(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0093827
(43) 공개일자 2025년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/752 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/752 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0184077
(22) 출원일자 2023년12월18일
심사청구일자 2023년12월18일

(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
김상숙
제주특별자치도 서귀포시 남원읍 하례광장로 107 국립원예특작과학원
박석만
제주특별자치도 서귀포시 남원읍 하례광장로 107 국립원예특작과학원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진동

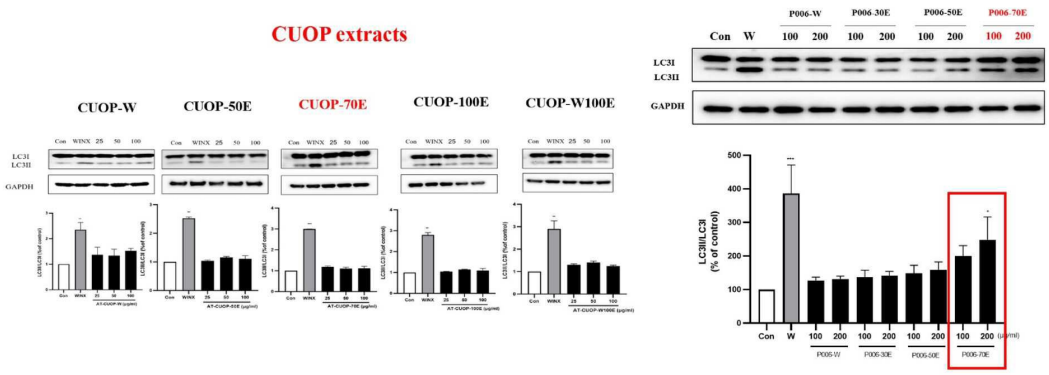
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **윈터프린스 추출물을 포함하는 자가포식 유도용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 자가 포식을 유도하는 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하여 자가 포식을 유도하고 세포 내 활성산호 저해 효과를 나타내며, 궁극적으로 신경퇴행성 질환을 예방 또는 개선시키는 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도12



(52) CPC특허분류
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
(72) 발명자
양현옥
서울특별시 강남구 삼성로51길 37, 109동 3306호
김희주
서울특별시 광진구 능동로 209 세종대학교
김여은
서울특별시 광진구 능동로 209 세종대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395076601
과제번호	RS-2022-RD010416(PJ017076022023)
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	원예특용자원생산및품질표준화연구
연구과제명	면역강화를 위한 원예특용 자원의 효능 향상과 생산표준화 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립원예특작과학원
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 자가포식 유도용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 윈터프린스 추출물은 추출 용매로서 물, 에탄올 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 1종 이상인, 자가포식 유도용 조성물.

청구항 3

윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 윈터프린스 추출물은 추출 용매로서 물, 에탄올 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 1종 이상인, 약학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 질환은 뇌허혈, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측색경화증, 크로이츠펠트-야콥병(CJD), 할러포르덴-스파츠 질환, 다체계 위축증, HIV-연관 치매(HAD), 전두엽성 치매, 척수성 근위축증, 척수소뇌 위축증(SCA), 수막뇌염, 세균성 수막뇌염, 바이러스성 수막뇌염, CNS 자가면역 장애, 다발성 경화증(MS), 신경모세포종, 급성 허혈성 상해 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 약학적 조성물.

청구항 6

윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 윈터프린스 추출물은 추출 용매로서 물, 에탄올 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 1종 이상인, 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태의 식품인, 건강기능식품 조성물.

청구항 9

윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 윈터프린스 추출물은 추출 용매로서 물, 에탄올 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 1종 이상인, 건강식품 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 건강식품은 각종 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림, 유제품, 스프, 이온음료, 음료수, 알코올 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제에서 선택되는, 건강식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자가 포식을 유도하는 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하여 자가 포식을 유도하고 세포 내 활성산소 저해 효과를 나타내며, 궁극적으로 자가포식 활성 저하로 인해 야기되는 신경퇴행성 질환을 예방 또는 개선시키는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자가포식(autophagy)은 세포 내 에너지원이 고갈되거나 세포 내 스트레스 요인이 과도하게 발생했을 때 자가포식체(Autophagosome)를 형성하여 노후 혹은 손상된 세포 내 물질 및 기관을 분해함으로써 에너지를 재생산하고 손상 물질을 제거하여 정상적인 세포의 유지를 가능하게 하는 기작을 말한다. 이러한 과정을 통해 세포 내 손상을 제거하고 세포 내 구조를 재구축하며 세포 내 영양분과 생존에 필요한 에너지, 단백질들을 다시 공급받게 되어 스트레스 환경에 적응하고 항상성을 되찾을 수 있다. 자가포식은 스트레스에 대한 세포 기능 및 생존력 유지에 중요한 역할을 하는 필수적이고 진화적으로 잘 보존된 경로이다. 최근 자가포식을 이용하여 이독성(ototoxicity)으로 인한 산화 스트레스를 줄이기 위한 많은 연구가 보고되었다.

[0003] 다양한 연구를 통해 노화가 진행될수록 또는 노화를 가속화시킬수록 세포 내 자가포식 활성이 급격히 감소한다고 보고되고 있으며, 반대로 자가포식을 억제시킨 경우 세포 내에 노후 미토콘드리아나 잘못 접힌 단백질 등이 과도하게 축적되어 세포 내 자유 라디칼 및 산화 스트레스가 증가하여 결국에 세포의 사멸이 증가하고 노화가 촉진되는 결과를 야기하게 된다.

[0004] 또한, 미토콘드리아에서는 에너지 생성 과정을 가동하면서 부산물로 활성 산소군이 생성되며, 외부 스트레스로 자외선, 약물, 섭취 물질 및 환경 오염 요인 등의 자극에 의해 과산화지질(lipid peroxide), 지질과산화 라디칼(lipid peroxy radical) 또는 과산화아질산염(peroxynitrite) 등이 생성되어 광범위한 산화 스트레스를 가하게 된다. 이러한 산화 스트레스 산물들은 매우 불안정하고 주변 물질과의 반응성이 매우 강하여, 세포 내의 단백질, 지질 및 DNA 등과 매우 강한 결합을 일으키며, 각종 변성을 야기하여 결국에 치명적인 문제를 야기하게 된다. 세포 내에서의 항산화 활성을 증가시키는 물질로는, 비타민류, 글루타치온, 코엔자임Q-10 등과 같은 항산화 물질들, 혹은 카탈라아제(catalase), 수퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase), 글루타치온-의존성 페록시다제(glutathione-dependent peroxidase) 및 퍼옥시리독신(peroxiredoxin) 등과 같은 항산화 단백질들을 예로들 수 있다. 그러나, 이들 종래의 항산화 물질들은 시험관내(in-vitro) 및 혈액 내에서는 활성 산소 소거능이 잘 발휘되지만, 세포 내에서는 농도에 따라 오히려 활성 산소의 형성을 증가시키는 부작용을 나타내는 문제가 있다.

[0005] 이에 종래 항산화 물질들이 가지는 문제점을 근본적으로 해결하고 우수한 항노화 효능을 제공하기 위해서, 세포 내 항산화 단백질의 발현을 증가시켜 항산화 활성을 높일 뿐만 아니라 자가포식 활성화를 유도하는 능력이 우수한 물질을 개발할 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2019-0010773호(2019년 1월 31일 공개)

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-2096600호(2020년 5월 27일 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 신품종 감귤인 윈터프린스의 효능에 대하여 연구한 결과, 윈터프린스 추출물이 안전하면서도 자가포식을 활성화시키는 효능을 가짐을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 자가포식 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선에 효과적인 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 자가포식 유도용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 SH-SY5Y 세포에서 자가포식소체의 막 단백질인 LC3II 단백질의 발현을 증가시키고, 다양한 자가포식 신호전달 경로 단백질들을 유의하게 증가시킬 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 윈터프린스 추출물을 포함하는 조성물은 자가포식 유도에 의해 파킨슨병, 알츠하이머병, 치매와 같은 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 및 기억력 개선 또는 인지장애 개선에 효과적으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 자가포식 신호전달 경로를 도식화한 것이다.

도 2는 LC/MS 포지티브 모드에서 수행한 윈터프린스 과피 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 LC/MS 포지티브 모드에서 수행한 온주 밀감과 윈터프린스 각각의 과피 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 LC/MS 포지티브 모드에서 얻은 온주 밀감과 윈터프린스의 성분에 대한 부분 최소제곱판별분석(PLS-DA) 결과 및 순열 검정법 결과를 나타낸 것이다.

도 5a 내지 5c는 LC/MS 포지티브 모드에서 얻은 온주 밀감과 윈터프린스에 존재하는 성분 각각에 대하여 존재비를 박스 플롯으로 나타낸 것이다.

도 6은 LC/MS 포지티브 모드에서 얻은 온주 밀감과 윈터프린스에 존재하는 성분을 히트맵으로 나타낸 것이다.

도 7은 LC/MS 네거티브 모드에서 수행한 윈터프린스 과피 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 LC/MS 네거티브 모드에서 수행한 온주 밀감과 윈터프린스 각각의 과피 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 LC/MS 네거티브 모드에서 얻은 온주 밀감과 윈터프린스의 성분에 대한 부분 최소제곱판별분석(PLS-DA) 결과 및 순열 검정법 결과를 나타낸 것이다.

도 10a 및 10b는 LC/MS 네거티브 모드에서 얻은 온주 밀감과 윈터프린스에 존재하는 성분 각각에 대하여 존재비를 박스 플롯으로 나타낸 것이다.

도 11은 LC/MS 네거티브 모드에서 얻은 온주 밀감과 윈터프린스에 존재하는 성분을 히트맵으로 나타낸 것이다.

도 12는 온주감귤 추출물과 윈터프린스 과피 추출물을 처리한 경우 LC3II의 발현량 변화를 나타낸 것이다(*, ***, 대조군 대비 <0.05, <0.001)(CUOP: 온주밀감; P-006: 윈터프린스; W: 물 추출물; 30E; 30% 에탄올 추출물; 50E: 50% 에탄올 추출물; 70E: 70% 에탄올 추출물; 100E; 100% 에탄올 추출물; W100E: 열수 추출 후 100% 에탄올로 추출한 추출물).

