



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년06월02일
 (11) 등록번호 10-1401612
 (24) 등록일자 2014년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 36/185 (2006.01) A61K 36/18 (2006.01)
 A61P 25/24 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0048987
 (22) 출원일자 2013년04월30일
 심사청구일자 2013년04월30일
 (65) 공개번호 10-2013-0122589
 (43) 공개일자 2013년11월07일
 (30) 우선권주장
 1020120045873 2012년04월30일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020110113018 A*
 W02003020275 A1*
 Indian Journal of Experimental Biology. Vol.
 46, pp.811-816(2008.12.)
 International Journal of Pharmaceutical
 Invention. Vol. 2, No. 5, pp.22-29(2012.06.)
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 재단법인 전남생물산업진흥원
 전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
 (72) 발명자
 김선오
 광주광역시 북구 양일로 55, 101동 605호 (연제1
 동, 현대아파트)
 나주련
 전라남도 장흥군 안양면 우드랜드길 288
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 4 항

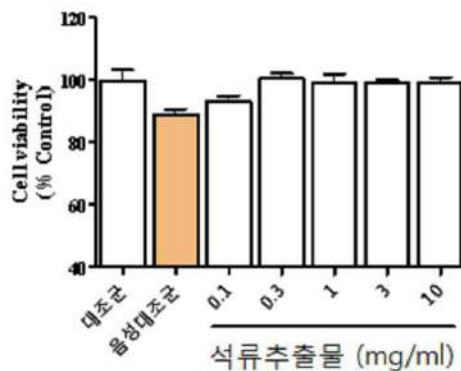
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **석류 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환의 치료 및 예방용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 석류 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 석류 추출물은 코르티졸의 분비를 억제하여 코르티졸에 의한 신경세포의 손상을 예방하고, 세로토닌 수용체를 억제하여 재흡수를 억제할 뿐만 아니라, 동물모델에서 확인한 결과 수면박탈 등에 의해 유도된 우울증과 같은 스트레스성 질환에 대한 저항성을 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도3a



(72) 발명자

이동욱

전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39, 203호 (수창아
트빌아파트)

최철웅

광주광역시 서구 풍암순환로 14, 105동 203호 (풍
암동, 호반중흥아파트)

김재갑

경기도 부천시 소사구 경인로134번길 51, 2동 507
호 (송내동, 삼익아파트)

오교녀

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136, 102동
208호 (성은연립)

정명아

광주광역시 서구 화운로83번길 28-7 (화정동)

특허청구의 범위

청구항 1

석류 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 스트레스성 질환은 우울증, 수면장애 및 불안장애로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것인 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

석류 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 식품 조성물은 건강기능식품인 스트레스성 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 스트레스성 질환의 치료, 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 우울장애(depressive disorder)는 의욕 저하와 우울감을 주요 증상으로 하여 다양한 인지, 정신 또는 신체적 증상을 일으켜 일상 기능의 저하를 가져오는 질환으로, 우울증이라고도 한다.

[0003] 상기 우울증이란 용어와 관련하여, 고대 그리스에서는 melancholia라는 용어를 사용하였고, 19세기 말부터는 depression이라는 용어가 사용되고 있다. 현재 정신과에서는 melancholia를 우울증(depression)의 한 유형으로 분류하고 있다.

[0004] 상기 우울증은 단순한 슬픔이라는 감정의 문제가 아니라, 장기간 지속되는 기분 저하 상태와 여기에 동반된 여러 장애를 뜻하며, 상기 장애란 생각의 과정, 동기, 의욕, 행동, 수면 등 전반적인 기능의 저하로 인해 일상 생활이 어려운 상황을 의미한다.

[0005] 상기 우울장애는 평생 유병율이 15% 정도로, 특히 여성에서는 25% 정도에 이르는 것으로 알려져 있으며, 세계보

건기구(WHO)는 우울증이 2020년에 인류를 괴롭힐 세계 2위의 질병이 될 것이라고 전망한 바 있다. 우리나라의 경우, 전체 인구 중 8%에 해당하는 약 320만 명이 우울증에 시달리는 것으로 보고된 바 있다.

