데 있어서 흔히 알려졌으면서 발명과 크게 관련 없는 부분들은 본 발명을 설명하는 데 있어 혼돈을 막기 위해 기술하지 않음을 미리 언급해 둔다.
- [0027] 이하에서는 본 발명에 따른 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법에 관하여 첨부되어진 도면과 함께 더불어 상세히 설명하기로 한다.
- [0028] 도 1은 본 발명의 제 1실시예에 따른 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법의 순서도이고, 도 2는 본 발명의 제 2실시예에 따른 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법의 순서도이고, 도 3은 본 발명의 제 3실시예에 따른 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법의 순서도이다.
- [0029] 먼저 제 1실시예는 도 1에 도시된 바와 같이, 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물 제조방법은 크게 다섯가지의 주요 단계로 구분된다.
- [0030] 상기 S10단계는 홍삼을 2회 이상 세척한 후 건조하는 단계이다.
- [0031] S20단계는 상기 홍삼과 에탄올을 1 : 9 ~ 11 중량비로 중탕하여 홍삼 혼합물을 추출하는 단계로서, 이 때 사용되는 에탄올은 70% 수용액인 것을 사용한다. 보다 바람직하게는 상기 홍삼을 잘게 자른 후, 초음파를 이용해 100℃의 온도에서 100kHz의 조건으로 60분간 초음파 처리하여 홍삼의 입자를 균질화 시킨 후, 마이크로웨이브로 20분 동안 1000W의 세기로 홍삼에 포함된 Rg3함량을 증가시킨 홍삼과 70% 에탄올을 1 : 9 ~ 11 중량비로 중탕하였다.
- [0032] S30단계는 중탕한 홍삼 혼합물에 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20 ~ 40분간 진탕하는 단계이다. 여기서 진탕(shaking)이란 시료로부터 분석성분을 추출하기 위하여 일정한 속도로 흔들리게 하는 것을 의미한다.
- [0033] S40단계는 진탕한 홍삼 혼합물을 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 단계이다.
- [0034] S50단계는 상층 분리된 홍삼 혼합물과 증류수를 1 : 8 ~ 12 중량비로 혼합하고 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 단계이다.
- [0035] 바람직하게는 상기 2차 분리하는 S50단계를 2 ~ 6회 반복하여 상층액을 분리하는 S51단계를 더 포함하게 되며, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 S40단계에서 원심분리기를 사용하여 1800 x g 에서 10분간 원심 분리하여 상층을 분리하고 증류수를 첨가한 뒤 재 진탕, 원심분리를 총 5회 반복하였다. 이때, 상층액 분리작업이 총 6회를 초과하면 회석이 과도하게 되어 효과를 발휘하기 어렵고 오히려 이전에 분리된 상층액을 회석시키기 때문에 바람직하지 않다.
- [0036] 이후 S60단계에서는 1차 및 2차로 분리된 상층액을 -75 ~ -65℃의 온도 조건에서 진공 동결건조하는 단계로서, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 Freeze dryer (Ilshin BioBase)를 이용하여 - 70 ℃에서 진공 동결 건조하여 알콜성 치매 개선용 홍삼 추출물을 수득하였다.
- [0037] 제 2실시예는 도 2와 같이, 제 1실시예를 포함하며, 다만 상기 S60단계 이후, 상기 진공 동결건조한 홍삼 추출물에 물을 첨가하여 5~ 50%(w/v) 농도로 재구성하는 S70단계를 포함하여 이루어질 수 있다. 이와 같은 과정을 통해 생성되는 홍삼 추출물의 수득률은 4.7±1.0% 정도이다.
- [0038] 제 3실시예는 도 3과 같이, 제 1실시예를 포함하며, 다만 상기 S60단계 이후, 상기 진공 동결건조한 홍삼 추출

물에 식용발효 락토바실러스속을 혼합한 미생물 혼합액을 $0.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ cfu/g 농도로 투입하는 S70단계와, 미생물이 투입된 홍삼 추출물을 밀폐된 발효실에서 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 의 온도범위로 3 ~ 7일간 발효하는 S80 단계 및 발효된 홍삼추출물을 건조한 후 액상의 용매를 첨가하여 5 ~ 50%(w/v) 농도로 재구성하는 S90단계를 더 포함할 수 있다.

[0040] 이하에서는 본 발명에 의해 제조된 Rg3를 갖는 홍삼 추출물(KOREAN RED GINSENG EXTRACT: 이하 Rg3-KRG로 칭하기로 한다.)에 대한 효과를 검증하기 위한 실험방법과 결과를 설명한다.

[0042] **A. 알코올성 치매를 유도한 rat의 행동실험에서 Rg3-KRG의 효과**

[0043] (1) 실험방법

[0044] 1) 알코올성 치매 모델 구현

[0045] 코아텍 (대한민국, 평택)에서 구입한 SD Rat (8 week-old, male)을 사용하였고 6주간 투여하였다. Control group, Alcohol group, Alcohol + Rg3-KRG group으로 나누어 진행하였다. Alcohol group은 6주 동안 2g/kg의 농도로 매일 경구투여 하였다. Rg3-KRG group은 3주간 alcohol(2g/kg)을 경구투여한 후 행동실험을 통해 치매가 유도되었음을 확인하고 alcohol과 Rg3-KRG(600mg/kg)를 3주 동안 동시 투여하였다

[0046] 2) Y-maze

[0047] Y-maze 검사는 실험동물의 단기 기억형태의 순간 공간 기억 평가를 위해서 많이 이용되는 방법이다. Y자형 미로에서 일정 시간동안(8분) 자유롭게 움직이게 하고, 들어간 통로의 순서를 기록한다. 직전에 들어가지 않았던 새로운 통로에 들어가는 비율로 변경행동력(Alternation behavior)을 측정한다.

