



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0062889
(43) 공개일자 2014년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/45 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0129795

(22) 출원일자 2012년11월15일

심사청구일자 2012년11월15일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

농업회사법인(유) 한결농수산

전라남도 고흥군 포두면 우주로 1233

(72) 발명자

허호진

경남 진주시 진주대로 501, 식품공학과 (가좌동, 경상대학교)

박동희

전남 고흥군 포두면 우주로 1250, 농업회사법인유 한결농수산

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

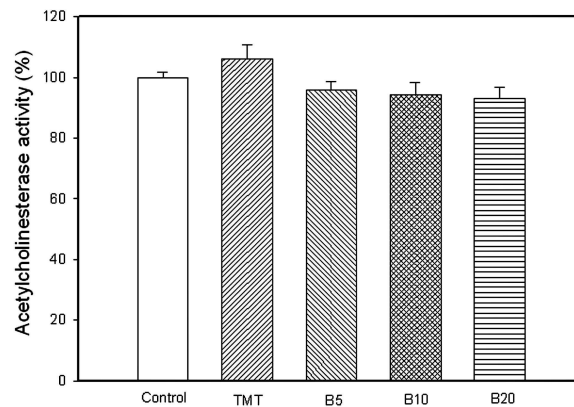
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지·학습 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품

(57) 요약

본 발명은 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지·학습 장애의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

양영주

전남 고흥군 포두면 우주로 1250, 농업회사법인유
한결농수산

조유나

경남 진주시 진주대로 501, 식품공학과 (가좌동,
경상대학교)

정지희

경남 진주시 진주대로 501, 식품공학과 (가좌동,
경상대학교)

김현주

경남 진주시 진주대로 501, 식품공학과 (가좌동,
경상대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 70011169

부처명 지식경제부

연구사업명 지역산업기술개발사업

연구과제명 래빗아이 블루베리를 활용한 뇌신경 세포 보호 효과를 갖는 고부가가치 건강지향 식품 개

발

기 여 율 1/1

주관기관 농업회사법인(유) 한결농수산

연구기간 2011.11.01 ~ 2012.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지·학습 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 블루베리 추출물은 블루베리를 C₁₋₄ 알콜, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에탈아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들 혼합용매로 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 블루베리 추출물은 블루베리를 에탄올로 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 추출은 환류 냉각 추출, 초음파 추출, 상온추출, 열수추출, 냉침추출 또는 증기 추출인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지·학습 장애 개선용 건강기능식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지·학습 장애의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 현대 사회의 눈부신 발달에 따라 생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환이 사회적인 문제로까지 크게 대두되고 있다. 파킨슨병, 알츠하이머 치매, 뇌졸중 등으로 대표되는 퇴행성 신경계 뇌 질환은 신경세포 손상과 소실로 이어지는 세포죽음이 그 궁극적 원인인 것으로 알려져 있다. 특히, 인지기능과 학습능력에 손실을 주는 퇴행성 신경계 뇌 질환의 대부분을 차지하는 알츠하이머 치매 질환(Alzheimer's disease: AD)이 사회적 관심사로 떠오르고 있으며, 노년층에서 흔히 발생하는 퇴행성 신경계 뇌 질환으로 국내의 경우, 노인 인구 증가에 따라 2020년까지 65세 이상이 인구의 약 8.3%인 62만명이 알츠하이머 환자가 될 것으로 추정되고 있다.

[0003] 퇴행성 신경계 뇌 질환의 신경 세포 죽음의 주요 원인으로 활성산소가 지적되고 있다. 활성산소란 호흡과정에서 체내로 들어간 산소가 산화과정에 이용되면서 여러 대사과정에서 생성되어 생체조직을 공격하고 세포를 손상시키는 산화력이 강한 산소를 말한다. 이러한 활성산소는 생체 세포 내 DNA, 세포 구성 단백질, 지질 등에 비가역적인 손상을 준다(Valko et al., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and

human disease. Int J Biochem Cell Biol. 39(2007), 44-84). 특히, 뇌세포에서 활성산소가 다량 생성되면 그로 인한 산화적 스트레스가 세포 내 미토콘드리아의 구조와 기능에 변화를 일으킴으로써 파킨슨병, 알츠하이머 등의 신경계 뇌 질환을 일으키게 된다(Knott et al., Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. Nat Rev Neurosci., 9(2008), 505-18).

[0004] 퇴행성 신경계 뇌 질환의 대표적인 치료방법으로는 항산화제 처리, 세포 이식 및 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시되고 있지만, 대부분의 치료법이 부작용을 비롯한 여러 가지 위험요소 및 손상 기전의 복잡성 등으로 인하여 신경세포의 손상 보호에 적합한 치료제는 아직까지 개발되지 못하고 있는 실정이다. 따라서, 안전성이 입증된 천연자원을 이용한 신경세포 보호 효과를 갖는 물질 개발이 필요한 실정이다.

[0005] 한편, 뇌 조직에서 기억력 및 지적 능력을 담당하는 특정부위에 있어, 신경전달물질 관련 효소들의 활성조절이 알츠하이머 질환의 신경병리학적 특징과 연관성이 있다는 연구가 보고된바 있다. 이에, 콜린성 신경계(cholinergic system)에서 인체 내 전기적 신호를 전달하는 신경전달물질인 아세틸콜린(acetylcholine: ACh)의 향상이 알츠하이머 질환에서 인지기능 개선 효과가 있음이 알려졌다. 따라서, 콜린성 길항제(cholinergic agonist)나 아세틸콜린 분해효소(acetylcholinesterase: AChE) 억제제들을 통한 시냅스 사이트에서의 아세틸콜린의 수준을 증가시키는 연구가 진행되고 있다. 또한, 초기 알츠하이머 질환 환자의 인지 및 학습기능 개선을 위하여 아세틸콜린 분해효소(AChE) 억제제를 대체할 수 있는 천연물 유래 아세틸콜린 분해효소 억제제에 대한 연구 역시 활발히 진행되고 있다.

