



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0100349
(43) 공개일자 2014년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/737 (2006.01) *A61P 25/24* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0013549
(22) 출원일자 2013년02월06일
심사청구일자 2013년02월06일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
함대현
서울 동대문구 장안벚꽃로 167, 217동 802호 (장안동, 래미안장안2차아파트)
이혜정
경기 용인시 수지구 신봉2로 26, 109동 502호 (신봉동, LG신봉자이1차아파트)
이봄비
서울 동대문구 경희대로1나길 50, 102호 (회기동, 플러스빌)
(74) 대리인
손민

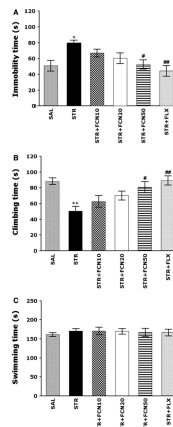
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **후코이단을 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 후코이단을 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 우울증 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명의 후코이단은 약학 조성물 또는 건강기능식품에 유효성분으로 포함되어, 우울증의 치료제 또는 개선제 등의 개발에 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2005-0049404

부처명 교육과학기술부

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 트립토판 대사 변형으로 유도한 우울증 동물 모델에서 침치료 효능 및 작용기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

후코이단을 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 후코이단은 20 내지 50 mg/kg 로 개체에 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 4

후코이단을 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 후코이단을 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 후코이단을 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약학 조성물, 및 우울증 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 우울증은 평생 유병률이 상대적으로 높고 관련된 장애가 상당하기 때문에 인간의 전 세계적인 문제이며, 종종 수면 장애, 낮은 자존감, 죄책감의 감정, 그리고 자살 충동에 사로잡히는 경향과 결부된다. 따라서 이 질병은 복잡한 장애로 간주되고, 그것의 근본적인 발병과정 메커니즘은 불분명하게 남아 있다. 또한, 우울증은 마음의 감기라고 불릴 만큼 우리 곁에 가까이 있는 질병이지만, 우울증에 걸리게 되면 일상생활이 어려워져 사회, 경제적으로 막대한 손실을 가져오는 질병이다. 게다가 급증하는 사망원인의 한가지인 자살의 60-70%가 우울증이 원인인 만큼 죽음에 이르게 하는 병이기도 하다.

[0003] 스트레스가 많은 생활사건에 대한 만성 노출은 주요 우울증과 같이 인간의 여러 심리적 또는 무력 조건의 유지 및 발달에 중요한 위험 요소로 작용하고, 뇌 기능에 오래 지속되는 해로운 효과를 유발한다. 이 질환에서 가장 중요한 생리학적, 신경내분비학적, 행동이상은 시상하부 뇌하수체 부신축(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)의 과잉활성화(hyperactivation)이다. 급성 스트레스에 대한 활성화 반응은 항상성을 유지하고 위협의 영향을 최소화하기 위해 생물체의 고유 기능을 강화하는 체계 변경(systemic alterations)으로 이어진다. 그러나 과도한 스트레스는 뇌 기능과 뒤이어 오는 스트레스원에 대해 적절하게 생리학적 및 행동 반응을 조절하는 능력에 손상을 주어 생리학 측면에서 비정상적인 변화를 유도한다. 만성 스트레스를 가한 여러 동물 연구에서는 시상하부(hypothalamus), 해마(hippocampus), 편도체(amygdala)의 형태학적 변화, 다양한 신경전달물질의 변화, 해마와 혈청의 BDNF(뇌유래 신경영양인자, brain-derived neurotrophic factor) 발현량 변화, 체중 감소, 행동 변화 등을 포함한 시상하부 뇌하수체 부신축(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)의 장애를 유발하였다.

[0004] 이전의 연구에서 우울증과 관련하여 반복된 감금 스트레스에 대한 결과가 보고되어 왔다. 반복된 감금 스트레스 자극에 대한 반응으로 우울증과 같은 증상을 가진 동물 모델은 약물 스크리닝에 하는데 있어서 후보 항우울제 효능을 결정하는 데 유용하게 이용된다. 이에 따라, 다양한 항우울제 개발에 있어서 이의 효능을 확인하는 데에

전임상 실험으로 사용되어 왔다.

[0005] 한편, 현재 개발되고 있는 항우울제로는 기초 및 임상 연구를 통해 모노아민산화효소 억제제 (monoamine oxidase inhibitors, MAOs), 선택적 세로토닌 재흡수 저해제 (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRIs), 삼환계 항우울제 (tricyclic antidepressants, TCAs)와 같은 여러 항우울제 종류가 개발되고 임상적으로 사용되고 있다. 또한, 상용되는 대표적인 우울증 치료제로는 벤조디아제핀(benzodiazepine), 디아제팜(diazepam), 옥사제팜(oxazepam), 로라제팜(lorazepam), 알프라졸람(alprazolam), 헬라제팜(helazepam), 클로나제팜(clonazepam) 등이 있다. 그러나 대부분의 항우울제는 매우 다양하고 복잡한 우울증 증상에 대해 효과적이지 않으며, 대부분은 심각한 부작용을 유발한다. 그러므로 우울증의 병인의 새로운 이해를 바탕으로 자연 제품 또는 약용 식물을 이용한 새로운 치료 전략이 간절히 필요하다.