[0048] (2) 실험결과

[0049] 도 4와 같이, 시험물질 투여 3주, 6주 후의 Rg3-KRG에 의한 인지기능 개선효과를 측정하였다. Alcohol (2g/kg)을 3주간 경구투여 한 결과, 변경행동력이 응집물은 Control group 대비 21.4% 감소하였다. 이를 통해 알코올을 통해 치매가 유도되었음을 확인할 수 있다. 2차 Y-maze 시험 결과, Alcohol+Rg3-KRG group 변경행동력이 Alcohol group 대비 28.6%로 증가하였다. 따라서 Rg3-KRG가 인지기능 개선효과가 있음이 증명된다.

[0051] **B. 알코올성 치매를 유도한 rat의 뇌조직에서 Rg3-KRG의 치매 원인 단백질 생성억제 효과**

[0052] (1) 실험방법

[0053] Rg3-KRG의 치매 관련 단백질을 생성 억제 효과를 확인하기 위해서 Western blot 실험 기법을 이용하였다. 모든 투여가 끝난 후, 부검을 통해 brain을 적출한다. 적출 후 frontal cortex, cerebral cortex, hippocampus, striatum, olfactory bulbs, cerebellum으로 절개한다. 절개 된 조직은 RIPA buffer로 조직 내 단백질을 용출시킨다. BCA 단백질 정량법을 수행하여 $10\mu\text{g}$ 에 해당하는 단백질을 western sample buffer와 혼합하여 5분간 끓는 물에서 끓인다. 그 후 100V의 전압으로 전기영동을 실시한다. 전기영동 후에는 PVDF membrane에 350mA의 전류로 2시간 동안 transfer 한다. Transfer가 끝난 membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 blocking 과정을 거친 후 TBST buffer로 30분 washing한다. 1차 항체를 TBST buffer에 희석하여 membrane과 12시간 반응시킨다. TBST로 30분 washing 후 2차 항체와 1시간 반응시킨다. 마지막으로 ECL solution과 반응시켜 Fusion SL imaging systems (Vilber Lourmat, France)로 developing한다.

[0054] (2) 실험결과

[0055] 도 5와 같이, 시험물질 투여 6주 후의 Rg3-KRG에 의한 뇌조직 내의 치매 원인 단백질 억제 효과를 측정하였다. 뇌 조직은 인지기능과 기억을 담당하는 Hippocampus와 Frontal cortex을 선정하였다. 치매의 원인이 되는 단백질로는 대표적으로 Amyloid beta oligomer와 Amyloid beta fibril이 있다. 그래프로 나타낸 바와 같이 알코올만 섭취한 그룹은 Control 그룹 대비 해당 단백질이 증가하였다. 그에 비해 Rg3-KRG 그룹은 알코올 단독 섭취한 그룹에 비해 유의적으로 감소하는 경향이다. 따라서 Rg3-KRG가 대표적인 치매 원인 단백질의 생성을 억제함으로써 항치매 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0057] **C. 알코올성 치매를 유도한 rat의 뇌조직에서 Rg3-KRG의 Apoptosis 연관 단백질 생성억제 효과**

[0058] (1) 실험방법

[0059] Rg3-KRG의 Apoptosis 연관 단백질 생성 억제 효과를 확인하기 위해서 Western blot 실험 기법을 이용하였다.

모든 투여가 끝난 후, 부검을 통해 brain을 적출한다. 적출 후 frontal cortex, cerebral cortex, hippocampus, striatum, olfactory bulbs, cerebellum으로 절개한다. 절개 된 조직은 RIPA buffer로 조직 내 단백질을 용출시킨다. BCA 단백질 정량법을 수행하여 10 μ g에 해당하는 단백질을 western sapmle buffer와 혼합하여 5분간 끓는 물에서 끓인다. 그 후 100 V의 전압으로 전기영동을 실시한다. 전기영동 후에는 PVDF membrane에 350mA의 전류로 2시간 동안 transfer 한다. Transfer가 끝난 membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 blocking 과정을 거친 후 TBST buffer로 30분 washing한다. 1차 항체를 TBST buffer에 희석하여 membrane과 12시간 반응시킨다. TBST로 30분 washing 후 2차 항체와 1시간 반응시킨다. 마지막으로 ECL solution과 반응시켜 Fusion SL imaging systems (Vilber Lourmat, France)로 developing한다.

[0060] (2) 실험결과

[0061] 도 6과 같이, 비정상적으로 축적된 Amyloid beta는 결국 신경세포의 Apoptosis를 일으킨다. 따라서 뇌조직의 Apoptosis signal을 확인해보았다. Bcl-2는 다른 유전자와 달리 Apoptosis를 억제시키는 기능이 있다. Bid와 Caspase3는 Apoptosis에 필수적인 대표 유전자이다. 이 유전자들의 단백질 발현 정도를 확인한 결과, Bcl-2는 Hippocampus와 Frontal cortex에서 알코올 그룹에서 감소하였고 Rg3-KRG 그룹에서 증가하는 양상을 보였다. Bid와 Caspase3는 알코올 그룹에서 증가하였고 Rg3-KRG 그룹에서 감소하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 Rg3-KRG가 뇌조직의 Apoptosis signal을 억제함으로써 알코올에 의한 신경세포의 사멸을 감소시키는 것을 의미한다.

[0063] D. 알코올성 치매를 유도한 rat의 혈장에서 Rg3-KRG의 간보호 효과

[0064] (1) 실험방법

[0065] 6주간의 시험물질 투여가 끝난 rat의 복대정맥에서 전혈을 채혈하여 원심분리한다 (1500 rpm, 10 min). 간기능 검사인 ALT, AST(아산제약)에 분리된 상층액(혈장)을 사용한다. ALT, AST 측정용 기질액 1mL를 시험관에 취해 37도의 항온수조에서 5분간 가온한다. 여기에 혈장을 0.2mL를 첨가하여 혼합해 37도의 항온수조에 넣어 정확히 30분간 가온한다. 항온수조에서 꺼내 정색시약 1mL를 가해 살며시 흔들어 섞어 실온에 20분간 방치한다. 이어서 수산화나트륨용액을 정제수로 정확히 10배로 희석한액을 10mL 가하여, 마개를 해전도 혼합하여 실온에 10분간 방치한다. 광전비색계를 사용하여 505nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 별도로 작성한 표준곡선에 의해 GOT, GPT의 단위를 구한다.

