



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0107982
(43) 공개일자 2013년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/066 (2006.01) A61K 36/068 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0030213

(22) 출원일자 2012년03월23일

심사청구일자 2012년03월23일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

함대현

서울시 동대문구 장안동 장안 래미안2차 217동 802호

이혜정

경기도 용인시 수지구 신봉동 873 LG자이1차아파트 109동 502호

이봄비

서울시 동대문구 회기동 109-96번지 플러스빌 102호

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 8 항

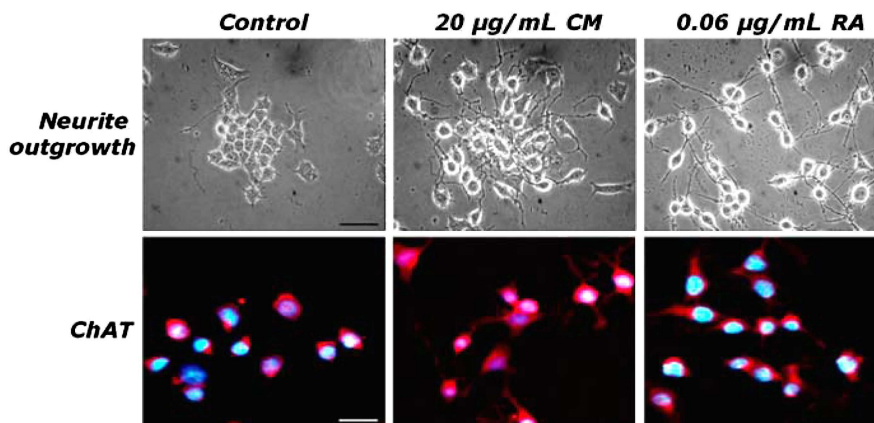
(54) 발명의 명칭 붉은 동충하초 추출물을 포함하는 신경돌기 성장 촉진제

(57) 요약

본 발명은 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물을 포함하는 신경돌기 성장 촉진용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물은 신경돌기의 형성, 연장, 분지를 촉진하여 신경돌기의 성장을 촉진하는 효과를 가지므로, 신경돌기 성장 촉진제로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명에 따른 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물은 신경돌기의 성장을 촉진시켜 시냅스 가소성을 유도할 뿐만 아니라, 콜린아세틸트랜스퍼라제의 발현을 촉진시켜 콜린성 신경에서 아세틸콜린의 방출을 유도하여, 인지, 학습 능력 및 기억력 감퇴를 예방 및 치료하는 효과를 가지므로, 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물을 포함하는 신경돌기 성장 촉진용 조성물.

청구항 2

붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 붉은 동충하초 추출물은 물, C₁₋₄ 알코올 또는 이들의 혼합용매 추출물인 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물은 신경돌기의 발아, 성장, 분지를 유도하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물이 콜린아세틸트랜스퍼라제의 발현을 촉진하는 것인 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물이 학습 능력, 인지 기능 또는 기억력의 감퇴 질환을 예방 또는 치료하는 것인 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 질환은 알츠하이머 질환인 조성물.

청구항 8

붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

명 세 서

기술분야

[0001] 본 발명은 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물을 포함하는 신경돌기 성장 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 퇴행성 신경질환을 예방 또는 치료할 수 있는 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물을

포함하는 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 신경돌기는 신경세포간의 신호의 전달에 필수적인 요소로 다양한 신호 전달 체계에 의해 조절되며 알츠하이머, 헌팅톤 등과 같은 질병 혹은 신경의 성장, 분해 등과 밀접한 관련이 있다. 즉, 장기 기억 형성시 새로운 유전자의 발현과 함께 신경세포의 구조변화와 이를 통한 시냅스 형성 역시 중요한 변화로 여겨지고 있다(Bailey et al. 1993 Annu. Rev. Physiol. 5, 397-426; Bailey et al. 1996 PNAS 93, 13445-13452). 최근의 연구 결과에 의하면 발생과정에서 신경세포로의 분화와 생존에 중요하다고 알려진 뉴로트로핀(neurotrophin) 인자들이 축삭 개척(axonal pathfinding)과 성체의 시냅스의 가소성에도 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어지고 있다(Mckay et al. 1999 Lamp;M 6, 193-215). 지금까지 신경돌기(neurite) 성장과 시냅스 가소성에 중요하게 알려진 뉴로트로핀들인 NGF(Nerve growth factor), NT-3(neurotrophin-3), BDNF(brain dericed neurotrophin factor) 등은 신경생장인자수용체인 TrkC와 결합하고, P75 NTR 수용체와는 비특이적으로 약한 결합을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 뉴로트로핀들은 TrkA 수용체를 자극시키는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 한편, 최근 현대 사회의 눈부신 발달에 따라 생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환이 사회적인 문제로까지 크게 대두되고 있다. 치매(dementia)는 일상 생활에 손상을 주는 기억과 인지 능력의 점차적인 악화로 정의되며, 크게 혈관성 치매와 노인성 치매로 나눌 수 있다. 혈관성 치매보다 훨씬 많은 비중을 차지하는 노인성 치매는 소위 알츠하이머성 치매로도 일컬어지는 것으로, 특징적인 뇌병변으로는 β -아밀로이드가 포함된 노인반과 신경섬유다발이 형성되어 콜린성 신경을 비롯한 광범위한 신경들을 사멸시키는 퇴행성 병변 등을 야기하는 것이 관찰되고 있다. 임상적으로는 병의 초기부터 기억력 소실이 나타나며, 병의 진행과 더불어 기억력 및 인지능의 손상 정도가 심해져서 결국에는 먹고 마시는 행위 등도 망각하여 스스로를 돌볼 수 없는 심각한 상태에 이르게 된다. 특히 퇴행성 신경질환의 대부분을 차지하는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease; AD)은 노년층에서 흔히 발생하는 퇴행성 신경질환으로 한국의 경우, 노인 인구 증가에 따라 2020년까지 65세 이상 인구의 약 8.3%인 62만명이 알츠하이머 환자가 될 것으로 추정되고 있다.
- [0005] 퇴행성 신경 질환의 발병 원인을 밝히려는 연구는 세계적으로 계속되고 있지만, 아직 정확한 기전은 밝혀지지 않고 있다. 이러한 연구 중 노인성 치매를 가진 환자의 사체의 뇌조직에서 전시냅스(presynapse) 콜린신경의 퇴화와 손실이 확인됨으로써 노인성 치매는 콜린성 인지 결손이라는 가설이 있다. 실제 노인성 치매 환자의 중추 콜린 기능이 강화될 때 인지력 손상이 완화되거나 개선된 바 있다(Schneider L.S. New Therapeutic Approaches to Cognitive Impairment, Journal of Clinical Psychiatry, 59, 8-12, 1998).
- [0006] 노인성 치매의 약물 치료 목표는 인지 또는 행동 증상을 개선하고 질병의 발생, 악화를 지연시키거나 막는 것이다(Cummings J. L., Vinters H., Cole G. M., Khachaturian Z. S., Alzheimer's disease, Neurology, 51, S2-S14, 1998;Steinberg M. Pharmacologic treatment of Alzheimer's disease, An update on approved, unapproved therapies, Formulary, 295, 32-44, 1999). 현재 노인성 치매의 치료제로 승인받은 약물은 콜린에스테라제 저해제(cholinesterase inhibitor)로, 시냅스에서의 콜린 분해를 감소시킴으로써 뇌 내 작용하는 콜린을 증가시키는 약물이다. 대표적인 예로는 타크린(tacrine, 상품명: Cognex), 리바스티그민(rivastigmine, 상품명: Exelon) 등과 같은 콜린에스테라제 저해제(cholinesterase inhibitor)가 사용되고 있다. 그러나, 콜린에스테라제 저해제는 1일 4회 복용 및 용량 증가과정이 필요할 뿐 아니라, 그 효과가 우수하지 못하고, 일시적으로 일부 증상을 호전시키는 정도의 효과를 나타낼 뿐이다. 특히, 타크린은 작용시간이 짧고 용량에 비례하여 간독성이 심하게 나타내고, 더욱이 현훈, 위장관장애, 운동실조 등의 부작용도 나타내며, 리바스티그민은 주로 부교감 신경 활성화로 인한 오심, 구토, 복통, 설사, 소화불량, 식욕부진, 어지러움, 초조, 우울, 두통, 불면, 혼동, 마비, 발한, 진전, 권태, 상호흡기와 생식기계 감염 등의 부작용을 나타낸다.
- [0007] 또한, 이제까지 개발된 노인성 치매의 치료 약물들은 단지 노인성 치매의 증상만을 완화하는 것이고, 근본 치료 약은 아닐 뿐만 아니라 앞서 살펴본 바와 같은 많은 부작용들이 알려져 있다. 즉, 현재까지는 노인성 치매를 치료하기 위한 근본적인 치료제가 거의 전무한 실정이다.