[0006] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 우울증의 치료법을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 우울증을 유발한 동물 모델에 후코이단을 처리하는 경우 그러한 우울증 증상이 감소함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 후코이단을 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 후코이단을 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 후코이단을 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명에서 사용되는 용어 "후코이단(fucoidan, FCN)"은, 끈적끈적한 점질 구조의 황산염화한 다당류로서, 일반적으로 고미역, 다시마 등의 갈조류에 함유된 성분이며, 분자량은 평균 20KDa으로 후코스(Fucose)라는 기본당과 황산기가 결합되어 있는 물질이다. 상기 후코이단은 구체적으로 슈가켄프 (*Laminaria saccharina*), L.디지타타 (*L. digitata*), 태평양 모자반 (*Fucus distichus*), 오키나와 모즈쿠 (*Cladosiphon okamuranus*)와 같은 해양 갈조류에서 얻어질 수 있다.

[0011] 상기 후코이단은 항산화제, 항응고제, 항암제, 항생제, 항염증 활성, 및 의학적 사용을 위한 잠재적 가치 제안 등 다양한 생리학적 및 생물학적 활성을 가지는 것으로 보고되어 왔다. 특히, 최근 몇 년간 항염증 및 항산화 활성이 많은 관심을 모으고 있다. 그러나, 아직까지 후코이단이 우울증을 개선할 수 있는지 여부가 보고된 바 없는바, 본 발명에서는 상기 후코이단이 우울증의 예방, 치료 또는 개선 등에 효과가 있음을 밝혔다.

[0012] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 랫트에 대하여 2주 동안 감금 스트레스를 가하여 우울증 증상을 갖는 우울증 동물 모델을 제조하였으며, 이를 이용하여 체중 변화 측정, 혈청 코르티코스테론(CORT) 측정, 강제 수영 부하 실험과 같은 행동 실험, 부신피질 자극 호르몬 방출인자(CRF) 및 티로신수산화효소(TH)의 면역반응성 검사, 및 해마에서의 BDNF mRNA의 발현 측정과 같은 실험을 통하여 우울증에 따른 다양한 인자에 대한 확인을 하였다.

[0013] 그 결과, 후코이단을 투여한 그룹에서는 모든 실시예 걸쳐서 감금 스트레스에 의한 우울증 동물 모델 그룹에서 악화되는 증상을 완화시키는 것을 확인하였다. 구체적으로, 후코이단의 투여는 우울증에 의한 체중 감소를 완화시키고, 혈청 CORT 함량 증가가 저해되었으며, 강제 수영 부하 실험에서는 우울증에 의해 증가된 부동 시간이 감소하고, 감소된 등반 행동 시간이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 우울증에 의해 증가된 부신피질 자극 호르몬 방출인자(CRF) 및 티로신수산화효소(TH)의 발현이 회복되어 감소하며, 해마에서의 BDNF mRNA 역시 우울증에 의해 감소하나 후코이단의 투여 그룹에서는 증가되는 결과를 확인할 수 있었다.

- [0014] 이러한 일련의 결과를 통하여, 감금 스트레스에 의해 유도된 우울증에 대하여, 후코이단이 항우울 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0015] 또한, 상기 실험 전반에 걸쳐서 양성 대조군으로써 기존에 항우울제로 시판되고 있는 세로토닌 재흡수억제제인 플록세틴(fluxetine, FLX)을 사용하였으며, 후코이단을 50mg/kg 투여한 STR + FCN50 그룹의 결과가 STR + FLX 그룹과 전체적으로 유사함을 확인함으로써, 본 발명의 후코이단이 기존의 항우울제와 비교하여 전혀 뒤지지 않는 효과를 가짐을 알 수 있었다.
- [0016] 본 발명에서 사용되는 용어 "우울증"은, 의욕 저하와 우울감을 주요 증상으로 하여 다양한 인지 및 정신 신체적 증상을 일으켜 일상 기능의 저하를 가져오는 질환을 의미하는 것으로서, 아직까지 분명한 원인에 대해서 명확하지 않으나 다양한 생화학적, 유전적 및 환경적 요인에 의해 야기되는 질환이다.
- [0017] 기존의 화학적 방법에 의해 제조된 항우울제의 경우 그 효과에 비하여 부작용이 심각한 상황이므로, 본 발명에서는 천연 원료로부터 얻을 수 있는 후코이단을 이용하여 항우울 효과를 확인하였다. 본 발명의 후코이단은 항우울 효과, 즉 우울증의 예방, 개선 또는 치료 효과를 가진다.
- [0018] 본 발명에서, "예방"은 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 우울증을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 상기 약학 조성물의 투여에 의해 우울증의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0019] 본 발명의 후코이단을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체로, 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우 정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 한약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화 할 수 있다. 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시 벤조에이트, 프로필 하이드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명의 조성물은 경구, 정맥 내, 피하, 피 내, 비강 내, 복강 내, 근육 내, 경피 등 다양한 방식을 이용하여 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 바람직하게 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 또한 조성물의 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 연령 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성 성분인 약물의 종류에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있으므로, 상기 투여량에 의해 본 발명이 범위가 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 약학 조성물은 그 투여용량에 특별한 제약은 없고, 체내 흡수도, 체중, 환자의 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다. 일반적으로, 일일 투여량은 바람직하게는 후코이단의 양을 기준으로 10 내지 100 mg/kg일 수 있으며, 보다 바람직하게는 20 내지 70 mg/kg일 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 20 내지 50 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 유효량 범위를 고려하여 제조하도록 하며, 이렇게 제형화된 단위 투여형 제제는 필요에 따라 약제의 투여를 감시하거나 관찰하는 전문가의 판단과 개인의 요구에 따라 전문화된 투약법을 사용하거나 일정 시간 간격으로 수회 투여할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 후코이단을 각각 10, 20, 50 mg/kg 투여한 실험 그룹을 이용하였으며, 농도의 의존적으로 효과가 증진됨을 확인하였고, 50 mg/kg 투여 그룹에서 가장 좋은 효과를 보임을 확인하였다.
- [0023] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 후코이단을 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 후코이단에 대해서는 전술한 바와 같으며, 우울증 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에

첨가할 수 있다.