- [0006] 상기 우울장애 또는 우울증은 일시적인 우울감과는 다르며 개인적인 약함의 표현이거나 의지로 없앨 수 있는 것이 아니다. 따라서, 우울증의 치료에는 전문적인 치료 또는 접근이 요구되나, 상당수가 전문가의 도움을 받지 못하고 우울증으로 고생하는 경우가 많아 안타까운 질환이기도 하다. 특히, 우울증의 위험성은 자살률과의 높은 상관성에 있다.
- [0007] 구체적으로, 우리나라의 연평균 자살 증가율은 1982년 이후 5.19%로, 우리나라는 OECD 국가 중 자살 증가율이 1위이며, 이러한 자살의 원인 중 80%가 우울증에 기인한다는 통계자료가 있다.
- [0008] 상기 우울증의 직접적인 원인은 명확하게 밝혀져 있지 않으나, 다른 정신 질환과 같이 생화학적 요인, 유전적 요인 및 환경적 요인이 우울증을 야기할 수 있는 것으로 알려져 있다.
- [0009] 상기 생화학적 요인과 관련하여, 신경전달 물질이나 호르몬의 불균형이 우울증 발생과 밀접한 연관이 있는 것으로 예상된다. 이와 관련하여, 최근 뇌 영상 기기를 이용한 연구를 통해 우울증 환자의 뇌에 변화가 있음이 보고되고 있다. 상기 유전적 요인과 관련하여, 일부 연구는 우울증을 가진 가족 내에서 우울증이 더 잘 발생하는 것으로 보고하고 있으며, 이러한 연구 결과에 기초하여 우울증을 발생시키는 유전자를 찾기 위한 연구가 진행되고 있다. 상기 환경적 요인과 관련하여, 가까운 지인의 상실이나, 경제적 문제 또는 스트레스 등이 이에 해당될 수 있다.
- [0010] 최근 연구결과에 의하면 상기 우울증의 주요 원인으로 과도한 정신적 스트레스가 제기되고 있다. 상기 정신적 스트레스의 원인은 복잡한 현대사회의 학업, 업무, 결혼, 육아 등과 관련된 사회적 요인과 날씨, 교통 등의 환경적 요인 등이 있으며, 이러한 일생 생활과 밀접하게 연관이 있는 다양한 원인으로 인하여 남녀노소를 불문하고 현대인의 우울증 발병률은 급속하게 증가되고 있는 실정이다.
- [0011] 상기 우울증에 의해 고생하고 있는 우울증 환자의 경우 다양한 스트레스성 질환이나 증상으로 고생하고 있다.
- [0012] 우선, 거의 대부분의 우울증 환자는 삶에 대한 에너지 상실을 호소하는데, 일상 생활의 과업을 끝까지 마치는 데에 어려움을 호소하고, 학교에서의 학업 및 직장에서의 정상적인 업무에 장애를 느끼거나, 새로운 과업을 실행할 동기를 갖지 못하고 있다.
- [0013] 또한, 상기 우울증 환자의 약 80%는 수면장애를 호소하는데, 상기 수면장애는 아침까지 충분히 잠을 못 이루고 일찍 깨거나 밤 사이 수면 시간 동안 자주 깨는 증상을 의미한다. 또한, 상기 우울증 환자의 불안증상을 나타내는데, 우울증 환자의 약 90%가 불안장애에 의해 고생하고 있다. 이 외에 성욕 저하 등의 성적 문제나 집중력 저하와 같은 인지기능 저하 증상도 상당 수의 우울증 환자에게서 관찰될 수 있다. 또한, 일부 우울증 환자는 신체 증상을 호소하는데, 이런 경우 내과적 검사에 의해서도 명확한 원인이 나오지 않은 경우가 많다. 이러한 경우, 단순히 내과적 검사만 진행하는 경우, 우울증 진단과 치료가 늦어져 고생하는 경우가 많으므로, 원인이 명확하지 않은 신체 증상이 지속될 때는 우울증을 의심하는 것이 요구된다. 우울증과 관련된 가장 심각한 증상은 자살 사고로, 우울증 환자의 약 70%가 자살을 생각하고, 약 10% 내지 15%가 실제로 자살을 시행하는 것으로 알려져 있다.
- [0014] 상기 우울증 환자에서 수면장애, 불안장애, 자살충동과 같은 증세과 관련하여, 생화학적인 측면에서 호르몬과 관련된 연구가 진행되고 있다.
- [0015] 상기 연구에 의하면, 과도한 정신적 스트레스를 받는 경우, 뇌의 시상하부에서 부신피질 자극 호르몬 방출호르몬(Corticotropin releasing hormon, CRH)이 생성되며, 상기 부신피질 자극 호르몬 방출호르몬은 뇌하수체 전엽을 자극하여 부신피질 자극 호르몬(adrenocorticotropic hormon, ACTH)을 방출하게 하며, 상기 부신피질 자극 호르몬은 부신피질에 작용하여 부신에서 분비되는 스테로이드 호르몬 중 스트레스 호르몬인 코르티솔(cortisol) 등 당질코르티코이드(glucocorticoid)의 분비를 촉진하며, 혈액으로 분비된 당질코르티코이드는 신체 각 기관으로 전달되게 된다.
- [0016] 상기 스트레스 호르몬인 코르티솔의 분비는 근육을 긴장시키고, 감각기관을 예민하게 만드는 등 정신적인 스트레스에 대응할 수 있도록 인체를 준비시키지만, 반복적인 정신적 스트레스로 인한 코르티솔 호르몬의 지속적인 분비는 신체가 늘 긴장한 상태로 유지되게 하여, 상기 코르티솔의 혈중농도가 높아지게 되며 숙면을 취하지 못하여 수면장애가 발생되게 된다. 이러한 수면장애는 또 다시 정신적 스트레스의 원인이 되어, 악순환이 발생됨에 따라 우울한 증상이 발생되게 된다.