[0066] (2) 실험결과

[0067] 도 7과 같이, 알코올을 과도하게 섭취하였을 때 간기능수치인 ALT와 AST는 증가한다. 알코올 단독 섭취한 그룹에서는 ALT와 AST 모두 증가하였고 Rg3-KRG 그룹에서 감소하였다. 이는 Rg3-KRG가 간보호 효과가 있음을 의미한다.

[0069] E-1. 알코올 처리한 신경세포(PC12)에서 Rg3-KRG가 신경세포사멸에 미치는 영향

[0070] (1) 실험방법

[0071] PC12 세포 생존율 측정은 96 well plate에 1 $\times$ 10⁴ cells/well의 농도가 되도록 조절한 후 24시간 동안 배양하여 안정화를 시행한다. 24시간 후 well에 배지를 모두 제거하고, (A)는 알코올을 다양한 농도로 24시간 처리하였고, (B)는 Rg3-KRG를 0.5, 1 μ g/mL의 농도로 6시간 처리하였다. (C)는 Rg3-KRG가 최종 농도로 0.5, 1 μ g/mL이 되도록 배양액에 희석하여 세포주에 처리한 후 6시간 동안 배양한다. 6시간 후 대조군을 제외한 well에 5% alcohol을 24시간 처리하였다. 시험물질 처리 후, 각 well에 배지를 제거하고 MTT용액 (대일랩서비스) 10 μ L와 DMEM 배지 90 μ L씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 30분 한다. 그 후, Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한다

[0072] (2) 실험결과

[0073] 도 8과 같이, 그래프는 PC12 cell에 알코올을 농도별로 처리한 결과이다. 그 결과, 알코올 농도의존적으로 세포 생존률이 감소하였다. 이 결과는 알코올이 PC12 cell의 생존률에 농도의존적으로 영향이 있음을 의미한다. (B) 그래프는 Rg3-KRG의 PC12 cell에 대한 독성 여부를 확인한 결과이다. 그 결과 모든 농도에서 Rg3-KRG 자체독성을 보이지 않았다. 따라서 실험에 적합한 농도임을 확인하였다. (C) 그래프는 Rg3-KRG를 농도별로 처리한 후 Alcohol을 처리한 결과이다. 그 결과 Rg3-KRG를 선처리한 그룹의 세포 생존률이 알코올 단독 처리한 그룹에 비해 농도의존적으로 증가하였다. 이를 통해 알코올에 의한 세포 사멸에 Rg3-KRG가 보호 효과가 있음을 알 수 있다.

[0075] **E-2. 알코올 처리한 신경세포(PC12)에서 Rg3-KRG가 신경세포사멸에 미치는 영향**

[0076] (1) 실험방법

[0077] 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 농도가 되도록 조절한 후 24시간 동안 배양하여 안정화를 시행한다. 24시간 후 well에 배지를 모두 제거하고, Rg3-KRG가 최종 농도로 0.5, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 배양액에 희석하여 세포주에 처리한 후 6시간 동안 배양한다. 6시간 후 대조군을 제외한 well에 5% alcohol을 처리하였다. 24시간 후 배지를 모두 제거한다. cell을 떼어내기 위해 0.25% trypsin/EDTA를 3분 처리하고 반응을 정지시키기 위해 0.25% trypsin/EDTA의 3배에 해당하는 DMEM 배지를 추가한다. 각 well의 cell을 E-tube에 수집하고 원심분리(1000 rpm, 3 min)를 실시한다. 원심분리 후 상층액을 버리고 pellet(cell)을 PBS로 wash한 후 동일한 조건으로 원심분리한다. 원심분리 후 상층액을 버리고 1X protease inhibitor가 첨가된 RIPA buffer $100 \mu\text{l}$ 첨가하여 세포 내 단백질을 용출시킨다. Pellet이 완전히 풀리면 원심분리(10000g, 10 min)하여 상층액만 사용한다. BCA 단백질 정량법을 수행하여 $10 \mu\text{g}$ 에 해당하는 단백질을 western sample buffer와 혼합하여 5분간 끓는 물에서 끓인다. 그 후 100 V의 전압으로 전기영동을 실시한다. 전기영동 후에는 PVDF membrane에 350mA의 전류로 2시간 동안 transfer 한다. Transfer가 끝난 membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 blocking 과정을 거친 후 TBST buffer로 30분 washing한다. 1차 항체를 TBST buffer에 희석하여 membrane과 12시간 반응시킨다. TBST로 30분 washing 후 2차 항체와 1시간 반응시킨다. 마지막으로 ECL solution과 반응시켜 Fusion SL imaging systems (Vilber Lourmat, France)로 developing한다.

[0078] (2) 실험결과

[0079] 도 9와 같이, Rg3-KRG 선처리 후 alcohol 처리한 cell을 수득하여 apoptosis 연관 gene의 단백질 발현 정도를 western blot으로 확인한 결과이다. (A)는 anti-apoptosis signal인 Bcl-2 발현양상을 확인한 결과이다. PC12 cell에 알코올만 처리하였을 때는 증가하였고 Rg3-KRG를 선처리 하였을 때는 농도의존적으로 증가하였다. (B), (C), (D)는 대표적인 apoptosis signal로 세포가 사멸할 때 증가하는 유전자이다. BID, Bax, Caspase3의 발현 양상은 알코올 단독 처리한 세포에서 증가하였고 Rg3-KRG를 선처리 한 후 알코올을 처리한 세포에서는 농도의존적으로 감소하는 양상을 보였다. 따라서 이는 Rg3-KRG가 알코올에 의한 세포사멸을 감소시킴을 의미한다.

