



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0044080
(43) 공개일자 2016년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/23 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0138088

(22) 출원일자 2014년10월14일

심사청구일자 2016년04월18일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

오명숙

서울 강남구 삼성로 151, 1동 305호 (대치동, 선경아파트)

박건혁

강원도 횡성군 서원면 압곡리 159-1

김정희

서울특별시 강남구 학동로 68길 20 중앙하이츠 102동 701호

(74) 대리인

이원희

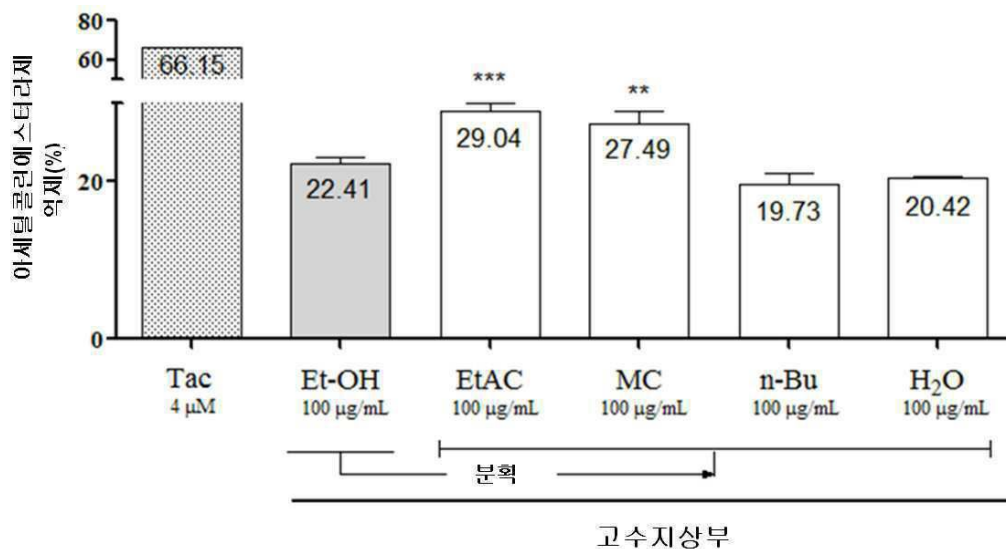
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 고수 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 고수(*Coriandrum sativum* L.; CS) 추출물로부터 제조한 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는, 고수 추출물은 Nrf2의 핵으로 이동 및 항산화 인자들인 HO-1, NQO1 양을 증가시키고, ROS의 과생성을 억제하여 MPP⁺ 독성물질로부터 PC12 세포, BV2 세포 및 중뇌 도파민 세포를 보호하며, 고수 추출물을 유기용매로 분획하여 제조한 분획물은 아세틸콜린에스터라제(Acetylcholin esterase)를 억제하고 세포의 생존율을 유의적으로 증가시키므로, 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료에 용이하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도14



명세서

청구범위

청구항 1

고수(*Coriandrum sativum* L.; CS) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고수 추출물은 고수 지상부(*Coriandrum sativum* L. aerial part; CSE)를 이용하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 고수 추출물은 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 분획물은 고수 추출물을 에틸아세테이트(ethyl acetate(EtOAc)), 메틸 클로라이드(methyl chloride), n-부탄올(n-Butanol) 및 물을 용매로 하여 순차적으로 반복 추출하여 얻어진 에틸아세테이트 분획물, 메틸 클로라이드 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물로 이루어진 군에서 선택되는, 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매(dementia), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 뇌졸중(stroke), 뇌경색(cerebral infarct), 머리외상(head trauma), 뇌동맥 경화증(cerebral arteriosclerosis), 및 파킨슨 질환(Parkinson disease)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 뇌 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 고수 추출물 또는 이의 분획물은 Nrf2의 활성을 경유하여 HO-1 및 NQO1을 포함하는 항산화 단백질 생성을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 고수 추출물 또는 이의 분획물은 ROS 생성 및 도파민세포 사멸을 억제하는 것을 특징으로

하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 고수 추출물 또는 이의 분획물은 NO, iNOS 및 COX-2를 포함하는 염증인자 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 고수 추출물 또는 이의 분획물은 성상세포(astrocytes) 및 미세아교세포(microglia)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 운동완서(bradykinesia)예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경 보호용 약학적 조성물.

청구항 13

고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 14

고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 운동완서 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 15

고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경 보호용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고수(*Coriandrum sativum* L.) 추출물 및 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 퇴행성 뇌질환은 나이가 들어감에 따라 발생하는 퇴행성 질환 중에서도 뇌에서 발생하는 질환을 뜻하며, 주요 증상과 침범되는 뇌부위를 고려해 구분할 수 있는데, 대표적으로 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease)이나 파킨슨 질환 등이 포함된다. 퇴행성 뇌질환은 노화에 따른 신경퇴화와 유전적·환경적 요인들로 인해 단백질이 응집돼 신경세포가 사멸해 야기되는 것으로 알려져 있지만, 아직 정확한 원인은 밝혀지지 않아 원인 규명을 위한 기초 연구가 활발히 진행되고 있는 상황이다.

- [0003] 빠르게 고령화가 진행되고 있는 우리나라의 상황에서 퇴행성 뇌질환 치료제의 개발은 가장 시급한 숙제가 아닐 수 없다. 2026년에는 20%를 넘어 초고령사회에 도달할 것으로 예측되고 있으며, 우리나라뿐만이 아니라 전 세계적으로 퇴행성 뇌질환 문제가 심각하게 부상할 것으로 예상된다. 우리나라의 치매 환자 수도 2010년 47만 명에서 2020년 75만 명이 될 것으로 추정되고 있으며, 뇌혈관질환은 지난 10여년 간 우리나라 주요 사망원인 중 2위를 고수하고 있다.
- [0004] 파킨슨 질환(Parkinson's Disease; PD)은 떨림, 경직, 행동이 느려짐 및 자세 이상증등을 주된 증상으로 하는 질병으로 뇌에서 도파민(dopamine)이라는 신경전달물질이 부족하게 되어 생기는 만성질환이다. 도파민은 뇌의 흑색질(Substantia nigra pars compacta; SNpc)이라는 신경세포에서 생성되며 흑색질의 신경세포는 뇌의 운동피질 및 기타 여러 부위와 복잡하게 연결되어 있어 인체의 운동을 부드럽고 조화있고 정확하게 수행할 수 있도록 해주는 기저핵이라는 부위와 연결되어 있다. 파킨슨 질환은 흑색질에서 기저핵의 기능을 조절하기 위하여 분비되는 물질인 도파민이 부족하여 발병하게 된다.
- [0005] 파킨슨 질환의 증상은 크게 일차적 증상과 이차적 증상으로 나눌 수 있는데 일차적 증상은 경직, 떨림, 몸의 움직임이 느리거나 줄어들고, 몸의 불균형 및 보행 장애 등의 증상들로서 흑색질의 신경세포 파괴로 인하여 생기는 직접적인 현상들을 말하며, 이차적 증상은 일차적 증상으로부터 파생되어 생기거나 흑색질 외의 다른 신경계의 침범에 의하여 생기는 증상들을 지칭한다.
- [0006] 현재 파킨슨 질환의 치료를 위해 사용되고 있는 치료법으로는 약물치료법, 수술치료법 및 물리치료법등이 있는데, 약물치료의 경우, 일반적으로 뇌에서 부족해진 도파민을 보충해주고, 도파민의 부족으로 인한 신경전달물질의 불균형을 맞춰주며, 신경세포의 파괴를 예방 또는 지연시키고자 하는 목적과 기타 우울증 등의 증상을 조절하기 위한 약물들이 사용되고 있으며, 그 예로 아만타딘, 항콜린성 약제, 엘-도파, 씨네메트, 마도파, 도파민 효능제, 엘테프릴 및 항우울제 등이 있다. 그러나 이러한 약물은 죽어버린 신경세포를 다시 살릴 수 없기 때문에 완치를 목적으로 하는 것이 아니라 증상의 조절을 목적으로 한다는 한계가 있다.
- [0007] 파킨슨 질환과 같은 중추 신경계 질환이 유발되는 도파민성 신경세포를 이용하는 연구에서는 카테콜아민성(catecholaminergic) 신경독소인 6-OHDA(6-hydroxydopamine)와 MPP+(1-methyl-4-phenylpyridinium)를 주로 사용한다. 6-OHDA는 도파민과 노르아드레날린(noradrenaline) 재흡수 운반체를 경유하여 뉴론(neuron)으로 들어가는데, 노르아드레날린의 재흡수 억제제로서 작용하며 도파민성 뉴론만을 파괴한다. MPP+는 미토콘드리아에서 산화성 인산화(oxidative phosphorylation)를 방해하고 카테콜아민 합성을 억제하고 도파민 수준을 감소시키는 작용을 하는 독성물질이다. 신경독소인 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)는 MPP+의 전구 물질이고 MAO-B 효소에 의하여 MPP+로 전환된다.
- [0008] 알츠하이머는 가장 흔한 퇴행성 뇌질환으로 알려져 있는 질환이다. 대개 만성적으로 진행성으로 나타나며, 점진적인 기억·판단·언어능력 등 지적 기능의 감퇴와 일상생활능력, 인격, 행동양상의 장애를 보인다. 알츠하이머는 치매의 원인 중 절반 정도를 차지할 정도로 그 비중이 크다. 가장 흔한 치매로서, 전체 치매의 절반정도를 차지하고 있다. 이 치매는 정상세포의 손상으로 아세틸콜린(acetylcholine)이라는 신경전달 물질이 감소되어 기억력, 언어기능, 판단력이 상실되고 성격이 변화되어 결국에는 스스로를 돌볼 수 있는 능력이 상실되는 질환이다.
- [0009] 아세틸콜린은 콜린과 아세트산의 에스테르이다. 수많은 신경계 또는 시냅스와 골격근의 운동신경 종판에서 충격을 전달한다. 신경 충격이 신경 종판에 다다르면 시냅스 주머니 안에 저장되어 있던 아세틸콜린이 방출되고, 시냅스 후세포의 막 또는 근섬유의 종판막에서 수용체와 결합하여 막의 투과성을 변화시키고 발생기 전위를 일으킨다. 만약 신경 충격이 계속 도달하게 되면 그 효과가 축적된다. 아세틸콜린은 아세틸콜린 에스테라아제라는 효소에 의해 분해되므로 아세틸콜린의 수명은 이 효소의 억제제에 의해 연장된다.
- [0010] 아세틸콜린은 혈관 확장제로서 작용하여 심장 박동 및 수축을 감소시켜 심혈관계를 포함한 수많은 신체기관에 영향을 미친다. 또한 위의 연동 운동 및 소화기의 수축 폭을 증가시켜 위장 관계에도 영향을 미치며, 방광의 용량을 감소시키고 방뇨압을 증가시키는 작용을 하여 비뇨계에 영향을 미친다. 또한 호흡계에도 영향을 미치며, 부교감 신경의 신경충격을 전달받는 모든 샘(腺)들도 아세틸 콜린에 의해 분비작용이 촉진된다.
- [0011] 신경분화 연구의 모델로서 사용되는 세포는 PC12, 신경모세포종(neuroblastoma)인 SH-SY5Y 세포 또는 BV2 세포가 있다. 이 중 PC12 세포는 신경성장인자인 NGF(nerve growth factor)를 처리하면 신경세포로 최종 분화(terminal differentiation)한다. 미세아교세포(microglia)인 BV2 세포는 중추신경계(CNS)에 상주하는 면역

