

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0114155

(43) 공개일자 2020년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 31/352* (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)*A61P 25/14* (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*A61K 31/352* (2013.01)*A23L 33/10* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0035396

(22) 출원일자 2019년03월27일

심사청구일자 2019년03월27일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김명옥

경상남도 진주시 가호로44번길 7, 102동 303호

(74) 대리인

특허법인 피씨알

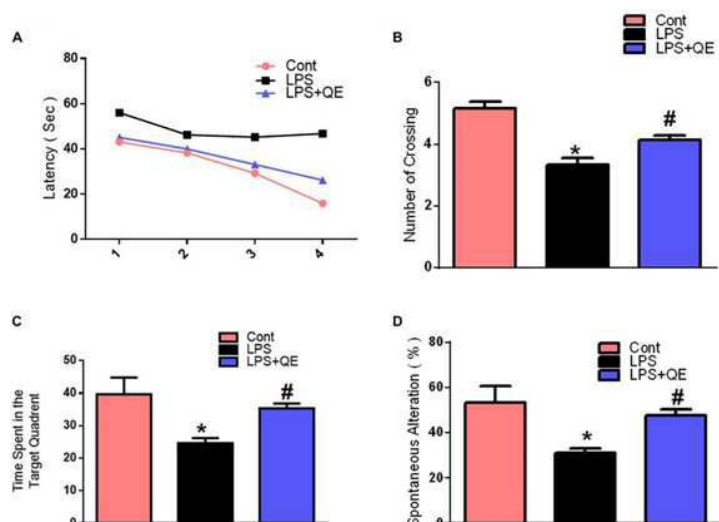
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

## (57) 요약

본 발명은 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 대상체 내 투여 또는 흡수를 통해 공간 작업 기억 기능을 향상시킬 뿐만 아니라 신경염증이 유발된 대뇌피질 및 해마에서 시냅스 및 성상교세포의 활성을 향상시키고, 항산화 및 항염증 효능을 나타냄으로써 신경퇴행성 질환을 예방하거나 개선 또는 치료에 적용 가능한 약학 조성물 및 식품 조성물로 활용될 수 있다.

## 대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

**A61P 25/14** (2018.01)

**A61P 25/28** (2018.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/322** (2013.01)

**A23V 2250/21168** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711081832

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발(R&D)

연구과제명 퇴행성 뇌질환 및 대사조절 신규 제어물질 개발 및 효과 검증 에너지 대사 활성화  
물질 개발을 통한 실용화 기반 확립

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경상대학교

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

퀘르세틴(quercetin)을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 시냅스 기능장애 및 기억 장애로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 약학 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 COX-2 및 NOS2의 발현을 감소시키는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 발현을 감소시키는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 신경 아포토시스를 억제하는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 6

퀘르세틴(quercetin)을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 시냅스 기능장애 및 기억 장애로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술분야

[0001] 본 발명은 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물 또는 식품 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0003] 염증(inflammation)은 다양한 세포조직이 외부 물질을 감지하면서 개시되는 생물학적 반응이다; 그 반응의 목적은 더 이상의 조직 손상 및 상처를 예방하고, 손상된 조직을 깨끗이 복구하며 병원성 요소(pathogenic element)를 제거하는 것이다. 그러나 염증이 장기화되면, 만성 염증이 되고 진행성 퇴화(degeneration)를 초래한다. 중추신경계(central nervous system)는 병원체를 방어하고 신경의 정상 구조를 유지함으로써 중추신경계에 면역 시스템을 제공하는 성상교세포(astrocyte) 및 미세아교세포(microglia)를 포함하는 신경교세포(glial cell)를 함유한다 (Witte et al., 2010; Badshah et al., 2015b). 조직 손상 및 침투성 염증은 뇌에서 염증성 매개체를 분비하고, 뇌수막염(meningitis), 다발성 경화증(multiple sclerosis)과 같은 염증성 질환뿐만 아니라 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 헌팅톤병(Huntington's disease; HD)과 같은 비염증성 질환을 유도하는 신경교세포 활성을 초래한다 (Qin et al., 2007; Di Filippo et al., 2010; Tajuddin et al., 2014). 많은 연구들은 신경교세포의 활성이 활성산소종(reactive oxygen species; ROS), 질소 산화물(nitric oxide; NO), 사이토카인, 염증성 매개체와 같은 해로운 매개체를 분비하고, 결국 신경염증 매개 신경 퇴화를 초래한다고 보고하였다 (Di Filippo et al., 2008; Chen W.W. et al., 2016; Kempuraj et al., 2016, 2017). 지질다당류(lipopolysaccharide; LPS)는 그람음성균의 세포벽의 주요 구성성분으로, 신경교세포를 포함하는 면역 세포의 잠재적 자극제로서 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)의 발현을 유도하는 작용을 한다 (Sheng et al., 2003; Biesmans et al., 2013). 다양한 세포외(*in vitro*) 및 세포내(*in vivo*) 연구들은 LPS가 신경퇴화에 따른 신경염증을 이끄는 신경교세포를 활성화시킨다고 보고하였다 (Johansson et al., 2014; Qin et al., 2015; Khan et al., 2017).

[0004] 플라보노이드(flavonoid)는 많이 소비되는 채소, 과일, 곡물, 허브, 음료에서 흔한 천연 폴리페놀 식물 색소의 큰 그룹이다. 플라보노이드는 항암, 심혈관, 항산화, 신경보호, 항염증 특성과 같은 많은 형태의 생물활성을 보였다 (Mennen et al., 2004; Yao et al., 2004; Hooper et al., 2008; Hwang et al., 2012). 가장 중요한 것은 폴리페놀성 플라보노이드가 다양한 신경독성 조건 및 패러다임(paradigm)에 대해 핵심적인 신경보호 역할을 한다는 것이다 (Dajas et al., 2003; Gopinath et al., 2011; Scapagnini et al., 2011; Prakash et al., 2013; Prakash and Sudhandiran, 2015; Ahmad et al., 2016; Khan et al., 2016; Ali et al., 2018). 퀘르세틴(quercetin, 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone)은 사과, 베리(berry), 양파, 케이퍼(caper)와 같은 과일 및 채소에서 풍부하게 발견되는 잘 알려진 천연 플라보노이드이다; 정상적인 사람의 식단은 최대 퀘르세틴 25 mg의 일일 섭취량을 포함한다. 퀘르세틴은 항우울제, 항염증제, 항암제 작용을 포함한 다양한 형태의 생물학적 활성을 가진다 (Dajas et al., 2003; Zhang et al., 2011; Costa et al., 2016). 퀘르세틴은 신경교세포에서 분비되는 전염증성 사이토카인을 억제함으로써 항염증 작용을 한다. 퀘르세틴은 미세아교세포에서 질소산화물 생성을 억제하여 신경염증을 보호하고, 나아가 NF $\kappa$ B 신호의 억제를 이끌어 염증성 관련 신경손상을 예방한다고 보고되었다 (Chen W.W. et al., 2016; Rao et al., 2005; Kao et al., 2010; Liao and Lin, 2015). 또한, 퀘르세틴은 중추신경계에서 활성화된 성상교세포를 개선시키고, 지도부딘(zidovudine) 유도 신경염증을 예방하였다 (Yang et al., 2018). 활성화된 성상교세포 및 신경교세포는 사이토카인 및 활성 산소의 활성을 매개하며, 나아가 신경세포에 영향을 주며 신경 퇴화를 유발한다 (Hong, 2017; Shal et al., 2018). 퀘르세틴은 H0-1(heme oxygenase-1)/Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 및 NF $\kappa$ B의 조절을 통해 신경염증 매개 신경퇴화를 예방함으로써 망간 유도 신경독성을 개선시킨다고 보고되었다 (Bahar et al., 2017). 더 나아가, 퀘르세틴은 다양한 세포외 및 세포내 마우스 모델에서 신경퇴화에 대한 신경보호 효과를 가지는 것으로 확인되었다 (Bureau et al., 2008; Yang et al., 2014; Lei et al., 2015; Pogacnik et al., 2016; Shveta et al., 2016).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하

는 것을 목적으로 한다.