[0081] **E-3. 알코올 처리한 신경세포(PC12)에서 Rg3-KRG가 신경세포사멸에 미치는 영향**

[0082] (1) 실험방법

[0083] 6 well plate에 3×10^5 cells/well의 농도가 되도록 조절한 후 24시간 동안 배양하여 안정화를 시행한다. 24시간 후 well에 배지를 모두 제거하고, Rg3-KRG가 최종 농도로 0.5, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 배양액에 희석하여 세포주에 처리한 후 6시간 동안 배양한다. 6시간 후 대조군을 제외한 well에 5% alcohol을 처리하였다. 24시간 후 배지를 모두 제거한다. cell을 떼어내기 위해 0.25% trypsin/EDTA를 3분 처리하고 반응을 정지시키기 위해 0.25% trypsin/EDTA의 3배에 해당하는 DMEM 배지를 추가한다. 각 well의 cell을 E-tube에 수집하고 원심분리(1000rpm, 3min)를 실시한다. 원심분리 후 상층액을 버리고 pellet을 PBS로 wash한 후 동일한 조건으로 원심분리한다. 원심분리 후 상층액을 1X Annexin binding buffer를 1ml 넣어 cell을 풀어준 후 원심분리 후 상층액을 버린다. $100 \mu\text{l}$ 의 1X Annexin binding buffer를 넣어 다시 풀어주고 $5 \mu\text{l}$ 의 Annexin V Alexa Fluor 488을 넣어주고 암실에서 20분 방치한다. 원심분리 후 $100 \mu\text{l}$ 의 1X Annexin binding buffer를 넣어 다시 풀어주고 $1 \mu\text{l}$ 의 Propidium Iodide를 넣고 잘 섞어준 후 암실에서 1~5분 정도 방치한다. Flow cytometry (ACEA Biosciences)로 분석한다

[0084] (2) 실험결과

[0085] 도 10과 같이, Annexin V-FITC와 PI 염색을 통해, Apoptosis가 일어난 세포를 검출할 수 있다. control (2.54%)에 비해 알코올 단독 처리 cell (7.54%)에서 apoptotic cell이 증가하였다. 반면 Rg3-KRG를 선처리 한 cell에서는 농도의존적으로 apoptotic cell이 감소하였다. (4.18, 2.87%) 따라서 알코올에 의한 세포 사멸에 Rg3-KRG가 보호 효과가 있음이 Flow cytometry를 통해 증명되었다.

[0087] **E-4. 알코올 처리한 신경세포(PC12)에서 Rg3-KRG가 신경세포사멸에 미치는 영향**

[0088] (1) 실험방법

[0089] 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 농도가 되도록 조절한 후 24시간 동안 배양하여 안정화를 시행한다. 24시간 후 well에 배지를 모두 제거하고, Rg3-KRG가 최종 농도로 0.5, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 배양액에 희석하여 세포주에

처리한 후 6시간 동안 배양한다. 6시간 후 대조군을 제외한 well에 5% alcohol과 Amyloid beta oligomer를 다양한 농도(10, 25, 50 μ m)로 처리하였다. 24시간 후 각 well의 배지를 제거하고 MTT용액 (대일랩서비스) 10 μ l와 DMEM 배지 90 μ l씩 첨가하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 30분 한다. 그 후, Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

