



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0106891
(43) 공개일자 2007년11월06일

(51) Int. Cl.

A61K 31/34(2006.01) A61P 39/06(2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0039320

(22) 출원일자 2006년05월01일

심사청구일자 2006년05월01일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

김미리

대전 유성구 신성동 대림아파트 101-201

석대은

대전 유성구 신성동 두레아파트 101-201

최혜송

대전시 유성구 공동 220 충남대학교 약학대학 약
품생화학실험실301호

(74) 대리인

이덕록

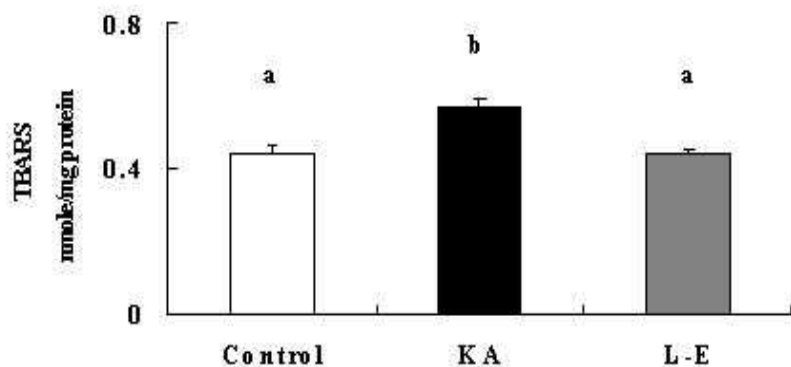
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 뇌조직 및 간조직내 산화적 스트레스에 대한 보호활성을가지는 4-히드록시피노레시놀을 유효성분으로 함유하는항산화제 조성물

(57) 요약

본 발명은 생체내 항산화 활성을 갖는 4-히드록시피노레시놀을 유효성분으로 함유하는 항산화제 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 뇌조직 및 간조직내 산화성 스트레스에 대한 예방 및 치료 효과를 가지는 4-히드록시피노레시놀을 유효성분으로 함유하는 항산화제 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 4-히드록시피노레시놀은 카인산(kainic acid)이 투여된 생쥐 모델의 뇌 조직내에서 유발되는 산화성 스트레스에 대한 항산화 활성과 항산화 효소의 유도가 뛰어나, 신경독성 완화 보호작용이 우수하며, 아울러 카인산 투여시 간조직으로 전달 유도된 산화성 스트레스에 대한 항산화 보호작용과 phase II 효소의 유도효과가 뚜렷해 간조직내 산화성 스트레스도 방지하므로 4-히드록시피노레시놀은 뇌조직 및 간조직 등에서 유발된 산화성 스트레스를 효과적으로 방지하고 치료하는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도1

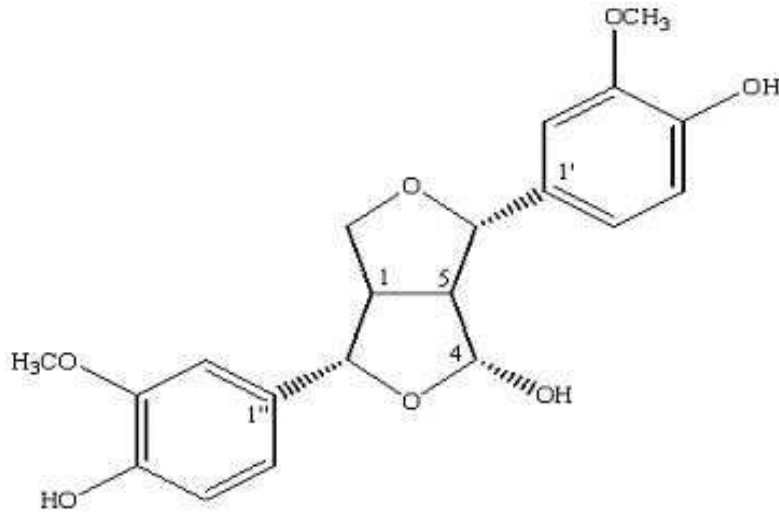


특허청구의 범위

청구항 1

뇌조직 및 간조직내 산화적 스트레스에 대한 보호활성을 가지는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항산화제 조성물.

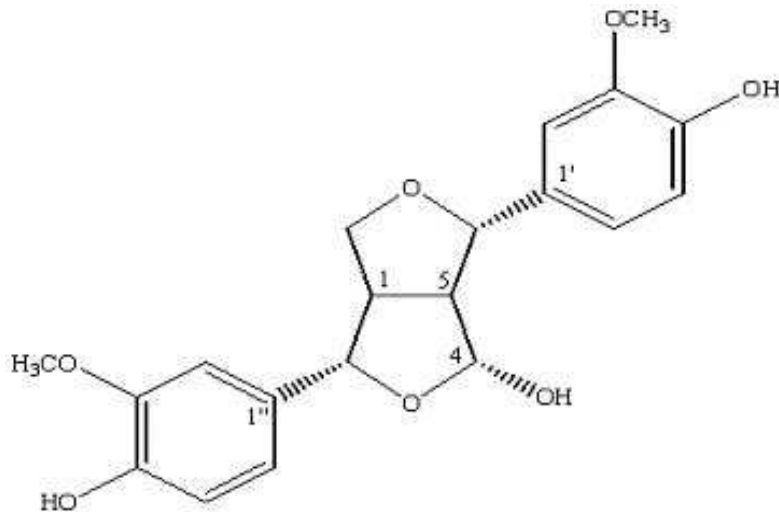
[화학식 1]



청구항 2

뇌조직 및 간조직내 산화적 스트레스에 대한 보호활성을 가지는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 뇌질환 또는 간질환 치료 및 예방용 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 뇌질환은 산화적 스트레스가 주 병인인 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 루게릭병(Amyotrophic lateral sclerosis), 허혈성 뇌졸중(Hypoxic-ischemic injury) 또는 퇴행성 척추손상이고 간질환은 간조직내 산화적 손상과 관련된 질환인 만성 간 손상(chronic liver damage)임을 특징으로 하는 뇌질환 또는 간질환 치료 및 예방용 조성물.

청구항 4

페스타슬리그노라이드 에이(Pestaslinolide A)로부터 나린지나제(naringinase) 또는 글리코시다제

(glycosidase) 처리에 의해 4-히드록시피노레이놀(4-hydroxypinoreinol)을 수득하는 단계;

상기 단계의 용액을 DMSO에 용해 후 산성 완충액(pH 5-7)에 용해한 후에 과량의 나린지나제(excess naringinase) 처리 후에 에칠 아세테이트로 추출 분획한 후 에칠 아세테이트층을 수득하는 단계; 및

상기 단계의 에칠 아세테이트층을 농축 후에 TLC 분리하는 단계를 포함함을 특징으로 하는 4-히드록시피노레이놀 함유 분획물을 얻는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <10> 본 발명은 생체내 항산화 활성을 갖는 4-히드록시피노레이놀을 유효성분으로 함유하는 항산화제 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 뇌조직 및 간조직내 산화적 스트레스에 대한 보호활성을 가지는 4-히드록시피노레이놀을 유효성분으로 함유하는 항산화제 조성물에 관한 것이다.
- <11> 인구의 고령화와 사회의 복잡성으로 인해 날로 증가하는 퇴행성질환의 병인규명이 이루어지면서 스트레스에 의한 ROS(과산화수소 등 유해산소종)가 여러 가지 퇴행성질환(신경계질환과 동맥경화, 당뇨병 신증, 만성 간손상 등) 유발의 주요 요인으로 밝혀지면서 이를 방지하기위한 연구가 진행되어왔다.
- <12> 한국인의 사망 원인을 살펴보면 뇌질환이 높은 사망원인을 차지하며, 단일 장기의 질환으로 볼 때 가장 높은 사망원인이다. 대표적인 뇌질환으로는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)(Furuta, A. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1995, 146, 357-367), 다발성 경화증(Multiple sclerosis, MS)(Takeda, A. *et al.*, *Neuroscience Letters*, 1996, 21, 17-20), 루게릭병(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)(Rosen, D.R. *et al.*, *Nature*, 1993, 362, 59-62), 파킨슨병(Parkinson's disease, PD)(Bowling, A.C. and Beal, M.F., *Life Sci.*, 1995, 56(14), 1151-1171), 뇌졸중(stroke), 허혈장애(ischemia) 등이 있는데, 상기질환의 대부분이나 노인성 뇌 질환은 뇌세포 내에서의 라디칼 형성을 수반하는 산화적 스트레스가 주요한 병인에 해당한다(Smith, M.A., *J. Neurochem.*, 1997, Supp. S1, 69, 19).
- <13> 산화적 스트레스는 세포나 조직이 독성 자유 라디칼(toxic free radical)에 의해 손상되는 것을 의미하는 것으로 산화적 스트레스 또는 정상적인 노화 과정에서 발생하는 독성 자유 라디칼이 뇌신경조직의 퇴행성 질환(neurodegenerative disease)에 관련하는 것으로 알려져 있다 (Good, D.F. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1996, 149(1), 21-28; Smith, M.A., *J. Neurochem.*, 69, 1997, Supp. S1, 19).
- <14> 뇌 무게는 체중의 2% 밖에 되지 않으나 산소 소비량은 전체의 20%를 차지하기 때문에 뇌 조직내 산소의 분압이 높아지게 된다. 특히, 뇌조직은 자유 라디칼 공격에 대해서 민감한 것으로 알려져 있는데, 이는 뇌 신경세포내 방어 기전은 미약한 반면에, 산화되기 쉬운 다가불포화지방산(long chain unsaturated fatty acids)이 고농도로 뇌조직내에 존재하기 때문이다.
- <15> 포유동물의 신경계 중에서 흥분성 아미노산 신경계(excitatory amino acids system, EAAs system)의 과다흥분은 자유 라디칼의 증가에 따른 산화적 스트레스를 유발하는데, 간질(epilepsy), 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중, 정신 장애(trauma)등과 같은 뇌 질환의 유발에는 자유 라디칼의 증가에 기인하는 산화적 스트레스가 관여한다(Rosen, D.R. *et al.*, *Nature*, 1993, 362, 59-62). 또한 흥분성 신경독(excitotoxins)은 흥분성 아미노산 신경계를 활성화시키며, 이들에 의해 과도하게 흥분된 흥분성 아미노산 신경계는 신경세포 내의 이온의 유입과 자유 라디칼 생성을 유도하여 신경세포의 손상을 일으킨다. 특히 흥분성 아미노산 신경계의 글루타메이트 수용체는 길항제의 선택성에 따라서 NMDA(N-methyl-D-aspartate), AMPA(α -amino-4-isoxazole-propionic acid), 카이닉산(kainic acid, KA) 수용체로 구분된다. 이들 NMDA 수용체의 경우 수용체가 과도하게 흥분되면 Ca^{2+} 의 유입으로 세포 구성성분인 지질, 단백질 및 핵산의 분해를 초래하는 반면에, 비-NMDA 수용체가 과도하게 흥분되면 Na^+ 의 유입으로 인해 신경세포의 용적증가(swelling)를 초래한다. 한편 비-NMDA 수용체인 카이닉산 수용체가 활성화되는 경우 많은 활성산소종(reactive oxygen species, 이하 "ROS"라 약칭함)의 생성을 통해 뇌신경세포의 손상이 유발되는데(Olney, J. W. *et al.*, *Brain Res*, 1974, 77, 507-512), 이러한 카이닉산의 흥분작용은 궁극적으로는 비가역적인 신경병리학적 변화를 초래하며, 이외에도 뇌 독성을 나타낼 수 있는 정도의 글루