도 13은 윈터프린스 과피 70% 에탄올 추출물을 처리한 경우 AMPK, Beclin-1 및 ULK 단백질 발현량 변화를 나타낸 것이다(*, **, ***, 대조군 대비 <0.05, <0.01, <0.001)(P-006: 윈터프린스; W: 물 추출물; 70E: 70% 에탄올 추출물).

도 14는 온주감귤 추출물과 윈터프린스 과피 추출물을 처리한 경우 BV-2 미세아교세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 생성량을 측정한 결과를 나타낸다(****, 대조군 대비 <0.0001; #, ##, ###, LPS 처리군 대비 <0.05, <0.01,

<0.001)(CUOP: 온주밀감; P006: 윈터프린스; W: 물 추출물; 30E: 30% 에탄올 추출물; 50E: 50% 에탄올 추출물; 70E: 70% 에탄올 추출물).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 자가포식 유도용 조성물에 관한 것이다.

[0020] 또한, 본 발명은 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환, 특히 자가포식 활성 저하로 인해 야기되는 신경퇴행성 질환을 예방 또는 개선시키는 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 “윈터프린스(*Citrus hybrid 'Winter Prince'*)”는 대한민국 농촌진흥청 감귤연구소에서 개발해 2017년 출원하여 2019년 본격적으로 보급하기 시작한 감귤의 국산 신품종으로, “하레히메”와 “태전병감”을 교배하여 육성한 품종이다. 일반 감귤에 비해 당도는 높고 산도는 낮으며, 껍질이 쉽게 벗겨지는 특징이 있다.

[0022] 감귤은 비타민 C가 풍부하여, 감기 예방, 피로 회복, 피부 미용, 혈관 질환 개선 등에 도움이 되며, 베타 클립토키산틴 성분이 풍부해 골다공증 예방에도 도움이 된다. 또한, 귤에는 식이섬유와 펙틴이 풍부하게 함유되어 있어 변비 예방에도 도움이 되며, 열량은 낮은 반면 포만감은 높기 때문에 비만을 예방하고 다이어트에 도움이 된다.

[0023] 본 발명에서 유효성분으로 사용되는 윈터프린스 추출물은 윈터프린스의 열매, 특히 과피의 추출물이다.

[0024] 추출물을 얻기 전에, 윈터프린스는 세척, 절단, 건조 등과 같은 전처리 공정을 거칠 수 있다. 본 발명에 있어서, 건조는 그 방법이 특별히 제한되지 않으며, 음건건조, 열풍건조 등 당업계에서 통상적으로 사용되는 건조 방법이 적용될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 윈터프린스 추출물은 제조방법이 특별히 제한되지는 않으며, 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 윈터프린스 추출물은 윈터프린스 열매로부터 물, 탄소수 1 내지 6의 유기용매, 아임계 또는 초임계 유체, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매를 사용하여 추출될 수 있다. 또한, 용매 분획, 실리카 겔 크로마토그래피, prep-HPLC 등의 기법을 사용하여 활성 물질이 농축된 특정 분획을 제조할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 윈터프린스 추출물을 수득하는 데 사용되는 추출 용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 2의 유기용매, 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 1종 이상이고, 더 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 2의 알코올(즉, 메탄올 또는 에탄올) 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 1종 이상이며, 더 바람직하게는 물, 에탄올 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 1종 이상이고, 가장 바람직하게는 에탄올 또는 물과 에탄올의 혼합물(주정)이다.

[0027] 본 발명에 있어서, 윈터프린스 추출물을 제조하는 조건은 특별히 제한되지 않는다. 바람직하게는 채취한 윈터프린스를 세척하여 건조시킨 다음 분쇄하여 분말을 얻은 다음, 여기에 추출 용매를 첨가하여 10 내지 80℃, 바람직하게는 20 내지 30℃, 더 바람직하게는 실온에서 3 내지 24시간, 바람직하게는 6 내지 12시간, 더 바람직하게는 7 내지 9시간 동안 추출한다.

[0028] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 윈터프린스 추출물의 함량은 특별히 제한되지 않으며, 필요에 따라 조성물 총 중량에 대해 0.001~50 중량%의 함량으로 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 윈터프린스 추출물의 함량은 바람직하게는 조성물 총 중량에 대해 0.01~30 중량%, 바람직하게는 0.1~20 중량%, 더 바람직하게는 0.5~10 중량%이다.

[0029] 본 발명은 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 자가포식 유도용 조성물에 관한 것이다.

[0030] 본 명세서에서 용어 "자가포식"은 리소좀을 사용하여 필요없거나 또는 이상기능을 나타내는 세포내 소기관의 분해에 관여하는 기본적인 이화작용기작을 의미한다. 영양결핍과 같은 특수한 상황에서는 세포내 소기관을 파괴하여 세포내 에너지 수준을 유지함으로써 세포 생존성을 향상시키는 효과를 나타낼 수 있다. 상기 자가포식은 진화적으로 보존적인 과정으로, 모든 진핵세포에서 나타난다.

[0031] 상기 자가포식은 크게 4단계로 진행된다. 1단계는 자가포식이 유도되는 단계로, 영양 또는 성장인자의 결핍, 또는 저산소 조건에서 mTOR(mechanistic target of rapamycin)이 불활성화되고 ATG5(autophage related 5)이 활

성화되어 자가포식이 유도된다. 2단계는 핵형성(nucleation)이 일어나는 단계로 ER에서 분리된 2중막 구조물에 자가포식 유도 인자와 막지질을 공급하는 요소들이 끌려와 핵형성이 일어나고 파고포어(phagophore)를 형성하게 된다. 자가포식 유도/핵형성 단계에서 Beclin, ULK1, Bcl-2 등의 다양한 유전자가 관여하는 것이 알려져 있다. 3단계는 파고포어의 연쇄가 일어나 자가포식소체(autophagosome)가 형성되는 단계로, 세포질성 LC3(microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha)-I가 절단되고 지질화되어 LC3-II로 전환되게 되고 자가포식소체 막에 존재하게 된다. 상기 LC3-II는 자가포식소체 마커로 알려져 있다. 4단계는 상기 자가포식소체와 라이소솜의 융합(fusion) 단계로, 상기 라이소솜에 의해 세포내 소기관이 분해된다(참조: http://www.abcam.com/pathways/autophagy-interactive-pathway).

[0032] 본 명세서에서 용어 "자가포식 유도용"은 세포내 소기관의 분해를 유도하는 활성으로, (ⅰ) ATG5을 활성화 시키거나; (ii) 자가포식소체 형성을 촉진하거나; (iii) 자가포식소체와 라이소솜의 융합을 촉진하는 활성을 나타낸다.

[0033] 본 발명에 따른 조성물은 윈터프린스 추출물, 특히 윈터프린스 과피 추출물을 함유함으로써 자가포식소체의 형성을 증가시키며, LC3-II의 발현을 증가시킨다.

[0034] 본 발명은 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환, 특히 자가포식 활성 저하로 인해 야기되는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명에 있어서, 신경퇴행성 질환의 예로는 뇌허혈, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측색경화증, 크로이츠펠트-야콥병(CJD), 할러포르텐-스파츠 질환, 다체계 위축증, 치매(예를 들어, HIV-연관 치매(HAD), 전두엽성 치매), 척수성 근위축증, 척수소뇌 위축증(SCA), 수막뇌염, 세균성 수막뇌염, 바이러스성 수막뇌염, CNS 자가면역 장애, 다발성 경화증(MS), 신경모세포종, 급성 허혈성 상해, 뇌졸중과 같은 질환이 포함된다.

[0036] 본 발명의 조성물은 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 일반적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제형화될 수 있다.

[0037] 경구투여를 위한 고형 제형에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제형은 하나 이상의 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제형으로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0038] 비경구 투여를 위한 제형에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 조성물이 비경구 투여될 경우, 조성물은 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 흉부내 주사 등의 적절한 투여 경로로 투여될 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0040] 본 발명에 따른 조성물의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.001~100 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.01~35 mg/kg/일이다. 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.07~7000 mg/일이며, 바람직하게는 0.7~2500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0041] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용되거나, 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용될 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환, 특히 자가포식 활성 저하로 인해 야기되는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명에 따른 조성물이 건강기능식품 및 건강식품 조성물인 경우, 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태일 수 있으며, 건강식품은 각종 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림, 유제품, 스프, 이온음료, 음료수, 알코올 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제 등일 수 있으며, 본 발명의 조성물은 통상적인 의미에서의 건강기능식품 및 건강식품 조성

물을 모두 포함한다.

[0044] 본 발명에 따른 건강기능식품 및 건강식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 및 건강식품 조성물 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 본 발명에 따른 조성물은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 건강기능식품 및 건강식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 윈터프린스 추출물을 함유하는 것 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트라이톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품 및 건강식품 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0046] 상기한 성분 이외에 본 발명에 따른 건강기능식품 및 건강식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 이의 염, 알긴산 및 이의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명에 따른 건강기능식품 및 건강식품 조성물은 천연 과일쥬스 및 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 윈터프린스 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은

[0048] SH-SY5Y 세포에서 자가포식소체의 막 단백질인 LC3II 단백질의 발현을 증가시키고, 다양한 자가포식 신호전달 경로 단백질들을 유의하게 증가시킬 수 있다(도 1 참조).

[0049] 본 발명에 따른 윈터프린스 추출물을 포함하는 조성물은 자가포식 유도에 의해 파킨슨병, 알츠하이머병, 치매와 같은 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 및 기억력 개선 또는 인지장애 개선에 효과적으로 활용될 수 있다.

[0051] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 이는 본 발명의 설명을 위한 것일 뿐, 이로 인해 본 발명의 범위가 제한되지 않는다.

[0053] [실시예 1] 윈터프린스 과피 물 추출물의 제조

[0054] 윈터프린스는 2022년 서귀포시에 위치한 감귤연구소에서 1월 상순에 수확한 시료를 수확하여 세척 후 과피와 과육을 분리하였다. 분리된 과피는 잘게 썰어서 건조하여 사용하였다. 건조된 과피 중량의 15배의 물을 첨가한 후 100℃에서 6시간 추출하였다. 추출 후 25 um의 종이 필터를 이용하여 필터 후 55℃~60℃에서 감압 농축하고 진공 건조하여 시험에 사용하였다.