세포로 외부의 자극에 의해 활성화되어 면역반응과 염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다

[0012] 신경계 질환을 치료하는 추출물로서 석류, 백년초, 녹차, 블루베리 등이 있고, 네리움(Nerium) 또는 테벤티아(Thevetia)를 사용하여 알츠하이머 질환, 헌팅턴 질환 또는 뇌졸중을 치료할 수 있다는 특허가 개시된바 있다(대한민국 등록번호 1010461260000; 국제 공개번호 WO 2012/071152). 또한, 고수씨 추출물 및 이로부터 분리된 리나로올 화합물이 ACAT의 활성을 저해하여, 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 관상 동맥경화증, 대동맥류, 알츠하이머 질환, 비만, 죽상경화증, 혈관재협착 및 폐색 등과 같은 ACAT-매개 질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있음이 개시되었다(대한민국 출원번호 1020110021504).

[0013] 고수(*Coriandrum sativum* L.)는 산형목에 속하는 식용식물로 호유실, 빈대풀이라고도 불리우며 지중해 동부 연안 원산의 귀화식물로 유럽에서는 소스를 만드는 데 향료로 사용되어 왔다. 한방에서는 열매를 호유자라 하여 건위제·고혈압·거담제로 쓰고 있으며 줄기와 잎을 고수강회·고수김치·고수쌈 등으로 먹는다. 최근에는 고수 세포를 현탁배양하여 뇌대사 증진, 치매예방, 뇌졸중, 머리외상, 뇌동맥 휴유증에 있어서 뇌혈류 개선 및 뇌대사 증진, 면역증진에 효과가 있음을 개시하였다(대한민국 등록번호 1006318470000).

[0014] 뇌신경 세포를 보호하는 상기 추출물들에는 인체의 산화를 막는 물질인 항산화 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 체내에서 활성산소가 만들어지는 과정에서 어떤 화학작용을 하여 활성산소를 제거하는 효소인 항산화 효소로서는 SOD(super oxide dismutase), 카탈라아제(catalase), 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase), HO-1(Heme oxygenase-1) 또는 NQO1(NADH quinone oxidoreductase-1) 등이 있다.

[0015] 이에, 본 발명자들은 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료를 위한 조성물을 개발하기 위해 노력한 결과, 고수 추출물 및 이의 분획물이 뇌신경세포를 보호하고, 항산화 인자의 생성을 증가시키며, 염증인자를 억제하여 항염증 효과를 나타내고, 신경세포 사멸을 억제함을 확인함으로써, 상기 고수 추출물 또는 이의 분획물을 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 고수(*Coriandrum sativum* L.; CS) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 또는 운동완서(bradykinesia) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경 보호용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 아울러, 본 발명의 목적은 고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 또는 운동완서 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경 보호용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고수(*Coriandrum sativum* L.; CS) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 또는 운동완서(bradykinesia) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경 보호용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 아울러, 본 발명은 고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 또는 운동완서 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경 보호용 건강기능식품을 제공한

다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 고수 추출물은 Nrf2의 핵으로 이동 및 항산화 인자들인 HO-1, NQO1 양을 증가시키고, ROS의 과생성을 억제하여 MPP⁺ 독성물질로부터 PC12 세포, BV2 세포 및 중뇌 도파민 세포를 보호하며, 고수 분획물은 아세틸콜린 에스테라제(Acetylcholin esterase) 억제하고 세포의 생존율을 유의적으로 증가시키므로, 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 SH-SY5Y 세포에서의 고수추출물에 의한 Nrf2, HO-1, NQO1 생성 또는 활성화에 대한 효과를 나타낸 도이다.
 도 2는 PC12 세포에서 6-OHDA독성에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 3은 BV2 세포에서의 LPS 염증독성에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 4는 Mesencephalic dopaminergic 세포에서 MPP⁺에 대한 고수추출물 도파민 세포 보호 효과를 나타낸 도이다.
 도 5는 Mesencephalic dopaminergic 세포에서 MPP⁺ 독성에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 6은 Mesencephalic dopaminergic 세포에서 MPP⁺에 의한 증가한 ROS 과생성에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 7은 Mesencephalic dopaminergic 세포에서 MPP⁺에 의한 astrocytes 활성화 및 microglia 활성화 억제 효과 및 염증인자(NO, iNOS, COX-2)에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 8은 MPTP로 유도된 마우스 행동장애에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 9는 MPTP로 유도된 파킨슨병 모델 마우스에서 도파민 세포 보호에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 10은 MPTP로 유도된 글리아 세포에서 S-100 베타 활성화에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 11은 C57/BL 마우스의 SNpc(흑색질) 및 ST(선조체)에서 Nrf2, HO-1, NQO1 생성 또는 활성화에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 12는 MPTP로 유도된 astrocytes 활성화 및 microglia 활성화에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 13은 MPTP로 유도된 caspase-3 활성화에 대한 고수추출물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 14는 아세틸콜린에스테라제(Acetylcholin esterase) 활성화에 대한 고수 분획물의 효과를 나타낸 도이다.
 도 15는 세포생존율에 대한 고수 분획물의 효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0027] 본 발명은 고수(*Coriandrum sativum* L.) 추출물 및 이의 분획물을 유기용매로 분획하여 제조한 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0028] 상기 고수 추출물은 고수 지상부(*Coriandrum sativum* L. aerial part; CSE)를 이용하는 것이 바람직하다.

[0029] 또한, 상기 고수 추출물은 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것이 바람직하고, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하다.