타메이트 양을 방출하며 결국에는 산화성 스트레스를 유발한다(Roberts, J. C. and Francetic, D. J., *Anal. Biochem.*, 1993, 211, 183-187). 이처럼 카이닉산에 의해 유도된 ROS의 생성은 세포막의 파괴에 따른 세포 사멸(neuronal death)을 유도하게 되는바, 이러한 신경세포 독성은 적절한 항산화제의 투여에 의해 보호될 것으로 사료된다(Coyle, J. T., and Puttfarcken, P. *Science*, 1993, 262, 689-695). ROS에 대한 세포내 존재하는 내재 보호물질로는 글루타치온(glutathione)(Roberts, J. C. and Francetic, D. J. *Anal. Biochem.*, 1993, 211, 183-187), α -토코페롤(Kormbrist, D. J. and Movis, R. D., *Lipids*, 1980, 15, 315-322), 비타민 A(Ernster, L. and Nordenbrand, K., *Methods in Enzymology*, 1967, 10, 574-580), 비타민 C, 셀레늄(selenium) 등이 있으며, 한편 항산화 효소계로는 superoxide dismutase (McCord and Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1969, 224, 6049-6055), 카탈라제(catalase), 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase)(Roberts, J. C. and Francetic, D. J., *Anal. Biochem.*, 1993, 211, 183-187), 글루타치온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase)(Roberts, J. C. and Francetic, D. J., *Anal. Biochem.*, 1993, 211, 183-187), 글루타치온 리덕타제(glutathione reductase)(Florenzi M, *et al.*, *FASEB J.*, 1997, 11, 1309-1315;), 퀴논 리덕타제(quinone reductase)(Prester, T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 2969) 등이 있다. 따라서 체내 항산화 효과를 위한 우수한 항산화제의 요구조건은 ROS를 소거하는 직접적인 항산화 기능을 가지거나, 또는 항산화 효소의 유도를 통한 간접적인 항산화 기능을 나타내는 경우이다.

<16>

별도로 간 조직은 oxidative stress의 여러 가지 요인(중금속, 산화제, 알킬화제, 등)에 의해 산화적 손상을 받게 되며 이로 인해 산화적 스트레스의 지표의 변화의 초래와 함께 간조직 세포손상의 지표인 아미노트랜스퍼라제(aminotransferase) 및 GOP/GPT 등의 혈중 활성치가 증가하는 것으로 알려져 있다(Vitaglione et al., 2004, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 575-586; Comar & Sterling, 2006, *Aliment Pharmacol. Ther.* 23, 207-215). 따라서 간조직내 산화적 스트레스를 방지하기 위해 초기부터 효과적인 항산화제의 선정은 산화성 스트레스에 기인 된 여러 가지 관련 간 질환의 방지에 도움이 될 것으로 사료된다. 이와 관련 현재까지 간세포내에서 생성되는 산소 라디칼에 대한 항산화 보호측면에서 여러 가지 천연 항산화제의 효과가 보고되었는데 대개의 경우 생약이나 식품내 함유된 성분(lycopene, carotene, quercetin, silymarin등)이 사용되고 있다(Vitaglione et al., 2004, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 575-586; Comar & Sterling, 2006, *Aliment Pharmacol. Ther.* 23, 207-215). 또한 간조직 등에서의 생체대사 과정에서 단일작용기 유도 인자(monofunctional inducer)로 알려진 디페놀류(diphenols), 티오카바메이트류(thiocarbamates), 1,2-디티올-3-티온류(1,2-dithiol-3-thiones), 이소티오시아네이트류(isothiocyanates), 신나메이트류(cinnamates), 코우마린류(coumarins) 등은 phase I 효소를 유도(inducing)하지 않으면서, phase II 효소(glutathione S-transferase, UDP-glucuronosyltransferase, quinone reductase, heme oxygenase)를 선택적으로 유도한다(Talalay et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 8261; Kim et al., *Food Research International*, 1999, 31, 389-394). 특히 phase II 효소들은 활성화된 화합물들을 컨쥬게이션(conjugation)시켜 독성이 없는 물질을 만들므로 케모프로텍션(chemoprotection)의 지표로 평가되고 있으며(Zhang et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 98), 더욱이 phase II 효소의 발현은 신호전달 차원(NrF2 signalling)에서 항산화효소(glutathione synthetase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase 등)의 발현과도 관련이 있는 것으로 알려지고 있다(Facino et al., *Biol Chim. Farm.*, 1997, 136, 240; Singh and Aggarwal, *J Biol Chem*, 1995, 270, 24995-25000). 이러한 점에서 간조직등 생체조직내 phase II 효소를 유도하는 화합물은 간조직내 해독기능뿐만 아니라 항산화기능을 통해 체내 산화성 스트레스에 대해 항산화 보호효과를 나타낼 것으로 기대된다. 이러한 기능을 발휘하는 화합물로는 설포라판(sulforaphane) 등 이소티오시아네이트(isothiocyanates)가 알려져 있으나 이들은 항산화효소의 유도는 약한 반면에, 커커민(curcumin), 레스베라트롤(resveratrol) 등 일부 리그난(lignan) 계열 폴리페놀(polyphenol) 화합물은 phase II 효소와 항산화 효소를 함께 유도하는 알려져 있으며 게다가 자체의 항산화기능도 알려져 있으므로 이에 대한 관심이 증대되고 있다(Zbarsky et al., *Free Radic. Res.* 2005, 39, 1119-1125; Singh and Aggarwal, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 24995-25000). 이러한 차원에서 효과적인 리그난 항산화제는 생체내 산화성 스트레스의 방지를 위해 매우 중요하며, 아울러 산화성 스트레스에 기인 된 여러 가지 퇴행성 질환의 방지에 도움이 될 것으로 사료된다.