[0008] 여기서, 상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 시냅스 기능장애 및 기억 장애로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0009] 상기 조성물은 COX-2 및 NOS2의 발현을 감소시키는 것일 수 있다. 또는, 상기 조성물은 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 발현을 감소시키는 것일 수 있다. 또는, 상기 조성물은 신경 아포토시스를 억제하는 것일 수 있다.

## 과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 구체예에 따른 조성물은 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 것으로, 신경퇴행성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물일 수 있다.

[0012] 상기 퀘르세틴은 양파, 사과와 같은 과일 및 채소뿐만 아니라 적포도주에서도 흔히 발견되며, 자연계에 풍부하게 존재하는 플라보노이드(flavonoid) 중의 하나이다. 이러한 퀘르세틴은 활성종 제거, 지질과산화 억제 등의 항산화 효과가 있으며, iNOS, COX-2의 발현을 억제하는 항염증 효과뿐만 아니라 세포 노화, 아포토시스(apoptosis), 자가포식(autophagy) 작용을 활성화시켜 암세포의 세포증식 억제 효과도 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서는 우수한 생리활성 작용을 갖는 퀘르세틴을 이용하여 신경세포의 염증에 대한 효능을 검토하였다.

[0013] 중추신경계에는 신경세포의 면역을 담당하는 성상교세포, 미세아교세포, 신경교세포 등이 있다. 특히, 미세아교세포가 활성화되면 약물이나 독소에 의한 이물질을 제거하고, 신경 성장 인자를 분비하여 신경세포를 보호 및 중추신경계의 항상성 유지하는데 중요한 역할을 한다. 그러나, 미세아교세포가 뇌 손상 등에 의해 활성이 지속되거나, 또는 LPS, IFN- $\gamma$  (interferon-gamma), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha)와 같은 염증 유발 인자의 자극으로 인해 과도하게 활성화되면 신경계에 독성을 보이는 NO, PGE2(prostaglandin E2)와 같은 전염증 매개체(proinflammatory mediator), 사이토카인(cytokine), 활성산소종 등이 분비되어 염증을 악화시키고, 결국 뇌 조직을 파괴함으로써 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 시냅스 기능장애, 기억 장애와 같은 신경퇴행성 질환의 원인이 된다.

[0014] 본 발명에 따른 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 조성물은 LPS에 의해 유발된 쥐의 신경염증에 대해 공간 작업 기억 기능을 향상시킬 뿐만 아니라, 대뇌피질 및 해마에서 시냅스 및 성상교세포의 활성을 향상시키고, COX-2 및 NOS2의 발현을 감소시키고, 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 발현을 감소시키고, 신경 아포토시스를 억제하는 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 따라서, 이러한 조성물은 신경염증 및 신경 세포사를 억제하고, 기억 기능을 향상시킴으로써 신경퇴행성 질환을 예방하거나 치료하는 약학 조성물 또는 신경퇴행성 질환을 예방하거나 개선하는 식품 조성물로 적용 가능하다.

[0015] 본 발명에 따른 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 투여할 수 있으며, 당업계에 알려진 통상적인 방법에 의해 투여 방법, 투여 형태 및 치료 목적에 따라 상기 퀘르세틴을 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 혼합하여 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시킬 수 있다.

[0016] 상기 담체가 희석제로 사용되는 경우에는 염수, 완충제, 텍스트로즈, 물, 글리세롤, 링거액, 락토즈, 수크로즈, 칼슘 실리케이트, 메틸 셀룰로오스 및 에탄올로 이루어진 군에서 선택된 적어도 1종 이상의 담체를 사용한 경구 투여와 비경구투여용으로 분말, 과립, 주사액, 시럽, 용액제, 정제, 좌약, 페사리(pessaries), 연고, 크림 또는 에어로졸 등과 같은 제형으로 제조할 수 있다. 다만, 이때 담체가 상기와 같은 종류의 담체로 한정되는 것은 아니다. 상기 비경구 투여는 경구 이외에 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강, 흡입 등을 통한 유효성분의 투여를 의미한다. 상기 제형에 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함하여 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 제형화할 수 있다.

[0017] 이러한 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여 경로 및 기간에 따라 조절될 수 있어 한정되지 않으며, 증상에 따라 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 자명하게 다양한 범위 내에서 사용할 수 있다. 본 발명에서는 효과적인 예방 또는 치료를 위해 퀘르세틴을 1일 0.01 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 1 내지 50 mg/kg으로 투여하고, 하루에 1회 투여하거나 연속적 또는 간헐적으로 수회 나누어 투여할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명에 따른 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 식품 조성물은 신경퇴행성 질환을 예방 또는 개선하는데 이용할 수 있다. 상기 식품 조성물은 퀘르세틴을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있으며, 식품학적으로 허용가능한 식품첨가물을 더 포함할 수 있다. 상기 식품첨가물은 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당 업계에 알려진 식품첨가물을 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명에서는 식품 조성물의 성질을 크게 변화시키지 않고 식품 조성물의 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선 효과를 보조하는 것이라면, 제한 없이 사용할 수 있다. 식품첨가물의 일례로는 다양한 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 향신제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 들 수 있다.

[0019] 상기 식품 조성물은 신경퇴행성 질환을 예방 또는 개선할 수 있도록 항산화용, 항염증용, 기억 개선용으로 기능화된 건강기능식품으로 이용할 수 있다. 상기 건강기능식품은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 기능성이란, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 또한, 상기 식품 조성물은 각종 식품의 첨가물로 이용할 수 있다. 이러한 식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 식품의 종류에 제한 없이 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

### 발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 조성물은 대상체 내 투여 또는 흡수를 통해 공간 작업 기억 기능을 향상시킬 뿐만 아니라 신경염증이 유발된 대뇌피질 및 해마에서 시냅스 및 성상교세포의 활성을 향상시키고, 항산화 및 항염증 효능을 나타냄으로써 신경퇴행성 질환을 예방하거나 개선 또는 치료에 적용 가능한 약학 조성물 및 식품 조성물로 활용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 일 구체예에 대한 실험 일정의 모식도이다; (i) 2주 동안 용매제로 식염수를 투여한 대조군 (ii) 1주 동안 용매제 투여 후 1주 동안 LPS 0.25 mg/kg/day를 투여한 LPS 투여군 (iii) 2주 동안 퀘르세틴 30 mg/kg/day 및 1주 동안 LPS 0.25 mg/kg/day를 투여한 퀘르세틴 투여군 (LPS 투여 전 1주, LPS와 동시 투여 1주). 14일째 행동 분석 후 쥐를 안락사시켜 웨스턴 블롯 및 형태학적 분석에 사용하였다.