- [0008] 한편, 동충하초는 예로부터 인삼, 녹용과 더불어 중국의 진귀한 3대보약 중의 하나로 알려져 있다. 자실체를 형성하는 대표적인 동충하초속 균주로는 코디셉스(*Cordyceps*)속, 토루비에라(*Torrubiella*)속, 포도넥트리아(*Podonectria*)속 등으로 알려져 있으며, 자연계에서 채집되는 동충하초의 종류는 *Cordyceps militaris*, *Cordyceps scarabaeicola*, *Cordyceps sphecocephala*, *Cordyceps tracentri* 및 *Cordyceps sinensis* 와 같은 종이 있고 이들은 유성생식을 하는 자낭균문에 속하며, 이들은 포자를 형성할 때 균사로 포자과를 만들기 때문에 버섯이라고 한다.
- [0009] 이 중 붉은 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 균핵 동충하초(*Cordyceps opioglossoides*)와 구성성분 및 유리 아미노산의 함량에 있어서 현저한 차이가 있다. 붉은 동충하초는 회분, 조지방, 조단백질, 탄수화물 뿐만 아니라 미량의 칼슘, 나트륨, 칼륨, 철, 인 등을 구성성분으로 함유하고 있다. 특히, 붉은 동충하초는 약리학적인 성분인 코디세핀, 코디세픽 산, 폴리사카라이드(다당류) 등을 다량 함유하고 있는데, 상기 코디세핀은 핵산물질로서 세포의 유전정보에 관여하여 저하된 면역기능을 활성화시켜 정상세포가 암세포로 되는 것을 방지하는 항암 효과 및 항염증 효과가 있다고 알려져 있다. 기존의 연구에서, 동충하초 속 식물들의 코디세핀 함량을 분석한 결과, 붉은 동충하초는 코디세핀을 매우 높은 함량으로 포함하고 있는 반면, 균핵 동충하초의 경우, 코디세핀을 거의 함유하고 있지 않은 것으로 보고된 바 있다(오세옥, 동충하초 품종별 영양성분 비교, 한국식품과학회지 제 35권 제1호, 15-22).
- [0010] 또한, 붉은 동충하초와 균핵 동충하초는 구성성분 중 유리 아미노산의 함량에 있어서 차이점이 있다. 동충하초에 포함된 17종의 유리 아미노산의 총합량은 균핵 동충하초보다 현저히 높으며, 특히 제1필수 아미노산인 라이신과 약효가 있는 글리신, 글루탐산, 아스파르트산 등의 함량이 균핵 동충하초보다 현저히 높다고 알려져 있다(백구은 과대학학보 제20권 제1기, 1994년).
- [0011] 종래 붉은 동충하초(*Cordyceps militaris*)에는 면역 기능을 강화시키는 성분이 함유되어 있어 세포면역과 체액 면역을 촉진시키고, 면역기능을 현저히 보강시켜 각종 종양과 바이러스 감염에 대한 저항력을 높이는 등의 효과가 있는 것으로 밝혀진 바 있다. 또한 한국에서도 이에 대한 연구로 항암성분인 ergosterol peroxide가 규명된 바 있다(Ha-Won Kim et al. 2001. In vitro Antitumor Activity of Ergosterol Peroxide Isolated from *Cordyceps militaris* on Cancer Cell Lines from Korean Patients).
- [0012] 상기와 같이, 종래 퇴행성 신경 질환의 치료 및 동충하초에 대한 효능에 대한 다양한 연구가 있었으나, 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물이 신경돌기 및 퇴행성 신경 질환에 미치는 효능에 대한 연구는 전무한 실정이다.
- [0013] 이에, 본 발명자는 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물의 신경세포에 대한 효능을 연구하던 중, 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물이 신경돌기의 성장(outgrowth)을 촉진하고, 콜린아세틸트랜스퍼라제의 발현을 증가시킴으로써, 인지 기능, 학습 능력 및 기억력 감퇴를 효과적으로 개선하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물을 포함하는 신경돌기 성장 촉진용 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [0015] 또한, 본 발명은 퇴행성 신경질환을 예방 또는 치료할 수 있는 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물을 포함하는 약학적 조성물 및 건강기능식품을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 붉은 동충하초(*Cordyceps Militar*) 추출물을 포함하는 신경돌기 성장 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명에서 사용되는 용어, "붉은 동충하초"는 *Cordyceps Militar*를 의미하는 것으로, 곰팡이의 일종인 붉은 동충하초 균이 온습도가 높아지는 시기에 살아있는 곤충의 몸 속으로 들어가 발육증식하면서 기주 곤충을 죽이고 얼마 후, 자실체를 곤충의 표피에 형성하는 일종의 약용 버섯이다.
- [0018] 본 발명에서 사용되는 용어, "추출물"은, 당업계에서 공지된 통상적인 추출용매, 예를 들어 (a) 물, (b) C₁₋₄ 알코올(예: 메탄올, 에탄올, 부탄올 등), (c) 상기 알코올과 물과의 혼합용매를 사용하여 얻을 수 있다. 바람직하게 본 발명의 붉은 동충하초 추출물은 메탄올 추출물일 수 있다.
- [0019] 또한, 상기 추출물은 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 추출은 상온 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 및 증기 추출로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 사용하여 수행할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명에서 사용된 용어, "신경돌기"는 뉴런의 세포체(신경 세포)로부터의 돌출부(수상 돌기 및 축삭 돌기)를 의미하고; "성장"은 세포체로부터의 상술한 신경돌기의 발생, 연장, 또는 분지를 의미한다. 본 발명에서, "...성장을 촉진하는"은 붉은 동충하초(*Cordyceps Militar*) 추출물에 의해 야기된 것으로서 신경 세포체로부터의 상술한 신경돌기의 발생, 연장 또는 분지를 의미한다.
- [0022] 본 발명에 따른 붉은 동충하초(*Cordyceps Militar*) 추출물은 신경돌기(neurite)의 성장을 촉진하는데, 구체적으로 신경돌기의 발생, 연장, 분지를 유도함으로써, 신경돌기의 성장을 촉진한다.
- [0023] 구체적인 일 실시예에서, Neuro2A 신경 세포에 붉은 동충하초(*Cordyceps Militar*) 추출물을 처리한 결과, 세포 몸체로부터 1차 신경돌기 및 1차 신경돌기로부터 2차 신경돌기의 발생이 현저하게 증가하였다. 붉은 동충하초(*Cordyceps Militar*) 추출물을 처리한 신경 세포는 신경돌기의 총 발생 갯수 뿐만 아니라, 발생한 신경돌기의 길이를 연장시켜, 붉은 동충하초 추출물을 처리하지 않은 미처리군 및 양성 대조군인 레티논산과 비교하여 현저하게 신경돌기가 성장하는 것을 확인하였다(도 1).
- [0024] 이는, 본 발명의 붉은 동충하초 추출물이 신경돌기의 발생과 연장을 촉진하여 시냅스 형성 및 가소성을 촉진하는 것을 의미한다. 또한, 시냅스의 연결은 뇌에서 엑손 및 덴드라이트 모두의 발생과 밀접하게 연관되어 있는 점에서, 본 발명의 붉은 동충하초 추출물이 학습, 인지 기능 및 기억력 증진에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 붉은 동충하초(*Cordyceps Militar*) 추출물을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 따른 붉은 동충하초(*Cordyceps Militar*) 추출물은 신경세포의 돌기의 형성 촉진, 성장, 분지를 유도 작용을 가질 뿐만 아니라 콜린아세틸트랜스퍼라제의 발현을 촉진함으로써, 콜린성 신경에서 아세틸콜린의 방출을 유도하는 역할을 한다.