<17>

한편 현재까지 세포내에서 생성되는 산소 라디칼에 대한 항산화 보호측면에서 여러 가지 천연 항산화제의 효과가 보고되었는데 간 조직에 관한 항산화 연구가 대부분인 반면에 뇌관문 통과를 요구하는 뇌 보호용 항산화제에 관련된 연구는 매우 부진하다(Park, J.C. *et al.*, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 1996, 25, 588-592; Kim, M.R. *et al.*, *J. Food. Sci. Nutr.*, 1997, 2, 207; Kim, Mee Ree, *et al.*, *Food Res. Intl.*, 1999, 31(5), 389-394). 더욱이 뇌 보호용 항산화제로서 유효성과 인체 안전성이 입증된 항산화제에 대한 연구는 미흡한 상태이다(Olney, J.W. *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1515-1518; Kim, W.J. Kwon, J.S., *Arch. Pharm.*

Res., 1999, 22, 35-43). 따라서 우리가 흔히 사용하는 식용 식물자원은 인체 안전성이 어느 정도 검증된 것이므로 뇌보호 효과를 나타내는 식용 자원 항산화제를 개발한다면 간조직 등 다른 조직에 대한 항산화 보호효과도 뚜렷할 것으로 기대되며 아울러 항산화 효소 유도 효과를 겸한다면, 우수한 복합 항산화 보호제로 기대된다. 이러한 목적에 부합된 것으로 커커민, 레스베라트롤 등 폴리페놀류가 다양한 산화적 스트레스 모델에 대한 우수한 항산화 보호효과를 나타내는 것으로 보고되어 있으나(Facino et al., *Biol Chim. Farm.*, 136, 240 1997; Singh and Aggarwal, *J Biol Chem*, 270, 24995-25000 1995; Surh, *Nature Rev.* 2003), 뇌조직 모델에 대해서도 뚜렷한 효과가 입증된 항산화제는 없다. 최근에는, 머위의 추출물에 함유된 페타스리그노라이드 에이(petaslignolide A)가 카이닉산에 의해 유도되는 신경 독성에 대해 항산화효과를 나타내며 아울러 항산화효소 유도를 통한 보호효과를 나타내는 것으로 보고된 바가 있다(Cui HS et al. *J. Agric Food Chem.*, 53, 4570-4575). 또한 그의 가수분해 대사산물의 일종인 4-히드록시피노레시놀(4-hydroxypinoresinol)은 더 큰 항산화 효과를 나타내 뇌 조직 및 간 조직에 대한 보호효과나 항산화 효과가 뛰어날 것으로 기대되나 아직까지 밝혀진 바 없다.

<18> 이에, 본 발명자들은 머위 추출물에 함유된 페타스리그노라이드 에이로부터 효소분해에 의해 제조된 4-히드록시피노레시놀은 KA에 의해 유도된 뇌조직 및 간조직내의 산화성 스트레스에 대한 항산화 활성이 항산화기능 및 항산화효소 유도 차원에서 우수함을 확인함으로써 우수한 뇌조직 및 간조직 질환의 예방 및 치료제로 효과가 있을 것으로 기대되며 개발이 요구되어 진다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<19> 본 발명은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로 페타스리그노라이드 에이로부터 가수분해 제조된 4-히드록시피노레시놀에 관한 것으로 뇌조직뿐만 아니라 간조직에 대한 항산화 기능 및 항산화 효소 유도가 우수한 복합 기능성 항산화제 4-히드록시피노레시놀(리그난계 폴리페놀)류를 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한 본 발명은 상기의 4-히드록시피노레시놀을 유효성분으로 하는 생체 내의 산화성 스트레스에 기인하는 뇌조직 및 간조직의 손상에 대한 예방, 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<20> 이하, 본 발명의 구성 및 작용을 설명한다.

발명의 구성 및 작용

<21> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 항산화 활성과 뇌 보호효과를 나타내는 4-히드록시피노레시놀을 제공한다.

<22> 또한, 본 발명은 상기 4-히드록시피노레시놀을 유효성분으로 함유하는 뇌질환 또는 예방 또는 치료용 항산화제 조성물을 제공한다.

<23> 본 발명은 Petaslignolide A로부터 4-hydroxypinoresinol을 수득하는 방법을 제공한다.

<24> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<25> 본 발명의 4-히드록시피노레시놀 함유 분획물을 얻는 방법은

<26> 페스타슬리그노라이드 에이(Petaslignolide A)로부터 나린지나제(naringinase) 또는 글리코시다제(glycosidase) 처리에 의해 4-히드록시피노레이놀(4-hydroxypinoresinol)을 수득하는 단계;

<27> 상기 단계의 용액을 DMSO에 용해 후 산성 완충액(pH 5-7)에 용해한 후에 과량의 나린지나제(excess naringinase) 처리 후에 에칠 아세테이트로 추출 분획한 후 에칠 아세테이트층을 수득하는 단계; 및

<28> 상기 단계의 에칠 아세테이트층을 농축 후에 TLC 분리에 의해 4-히드록시피노레시놀 함유 스팟(spot)을 확인하는 단계를 포함한다.

<29> 본 발명에서 Petaslignolide A로부터 4-hydroxypinoresinol을 수득하기 위해서는 효소로서 naringinase 또는 glycosidase를 사용한다.

<30> 본 발명에서 4-hydroxypinoresinol을 분리 제조시에는 유기용매 바람직하게는 에칠아세테이트 등을 사용할 수 있다.

<31> 본 발명에서는 상기 Petaslignolide A에 효소 처리 후 얻은 수층을 에칠아세테이트를 사용하여 에칠아세테이트층과 수층으로 분획한 후 에칠아세테이트층을 수득한다.

<32> 더 나아가 상기 에칠아세테이트층을 저온 저압하에서 증발하여 에칠아세테이트 분획을 수득하거나 또는 상기에서 수득된 에칠아세테이트 분획에 재차 에칠아세테이트를 첨가하여 가용성 분획을 수득할 수 있다.

<33> 상기 분획물은 항산화 활성을 갖는 4-hydroxypinoresinol을 함유하고 있음을 확인할 수 있다.

<34> 본 발명에서 상기 수층은 물층 또는 완충액(pH 5-7)인 것을 특징으로 한다.

<35> 본 발명에서 상기 에칠 아세테이트는 90 내지 100 % 인 것을 특징으로 한다.

<36> 본 발명은 상기와 같이 분리된 4-히드록시피노레시놀을 유효성분으로 함유하는 항산화성 보호제 조성물을 제공한다.

<37> 상기 항산화성 보호제 조성물은 기능성 식품, 치료약품, 4-히드록시피노레시놀 물질을 생체 활성 물질로 사용하는 제제 등으로 사용할 수 있다.

<38> 또한, 본 발명은 상기에서 제조된 4-hydroxypinoresinol을 유효성분으로 함유하는 산화성 스트레스를 수반한 뇌질환에 대해 항산화효과를 나타내는 보호제 조성물을 제공한다.

<39> 그리고, 본 발명은 상기에서 제조된 4-hydroxypinoresinol을 유효성분으로 함유하는 산화성 스트레스를 수반한 간 조직 손상에 대한 항산화효과를 나타내는 보호제 조성물을 제공한다.

<40> 본 발명의 4-hydroxypinoresinol는 뇌조직의 항산화 보호 효과 및 간조직내 항산화 활성이 우수하므로 이를 이용하여 산화적 스트레스 즉, 과산화에 의해 유발되는 뇌질환/간질환을 예방 및 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

<41> 본 발명의 추출물을 이용하여 예방 및 치료할 수 있는 뇌질환으로는 산화적 스트레스가 주 병인인 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 루게릭병(Amyotrophic lateral sclerosis), 허혈성 뇌졸중(Hypoxic-ischemic injury), 퇴행성 척추손상 등 및 간조직내 산화적 손상과 관련된 질환(chronic liver diseases)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 그러나, 반드시 상기한 질환에만 한정되는 것은 아니고 산화적 스트레스에 의해 유발되는 뇌질환이나 산화성 스트레스에 기인한 여러 가지 간질 환등에도 적용될 수 있다.

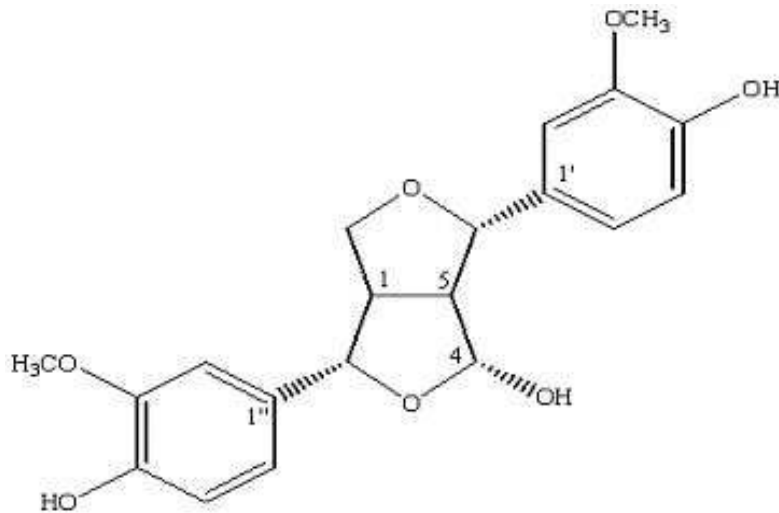
<42> 또한, 본 발명의 4-hydroxypinoresinol을 유효성분으로 함유하는 뇌질환 및 간질환의 예방 또는 치료용 항산화제에는 본 발명의 머위 추출물 성분 외에도 일반적으로 사용되는 임의의 항산화제 성분을 추가하여 사용하는 것도 가능하다.

<43> 이하, 본 발명을 실시예에 대해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<44> 실시예 1: 4-히드록시피노레시놀(4-hydroxypinoresinol)의 제조

<45> 완충액에서 Petasignolide A (20 mg/ml)를 우선 DMSO 에 녹인 후에 초산 완충액(pH 5.5 근처)에 희석한 후에 종래 방법(Cui et al., 2005; Min et al., 2005)에 따라 효소 Naringinase를 넣고 1 시간 동안 교반 후에 TLC에 의해 전환을 파악한 후에 에틸아세테이트로 추출하여 분리하였고 negative API-MS분석에 의거, 가수분해 산물의 분자량은 m/z 373 [M-H]으로 분자식($C_{20}H_{20}O_6$)에 해당하였고, NMR 분석에 의거 하기 화학식 1의 구조를 가지는, 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-hydroxy-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]-octane, 즉 4-hydroxypinoresinol으로 파악되었다.