[0006] 한편, 블루베리는 진달래과 산앵도나무속의 관목성 식물로서, 전 세계적으로 400여 종이 있으며, 아프리카, 칠레, 호주, 일본, 미국, 캐나다, 핀란드, 폴란드, 스웨덴 등 추운 지역까지 분포되어 있다. 블루베리에는 안토시아닌과 카로티노이드 색소가 다량 함유되어 있어 항산화 및 항염작용이 우수하다고 알려져 있으며, 망막 로돕신 재합성 작용의 활성화를 촉진하여 눈의 피로를 줄여주며 시야가 맑아지게 하는 효과가 있다. 특히, 최근에 마시는 차로 가공하여 상업적으로 활용하고 있는 블루베리는 요로감염증과 설사, 당뇨 등에 좋은 효력을 가지는 것으로 알려져 있다. 또한, 블루베리 과실은 여러 가지 뛰어난 생체 조절 기능성을 갖는 고품질의 소재를 함유하고 있으며, 각종 성인병을 예방하고 치유하는 훌륭한 기능성이 밝혀짐에 따라 관련 연구개발을 통해 가공식품 및 기능성 식품 개발이 이뤄지고 있다.

[0007] 상기의 배경 하에, 본 발명자들은 뇌 신경세포 손상으로 유발되는 인지·학습 장애에 개선 또는 치료 효과를 갖는 천연 약재를 연구하던 중, 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물이 단기 및 장기 기억력 손실 유발 마우스에 투여한 결과 현저한 기억력 향상 효과가 있음은 물론 뇌신경전달물질인 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성을 억제하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 퇴행성 신경계 뇌 질환 등으로부터 발생된 뇌 신경세포 손상으로인한 인지·학습 장애를 예방 또는 치료할 수 있는 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기의 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지·학습 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0010] 본 발명에서 사용되는 용어 "블루베리"는, 진달래과 산앵도나무속의 관목성 식물의 열매를 의미하며, 안토시아닌과 카로티노이드 색소가 다량 함유되어 있어 항산화 및 항염 작용이 우수하다고 알려져 있다. 또한, 망막 로돕신 재합성 작용의 활성화를 촉진하여 눈의 피로를 줄여주며 시야가 맑아지게 해주는 효과가 있으며, 요로감염증과 설사, 당뇨 등에 좋은 효력을 갖는 것으로 알려져 있다.
- [0011] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물"은, 블루베리로부터 액체의 용매를 사용하여 추출된 특정 성분을 의미한다. 상기 용매로는 C₁₋₄ 알콜, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에탈아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들 혼합용매를 사용할 수 있다. 유효성분을 효율적으로 추출하기 위하여 에탄올로 추출하는 것이 바람직하다. 에탄올의 농도는 10% 내지 90%가 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0012] 본 발명의 블루베리 추출물은, 블루베리를 추출한 것으로 상기 추출은 환류 냉각 추출, 상온추출, 열수 추출, 냉침 추출 및 증기추출로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 사용할 수 있다. 유효성분을 효율적으로 추출하기 위해서 환류 냉각 추출법을 이용하는 것이 바람직하다.
- [0013] 본 발명에서 사용되는 용어 "인지·학습 장애"는, 뇌 신경세포의 손상으로 발생하는 장애를 의미하며, 알츠하이머성 치매와 같은 퇴행성 신경질환의 결과로 발생하는 기억력 장애, 지적장애, 인지 장애 및 학습 장애 등을 포함할 수 있다.
- [0014] 본 발명에서는 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 함유하는 조성물이 인지·학습 장애의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하였다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 투여한 결과 활성산소 또는 산화적 스트레스에 의해 유도된 뇌 신경세포 사멸이 억제되는 것을 확인하였다. 또한, 뇌신경전달물질인 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성을 억제시킴으로써 신경전달물질(아세틸콜린, ACh)의 보호 효과를 보이는 물론 인지·학습 장애 예방 또는 치료 효능이 있음을 확인하였다.
- [0015] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 인지·학습 장애가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0016] 본 발명의 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경

구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위캡슐, 마크로캡슐, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0018] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물의 일일 투여량은 바람직하게는 1 mg/kg 내지 500 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 블루베리 추출물의 산성 메탄올 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지·학습 장애 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연과일 주스 등의 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0021] 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 대한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0022] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0023] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량%에 1 중량% 내지 15 중량% 포함되도록 첨가하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0024] 본 발명은 인지·학습 장애의 예방 또는 치료에 효과적인 천연 추출물의 분획물로서, 뇌 신경세포 손상 등으로 인해 유발된 인지·학습 장애의 예방 또는 치료 조성물로서 약학적으로 이용 가능할 뿐 아니라 건강기능식품으로서도 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은, 본 발명의 일 실시예에 따른 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 수득하는 과정을 나타낸 순서도이다.

도 2는, 본 발명의 일 실시예에 따른 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 처리에 따른 뇌 조직(세포

막)에 지질과산화 생성 억제 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 3은, 본 발명의 일 실시예에 따른 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 처리에 따른 PC 12 신경세포의 산화적 스트레스 손상 보호 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 4는, 본 발명의 일 실시예에 따른 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 처리에 따른 PC 12 신경세포의 세포생존율 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 5는, 본 발명의 일 실시예에 따른 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 처리에 따른 PC 신경세포의 세포막 손상 억제 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 6은, 본 발명의 일 실시예에 따른 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 처리에 따른 PC 12 신경세포 내의 아세틸콜린 분해효소 저해 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 7은, 본 발명의 일 실시예에 따른 *In-vivo* 실험 진행과정을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 8은, 본 발명의 일 실시예에 따른 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 투여에 따른 Y-maze 실험을 통한 단기 기억력 상실 회복 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 9는, 본 발명의 일 실시예에 따른 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 투여에 따른 수동회피반응 실험을 통한 장기 기억력 상실 회복 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 10은, 본 발명의 일 실시예에 따른 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 투여에 따른 뇌 조직 내의 아세틸콜린 분해효소 활성 억제 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 11은, 본 발명의 일 실시예에 따른 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 투여에 따른 뇌 조직 내 MDA(malondialdehyde) 함량 변화 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 하기 제조에 및 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 제조에 및 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0027] 실시예: 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 제조

[0028] 블루베리는 전라남도 고흥군 포두면의 한결농수산에서 원물로 제공받아 재료로 사용하였다(2011년 7월).