- [0017] 또한, 극심한 정신적 스트레스로 인한 코르티졸 분비 조절 기능이 상실하게 되어, 과도한 코르티졸 분비가 지속되는 경우, 뇌 신경계 전반에 걸쳐 뇌 위축 및 손상이 야기되고 이로 인해 심각한 우울증 증세 및 이로 인한 자살 발생 가능성이 보고되고 있다.
- [0018] 상기 자살 발생의 원인이 되는 자살충동을 유발하는 우울증의 뇌신경계 위축(무게 및 부피의 감소)과 손상은 분비조절능력 상실에 의해 과다 분비된 코르티졸 호르몬이 직접적인 1차적 원인 물질인 것으로 보고되고 있다.
- [0019] 그러나, 상기 코르티졸 호르몬에 의한 신경 손상 기전과 원인은 아직 불분명하며, 현재 많은 신경과학자들의 주요 관심 연구주제로 여러 연구가 진행되고 있다. 다만, 우울증의 경우, 대부분의 뇌신경계 질환, 특히 치매나 뇌졸중과 같은 퇴행성 뇌질환의 원인 즉, DNA 손상에 의한 세포손상기전으로 알려진 apoptosis와는 다른 기전에 의해 신경계 위축과 손상이 발생된다고 보고되고 있다.
- [0020] 우울증 환자 및 우울증 실험 동물모델에 대한 최근 연구는 정신적 스트레스로 인해 분비되는 코르티졸은 신경세포, 더 구체적으로는 해마 신경세포에 칼슘이온의 유입을 과도하게 증가시키고, 상기 해마 신경세포 내부로 과잉 유입된 칼슘이온은 세포의 에너지원인 글루코스(glucose)의 세포 내 유입을 방해하여, 결국 세포 내 주요 에너지분자인 ATP(adenosine triphosphate)의 양이 감소되며, 이로 인하여 신경세포의 에너지 대사 방해로 세포생장을 어렵게 되고, 궁극적으로 뇌신경계 위축 및 세포사멸을 유도하는 것으로 추정하고 있다.
- [0021] 상기 코르티졸에 의한 신경세포 내부로 칼슘이온의 과잉 유입과 관련하여, 상기 코르티졸은 글루타메이트(glutamate), NMDA 및 kainic acid 등의 신경계 흥분성 신경전달물질의 양적 증가를 유도하고, 상기 흥분성 신경전달물질의 양적 증가는 흥분성 신경전달물질 수용체를 비정상적으로 활성화하여, 상기 수용체를 통해 칼슘이온이 세포내부로 과잉 유입됨이 보고되어 있다. 또한, 신경세포의 전기적신호전달 기능을 담당하는 칼슘채널(calcium-channel) 및 칼슘펌프(calcium-pump)도 과잉 활성화되며, 이로 인해 신경세포 내부로 칼슘이온이 과잉 유입됨도 보고되어 있다.
- [0022] 현재까지 보고되고 사용되고 있는 우울증 치료제는 행복함과 사랑을 느끼게 하는 호르몬이라고 알려진 세로토닌(serotonin)의 재흡수를 억제하여 혈중 세로토닌 농도를 증가시킴으로 일시적인 기분전환 효과를 통해 우울증 치료효과를 유도하는 약물들로, 미국 FDA 승인을 받고 판매되고 있는 우울제는 프로작(prozac)이나 세렉사(celexa)등 약 5종이 있다.
- [0023] 그러나, 이러한 세로토닌 재흡수 억제제의 경우, 환자의 절반 정도만이 증상이 호전될 뿐만 아니라 미국정신과 협회(APA) 권장사항에 의하면, 증상 호전을 위해서는 최소 4개월 이상의 복용기간이 요구되고, 환자에 따라서는 2년 내지 3년 동안 계속 복용하여야 하는 문제점이 있다. 또한, 상기 세로토닌 재흡수 억제제의 경우, 상기 약의 복용을 끊었을 경우 대부분 증상이 6개월 내지 12개월 이내 재발함이 관찰되었고 부작용 또한 심각한 수준인 것으로 알려져 있다.
- [0024] 따라서, 부작용이 문제될 가능성이 낮은 현재에는 천연물 유래로 우울증에 대해 장기적이고 효과적으로 치료할 수 있는 항우울제의 개발이 계속적으로 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0025] (특허문헌 0001) KR 10-1046126 B
- (특허문헌 0002) KR 10-0008675 B