[0056] [실시예 2] 윈터프린스 과피 30% 에탄올 추출물의 제조

[0057] 추출 용매로서 30% 에탄올을 사용한 것을 제외하고 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 윈터프린스 과피 30% 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0059] [실시예 3] 윈터프린스 과피 50% 에탄올 추출물의 제조

[0060] 추출 용매로서 50% 에탄올을 사용한 것을 제외하고 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 윈터프린스 과피 50% 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0062] [실시예 4] 윈터프린스 과피 70% 에탄올 추출물의 제조

[0063] 추출 용매로서 70% 에탄올을 사용한 것을 제외하고 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 윈터프린스 과피 70% 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0065] [비교예 1] 온주밀감 물 추출물의 제조

[0066] 온주밀감은 2022년 서귀포시에 위치한 감귤연구소에서 12월 상순에 수확한 시료를 수확하여 세척 후 과피와 과육을 분리하였다. 분리된 과피는 잘게 썰어서 건조하여 사용하였다. 건조된 과피 중량의 15배의 물을 첨가한 후 100℃에서 6시간 추출하였다. 추출 후 25 um의 종이 필터를 이용하여 필터 후 55℃~60℃에서 감압 농축하고 진공 건조하여 시험에 사용하였다.

[0068] [비교예 2] 온주밀감 50% 에탄올 추출물의 제조

[0069] 추출 용매로서 50% 에탄올을 사용한 것을 제외하고 상기 비교예 1과 동일한 방법으로 온주밀감 50% 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0071] [비교예 3] 온주밀감 70% 에탄올 추출물의 제조

[0072] 추출 용매로서 70% 에탄올을 사용한 것을 제외하고 상기 비교예 1과 동일한 방법으로 온주밀감 70% 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0074] [비교예 4] 온주밀감 100% 에탄올 추출물의 제조

[0075] 추출 용매로서 100% 에탄올을 사용한 것을 제외하고 상기 비교예 1과 동일한 방법으로 온주밀감 100% 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0076] [비교예 5] 온주밀감 열수 추출 후 100% 에탄올로 추출한 추출물의 제조

[0077] 추출 용매로서 먼저 열수를 사용하여 추출한 다음 잔여물에 대해 100% 에탄올로 다시 추출한 것을 제외하고 상기 비교예 1과 동일한 방법으로 온주밀감의 열수 추출 후 100% 에탄올로 추출한 추출물을 제조하였다.

[0079] [시험예 1] 성분 분석

[0080] 본 발명에서 사용되는 윈터프린스와 현재 국내에서 가장 많이 생산되는 감귤류인 온주밀감의 과피에 존재하는 성분을 LC/MS로 분석하였다.

[0081] 구체적인 분석 방법은 다음과 같다:

[0082] - 전처리: 40 mg / 600 ul 80% 메탄올(IS : 테르페나딘, 지도부딘)

[0083] - LC/MS 분석 조건

[0084] - 분석 장비: UPLC-Q-TOF MS (Xevo™ G2-S, Waters, Milford, MA, USA)

[0085] - LC 조건

[0086] · 주입 부피: 1 uL

[0087] · 컬럼: Acquity UPLC BEH C18 column(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm; Waters)

[0088] · 용매 A: 물 + 0.1% 포름산(FA); 용매 B: ACN + 0.1% FA

[0089] · 유속: 0.35 mL/min

[0090] - MS 조건

[0091] · ESI-포지티브 모드

[0092] 모세관 전압: 3 kV

[0093] 샘플 콘 전압: 30 V

[0094] 탈용매화 가스 흐름: 800 L/h

[0095] 잠금 질량: 류신-엔케팔린(556.2771 Da)

[0096] 콘 가스 흐름: 30 L/h

[0097] 탈용매화 온도: 400℃

[0098] 이온원 온도: 100℃

[0099] 데이터 수집: 0.2초의 스캔 시간으로 *m/z* 50 내지 1500 범위

[0100] 품질 제어(*QC*), 5개 샘플마다 모든 샘플의 혼합물을 주입

[0101] · ESI-네거티브 모드

[0102] 모세관 전압: 2.5 kV

[0103] 샘플 콘 전압: 20 V

[0104] 탈용매화 가스 흐름: 900 L/h

[0105] 잠금 질량: 류신-엔케팔린(554.2615 Da)

[0106] - MS 조건

[0107] · 10 내지 40 eV(*m/z* 50 내지 1500)의 충돌 에너지 램프

[0109] 데이터 처리는 UNIFI version 1.9.2.045(Waters)를 이용하여 데이터의 수집, 정규화, 정렬을 수행하였다. LC/MS 물질 동정은 Chemspider database, Metlin database(metlin.scripps.edu) 및 human metabolome databases(www.hmdb.ca), EZmass database, authentic standards을 기반으로 하였다.

[0110] 통계 분석 및 시각화를 위해, SIMCA-P+ version 16.0.2(Umetrics, Umeå, Sweden)를 사용하여 PCA, PLS-DA, VIP, 순열 검정법(permutation test), p-값을 구하였고, SPSS 27.0(SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용하여 Duncan's test와 함께 일원배치 분산분석(One-way analysis of variance, ANOVA)($p < 0.05$)을 수행하였다. GraphPad Prism 9를 사용하여 상대 존재비를 구하였고, R-project를 사용하여 히트맵(heatmap)을 작성하였다.

[0112] 1. 포지티브 모드

[0113] LC/MS 포지티브 모드에서 수행한 분석 결과는 도 2 및 3에 나타내어져 있다. 도 2는 윈터프린스에 대한 분석 결과이며, 도 3은 온주밀감 및 윈터프린스에 대한 분석 결과를 함께 나타낸 것이다.

[0114] 도 2 및 3을 보면, 온주밀감과 윈터프린스가 모두 감귤 종류이므로, 공통적으로 발견되는 성분도 보이지만, 일부 성분은 온주밀감과 비교하여 윈터프린스에서 더 적은 양으로 또는 더 많은 양으로 존재하거나, 온주밀감에서는 검출되지 않은 성분도 발견된다는 것을 알 수 있다.

[0115] 부분 최소제곱판별분석(PLS-DA) 결과를 보면(도 4), 온주 밀감과 윈터프린스 사이에 성분 차이가 존재한다는 것을 쉽게 알 수 있다.

[0116] 크로마토그램에 나타난 성분을 Chemspider database, Metlin database(metlin.scripps.edu) 및 human metabolome databases(www.hmdb.ca), EZmass database, authentic standards을 기반으로 하여 확인한 결과는 하기 표 1에 나타내었으며, 이들 성분 각각에 대한 박스 플롯을 도 5a 내지 5c에 나타내었다.

표 1

샘플 중 대사산물 확인

No.	RT (min)	화합물	정확한 질량 [M+H]	MS 단편	VIP	p-값
1	0.76	stachydrine	144.1035	116, 184, 70, 102	1.12	3.16E-07
2	0.77	cathinone/4-acetyl-N-methylaniline	150.093	135, 134, 107, 77	1.12	2.51E-07
3	2.36	2,3,4,6-tetra-O-acetyl linamarin	416.1549	316, 116	1.13	1.67E-10
4	2.54	phenylalanine	166.0874	120, 103	1.11	1.26E-06
5	2.57	esculamine	310.1284	292, 264	1.10	1.62E-04
6	2.81	mannosyl tryptophan	367.1502	349, 332, 188	1.08	9.17E-04
7	2.86	tryptophan	205.0981	188, 144, 170	1.10	2.90E-06
8	2.92	feruloyl putrescine	265.1494	177, 145	1.10	5.86E-06
9	2.99	luteolin-3'-7'-diglucoside	611.1603	163, 593, 575, 325	1.09	9.59E-06
10	3.12	saponarin	595.1664	577, 475	1.12	4.23E-05
11	3.18	apigenin-7-rutinoside-4'-glucoside	741.2236	595, 433, 271, 377	1.11	1.31E-04
12	3.21	naringenin triglucoside	743.2405	581, 273	1.13	1.60E-11
13	3.42	apioside	565.1547	433, 415, 313	0.97	1.65E-03
14	3.69	apigenin-7-rutinoside	579.1697	271, 433	0.98	1.45E-03
15	3.71	narirutin	581.1867	273, 419, 119	1.14	4.39E-16
16	3.85	hesperidin	611.1976	303, 449, 177	1.13	3.22E-09
17	4.06	limonoid (xylogranatin K)	515.2278	496, 409	1.07	5.73E-04
18	4.35	didymin	595.2023	287, 433, 559	1.13	6.88E-11
19	4.56	cyclonatsudamine A	728.3983	615, 587, 502, 474	0.97	1.80E-03
20	4.63	natsudaidain 3-(4-O-3-hydroxy-3-methylglutaroylglucoside	725.2295	419	1.04	1.99E-03
21	5.01	isosinensetin	373.1282	343, 358	0.91	5.76E-03
22	5.20	methoxynaringenin	403.1387	373, 342, 241	1.13	9.57E-09
23	5.28	sinensetin	373.1282	343, 358	1.12	5.66E-08
24	5.31	Tetramethoxyflavone	343.1173	313, 135	1.04	2.28E-04
25	5.58	nobiletin	403.1387	373, 355	1.12	4.17E-07
26	5.61	tetramethoxyflavone	343.1177	313, 282, 299, 281	1.11	9.94E-07
27	5.78	heptamethoxyflavone	433.1499	403, 385, 418	1.10	1.04E-04
28	5.87	natsudaidain	419.1333	184, 389, 371	1.09	7.82E-04
29	5.90	tangeretin	373.1285	343, 358	1.12	1.65E-07
30	6.15	heptamethoxyflavone	403.1387	184, 373, 355	1.11	6.53E-06
31	6.49	LPC(18:3)	518.3235	184, 500, 335, 104	1.00	1.99E-03
32	6.87	LPC(18:2)	520.3397	184, 339, 125	1.05	1.17E-04
33	7.36	LPE(18:1)	480.3075	339, 125	1.13	1.74E-08

[0117]

[0118] 상기 표 1 및 도 5a 내지 5c를 보면, 윈터프린스에는 스타키드린, 2,3,4,6-테트라-O-아세틸 리나마린, 페닐알라닌, 트립토판, 아피오사이드, 이소시넨세틴, 메톡시나린게닌,시넨세틴, 테트라메톡시플라본, 노빌레틴, 테트라메톡시플라본, 헥사메톡시플라본, 텐제레틴, 헵타메톡시플라본, LPC(리소포스파티딜 콜린, 18:3), LPC(18:2), LPE(리소포스파티딜 에탄올아민, 18:1)가 온주 밀감에 비하여 풍부하게 존재하는 반면, 카티논/4-아세틸-N-메틸아닐린, 에스큘라민, 만노실 트립토판, 사포나린, 나리루틴, 헤스페리딘 등의 성분은 온주 밀감에 비하여 적게 존재하며, 특히 아피게닌-7-루티노사이드-4'-글루코사이드 및 나린게닌 트리글루코사이드는 윈터프린스에 거의 존재하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 특징은 도 6에 나타낸 히트맵을 통해서도 확인할 수 있다.