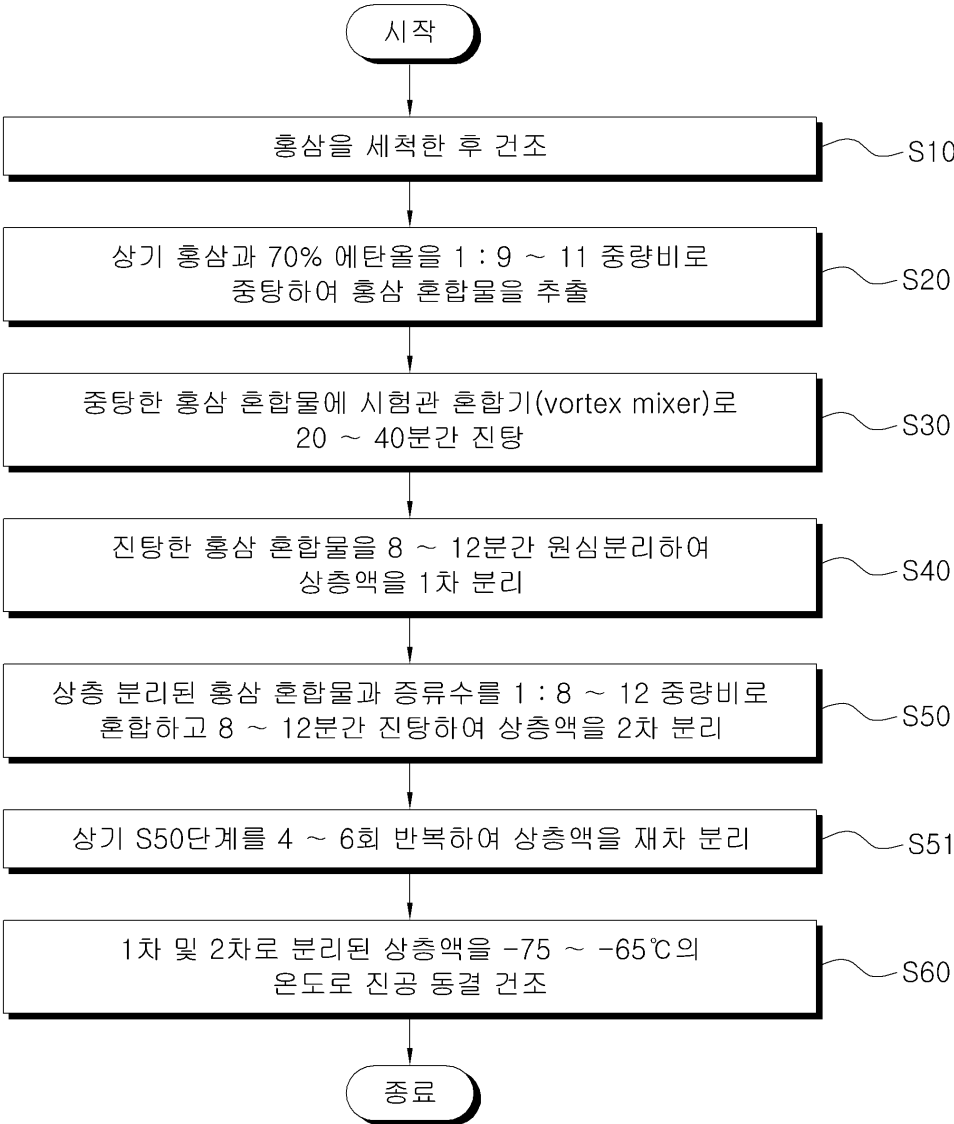
(2) 실험결과

도 11과 같이, Amyloid beta의 여러가지 형태 중 amyloid beta oligomer 형태가 신경세포의 손상을 유도하는 중요한 형태이다. 위 그래프는 Rg3-KRG 선처리 후 alcohol과 amyloid beta oligomer를 농도별로 처리한 후 세포 생존률을 나타낸 그래프이다. amyloid beta oligomer와 alcohol을 처리하였을 때는 alcohol만을 처리하였을 때에 비해 amyloid beta oligomer 농도의존적으로 세포생존률이 감소하였다. 반면, 각각의 amyloid beta oligomer 농도별로 Rg3-KRG를 농도별로 처리하였을 때 세포 생존률이 증가하였다. 이 결과를 통해 알코올 단독 처리된 cell에 비해 동시에 amyloid beta oligomer가 가해졌을 때 더욱 세포생존률이 감소하였고 이러한 상태에서 Rg3-KRG가 보호효과가 있다는 것을 알 수 있다.

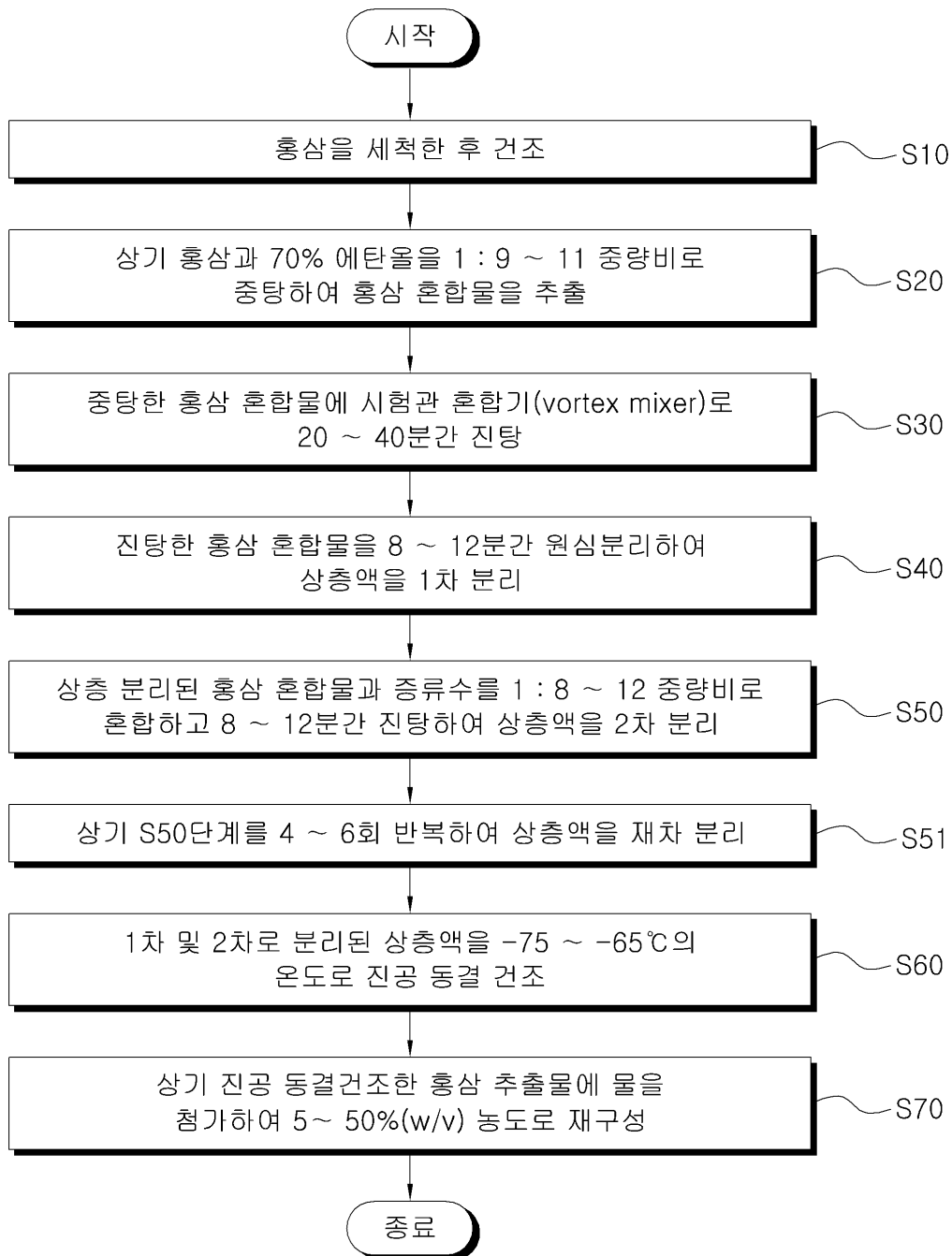
본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