- [0024] 본 발명의 조성물을 건강기능식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 또는 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 바람직하게는 15 중량부 이하, 보다 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 조절 및 위생을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안정성 면에서 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 조성물을 첨가할 수 있는 건강기능식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 농식품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있고, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함할 수 있으며, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품을 포함할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물이 음료의 형태로 사용될 경우에는 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제, 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스 및 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨과 같은 당알콜일 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 이에 제한되지는 않으나, 본 발명의 조성물 100 ml 당 바람직하게는 약 0.01 내지 0.04g, 보다 바람직하게는 0.02 내지 0.03g일 수 있다. 상기 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제 및 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제일 수 있다.
- [0027] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명의 후코이단은 약학 조성물 또는 건강기능식품에 유효성분으로 포함되어, 우울증의 치료제 또는 개선제 등의 개발에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1 및 도 2는 감금 스트레스에 의한 우울증 행동을 관찰하기 위한 실험 일정을 나타낸다. 도 1은 체중 변화 측정 및 CORT 측정 일정을 나타내고, 도 2는 강제 수영 부하 실험, 면역조직화학검사 및 RT-PCR 일정을 나타낸다.
- 도 3은 감금 스트레스를 가한 2주간의 각 그룹별 체중 변화를 나타낸다.
- 도 4는 감금 스트레스 이후에 각 그룹별 혈청의 코르티코스테론 (CORT) 함량 측정 결과를 나타낸다.
- 도 5는 강제 수영 부하 검사에서 각 그룹별 부동 시간(A), 등반 행동 시간(B), 및 수영 시간(C)의 측정 결과를 나타낸다.
- 도 6은 감금 스트레스 이후에 각 그룹별 시상하부의 실방핵(PVN)에서 CRF 발현을 면역조직화학검사를 통해 측정 한 결과를 나타낸다. A: SAL 그룹, B: STR 그룹, C: STR + FCN50 그룹, D: STR + FLX 그룹.
- 도 7은 감금 스트레스 이후에 각 그룹별 청반(LC, 도 7의 A 내지 D) 및 편도체의 기저외측핵(BLA, 도 7의 E 내지 H)에서 TH 발현을 면역조직화학검사를 통해 측정 한 결과를 나타낸다. A, E: SAL 그룹, B, F: STR 그룹, C, G: STR + FCN50 그룹, D, H: STR + FLX 그룹.
- 도 8은 감금 스트레스 이후에 각 그룹별 해마에서의 BDNF mRNA 발현을 측정 한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0031] **실시예 1: 재료 준비**

[0032] 양성대조군인 플록세틴(fluoxetine, FLX)과 실험군인 후코이단(fucoidan, FCN)은 시그마 케미컬 (Sigma Chemical Co. (St. Louise, MO, USA))로부터 구입하였다.

[0033] 실험동물로서, 260 내지 280g의 수컷 성인 SD(Sprague-Dawley)계 랫트를 사용하였다. 성숙한 SD계 랫트(260-280g)를 실험 전에 적어도 1주 동안 온도 조절실 (22 ± 2 °C)에 수용하고, 음식과 물을 자유롭게 섭취하게 했으며, 12h 주야 사이클을 유지시켰다.

[0034] **실시예 2: 실험 그룹**

[0035] **2-1. 코르티코스테론(corticosterone, CORT) 측정**

[0036] 실험 동물 랫트에 2주 동안 감금 스트레스(restraint stress)를 가한 후 실험을 실시하였고, 실험 동물 랫트는 무작위로 각 그룹별 7마리씩 6개 그룹으로 하기 표 1과 같이 나누어 테스트하였다. 그 중에서, 코르티코스테론(corticosterone, CORT) 농도 측정 실험에 대해서는 각 그룹별 4마리씩만을 대상으로 랫트의 혈액을 따로 얻어 실험하였다.

표 1

감금 스트레스 (restraint stress) 유발 유무	그룹	약물 처리	개체수
- (unstressed)	SAL 그룹 (음성대조군)	Saline (0.9% NaCl)	4
+ (restraint-stressed)	FLX 그룹 (양성대조군)	10mg/kg 플록세틴 (fluoxetine, FLX)	4
	STR 그룹	Saline (0.9% NaCl)	4
	STR + FCN 10 그룹	10mg/kg 후코이단 (fucoidan, FCN)	4
	STR + FCN 20 그룹	20mg/kg 후코이단 (fucoidan, FCN)	4
	STR + FCN 50 그룹	50mg/kg 후코이단 (fucoidan, FCN)	4

[0037]

[0038] 양성대조군인 플록세틴 (fluoxetine, FLX)과 실험군인 후코이단(fucoidan, FCN)은 사용 전에 0.9% 생리식염수 용액에 용해하고, 2주 동안 매일 감금 스트레스를 가하기 30분 전, 복강 주사하여 처리하였다. 모든 약물은 매 실험 전, 즉각 준비하여 신선하게 사용하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, 감금 스트레스 진행은 설치류 부동 백에서 2주동안 오전 10시부터 12시 사이에 2시간 동안 매일 한번씩 수행하였다.

[0039] 구체적으로, 랫트는 한 쪽은 열려지고 다른 한 쪽은 호흡을 위해 끝이 여러 개의 3-mm 구멍을 가진 원뿔 모양의 투명한 플라스틱 튜브 (20 × 7 cm)에 넣어서 감금 스트레스를 가하였다. 실험동물은 튜브 내에서 충분한 공기는 가지지만, 부동 상태이다. 체중 변화 (구속 스트레스의 시작 단계부터 측정)와 혈청(serum) CORT 함량 (반복된 구속 스트레스 후 측정)과 같은 파라미터는 스트레스의 영향을 모니터링하기 위해 측정하였다. SAL 그룹 (음성대조군, unstressed 그룹)을 제외한 모든 랫트 그룹은 동일한 감금 스트레스를 가하였다.