[0120] 2. 네거티브 모드

[0121] LC/MS 네거티브 모드에서 수행한 분석 결과는 도 7 및 8에 나타내어져 있다. 도 7은 윈터프린스에 대한 분석 결과이며, 도 8은 온주밀감 및 윈터프린스에 대한 분석 결과를 함께 나타낸 것이다.

[0122] 도 7 및 8을 보면, 온주밀감과 윈터프린스가 모두 감귤 종류이므로, 공통적으로 발견되는 성분도 보이지만, 일부 성분은 온주밀감과 비교하여 윈터프린스에서 더 적은 양으로 또는 더 많은 양으로 존재하거나, 온주밀감에서는 검출되지 않은 성분도 발견된다는 것을 알 수 있다.

[0123] 부분 최소제곱판별분석(PLS-DA) 결과를 보면(도 9), 온주 밀감과 윈터프린스 사이에 성분 차이가 존재한다는 것을 쉽게 알 수 있다.

[0124] 크로마토그램에 나타난 성분을 Chemspider database, Metlin database(metlin.scripps.edu) 및 human metabolome databases(www.hmdb.ca), EZmass database, authentic standards을 기반으로 하여 확인한 결과는 하기 표 2에 나타내었으며, 이들 성분 각각에 대한 박스 플롯을 도 10a 및 10b에 나타내었다.

표 2

샘플 중 대사산물 확인

No.	RT (min)	화합물	정확한 질량 [M-H]	MS 단편	VIP	*p*-값
1	0.76	quinic acid	191.0555	173, 127	1.11	1.04E-06
2	0.78	sucrose	341.1076	179, 89, 59, 323	1.11	1.14E-06
3	1.36	phlorin	287.0759	125	1.13	1.03E-09
4	2.68	gentidic acid glucoside/protocatechuic acid glucoside	315.0708	265, 152, 108	1.03	3.01E-04
5	2.74	acetylsalicylic acid glucuronide	355.0654	137, 93, 191, 263	1.13	4.34E-06
6	2.81	caffeic acid diglucoside	503.1393	341, 323, 179	1.11	1.80E-04
7	2.93	Feruloylglucaric acid	385.0760	191, 209, 134	1.05	1.87E-03
8	3.04	rutin	609.1449	519, 429, 535	1.11	6.90E-07
9	3.13	Feruloylglucaric acid	385.0761	191, 209, 134	1.03	1.69E-03
10	3.13	unidentified flavonoid glucoside	771.1612	191, 577	1.08	8.00E-04
11	3.19	saponarin	593.1499		1.08	2.59E-04
12	3.47	Quercetin 3'-methyl ether 3-[2"-(4"'-acetylrhamnosyl)-gentiobioside]	827.2241	563, 669, 191	1.12	6.27E-05
13	3.67	peptide (gln-gln-ala-glu or asp-glu-val-asp)	473.2012	427, 367, 85	1.12	2.89E-08
14	3.72	quercetin acetyl troglucoside	813.2092	345, 549	1.12	5.62E-05
15	3.73	unidentifeid flavonoid glucoside	561.1240	269, 515, 85	1.13	2.45E-06
16	3.78	narirutin	579.1709		1.13	1.84E-06
17	3.90	hesperidin	609.4106		1.13	4.93E-10
18	4.11	Nomilin glucoside	693.2755	565, 471	1.06	7.53E-05
19	4.16	Caffeoyl-feruloylquinic acid	529.1337	367, 173, 193	1.13	2.16E-06
20	4.25	unidentified flavonoid glucoside	857.2339	695, 593, 489, 221	1.12	2.06E-05
21	4.36	Kaempferol acetyl glucoside	489.1024	367, 301	1.13	1.02E-05
22	4.41	didymin	593.1864	285, 543	1.13	1.59E-06
23	4.45	kaempferol triglucoside	709.1973	607. 251	1.13	2.33E-08
24	4.47	Diferuloylquinic acid	543.1492	367, 173, 349, 193, 388	1.13	6.43E-06
25	4.52	Haploside C	695.1819	593, 511, 374, 193	1.10	3.07E-06
26	4.61	cyclonatsudamine A	726.3821		0.97	1.85E-03
27	4.69	natsudaidain 3-(4-O-3-hydroxy-3-methylglutaroylglucoside	723.2130		1.00	2.78E-03
28	7.06	peroxylinoleic acid	295.2265	277, 195	1.12	1.02E-07

[0125]

[0126] 상기 표 2 및 도 10a 및 10b를 보면, 윈터프린스에는 퀸산, 플로린, 아세틸살리실산 글루쿠로나이드, 펩타이드(gln-gln-ala-glu 또는 asp-glu-val-asp), 카페오일-페룰로일퀸산, 캠페럴 아세틸 글루코사이드, 캠페롤 트리글루코사이드, 디페룰로일퀸산, 하플로사이드 C, 페록시리놀레산 등의 성분이 온주 밀감에 비하여 풍부하게 존재하는 반면, 수크로스, 카페익산 디글루코사이드, 루틴, 페룰로일글루카릭산, 사포나린, 퀘르세틴 아세틸 트리글루코사이드, 나리루틴, 헤스페리딘 등의 성분은 온주 밀감에 비하여 적게 존재하는 것으로 나타났다. 이러한 특징은 도 11에 나타낸 히트맵을 통해서도 확인할 수 있다.

[0128] 상기 나타낸 결과를 통해, 윈터프린스는 온주 밀감과 성분 상으로 차이를 보이며, 이는 윈터프린스 추출물이 온주 밀감 추출물과는 별개의 물질로 간주되어야 한다는 것을 시사한다.

[0130] [시험예 2] 온주밀감과 윈터프린스 과피 추출물의 SH-SY5Y 세포에서의 자가포식 유도

[0131] 온주밀감 추출물과 윈터프린스 과피 추출물의 자가포식 유도 효과를 평가하기 위하여, 자가포식 마커인 LC3II 단백질 발현량 증가 정도를 측정하였다.

[0132] 도파민성 세포주인 인간 신경아세포종 세포(human neuroblastoma cells)

[0133] SH-SY5Y를 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)로부터 입수하여, 10% FBS(Fetal bovine serum; Gibco/Invitrogen; 미국) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; Gibco/Invitrogen; 미국)을 보충한 MEM+Ham's F12(Welgene.,Ltd, CAT. No. LM007-07, LM010-01, Korea)에 배양하였다. SH-SY5Y 세포는 37° C 조건 하에 5% CO_2 함유 습윤 분위기에서 배양하였다.

[0134] 먼저 SH-SY5Y 세포를 12-웰 플레이트에 웰당 5 × 10^5개 세포/웰로 분주한 다음 실시예 1 내지 4의 샘플을 100 또는 200 μg/ml, 비교예 1 내지 5의 샘플을 50 또는 100 μg/ml의 농도로 처리하였다. 양성 대조군으로는 WIN-1001X 100 μg/ml를 처리한 것을 사용하였다.

[0135] 다음으로 웨스턴블롯을 수행하였으며, 구체적으로 세포를 Pro-Prep 단백질 추출 용액(intron bio technology Korea Ltd, CAT. No 17081)과 포스파타제 억제제 칵테일(sigma aldrich. Ltd. CAT. No 524624, 미국)로 용해하

여 BCA 분석 키트(Thermo Fisher Scientific)로 단백질을 정량한 다음 샘플을 조제한 후, 12% 겔을 만들어 100 V로 1시간 30분가량 전기영동을 진행하였다. 전기영동으로 얻어진 겔을 PVDF 막으로 wet-트랜스퍼하고 5% Skim milk(DB difco, CAT. No 232100)가 포함된 PBS로 1시간 동안 블로킹하고, 일차 항체인 항-LC3I 항체 및 항-LC3II 항체로 4℃에서 밤새 표지시킨 다음, PBS로 3회 이상 세척한 다음, HRP(horseradish peroxidase)가 부착된 2차 항체를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 멤브레인은 ECL 검출 키트(detection kit)와 발광 영상 분석기(Luminescent Image Analyzer; LAS-3000, 미국)를 사용하여 영상화하여 배지 중 LC3I 및 LC3II 단백질 발현량을 측정하였으며, 하우스키핑 유전자로는 GAPDH를 사용하였다. 결과는 도 12에 나타내었다.

[0136] 이 때, 실험은 3회 반복하였다.

[0137] 도 12에 나타내 바와 같이, 비교예 1 내지 5의 온주감귤 추출물을 처리한 경우에는 비교예 1의 온주감귤 물 추출물을 처리한 경우에 LC3II의 약간의 발현 증가가 관찰되고, 비교예 2 내지 5의 온주감귤 에탄올 추출물을 처리한 경우에는 LC3II의 유의적인 발현 증가가 관찰되지 않았다.

[0138] 반면, 도 12 나타낸 바와 같이, 실시예 1 내지 4의 윈터프린스 과피 추출물을 처리한 경우에는 모두 LCII의 발현 증가가 관찰되었으며, 추출 용매 중 에탄올의 농도가 증가함에 따라 그리고 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 LC3II의 발현도 증가하는 것이 관찰되었으며, 특히 실시예 4의 윈터프린스 과피 70% 에탄올 추출물을 처리한 경우 100 μg/ml를 처리했을 때 LC3II의 발현량이 대조군 대비 약 200% 증가하였으며, 200 μg/ml를 처리했을 때 LC3II의 발현량이 대조군 대비 약 250% 증가하여 자가포식이 효율적으로 유도된다는 것을 확인하였다.

[0140] [시험예 3] 윈터프린스 과피 추출물의 SH-SY5Y 세포에서의 자가포식 신호전달 경로 단백질 발현 유도

[0141] 윈터프린스 과피 추출물의 자가포식 신호전달 경로 단백질 발현 유도 효과를 평가하기 위하여, AMPK, Beclin-1 및 ULK 단백질 발현량 증가 정도를 측정하였다.