화학식 1



실시예 2: 4-히드록시피노레시놀의 항산화 활성 분석

본 발명의 4-히드록시피노레시놀의 항산화 활성을 가지는지 알아보기 위해 LDL의 Cu^{2+} 산화에 대한 항산화 평가 실험(*in vitro*)을 수행하였다. 구체적으로, 인 혈액으로부터 분리된 LDL를 PBS 완충액에 넣고서 copper ion($5 \mu\text{M}$)을 첨가한 후에 각 peptide의 존재하에 3 시간 동안 산화시킨 후에 상기 혼합액에 1 ml에 8.1% SDS 1 ml, 20% 초산 2 ml 및 0.75% 티오바비투릭산(thiobarbituric acid, 이하 "TBA"라 약칭함) 1 ml을 첨가하였다. 상기 혼합물을 끓인 뒤 30분 동안 얼음에 놓아둔 후 14,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상기 원심분리 후 상층액을 얻은 후 533 nm에서 흡광도를 측정하였다(Bidlack, W.T., and Tappel, A.L., *Lipids*, 1973, 8, 177-182). 1,1,3,3,-테트라에톡시프로판(1,1,3,3,-tetraethoxypropane)의 가수분해에 의해 생성되는 말론디알데히드(malondialdehyde)(Gutteridge, J.M.C., *Analytical Biochemistry*, 1975, 69, 518-526)를 이용해 보정(calibration)하였다.

지질 과산화의 억제 정도는 각 peptide의 수 가지 농도로 처리했을 때의 지질 과산화 억제 정도를 나타낸 곡선으로부터 50% 저해 효과를 나타내는 log 농도를 반수유효약량(IC₅₀)으로 나타내었다.

항산화 활성은 하기 수화식 1에 나타난 바와 같이 대조군(시료를 첨가하지 않은 것)에 대한 티오바비투릭산 반응성 기질(thiobarbituric acid reactive substrate, 이하 "TBARS"라 약칭함)의 퍼센트 감소 정도로 나타내었다.

이어서 본 발명의 4-히드록시피노레시놀의 알킬 라디칼(alkyl radical) 소거능을 분석하기 위해 4-히드록시피노레시놀의 DPPH 라디칼 소거능에 대한 항산화 평가 실험(*in vitro*)을 수행하였다. 구체적으로, DPPH를 함유한 아세톤 용액에 일정량의 4-hydroxypinoresinol를 넣고서 564 nm에서의 흡광도 감소를 측정하고, 4-hydroxypinoresinol의 DPPH radical 소거능은 4-hydroxypinoresinol를 여러가지 농도로 처리했을때의 DPPH radical의 50% 감소 효과를 나타내는 4-hydroxypinoresinol 농도를 반수유효약량(IC₅₀)으로 나타내었다.

상기와 같이, 페타스리그노라이드 에이와 분해산물인 4-히드록시피노레시놀의 항산화 활성을 KA로 투여된 생쥐의 뇌조직과 간조직내 산화성 스트레스에 대한 보호효과를 검증하기 위해 측정한 in-vitro 실험 결과, DPPH 소거능 및 LDL 산화 방지에서 4-히드록시피노레시놀이 페타스리그노라이드 에이보다 더 우수함을 알 수 있다. 즉, 본 발명의 4-히드록시피노레시놀의 항산화 활성을 가지는지 알아보기 위해 실시예 1에서 제조된 4-히드록시피노레시놀과 전구체인 페타스리그노라이드 에이의 LDL 산화방지에 대한 각 물질의 IC₅₀ 농도값을 측정했을 때 4-히드록시피노레시놀의 IC₅₀ 값이 페타스리그노라이드 에이의 IC₅₀보다 낮다(표 1). 아울러, 두 물질의 DPPH 라디칼 소거능을 평가하였을 때에 4-히드록시피노레시놀의 IC₅₀ 값이 페타스리그노라이드 에이의 IC₅₀보다 4 배나 작은 것으로 보아(표 1), 4-히드록시피노레시놀의 항산화 활성이 뛰어남을 알 수 있다.

표 1

<53> 4-hydroxypinoresinol와 petasignolide A의 항산화효과(IC₅₀ 값)를 나타낸 결과

물질	Cu ²⁺ 에 의한 LDL 산화에 대한 보호 ($\mu\text{g/ml}$)	DPPH radicals-제거능($\mu\text{g/ml}$)
Petasignolide A	181.1 $\pm$ 3.44	113.04 $\pm$ 4.21
4-Hydroxypinoresinol	43.98 $\pm$ 0.14	25.49 $\pm$ 0.72
Alpha-tocopherol	11.64 $\pm$ 0.33	17.16 $\pm$ 0.82

<54> 실시예 3: 카이닉산에 의해 유도되는 치사율, 신경독성 행동에 대한 4-히드록시피노레시놀의 보호효과

<55> 상기 실시예 2에서 항산화 활성이 높음을 확인한 4-히드록시피노레시놀이 신경 독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 카이닉산(kainic acid, 이하 "KA"라 약칭함)에 의해 유도되는 산화적 신경 독성에 미치는 영향을 생체내 실험(*in vivo*)을 통해 분석하였다.

<56> 즉, 수컷 ICR 생쥐(22.5 $\pm$ 2.5 g, 6 내지 8주령)를 폴리카보네이트 케이지(케이지당 5마리)에서 실험 동물용 고형 사료(SamYang Co. Korea)를 자유급이시켰다. 온도는 23 $\pm$ 3°C, 상대 습도는 60 $\pm$ 10%로 유지하고 12시간 간격의 명암 주기 및 150-200 렉스(lux)로 조도를 조절하였다. 순화 기간중 건강하다고 판단된 동물만을 무작위로 군분리를 하여 실험에 사용하였다. 동물의 생육 및 실험은 모두 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 지침서(Guide for care and use of laboratory animal, National Institutes of Health Guidelines, 1985, 85-23)에 따라 수행하였다. 생쥐의 그룹은 불특정하게 그룹지었으며 각각의 체중을 매일 측정하였다.

<57> 상기 생쥐에 식도 주입용 니들(esophagus needle)을 이용하여 상기 실시예 1에서 4-hydroxypinoresinol을 10 또는 20 mg/kg의 양으로 하루에 한번씩 3일 동안 복강내로 주입하거나 별도로 4-hydroxypinoresinol 30 mg/kg을 2 시간 또는 24 시간 전에 일회 투여하였다. 또한 비교실험에서 4-hydroxypinoresinol의 전구체인 petasignolide A(40 mg/kg)를 경구로 4 일간 투여하였다. 상기 4-hydroxypinoresinol의 주입 후 하루 뒤에 KA를 식염수에 녹여 생쥐 몸무게 1 kg당 50 mg을 복강 주사하였다. 상기 부탄올 분획을 주입하는 대신에 식염수를 주입한 생쥐를 대조군 생쥐로 사용하였다. KA 주입후 생쥐의 행동학적 변화를 콘도 등의 방법(Kondo *et al.*, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1997, 17, 241-256)에 의해 모니터링하였다. 또한, KA 주입후 하루 뒤에 생쥐의 뇌를 적출하여 액체 질소에 얼린 후 사용하기 전까지 최대 48시간 동안 -80°C에서 보관하였다.

<58> 본 발명에서 우선 Petasignolide A의 KA 신경독성에 대한 보호효과를 확인한 결과, 각 신경 행동학적 변화가 뚜렷하게 관찰되었다. 아울러 치사율을 측정한 결과, petasignolide A(PA)를 복강내로(40 mg/kg) 3 일간 투여한 후에 KA 처리시에 하기 표 2에서 보는 바와 같이 petasignolide A의 3 일간 전투여가 효과적으로 보호효과를 표시하였음을 확인하였다. 상기 결과를 근거로 petasignolide A의 가수분해 산물(당 제거 산물)인 4-hydroxypinoresinol의 보호효과가 더 우수함을 확인할 수 있었다.

<59> 이러한 결과 전투여 기간이 길어질수록 보호효과는 더욱 뚜렷한 것을 알 수가 있었고 이러한 보호효과는 4-hydroxypinoresinol의 양이 10 mg/kg로 감량시에도 뚜렷한 보호효과를 얻을 수가 있었으므로 4-hydroxypinoresinol은 KA 신경독성에 대한 효과적인 보호제로 사료되었다.