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0026] 본 발명의 목적은 스트레스성 질환의 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0027] 본 발명의 다른 목적은 스트레스성 질환 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0028] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 석류나무(*Punica granatum*) 추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0029] 이러한 측면에서, 본 발명은 석류나무(*Punica granatum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 상기 스트레스성 질환은 우울증, 수면장애 및 불안장애로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0031] 상기 석류나무는 바람직하게는 석류일 수 있다.
- [0032] 상기 석류나무 추출물은 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나의 추출용매에 의하여 추출한 것일 수 있으며, 바람직하게는 석류나무 열수 추출물일 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 스트레스성 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물은 석류나무(*Punica granatum*) 추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0034] 이러한 측면에서, 본 발명은 석류나무(*Punica granatum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물일 수 있다.
- [0035] 상기 석류나무는 바람직하게는 석류일 수 있다.
- [0036] 상기 식품 조성물은 건강기능식품일 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 스트레스성 질환이란 스트레스에 의해 유발되는 증상을 갖는 질환을 의미하며, 일 예로 우울장애 등이 이에 포함된다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 우울장애(depressive disorder)는 의욕 저하와 우울감을 주요 증상으로 하여 다양한 인지 및 정신 신체적 증상을 일으켜 일상 기능의 저하를 가져오는 질환을 의미하며, 우울증이라고도 한다.
- [0039] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0040] 본 발명의 발명자들은 스트레스성 질환, 특히 우울증에 효과적인 천연물에 대하여 연구 하던 중, 석류 추출물이 코르티졸 분비 제어 및 신경세포 손상 저해에 효과가 있음을 확인하고, 상기 석류 추출물이 일차배양한 흰쥐의 뇌신경 세포 에서 스트레스성 정신 질환 유발물질에 의한 신경세포손상 치료 및 예방 효과가 있으며, 랫트에서 스트레스성 정신 질환 유도를 통한 스트레스 및 우울증에 대한 발생억제 효과가 탁월함을 확인하였으며, 상기 석류 추출물 중 석류 열수 추출물이 스트레스성 정신 질환의 치료 또는 예방 효과가 뛰어남을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0041] 본 발명은 석류 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 석류 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물이다.
- [0043] 석류나무(*Punica granatum* L.)는 쌍떡잎식물로 부처꽃과(Lythraceae)에 속하는 낙엽소교목이다. 상기 석류나무의 원산지는 서아시아와 인도 서북부 지역이며 한국에는 고려 초기에 중국에서 건너온 것으로 추정되고 현재 중부와 남부지방에서 정원수와 과수로 재배한다.
- [0044] 상기 석류나무는 석류나무의 열매, 잎, 꽃, 수피 및 뿌리로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 석류나무 열매일 수 있다. 상기 석류나무 열매는 석류(pomegranate)라고 하며, 식용 또는 약용으로 이용되고 있다. 상기 석류는 과육, 과피, 씨앗 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용할 수 있고, 그 부위에 영향을 받지 않는다.