- [0027] 아세틸콜린은 뇌의 기저핵에서 대뇌 피질과 해마로 투사되어 정상적인 지식기능에 매우 중요하게 작용하는 신경 전달물질이다(Richter et. al., Life Sci, 19:26(20):1683-9(1980)). 특히, 학습 및 기억은 아세틸콜린계에 작용하는 물질에 의해 변화될 수 있다는 것이 알려져 있다.
- [0028] 본 발명의 붉은 동충하초 추출물은 콜린아세틸트랜스퍼라제의 발현을 유도하고, 신경돌기의 성장을 촉진하여 인지 기능의 손상을 예방 및 치료하고, 손상된 인지 기능, 학습 능력 및 기억력 감퇴를 개선하는 효과가 있다. 즉, 본 발명에 따른 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물은 학습 능력, 인지 기능 또는 기억력의 감퇴 질환을 예방 또는 치료하는 작용을 가진다.
- [0029] 구체적인 일 실시예에서 콜린아세틸트랜스퍼라제(cholineacetyltransferase, ChAT)의 발현을 측정하기 위해 면역세포화학을 수행하였다. 그 결과, 10 μ g/mL 및 20 μ g/mL의 붉은 동충하초 추출물을 처리한 세포는 미-처리한 대조군과 비교하여 ChAT의 발현과 관련한 형광 강도가 현저하게 증가하는 것을 확인하였다(도 3).
- [0030] 또한, 구체적인 다른 실시예에서, 붉은 동충하초 추출물을 처리한 래트의 해마 절편을 취하여 면역조직화학을 수행하였고, 아무것도 처리하지 않은 미처리 군에 비하여 ChAT의 활성이 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 6 및 7).
- [0031] 이는, 붉은 동충하초 추출물이 콜린성 신경의 분자적 마커인 콜린아세틸트랜스퍼라제의 발현을 효과적으로 유도함으로써, 퇴행성 신경 질환에 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.
- [0032] 본 발명에서 사용된 용어, "퇴행성 신경 질환"은 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 여러 가지 증상을 유발하는 질환을 의미하는 것으로, 대표적인 퇴행성 대표적인 퇴행성 뇌신경 질환에는 치매, 알츠하이머 병(Alzheimer's disease), 파킨슨 병(Parkinson's disease), 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 다계통 위축증(Multiple system atrophy); 감람핵-뇌교-소뇌 위축증(Olivopontocerebellar atrophy: OPCA); 샤이-드래거 증후군(Shy-Drager syndrome); 선조체-흑질 퇴행증(Striatonigral degeneration), 헌팅톤 병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis;ALS), 본태성 진전증(Essential tremor), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico-basal ganglionic degeneration), 미만성 루이 소체 질환(Diffuse Lewy body disease), 파킨스-ALS-치매 복합증(Parkinson-ALS-dementia complex of Guam) 및 픽병(Pick's disease) 중 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 알츠하이머병일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 개시한 퇴행성 신경질환인 치매는 사람의 정신(지적) 능력과 사회적 활동을 할 수 있는 능력의 소실을 말하며, 어떤 사람의 일상생활의 장애를 가져올 정도로 충분히 심할 때 이를 치매라고 한다. 즉 치매는 그 자체가 어떤 활동을 이야기하는 진단명이 아니라 단지 특정한 증상들이 나타나서 어떤 기준을 만족시키는 경우를 지칭하는 하나의 증후군이다. 치매는 여러 가지 질환들에 의해 나타나는 병적 증상으로, 미만성 루이소체 치매, 두부 외상성 치매 등 매우 다양한 질환들에 의해서 치매가 나타날 수 있는데, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 미만성 루이소체 치매들은 치매의 증상으로만 나타날 수 있다.
- [0034] 구체적인 일 실시예에서, 스코폴라민으로 신경 손상을 유도한 수컷 래트에 본 발명의 붉은 동충하초 추출물을 처리하고 수동 회피 시험, 모리스 워터 메이즈 시험을 수행하였다. 그 결과, 아무것도 처리하지 않은 미처리군 및 양성 대조군으로서 레티논산을 투여한 군과 비교하여 유사 또는 개선된 정도의 인지 및 기억력을 나타내는 것을 확인하였다(도 4 및 5). 이는 붉은 동충하초 추출물이 스코폴라민으로 손상된 신경 세포를 재생하고 콜린성 신경을 활성화시킴으로써, 퇴행성 신경질환에 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 붉은 동충하초 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 퇴행성 신경질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 붉은 동충하초 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

- [0036] 본 발명의 조성물은 투여를 위하여, 상기 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.
- [0037] 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, 봉해제, 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 잎 추출물, 또는 이의 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. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를들어, 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.
- [0039] 또한, 본 발명은 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 바람직하게, 상기 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 개선은 상기 두뇌 또는 인지 기능의 증진은 학습 능력, 기억 능력 및 집중력의 증진에 기인한 것일 수 있다.
- [0040] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 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 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0041] 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 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0042] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0043] 상기 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따른 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물은 신경돌기의 형성, 연장, 분지를 촉진하여 신경돌기의 성장을 촉진하고, 시냅스 형성 및 가소성을 높이는 효과를 가진다. 뿐만 아니라 본 발명에 따른 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물은 콜린아세틸트랜스퍼라제의 발현을 촉진시켜 콜린성 신경에서 아세틸콜린의 방출을 유도하여, 인지, 학습 능력 및 기억력 감퇴를 예방 및 치료하는 효과를 가진다.

[0045] 또한, 붉은 동충하초 (*Cordyceps Militaris*) 추출물은 천연자원으로서, 부작용이 적으므로, 신경돌기 성장 촉진제 및 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은, 본 발명의 일실시예에 따른 신경돌기 성장을 평가한 그래프이다(도 1의 A는 1차 신경돌기 및 2차 신경돌기(분지, Branch)를 모식도로 나타낸 것이고, 도 1의 B는 신경세포 당 총 신경돌기의 갯수를 나타낸 그래프이고, 도 1의 C 및 D는 각각 신경세포 당 1차 신경돌기 및 2차 신경돌기의 갯수를 각각 나타낸 그래프이다. 도 1의 E는 신경돌기의 평균 길이에 대한 그래프이며, 도 1의 F는 총 신경돌기의 길이를 나타낸 그래프이다; CM: 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물, RA: 레티논산)

도 2는, 본 발명의 일실시예에 따른 신경아세포종에서 신경돌기 성장 및 ChAT의 발현을 관찰한 현미경 사진이다(CM: 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물, RA: 레티논산).

도 3은, 본 발명의 일실시예에 따른 신경아세포종에서 ChAT의 발현 평균 강도를 나타낸 그래프이다(CM: 붉은 동충하초(*Cordyceps Militaris*) 추출물, RA: 레티논산).