도면

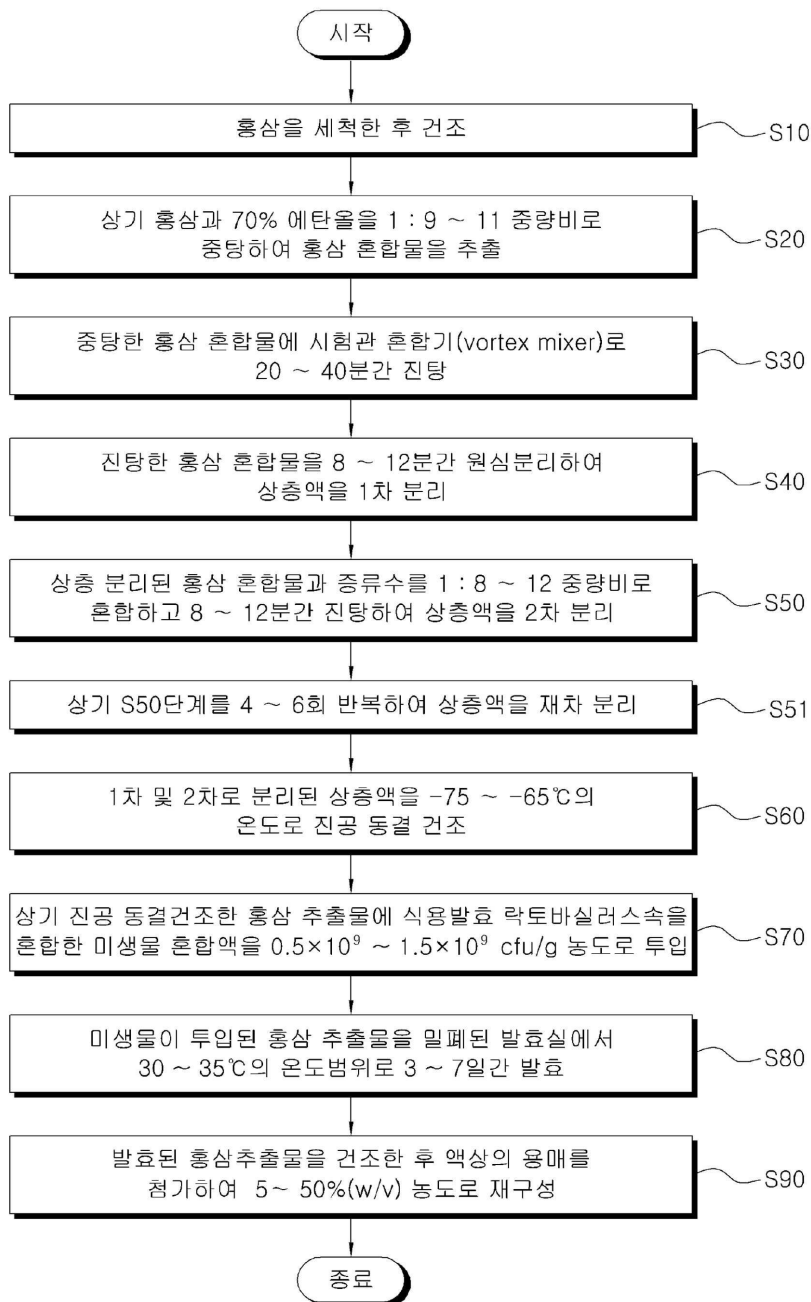
도면1



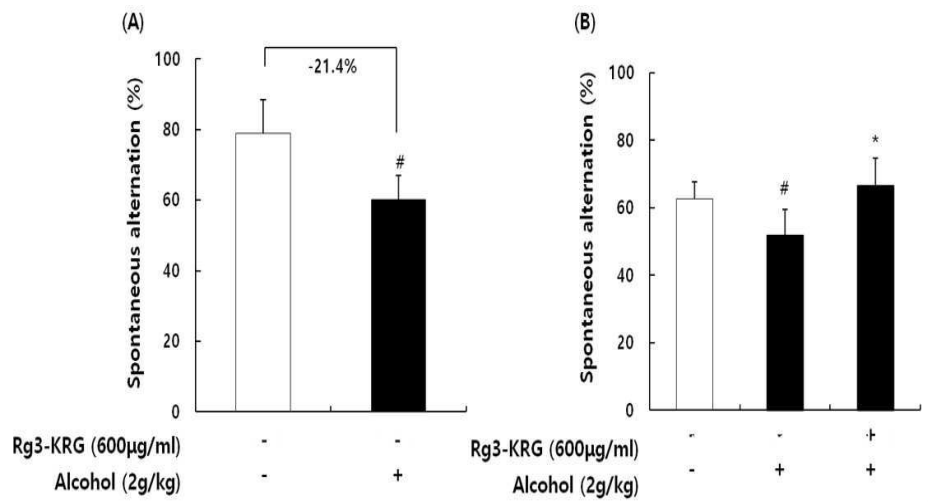
도면2



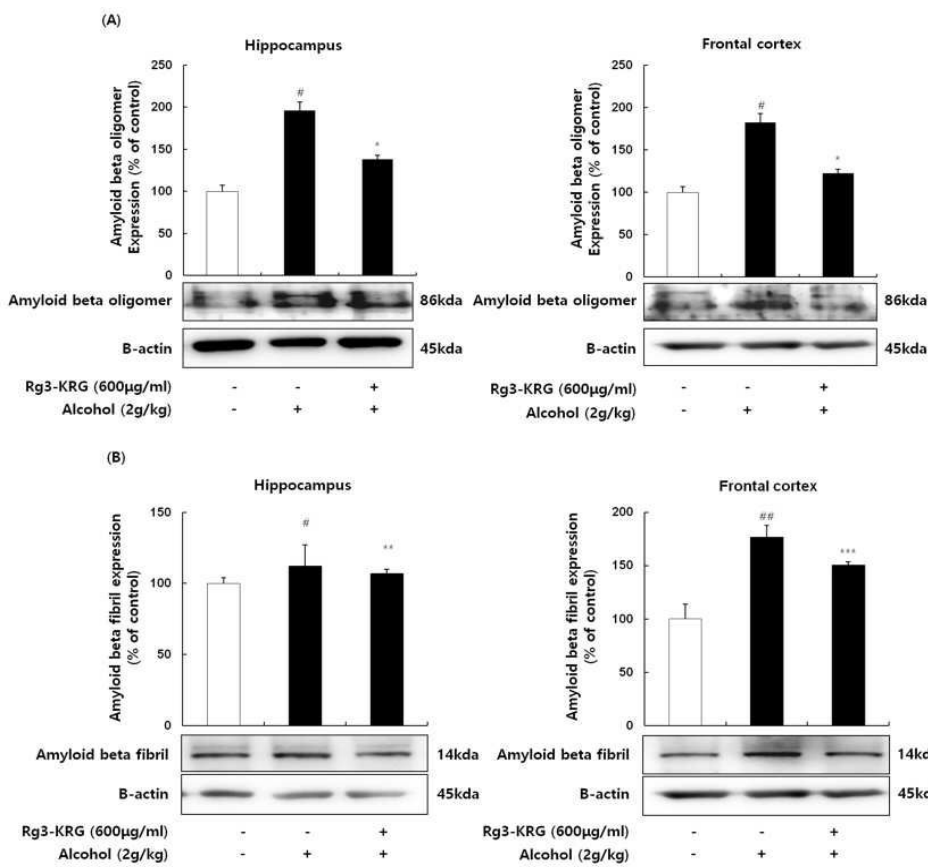