[0030] 상기 분획물은 고수 추출물을 n-헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물로 순차적으로 계통

분획하여 수득한 n-헥산 분획물, 메틸렌클로라이드 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것이 바람직하고 n-헥산 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

- [0031] 상기 고수 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다:
- [0032] 1) 고수(*Coriandrum sativum* L.)에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0033] 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및
- [0034] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.
- [0035] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 고수는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 고수는 전초, 잎, 줄기, 또는 뿌리를 모두 이용할 수 있고, 지상부(*Coriandrum sativum* L. aerial part; CSE)를 이용하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0036] 상기 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C1 내지 C4 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하고, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하며, 70% 에탄올을 이용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 추출 방법으로는 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 및 초음파추출 등을 이용할 수 있으며, 열수추출 방법으로 1회 내지 5회 추출하는 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 추출용매는 건조된 고수 뿌리 중량에 5 내지 15배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고 10배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 40 내지 80℃인 것이 바람직하고 50 내지 60℃인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 2 내지 6시간인 것이 바람직하며, 2시간이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0037] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조를 모두 이용할 수 있으며, 이 중 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 고수 지상부를 물로 세척한 후, 그늘 및 실온에서 7일간 건조시켰다. 건조된 고수 지상부를 분쇄하여 추출용기에 넣고, 추출용매로 50 ~ 60℃에서 2시간 동안 추출하였다. 고수 추출물을 수득한 후, 거름종이 등을 이용하여 고형분을 제거하고 현탁액을 원심분리하여 상층액을 감압 여과하였다. 상기 추출액을 감압농축하고 동결건조시켜 고수 추출물을 제조하였다.
- [0039] 상기 고수 추출물의 분획물은 고수 추출물에 추가로 용매를 가하여 분획물을 제조하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0040] 상기 분획물은 상기 고수 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회, 바람직하게는 3회 반복하여 수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0041] 상기 고수 추출물 또는 이의 분획물은 Nrf2의 활성을 경유하여 HO-1 및 NQO1을 포함하는 항산화 단백질 생성을 촉진시키고, ROS 생성 및 도파민세포 사멸을 억제하며, NO, iNOS 및 COX-2를 포함하는 염증인자 생성을 억제한다.
- [0042] 또한, 상기 고수 추출물 또는 이의 분획물은 정상세포(astrocytes) 및 미세아교세포(microglia)의 활성을 억제한다.
- [0043] 상기 퇴행성 뇌질환은 치매(dementia), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 뇌졸중(stroke), 뇌경색(cerebral infarct), 머리외상(head trauma), 뇌동맥 경화증(cerebral arteriosclerosis), 및 파킨슨 질환(Parkinson disease)으로부터 선택된다.
- [0044] 아울러, 본 발명은 고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경 보호용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 고수 추출물은 항산화 효과를 확인한 결과, SH-SY5Y 세포에서 항산화 인자(HO-1 및 NQO1) 생성을 증가시킴을 확인하였고(도 1 참조), PC12 세포에서 6-OHDA(6-hydroxydopamine)으로부터 세포를 보호하는지를 조사한 결과, 세포 보호효과를 나타냄을 확인하였다(도 2 참조). 또한, 마우스의 미세아교

세포(microglia cell)인 BV2 세포에서 LPS(lipopolysaccharide)에 의한 염증독성을 보호할 수 있는지를 조사한 결과, 니트릭 옥사이드(NO)의 양이 감소함을 확인하였다(도 3 참조). 중뇌 도파민 세포에서 MPP⁺로 유도된 세포를 고수 추출물이 보호하는지를 TH(tyrosine hydroxylase) 분석, 젖산탈수효소(lactate dehydrogenase; LDH) 분석 및 ROS 분석을 이용하여 조사한 결과, 세포 보호효과를 나타냄을 확인하였고(도 6 참조), 정상세포 활성화 및 미세아교세포 활성화와 염증인자를 억제함을 확인하였다(도 7 참조). 마우스로부터 얻은 도파민 세포에서 보호 효과(도 9 참조), 정상세포 및 미세아교세포의 활성화 억제 효과(도 10 참조), 항산화 억제 효과(도 11 참조), 염증인자 억제 효과(도 12 참조), 및 세포사멸 억제 효과(도 13 참조)를 각각 확인하였다. 아울러, 고수분획물을 이용하여 아세틸콜린 에스터라제(Acetylcholin esterase)에 대한 억제효과를 조사한 결과, 에틸렌 아세테이트(EtAC) 분획물 및 메틸렌 아세테이트(MC) 분획물이 아세틸콜린에스터라제를 억제함을 확인하였고(도 14 참조), 6-OHDA가 처리된 세포에서 EtAC 고수 분획물, MC 고수 분획물 또는 n-부탄올(n-Bu)이 처리된 세포는 70% 에탄올 고수 추출물이 처리된 세포보다 세포생존율이 증가함을 확인하였다(도 15 참조).

[0046] 따라서, 본 발명의 고수 추출물은 Nrf2의 핵으로 이동 및 항산화 인자들인 HO-1, NQO1 양을 증가시키고, ROS의 과생성을 억제하여 MPP⁺ 독성물질로부터 PC12 세포, BV2 세포 및 중뇌 도파민 세포를 보호하며, 고수 분획물은 아세틸콜린에스터라제(Acetylcholin esterase) 억제하고 세포의 생존율을 유의적으로 증가시키므로, 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명은 유효성분으로 함유하는 운동완서(bradykinesia) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명의 구체적인 실시예에서, MPTP로부터 유도된 마우스의 행동장애에 대한 고수추출물의 보호효과를 조사하기 위하여 폴 검사(pole test) 및 회전봉 검사(Rotarod test)를 수행한 결과, 행동장애가 개선됨을 확인하였다(도 8 참조).

[0049] 따라서, 본 발명의 고수 추출물은 MPTP로부터 유도된 마우스의 행동장애를 개선함으로써, 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0050] 이에, 본 발명의 고수 추출물로부터 제조된 분획물은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0051] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0052] 경구투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡셀제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol) 약학폴리에틸렌 글리콜약학올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로글, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제, 향미제 및 희석제등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 상기 붕해제로는 전분글리콜산나트륨, 크로스포비돈, 크로스카멜로스나트륨, 알긴산, 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 카르복시 메틸셀룰로오스 나트륨, 키토산, 구아검, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 폴

라크틸린 칼륨 등이 있다.

- [0054] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨, 탈크 등이 사용될 수 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 약학적 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하다.
- [0056] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 본 발명의 분획물을 0.0001 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.
- [0058] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 고수 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 조성물은 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 고수 추출물을 유기용매로 분획하여 제조한 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료 방법을 제공한다.
- [0061] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.
- [0062] 상기 투여방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0063] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 이에 한정하지 않는다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0064] 본 발명은 고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 또는 운동완서 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0065] 또한, 본 발명은 고수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경 보호용 건강기능식품을 제공한다.
- [0066] 상기 퇴행성 뇌질환은 치매(dementia), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 뇌졸중(stroke), 뇌경색(cerebral infarct), 머리외상(head trauma), 뇌동맥 경화증(cerebral arteriosclerosis), 및 파킨슨 질환(Parkinson disease)으로부터 선택된다.
- [0067] 따라서, 본 발명의 고수 추출물은 Nrf2의 핵으로 이동 및 항산화 인자들인 HO-1, NQO1 양을 증가시키고, ROS의 과생성을 억제하여 MPP^+ 독성물질로부터 PC12 세포, BV2 세포 및 중뇌 도파민 세포를 보호하며, 고수 분획물은 아세틸콜린에스테라제(Acetylcholin esterase) 억제하고 세포의 생존율을 유의적으로 증가시키므로, 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 추출물 및 분획물이 상기와 같은 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선을 위해 이용되기 위해서는, 식품학 또

는 약제학적 분야에서 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있으며 그 자체 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 경구로 섭취할 수 있는 어떤 식품 형태로도 제조될 수 있다. 바람직하게는 음료, 환, 과립, 정제 또는 캡슐 형태이다.

[0069] 본 발명의 건강기능식품은, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되고 식품학적으로 허용되는 성분을 더 포함할 수 있다. 예컨대, 음료수로 제조되는 경우에는 본 발명의 화합물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등에서 하나 이상의 성분을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0070] 본 발명에 따른 건강기능식품의 유효성분으로 포함될 수 있는 양은 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선을 원하는 사람의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 g 내지 10.0 g 정도로 포함되는 것이 좋으며, 이러한 함량을 갖는 건강기능식품을 섭취함으로써 퇴행성 뇌 질환 예방 및 개선 효과를 얻을 수 있다.

[0071] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0072] 상기 외에 본 발명의 고수 추출물의 분획물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0073] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0074] <실시예 1> 고수 추출물의 제조

[0075] 고수(*Coriandum sativum*. L; CS)는 미나리과에 속하는 단년생이고, 하기의 실험을 위해서 아시아마켓에서 구입하였다(Inchon, Korea). 고수의 지상부(CS aerial part; CSE)는 시료의 10배 양의 70% 에탄올을 사용하여 상온에서 5분간 혼합하였고, 감압여과하여(Whatman filter paper #2) 건조 분말화하였으며 4%의 수득물을 나타냈다. 이 후 -20℃에서 보관하였고, 실험시 용시조제하여 사용하였다.

[0076] <실시예 2> 고수 추출물로부터 분획물의 제조

[0077] <2-1> 유기용매 분획물의 제조

[0078] 상기 고수 추출물로부터 분획물을 제조하기 위하여, 상기 <실시예 1>의 방법에 따라 건조된 고수 지상부(CSE)로부터 70% 에탄올 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 5 l의 물(H₂O)에 현탁한 후, 다시 현탁액과 동량의 n-헥산(n-hexane, Hx)을 가하고 물층과 Hx층으로 분리되도록 방치하였다. 화학평형이 이루어진 후 Hx층을 분리하고 다시 새로운 동량의 Hx를 부어서 물층과 Hx층으로 분리되도록 방치하였다. 상기 층분리 과정을 3회 반복하여 수득한 Hx층을 감압 농축하여 Hx 분획물(0.9 g)을 수득하였다. 상기과 동일한 방법으로, Hx 분획물을 분리하고 남은 물층에 용매의 극성에 따라 메틸렌클로라이드(methylene chloride, dichloromethane, MC), 에틸아세테이트(ethyl acetate, EA), n-부탄올(n-butanol, BuOH), 물(H₂O) 순으로 계통분획 추출을 함으로써 고수 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물 분획물을 제조하였다.