[0142] 도파민성 세포주인 인간 신경아세포종 세포(human neuroblastoma cells) SH-SY5Y를 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)로부터 입수하여, 10% FBS(Fetal bovine serum; Gibco/Invitrogen; 미국) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; Gibco/Invitrogen; 미국)을 보충한 MEM+Ham's F12(Welgene.,Ltd, CAT. No. LM007-07, LM010-01, Korea)에 배양하였다. SH-SY5Y 세포는 37° C 조건 하에 5% CO_2 함유 습윤 분위기에서 배양하였다.

[0143] 먼저 SH-SY5Y 세포를 12-웰 플레이트에 웰당 5 × 10^5개 세포/웰로 분주한 다음 실시예 1 내지 4의 샘플을 100 또는 200 μg/ml의 농도로 처리하였다. 양성 대조군으로는 WIN-1001X 100 μg/ml를 처리한 것을 사용하였다.

[0144] 다음으로 웨스턴블롯을 수행하였으며, 구체적으로 세포를 Pro-Prep 단백질 추출 용액(intron bio technology Korea Ltd, CAT. No 17081)과 포스파타제 억제제 칵테일(sigma aldrich. Ltd. CAT. No 524624, 미국)로 용해하여 BCA 분석 키트(Thermo Fisher Scientific)로 단백질을 정량한 다음 샘플을 조제한 후, 12% 겔을 만들어 100 V로 1시간 30분가량 전기영동을 진행하였다. 전기영동으로 얻어진 겔을 PVDF 막으로 wet-트랜스퍼하고 5% Skim milk(DB difco, CAT. No 232100)가 포함된 PBS로 1시간 동안 블로킹하고, 일차 항체인 항-AMPK 항체, 항-Beclin-1 항체 및 항-ULK 항체로 4℃에서 밤새 표지시킨 다음, PBS로 3회 이상 세척한 다음, HRP(horseradish peroxidase)가 부착된 2차 항체를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 멤브레인은 ECL 검출 키트(detection kit)와 발광 영상 분석기(Luminescent Image Analyzer; LAS-3000, 미국)를 사용하여 영상화하여 배지 중 AMPK, Beclin-1 및 ULK 단백질 발현량을 측정하였으며, 하우스키핑 유전자로는 GAPDH를 사용하였다. 결과는 도 13에 나타내었다.

[0145] 이 때, 실험은 2회 반복하였다.

[0146] 도 13에 나타낸 바와 같이, 윈터프린스 과피 70% 에탄올을 50 및 100 μg/ml의 농도로 처리한 경우에는 상기 AMPK, Beclin-1 및 ULK 단백질의 발현량이 증가하였으나 그 정도가 작은 반면, 200 μg/ml의 농도로 처리한 경우에는 상기 단백질들의 발현량이 상당히 증가한 것을 확인하였다.

[0148] [시험예 3] 온주밀감과 윈터프린스 과피 추출물의 항염증에 대한 LPS로 유도된 BV-2 미세아교세포에서의 NO 생

성 억제 효과

[0149] NO는 염증 반응의 대표적인 지표물질이므로, 온주밀감과 윈터프린스 추출물의 항염증성 효과를 BV-2 미세아교세포에서 LPS에 의해 신경염증반응을 유도시키고 이에 의해 유도된 NO의 생성이 감소되는 정도를 통해 평가하였다.

[0150] BV-2 세포를 12-웰 플레이트에 웰당 1.7 × 10^5개 세포/웰로 분주한 다음 실시예 2의 샘플을 50, 100, 200 μg/ml의 농도로 1시간 동안 전처리하였다. 그 다음 신경염증 유발 인자인 LPS(Sigma-aldrich Korea Ltd. CAS No. L2880) 100 ng/ml를 처리하고 23시간 동안 BV-2 세포를 자극하여 신경염증반응을 유도하였다. 양성 대조군으로는 덱사메타손(DEX) 5 μM을 처리한 것을 사용하였다. 배지 중 NO의 양을 Griess 시약(0.1 %(w/v) N-(1-naphathyl)-ethylenediamine and 1%(w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoric acid)을 이용한 NO 어세이 키트(NO assay kit)를 이용하여 반응시킨 다음, ELISA micro plate reader을 사용하여

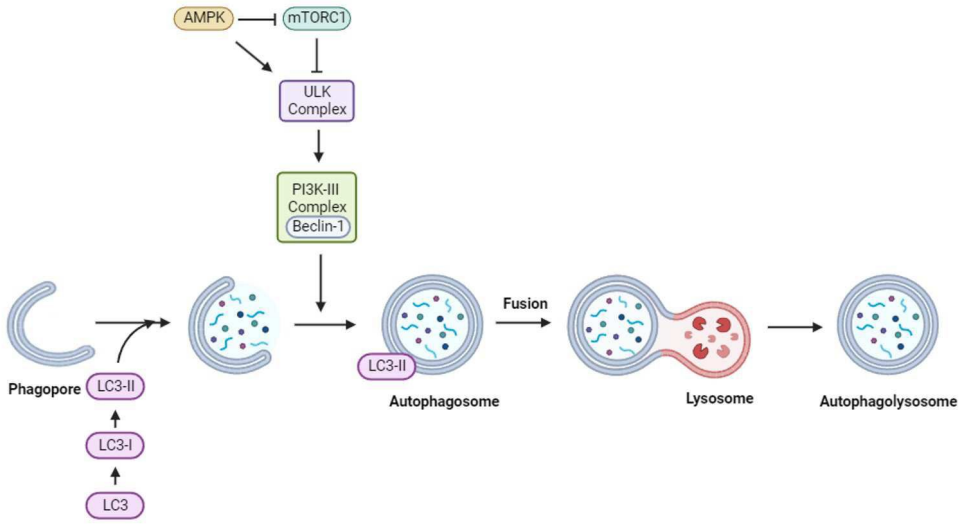
[0151] 540 nm에서 측정하였다. 결과는 도 14에 나타내었다.

[0152] 이 때 처리군별 n=3이었다.

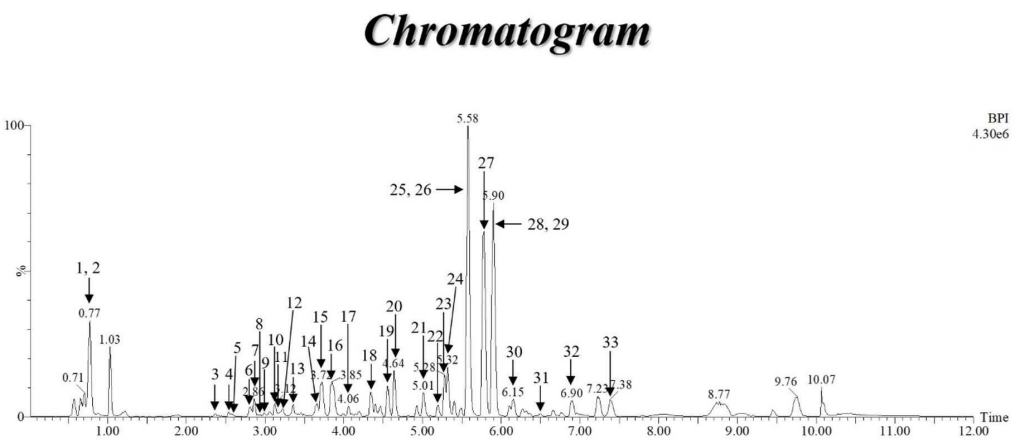
[0153] 도 14에 나타내 바와 같이, 온주감귤 추출물과 윈터프린스 과피 추출물을 처리한 경우 추출 용매의 종류에 관계없이 모든 경우에 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소하는 것을 확인하였다. 윈터프린스 과피 추출물을 400 μg/ml의 농도로 처리한 경우에 우수한 NO 생성 감소 효과가 나타났으며, 특히 추출 용매로 50% 에탄올 또는 70% 에탄올을 사용한 경우에는 양성 대조군인 덱사메타손을 전처리한 경우보다도 효과가 훨씬 더 우수한 것으로 나타났다.