- [0045] 상기 석류나무 추출물은 통상의 식물 추출물 제조방법에 따라서 제조될 수 있다. 일 예로, 석류를 건조한 후 수분을 제거하여 분쇄한 후 추출용매를 가하여 추출하는 방법으로 제조된 것 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 통상의 식물 추출물 제조방법은 일 예로 가열추출법, 초음파 추출법, 환류 추출법 또는 초고압추출법일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0047] 상기 본 발명의 추출물은 추출용매로 추출하거나 추출용매로 추출하여 제조한 추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조한 것일 수 있다. 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매 일 수 있으며, 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 에탄올 수용액 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 구체적으로, 상기 추출용매는 20% 에탄올 수용액, 80% 에탄올 수용액 또는 물일 수 있으며, 바람직하게는 물일 수 있다.
- [0048] 상기 분획용매는 물, 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산 또는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0049] 상기 석류나무 추출물은 상기 석류나무, 바람직하게는 석류를 건조 후 분쇄한 후, 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나, 바람직하게는 물 또는 에탄올 수용액을 추출용매로 하여, 10℃ 내지 120℃ 또는 30℃ 내지 90℃의 반응온도에서 약 2시간 내지 7일간 또는 12시간 내지 30시간 동안 추출하는 방법으로 제조할 수 있다.
- [0050] 상기 석류나무 추출물은 상기 추출방법에 의해 추출하여 추출액을 제조한 후, 상기 수득한 추출액을 여과하여 감압 농축하는 단계 및/또는 상기 농축된 추출물을 동결 건조하는 단계를 더욱 수행하여 제조될 수 있다.
- [0051] 상기 스트레스성 질환은 사람의 사고, 감정 및 행동에 영향을 미치는 병적인 정신 상태가 스트레스에 의하여 유발되는 질환을 의미하며, 일 예로 수면장애, 우울증, 공황장애 및 기억력 감소로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나 일 수 있고, 바람직하게는 우울증일 수 있다.
- [0052] 상기 스트레스성 질환은 스트레스에 의하여 코르티졸 호르몬의 분비조절 능력이 상실되어 뇌신경계의 무게 또는 부피 등이 감소하는 위축 및 손상에 의하여 유발되는 것일 수 있다.
- [0053] 실시예를 통하여 확인된 결과에 의하면, 상기 스트레스성 질환의 경우 치매나 뇌졸중과 같은 퇴행성 뇌질환의 원인으로 알려진 DNA 손상에 의한 세포손상기전으로 알려진 apoptosis에 의하여 유발되는 뇌신경계 질환과 발생 기전 및 원인이 상이한 것으로 확인되었다.
- [0054] 본 발명의 실시예에 의하면, 석류 추출물의 경우 정신적 스트레스로 인해 분비가 촉진되는 코르티졸의 분비를 억제하여 신경세포의 에너지 대사를 유지시켜 줌으로써 뇌신경 세포가 위축되거나 사멸되는 것을 방지하여 뇌신경 세포를 보호하는 역할을 하고, 세포손상의 주요원인으로 알려진 산화적 스트레스와는 관계가 없음이 확인되었다. 또한, 상기 석류 추출물은 동물모델을 통해 확인한 결과, 스트레스 완화, 뇌기능 수행능력 회복 및 반사행동 회복 등의 우수한 효과가 있음이 확인되었다.
- [0055] 상기 우울증(depression)은 우울한 기분에 빠져서 의욕을 상실한 채 무능감, 고립감, 허무감, 죄책감 또는 자살충동 등에 사로잡히는 일종의 정신질환으로서, 신경전달물질이 완전한 기능을 하지 못하는 것이 원인이 되는 것으로 일 예로 과도한 신체 내 코르티졸 분비가 지속되어 혈중 코르티졸 농도가 높게 유지 될 경우 뇌 신경계 진반에 걸쳐 뇌 위축 및 손상이 야기되고 이로 인하여 우울증이 발병할 수 있다.
- [0056] 상기 석류나무 추출물, 바람직하게 석류 추출물의 경우 신체 내 호르몬 중의 하나인 코르티졸의 분비 활성을 억제하여 혈중 코르티졸의 농도를 정상적으로 유지 함으로써 뇌 위축 및 손상을 억제하여 우울증을 예방 또는 치료 할 수 있게 된다.
- [0057] 상기 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 석류나무 추출물, 바람직하게는 석류 추출물을 0.01 내지 99% 중량으로 포함할 수 있다. 그러나 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 다르게 하여 포함할 수 있다.
- [0058] 상기 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절함 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0059] 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 이에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 갈슘 포스페이트, 갈슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0060] 상기 약학 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등