[0040] **2-2. 행동학 및 신경생물학적 평가**

[0041] 반복된 감금 스트레스로 유도된 우울증 유사 증상을 가진 실험 동물 모델에서 우울증 치료를 위해, 후코이단(FCN)을 투여하여 행동학 및 신경생물학적 방법론을 사용하여 효력을 평가하였다. 랫트는 위 표 1에 개시한 바와 같이, 무작위로 각 그룹별 7마리씩 6개 그룹으로 나누어 테스트하였다. 운동기능 평가는 스트레스 프로토콜 마지막 단계 24h 후 실시하였다. 감금 스트레스 및 행동학적 실험의 일정은 도 2에 나타난 바와 같다.

[0042] **실시예 3: 체중 변화 측정**

[0043] 반복된 감금 스트레스가 체중 감소를 유발하는지를 확인하기 위하여, 감금 스트레스 2주 동안에 매일 랫트의 체중 변화를 측정하였다.

[0044] 반복된 감금 스트레스에 노출된 랫트는 감금 첫 날에 체중이 감소하기 시작했고, 이 초기 체중 감소는 회복 없이 그 기간 동안 지속되었으며, 심지어 악화되기까지 하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 아무 스트레스도 받지 않은 음성 대조군 (SAL 그룹)과 비교하였을 때, 감금 스트레스를 받은 STR 그룹은 2주 동안 점진적인 체중 감소를 보였다. 반면, 이 기간 동안 후코이단 (FCN)을 투여한 랫트 그룹은 감금 스트레스에 의한 체중 감소가 저해되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 50 mg/kg 후코이단을 투여한 랫트 그룹은 STR 그룹과 비교하였을 때 거의 차이가 없는 체중 변화를 보임을 확인할 수 있었다.

[0045] 이러한 결과는 감금 스트레스에 의해 체중 감소 효과가 나타나지만, 후코이단을 투여하는 경우 이러한 체중 감소 효과가 없어지며, 정상적인 체중 변화로 회복된다는 것을 의미한다.

[0046] **실시예 4: 코르티코스테론의 측정**

[0047] 감금 스트레스를 랫트에 반복적으로 가하였을 때, 부신의 둔감화 (adrenal habituation) 때문에 점진적으로 감소되는 혈청 CORT 함량은 급성 감금 스트레스에 의해 크게 증가된다. 혈청 CORT 함량은 2주 동안 반복된 감금 스트레스에 노출시킨 후 각 그룹별로 측정하였다.

[0048] 실험동물은 스트레스 유도 진행 후 단두술(decapitation)에 의해 희생시키고, 혈청 코르티코스테론 (corticosterone, CORT) 함량 측정을 위해 혈액 샘플을 채취하였다. 이를 위해, 마취시키지 않은 랫트는 신속하게 목을 자르고, 혈액은 배대동맥을 통해 빠르게 채취하였다. 혈액은 4000g에서 10분간 원심분리하고, 이렇게 얻어진 혈청은 사용 전까지 -20℃에 보관하였다. CORT 농도는 제조사의 프로토콜에 따라 토끼 다클론 CORT 항체 (rabbit polyclonal CORT antibody, OCTEIA Corticosterone kit; Alpco Diagnostics Co., Windham, NH, USA)를 사용하여 경쟁 효소면역측정법 (competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA))으로 측정하였다. 샘플 (또는 표준 물질)과 컨주게이트 (conjugate, 결합체)를 각 웰(well)에 더하고, 플레이트(plate)는 블로킹 (blocking) 없이 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 그 후, 웰은 버퍼로 여러 번 씻어내고 적절한 색깔로 발색시켜서 효소면역측정법 리더 (ELISA reader (MutiRead 400; Authos Co., Vienna, Austria))를 사용하여 450 nm에서 흡광도 (OD; optical density)를 측정하였다.

[0049] 그 결과, 아무 스트레스도 받지 않은 음성 대조군 (SAL 그룹)과 비교하였을 때, 반복된 감금 스트레스를 받은 랫트 그룹의 혈청 CORT 농도는 462.45% ($P < 0.05$)로 현저하게 증가하였다. 반면, 후코이단 (FCN)을 매일 투여하였을 경우, 반복된 감금 스트레스로 유도된 혈청 CORT 함량 증가가 다소 저해된 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[0050] **실시예 5: 강제 수영 부하 실험 (Forced swimming test)**

[0051] 우울증을 위한 대표적 행동학적 테스트인 FST (강제 수영 부하 실험, forced swimming test)는 설치류 동물 모델에서 잠재력 있는 항우울제 활성 평가를 위해 흔히 사용되어 왔다. 우울증이 유발된 랫트를 연장된 시간 동안 물속에 강제 침수시키면 부동 행동 특징을 보인다. 이 때, 항우울제를 투여하게 되면, 등반(climbing)과 수영 (swimming)과 같은 도피 반응 (escape response)을 증가시킴에 의해 부동 행동을 감소시킨다.

[0052] 상기 반복된 감금 스트레스에 의해 우울증이 유발되는지와 후코이단이 그러한 우울증 증상을 감소시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 상기 실험군들을 이용하여 강제 수영 부하 실험을 수행하였다.