도면

도면1

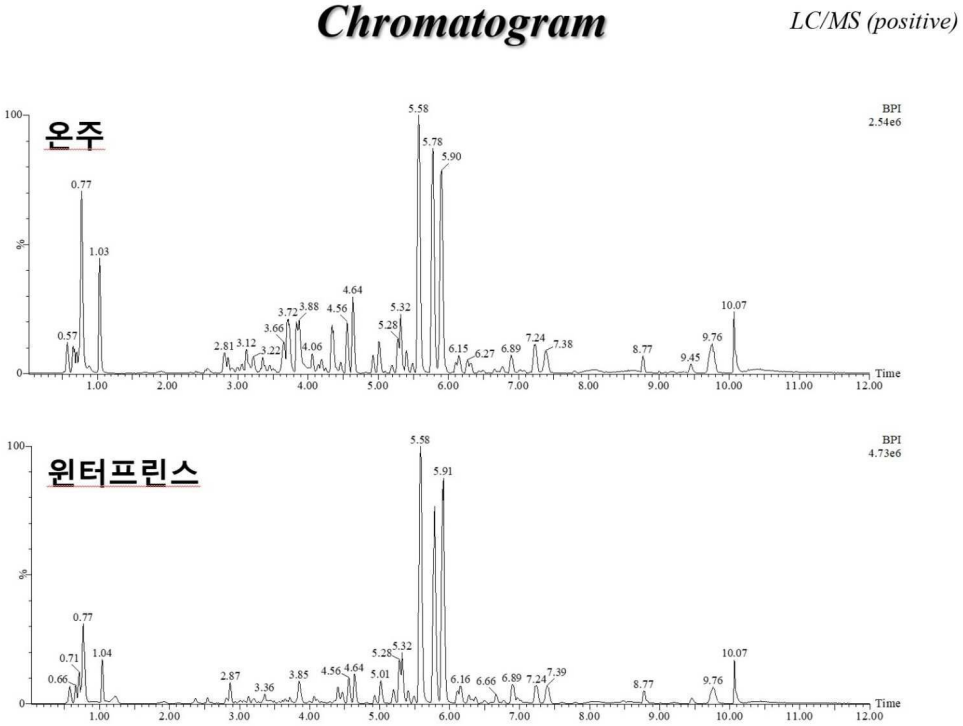


도면2

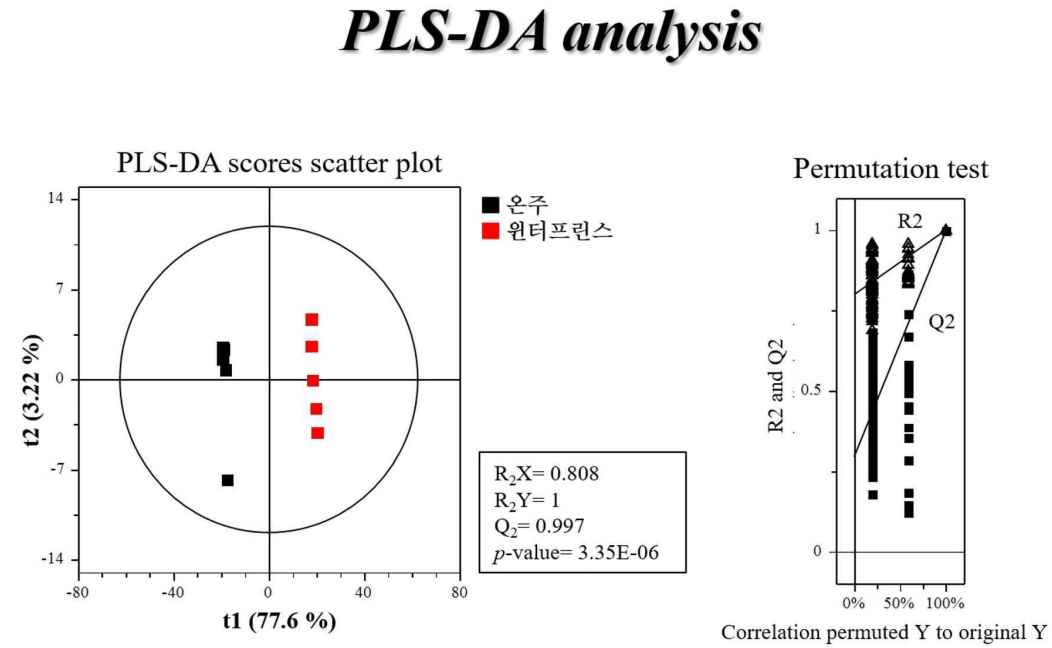


1, stachydrine; 2, cathinone/4-acetyl-N-methylaniline; 3, 2,3,4,6-tetra-O-acetyl linamarin; 4, phenylalanine; 5, esculamine; 6, mannosyl tryptophan; 7, tryptophan; 8, feruloyl putrescine; 9, luteolin-3'-7'-diglucoside; 10, saponarin; 11, apigenin-7-rutinoside-4'-glucoside; 12, naringenin triglucoside; 13, apioside; 14, apigenin-7-rutinoside; 15, narirutin; 16, hesperidin; 17, limonoid (xylogranatin K); 18, didymin; 19, cyclonatsudamine A; 20, natsudaidain 3-(4-O-3-hydroxy-3-methylglutaroylglucoside; 21, isosinensetin; 22, methoxynaringenin; 23, sinensetin; 24, Tetramethoxyflavone; 25, nobiletin; 26, tetramethoxyflavone; 27, heptamethoxyflavone; 28, natsudaidain; 29, tangeretin; 30, heptamethoxyflavone; 31, LPC(18:3); 32, LPC(18:2); 33, LPE(18:1)

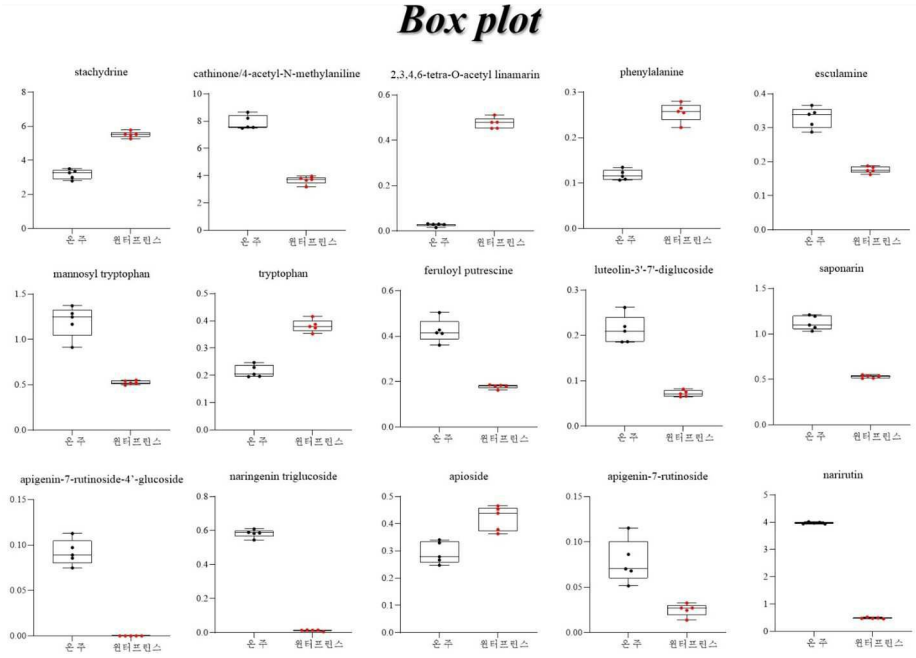
도면3



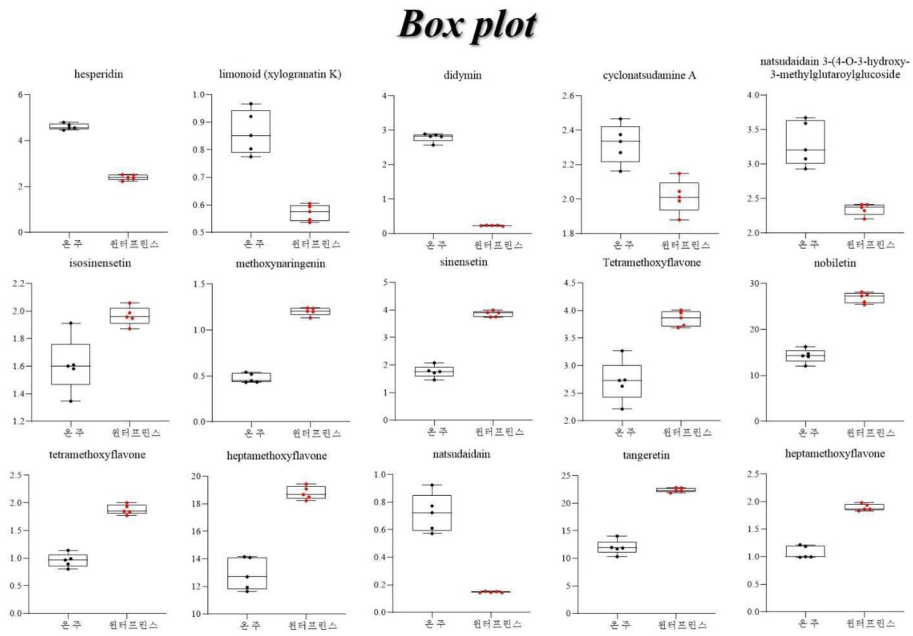
도면4


PLS-DA analysis
PLS-DA scores scatter plot
온주
원터프린스
t2 (3.22 %)
t1 (77.6 %)
R2X= 0.808
R2Y= 1
Q2= 0.997
p-value= 3.35E-06
Permutation test
R2
Q2
R2 and Q2
Correlation permuted Y to original Y

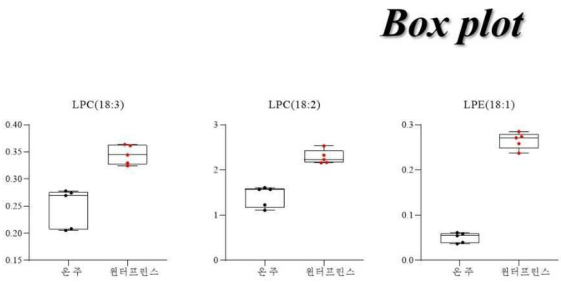
도면5a


Box plot
stachydrine
cathinone/4-acetyl-N-methylaniline
2,3,4,6-tetra-O-acetyl linamarin
phenylalanine
esculamine
mannosyl tryptophan
tryptophan
feruloyl putrescine
luteolin-3'-7'-diglucoside
saponarin
apigenin-7-rutinoside-4'-glucoside
naringenin triglucoside
apioside
apigenin-7-rutinoside
narirutin
온주
원터프린스

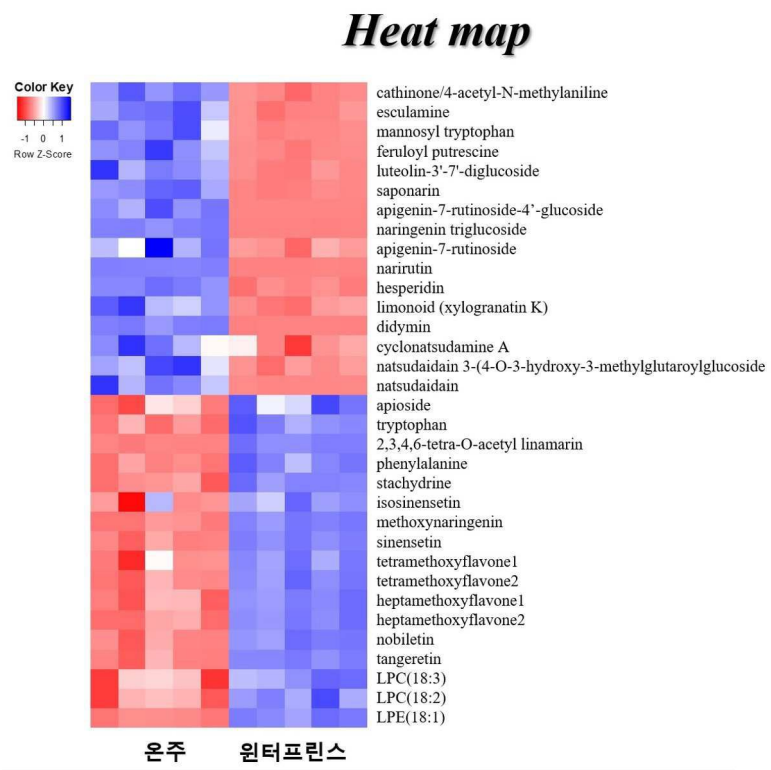
도면5b


Box plot
hesperidin
limonoid (xylogranatin K)
didymin
cyclonatsudamine A
natsudaidain 3-(4-O-3-hydroxy-3-methylglutaroylglucoside
isosinensetin
methoxynaringenin
sinensetin
Tetramethoxyflavone
nobiletin
tetramethoxyflavone
heptamethoxyflavone
natsudaidain
tangeretin
heptamethoxyflavone
온주
원터프린스