도 4는, 본 발명의 일실시예에 따른 수동 회피 시험에서의 인지 시도(acquisition trial) 및 체류 시험(retention test) 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는, 본 발명의 일실시예에 따른 MWM 시험에서 인지 시도, 체류 시험에 대한 결과를 나타낸 그래프이다(A: 숨겨진 플랫폼 시험, B: 프로브 시도, C: 수영 속도, CON: 대조군, CM: 붉은 동충하초 추출물, SCO: 스코폴라민, CM100+SCO: 붉은 동충하초 추출물 100mg/kg+스코폴라민; CM200+SCO: 붉은 동충하초 추출물 200mg/kg+스코폴라민; CM300+SCO: 붉은 동충하초 추출물 300mg/kg+스코폴라민)

도 6은, 본 발명의 일실시예에 따른 해마에서 ChAT-반응 세포 분포를 나타낸 사진이다(CON: 대조군, SCO: 스코폴라민; CM300+SCO: 붉은 동충하초 추출물 300mg/kg+스코폴라민)

도 7은, 본 발명의 일실시예에 따른 ChAT-면역반응성 신경의 평균 수를 나타낸 그래프이다(CON: 대조군, CM: 붉은 동충하초 추출물, SCO: 스코폴라민, CM100+SCO: 붉은 동충하초 추출물 100mg/kg+스코폴라민; CM200+SCO: 붉은 동충하초 추출물 200mg/kg+스코폴라민; CM300+SCO: 붉은 동충하초 추출물 300mg/kg+스코폴라민).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0048] 1. 실험방법

[0049] 1-1. 붉은 동충하초(*Cordyceps militaris*) 메탄올 추출물의 제조

[0050] 붉은 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 Forest Resources Research Institute (대한민국, 나주)에서 구입하여 사용하였다. 붉은 동충하초 추출물의 대조 표본은 경희대학교 한방학과의 식물표본관(Code No. KH-CM01)에 보관하였다. 붉은 동충하초 100g을 작은 조각으로 자르고, 상온(25±2℃)에서 24시간동안 환류냉각기 내에서 80% 메탄올 4L로 각각 3회 추출하고, 초음파처리하였다. 각 용액을 합친 후, 와트만 여과지(Whatman No.1 filter

paper)로 여과하고, 감압 하에 회전 진공 농축기(Rotacapor R-124; Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)를 사용하여 농축하였다. 농축된 추출물을 얻기 위하여 냉각하고(Eyela CCA-1110; Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan), 동결건조하였다(Eyela FD-800; Tokyo Rikakikai Co). 얻은 붉은 동충하초의 메탄올 추출물 수율은 15.5%(w/w)였다.

[0051] 1-2. 세포 배양

[0052] Neuro2A 세포(마우스 신경아세포종 세포주)를 생명자원센터(the Korean Collection for Type Culture, 대한민국, 대전)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10%(v/v) 열불활성화된 소태아혈청(FBS), 1%(v/v) 페니실린 및 스트렙토마이신 혼합물로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified minimum essential medium) 배지에서 37℃ 5% CO₂와 95% 습도의 대기 조건하에 배양하였고, 격일로 교체하였다. 상기 세포는 3~4일마다 계대배양하였고, 배지는 2일마다 교체하였다.

[0053] 1-3. 신경돌기 발생

[0054] 신경돌기 발생 평가를 위하여, 준비한 세포를 콜라겐(송아지 피부로부터 얻은 Type I; Elastin Products Co., Owensville, MO, USA)으로 코팅된 6-웰 플레이트(35mm 플라스틱 배양접시)에서 2.5×10^5 세포/웰의 밀도로 분주하였고, 37℃ 5% CO₂에서 24시간동안 배양하였다. 24시간의 배양 후, 배양 매질을 2% FBS의 DMEM으로 교체하였다. 세포들은 pH 7.4에서 멸균된 인산 완충 식염수(PBS)로 희석한 여러 가지 농도의 붉은 동충하초 추출물로 처리하였고, 가장 바람직한 붉은 동충하초 추출물의 농도는 5, 10, 및 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 임을 확인하였다. 붉은 동충하초 추출물은 대조군 플라스크에는 첨가하지 않았다. 37℃, 5% CO₂에서 24시간동안 배양한 후, 세포들을 PBS로 세척하고, 0.1% 글루타르알데하이드 용액 1mL를 첨가하였다. 그리고 나서, 세포를 상온에서 30분간 방치하였다. 개별 세포의 모든 신경돌기 및 분지들은 위상차 현미경($\times 200$ 확대)이 있는 영상 처리 시스템(FLUOVIEW FV10i, Olympus confocal microscope system; Olympus Co., Ltd., Cambridge, UK) 및 영상 소프트웨어(Leica Qwin Plus 271; Leica Microsystems Co., Ltd., Cambridge, UK)를 사용하여 계산하였다.

[0055] 1-4. 콜린아세틸트랜스퍼라아제(Cholineacetyltrasferase, ChAT) 면역세포화학

[0056] 면역세포화학을 위해서, 세포를 2.5×10^5 세포/웰의 밀도로 35mm 커버글라스-버텀 접시(Coverglass-Bottom Dishes, SPL Life Sciences, 대한민국 서울)에 분주하고 24시간동안 배양하였다. 세포를 pH 7.4에서 PBS로 희석한 여러 가지 농도의 붉은 동충하초 추출물로 처리하여 바람직한 붉은 동충하초 추출물 농도인 5, 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 얻었다. 대조군 플레이트에는 붉은 동충하초 추출물을 처리하지 않았다. 세포를 PBS로 세척하고, 10분동안 4% 파라포름알데하이드로 고정시킨 후, 상온에서 투과된 세포에 PBST(PBS plus 0.5% Triton X-100)을 10분동안 노출시켰다. 고정 및 투과된 세포는 5분동안 PBS로 세척하고 5% 노르말 고트 블로킹 용액(Normal goat blocking solution)과 함께 배양하였다. 그리고 나서, PBS 중 1차 토끼 항-ChAT 항체(1:2,000 희석: Abcam Co., San Francisco, CA, USA)와 함께 상온에서 2시간동안 배양하였다. 세포를 5분동안 PBS로 세척하고, Alexa Fluor 647 항-토끼 염소 IgG를 상온에서 60분동안 배양하였다. 이차 항체는 Invitrogen Co, (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고, 1:200으로 5% 노르말 고트 세럼을 포함하는 PBS으로 희석하였다. 면역반응을 가시화하기 위하여, 세포들을 10분동안 Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA)에서 배양하였고, 5분동안 PBS로 세척하였다. Hoechst 333258로 염색된 세포들을 FLUOVIEW FV10i Olympus 공초점 현미경으로 캡처하였다. Alexa Fluor 647 푸른색은 붉은색을 대체하고, 염색된 세포들의 강도는 FV10-ASW ver. 2.0 프로그램(Olympus Co., Ltd)를 사용하여 측정하였다. 세포들은 $\times 200$ 배로 관찰하였고, 세포의 강도는 $100 \times 100\text{-}\mu\text{m}$ 그리드 내에서 실험 농도에 매칭인 관찰자가 측정하였다.

[0057] 1-5. 실험동물의 준비

[0058] (1) 동물

[0059] 260~280g의 다 자란 수컷 Sprague-Dawley(SD) 래트를 Samatoco Amino Co. (대한민국, 서울)에서 구입하였다.

래트는 최대 5 마리/폴리카보네이트 케이지로 접근이 통제된 설치류 시설에서 사육하였다. 시설은 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도 및 $55 \pm 15\%$ 의 습도로 통제하였다. 케이지는 하루 12시간씩 낮/밤으로 조절하였으며, 멸균 음용수와 표준 음식을 자유롭게 실험기간 동안 각 케이지에 공급하였다. 동물 실험은 실험 동물 사용과 관리에 대한 가이드(NIH 발간 No. 80-23)에 따라 수행하였고, 경희 대학교 동물실험 윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 하에 수행하였다. 모든 동물 실험은 동물 도착 7일 후부터 시작하였다.