[0079] <2-2> 메탄올 분획물의 제조

- [0080] 상기 고수 추출물로부터 분획물을 제조하기 위하여, 상기 <실시에 1>의 방법에 따라 건조된 고수 지상부로부터 70% 에탄올 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 0.5 ℓ의 메탄올(MeOH)에 현탁한 후, Amberlite XAD-4를 이용하여 100% 물(100% H₂O)과 100% MeOH 분획물(100% MeOH)을 각각 수득하였다.
- [0081] <실시에 3> 통계처리
- [0082] 본 발명의 통계처리는 GraphPad Prism 프로그램을 사용하여 실시하였으며, ANOVA(one-way analysis of variance)를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.
- [0083] <실험예 1> SH-SY5Y 세포에서 고수 추출물의 항산화 인자 생성 증가 확인
- [0084] 신경모세포종(neuroblastoma)인 SH-SY5Y 세포에서 고수 추출물에 의한 Nrf2, HO-1, NQO1 생성 또는 활성 촉진 효과를 조사하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0085] 구체적으로, SH-SY5Y 세포에서 핵분리 키트(Nuclear/Cytosol Fractionation Kit, Vision)를 사용하여 마우스의 조직을 세포질과 핵으로 나누어 웨스턴 블랏하였다.
- [0086] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 SH-SY5Y 세포에서 고수 추출물을 100 µg/ml 농도로 처리하였을 때 Nrf2가 핵으로 이동하는 것이 증가하였고 하위 항산화 인자들인 HO-1, NQO1 양이 증가함을 확인하였다(도 1).
- [0087] <실험예 2> 고수 추출물의 PC12 세포 보호 효과 확인
- [0088] 래트(rat)의 부신수질(adrenal medulla)에서 발생한 크롬친화세포종(pheochromocytoma)에서 유래된 세포주인 PC12 세포에서, 고수 지상부(CSE) 추출물이 신경독소인 6-OHDA(6-hydroxydopamine)으로부터 세포를 보호할 수 있는지를 조사하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0089] 구체적으로, PC12 세포를 96-웰 플레이트에 2x10⁴ 세포/웰로 분주한 후 하루 동안 배양하였다. CSE 추출물을 FBS 없는 DMEM 배지로 희석하여 농도별(0, 10, 100 µg/ml)로 전처리한 후, 6-OHDA(75 µM)를 처리(도 1B)) 또는 비처리(도 1A)하여 배양하였다. 1 mg/ml의 MTT처리 2시간 후, DMSO로 포르마진(formazan)을 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0090] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, PC12 세포에서 고수 추출물을 단독으로 처리하였을 때 세포 생존율에 전혀 영향을 미치지 않았다(도 2A). 또한, 고수 추출물을 전처리한 후 6-OHDA를 처리하였을 때는, 6-OHDA를 단독처리하여 약 50%의 세포 생존율을 나타낸 것과 비교하여 CSE 10, 100 µg/ml 처리에 대하여 각각 약 60%, 90% 세포 생존율을 나타냄으로써 6-OHDA의 독성에 대한 세포 보호효과를 나타냄을 확인하였다(도 2B).
- [0091] <실험예 3> 고수 추출물에 의한 BV2 세포 보호 효과 확인
- [0092] 고수 지상부(CSE) 추출물이 마우스(mouse)의 신경 지지세포 형태로서 미세아교세포(microglia cells)인 BV2 세포에서 LPS(lipopolysaccharide)에 의한 염증독성을 보호할 수 있는지를 조사하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0093] 구체적으로, BV2 세포를 96-웰 플레이트에 3x10⁴ 세포/웰로 분주한 후 1일 동안 배양하였다. CSE 추출물을 FBS 없는 DMEM 배지로 희석하여 농도별(0, 10, 100 µg/ml)로 전처리한 후, LPS(100 µg/ml)를 처리 또는 비처리하여 배양하였다. 1 mg/ml의 MTT처리 2시간 후, DMSO로 포르마진을 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율 및 니트릭 옥사이드(Nitric Oxide; NO)를 계산하였다.
- [0094] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 BV2 세포에서 CSE 추출물을 전처리한 후 LPS를 처리한 결과 세포생존율에 영향을 미치지 않았다(도 3A). 또한 LPS독성에 의해 생성된 니트릭 옥사이드(NO)의 양은 고수 추출물에 의해 감소함을 확인하였다(도 3B).

- [0095] <실험예 4> 고수 추출물에 의한 중뇌 도파민 세포(Mesencephalic dopaminergic cells) 보호 효과 확인
- [0096] <4-1> 중뇌 도파민 세포 배양
- [0097] 스프라그-다우레이 래트(Sprague-Dawley rats)(Orient Bio., Osan, Korea) 의 14일째 배아(embryo)에서 중뇌(mesencephalon) 부위만 분리한 후, 기계적으로 분해하여 세포를 얻었다. 폴리-L-라이신(Poly-L-lysine)으로 미리 코팅한 플레이트에 세포를 분주한 후 7일 동안 배양하였다. 최소필수배지(minimal essential medium)에 고수 지상부(CSE)를 농도별(0, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리 1시간 후, MPP^+ (1-methyl-4-phenylpyridinium)(15 μM)를 처리하여 총 24시간까지 배양하였다.
- [0098] <4-2> TH(tyrosine hydroxylase) 분석
- [0099] 고수지상부 추출물(CSE)이 중뇌 도파민 세포에서 MPP^+ 에 의해 세포를 보호할 수 있는 지를 조사하기 위하여 하기와 같은 실험을 실행하였다.
- [0100] 구체적으로, 중뇌 도파민 세포에 CSE와 도파민 작용제(dopamine agonist)인 로피니롤(Ropinirole)을 1시간 전처리한 후 MPP^+ (15 M) 독성을 주고 23시간 더 배양 하였다. 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 이용하여 세포를 고정한 후, 래빗(rabbit) 안티-티로신 수산화 효소(tyrosine hydroxylase)(TH) 으로 염색하여 100배 비율의 현미경 상에서 TH-양성(positive) 세포 수를 측정하였다.
- [0101] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 중뇌 도파민 세포에서 MPP^+ 에 의해 손상된 도파민 세포는 고수 추출물 전처리에 의해 보호됨으로써, CSE가 도파민 세포 보호 효과를 나타냄을 확인하였다(도 4).
- [0102] <4-3> 젖산탈수효소(lactate dehydrogenase; LDH) 분석
- [0103] 고수지상부 추출물(CSE)이 중뇌 도파민 세포에서 MPP^+ 에 의한 독성 중의 하나인 LDH로부터 보호할 수 있는지를 조사하기 위하여 하기와 같은 실험을 실행하였다.
- [0104] 구체적으로, 중뇌 도파민 세포에 CSE를 전처리하고 MPP^+ (15 μM) 또는 도파민 작용제(dopamine agonist)인 로피니롤(Ropinirole)을 처리(1 μM)하였다. 배양액을 회수하여 바이오워드 LDH 분석 키트(bioworld LDH assay kit)을 이용하여 LDH를 측정하였다(CytoScan™ LDH-cytotoxicity assay kit, Bioworld).
- [0105] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 MPP^+ 에 의해 생성된 LDH의 양이 고수 추출물 전처리에 의해 감소함을 확인하였다(도 5).
- [0106] <4-4> ROS 분석
- [0107] 고수지상부 추출물(CSE)이 중뇌 도파민 세포에서 MPP^+ 에 의한 독성중의 하나인 ROS 생성을 억제할 수 있는지를 조사하기 위하여 하기와 같은 실험을 실행하였다.
- [0108] 구체적으로, 중뇌 도파민 세포에 CSE를 전처리하고 MPP^+ 또는 로피니롤을 상기 실험예 <4-1> 및 <4-2>와 같이 동일한 농도로 처리한 후 배양하였다. 25 M HDCF-DA를 넣고 30 분 배양한 후, 형광 여기파장(excitation) 480 nm, 방출파장(emission) 530 nm에서 측정하였다.
- [0109] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 고수 추출물은 MPP^+ 에 의해 증가한 ROS의 과생성을 농도의존적으로 억제함으로써 유의한 세포 보호효과를 나타냄을 확인하였다(도 6).
- [0110] <4-5> 고수 추출물의 성상세포(astrocytes) 활성화 및 미세아교세포(microglia) 활성화에 대한 억제 효과 확인
- [0111] 중뇌 도파민 세포에서 MPP^+ 에 의한 성상세포(astrocytes) 활성화 및 미세아교세포(microglia) 활성화에 대한 고수

추출물의 효과를 조사하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0112] 구체적으로, 중뇌 도파민 세포에서 CSE를 전처리하고 MPP^+ 또는 로피니롤을 상기 실험에 <4-2>와 같이 동일한 농도로 처리한 후 배양하였다. 정상세포의 활성을 측정하기 위하여 정상세포의 중심 뇌 신경 시스템에서 발현되는 GFAP(Glial fibrillary acidic protein)를 항체를 이용하여 염색하였다. 또한 미세아교세포 활성을 측정하기 위하여 CD11b(integrin α_{II}) 및 CD18(integrin β_2)로 구성된 CR3(complement receptor)인 MAC-1(Macrophage-1)을 항체를 이용하여 염색하였다.(사용한 염색방법을 간략히 알려주시기 바랍니다)

[0113] 그 결과, 도 7A에 나타난 바와 같이 고수 추출물은 MPP^+ 에 의해 증가한 정상세포 활성 및 미세아교세포 활성을 억제함을 확인하였다(도 7A).