[0053] 투명한 플렉시글라스 실린더 (Plexiglas cylinder, 20 cm 직경 × 50 cm 높이)는 25 °C 물로 30 cm 깊이로 채웠다. 이 깊이에서, 랫트는 꼬리나 뒷다리가 실린더의 바닥에 닿지 않는다. 15일째 되는 날, 모든 그룹의 랫트는 물로 채워진 실린더에 넣어 15분 동안 훈련시켰다. 16일째, 실험동물은 5분 동안 강제 수영시켰고, 도피 행동 (등반과 수영)을 모니터하였다. 또한, 5분의 테스트 시간 동안 부동 시간을 기록하였다. 등반은 수영 챔버 가장자리를 따라 위쪽 방향을 향한 앞발의 움직임으로 정의하고, 수영은 수영 챔버의 사분면을 가로지르는 것을 포함하여 전반적 움직임으로 판단하였다. 부동 행동은 실험동물이 도피 행동을 보이지 않는 시간 길이 (전체 테스트 시간에서 등반과 수영 행동을 하는데 소비되는 시간을 뺀 시간; 전체 테스트 시간 - 등반과 수영 행동으로

소비한 시간)로 산출하였다. 실험 동물의 행동은 계속적으로 오버헤드 비디오 카메라 (overhead video camer)를 사용하여 전체 테스트 시간 동안 기록하였다. 테스트 후, 랫트는 탱크로부터 꺼내어 타월로 건조 후, 처음 우리로 되돌려 보냈다. 수영 탱크의 물은 랫트 간에 교체하였다.

[0054] 그 결과, 2주동안 반복된 감금 스트레스를 가한 랫트는 생리식염수 용액을 투여한 음성 대조군 (SAL)과 비교하였을 때 현저한 우울증 증상을 보였으며, 강제 수영 부하 실험동안 부동시간이 증가하고, 등반 행동 시간이 감소하는 특징을 보였다. 반면, 후코이단을 함께 투여한 군에서는 농도 의존적으로 상기와 같은 우울증 증상이 완화되는 것, 즉 부동시간이 감소하고 등반 행동 시간이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 STR + FCN50 그룹에서는 음성 대조군 및 플록세틴을 투여한 STR + FLX 그룹(양성 대조군)과 거의 유사한 수준까지 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

[0055] 구체적으로, 도 5의 A (부동 시간)에 나타난 바와 같이, 강제 수영 부하 실험 동안 STR 그룹의 랫트는 음성 대조군인 SAL 그룹보다 부동 시간이 증가하였고, 이러한 효과는 후코이단 투여군에서 회복되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 후코이단 투여에 의해 우울증 증상이 감소함을 나타낸다.

[0056] 또한, 도 5의 B (등반 행동 시간)에 나타난 바와 같이, 우울증 평가를 위한 대표적인 도피반응 행동인 등반 행동에 관해서는, STR 그룹의 랫트는 음성 대조군인 SAL 그룹보다 감소하였고, 이러한 효과는 후코이단 투여군에서 회복되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 후코이단 투여에 의해 우울증에 따른 자포자기 증상이 감소함을 나타낸다.

[0057] 한편, 도 5의 C (수영 시간)에 나타난 바와 같이, 모든 그룹 간에 수영과 같은 도피 반응에 있어서는 별다른 차이를 보이지 않았다.

[0058] **실시예 6: 부신피질 자극 호르몬 방출인자 (corticotrophin-releasing factor, CRF) 및 티로신수산화효소 (tyrosine hydroxylase, TH)의 면역조직화학 (immunohistochemistry, IHC) 조직 검사**

[0059] 상기 행동실험에 이어서, 우울증 및 신경전달과 관련된 부신피질 자극 호르몬 방출인자 (corticotrophin-releasing factor, CRF) 및 티로신수산화효소 (tyrosine hydroxylase, TH) 면역반응성을 확인하였다. 상기 CRF는 시상하부 뇌하수체 부신축(HPA)의 과잉활성화 및 우울증 유사 행동에 관여하고 있음이 알려져 있으며, TH 역시 우울증과 같은 정신병리학적 조건과 관련된 효소로 알려져 있다.

[0060] 면역조직화학적 염색을 위해, 각 그룹에서 3마리의 랫트를 펜토바비탈나트륨 (sodium pentobarbital, 80 mg/kg, 복강 주사)으로 마취시키고, 0.9% 생리식염수 용액을 상행대동맥을 따라 관류시킨 다음 (혈액 제거), 뒤이어 0.1 M 인산완충식염수 (phosphate-buffered saline, PBS)에 4%로 희석되어 있는 포르말린 (4% paraformaldehyde, 4% 파라포름알데하이드) 300 mL로 관류 고정하였다. 랫트의 뇌는 무작위 순서로 적출하여 밤새 고정시키고, 4°C에서 0.1 M 인산완충식염수 (PBS)의 20% 수크로오스 용액으로 동결 보존하였다. 크라이오스탯 (저온유지장치, cryostat; Leica CM1850; Leica Microsystems Ltd., Nussloch, Germany)을 사용하여 시상하부 (hypothalamus), 청반 (locus coeruleus, LC), 편도체의 기저외측핵 (basolateral nucleus of the amygdala, BLA)이 가로지르도록 30 μ m 두께의 관상절편을 제작하였다. CRF와 TH 발현을 확인하기 위해, 절편은 아비딘-비오틴과산화효소 복합체법 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC)을 사용하여 면역 염색하였다. 절편은 1차 항체로 goat-anti-CRF antibody (1:500 희석; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) 및 sheep anti-TH antibody (1:2000 희석; Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA)를 PBST (PBS plus 0.3% Triton X-100)에 희석하여 4°C에서 72시간 동안 방치하였다. 2차 항체는 Vector Laboratories Co. (Burlingame, CA, USA)로부터 얻었고, 2% 혈청이 포함된 PBST에 1:200으로 희석하여 사용하였다. 면역반응성 (immunoreactivity)을 가시화하기 위해, 절편은 ABC 시약 (Vectastain Elite ABC kit; Vector)으로 90분 동안 인큐베이션하고, 3,3'-다이아미노벤지딘 (diaminobenzidine, DAB; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 0.01 % 과산화수소 (H_2O_2)가 포함된 용액에 1분 동안 방치하였다. 마지막으로, 조직은 PBS로 씻어내고, 뒤이어 물로 간단하게 세척한 뒤 슬라이드에 개별적으로 올려놓았다. 이미지는 AxioVision 3.0 imaging system (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany)를 사용하여 캡처하였고, Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose CA, USA)를 사용하여 가공 처리하였다. 절편은 200배 배율로 관찰했고, CRF-와 TH- 표지된 세포의 수는 실험 그룹에 대해 모르는 실험자에 의해 시상하부, 청반 (LC), 편도체의 기저외측핵 (BLA)에서 계산하였다. 실험동물 1마리에 3장의 표본을 대상으로 무작위로 시상하부, 청반 (locus coeruleus, LC), 편도체의 기저외측핵 (basolateral nucleus of the amygdala, BLA)에 분포하는 단위면적 ($100 \times 100 \mu m^2$) 당 면