[0060] (2) 인지 장애 모델 및 실험군

[0061] 학습 및 기억 결함을 위하여, 체중당 2mg/kg로 생리식염수에 용해시킨 스코폴라민 브로민화수소산염을 하루 1번 14일동안 수컷 래트에 복강주사하였다. 대조군은 담체로 스코폴라민 대신 생리식염수를 주사하였다. 구체적으로 래트는 임의로 7마리씩 6군으로 나누었다: 정상군(normal group, NOR group, n=7), 생리식염수+300mg/kg 붉은 동충하초 처리군(CM 군, n=7), 스코폴라민+생리식염수 처리군(대조군: SCO 군, n=7), 스코폴라민+100mg/kg 붉은 동충하초 처리군(SCO+CM100 군, n=7), 스코폴라민+200mg/kg 붉은 동충하초 처리군(SCO+CM200 군, n=7), 스코폴라민+300mg/kg 붉은 동충하초 처리군(SCO+CM300 군, n=7). 래트는 14일동안 붉은 동충하초 추출물을 경구 투여하였고, 붉은 동충하초 추출물은 0.9% 생리식염수에 용해되어 제공하였다. 붉은 동충하초 추출물의 경구 투여는 스테인레스 강철 바늘을 사용하였으며, 이는 식도 끝에서 용액의 침적을 가능하게 하였다. 붉은 동충하초 추출물 투여 한 시간 후, 정상군을 제외한 모든 래트들에게 스코폴라민을 주사하였다. 모든 래트는 스코폴라민 주사 후 8일째 수동 회피 시험(passive avoidance test), 10일째 모리스 워터 메이즈 시험(Morris water maze test)을 연속적으로 수행하였다. 행동 시험 후에, 모든 래트들을 스코폴라민 주사 후 15일째 면역조직화학 연구를 위하여 희생하였다.

[0062] 1-6. 수동 회피 시험(Passive avoidance test)

[0063] 모든 군의 래트들은 수동 회피 시험(Passive avoidance test)을 수행하였다. 래트들은 생리적 결함 또는 본태성 인지 장애가 없는지를 확실하게 하기 위하여 스코폴라민-유도 손상시험 이전에 전기충격 없이 인지 시험을 수행하였다. 인지 시험에 대한 시간은 어두운 방을 들어가는 데 소요되는 시간을 의미하는 것이고, 실험군 별로 크게 차이하지 않았다.

[0064] 실험에는 Gemini Avoidance System (SD Instruments., San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 기본적으로 쇼크실 수동 회피(step-through passive avoidance) 장치는 밝은 부분과 어두운 부분이 자동 단두대(guillotine door)로 연결된 2-부분의 아크릴 박스로 구성되어 있다. 전기 충격은 스테인레스 강철골(3mm 직경)로 구성된 두 부분의 격자 바닥으로 독립된 쇼크 생성기(Behbood Pardaz Co., Ghaem, Iran)에 의하여 전달된다. 먼저, 장치에서 인지 시험을 수행하였다. 이 시험에서, 래트는 밝은 부분에 30초동안 위치하였고, 단두대 문을 열었다. 래트는 어두운 환경으로 가고자 하는 본능을 가진다. 어두운 부분을 통과하자마자, 문은 닫힌다. 스코폴라민 주사 후, 8일째 어두운 부분을 통과하는 반응 시간에 대한 인지 시험을 기록하였다. 30분 후, 래트는 밝은 부분으로 다시 위치시켰다. 래트가 어두운 부분으로 통과하는 동시에 단두대 문이 닫히고, 약한 전기 충격(0.5mA)을 3초동안 가하였다. 트레이닝을 위하여 인지 시험 24시간 직후, 체류 시험(retention test)을 수행하였다. 래트를 다시 밝은 부분에 위치시켰고, 단두대 문을 열었다. 체류 시험은 인지 시험과 같은 방법으로 어두운 부분을 통과하는 반응시간을 측정하였다. 체류 시험에서 허용한 최대 통과 반응시간은 180초까지만 측정하였다.

[0065] 1-7. 모리스 워터 메이즈 시험(Morris water maze (MWN) test)

[0066] (1) MWN 장치

[0067] MWN 장치는 폴리프로필렌 순환 풀(내부는 하얀색으로 칠해져 있고, 직경은 2.0m, 높이는 0.35m)을 사용하였다. 풀은 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지되는 물을 포함하고 있으며, 상기 물은 1kg의 탈지분유를 첨가하여 불투명하게 만들었다. MWN 시험동안, 직경 15cm의 플랫폼을 상기 물 아래 1.5cm, 풀의 4 부분중 하나, 즉 측면으로부터 약 50cm 부분에 위치시켰다. 상기 풀은 동등하게 4개의 부분으로 나누어져 있다. 풀의 천장에 디지털 카메라를 고정시키고, 상기 풀은 추적 프로그램(tracking program, S-MART: PanLab Co., Varcelona, Spain)으로 장착된 컴퓨터화 기

록 매체에 연결시켰고, 이를 이용하여 래트가 지나간 길을 온-, 오프라인으로 자동 추적하도록 하였다.

[0068] (2) 인지 시험을 위한 숨겨진 플랫폼 시험(Hidden platform trial for acquisition test)

[0069] MWM 시험은 붉은 동충하초 추출물 및 스코폴라민 투여 10일 후에 시작하였다. 동물들은 하루 3번의 시도(trial)를 수행시켰다. 래트는 시험을 통하여 고정된 장소에서 숨겨진 플랫폼을 찾도록 훈련시켰다. 시도는 최대 180초 동안 수행하였고, 플랫폼을 찾는데 걸리는 시간을 매번 기록하였다. 동물들은 5일동안 하루 3번 시도하였고, 6일째에는 60초의 프로브 시도를 수행하였다. 플랫폼 찾기는 180초의 인지시간이 끝나기 전에, 4초 이상동안 그 자리에서 머문 것으로 정의하였다. 만약 래트가 할당된 시간안에 플랫폼을 찾는 것을 실패한다면, 플랫폼에 20초 동안 머물도록하고 180초의 체류시간을 할당하였다. 이전 수영 패턴의 후각 추적을 제거하기 위해서 한 번의 시험 후 다음번 시험 전에 물을 교반하였다. 전 과정은 6일 연속 진행하였고, 각 동물들은 시행간 간격 30 내지 40분으로, 하루 3번의 트레이닝 시험을 수행하였다.

[0070] (3) 체류 시험을 위한 프로브 시험(Probe trial for retention test)

[0071] 프로브 시도를 위해서 각 래트를 타겟 사분원으로부터 60초 동안 비스듬히 두었다. 그리고 어떤 플랫폼이 제거되었는지 물을 수색하도록 하였다. 전 플랫폼 사분원에 대한 다른 3개의 사분원에서의 플랫폼 서치 소요 시간을 각 래트당 측정하였다.