<60> 다시 말해, *in vivo* 실험에서도 신경독성 보호능에서 4-히드록시피노레시놀이 페타스리그노라이드 에이보다 더 뛰어난 것을 알 수 있었다(표 2 참조). 이어서 즉 KA 및 KA와 4-히드록시피노레시놀을 투여한 후의 치사율을 측정한 결과, KA만을 투입한 것에 비해 4-히드록시피노레시놀을 사전에 복강내로 투여한 경우 생쥐의 치사율이 낮아졌으며, 또한 2 시간 전에 투여시(30 mg/kg)에 비해 24 시간 전 투여한 경우 치사율이 더 낮았다(표 3). 따라서, 4-히드록시피노레시놀의 24 전 투여가 KA에 의해 유도된 생쥐의 치사율을 낮춰줄 수 있었다. 다음으로 4-히드록시피노레시놀(20 mg/kg)을 복강 내로 전 투여를 3 일간 계속한 후에 KA 처리시에 상기 표 4에서 보는 바와 같이 4-히드록시피노레시놀의 3 일간 전투여가 더 효과적으로 신경 행동 독성 및 치사율을 낮추는 보호효과를 표시하였고, 이어서 4-히드록시피노레시놀(10 mg/kg)의 전 투여를 3 일간 계속 투여 시에도 뚜렷한 보호효과를 표시하였으나 4-히드록시피노레시놀(20 mg/kg)의 전 투여에 비해 다소 미약한 보호효과가 나타나는 것으로 확인되었다.

표 2

<61> 카인산(Kainic acid)으로 투여된 생쥐의 행동변화 및 치사율에 대한 petasignolide A의 효과를 분석한

결과

	Tail arch (min)	Tremors (min)	Seizure (min)	Death (min)	Mortality (%)
카인산	6.6 ± 2.4 ^a	9.5 ± 3.1 ^a	12.5 ± 4.0 ^a	16.5 ± 4.0 ^a	50 %
+ PA (3 일간)	12.6 ± 3.4 ^a	16.1 ± 4.1 ^b	22.5 ± 4.0 ^a	22.0 ± 0.0 ^b	12.5 %

[주] 1. 측정 평균 ± SE 값으로 표시
 2. ^a: 그룹간에 서로 다른 알파벳 첨자는 통계적으로 유의적인 차이 있음을 의미함 ($P < 0.05$)
 3. PA: petasignolide A(4-hydroxypinoresinol 전구체 물질)

표 3

<62> 카인산(Kainic acid)으로 투여된 생쥐의 행동변화 및 치사율에 대한 4-hydroxypinoresinol 경시별(2 시간 또는 24 시간) 효과를 분석한 결과

	Tail arch (min)	Tremors (min)	Seizure (min)	Death (min)	Mortality (%)
카인산	7.6 ± 0.1 ^a	9.7 ± 0.9 ^a	14.3 ± 1.1 ^a	31.4 ± 3.4 ^a	50 %
+ HP (2 h)	7.7 ± 0.9 ^a	11.3 ± 1.2 ^b	15.0 ± 1.6 ^a	46.7 ± 9.6 ^b	30 %
+ HP (24h)	12.7 ± 1.7 ^b	16.7 ± 1.5 ^c	22.0 ± 2.2 ^b	80.0 ± 0.0 ^c	10 %

[주] 1. 측정 평균 ± SE 값으로 표시
 2. ^a: 그룹간에 서로 다른 알파벳 첨자는 통계적으로 유의적인 차이 있음을 의미함 ($P < 0.05$).
 3. HP: 4-hydroxypinoresinol

표 4

<63> 카인산(Kainic acid)으로 투여된 생쥐의 행동변화 및 치사율에 대한 4-hydroxypinoresinol(1 일 투여)의 영향을 분석한 결과

Group	Tail arch (min)	Tremors (min)	Seizure (min)	Death (min)	Mortality (%)
Kainic acid	5.9 ± 1.4	9.7 ± 2.0	15.5 ± 3.2	22.2 ± 6.7	60
+HP	11.5 ± 1.6 (9.4 ± 2.7)	15.9 ± 2.4 (13.1 ± 2.9)	28.4 ± 3.1 (18.0 ± 2.8)	- (21 ± 0)	0 (10)

[주] 1. 측정 평균 ± SE 값으로 표시
 2. () 값은 4-hydroxypinoresinol(10 mg/kg) 투여를 의미함
 3. ^a: 그룹간에 서로 다른 알파벳 첨자는 통계적으로 유의적인 차이 있음을 의미함 ($P < 0.05$).
 4. HP: 4-hydroxypinoresinol

<64> 실시예 4: KA 투여후 뇌조직내 지질 과산화 에 대한 4-hydroxypinoresinol의 보호효과

<65> KA는 지질 과산화를 유도하기 때문에 KA에 의해 유도된 생쥐의 지질 과산화에 본 발명의 4-hydroxypinoresinol의 투여가 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 구체적으로, KA만 투여한 생쥐 및 KA 투여와 함께 4-hydroxypinoresinol을 20 mg/kg 투여한 생쥐로부터 뇌를 적출하였다. 상기 뇌 조직에 0.25 M 수크로즈

용액을 넣어 분쇄한 후 분쇄된 전체 뇌 균질화물을 이용하여 뇌에 함유되어 있는 TBARS의 양을 측정하였다.

<66> 상기와 같이 KA를 단독으로 투여함으로써 뇌조직에서 증가한 TBARS 함량이 본 발명의 4-히드록시피노레시놀(20 mg/kg)을 3 일간 전 처리함으로써 무처리한 대조군의 수준으로 회복되었다(도 1). 또한, 4-hydroxypinoresinol의 10 mg/kg 의 투여시에도 상기와 유사하게 나왔다. 따라서, 본 발명의 4-hydroxypinoresinol 은 뇌조직에서의 산화적 스트레스에 의한 지질 과산화를 막아줄을 알 수 있었다.

<67> **실시예 5: KA 투여시 뇌조직내 글루타치온에 대한 4-hydroxypinoresinol의 효과**

<68> 상기 실시예 4에서와 같이 KA만 투여한 생쥐 및 4-hydroxypinoresinol을 투여한 생쥐로부터 얻은 약 0.2 g의 뇌 조직을 차가운 6% 메타포스포릭산(metaphosphoric acid) 용액에 넣고 차가운 세라믹 펄썬 모터를 사용하여 분쇄하였다. 상기 분쇄된 용액을 4℃, 27,000 g에서 20분 동안 원심분리하였다. 상기 원심분리한 상층액을 수득한 후 상등액 0.05 ml에 5 mM EDTA를 포함하는 100 mM 포스페이트 버퍼(pH 7.4) 0.39 ml, 10 mM DTNB(5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) 0.025 ml 및 5 mM NADPH 0.08 ml을 첨가하여 25℃에서 3분 동안 평형유지시켰다. 상기 평형유지 후 글루타치온(glutathione, 이하 “GSH” 라 약칭함) 리덕타제(reductase) 2 unit를 넣어 반응을 시작한 후 흡광도 측정기(UV/VIS spectrophotometer)를 사용하여 412 nm에서 흡광도를 측정해 2-니트로-5-티오벤조익산(2-nitro-5-thiobenzoic acid)의 형성을 측정하였다(Roberts, J.C. and Francetic, D.J., *Analytical Biochemistry*, 1993, 211, 183-187; Raymond, C. et al., *Journal of Nutrition*, 1995, 125, 3062-3070). 샘플에 포함된 전체 GSH 양은 알려진 GSH의 양에 대한 412 nm에서의 흡광도 변화를 그래프화하여 작성한 표준 곡선으로부터 도출하였다. 상기 GSH의 값은 4 내지 8마리의 생쥐로부터의 결과를 세 번 수행한 결과의 평균 $\pm$ S.E.M로 나타내었다.

<69> 이는 본 발명의 4-hydroxypinoresinol이 KA에 의해 유도되는 뇌조직내 총 글루타치온 양의 감소를 억제하여 항산화 효과가 있음을 확인하고자 한 것이다.

<70> 상기와 같이 뇌 균질화물에 포함되어 있는 총 글루타치온량을 측정하였을 때, KA에 의해 감소한 총글루타치온량은 본 발명의 4-hydroxypinoresinol을 전 투여함으로써 무처리한 대조군보다 더 높은 수준으로 유의성 있게 증가하였다($p < 0.05$)(도 2).

<71> **실시예 6: KA 투여후 뇌조직내 총 글루타치온 퍼옥시다제 활성에 대한 4-hydroxypinoresinol의 보호효과**

<72> 본 발명의 4-hydroxypinoresinol이 KA에 의해 유도되는 과산화를 억제하여 항산화 효과가 있음을 확인하고 이어서 이러한 효과가 항산화 관련 효소 활성에 영향을 줌으로써 일어나는지 확인하고자 하였다. 구체적으로, 상기 실시예 4에서 수득한 뇌 균질화물을 이용하여 뇌 균질화물에 포함되어 있는 글루타치온 관련 항산화 효소 즉, 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase) 및 글루타치온 리덕타제(glutathione reductase)의 활성을 측정하였다.

<73> KA에 의해 감소한 글루타치온 퍼옥시다제의 활성은 본 발명의 4-hydroxypinoresinol을 전 투여함으로써 무처리한 대조군보다 더 높은 수준으로 유의성있게 증가하였다($p < 0.05$)(도 3a). 반면, 본 발명의 4-hydroxypinoresinol은 KA에 의해 감소한 글루타치온 리덕타제의 활성에는 영향을 주지 않았다(도 3b).