[0029] 블루베리 50 g에 80% 에탄올 1 l를 첨가하여 2시간 동안 환류 냉각 추출한 후 여과 및 농축하여 블루베리 에탄올 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 C18 column sep-pak cartridge를 이용하여 다른 용매를 첨가하면서 단계적으로 분획하였다. C18 column sep-pak cartridge 두 개를 연결하여 10 ml 에틸아세테이트, 5 ml 메탄올, 5 ml 0.01N 염산으로 sep-pak cartridge을 활성화 한 후, 0.45 μ m 필터로 여과된 상기의 블루베리 에탄올 추출물 1 ml를 통과시켰다. 그 후 블루베리 에탄올 추출물이 로딩된 sep-pak cartridge에 6 ml 0.01N 염산, 40 ml 에틸아세테이트, 5 ml 산성 메탄올을 순차적으로 통과시켜서 순수한 산성 메탄올 분획물을 얻었다. 얻어진 산성 메탄올 분획물을 농축하고 동결건조하여 실험에 사용하였다. 도 1에 상기 산성 메탄올 분획물을 얻는 과정을 나타내었다.

[0030] 실험예 1: *In-vitro* 분석

[0031] 1) 지질과산화 억제활성 분석

[0032] 상기 실시예에서 제조한 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물의 지질과산화 억제활성을 분석하기 위하여, 마우스 뇌 조직(세포막)을 이용한 지질과산화 생성물(MDA, malondialdehyde)의 생성 억제활성 측정을 실시하였다. 뇌 부위 조직을 10 부피의 ice cold Tris-HCl 버퍼(20 mM, pH 7.4)에 균질화시킨 후 4℃에서 15분간 12,000 $\times$ g으로 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액 0.1 ml에 10 μ M FeSO₄ 0.1 ml, 0.1 mM 아스코르브산(ascorbic acid) 0.1 ml 및 시료 0.2 ml를 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 시료는 양성대조군으로써 카테킨(catechin) 100 μ g/ml 농도를 사용하였으며, 시험군으로써 상기 실시예에서 제조한 블루베리 에탄올

추출물의 산성 메탄올 분획물을 각각 7 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 31 $\mu\text{g/ml}$, 62 $\mu\text{g/ml}$ 및 125 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 사용하였다. 배양반응 후, 상기 배양액에 28% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid) 0.1 ml를 첨가하여 반응을 종결시키고, 1% 티오바르비톨산(TBA, thiobarbituric acid) 0.3 ml를 첨가하고 80°C에서 30분간 가열한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과를 도 2에 나타내었다.

[0033] 도 2에 나타난 바와 같이, 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 처리한 경우 농도의존적으로 저해 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 농도 125 $\mu\text{g/ml}$ 에서 양성대조군으로 사용된 카테킨 100 $\mu\text{g/ml}$ 보다 높은 저해 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0034] 2) 산화적 스트레스에 의한 뇌 손상 보호 효과 분석

[0035] 상기 실시예에서 제조한 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물이 산화적 스트레스에 의한 신경세포 손상에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 과산화수소에 의한 PC 12 신경세포의 산화적 스트레스 손상 보호 효과를 DCF-DA 방법을 통하여 측정하였다. 먼저, 세포를 96 well plate에 2×10^6 cells/well로 분주하고, 상기 실시예의 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 농도별(31 $\mu\text{g/ml}$, 62 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$ 및 250 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 시험군으로 사용하였다. 각 시료를 처리한 후 37°C, 5% CO₂의 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 인산완충식염수(PBS)로 세척한 후 200 μM 과산화수소를 가하여 3시간 배양하였다. 그 후 50 μM DCFH-DA를 가하고, 형광측정 마이크로플레이트 리더(fluorescence microplate reader, Infinite 200, Tecan Co., San Jose, CA, USA)를 사용하여 485 nm 여기파장(excitation)과 535 nm 방출파장(emission)에서 형광강도를 측정하였다. 양성대조군으로 비타민 C(Vit. C, 200 μM)를 사용하였으며, 비교군으로 과산화수소를 단독 처리(H₂O₂ 200 μM)하여 사용하였다. 상기 측정 결과를 도 3에 나타내었다.

[0036] 도 3에 나타난 바와 같이, 과산화수소를 단독 처리한 군에서는 110.80%로 정상대조군(control) 100% 대비 약 11%의 형광강도 증가를 보인 반면, 상기 실시예에서 제조한 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 처리한 군에서는 농도의존적으로 산화적 손상 보호 효과를 나타내었다. 특히, 농도 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 101.64%로 과산화수소 단독 처리군 대비 약 10% 정도의 ROS 감소율을 나타냄으로써 뛰어난 뇌 손상 보호 효과를 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0037] 3) 세포생존율 분석

[0038] 상기 실시예에서 제조한 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물의 신경 세포 보호 효과를 확인하기 위하여, 과산화수소에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 PC 12 신경 세포의 생존율을 MTT 분석을 통해 확인하였다. 상기 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 농도별(31 $\mu\text{g/ml}$, 62 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$ 및 250 $\mu\text{g/ml}$)로 PC 12 신경세포에 처리하여 24시간 동안 전배양하였다. 그 후, 과산화수소를 200 μM 농도로 증류수에 녹여 첨가한 후 3시간 동안 배양하였다. 이 상태의 PC 12 신경세포에 MTT stock solution(10 $\mu\text{l/well}$)을 처리하고 37°C에서 3시간 동안 배양한 후, MTT solubilization solution(10% triton X-100 in acidic isopropanol) 100 μl 를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 그리고 마이크로플레이트 리더(microplate reader, 680, Bio-rad, Japan)를 이용하여 570 nm(determination wave)와 630 nm(reference wave)에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 비타민 C(Vit. C, 200 μM)를 사용하였으며, 비교군은 과산화수소를 단독 처리(H₂O₂ 200 μM)하여 사용하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 퍼센트 농도로 나타내었으며, 도 4에 결과를 나타내었다.