역양성 (immunopositive) 세포의 수를 확인하였다. 면역양성세포는 배경 값보다 염색 강도가 높은 것으로 정의하였고, CRF-와 TH- 면역양성 세포를 나타내는 뚜렷한 갈색 점이 시상하부, 청반 (LC), 편도체의 기저외측핵 (BLA)에서 관찰되었다. 원래 이미지의 밝기와 대조 차이는 면역양성 세포의 주관적 선택 가능성을 배제하기 위해 조정하지 않았다.

[0061] 부신피질 자극 호르몬 방출인자 (CRF) 면역반응성은 도 6에 나타난 바와 같이, 실방핵 (paraventricular nucleus, PVN)을 포함한 시상하부구역 (hypothalamic regions)의 세포체 (cell body)를 분석하였다. 그 결과, STR 그룹의 랫트 뇌에서 실방핵 (PVN)의 CRF 면역양성 섬유의 수는 151.03% 증가하였다. 구체적으로, CRF 면역양성 뉴런의 수를 분석해 본 결과, STR 그룹(도 6의 B)의 랫트의 경우 SAL 그룹(도 6의 A)과 비교시, CRF 발현이 두드러지게 증가함을 확인하였으며, STR + FCN50 그룹(도 6의 C)에서는 STR 그룹(도 6의 B)에 비해 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 CRF-면역반응성이 반복된 감금 스트레스에 의해 증가하고, 후코이단 (FCN)을 투여함에 의해 현저하게 회복됨을 나타낸다. STR + FCN50 그룹(도 6의 C)의 CRF-면역양성 뉴런의 수는 STR + FLX 그룹(도 6의 D)과 거의 유사하였다.

[0062] 또한, 티로신수산화효소 (tyrosine hydroxylase, TH)의 면역반응성은 도 7에 나타난 바와 같이, 청반 (LC) 및 편도체의 기저외측핵 (BLA)을 포함한 교감신경구역 (adrenergic regions)에서 분석하였다. STR 그룹 랫트 뇌의 청반 (LC)과 편도체 기저외측핵 (BLA)에서 티로신수산화효소 (TH)의 면역양성 섬유의 수는 각각 139.80% 및 147.74%로 증가하였다. 구체적으로, TH 면역양성 뉴런 수를 분석해 본 결과, STR 그룹(도 7의 B 및 F)의 랫트의 경우 SAL 그룹(도 7의 A 및 E)과 비교시, TH 발현이 두드러지게 증가함을 확인하였으며, STR + FCN50 그룹(도 7의 C 및 G)에서는 STR 그룹(도 7의 B 및 F)에 비해 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 반복된 감금 스트레스를 가한 랫트의 TH-면역양성 뉴런의 증가된 수가 후코이단 (FCN)을 투여함에 의해 현저하게 회복됨을 나타낸다. 또한, STR + FCN50 그룹(도 7의 C 및 G)의 TH-면역양성 뉴런의 수는 STR + FLX 그룹(도 7의 D 및 H)과도 유사하였다.

[0063] **실시예 7: 해마에서의 BDNF (뇌유래 신경영양인자, brain-derived neurotrophic factor) mRNA 발현 평가**

[0064] 우울증과 관련된 단백질 마커로서 BDNF의 mRNA 발현을 평가하였다. BDNF는 뇌에서 만들어지는 단백질로 중추신경계와 말초신경계 양쪽의 신경세포에 작용하며 우울증과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