도 2는 본 발명의 일 구체예에 따른 실험 결과이다; 퀘르세틴은 LPS가 투여된 쥐의 기억 기능을 향상시킨다. 행동 분석에 대해 MWM 및 Y 미로 시험을 대조군, LPS 처리군, 퀘르세틴 투여군의 기억 기능을 평가하는데 이용하였다. (A) 1 내지 4일 동안 숨겨진 플랫폼에 도착하는 쥐에 대한 평균 탈출 대기 시간 (B) MWM 시험의 프로브 시험 동안 숨겨진 플랫폼의 평균 건너가는 수 (C) 시험 기간 동안 숨겨진 플랫폼이 설치된 사분면에서 소요된 시간 (D) Y 미로 시험 동안 쥐의 자발적인 변화 행동 %. 히스토그램은 쥐의 평균  $\pm$  SEM을 나타낸다 (n = 15/그룹).

도 3은 본 발명의 일 구체예에 따른 실험 결과이다; 퀘르세틴은 LPS가 투여된 쥐에서 전/후시냅스(pre- and postsynaptic) 마커를 향상시킨다. (A, B) 단백질 Synap 및 PSD95의 웨스턴 블롯팅; 쥐 대뇌피질 및 해마에서의 차이를 히스토그램으로 나타냈다.  $\beta$ -Actin은 로딩 컨트롤(loading control)로서 사용되었다. 정량 밀도 값(quantified density value)은 각 단백질에 대해 평균  $\pm$  SEM으로 A.U.(arbitrary units)로 표시하였다 (8 마리/그룹). (C) 쥐의 대뇌피질 및 해마에서의 대표적인 면역형광 이미지 및 SNAP-23의 정량 히스토그램 (5 마리/그룹). 확대 10X. 축적마 = 50  $\mu$ m. 표시된 데이터는 대조군과 비교하였다.

도 4는 본 발명의 일 구체예에 따른 실험 결과이다; 퀘르세틴은 쥐의 대뇌피질 및 해마에서 LPS에 의해 유도된 활성화된 성상교세포를 개선시킨다. (A, B) 단백질 GFAP 및 Iba-1의 웨스턴 블롯팅; 쥐 대뇌피질 및 해마에서의 차이를 히스토그램으로 나타냈다.  $\beta$ -Actin은 로딩 컨트롤로서 사용되었다. 정량 밀도 값은 각 단백질에 대해 평균  $\pm$  SEM으로 A.U.로 표시하였다 (8 마리/그룹). (C) 쥐의 대뇌피질 및 해마에서의 대표적인 면역형광 이미

지 및 활성화된 GFAP의 정량 히스토그램 (5 마리/그룹). 확대 10X. 축적바 = 50  $\mu$ m. 표시된 데이터는 대조군과 비교하였다.

도 5는 본 발명의 일 구체예에 따른 실험 결과이다; 퀘르세틴은 LPS에 의해 유도된 활성화된 TLR4/NF $\kappa$ B 경로를 중단시킨다. (A, B) 단백질 TLR4 및 p-NF $\kappa$ B의 웨스턴 블롯팅; 쥐 대뇌피질 및 해마에서의 차이를 히스토그램으로 나타냈다.  $\beta$ -Actin은 로딩 컨트롤로서 사용되었다. 정량 밀도 값은 각 단백질에 대해 평균  $\pm$  SEM으로 A.U.로 표시하였다 (8 마리/그룹). (C) 쥐의 대뇌피질 및 해마에서의 대표적인 면역형광 이미지 및 p-NF $\kappa$ B의 정량 히스토그램 (5 마리/그룹). 확대 10X. 축적바 = 50  $\mu$ m. 표시된 데이터는 대조군과 비교하였다.

도 6은 본 발명의 일 구체예에 따른 실험 결과이다; 퀘르세틴은 LPS에 의해 유도된 신경염증 관련 마커를 약화시킨다. (A, B) 단백질 TNF- $\alpha$ , COX-2 및 NOS2의 웨스턴 블롯팅; 쥐 대뇌피질 및 해마에서의 차이를 히스토그램으로 나타냈다.  $\beta$ -Actin은 로딩 컨트롤로서 사용되었다. 정량 밀도 값은 각 단백질에 대해 평균  $\pm$  SEM으로 A.U.로 표시하였다 (8 마리/그룹). (C) 쥐의 대뇌피질 및 해마에서의 대표적인 면역형광 이미지 및 IL-1 $\beta$ 의 정량 히스토그램 (5 마리/그룹). 확대 10X. 축적바 = 50  $\mu$ m. 표시된 데이터는 대조군과 비교하였다.

도 7은 본 발명의 일 구체예에 따른 실험 결과이다; LPS에 의해 유도된 신경 아포토시스 경로는 대뇌피질 및 해마에서 퀘르세틴에 의해 예방된다. (A, B) 단백질 Bcl-2, Bax, Cyto. c, caspase 3 and PARP-1의 웨스턴 블롯팅; 쥐 대뇌피질 및 해마에서의 차이를 히스토그램으로 나타냈다.  $\beta$ -Actin은 로딩 컨트롤로서 사용되었다. 정량 밀도 값은 각 단백질에 대해 평균  $\pm$  SEM으로 A.U.로 표시하였다 (8 마리/그룹). (C) 쥐의 대뇌피질 및 해마에서의 대표적인 면역형광 이미지 및 caspase 3의 정량 히스토그램 (5 마리/그룹). 확대 10X. 축적바 = 50  $\mu$ m. (D) 쥐의 대뇌피질 및 해마에서의 대표적인 면역조직화학 이미지 (니슬 염색) 및 생존 신경 반응도, 강도의 정량 히스토그램. 표시된 데이터는 대조군과 비교하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 첨부된 도면을 참조하며 본 발명에 따른 퀘르세틴을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.

## 1. 재료 및 방법

### 1-1. 마우스 종, 사육장 및 윤리적 고려사항

야생형 수컷 C57BL/6N 쥐 (8주령, 체중 25~30 g)를 샘타코 바이오(Samtako Bio, 한국)에서 구매하였다. 쥐를 습도 60  $\pm$  10%, 23 $^{\circ}$ C에서 12시간/12시간 light/dark cycle 조건으로 대학 동물 사용장에서 일주일 동안 적응시키고, 사료와 물을 임의로(*ad libitum*) 제공하였다. 쥐의 유지 및 처치는 경상대학교 응용생명과학부에서 발행된 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC) 가이드라인에 따라 진행하였다. 동물의 고통을 최소화하는데 노력하였다. 쥐에 대한 실험 방법은 승인된 가이드라인(승인 ID: 125)에 따라 진행하였고, 모든 실험 방법은 경상대학교 응용생명과학부의 IACUC에 의해 승인되었다.