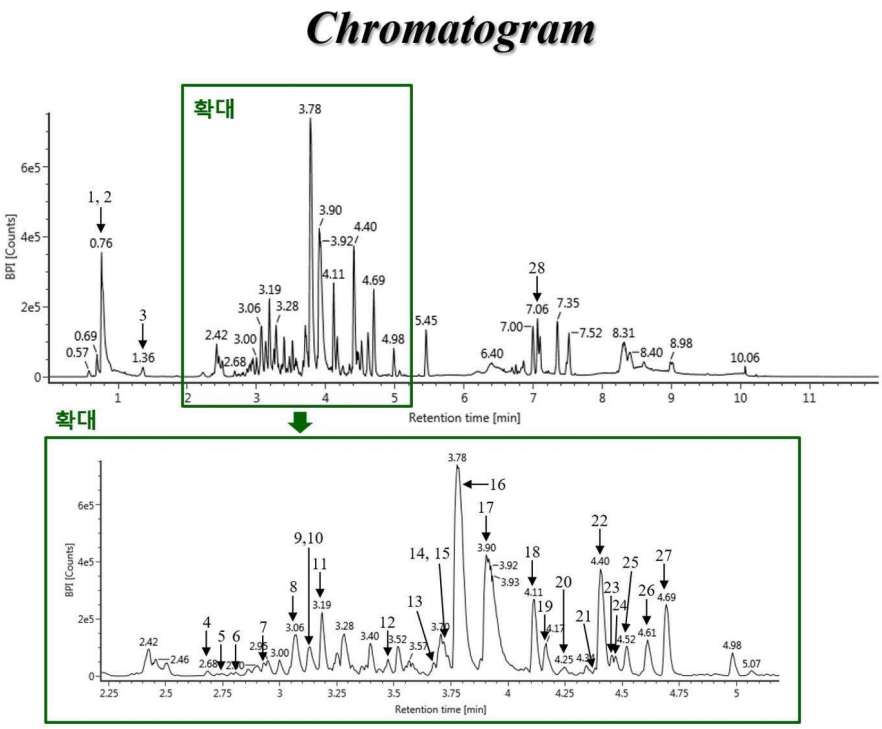
도면5c


Box plot
LPC(18:3)
LPC(18:2)
LPE(18:1)
온주
원터프린스

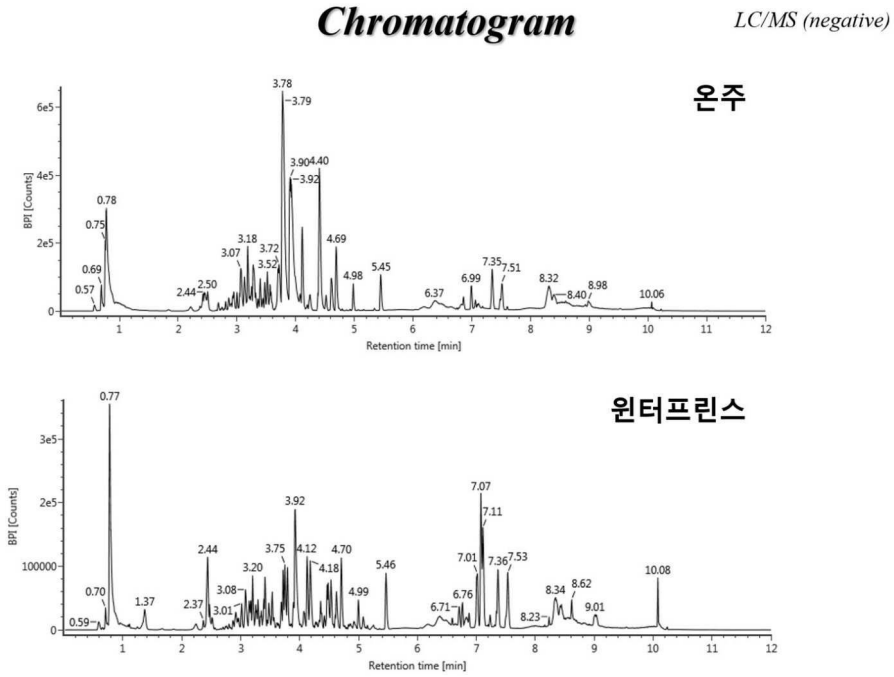
도면6


Heat map
Color Key
-1 0 1
Row Z-Score
cathinone/4-acetyl-N-methylaniline
esculamine
mannosyl tryptophan
feruloyl putrescine
luteolin-3'-7'-diglucoside
saponarin
apigenin-7-rutinoside-4'-glucoside
naringenin triglucoside
apigenin-7-rutinoside
narirutin
hesperidin
limonoid (xylogranatin K)
didymin
cyclonatsudamine A
natsudaidain 3-(4-O-3-hydroxy-3-methylglutaroylglucoside
natsudaidain
apioside
tryptophan
2,3,4,6-tetra-O-acetyl linamarin
phenylalanine
stachydrine
isosinensetin
methoxynaringenin
sinensetin
tetramethoxyflavone1
tetramethoxyflavone2
heptamethoxyflavone1
heptamethoxyflavone2
nobiletin
tangeretin
LPC(18:3)
LPC(18:2)
LPE(18:1)
온주
윈터프린스

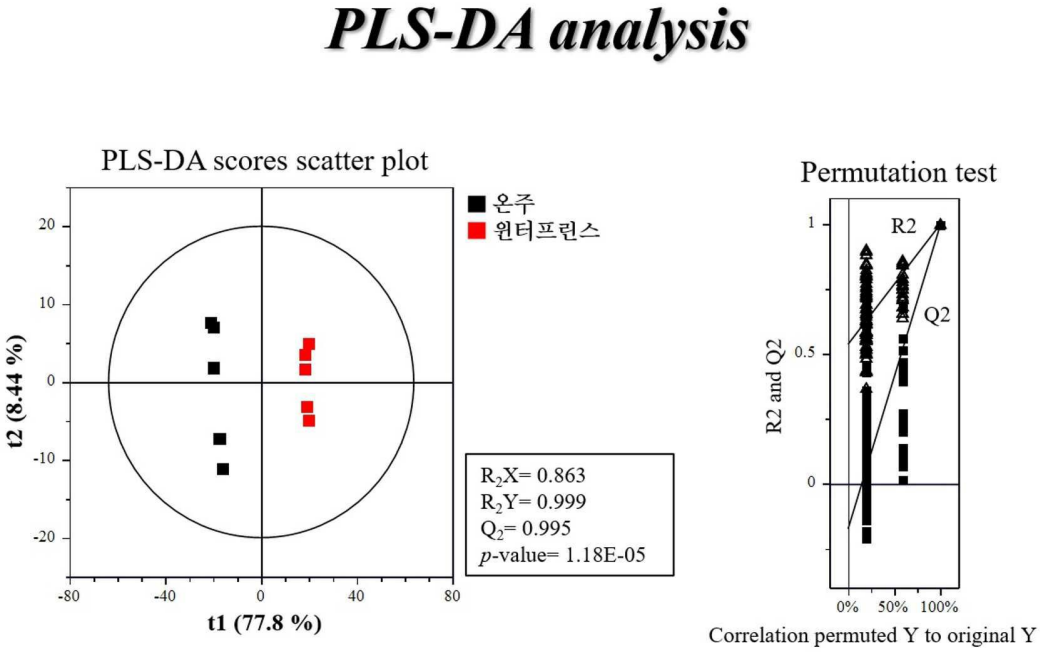
도면7


Chromatogram
확대
BPI [Counts]
Retention time [min]
확대
BPI [Counts]
Retention time [min]

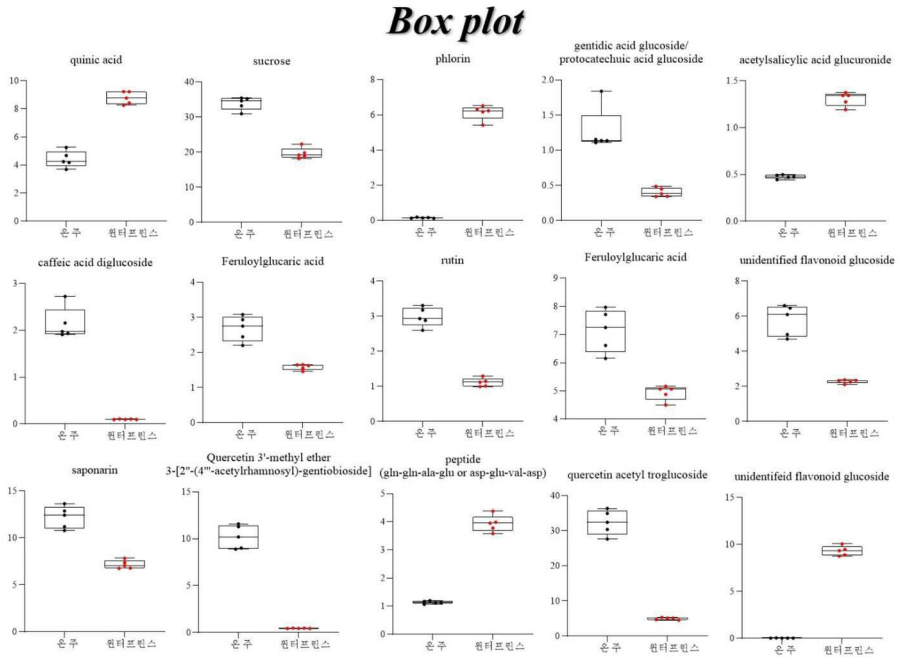
도면8


Chromatogram
LC/MS (negative)
온주
윈터프린스
BPI [Counts]
Retention time [min]