의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 적어도 면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0061] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 추출물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러므로 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0062] 상기 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 상기 투여의 모든 방식은 통상의 방법에 의할 수 있고, 일 예로 경구 및 직장 또는 정맥 등의 방법을 통하여 투여할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 조성물은 석류나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물이다.
- [0064] 상기 석류나무 추출물은 석류 추출물일 수 있다.
- [0065] 상기 식품 조성물은 건강기능식품일 수 있다.
- [0066] 상기 석류나무 추출물 및 상기 스트레스성 질환에 대한 내용은 상기 약학 조성물에서 언급한 내용과 같다.
- [0067] 상기 식품은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하고, 통상적인 의미로서 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함한다.
- [0068] 상기 식품의 일 예로 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0069] 상기 식품, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지 및 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.
- [0071] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 건강기능음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 석류 추출물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0073] 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트ρί톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1 g 내지 20 g, 바람직하게는 5 g 내지 12 g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0074] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 석류 추출물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부 범위에서 선택될 수 있다.

[0075] 본 발명에서 건강기능음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 균이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.

[0076] 상기 건강기능음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 흰색 감국 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0077] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1 g 내지 20 g, 바람직하게는 5 g 내지 12 g이다.

[0078] 상기 석류나무 추출물, 구체적으로 석류 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 일차배양한 흰쥐의 신경세포에서 정신적 스트레스 유발물질에 의한 신경세포손상을 효과적으로 예방하는 효과를 가지고 있고, 산화적 스트레스에 의한 세포손상에는 영향을 주지 않으며, 5-HT6 유전자가 발현된 1321N1 세포에서 세로토닌 수용체를 저해시킴으로써 세포내 cAMP 조절을 하고, 랫에서 정신적 스트레스 유도를 통한 스트레스 및 우울증에 대한 발생억제 효과가 탁월함을 실험적으로 확인하였다.