<74> **실시예 7: KA 투여후 간조직내 지질 과산화에 대한 4-hydroxypinoresinol의 보호효과**

<75> 간 조직은 oxidative stress의 여러가지 요인에 의해 산화적 손상을 받게 되며 이로 인해 산화적 스트레스의 지표의 변화의 초래와 함께 간조직 세포손상의 지표인 aminotransferase 및 GOP/GPT 등의 혈중 활성치가 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 간조직내 산화적 스트레스를 방지하기 위해 초기부터 효과적인 항산화제의 선정은 산화성 스트레스에 기인 된 여러 가지 관련 간 질환의 방지에 도움이 될 것으로 사료된다. 항산화제로는 라이코펜(lycopene), 카로틴(carotene), 퀘르세틴(quercetin), 실리마린(silymarin) 등이 사용되고 있다(Vitaglione et al., 2004, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 575-586; Comar & Sterling, 2006, *Aliment Pharmacol. Ther.* 23, 207-215).

<76> KA는 지질 과산화를 유도하기 때문에 KA에 의해 유도된 생쥐의 뇌조직내 지질 과산화에 본 발명의 4-hydroxypinoresinol의 투여가 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 구체적으로, KA만 투여한 생쥐 및 KA 투여와 함께 4-hydroxypinoresinol을 20 mg/kg 투여한 생쥐로부터 간 조직을 적출하였다. 상기 간 조직에 0.25 M 수크로즈 용액을 넣어 분쇄한 후 분쇄된 전체 간 조직 균질화물을 이용하여 간 조직에 함유되어 있는 TBARS의 양을 측정하였다.

<77> KA에 의해 유도 전달된 간 조직내에서의 산화성 스트레스의 표식인 TBARS 값의 변화에 대해 분석하였다. 즉, 본 발명에서 KA를 단독으로 투여함으로써 간조직에서 증가한 TBARS 함량이 본 발명의 4-hydroxypinoresinol를 전처리함으로써 무처리한 대조군의 수준이상으로 회복되었다(도 4).

<78> **실시예 8: KA 투여 후 간 조직내 총 글루타치온 양에 대한 4-히드록시피노레시놀의 보호효과**

<79> 상기 실시예 7에서와 같이 KA만 투여한 생쥐 및 4-히드록시피노레시놀을 투여한 생쥐로부터 약 0.2 g의 간 조직을 차가운 6% 메타포스포릭산(metaphosphoric acid) 용액에 넣고 차가운 세라믹 퍼큐션 모터를 사용하여 분쇄하였다. 상기 분쇄된 용액을 4℃, 27,000 g에서 20분 동안 원심분리하였다. 상기 원심분리한 상층액을 수득한 후 상등액 0.05 ml에 5 mM EDTA를 포함하는 100 mM 포스페이트 버퍼(pH 7.4) 0.39 ml, 10 mM DTNB(5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) 0.025 ml 및 5 mM NADPH 0.08 ml을 첨가하여 25℃에서 3분 동안 평형유지시켰다. 상기 평형유지 후 글루타치온(glutathione, 이하 “GSH”라 약칭함) 리덕타제(reductase) 2 unit를 넣어 반응을 시작한 후 흡광도 측정기(UV/VIS spectrophotometer)를 사용하여 412 nm에서 흡광도를 측정 글루타치온 양을 산출하였다(실시예 5 참조). 상기 GSH의 값은 4 내지 8마리의 생쥐로부터의 결과를 세 번 수행한 결과의 평균 $\pm$ S.E.M로 나타내었다. 본 발명의 4-hydroxypinoresinol이 KA에 의해 유도되는 간조직내 총 글루타치온 량의 감소를 억제하여 항산화 효과가 있음을 확인하고자 하였다.

<80> 상기에서 수득한 간 균질화물을 이용하여 뇌 균질화물에 포함되어 있는 총 글루타치온량을 측정하였을 때에, KA에 의해 감소한 총글루타치온 양은 본 발명의 4-hydroxypinoresinol을 전 투여함으로써 무처리한 대조군보다 더 높은 수준으로 유의성있게 증가하였다($p < 0.05$)(도 5).

<81> **실시예 9: KA 투여후 간조직내 총 글루타치온 퍼옥시다제 활성에 대한 4-hydroxypinoresinol의 보호효과**

<82> 본 발명의 4-hydroxypinoresinol이 KA에 의해 유도되는 과산화를 억제하여 항산화 효과가 있음을 확인하고 이어서 이러한 효과가 항산화 관련 효소 활성화에 영향을 줌으로써 일어나는지 확인하고자 하였다. 구체적으로, 상기 실시예 7에서 수득한 간 균질화물을 이용하여 뇌 균질화물에 포함되어 있는 글루타치온 관련 항산화 효소 즉, 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase)의 활성을 측정하였다.

<83> 그 결과, KA에 의해 감소한 글루타치온 퍼옥시다제의 활성은 본 발명의 4-hydroxypinoresinol을 전 투여함으로써 무처리한 대조군보다 더 높은 수준으로 유의성있게 증가하였다($p < 0.05$)(도 6a). 반면, 본 발명의 4-hydroxypinoresinol은 KA에 의해 감소한 글루타치온 리덕타제의 활성도를 유의적으로 높여주었으나 대조군도 높여주었으므로 영향을 주지 않았다(도 6b).

<84> **실시예 10: KA 투여후 간조직내 총 글루타치온 S-트랜스퍼라제 및 퀴논리덕테이즈 활성에 대한 4-hydroxypinoresinol의 유도효과**

<85> 본 발명의 4-hydroxypinoresinol이 KA에 의해 감소된 항산화 효소 활성을 회복시킴을 확인하고 이어서 이러한 효과가 글루타치온 S-트랜스퍼라제 활성의 유도와 관련이 있는 지를 확인하고자 하였다. 구체적으로, 4-hydroxypinoresinol(20 mg/kg)을 3일간 생쥐에 복강투여 후 카인산 50 mg/kg을 복강 내로 투여하고 하루만에 희생한 후에 뇌조직을 50 mM Tris 완충액(pH 7.4) 내에서 상기 실시예 7에서 수득한 간 균질액을 제조한 후에 상정액을 취하여 글루타치온 트랜스퍼라제 활성을 3회 측정 평균 $\pm$ SE 값으로 표시하였다.

<86> KA에 의해 감소한 간조직내 글루타치온 S-트랜스퍼라제의 활성은 본 발명의 4-hydroxypinoresinol을 전 투여함으로써 무처리한 대조군보다 더 높은 수준으로 유의성있게 증가하였다($p < 0.05$)(도 7a). 뿐만 아니라 퀴논리덕테이즈의 활성도는 무처리한 대조군에 비하여 2배 이상 증가시켰다(도 7b). GST와 QR 효소는 phase II 효소들로서 독성물질 즉 활성화된 화합물들을 컨쥬게이션(conjugation)시켜 독성이 없는 물질을 만들므로 간조직내의 케모프리벤션(chemoprevention)의 지표 즉 항발암의 지표로 평가되고 있다.

<87> 이와 같이 4-hydroxypinoresinol은 간조직등 생체조직내 phase II 효소를 유도하여 간조직내 해독기능 뿐만 아니라 항산화 활성이 우수하며, 지질 과산화 억제능이 뛰어나 과산화에 의해 유도되는 뇌질환 및 간질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

<88> **실시예 11: 체중 및 뇌의 무게 변화**

<89> 20 mg/kg의 4-hydroxypinoresinol을 3일간 투여한 후의 생쥐의 체중 및 뇌의 무게를 측정한 결과 4-hydroxypinoresinol을 투여하여도 체중 및 뇌의 무게에는 영향을 주지 않았다(표 5). 이러한 현상은 30 mg/kg을 일일간 투여시에도 체중 및 뇌의 무게에 영향을 주지 않았다. 따라서, 본 발명의 4-hydroxypinoresinol은 직접

투여하여도 부작용을 주지 않음을 알 수 있었다.

표 5

<90> 4-hydroxypinoresinol을 생쥐에 전투여하였을 때 체중 및 뇌무게의 변화

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	body weight(g)	Brain weight(g)
Control	21.5 ± 0.6	24.6 ± 0.9	3.1 ± 0.6	0.322 ± 0.012
Kainic acid	21.3 ± 0.9	24.9 ± 0.9	3.6 ± 0.8	0.316 ± 0.012
+HP	21.7 ± 0.7	24.5 ± 0.8	2.8 ± 0.6	0.313 ± 0.010

<91> [주] N.S.: 그룹간에 통계적으로 유의적인 차이 없음($p < 0.05$)을 의미함

<92> 이하, 본 발명의 4-hydroxypinoresinol을 이용하여 예방 또는 치료할 수 있는 구체적인 질환에 대해 설명한다.