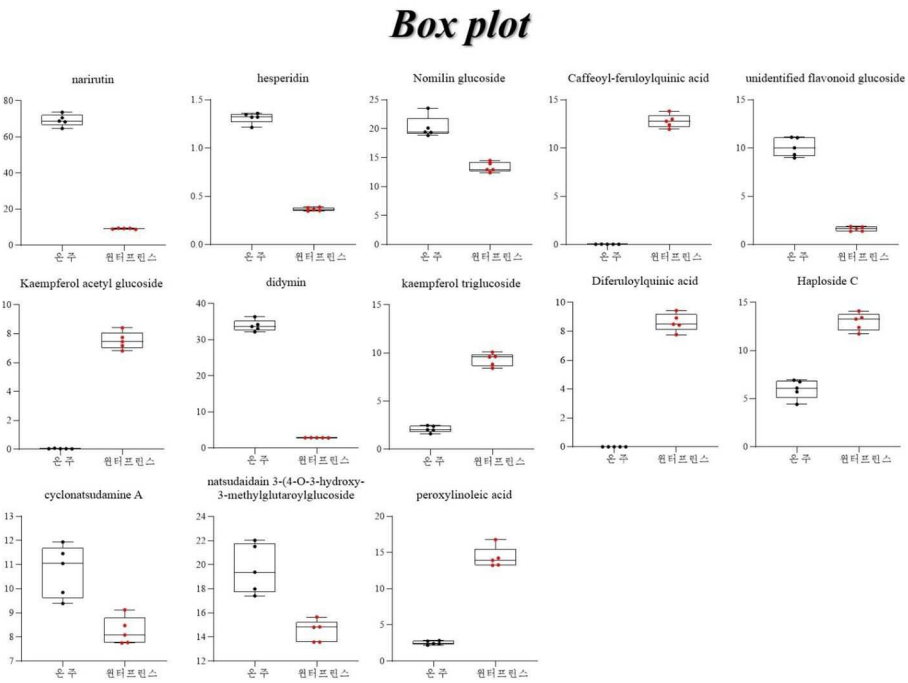
도면9


PLS-DA analysis
PLS-DA scores scatter plot
온주
윈터프린스
t1 (77.8 %)
t2 (8.44 %)
R2X= 0.863
R2Y= 0.999
Q2= 0.995
p-value= 1.18E-05
Permutation test
R2
Q2
R2 and Q2
Correlation permuted Y to original Y

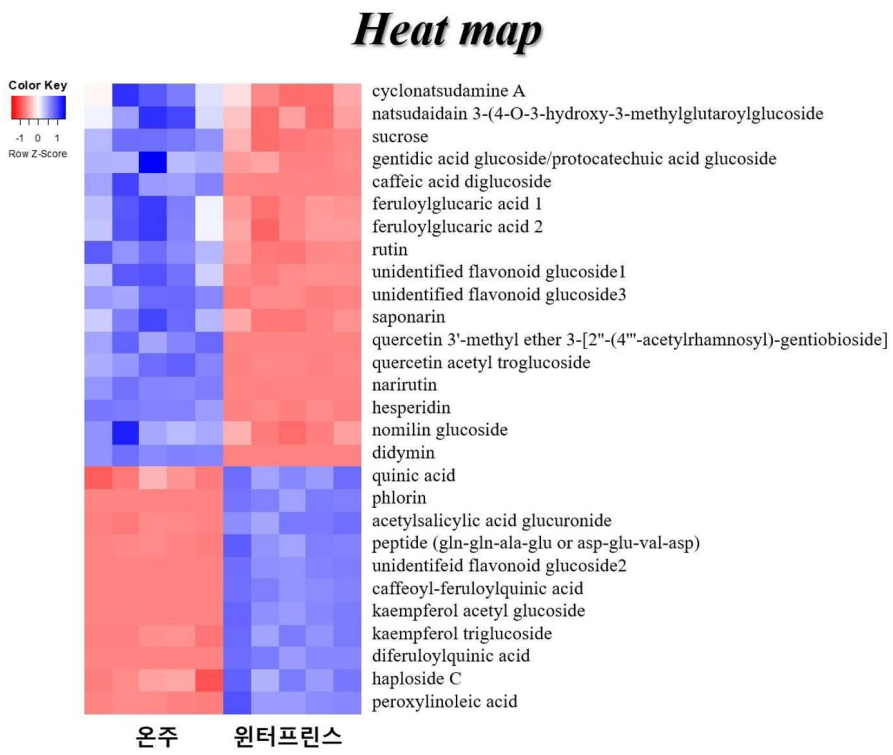
도면10a


Box plot
quinic acid
sucrose
phlorin
gentidic acid glucoside/ protocatechuic acid glucoside
acetylsalicylic acid glucuronide
caffeic acid diglucoside
Feruloylglucaric acid
rutin
Feruloylglucaric acid
unidentified flavonoid glucoside
saponarin
Quercetin 3'-methyl ether 3-[2"-(4"'-acetylrhamnosyl)-gentiobioside]
peptide (gln-gln-ala-glu or asp-glu-val-asp)
quercetin acetyl troglucoside
unidentifeid flavonoid glucoside
온주
원터프린스

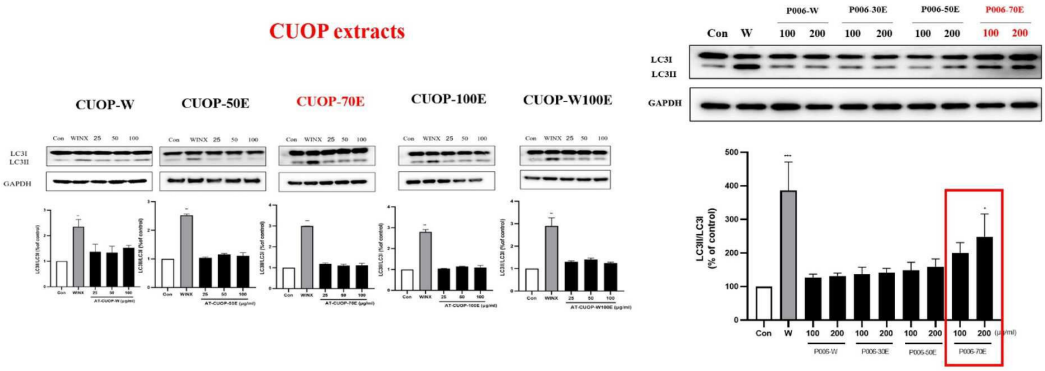
도면10b


Box plot
narirutin
hesperidin
Nomilin glucoside
Caffeoyl-feruloylquinic acid
unidentified flavonoid glucoside
Kaempferol acetyl glucoside
didymin
kaempferol triglucoside
Diferuloylquinic acid
Haploside C
cyclonatsudamine A
natsudaidain 3-(4-O-3-hydroxy-3-methylglutaroyl)glucoside
peroxylinoleic acid
온주
원터프린스

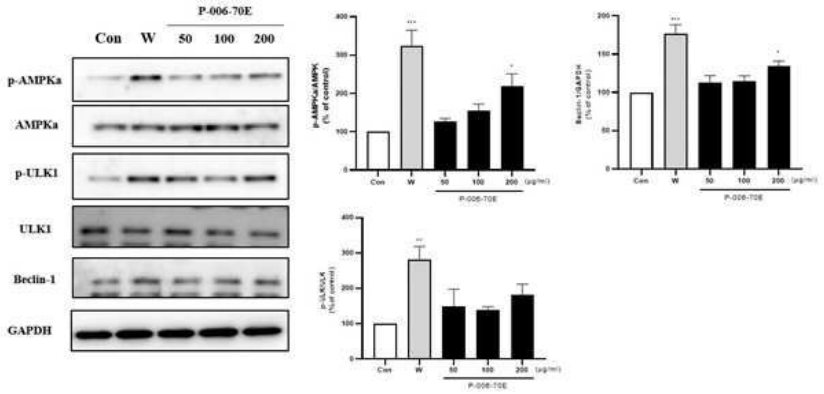
도면11


Heat map
Color Key
-1 0 1
Row Z-Score
cyclonatsudamine A
natsudaidain 3-(4-O-3-hydroxy-3-methylglutaroylglucoside
sucrose
gentidic acid glucoside/protocatechuic acid glucoside
caffeic acid diglucoside
feruloylglucaric acid 1
feruloylglucaric acid 2
rutin
unidentified flavonoid glucoside1
unidentified flavonoid glucoside3
saponarin
quercetin 3'-methyl ether 3-[2"-(4'"-acetylrhamnosyl)-gentiobioside]
quercetin acetyl troglucoside
narirutin
hesperidin
nomilin glucoside
didymin
quinic acid
phlorin
acetylsalicylic acid glucuronide
peptide (gln-gln-ala-glu or asp-glu-val-asp)
unidentifeid flavonoid glucoside2
caffeoyl-feruloylquinic acid
kaempferol acetyl glucoside
kaempferol triglucoside
diferuloylquinic acid
haploside C
peroxylinoleic acid
온주
윈터프린스

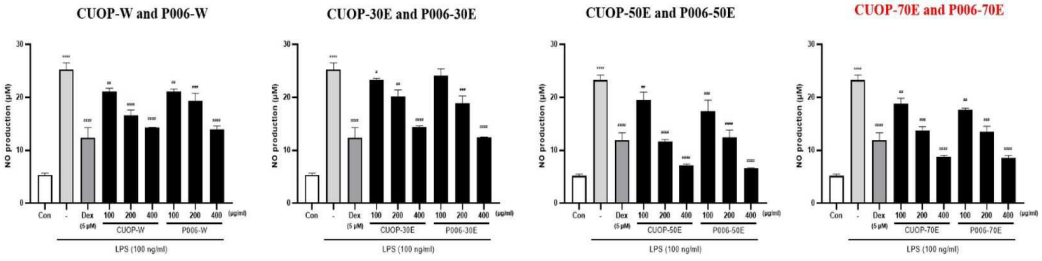
도면12


CUOP extracts
CUOP-W
CUOP-50E
CUOP-70E
CUOP-100E
CUOP-W100E
LC3I
LC3II
GAPDH
Con W 100 200 100 200 100 200 100 200
P006-W
P006-30E
P006-50E
P006-70E
LC3II/LC3I (% of control)

도면13


P-006-70E
Con
W
50
100
200
p-AMPKa
AMPKa
p-ULK1
ULK1
Beclin-1
GAPDH

도면14


CUOP-W and P006-W
CUOP-30E and P006-30E
CUOP-50E and P006-50E
CUOP-70E and P006-70E
NO production (μM)
LPS (100 ng/ml)