발명의 효과

[0079] 본 발명의 석류나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 스트레스 호르몬의 과다 분비에 의한 신경세포 손상을 치료, 개선 및 예방하고, 스트레스 및 우울증 발생을 억제하는 효과가 있으므로, 스트레스성 질환, 특히 우울증을 예방 또는 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0080] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 추출용매에 따른 석류 추출물이 뇌세포에 미치는 세포독성 정도를 나타내는 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 대조군에 대한 상대값으로 세포독성 정도를 나타내는 것이고, 상기 그래프의 가로축은 대조군 및 각 용매별 추출물의 농도($\mu\text{g/ml}$)를 나타낸다. 도 1a는 흰쥐 태아에서 분리한 해마신경세포, 도 1b는 대뇌피질신경세포 및 도 1c는 선조체 신경세포에 미치는 세포독성을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 과산화수소 처리를 통한 산화적 스트레스 유도에 대한 석류 추출물의 신경세포 보호효과를 나타내는 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 세포 생존도를 대조군에 대한 상대값으로 나타내는 것이고, 상기 그래프의 가로축은 아무런 시료를 처리하지 않은 대조군, 과산화수소만 처리한 음성대조군(H_2O_2) 및 석류 추출물, 구체적으로 석류 열수 추출물(열수), 석류 20% 에탄올 수용액 추출물(20%), 석류 80% 에탄올 수용액 추출물(80%)과 그 처리 농도(mg/ml)를 나타내는 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 정신적 스트레스 호르몬인 코티졸 처리를 통한 세포 내 스트레스 유발 및 석류 추출물의 농도에 따른 신경세포 보호효과를 나타내는 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 세포 생존도를 대조군에 대한 상대값으로 나타내는 것이고, 상기 그래프의 가로축은 아무런 시료를 처리하지 않은 대조군, 코티졸만 단독처리한 음성대조군 및 석류 추출물 과 그 처리 농도(mg/ml)를 나타내는 것이다. 도 3a는 석류 열수추출물(열수), 도 3b는 석류 20% 에탄올 수용액 추출물 (석류 20%주정 추출물), 도 3c는 석류 80% 에탄올 수용액 추출물(석류 80% 주정 추출물)의 신경세포보호 효과를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 과산화수소 및 코티졸 처리를 통한 세포 스트레스 유발 및 석류 열수추출물 (0.3 mg/ml)에 의한 신경세포 보호효과를 ERK의 인산화 및 NF-κB의 발현여부를 통해 확인한 사진 및 그래프로, 도 4a 내지 도 4c는 과산화수소에 대한 신경세포 보호효과, ERK의 인산화 정도 및 NF-κB의 발현여부를 확인한 결과이고, 도 4d 내지 도 4f는 코티졸에 대한 신경세포 보호효과, ERK의 인산화 정도 및 NF-κB의 발현여부를 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 석류추출물이 세로토닌 수용체에 미치는 영향을 확인하기 위하여 cAMP 저해 효과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 저해효과를 나타내는 것이고, 상기 그래프의 가로축은 석류 추출물, 구체적으로 석류 열수 추출물(열수), 석류 20% 에탄올 수용액 추출물(20%), 석류 80% 에탄올 수용액 추출물(80%)과 그 처리 농도(μg/ml)를 나타내는 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 수면박탈 스트레스를 통한 우울증 동물모델 상태에서 실험동물의 사망률 및 석류 추출물 투여를 통한 사망률 감소를 나타내는 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 생존률을 대조군에 대한 상대값으로 나타낸 것이고, 상기 그래프의 가로축은 실험 후 경과된 시간을 나타내며, 상기 대조군은 아무런 처리를 하지 않은 실험군을 의미하고, 상기 수면박탈은 수면박탈을 수행한 음성대조군을 의미하며, 상기 수면박탈+석류는 수면박탈을 수행하며 석류 추출물을 투여한 실험군을 의미하고, 상기 양성대조군은 수면박탈을 수행하며 카페인을 투여한 실험군을 의미한다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 수면박탈 스트레스를 통한 우울증 동물모델 상태에서 실험동물의 체중변화 및 석류 추출물 투여를 통한 체중변화를 나타내는 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 대조군 실험동물의 체중에 대한 체중의 상대값을 나타내며, 상기 대조군은 아무런 처리를 하지 않은 실험군을 의미하고, 상기 수면박탈은 수면박탈을 수행한 음성대조군을 의미하며, 상기 수면박탈+석류는 수면박탈을 수행하며 석류 추출물을 투여한 실험군을 의미하고, 상기 석류는 수면박탈을 수행하지 않고 석류 추출물만 처리한 군을 의미한다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 수면박탈 스트레스를 통한 우울증 동물모델 상태에서 실험동물의 줄립 현상을 꾸벅임 행동 횟수로 정량한 정도를 나타낸 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 꾸벅임 행동 횟수를 나타내고, 상기 그래프의 가로축은 각 군을 나타내며, 상기 수면박탈은 수면박탈을 수행한 음성대조군을 의미하며, 상기 수면박탈+석류는 수면박탈을 수행하며 석류 추출물을 투여한 실험군을 의미하고, 상기 수면박탈+카페인은 수면박탈을 수행하며 카페인을 투여한 양성대조군을 의미한다.