### 1-2. 동물 그룹화 및 처치

동물 그룹화 및 처치의 간략한 설명을 도 1에 나타내었다. 적응 후 쥐를 다음의 그룹으로 배치하였다:

(1) 대조군 - 2주 동안 용매제(vehicle)로 식염수(saline)를 복강 투여(i.p.)

(2) LPS 투여군 - 1주 동안 LPS (0.25 mg/kg/day)를 복강 투여

(3) 퀘르세틴 투여군 - 2주 동안 퀘르세틴 (30 mg/kg/day) 및 1주 동안 LPS (0.25 mg/kg/day)를 복강 투여 (LPS 투여 이전 1주, LPS와 동시 투여 1주)

퀘르세틴의 용량은 체중 복용량 30 mg/kg의 퀘르세틴이 10 또는 20 mg/kg에 비해 더 명확하고 유의한 효과를 유도한다는 이전 보고된 연구에 따라 선택되었다 (Haleagrahara et al., 2009; Yang et al., 2014; Park et al., 2018). 퀘르세틴을 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해하였다. 매일 새로운 퀘르세틴 용액을 요구되는 투여량 (250  $\mu$ L/mouse/day)에 따라 생리식염수(normal saline)로 제조하였다. LPS를 생리식염수에 용해하였고, 이를

쥐에 복강 투여하였다. 매일 동일한 시간에 쥐를 주사하기 위해 주사실로 옮겼다.

### 1-3. 행동 연구

기억 기능에 대한 퀘르세틴의 효과를 조사하기 위해, 모리스 수중 미로(Morris water maze; MWM) 시험 및 Y 미로(Y-maze) 시험을 이용하여 행동 연구 (n = 15/그룹)를 실시하였다.

모리스 수중 미로 시험은 기억 기능을 평가하는 매개변수 작업(parameter task)이다. 실험 장치는 흰색 페인트로 칠해져 불투명하고, 깊이가 15.5 cm가 되게 물 ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ )을 포함하는 원형 물탱크 (지름 100 cm, 높이 40 cm)로 구성되었다. 투명한 탈출 플랫폼 (지름 10 cm, 높이 20 cm)을 수면 1 cm 아래에 숨겼으며, 한 사분면의 중간 지점에 위치시켰다. 모리스 수중 미로 시험을 실험 일정 중 7일째 시작하였고, 13일째 끝냈다 (도 1). 각각의 쥐는 3개의 회전하는 시작 사분면 중 하나에 숨겨진 플랫폼을 사용하여 6일 연속으로 매일 훈련을 받았다. 수중 미로에서 탈출하는 대기 시간(latency) (물에 잠긴 탈출 플랫폼 찾기)을 각 시험마다 계산하였다. 7일째, 마지막 탈출 대기 시간 및 프로브(probe) 시험을 기억 강화를 평가하는데 수행하였다. 프로브 시험은 플랫폼을 제거하고, 각 마우스가 60초 동안 자유롭게 수영할 수 있도록 허용하여 수행되었다. 목표 사분면에서 쥐가 머무르는 시간 (숨겨진 플랫폼 훈련을 하는 동안 그 플랫폼에 위치할 때)을 측정하였다. 목표 사분면에서 머무르는 시간은 학습 후 발생하는 기억 강화의 강도를 대표하는 것으로 간주된다. 모든 데이터를 비디오 추적 소프트웨어 (SMART, Panlab 제조)를 이용하여 기록하였다.

Y 미로는 검정색으로 칠해진 나무로 만들어졌다. 미로의 각 팔(arm)은 바닥과 천장이 길이 50 cm, 높이 20 cm, 너비 10 cm이다. Y 미로를 실험 일정 중 12일째 시작하였고, 14일째 끝냈다 (도 1). 각각의 쥐를 장치의 중심부에 위치시키고, 8분씩 3회 동안 미로를 통해 자유롭게 움직이게 허용하였다. 팔 입구들을 시각적으로 관찰하였다. 자발적인 변화(spontaneous alteration)를 중복되는 3회 세트에서 3개의 팔로 쥐가 연속적으로 들어가는 것으로 정의하였다. 변형 행동 (%)을 다음과 같이 계산하였다:  $[\text{연속적인 3회 세트 (연속적으로 3개 다른 팔로 진입)}/\text{총 팔 입장의 수}-2] \times 100$ .

### 1-4. 쥐 뇌에서 단백질 추출

행동 연구 후 모든 쥐를 수술실로 옮기고, Rompun (Xylazine) 체중당 0.05 mL/100 g 및 Zoletil (ketamine) 체중당 0.1 mL/100 g으로 마취시켰다. 마취 후 쥐를 단두하여 안락사시키고, 뇌 조직을 바로 제거하여 대뇌피질 및 해마를 분리시켰고,  $-80^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 대뇌 피질 및 해마 조직을 사용자 지시사항에 따라 PRO-PREP™ 단백질 추출액 (iNtRON Biotechnology 제조)에서 균질화시켰다. 샘플을 25분 동안  $4^\circ\text{C}$ , 13000 rpm에서 원심분리하였다. 상층액을 모아서  $-80^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다.

### 1-5. 웨스턴 블롯 분석

웨스턴 블롯팅을 기존의 방법으로 수행하였다 (Ali et al., 2018). 간략하게는, 샘플에서 단백질 농도 (BioRad protein assay kit, BioRad Laboratories 제조)를 측정하였다. 동일한 양의 단백질 ( $15\text{--}30 \mu\text{g}$ )을 12-15% SDS-PAGE 젤에서 전기영동하고, PVDF 막에 트랜스퍼하였다(transferred). 단백질 마커 (GangNam-STAIN, iNtRON Biotechnology 제조)를 단백질의 분자량을 확인하기 위해 평행하게 수행하였다. 비특이적 결합을 감소시키기 위해 막을 5% 탈지유(skim milk)를 이용하여 블록하였고(blocked), 1:1000으로 희석하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 각각의 1차 항체와 인큐베이션하였다; Iba-1(ionized calcium binding adapter molecule 1), GFAP(glial fibrillary acidic protein), p-NF $\kappa$ B(phosphorylated-nuclear factor kappa B), TLR4(toll-like receptor 4), PSD 95(postsynaptic density protein 95), Synap(synaptophysin), TNF- $\alpha$ , NOS2(nitric oxide synthase 2), COX2(cyclooxygenase 2), caspase 3, PARP-1(poly (ADP-ribose) polymerase-1), Cyto. c(cytochrome c), Bax, Bcl2 및  $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology 제조). 면역반응은 화학발광 (Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Reagent)을 이용하여 확인되었다. X-ray 필름을 스캔하여 밴드의 광학적 밀도(optical density)를 Computerbased Sigma Gel software (SPSS)를 이용하여 측정하였다.

### 1-6. 면역조직화학 염색을 위한 뇌 조직 수집 및 샘플 준비

[0049] 행동 연구 후 모든 쥐를 수술실로 옮기고, Rompun (Xylazine) 체중당 0.05 mL/100 g 및 Zoletil (ketamine) 체중당 0.1 mL/100 g으로 마취시켰다. 쥐를 0.9% 생리식염수와 4% 파라포름알데히드로 경심(transcardially) 관류하였다. 쥐를 단두하여 안락사시키고, 뇌 조직을 바로 제거하여 72시간 동안 4℃에서 차가운 파라포름알데히드로 고정하고서 72 시간 동안 20% 자당 인산 완충용액(sucrose phosphate buffer)에 담갔다. 모든 뇌를 O.C.T. 혼합물 (A.O. 제조)에서 냉동시키고서 CM 3050C 저온 유지 장치 (Leica 제조)를 이용하여 14  $\mu$ m 이마 절단(coronal sections)으로 절단하였다. 절단부(section)를 해동시켜 ProbeOn Plus charged slides (Fisher 제조) 위에 고정시켰다.