[0039] 도 4에 나타난 바와 같이, 세포생존율은 과산화수소 단독 처리군에서는 정상대조군(control) 100% 대비 75.59%의 생존율을 나타내었으며, 과산화수소와 비타민 C를 동시에 처리한 양성대조군(Vit. C)에서는 111.44%의 생존율로 약 36% 정도의 신경세포 보호 효과를 나타내었다. 한편, 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 처리한 군에서는 농도의존적으로 세포생존율이 증가하진 않았지만, 처리한 모든 농도에서 양성대조군(Vit. C)과 유사한 활성을 나타내었다.

[0040] 4) 세포막 손상 억제 효과 분석

[0041] 상기 실시예에서 제조한 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물의 신경 세포막 손상 억제 효과를 확인하기 위하여, 신경세포 중에 함유되어 있는 세포질 성분의 LDH 방출량을 측정하였다. PC 12 신경 세포에 상기 블

블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 농도별(31 $\mu\text{g/ml}$, 62 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$ 및 250 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하고 48시간 동안 전배양한 후, 200 μM 과산화수소를 처리하여 3시간 동안 배양하였다. 그 후 5분간 원심분리(250 $\times g$)하여 침전시키고, 상등액 100 μl 을 새로운 well로 옮겨 LDH assay kit(Simga Chemical Co., St. Louis MO., U.S.A)를 사용하여 세포막 손상효과를 측정하였다. 양성대조군(Vit. C)으로 비타민 C를 200 μM 로 처리하였으며, 비교군으로 과산화수소 200 μM 을 단독처리하였다. 상기의 측정 결과를 도 5에 나타내었다.

[0042] 도 5에 나타난 바와 같이, 정상대조군(control)의 LDH 방출량은 22.04% 정도인데 반하여 과산화수소 단독 처리한 비교군(H_2O_2)에서는 49.57%의 방출량을 보여 과산화수소에 의해 LDH 방출량이 약 27.53% 정도 증가하였다. 양성대조군(Vit. C)인 비타민 C 200 μM 처리군은 24.53%의 LDH 방출량을 나타내었으며, 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 처리한 군은 농도의존적으로 LDH 방출 감소 효과를 나타내었다.

[0043] 5) 아세틸콜린 분해효소 저해 활성 분석

[0044] 알츠하이머성 치매로부터 유발되는 기억력 상실 및 학습력 저하 등 각종 인지장애는 주로 대뇌기저부의 아세틸콜린(ACh)성 신경세포의 손상으로부터 기인되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 상기 실시예에서 제조한 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물의 아세틸콜린 분해효소 저해 활성을 분석하였다. 아세틸콜린 분해효소(AChE) 저해 활성 분석은 아세틸콜린 요오드화물을 기질로 사용하여 수행하였다. 효소는 PC 12 신경세포 배양액 1 ml에 균질화를 위한 완충액(1 M NaCl, 50 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100 혼합액에 10 mM Tris-HCl를 첨가하여 pH 7.2로 조정된 용액) 5 ml를 첨가하여 Glass-Col homogenizer로 균질화하였다. 균질화된 세포배양액을 10,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하고, 상등액을 추출하여 효소실험을 위하여 사용하였다. 모든 공정은 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 수행하였으며, 추출한 효소액의 단백질 함량은 Quant-iTTM Protein Assay kit(Invitrogen, St. Oregon, Eugene, USA)를 사용하여 측정하였다. 추출한 효소액 10 μl 에 대조약물 10 μl (Tacrine 1 μM) 또는 상기 실시예의 추출물(31 $\mu\text{g/ml}$, 62 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ 및 500 $\mu\text{g/ml}$) 10 μl 를 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 전배양시켰다. 전배양된 혼합물에 50 mM 인산나트륨완충용액(인산완충용액, pH 8.0)에 용해시킨 Ellman's reaction mixture(0.5 mM 아세틸티오콜린, 1 mM 5,5'-디티오-비스(2-니트로벤조산)) 70 μl 를 첨가하고 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 대조군으로써 1세대 아세틸콜린 분해효소(AChE) 저해제인 tacrine 1 μM 를 사용하였으며, 결과를 도 6에 나타내었다.

[0045] 도 6에 나타난 바와 같이, 대조군인 1세대 아세틸콜린 분해효소(AChE) 저해제인 tacrine은 1 μM 에서 50%의 아세틸콜린 분해효소(AChE) 저해활성을 나타내었으며, 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물은 농도의존적으로 저해활성을 나타내었다. 블루베리로부터 수득한 산성 메탄올 분획물의 아세틸콜린 분해효소(AChE) 50% 저해활성 농도(IC_{50})은 212.5 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

[0046] 실험예 2: *In-vivo* 실험

[0047] 상기 실시예에서 제조한 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물의 기억력 개선 효과, 인지 장애 개선 효과, 아세틸콜린 분해효소 저해 효과 등을 확인하기 위하여 4 주령의 ICR-male mouse를 실험동물로 사용하였다. 각 마우스는 2마리씩 한 개의 사육케이스에 넣고 항온(22 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$), 항습(50-55%)을 유지하며, 12시간 간격으로 낮과 밤을 고대시키는 동일한 실험실 환경에서 사육하였다. 마우스는 정상대조군(control), TMT 처리군, 상기 실시예에서 제조한 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 5 mg/kg body weight(B5), 10 mg/kg body weight(B10) 및 20 mg/kg body weight(B20)으로 처리한 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 실험진행과정을 도 7에 도식적으로 나타내었다.