도면3



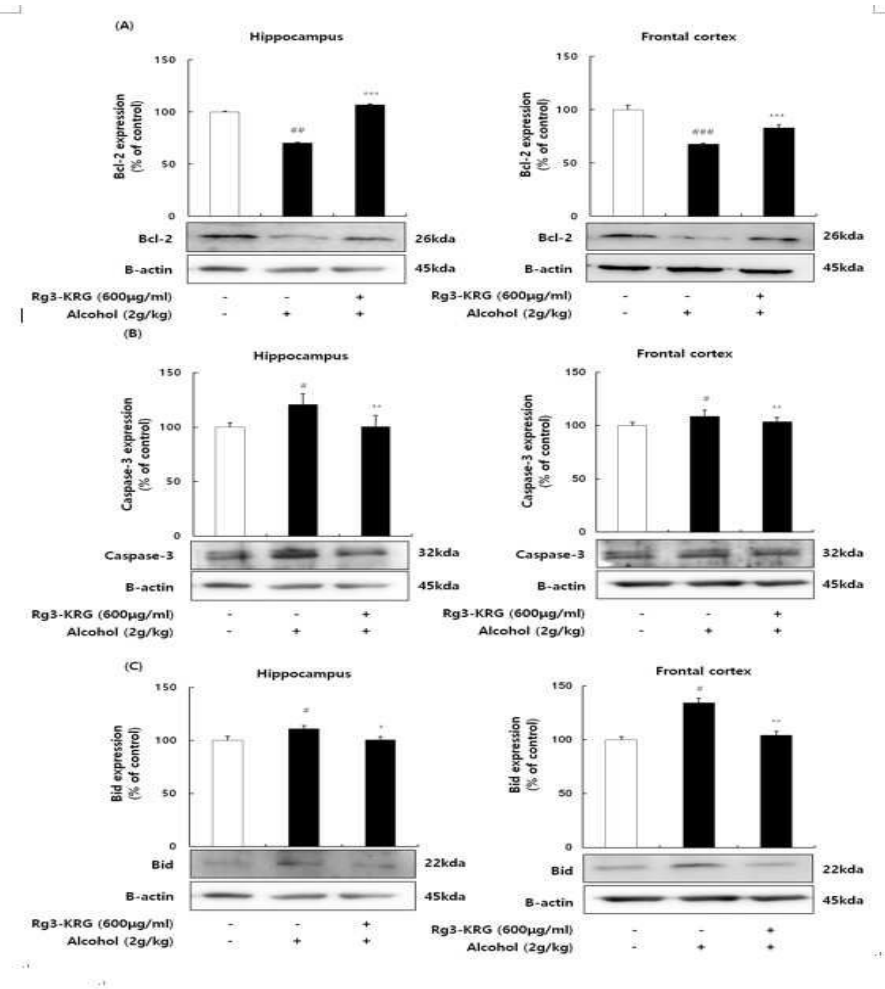
도면4



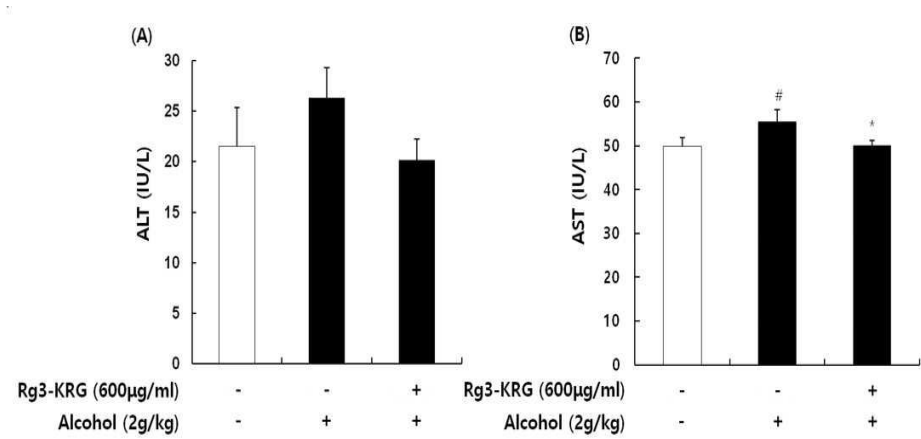
도면5



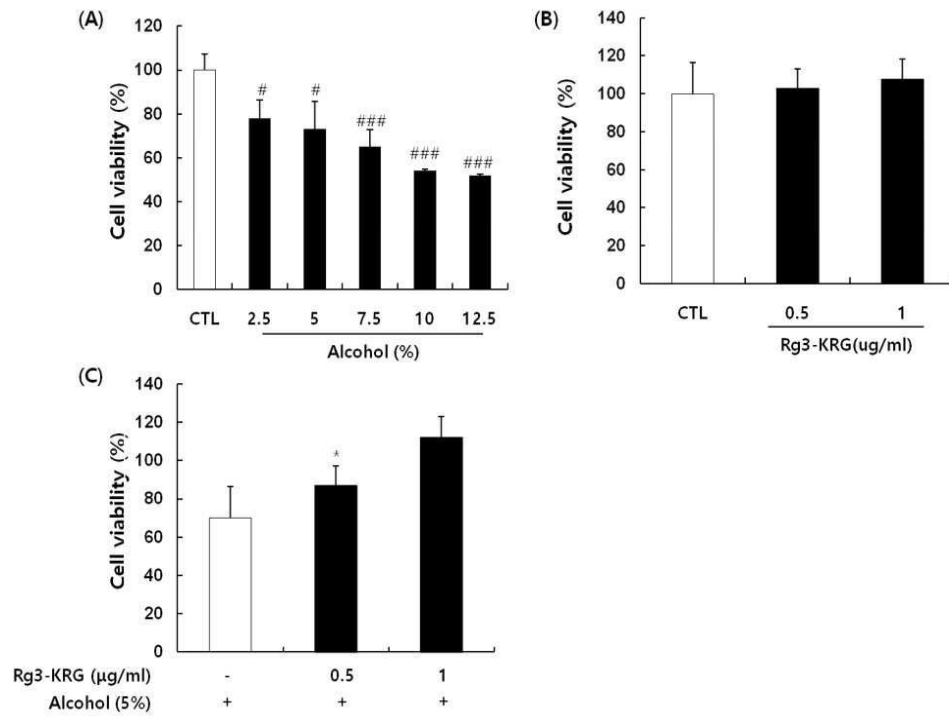