[0051] **1-7. 면역형광 염색**

[0052] 면역형광 염색을 일부 변형된 기존의 방법으로 수행하였다 (Badshah et al., 2016). 간략하게는, 뇌 절단부를 포함하는 슬라이드를 각 0.01 M PBS로 10분 동안 2회 세척하여 1X 프로테아제 K를 조직에 첨가하고, 슬라이드를 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 슬라이드를 각 5분 동안 2회 세척하여 블로킹(blocking) 용액 (2% 혈청 및 0.3% 트리트론 X-100을 포함하는 0.01 M PBS)에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 슬라이드를 블로킹한 후 블로킹 용액에 1:100으로 희석된 각각의 1차 항체와 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다: GFAP, p-NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , caspase 3 및 SNAP23 (Santa Cruz Biotechnology 제조). 1차 항체와 인큐베이션 후 절단부를 2차 항체와 2시간 동안 인큐베이션하였다: TRITC/FITC(tetramethyl rhodamine isothiocyanate/fluorescein isothiocyanate) 표지 항체 (1:50) (Santa Cruz Biotechnology 제조). 인큐베이션 후 슬라이드를 DAPI 및 Prolong Antifade Reagent로 고정하였다. 사진을 FV10-ASW 3.1 Viewer를 갖춘 FluoView FV 1000 레이저 공초점 형미경 (Olympus 제조)을 이용하여 캡처하였다. 조직 당 원본 공초점 사진의 수는 각 그룹별로 5장이고, TIF 이미지로 전환하였다. 모든 그룹에 대해 TIF 이미지의 대뇌피질/총 면적, 해마/총 면적의 동일 부분에 대한 형광 강도를 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 측정하였다. TIF 이미지 배경을 임계점 강도(threshold intensity)에 따라 최적화하였고, 모든 그룹에 대해 동일한 임계점 강도로 분석된 면역형광 강도를 대조군과 비교하여 샘플의 상대적 집적 밀도로 표현하였다.

[0054] **1-8. 니슬 염색(Nissl staining)**

[0055] 신경 손실 및 생존을 분석하기 위해, 니슬 염색을 최소한으로 변형된 기존의 방법으로 수행하였다 (Ali et al., 2015b; Badshah et al., 2015a). 간략하게는, 모든 슬라이드 절단부를 0.01M PBS로 10~15분 동안 2회 세척하고, 10~15분 동안 빙초산 몇 방울이 함유된 0.5% 크레실 바이올렛 용액(cresyl violet solution)으로 인큐베이션하였다. 조직을 증류수로 세척하고 에탄올 (70, 95, 100%)로 탈수시켰다. 탈수 후 조직을 봉입제를 이용하여 커버슬립으로 덮었다. 면역조직화학적 TIF 이미지를 형광 광학 현미경(fluorescence light microscope)으로 캡처하였다. 슬라이드 당 이미지 수는 각 그룹별로 5장이다. 뇌의 대뇌피질/총 면적, 해마/총 면적에서 생존 신경의 수에 대한 면역조직화학적 강도를 다음의 방법으로 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 측정하였다. TIF 이미지 배경을 임계점 강도(threshold intensity)에 따라 최적화하여 모든 그룹에 대해 동일한 임계점 강도로 생존 신경 세포를 분석하였고, 대조군과 비교하여 샘플의 생존 신경세포의 수에 대해 상대적 집적 밀도로 표현하였다.

[0057] **1-9. 화합물**

[0058] LPS, 퀘르세틴 (2-(3, 4-Dihydroxyphenyl)-3, 5, 7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one) 및 DMSO를 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구매하였다.

[0060] **1-10. 데이터 및 통계 분석**

[0061] 웨스턴 블롯 밴드를 스캔하여 Sigma Gel System (SPSS)를 이용하여 집적도 분석(densitometric analyses)으로 분석하였다. ImageJ 소프트웨어 (National Institutes of Health, 미국)를 면역형광 및 면역조직화학적 이미지의 집적도 분석에 이용하였다. 모든 히스토그램은 GraphPad Prism 5/6 (GraphPad Software)를 이용하여 만들었다. 투여군과 대조군 간의 비교를 위해 통계 분석을 two-tailed independent Student's t-test와 Tukey's multiple comparison test에 따른 ANOVA(one-way analysis of variance)를 이용하여 수행하였다. 표현된 데이터는 세 가

지 독립적인 실험의 평균  $\pm$  SEM으로 기재하였다. 통계적 유의도는  $P < 0.05$ 이다. \*는 대조군과의 현저한 차이이고, #는 LPS 투여군과의 현저한 차이를 나타낸다.

## 2. 결과

### 2-1. 기억 기능 향상

케르세틴의 기억 향상 효과를 평가하기 위해, 쥐에 2주 동안 케르세틴 30 mg/kg을 복강 투여하여 MWM 시험 및 Y 미로 시험으로 쥐의 기억 기능을 평가하였다.

MWM 시험에서는 쥐를 물에 숨겨진 플랫폼을 찾도록 훈련시켜 그 플랫폼에 도달하는데 걸리는 시간을 분석하였다. LPS 투여군은 대조군에 비해 숨겨진 플랫폼을 찾는데 더 많은 시간이 걸렸다 (도 2의 A). 그러나, 케르세틴 투여군은 LPS 투여군에 비해 숨겨진 플랫폼에 도달하는데 적은 시간이 걸린 것으로, 기억 기능이 크게 향상되었다. 나아가, 프로브 시험에서는 케르세틴 투여군이 플랫폼을 건너가는 횟수가 현저히 증가하고, 숨겨진 플랫폼이 이전에 있었던 목적 사분면에서 소요되는 시간이 증가하였다 (도 2의 B, C). 이러한 결과는 케르세틴이 LPS의 영향과 반대로, 기억력을 향상시킨다는 것을 입증한다.

Y 미로 실험에서는 단기 공간 기억 장애를 평가하였다. 케르세틴 투여군은 자발적인 변화 행동 백분율 (공간 작업 기억력의 향상을 위한 파라미터)이 현저히 증가한 것으로, 케르세틴이 LPS가 투여된 쥐의 공간 작업 기억 기능 향상시키는 것을 나타낸다 (도 2의 D).

### 2-2. 시냅스 장애 보호

웨스턴 블롯과 공초점 현미경을 통해 시냅스 발현 수준으로 케르세틴의 효과를 실험하였다.

웨스턴 블롯 결과에서, LPS 투여군은 대조군에 비해 대뇌피질 및 해마의 PSD-95 및 Synap의 발현 수준이 감소하였다. 반면, 케르세틴 투여군은 대뇌피질 및 해마에서 PSD-95 및 Synap의 발현이 증가하였다 (도 3의 A, B).