[0048] 1) 단기 기억력 상실 회복 효과 분석

[0049] 뇌의 해마부위에 비가역적인 손상을 일으킴으로써 알츠하이머와 유사한 증상을 나타내는, TMT로 유발된 단기 기억력 상실 마우스에 대한 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물의 기억력 회복 효과를 확인하기 위하여, TMT 주입 2일 후 Y-maze 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 Y-maze는 검은색 플라스틱 재질로 3개의 가지로 구성되어 있으며, 각 가지의 길이, 높이 및 너비는 33 cm, 15 cm 및 10 cm이었다. 각 가지를 A, B 및 C로 정한 후 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 마우스가 들어간 가지의 이동경로를 기록하였다. 3개

의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하고, 변경 행동력(alternation behavior)은 총 통과횟수(total arm entry)와 점수를 이용하여 하기의 식을 통해 계산하였다. 실험 결과를 도 8에 나타내었다.

$$\text{변경 행동력(\%)} = \frac{\text{실제변경}}{\text{최대변경}} \times 100$$

$$\text{최대변경} = \text{총가지통과횟수} - 2$$

도 8에 나타난 바와 같이, 8분 동안 Y-maze에서의 마우스의 행동을 관찰한 결과 TMT 처리군은 정상대조군(control) 100% 대비 78.65%로 현저한 기억력 저하(21.35% 감소)를 나타내었다. 반면, 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 처리한 B5, B10 및 B20 군은 각각 89.72%, 95.56% 및 96.50%로 TMT 처리군과 비교하였을 때 농도의존적으로 기억력 기억력을 개선시킬 뿐만 아니라 정상대조군(control)과 유사한 수준으로 나타났다.

2) 장기 기억력 상실 회복 효과 분석

TMT로 유발된 장기 기억력 상실 마우스에 대한 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물의 기억력 회복 효과를 확인하기 위하여, 수동회피반응 실험(passive avoidance test)를 실시하였다. 수동회피반응 실험기구는 조명이 있는 밝은 챔버와 어두운 챔버, 2개의 구역으로 되어 있으며 바닥은 철망이었다. TMT 주입 3일 후, 수동회피반응 학습 시험(training trial)을 실시하였으며, 각 마우스는 조명이 있는 챔버에서 조명을 켜지 않은 채 1분 동안 적응시킨 후 조명을 켜고 2분 동안 적응시켰다. 그 후 마우스가 어두운 챔버로 이동하자마자 전기충격을 0.5 mA, 1초 동안 가하였다. 학습 시험을 시킨 다음날 각 마우스들을 대상으로 기억시험(test trial)을 실시하였으며, 조명을 켜 챔버에 마우스를 놓고 마우스의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time: 머무름 시간)을 300초까지 측정하였다. 측정 결과를 도 9에 나타내었다.

도 9에 나타난 바와 같이, TMT 처리군의 latency time은 77.25초로 정상대조군(control) 295.14초에 비하여 학습 및 인지기능이 현저히 감소하였다(73.82% 감소). 반면, 블루베리 에탄올 추출물로부터 얻은 산성 메탄올 분획물(B5, B10 및 B20)을 처리한 군은 TMT 처리군과 비교하여 농도의존적으로 인지기능이 크게 회복, 개선 되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로 블루베리 추출물로부터 얻은 산성 메탄올 분획물이 알츠하이머와 같은 신경퇴행성 질환에 활용 가능할 수 있을 것으로 생각된다.

3) 뇌 조직 내의 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성 분석

블루베리 에탄올 추출물로부터 얻은 산성 메탄올 분획물이 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, Y-maze 및 수동회피반응 실험 종료 후 마우스의 뇌를 적출하여 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성을 측정하였다. 적출한 뇌에 10 부피의 인산완충식염수(PBS)를 넣고 Glass-Col homogenizer로 균질화한 후 12,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하고, 상등액을 효소실험을 위하여 사용하였다. 모든 공정은 4℃에서 수행하였으며, 추출한 효소액의 단백질 함량은 Quant-iTTM Protein Assay kit(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 효소액 5 μ l에 50 mM 인산나트륨완충액(인산완충액) 65 μ l을 넣고 37℃에서 15분간 전배양하였다. 전배양된 혼합물에 Ellman's reaction mixture 70 μ l를첨가한 후 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였으며, 결과를 도 10에 나타내었다. 마우스 뇌 조직 내의 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성은 정상대조군(control) 대비 % 활성으로 나타내었다.

도 10에 나타난 바와 같이, TMT 처리군은 정상대조군(control) 100% 대비 106.14%로 뇌 해마 영역의 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 낮은 농도에서의 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물 처리 군(B5)에서는 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성을 크게 저해시키지 않았으나, 높은 농도(B20)에서는 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성을 크게 저해시키는 것을 확인할 수 있었다(B5: 95.80%, B10: 94.32% 및 B20: 93.16%). 따라서, TMT로 유도된 학습 및 인지기능 결함 마우스에서 블루베리로부터 얻은 산성 메탄올 분획

물이 효과적으로 아세틸콜린 분해효소(AChE)의 저해활성을 갖는 것으로 생각된다.