[0065] BDNF(뇌유래 신경영양인자, brain-derived neurotrophic factor) mRNA의 발현수준은 역전사 중합효소연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)에 의해 측정되었다. 랫트의 뇌 해마 (hippocampus)는 그룹 당 4마리의 랫트로부터 분리하였다. 단두술 후에, 뇌는 신속하게 적출되었고 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다. 총 RNA(total RNA)는 공급자의 지시에 따라 TRIzol시약 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 뇌 조직으로부터 추출하였다. 상보적 DNA (complementary DNA)는 역전사 효소 (reverse transcriptase, Takara Co., Shiga, Japan)를 사용하여 총 RNA로부터 처음 합성되었고, PCR은 PTC-100 programmable thermal controller (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)를 사용하여 수행하였다. 작동 조건은 다음과 같다: GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 경우, 30사이클, 변성 (denaturation) 95℃, 30초, 어닐링(annealing) 58℃, 30초, 연장 (extension) 72℃, 30초; BDNF의 경우, 27사이클, 변성 (denaturation) 95℃, 30초, 어닐링(annealing) 57℃, 30초, 연장 (extension) 72℃, 30초. 모든 프라이머 (primer)는 게재된 mRNA 시퀀스와 화이트헤드 생의료연구소 (Whitehead Institute for Biomedical Research (Cambridge, MA, USA; <http://www.genome.wi.mit.edu>))에 의해 제공된 프라이머 디자인 소프트웨어 Primer 3를 사용하여 디자인하였다. 다음과 같은 염기서열을 가지는 프라이머를 사용하였다: GAPDH(406 bp)의 경우, (forward) 5'-ATC CCA TCA CCA TCT TCC AG-3'(서열번호 1) 및 (reverse) 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'(서열번호 2); BDNF (153 bp)의 경우, (forward) 5'-CAG GGG CAT AGA CAA AAG-3'(서열번호 3) 및 (reverse) 5'-CTT CCC CTT TTA ATG GTC-3'(서열번호 4). PCR 산물은 1.2% 아가로스 겔에서 분리되었고 에티디움브로마이드 (EtBr, ethidium bromide)로 염색하였다. 각 밴드(band)의 농도(density)는 image-analyzing system (i-MaxTM, CoreBio System Co., Seoul, Korea)을 사용하여 정량화하였다. 발현 정도는 GAPDH에 상대적으로 BDNF와 같은 각 타겟 밴드의 농도를 계산함에 의해 비교하였다.

[0066] 상기와 같이 BDNF의 발현을 측정한 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, STR 그룹의 랫트 해마에서 BDNF mRNA 발현

은 SAL 그룹과 비교했을 때 상당히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, STR 그룹의 감소된 BDNF mRNA 발현량은 STR + FCN50 그룹에서 유효성 있게 회복되었다. 회복된 발현량은 SAL 그룹의 정상 랫트와 거의 유사한 수준이었으며, 양성 대조군인 STR + FLX 그룹과도 거의 동등하였다.

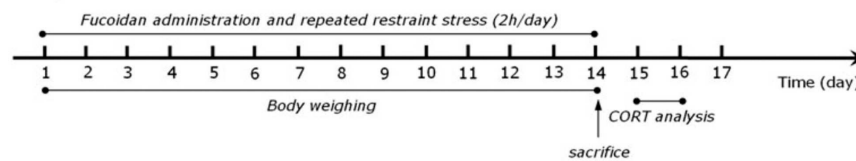
[0067] 이러한 다양한 결과를 종합할 때, 후코이단은 우울증을 완화시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

[0068] 실시예 8: 통계 처리

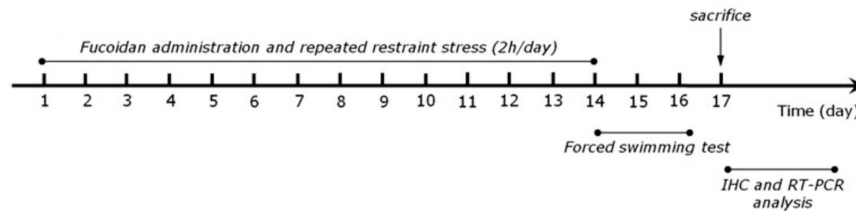
[0069] 모든 측정은 실험 조건에 대해 모르는 독립적 연구자에 의해 수행되었고, 도면에 있는 결과는 평균 $\pm$ 표준오차 (standard error, SE)로 표현하였다. 각 결과에 대한 실험군 간의 유의성을 비교하기 위하여 SPSS (Version 13.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 분산분석 (analysis of variance, ANOVA) 및 Tukey's post-hoc test를 실시하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