[0114] <4-6> 고수 추출물의 염증인자에 대한 억제 효과 확인

[0115] 중뇌 도파민 세포에서 MPP^+ 에 의한 염증인자, 예를 들면, NO, iNOS, COX-2,에 대한 고수 추출물의 효과를 조사하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0116] 구체적으로, 중뇌 도파민 세포에 CSE를 전처리하고 MPP^+ 또는 로피니롤을 처리한 후 배양하였다. 세포 배양액을 수득하여 배양액에 그리스시약을 동량으로 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산나트륨을 이용해 표준곡선을 그려 니트릭옥사이드(NO) 농도를 계산하였다.

[0117] 또한, 반응이 끝난 세포를 수득하여 용해버퍼(lysis buffer)로 녹인후 총 단백질을 정량하여 전기영동하였다. 젤을 멤브린으로 트랜스퍼 하고 iNOS, COX-2, GFAP, MAC-1, 및 β -actin 항체를 이용하여 단백질 발현을 측정하였다.

[0118] 그 결과, 도 7B 및 7C에 나타난 바와 같이 MPP^+ 에 의해 증가된 NO는 CSE에 의해 농도 의존적으로 감소하였고(도 7B), 또한 MPP^+ 에 의해 증가된 iNOS, COX-2, GFAP, 및 MAC-1 단백질은 CSE(10 μ g/ml)에 의해 단백질 양이 감소됨을 확인하였다(도 7C).

[0119] <실험예 5> 고수 추출물에 의한 마우스 내의 세포보호 효과 확인

[0120] <5-1> 마우스 배양

[0121] 수컷 C57BL/6 마우스(8 주령, 21-23g)을 분양받아 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 10\%$ 에서 밤과 낮을 12 시간씩 조절하였다. 물과 일반식이를 충분히 공급하면서 7일 동안 동물실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다. CSE(100 mg/kg)를 6일 동안 하루에 한번 경구투여하고, 3일째 경구투여 2시간 후 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)를 급성방법으로 2시간 간격으로 20 mg/kg씩 4회 복강투여 하여 파킨슨병 유사모델을 유발하도록 하였다.

[0122] <5-2> 동작 테스트(Behavioral test)

[0123] MPTP로부터 유도된 마우스의 행동장애에 대한 CSE의 보호효과를 조사하기 위하여, 폴 검사(pole test) 및 회전봉 검사(Rotarod test)를 실시하였다.

[0124] 구체적으로, 폴 검사를 위하여 MPTP(20 mg/kg) 투여 후 마지막 7일째 되는 날에 55 cm높이에서 0.8 cm의 폭을 가진 막대기 위에서 하늘을 향하여 마우스를 올려놓은 뒤 마우스가 180° 회전하는 시간(T-turn time)과 돌아서 바닥에 내려오는 시간(T-I, A time)을 측정하도록 하였다. 또한, MPTP로 유발된 마우스의 운동결손과 균형유지를 평가하기 위해 회전봉 검사(Rotarod test)를 하였다. 검사에 사용한 로타로드 장치는 직경이 7cm이고 15 cm 간격, 높이 60cm의 칸막이가 5개로 구성되어 있는 회전이 가능한 원통형의 봉이다. 로타로드로 20rpm 속도로 회전하는 봉 위에 마우스를 올려놓고 낙하하기까지 걸린 시간(Latency time; sec)을 측정하였다. 모든 마우스는 MPTP 약물 투여 전에 로타로드에서 훈련을 하고, 약물 투여 후 충분한 훈련을 하고 실험을 하여 평균값을 보행 시간으로 정하였다.

- [0125] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, MPTP를 처리한 군에 비해 CSE 처리군의 행동장애가 개선됨을 확인하였다(도 8).
- [0126] <5-3> MPTP로 유도된 파킨슨병 마우스 모델에서 CSE에 의한 도파민 세포 보호 효과 확인
- [0127] MPTP에 의해 유도된 도파민 세포 손상에 대한 CSE의 효과를 평가하기 위하여 파킨슨병 유사모델인 MPTP가 처리된 마우스를 이용하여 면역염색법을 수행하였다.
- [0128] 구체적으로, 마우스의 조직적출을 폴 검사(pole test)를 마친 후에 실시하였다. 각 군의 마우스를 마취하고 관류 및 4% PFA로 뇌조직을 고정시켰다. 후고정과정을 거친 뇌조직을 동결박편기를 이용하여 30 μ m 두께로 절편하였고 선조체(ST)와 흑색질(SNpc) 부분의 조직을 TH, GFP, iNOS, COX-2, 및 NQO1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1) 항체를 이용하여 면역염색 과정을 거쳐 디아민벤지딘(Diaminobenzidine)을 이용하여 발색하였다. 선조체에서 TH 양성세포 광학밀도와 흑색질에서 TH 양성세포수를 세어 CSE의 효과를 평가하였다.
- [0129] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이 C57/BL 마우스의 SNpc(흑색질) 및 ST(선조체)에서 MPTP로 유도된 도파민세포 손상으로 인하여 감소된 PH 양성세포 수와 비교하여 CSE를 처리하였을 때 PH 양성세포 수가 증가함을 나타냄으로써 세포보호효과를 나타냄을 확인하였다(도 9).
- [0130] <5-4> MPTP로 유도된 파킨슨병 마우스 모델에서 CSE에 의한 성상세포 및 미세아교세포의 활성화 억제 확인
- [0131] MPTP로 유도된 성상세포(astrocytes) 및 미세아교세포(microglia)의 활성화에 대한 CSE의 효과를 조사하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0132] 구체적으로, 상기 실험에 <5-3>에서 사용한 동일한 방법으로 절편한 뇌의 흑색질 부분의 조직을 GFAP 및 S-100 베타 항체를 이용하여 면역염색 과정을 거쳐 형광염료를 이용하여 발색하여 글리아세포의 활성화와 S-100 베타에 대한 CSE의 보호효과를 평가하였다.
- [0133] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이 흑색질에서 성상세포와 S-100 베타의 양을 현미경상에서 확인할 수 있으며, MPTP에 의해 증가된 글리아세포의 활성화, S-100 베타 활성이 CSE에 의해 유의하게 억제되어 보호효과를 나타냄을 확인하였다(도 10).
- [0134] <5-5> MPTP로 유도된 파킨슨병 마우스 모델에서 CSE에 의한 항산화 억제 효과 확인
- [0135] MPTP로 유도된 마우스에서 항산화 인자인 Nrf2, HO-1(Heme oxygenase-1), NQO1(NADH quinone oxidoreductase 1)에 대하여 CSE의 효과를 조사하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0136] 구체적으로, 상기 실험에 <5-1>의 동일한 방법인 MPTP로 유도된 C57/BL 마우스의 SNpc(흑색질) 및 ST (선조체)에서 고수 추출물(100 mg/kg)에 의한 Nrf2, HO-1, NQO1 생성 또는 활성화에 대한 효과를 웨스턴 블랏 및 면역염색을 통하여 조사하였다. 또한 Nrf2의 이동을 조사하기 위하여 핵분리 키트(Nuclear/Cytosol Fractionation Kit, Vision)를 사용하여 마우스의 조직을 세포질과 핵으로 나누어 웨스턴 블랏하였다.
- [0137] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이 마우스의 흑색질 및 선조체에서 고수 추출물을 100 mg/kg 농도로 처리하였을 때, Nrf2의 이동 및 하위 항산화 인자인 HO-1, NQO1의 양이 증가함을 확인하였다(도 11).
- [0138] <5-6> MPTP로 유도된 파킨슨병 마우스 모델에서 CSE에 의한 염증인자 억제 효과 확인
- [0139] MPTP로 유도된 염증인자인 iNOS, COX-2에 대하여 CSE의 효과를 조사하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0140] 구체적으로, 상기 실험에 <5-1> 및 <5-3>에서 사용한 동일한 방법으로 마우스에 약물처리 및 조직을 절편하고 iNOS 및 COX-2 항체를 이용하여 염색 및 웨스턴 블랏하였다.
- [0141] 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이 MPTP에 의한 iNOS, COX-2 단백질 증가에 대하여, CSE는 각각의 단백질 양을 감소시켰다(도 12).

[0142] <5-7> MPTP로 유도된 파킨슨병 마우스 모델에서 CSE에 의한 세포사멸 억제 효과 확인

[0143] MPTP로 유도된 세포사멸이 CSE에 의해 억제되는지를 조사하기 위하여, 케스페아제 3(caspase-3)의 활성을 측정하였다.

[0144] 구체적으로, 상기 실험에 <5-1>의 동일한 방법으로 C57/BL 마우스에 CSE(100 mg/kg), 로피니롤(1 mg/kg), MPTP(20 mg/kg)를 처리한 후 뇌조직을 취하여 용해버퍼를 이용하여 용해시켰다. 단백질을 정량한 후 바이오비전 케스페아제-3 키트를(Biovision caspase-3 kit)을 이용하여 DEVD 절단 활성(DEVD cleavage activity)를 측정하였다.