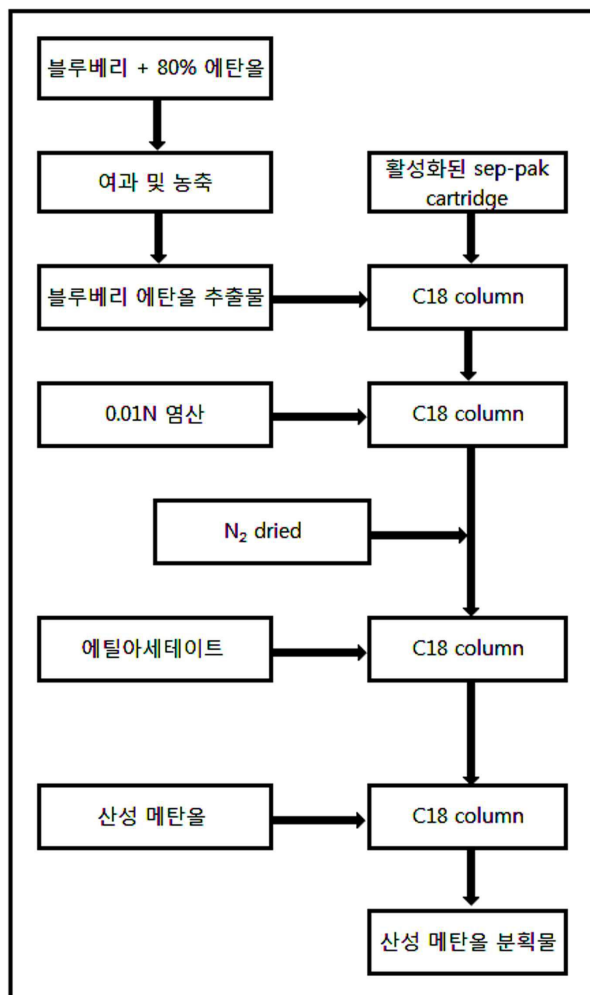
[0059] 4) 뇌 조직 내 malondialdehyde(MDA) 함량 측정

[0060] 인산완충식염수를 이용하여 얻은 마우스 뇌 조직 균질액 160 μl 에 1% 인산 960 μl 를 혼합한 후 0.67% thiobabutaric acid 320 μl 를 넣고 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액은 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 532 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였으며, 결과를 도 11에 나타내었다. MDA 함량은 mg protein 당 μM 농도로 표시하였다.

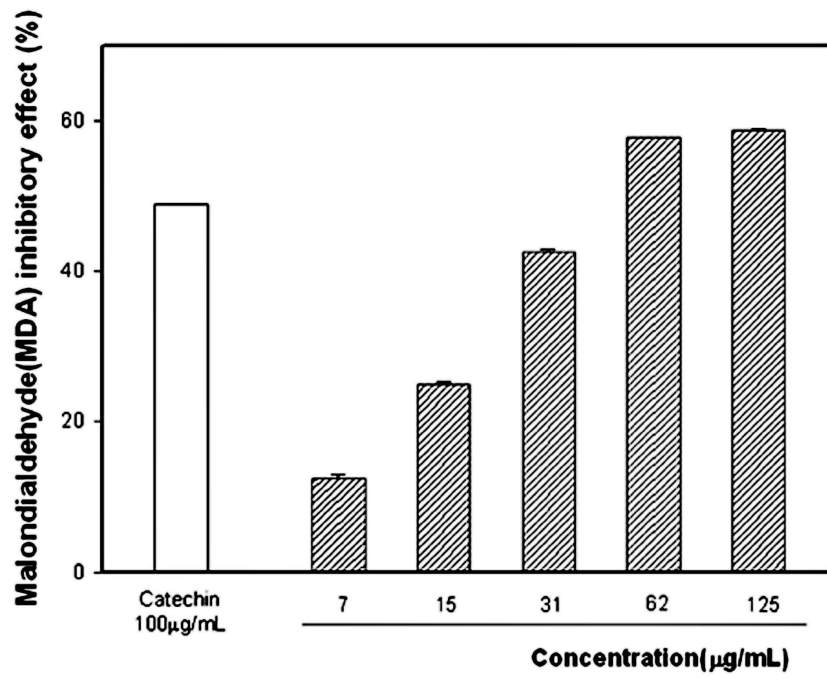
[0061] 도 11에 나타난 바와 같이, 정상대조군(control)은 7.90 nmole/mg protein이었으며, TMT 처리군은 이보다 증가한 9.73 nmole/mg protein을 나타내었다. 이는, TMT에 의해 대부분 지질로 구성되어 있는 뇌 조직의 과산화 생성물이 증가하였음을 나타낸다. 반면, 블루베리 에탄올 추출물의 산성 메탄올 분획물을 처리한 B5, B10 및 B20 군에서는 농도가 증가함에 따라 MDA의 함량이 현저하게 감소하였으며, 특히 B20군은 TMT 처리군 대비 18.81% 정도 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이는, 정상대조군(control)과 유사한 수준으로 TMT로 인한 뇌 조직의 과산화를 감소시키는 효과가 있는 것을 나타낸다.