스텝스 기능에 대한 케르세틴의 효과를 더 확인하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 SNAP-23 발현 수준을 측정하였다. 면역형광 이미지는 대조군에 비해 LPS 투여군에서 반응도가 감소하였다. 케르세틴 투여군은 LPS 투여군에 비해 대뇌피질 및 해마의 DG 부위에서 SNAP-23의 면역형광 반응도가 현저히 증가하였다 (도 3의 C).

### 2-3. 미세아교세포 및 성상교세포의 활성화 개선

중추신경계에서 미세아교세포 및 성상교세포는 신경염증 반응의 중요한 조절자로서 감염, 스트레스, 손상과 같은 문제들에 대해 빠르게 반응하며, GFAP 및 Iba-1는 각각 활성화된 성상교세포 및 미세아교세포의 특이적 마커이다.

GFAP 및 Iba-1의 발현을 분석하기 위해, 웨스턴 블롯을 이용하여 단백질의 발현 수준을 측정하였다. LPS 투여군은 대조군에 비해 대뇌피질 및 해마에서 GFAP 및 Iba-1의 발현이 증가하였다. 케르세틴 투여군은 대뇌피질 및 해마에서 GFAP 및 Iba-1의 발현이 현저히 감소하였다 (도 4의 A, B).

추가로, GFAP 발현 수준을 면역형광 염색을 이용하여 분석하였다. LPS 투여군은 대조군에 비해 GFAP 양성 세포의 강도 및 면역형광 반응도가 증가하였다. 케르세틴 투여군은 LPS 투여군에 비해 GFAP 양성 세포의 강도 및 면역형광 반응도가 감소하였다. (도 4의 C).

### 2-4. 활성화된 TLR4/NF $\kappa$ B 경로 중단

쥐의 대뇌피질 및 해마에서 LPS에 의해 활성화된 TLR4를 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 케르세틴 투여군은 LPS 투여군에 비해 대뇌피질 및 해마에서 TLR4의 발현이 현저하게 감소하였다 (도 5의 A, B).

활성화된 TLR4는 MyD88 의존 경로를 통해 염증성 신호전달이 진행하면서 NF $\kappa$ B의 활성을 향상시킨다. 쥐의 대뇌피질 및 해마에서 p-NF $\kappa$ B의 활성을 웨스턴 블롯, 면역형광으로 확인하였다. 케르세틴 투여군은 대뇌피질 및 해마에서 p-NF $\kappa$ B의 발현이 현저히 감소하였다 (도 5의 A, B). 또한, 케르세틴 투여군은 LPS 투여군에 비해 면역

형광 반응도가 현저히 감소하였다 (도 5의 C).

[0083] 2-5. 신경염증 관련 마커 개선

[0084] LPS는 TNF- $\alpha$ , COX-2, NOS-2, IL-1 $\beta$ 와 같은 염증성 매개체의 생산을 증가시킨다. LPS 투여가 쥐의 대뇌피질 및 해마에서 TNF- $\alpha$ , COX-2, NOS-2의 발현을 증가시키는지 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

[0085] 퀘르세틴 투여군은 염증성 단백질의 발현을 감소시켰다 (도 6의 A, B). IL-1 $\beta$ 의 면역형광 결과에서, LPS 투여군은 대조군에 비해 대뇌피질 및 DG 부위에서 IL-1 $\beta$  양성 세포의 수가 증가하였으나, 퀘르세틴 투여군은 대뇌피질 및 DG 부위에서 IL-1 $\beta$  양성 세포 및 형광 면역활성도가 현저히 감소하였다 (도 6의 C).

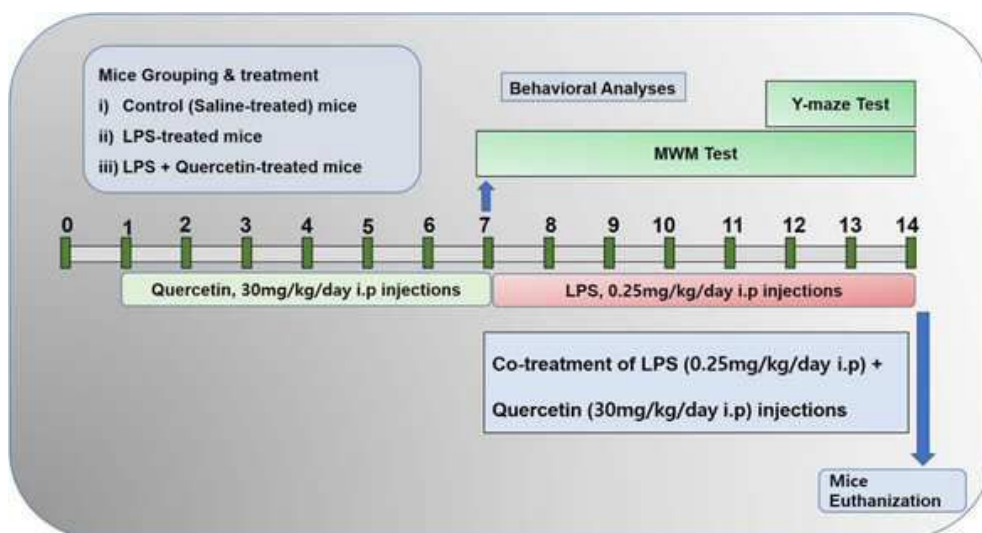
[0087] 2-6. 신경 퇴화 예방

[0088] 미토콘드리아 아포토시스 경로(mitochondrial apoptotic pathway)는 신경 퇴화에서 중요한 역할을 하며, Bcl-2 및 Bax는 각각 항아포토시스(antiapoptotic), 후아포토시스(proapoptotic)와 관련된 마커이다. Bax/Bcl-2 비율은 아포토시스 경로의 중요한 지표이며, 이 비율이 증가하면 카스파제(caspase)의 활성을 초래하는 Cyto. c(cytochrome C)의 과활성을 유발한다. Bax/Bcl-2 비율, Cyto. C의 분비를 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 퀘르세틴 투여군은 LPS 투여군에 비해 Bax/Bcl-2 비율, Cyto. C 발현 수준이 현저히 감소하였다. 쥐의 대뇌피질 및 해마에서 caspase 3 활성을 웨스턴 블롯 및 공초점 현미경으로 확인하였다. 퀘르세틴 투여군은 LPS 투여군에 비해 활성화된 caspase 3 활성이 감소하였다 (도 7의 A, B). 대뇌피질 및 CA-1 부위에서 caspase 3 양성 세포 및 caspase 3의 형광 반응도를 공초점 현미경으로 확인하였다. 퀘르세틴 투여군은 뇌의 대뇌피질 및 CA-1 부위에서 caspase 3 양성 세포 및 형광 반응도가 현저히 감소하였다 (도 7의 C).