<93> **적용예 1: 알츠하이머병(Alzheimer's disease: AD)**

<94> 알츠하이머병은 대뇌피질 및 해마에 있는 글루타민성 뉴런(glutamatergic neurons)과 전뇌 기저에 있는 콜린성 신경세포(cholinergic neurons)의 괴사를 동반하며, 신경세포 밖의 아밀로이드 플라그(amyloid plaque)와 신경세포 안의 신경 섬유 엉킴(neurofibrillary tangles)이 공통적인 현상으로 발견된다. 그리고, 과도한 양의 활성산소에 의해 지질 과산화(lipid peroxidation), 8-하이드록시 디옥시구아노신(8-hydroxy deoxyguanosine), 단백질 카르보닐(protein carbonyls), 질화(nitration), 단백질의 산화적 교차결합(oxidative crosslinking of proteins) 등이 알츠하이머병에서 증가해 있다고 알려져 있다(Vitek *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 4766-4770; Smith *et al.*, 1995, *Trends. Neurosci.*, 18, 172-176; Smith *et al.*, 1996, *Mol. Chem. neuropathol.*, 28, 41-48, Smith *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 9866-9868; Montine *et al.*, 1996, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55, 202-201). 따라서, 지질 과산화 억제 활성 및 항산화 관련 효소 활성이 우수한 본 발명의 추출물은 알츠하이머병을 예방 및 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

<95> **적용예 2: 파킨슨병(Parkinson's disease)**

<96> 파킨슨병은 흑질에 존재하는 도파민 신경 세포의 괴사가 동반되어 진전, 근육경직, 운동 완서, 비정상적 자세, 운동 불능 등의 다양한 증상들을 나타내는 퇴행성 신경계 질환이다. 신경 세포괴사의 주요 원인으로 산화적 독성이 제시되고 있는데 주로 지질 과산화, DNA 산화, 단백질 카보닐(protein carbonyl) 및 나이트로타이로신(nitrotyrosine)의 증가가 흑질에서 발견된다(Bowling, A.C. and Beal, M.F., *Life Sci.*, 1995, 56(14), 1151-1171). 따라서, 지질 과산화 억제 활성 및 항산화 관련 효소 활성이 우수한 본 발명의 추출물은 파킨슨병을 예방 및 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

<97> **적용예 3: 루게릭병(Amyotrophic lateral sclerosis)**

<98> 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)은 주로 척수신경의 하위 운동 뉴런(lower motor neuron)으로부터 시작하여 점차 상위 운동 뉴런(upper motor neuron)으로 진행되어 대뇌피질, 뇌간, 척수의 운동 신경세포의 손상을 동반하고, 근위축, 호흡근력 약화 및 섬유축성 연축이 특징적으로 나타나며, 증상이 처음 관찰된 지 2-5년내에 사망한다. 특히, 유전적 근위축성 측삭 경화증 환자에서 염색체 21번(chromosome 21)에 위치하는 슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical)을 제거해주는 SOD-1 유전자에서 변이가 관찰되어 산화적 독성이 나타나며 환자의 뇌에서 산화적 독성의 지표인 단백질 카보닐 군이 증가해 있다고 보고되었다(Bowling *et al.*, 1993, *J. Neurochem.*, 61, 2322-2325). 따라서, 지질 과산화 억제 활성 및 항산화 관련 효소 활성이 우수한 본 발명의 추출물은 루게릭병을 예방 및 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

<99> **적용예 4: 허혈성 뇌졸중(Hypoxic-ischemic injury)**

<100> 뇌졸중은 뇌의 혈액 순환 장애(혈전증, 색전증, 협착증)에 의해 일정한 양으로 공급되는 포도당 및 산소가 부족함으로 인해 일어나는 질환으로서, 손상을 받은 뇌에 의한 신체기능 조절의 손실로 인해 마비증세, 언어 및 인지 기능의 장애가 발생한다. 뇌졸중이 일어나고 난 뒤 세포막의 탈극성(membrane depolarization)으로 인해 세포내로 칼슘이 유입되면 이것이 다시 미토콘드리아로 유입되어 호흡체계(respiratory chain)가 손상되고 활성 산소의 생성이 증가하여 세포내에 활성 산소가 과량 쌓이게 된다. 생성된 활성 산소는 세포막 지질의 파

괴, 유전자의 손상, 단백질 변성 등을 유도해 신경세포의 괴사가 일어나며, 이에 대해 항산화제는 허혈성 신경세포의 괴사를 억제하는 효과가 있다(Holtzman *et al.*, 1996, *Ann. Neurol.*, 39(1), 114-122; Ferrer *et al.*, 2001, *Acta neuropathol.(Berl.)*, 101(3), 229-38; Hall *et al.*, 1990, *Stroke*, 21, 11183-11187). 따라서, 지질 과산화 억제 활성 및 항산화 관련 효소 활성이 우수한 본 발명의 추출물은 허혈성 뇌졸중을 예방 및 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

<101> **적용예 5: 만성 간 손상 (Chronic liver damage)**

<102> 간조직의 손상은 여러 가지 간조직의 질환(fatty liver, steatosis, chronic hepatitis, fibrosus, cirrosis등)의 병변 진행에 oxidative stress가 관여하는 것으로 알려짐에 따라서 간조직 손상의 예방을 위해 항산화제의 사용이 강조되어왔으며 이러한 것들 중에 인체에 lycopene은 이러한 역할에 유효한 것으로 알려져 왔으며, ascorbic acid, tocopherol, carotene, trans-resveranol등 항산화제의 사용은 입증되지 못하고 있으며, quercetin, silymarin, esculetin 등 phenol성 화합물은 더 연구가 요구된다(Vitaglione *et al.*, 2004, *Crit. Rev. Food Sci.Nutr.* 44, 575-586; Comar & Sterling, 2006, *Aliment Pharmacol. Ther.* 23, 207-215).

발명의 효과

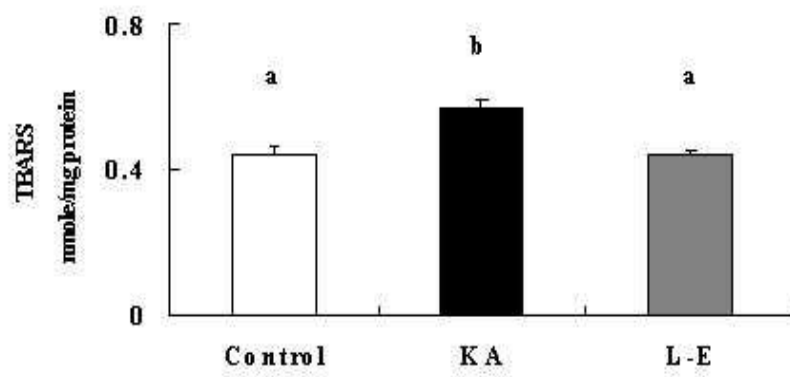
<103> 이상, 상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이, 본 발명 뇌조직 및 간조직내 산화적 스트레스에 대한 보호활성을 가지는 4-히드록시피노레시놀을 유효성분으로 함유하는 항산화제 조성물은 뇌조직내 신경독성 및 산화적 스트레스에 대해 억제 활성이 뛰어나고 아울러 간조직내 산화적 스트레스에 대해 억제 활성이 뛰어나 산화적 스트레스와 관련된 다양한 질환을 예방하고 치료하는데 매우 유용하게 사용할 수 있는 매우 뛰어난 효과가 있으므로 의약품 및 기능성 식품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

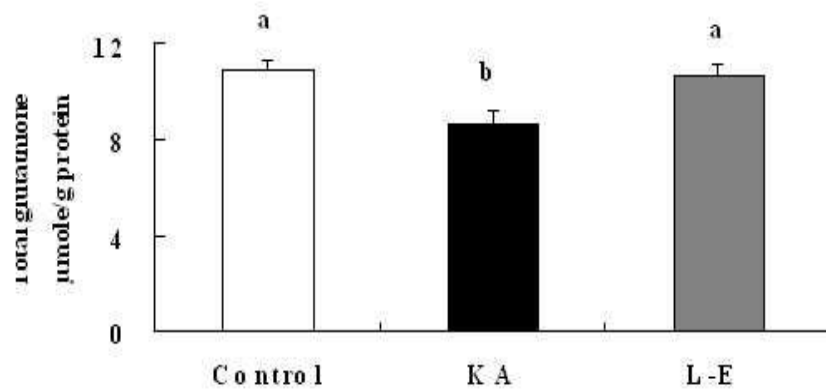
- <1> 도 1은 4-히드록시피노레시놀을 생쥐에 전투여하였을 때 KA에 의해 유도되는 뇌조직내 지질과산화에 대한 억제효과를 분석한 그래프이다.
- <2> 도 2는 4-히드록시피노레시놀을 생쥐에 전투여하였을 때 KA에 의해 유도되는 뇌조직내 글루타치온 양의 감소에 미치는 보호영향을 분석한 그래프이다.
- <3> 도 3은 4-히드록시피노레시놀을 생쥐에 전투여하였을 때 KA에 의해 유도되는 뇌조직내 글루타치온 퍼옥시다제 및 리닥타아제 활성의 감소에 미치는 영향을 분석한 그래프이다.
- <4> 도 4는 4-히드록시피노레시놀을 생쥐에 전투여하였을 때 KA 효과에 의해 전달된 간조직내에서 유도되는 지질과산화에 대한 억제 효과를 분석한 결과이다.
- <5> 도 5는 4-히드록시피노레시놀을 생쥐에 전투여하였을 때 KA 효과에 의해 전달된 간조직내 글루타치온 양의 감소에 미치는 영향에 대한 억제를 분석한 결과이다.
- <6> 도 6a은 4-히드록시피노레시놀을 생쥐에 전투여하였을 때 KA 에 의한 간조직내 글루타치온 퍼옥시다제 활성의 감소에 대한 보호효과를 분석한 결과이다.
- <7> 도 6b는 4-히드록시피노레시놀을 생쥐에 전투여하였을 때 KA 에 의한 간조직내 글루타치온 리닥타제 활성의 감소에 대한 보호효과를 분석한 결과이다.
- <8> 도 7a는 4-히드록시피노레시놀을 생쥐에 전투여하였을 때 간조직내에서 글루타치온 S-트랜스퍼라제 (glutathione S-transferase)활성의 유도에 미치는 영향을 분석한 결과이다.
- <9> 도 7b는 4-히드록시피노레시놀을 생쥐에 전투여하였을 때 간조직내에서 퀴논리덕테에즈의 활성에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도면