도면

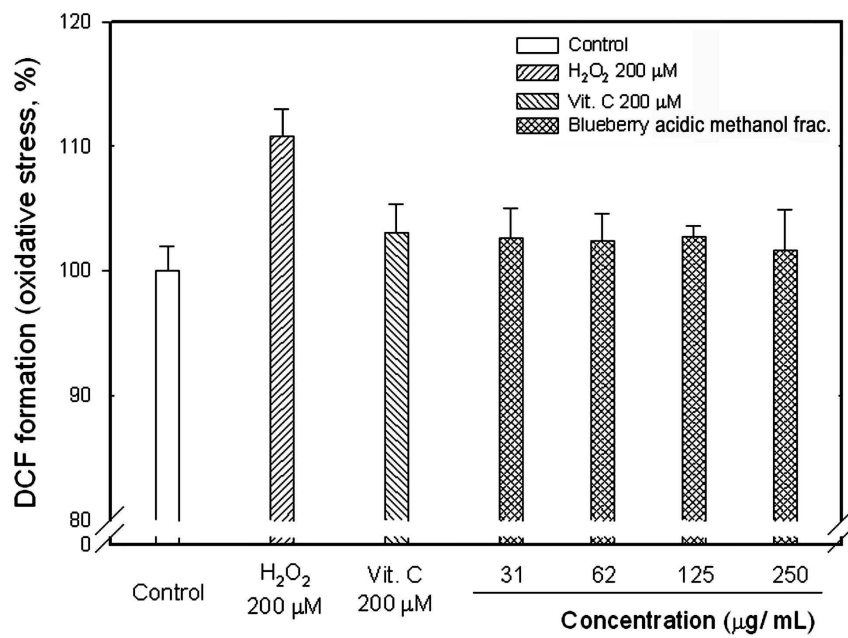
도면1



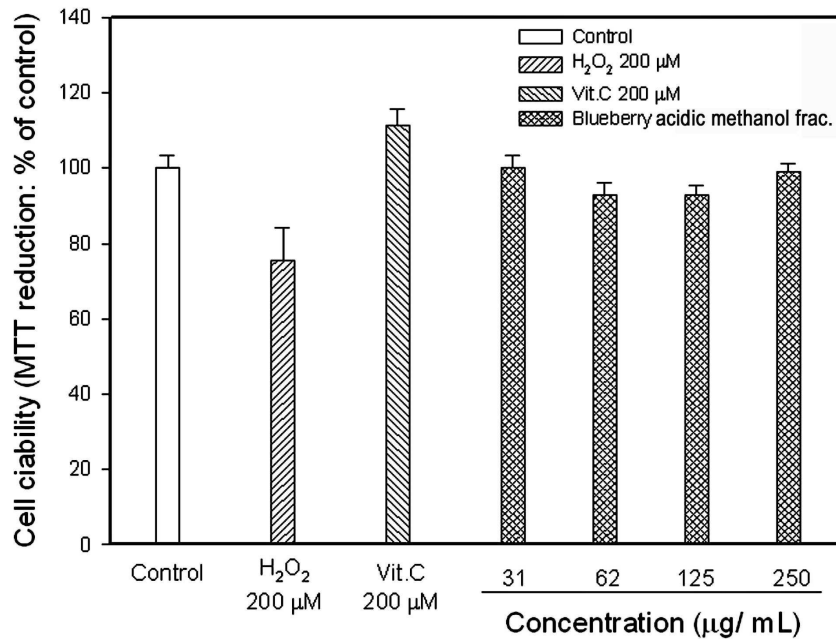
도면2



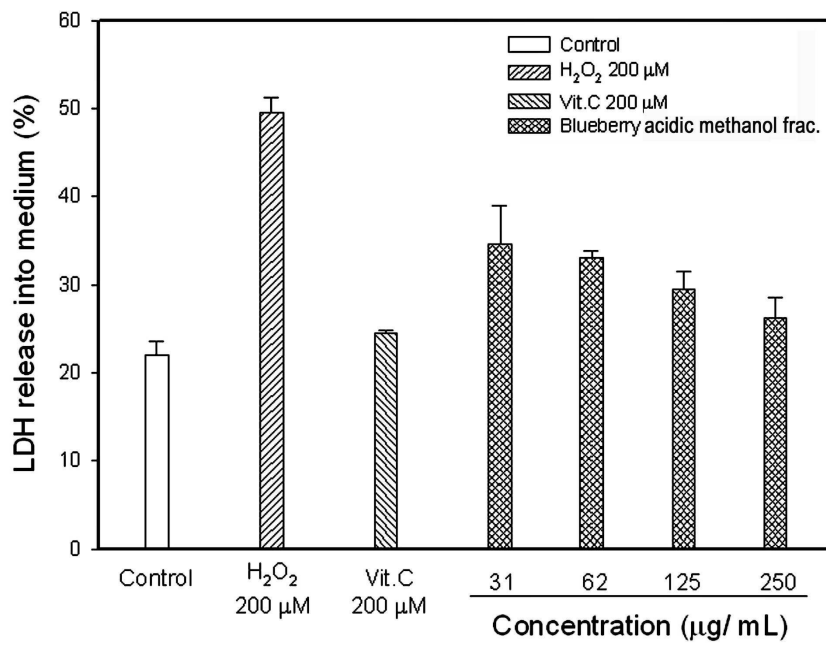
도면3



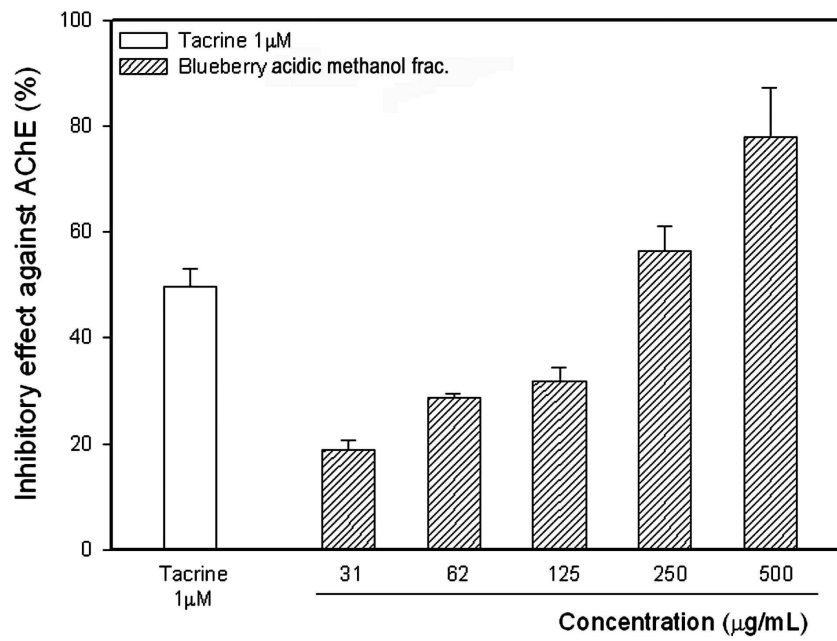
도면4