도면

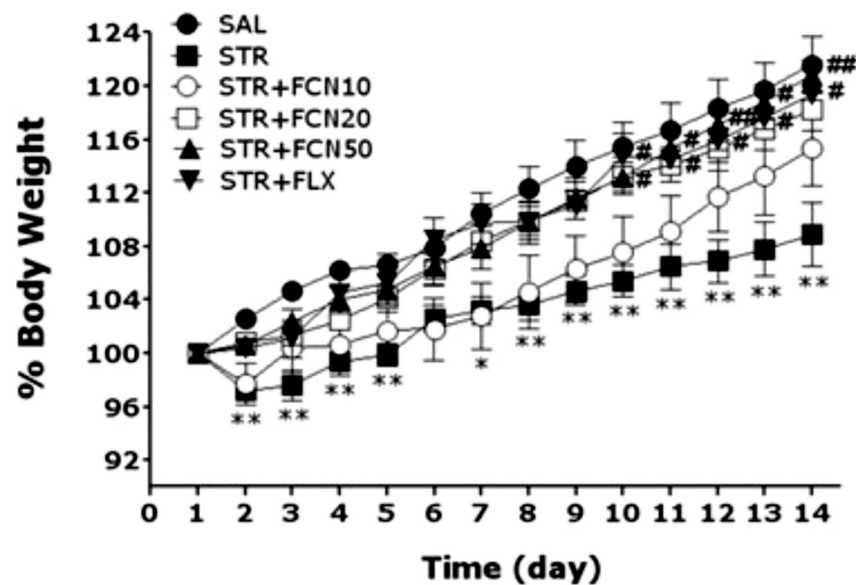
도면1



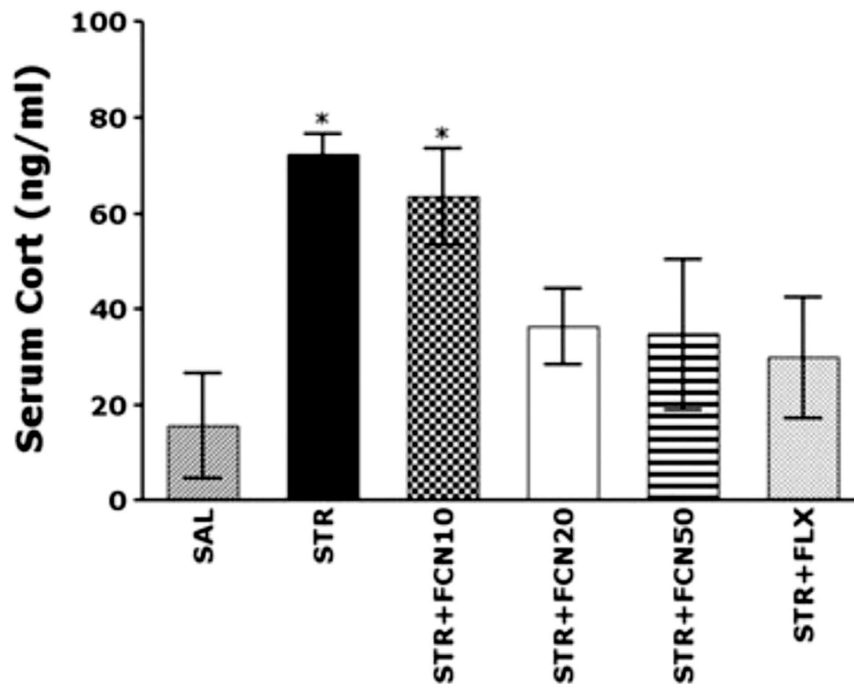
도면2



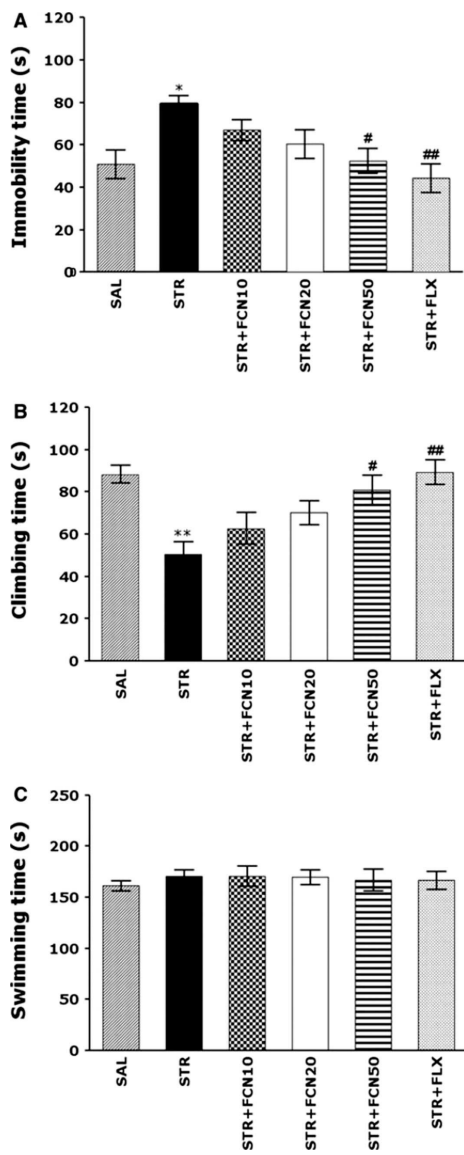
도면3



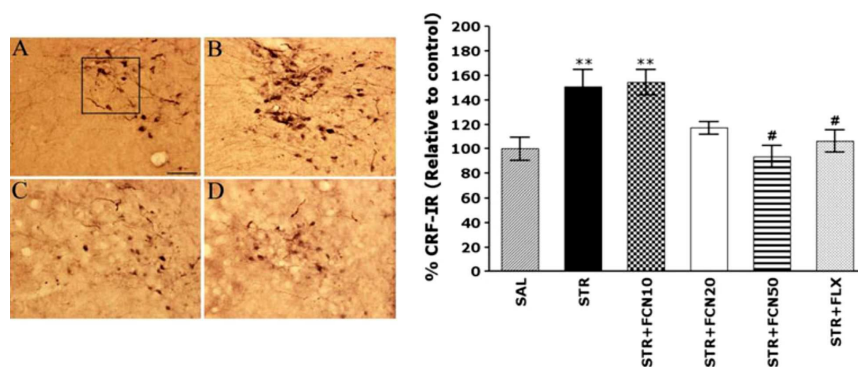
도면4



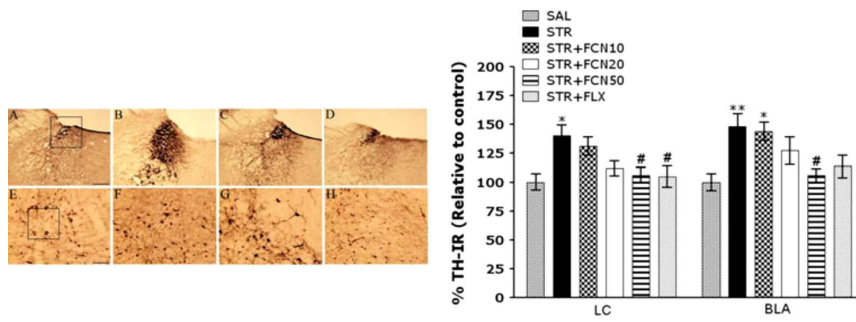
도면5



도면6



도면7



도면8