[0145] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 MPTP에 의해 증가한 케스페아제-3 활성은 고수 추출물에 의해 억제 효과를 나타냄으로써 고수 추출물은 세포사멸을 억제함을 확인하였다(도 13).

[0146] <실험예 6> 고수분획물에 의한 아세틸콜린에스테라제(Acetylcholin esterase) 억제 효과 확인

[0147] 상기 <실시예 2>의 다양한 고수분획물을 이용하여 아세틸콜린 에스테라제(Acetylcholin esterase)에 대한 억제효과를 조사하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0148] 구체적으로, 아세틸콜린에스테라제 저해 활성 측정은 아세틸콜린 아이오다이드(acetylcholine iodide)를 기질로 사용하여 측정하였다. 효소는 PC12 세포배양액 1 ml에 균질화를 위한 버퍼(1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 혼합액에 10 mM Tris-HCl로 pH 7.2로 조정) 5 ml를 첨가하여 글라스-콜 호모게나이저(Glass-Col homogenizer)로 균질화하였다. 균질화된 세포배양액을 10,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하였으며, 그 상정액을 효소실험을 위하여 사용하였다. 모든 추출공정은 4℃에서 수행하였으며, 추출한 효소액의 단백질 함량을 측정하기 위하여 BCA 키트(bicin-choninic acid; Sigma Co., St. Louis, Mo, USA)를 이용하였고, 소혈청 알부민(vine serum albumin)으로 작성한 검량곡선에 준하여 함량을 환산하였다. 정제효소(단백질 함량: 2.38 mg/mL) 10 μl에 추출물 10 μl를 넣어 37℃에서 15분간 반응시켰으며, 반응 혼합물에 50 mM 소듐 포스페이트 버퍼(sodium phosphate buffer; pH 8.0)에 용해시킨 엘만스 반응 혼합물(Elman's reaction mixture)(0.5 mM acetylthiocholine, 1 mM 5,5'dithio-bis(2-nitro benzoic acid)) 70 μl를 첨가한 후 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

[0149] 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이 에틸렌 아세테이트(EtAC, 100 μg/ml) 분획물 및 메틸렌 아세테이트(MC, 100 μg/ml) 분획물은 70% 에탄올(Et-OH, 100 μg/ml) 추출물과 비교하여 높은 아세틸콜린에스테라제 억제효과를 나타냈다. 반면에 n-부탄올 및 물 분획물은 70% 에탄올(Et-OH, 100 μg/ml) 추출물과 비교하여 낮은 아세틸콜린에스테라제 억제효과를 나타냈다(도 14). 따라서, EtAc 분획물 및 MC 분획물이 아세틸콜린에스테라제 억제하여 아세틸콜린(acetylcholine)의 활성을 연장시킴으로써 알츠하이머 질환 치료에 유효할 수 있음을 나타냈다.

[0150] <실험예 7> 고수 분획물에 의한 세포생존율 증가 효과 확인

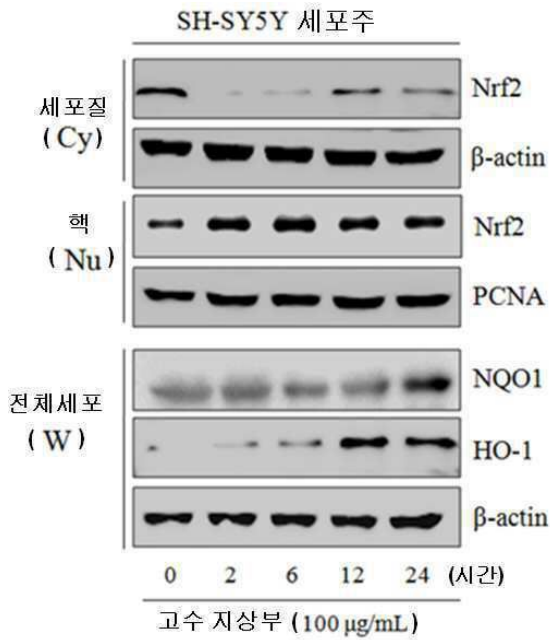
[0151] 상기 <실시예 2>의 다양한 고수분획물을 이용하여 세포 생존율을 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0152] 구체적으로, 상기 <실험예 2>의 동일한 방법으로 PC12 세포에 독성물질인 6-OHDA(200 μM)를 1시간 동안 처리한 후, 70% 에탄올(Et-OH, 100 μg/ml) 추출물, 에틸렌 아세테이트(EtAC, 100 μg/ml) 분획물, 메틸렌 아세테이트(MC, 100 μg/ml) 분획물, n-부탄올(n-Bu, 10 μg/ml) 분획물 및 물 분획물(H₂O, 10 μg/ml)을 23 시간 동안 처리하였다. 이후, 1 mg/ml의 MTT처리 2시간 후, DMSO로 포르마진(formazan)을 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

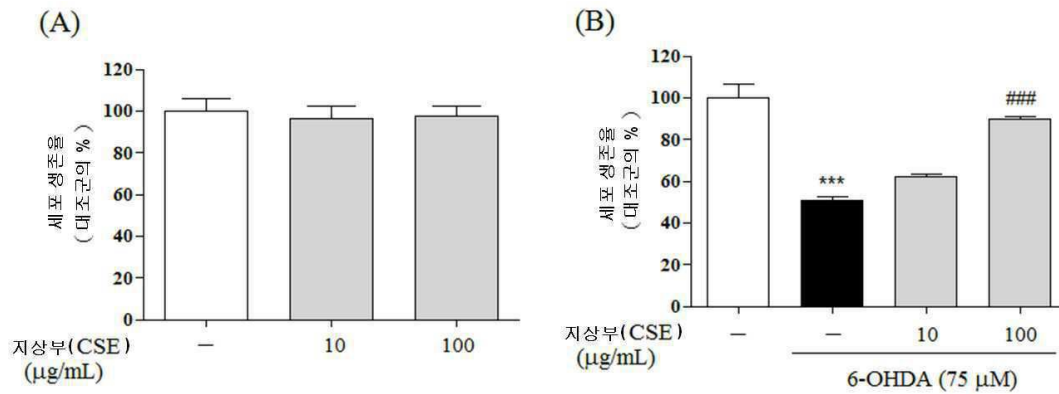
[0153] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이 6-OHDA가 처리된 세포에서 에틸렌 아세테이트(EtAC) 고수 분획물, 메틸렌 아세테이트(MC) 고수 분획물 또는 n-부탄올(n-Bu)이 처리된 세포는 70% 에탄올(Et-OH, 100 μg/ml) 고수 추출물이 처리된 세포보다 더 높은 생존율을 나타냈다(도 15). 따라서, 에틸렌 아세테이트 고수 분획물, 메틸렌 아세테이트 고수 분획물 및 n-부탄올 고수 분획물은 70% 에탄올 고수 추출물보다 세포보호효과가 더 우수함을 나타냈다.