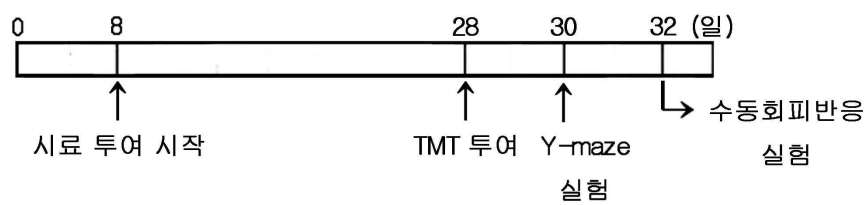
도면5



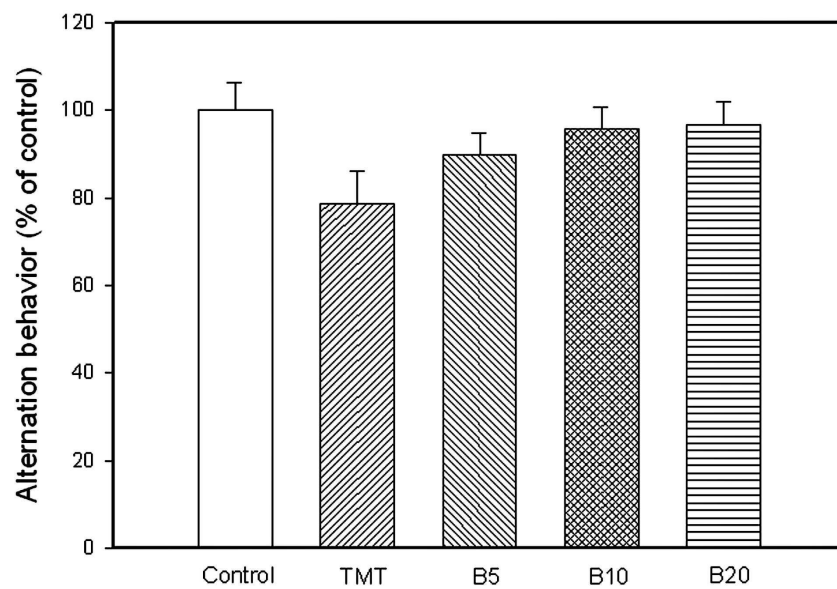
도면6



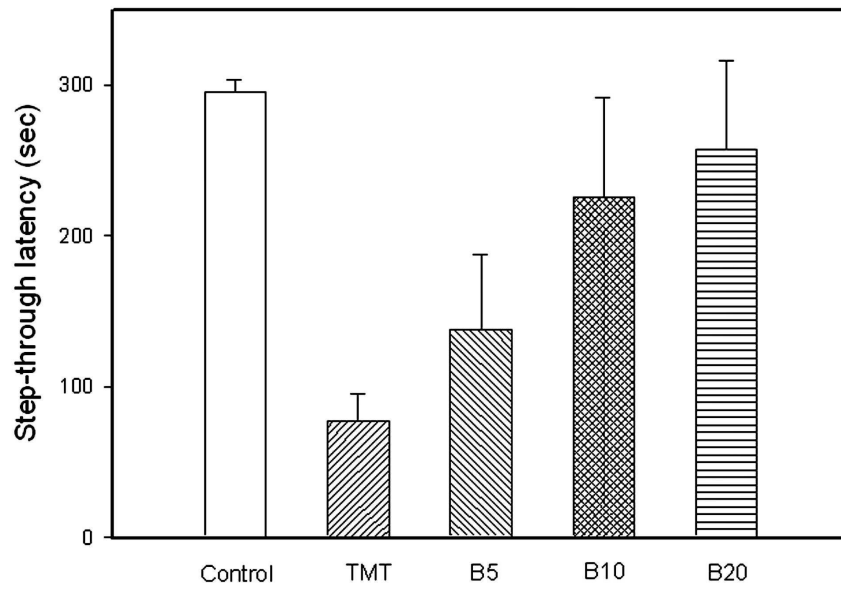
도면7



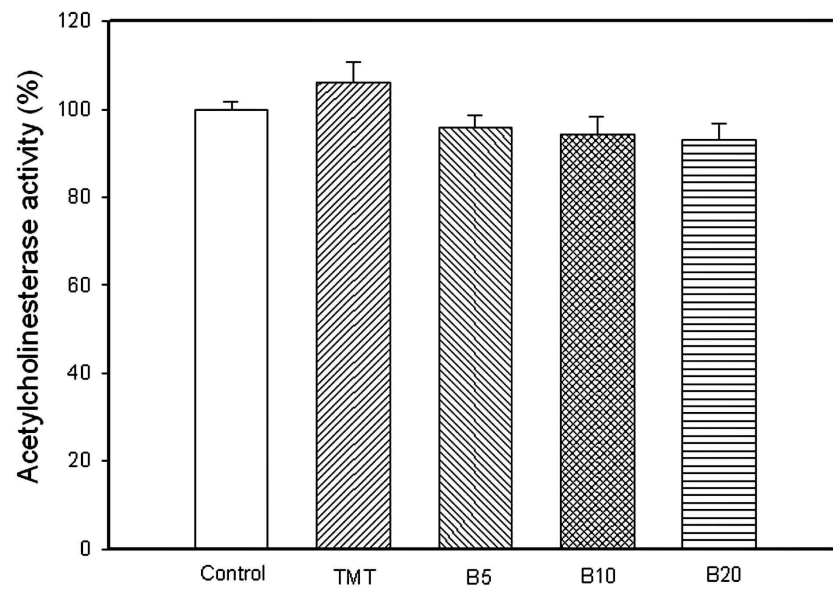
도면8



도면9



도면10



도면11