[0072] 1-8. ChAT 면역조직화학

[0073] 면역조직화학 실험을 위하여, 래트들을 펜토바르비탈 나트륨염(80mg/kg, 복강주사)로 마취시키고, 0.9% 생리식염수로 상행 대동맥을 관류시켰다. 이어서, 0.1M PBS 중 4% 파라코름알데히드 300mL로 관류시켰다. 뇌를 제거하고, 하룻밤동안 후-고정시켰으며 4℃ 0.1M PBS 중의 20% 수크로오스로 동결보호시켰다. 관상(coronal) 섹션 20 μ m 두께를 해마를 관통하여 크라이에스탯(cryostat, Leica CM1850; Leica Microsystems Ltd., Nussloch, Germany)으로 절단하였다. 절단 섹션은 래트 아틀라스의 Paxinos 및 Watson (해마; 브레그마 -2.6 및 3.6)을 따라 얻었다. 섹션은 아비딘-비오틴-퍼옥시데이즈 복합체(ABC) 방법을 사용하여 ChAT 발현을 위해 면역염색시켰다. 섹션은 각각 PBS에서 5분동안 3번 행구었고, 그리고 나서 PBST (PBS plus 0.3% Triton X-100) 중의 1차 토끼 항-ChAT 항체(1:2,000 희석; Cambridge Research Biochemicals Co., Bellingham, UK)로 4℃에서 72시간동안 배양하였다. 섹션은 PBS 중에서 5분동안 세척하였고, 그리고 120분동안 상온에서 비오디닐레이티드 항-토끼 염소 IgG (항-ChAT 항체를 위해서)와 함께 배양하였다. 이차 항체는 Vector Laboratories Co. (Burlingame, CA, USA)에서 구입하였고, 1:200배로 2% 염소혈청을 함유하는 PBST와 함께 희석하였다. 면역 반응을 가시화하기 위해서, 섹션은 ABC 시약(Vectastain Elite ABC 키트; Vector Laboratories Co.)로 90분동안 배양하였고, PBS에서 5분동안 3번 세척하였다. 그리고 3,3'-디아미조벤지딘 (DAB; Sigma-Aldrich) 및 0.01% 과산화수소를 포함하는 용액으로 1분동안 배양하였다. 마지막으로, 조직들은 PBS로 세척하고, 이어서 증류수로 간단히 행군 후, 각각 슬라이드에 올렸다. 슬라이드는 자연 건조시켰고, 그리고 나서 커버를 덮었다. 이미지는 AxioVision 3.0 이미징 시스템(Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germany)으로 캡처하였고 Adobe photoshop (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA)으로 작업하였다. 섹션들은 $\times 200$ 배 확대하였고 실험군에 맹검인 관찰자들에 의해 $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ 그리드 안의 세포 수를 세었다. 해마 영역 세포들은 Paxinos 및 Watsondml 통계학적 아틀라스에 따라 얻었다. 세포들은 해마 영역 안에서 래트당 3 섹션으로 세었다.

[0074] 1-9. 통계학적 분석

[0075] 모든 분석은 실험군에 맹검인 독립적인 실험자들에 의해서 수행되었다. 수치상 결과는 평균 $\pm$ 표준오차(SE)로 표현하였다. 정규분포 데이터 사이의 차이는 SPSS (version 13.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)를 이용한 ANOVA와 Tukey's post hoc test에 의해서 분석하였고, 통계학적 의미는 $p < 0.05$ 로 하였다. 워터 메이즈 데이터(water maze data)의 통계학적 분석에 대해서는, 수중 탈출 과제 인지에서의 교육 효과는 반복 측정된 세션의 인자(수일)로 단일 경로 ANOVA를 사용하여 평가하였고, 이어서 적절한 Tukey's post hoc 분석을 실시하였다. water maze에서 프로브 시도에 대해서는 각 사분면에서 소요한 그룹 간의 시간상 차이 내에서, 및 면역 조직화

학 데이터 및 신경돌기 발생 데이터는 또한 단일 경로 ANOVA로 분석하였고, 이어서 Tukey's post hoc 시험으로 분석하였다.

[0076] 2. 실험 결과

[0077] 2-1. Neuro 2A 세포의 신경돌기 발생에 대한 붉은 동충하초 추출물의 효과

[0078] Neuro 2A 세포에서 신경돌기의 형성, 연장 및 분지에 대한 붉은 동충하초 추출물의 자극 효과를 도 1 및 2에 나타내었다. 양성 대조군으로 사용한 레티논산, 즉 비타민 A의 대사체는 부분 기억의 유지 및 발달에 있어서 신경 세포의 성장, 분화 및 생존에 중요한 역할을 하기 때문에 양성 대조군으로 사용하였다.

[0079] 구체적으로 신경돌기 발아 및 분지를 정량하기 위해서 붉은 동충하초 추출물 처리 24시간 후에 각 신경 세포의 신경돌기 발생의 총 갯수 및 일차(세포 몸체로 직접적으로 형성된) 및 이차 신경돌기(1차 신경돌기로부터 형성된, 즉 분지된)를 세었다(도 1의 A). 신경돌기 연장에 대해서는, 각 신경 세포 당 신경돌기의 총 길이를 측정하였고, 신경돌기의 평균 길이는 신경돌기 총 수로 나눈 값으로 계산하였다.

[0080] 그 결과, 도 1에 나타나듯이 10 μ g/mL의 붉은 동충하초 추출물($p < 0.01$) 및 20 μ g/mL의 붉은 동충하초 추출물($p < 0.01$)로 처리한 세포에서, 총 신경돌기의 숫자가 대조군과 비교하여 현저하게 농도 의존적으로 증가하였다(도 1의 B). 또한, 일차 신경돌기의 숫자도 붉은 동충하초 추출물 처리 농도의존적으로 증가하였다(도 1의 C). 총 신경돌기 및 일차 신경돌기의 발아에 관해서는, 붉은 동충하초 추출물의 효과는 양성 대조군인 레티논산에 비하여 현저하게 우수한 것을 확인하였다.

[0081] 일단 일차 신경돌기가 세포 몸체로부터 발아하면, 신경돌기들은 계속해서 연장을 하거나 새로운 분지를 형성하기 위해서 연장을 중지하였다. 신경돌기 분지인 이차 신경돌기들은 일차 또는 이차 신경돌기로부터 형성되었다. 각 세포 당 분지(이차 신경돌기)의 숫자는 음성 대조군에 비하여 현저하게 높았다(도 1의 D).

[0082] 또한, 붉은 동충하초 추출물은 형성된 신경돌기들이 직선 방향으로 연장 즉, 성장하는 것을 효과적으로 촉진시켰다(5 μ g/mL, $p < 0.01$; 10 μ g/mL, $p < 0.001$; 20 μ g/mL, $p < 0.01$)(도 1의 E 및 F).

[0083] 또한, 도 2에 나타나듯이, 미처리한 대조군 및 양성 대조군인 레티논산 처리군에 비하여 현저하게 많이 발생 및 성장한 신경돌기들을 관찰할 수 있었다.

[0084] 이는, 본 발명에 따른 붉은 동충하초 추출물이 신경돌기의 발생과 연장 및 분지를 효과적으로 촉진하여, 시냅스 연결을 도움으로써, 기억력 개선 및 시냅스 성형성을 촉진시키기 위한 유용한 소재로 사용될 수 있음을 의미한다.

[0085] 2-2. Neuro2A 세포에서 ChAT 발현에 대한 붉은 동충하초 추출물의 효과

[0086] Neuro2A 세포에서 콜린성 신경의 분자적 마커인 ChAT의 발현에 대한 붉은 동충하초 추출물의 효과는 면역세포화학을 사용하여 확인하였다(도 3). 붉은 동충하초 추출물을 처리하고 24시간 후에는 농도의존적으로 현저하게 형광의 강도가 증가하였다. 이로써, 붉은 동충하초 추출물이 ChAT의 발현, 즉 뇌에서 콜린성 시냅스에 대한 아세틸콜린의 현저한 증가와 밀접하게 연관된 콜린아세틸트랜스퍼라제의 발현을 촉진하는 것을 확인하였다.