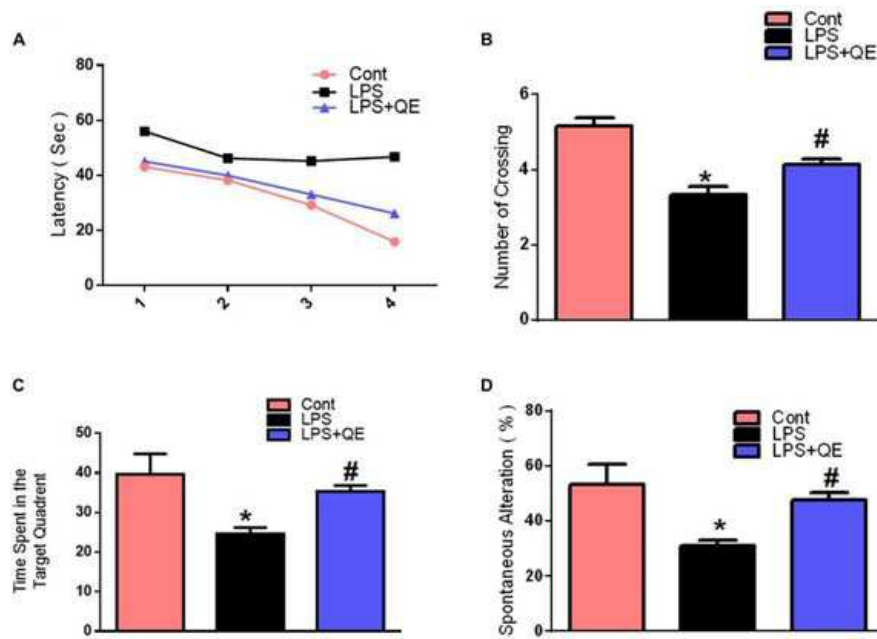
[0089] PARP-1은 DNA 복구 및 게놈 안정성에 관여하며 신경세포의 사멸을 유도하는 핵산 효소이다. 활성화된 caspase 3이 PARP-1의 과활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Williams et al., 2008; Badshah et al., 2015a). 쥐의 대뇌피질 및 해마에서 PARP-1의 과발현을 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 퀘르세틴 투여군은 대뇌피질 및 해마에서 PARP-1의 발현이 감소하였다 (도 7의 A, B). 면역조직화학적 니슬 염색에서, LPS 투여군은 대조군에 비해 쥐의 대뇌피질 및 해마에서 신경 생존 반응도가 감소하였다. 퀘르세틴 투여군은 대뇌피질 및 해마에서 신경세포의 생존을 증가시켰다 (도 7의 D).