도면

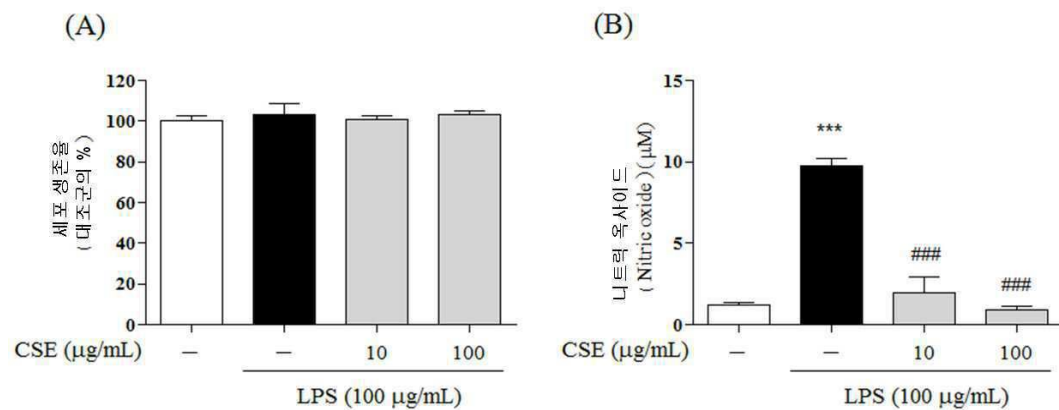
도면1



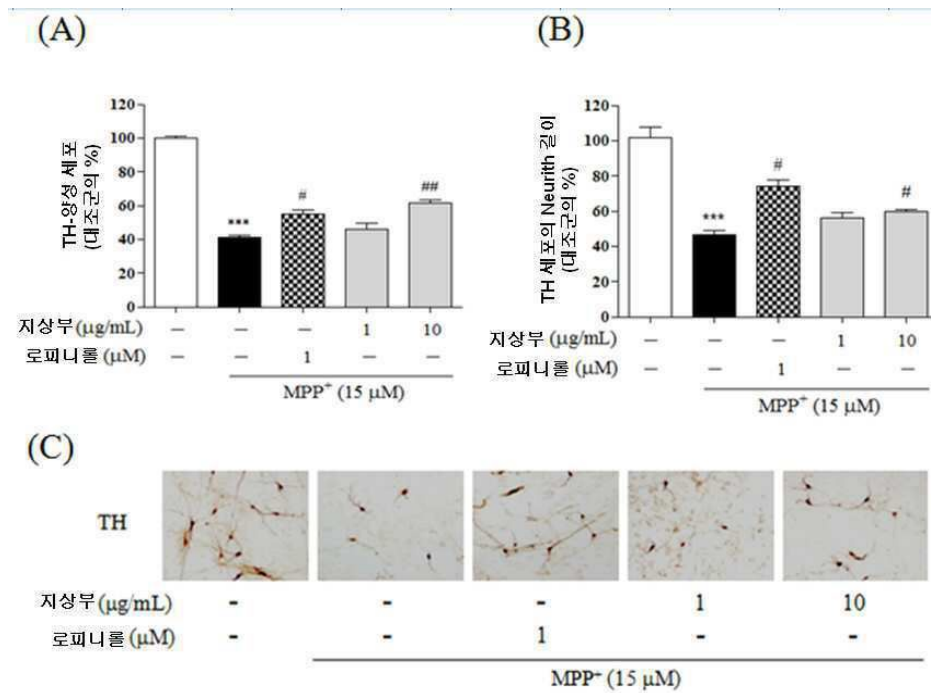
도면2



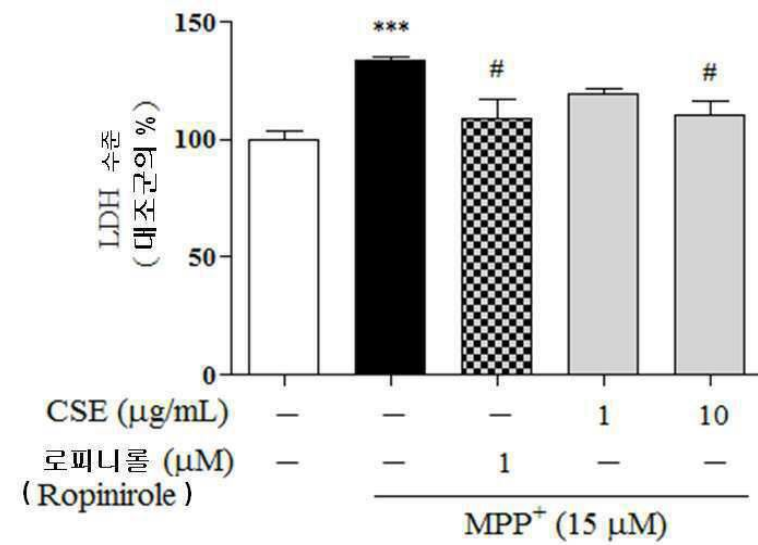
도면3



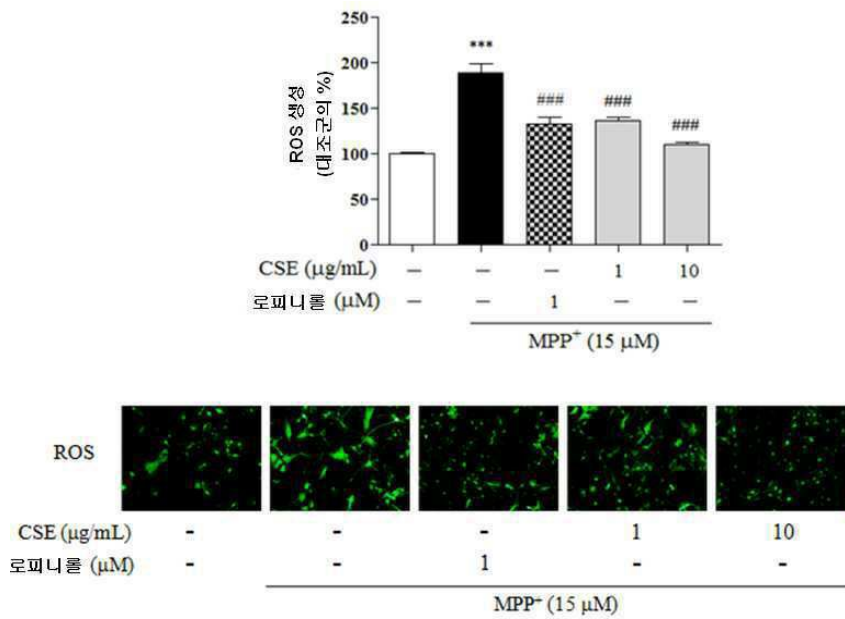
도면4



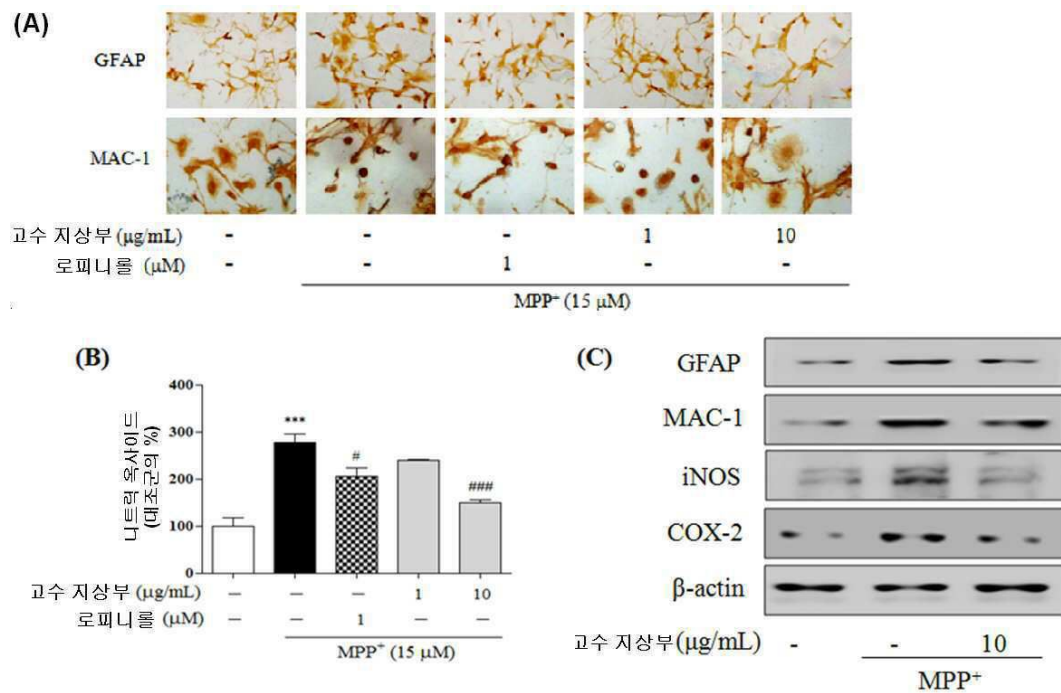
도면5



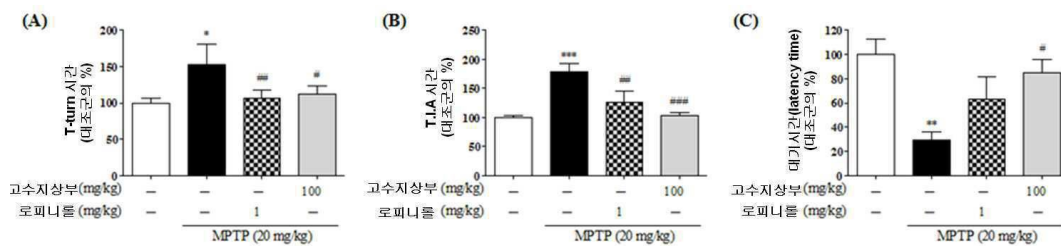
도면6