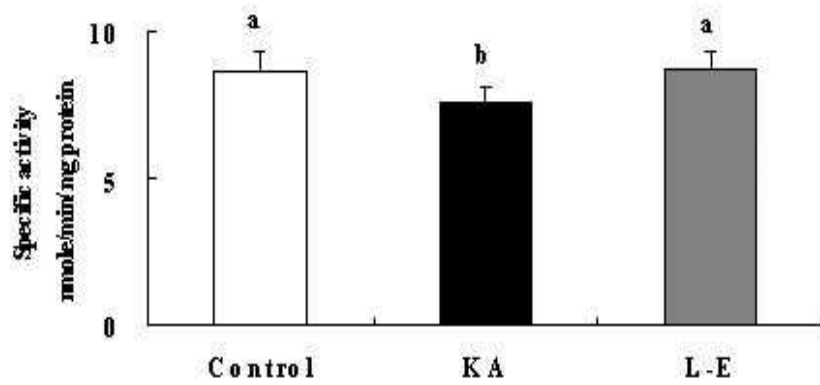
도면1



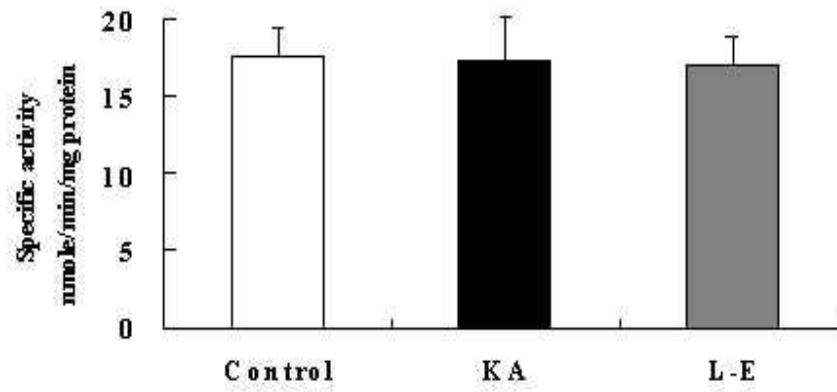
도면2



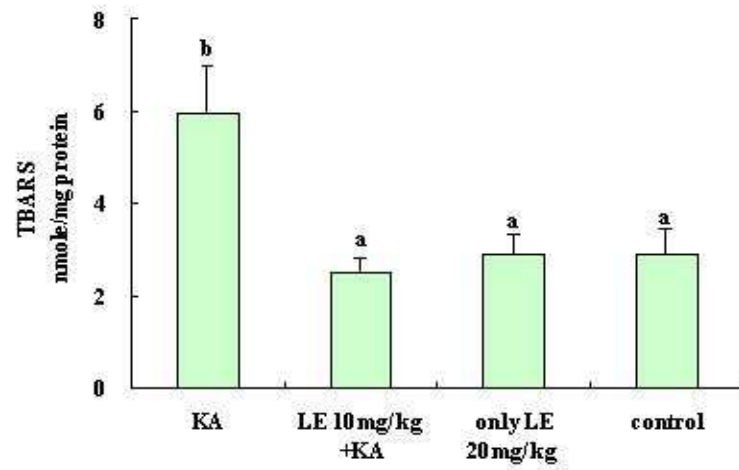
도면3a



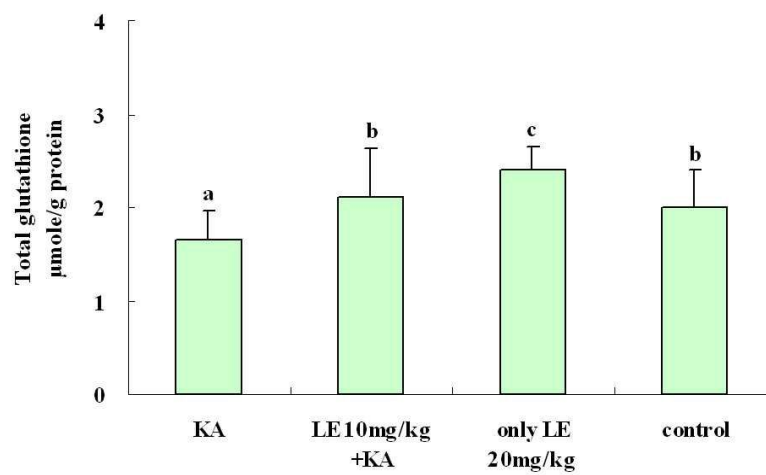
도면3b



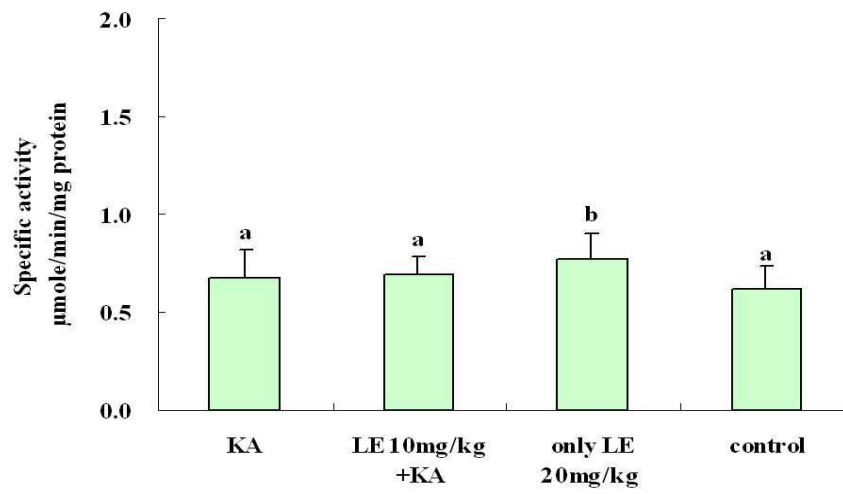
도면4



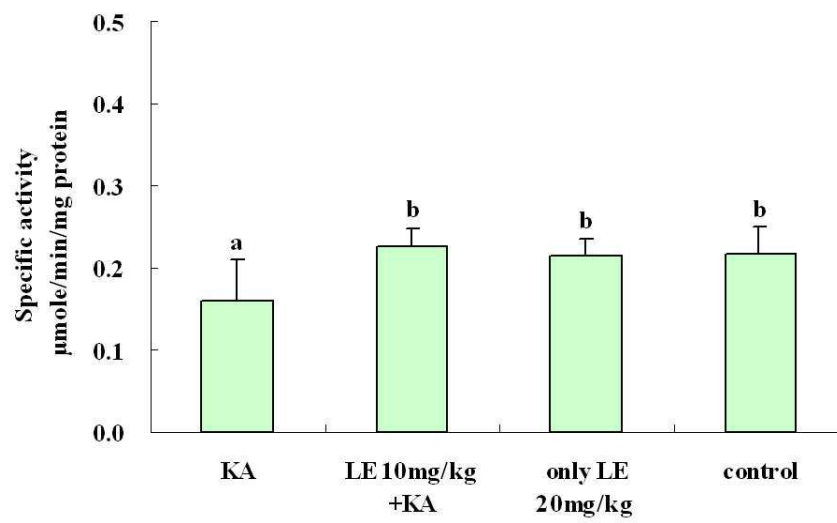
도면5



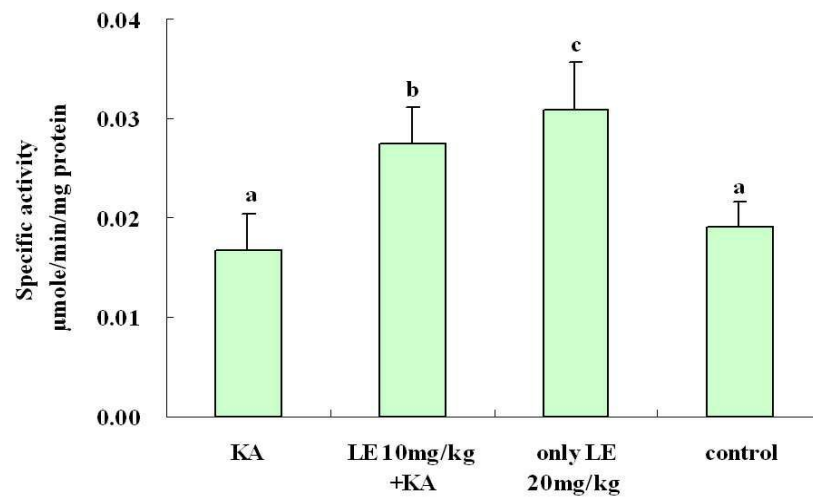
도면6a



도면6b



도면7a



도면7b