도면

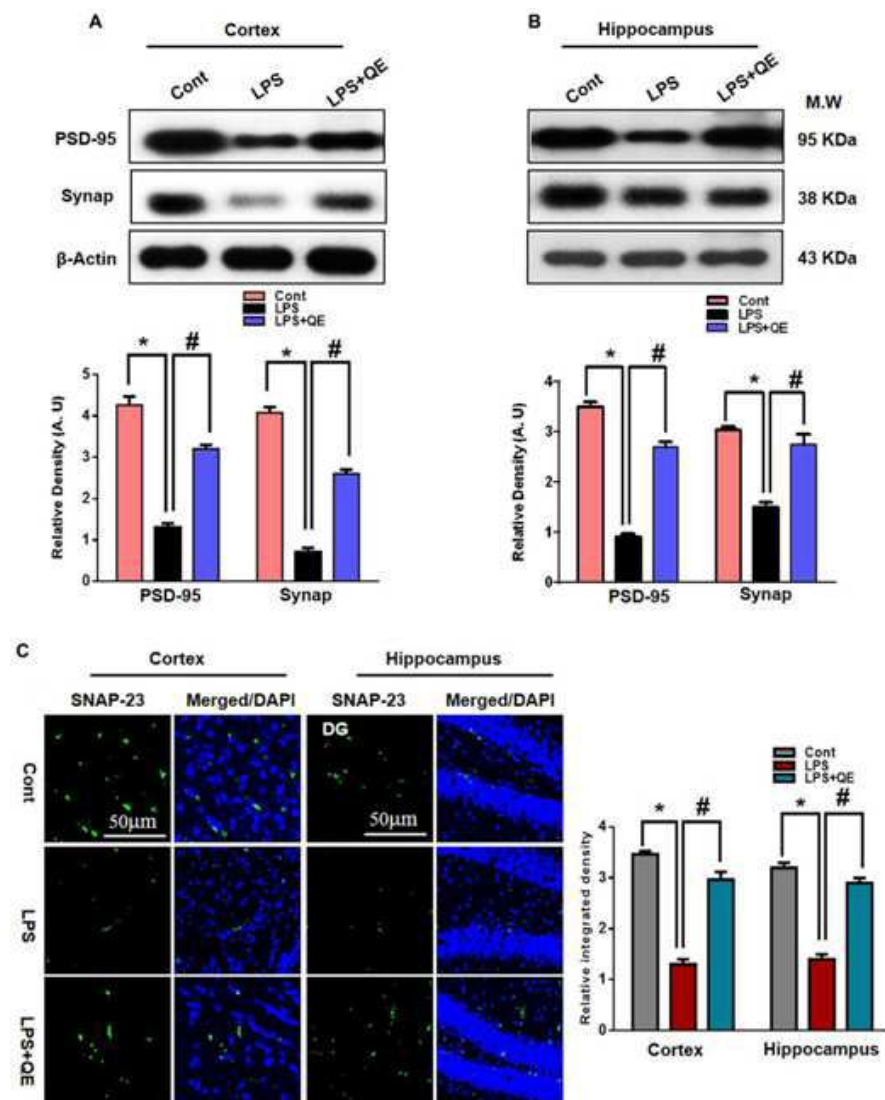
도면1



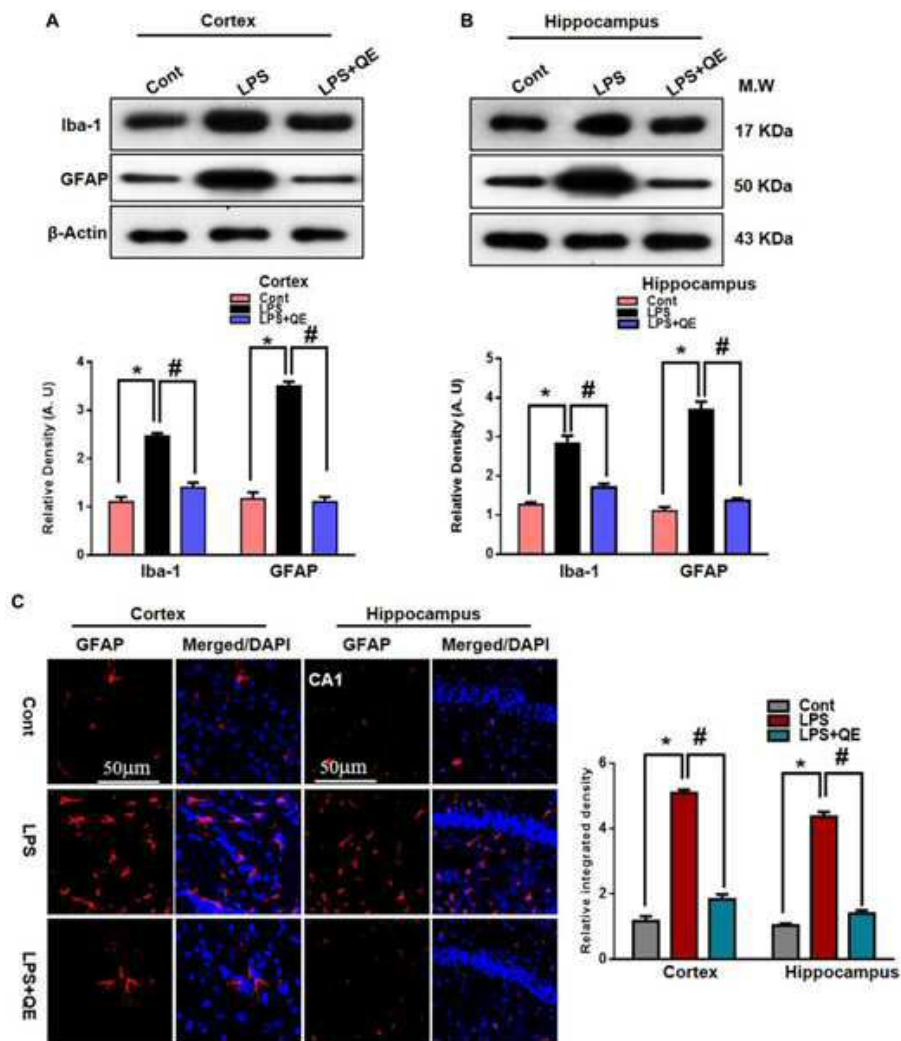
도면2



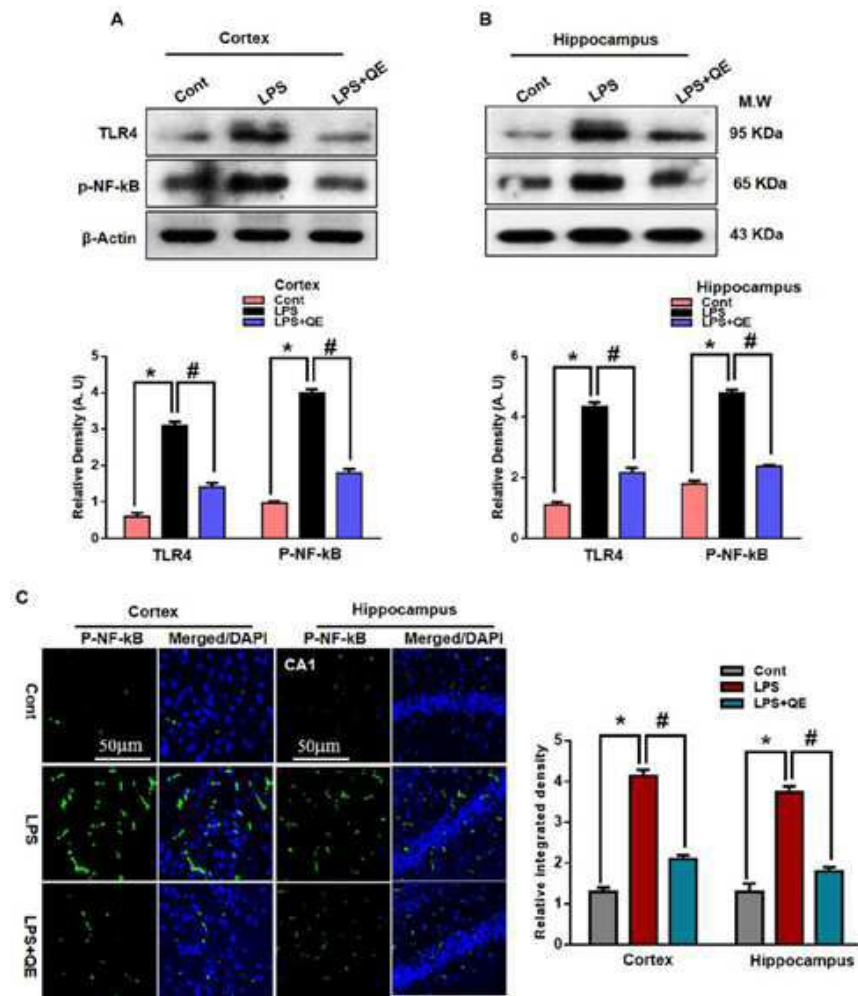
도면3



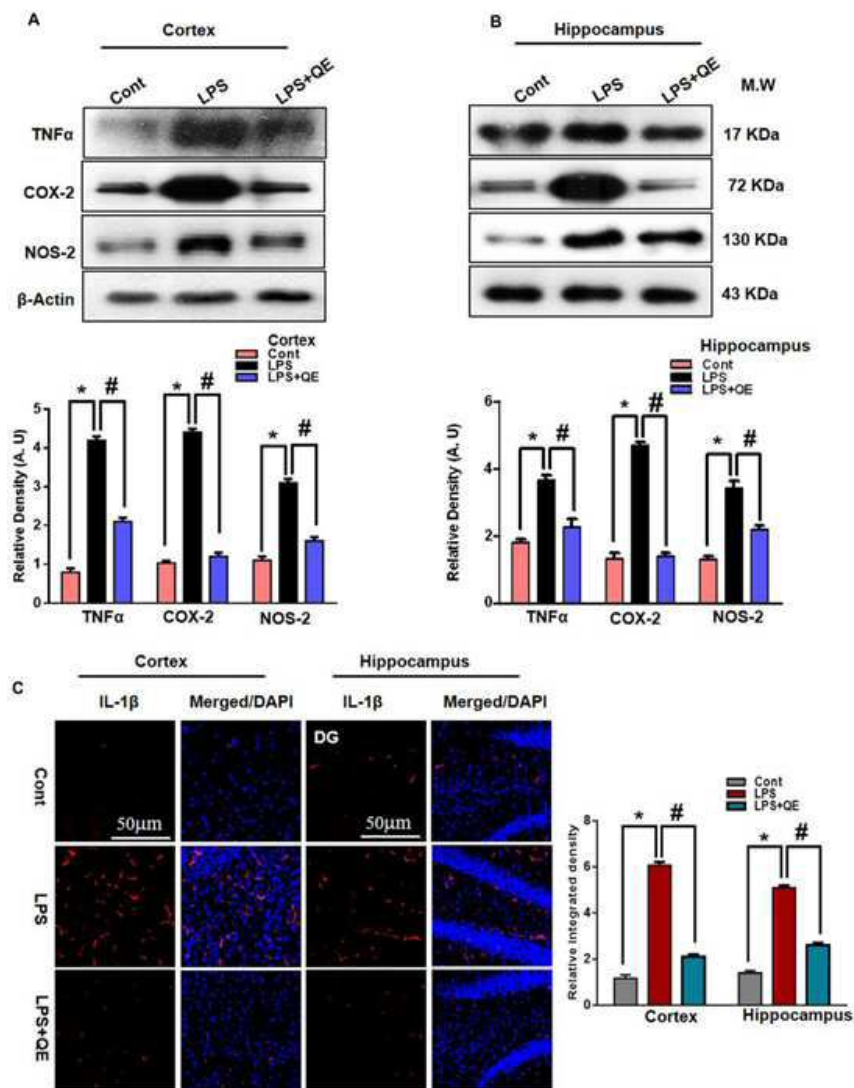
도면4



도면5



도면6



도면7