[0087] 2-3. 수동 회피 시험에 대한 붉은 동충하초 추출물의 효과

[0088] 인지 실험 후, 어두운 방을 통과하는데 소요된 대기 시간을 의미하는 체류 시간에 대한 붉은 동충하초 추출물의 효과는 전기적 충격을 적용하고 24시간 후에 측정하였고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0089] 그 결과, 도 4에 나타나듯이 인지 시간은 스코폴라민의 투여에 따른 신경 손상으로 증가하였으나, 붉은 동충하초 추출물의 투여로 다시 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 체류 시간은 붉은 동충하초 추출물의 처리로 스코폴

라민 단독 처리군에 비하여 어두운 방을 통과하는 체류 시간(retention time)이 현저하게 증가하였다.

[0090] 이로써, 스코폴라민 주사에 의해 장기 기억이 심각하게 손상되었지만, 붉은 동충하초 추출물의 처리로 기억 손상을 효과적으로 회복시켰다. 이는, 콜린성 신경 시스템에 연관되어 있는 스코폴라민-유도 기억 손상에 대하여 붉은 동충하초 추출물이 항-건망증(anti-amnesic) 효과가 있음을 의미하는 것이다.

[0091] 2-4. 워터-메이즈 시험에 대한 붉은 동충하초 추출물의 효과

[0092] 붉은 동충하초 추출물 처리에 따른 효과를 확인하기 위하여 수몰된 플랫폼에 도달하기 위한 수영시간을 평가하여 도 5에 나타내었다. 평가는 플랫폼의 위치를 찾는 데 걸리는 시간, 프로브 시도 및 수영 속도로 측정하였다.

[0093] 그 결과, 도 5에 나타나듯이 대조군은 숨겨진 플랫폼의 위치를 빠르게 습득하고 이 시도 5일째 30초 안에 도달하였다. 붉은 동충하초 추출물을 처리한 래트들은 훈련기간에 도달시간의 감소를 보였으나, 스코폴라민 단독 처리군은 도달시간에서 현저한 지연을 보였다(도 5의 A).

[0094] 또한, 래트의 공간 기억을 시험하기 위하여, 6일째 탐침 시험에서 플랫폼의 예상되는 위치로 수영하는데 소요되는 시간을 분석한 결과, 붉은 동충하초 추출물 처리시 대조군과 유사한 정도로 탈출 대기시간을 현저하게 감소시키고, 인지 기능을 강화하며 동시에 스코폴라민으로 손상된 기억 결함을 개선하는 것을 확인하였다.

[0095] 또한, 수영 속도에 있어서도, 스코폴라민으로 감소한 수영 속도를 붉은 동충하초 추출물의 처리로 대조군과 유사한 정도로 회복시켰다.

[0096] 이로써, 붉은 동충하초 추출물이 장기 공간 기억력을 효과적으로 개선하는 것을 확인하였다.

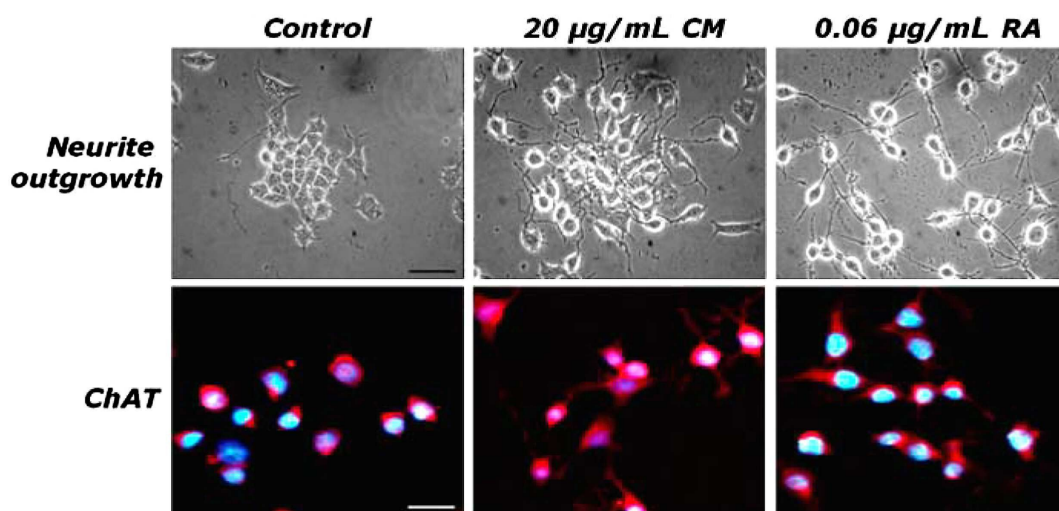
[0097] 2-5. 중추 콜린성 시스템 ChAT 면역조직화학에 대한 붉은 동충하초 추출물의 효과

[0098] 스코폴라민-유도 기억 손상으로 인한 신경 세포 손상에 대한 붉은 동충하초 추출물의 효과를 시험하기 위하여 래트들로부터 뇌조직(해마) 샘플을 분리하여 면역 조직화학시험을 수행하였고 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

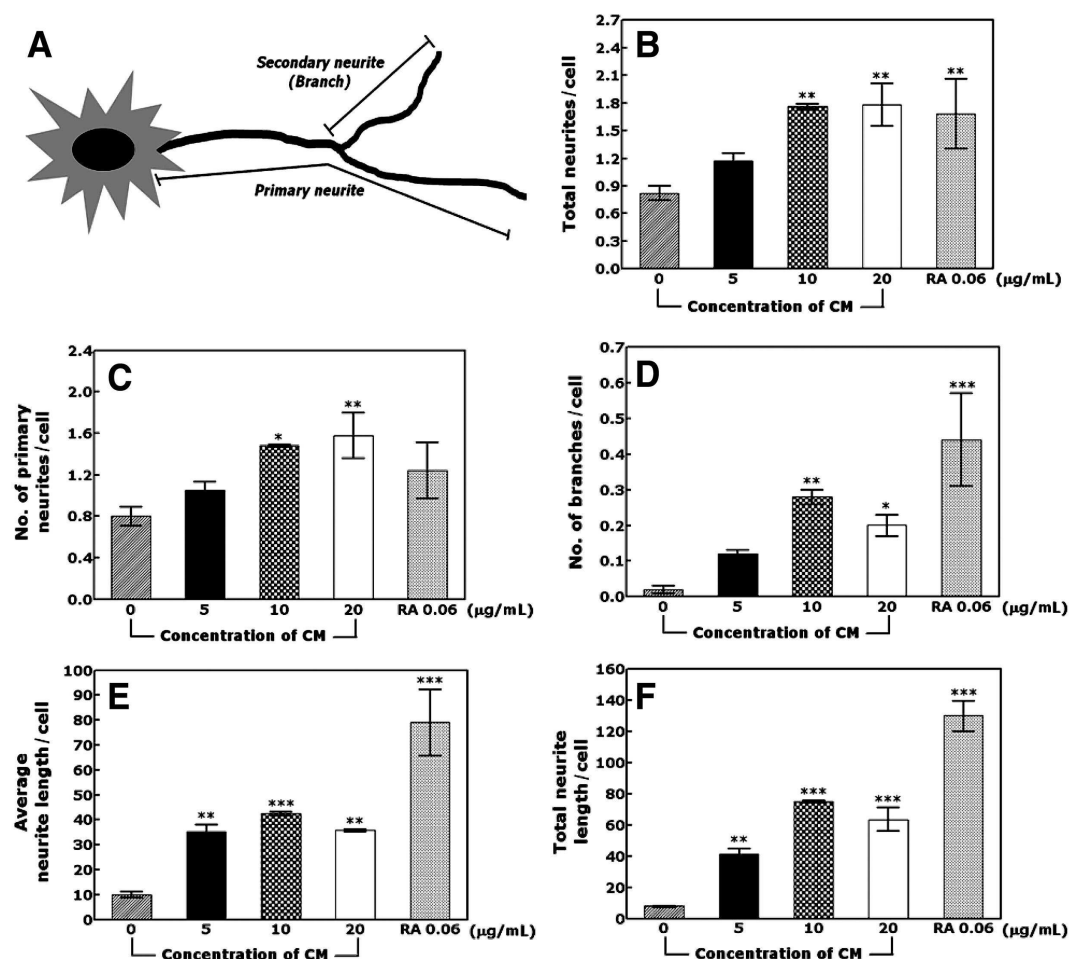
[0099] 그 결과, 도 6에 나타나듯이, 스코폴라민 투여군은 해마의 CA1 및 CA3 영역에서 심각한 신경 세포 손상을 나타내었다. 해마의 CA1에서 ChAT 면역반응성 신경세포의 숫자는 붉은 동충하초 추출물+스코폴라민 투여군에서 현저하게 증가하였다. 또한, 도 7에 나타나듯이, 스코폴라민-유도 기억 손상 래트의 해마 CA1 및 CA3영역에서 붉은 동충하초 추출물은 처리 농도의존적으로 ChAT-면역 반응성을 회복시켰으며, ChAT-면역양성 신경세포의 숫자는 거의 대조군과 유사하였다. 이로써, 붉은 동충하초 추출물이 중추 콜린성 신경의 기능을 효과적으로 증가시켜 감소된 아세틸콜린의 수준을 회복시킬 수 있음을 알 수 있다.