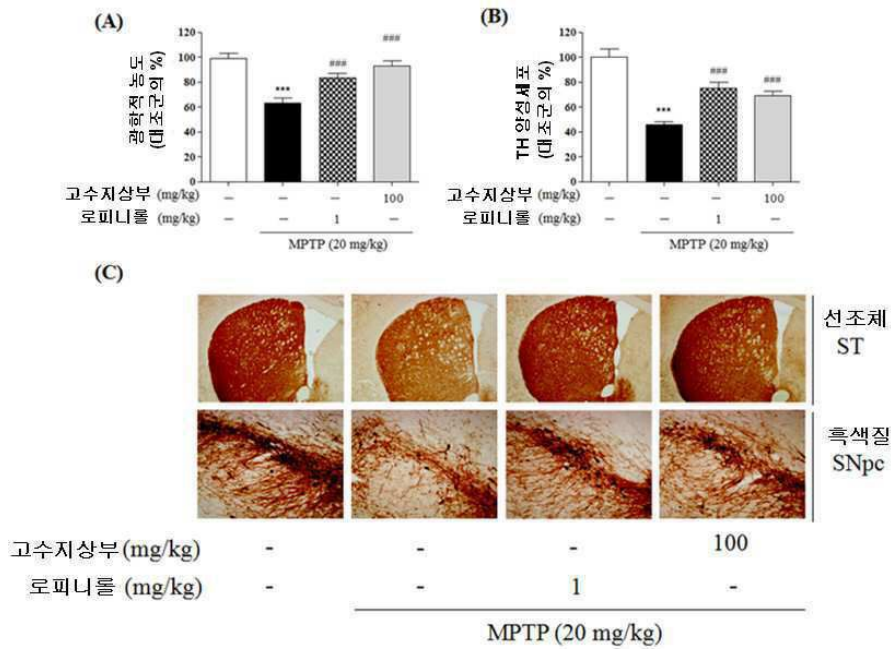
도면7



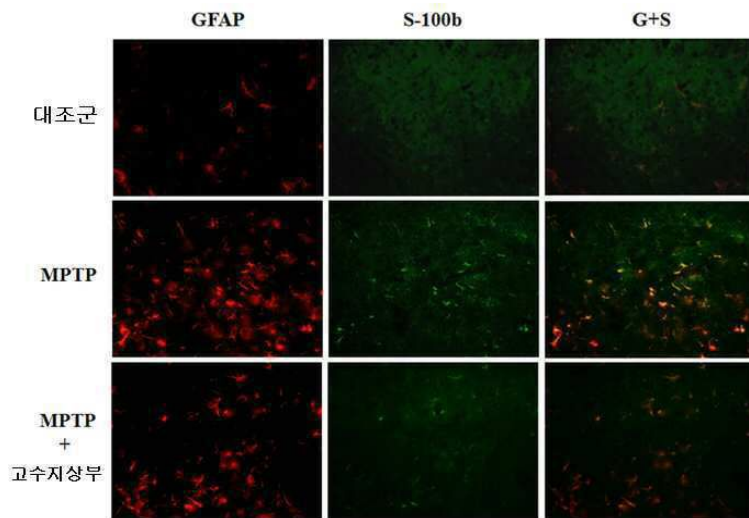
도면8



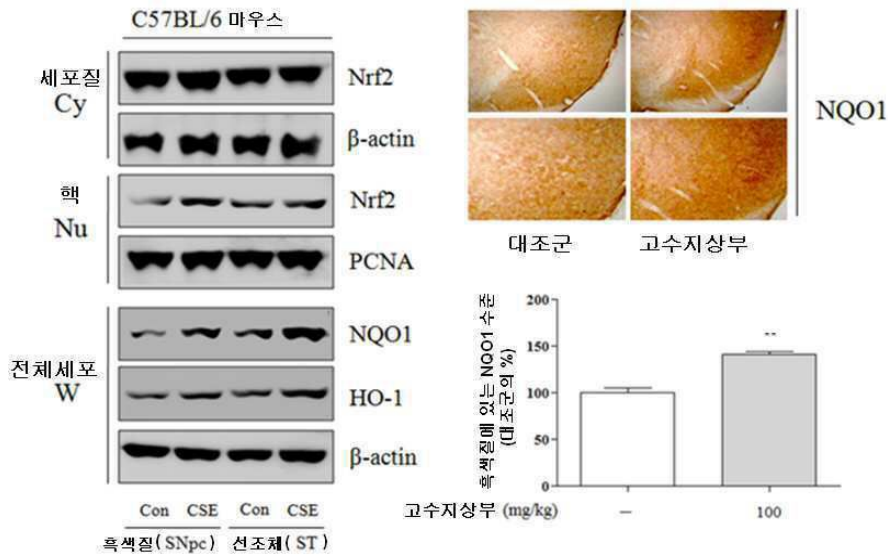
도면9



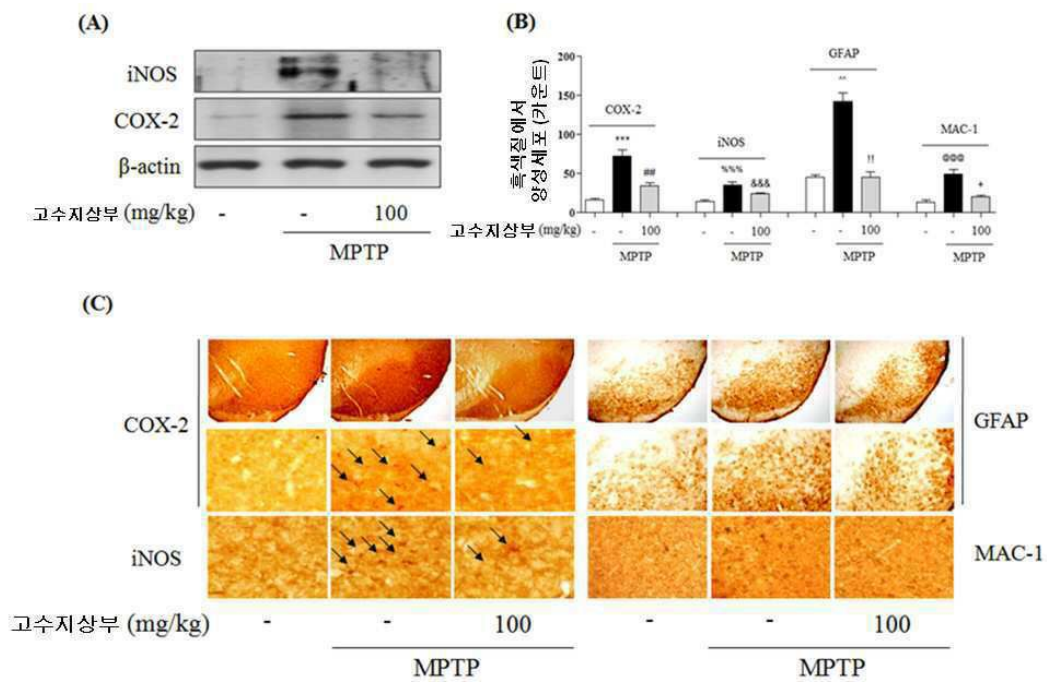
도면10



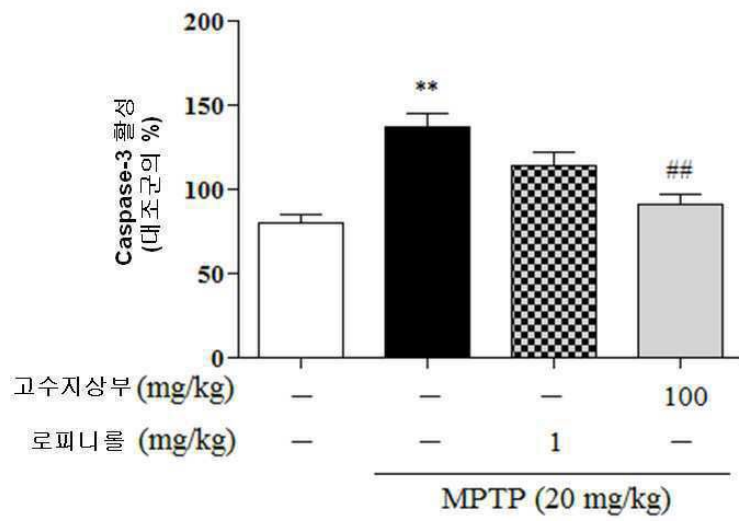
도면11



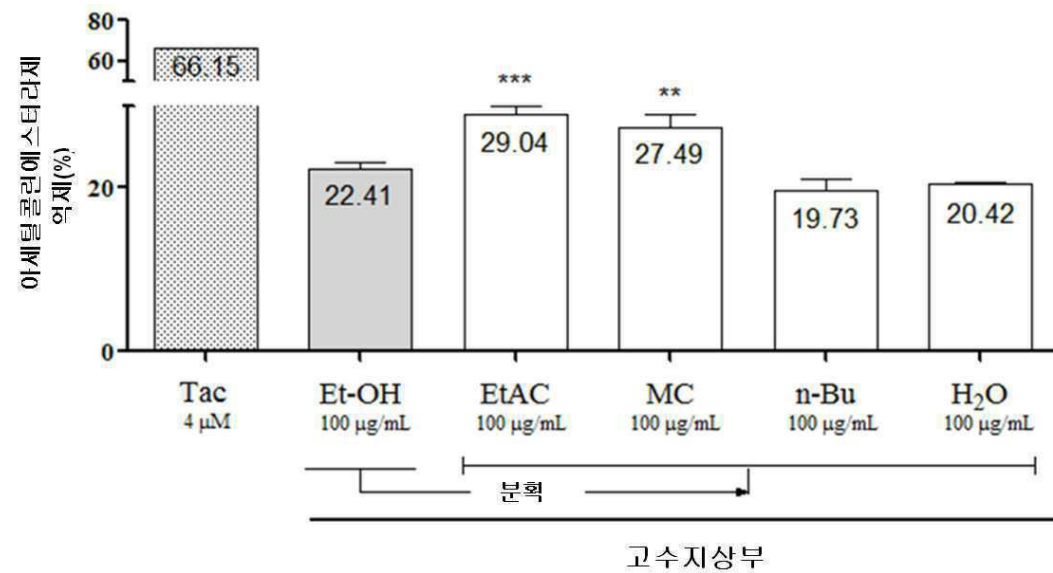
도면12



도면13



도면14



도면15