도면6



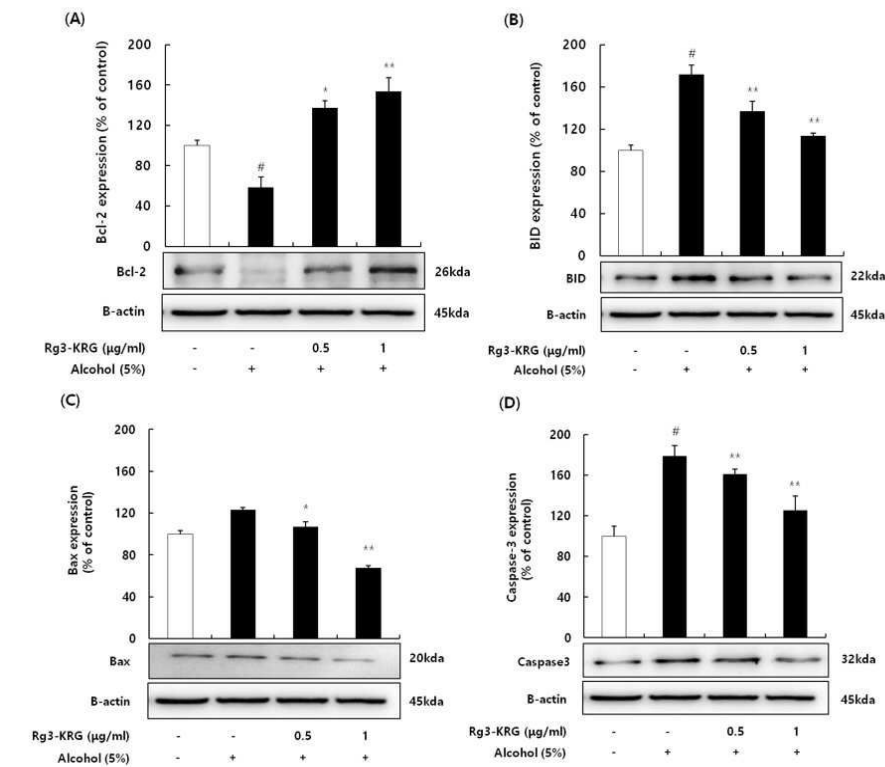
도면7



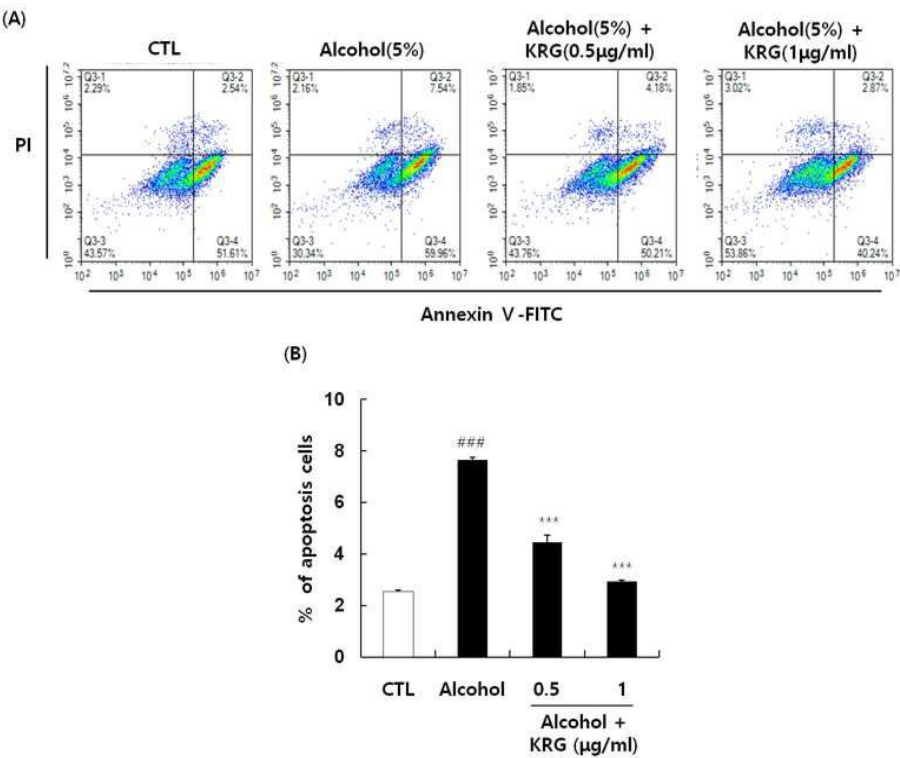
도면8



도면9



도면10



도면11