도면

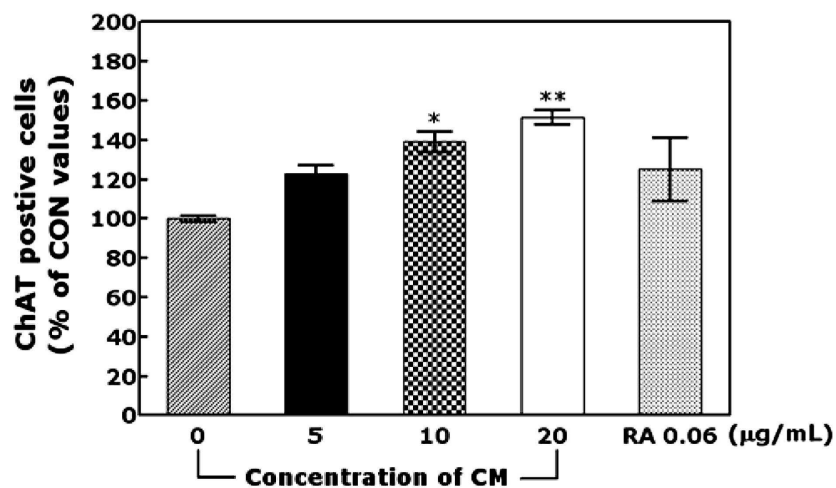
도면1



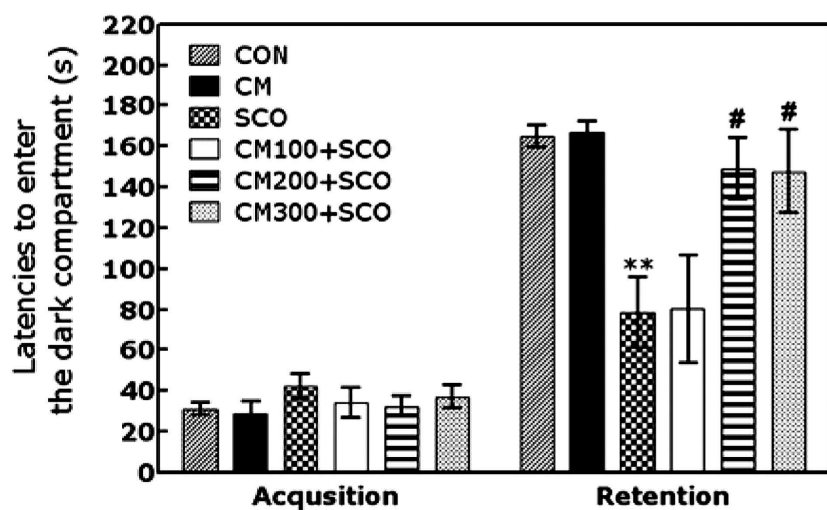
도면2



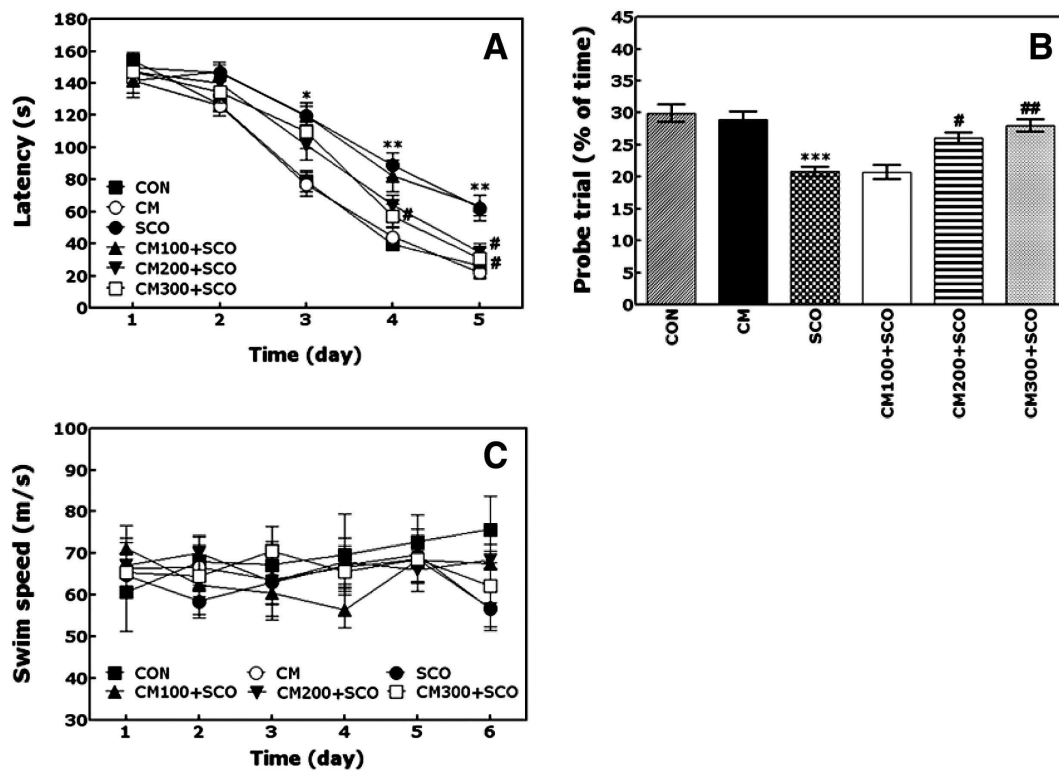
도면3



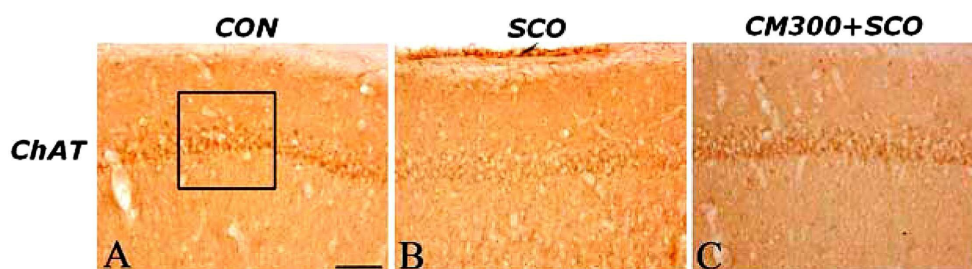
도면4



도면5



도면6



도면7