도 9은 본 발명의 일 실시예에 따른 수면박탈 스트레스를 통한 우울증 동물모델 상태에서 실험동물의 뇌기능 수행능력 및 행동변화 측정을 통한 기억능력을 시험하기 위한 수동회피실험의 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 시간(sec)을 나타내고, 상기 그래프의 가로축은 각 군을 나타내며, 상기 대조군은 아무런 처리를 하지 않은 실험군을 의미하고, 상기 수면박탈은 수면박탈을 수행한 음성대조군을 의미하며, 상기 석류는 수면박탈을 수행하지 않고 석류 추출물만 처리한 군을 의미하고, 수면박탈+석류는 수면박탈을 수행하며 석류 추출물을 투여한 실험군을 의미하고, 상기 카페인은 수면박탈을 수행하지 않고 카페인만 처리한 군을 의미하며, 상기 수면박탈+카페인은 수면박탈을 수행하며 카페인을 투여한 양성대조군을 의미한다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 수면박탈 스트레스를 통한 우울증 동물모델 상태에서 실험동물의 열 자극에 의한 민감성 반응 행동에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험의 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 실험동물이 반사행동을 보이는 온도(℃)나타내고, 상기 그래프의 가로축은 각 군을 나타내며, 상기 대조군은 아무런 처리를 하지 않은 실험군을 의미하고, 상기 수면박탈은 수면박탈을 수행한 음성대조군을 의미하며, 상기 석류는 수면박탈을 수행하지 않고 석류 추출물만 처리한 군을 의미하고, 수면박탈+석류는 수면박탈을 수행하며 석류 추출물을 투여한 실험군을 의미하고, 상기 카페인은 수면박탈을 수행하지 않고 카페인만 처리한 군을 의미하며, 상기 수면박탈+카페인은 수면박탈을 수행하며 카페인을 투여한 양성대조군을 의미한다.

도 11는 본 발명의 일 실시예에 따른 수면박탈 스트레스를 통한 우울증 동물모델 상태에서 실험동물의 혈액 내 스트레스 호르몬인 코르티졸의 분비량을 측정한 것으로, 상기 그래프의 세로축은 코르티졸 함량(mg/ml)을 나타내고, 상기 그래프의 가로축은 각 군을 나타내며, 상기 대조군은 아무런 처리를 하지 않은 실험군을 의미하고, 상기 수면박탈은 수면박탈을 수행한 음성대조군을 의미하며, 상기 석류는 수면박탈을 수행하지 않고 석류 추출물만 처리한 군을 의미하고, 수면박탈+석류는 수면박탈을 수행하며 석류 추출물을 투여한 실험군을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081]

이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는

실시예에 한정되지 않는다.

[0082] **[제조예: 실험재료의 준비 및 추출]**

[0083] 1. 실험재료의 준비 및 세포 배양

[0084] 세포배양액인 RPMI 1640, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL 사(NY, USA)에서 구입하였다. 하기 실험예에서 사용된 코르티졸(Cortisol) 등을 비롯한 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

[0085] 일차세포는 흰쥐 태아(E16-18)의 뇌 조직을 신속히 분리한 후 트립신(trypsin)을 처리하여 hippocampal cell (해마), cortical cell (대뇌피질), striatal cell (선조체) 등 단일세포들로 분리하였다. Neurobasal 배지 (Gibco 사, USA)와 B-27 supplement(Gibco 사), USA 가 함유된 배양액에 분리된 단일세포들을 목적에 따라 배양접시에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 14일 동안 배양한 후 하기 실험에 사용하였다.

[0086] 모든 실험결과는 평균과 표준편차로 표시하고, 유의성 검증은 GraphPad Prism 5 프로그램을 이용하여 student's *t*-test(*p*<0.05)를 실시하여 실험군과 대조군 간의 유의성을 표기하였다.

[0087] 2. 석류 추출물의 제조

[0088] 석류를 크기에 따라 10등분으로 절단 후, 동결건조하여 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 석류를 분쇄하여 균일하게 만든 후, 석류 분말 5 kg에 추출용매 50 L을 섞어 4시간 동안 압력 0.7 Kg/cm² 내지 0.75 Kg/cm²의 조건에서 추출하였다. 상기 추출용매는 20% 에탄올 수용액(20% 주정), 80% 에탄올 수용액(80% 주정) 및 증류수를 이용하여 각각 주정에탄올 추출물, 구체적으로 20% 에탄올 추출물 및 80%에탄올 추출물과 열수추출물을 제조하였다.

[0089] 상기 제조된 열수추출물은 60°C 및 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축하였고, 주정에탄올추출물은 60°C 및 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 정제수 50L를 투입하고, 동일한 조건으로 1회 더 농축하였다. 상기 농축된 각각의 추출물은 동결건조기를 이용하여 -40°C에서 48시간 동안 동결건조하여 제조하였다.

[0090] 상기 방법에 의해 석류 열수 추출물(이하, RR0이라 함) 880 g, 20% 에탄올 추출물 775 g(이하, RR20E이라 함) 및 80%에탄올 추출물 745 g(이하, RR80E이라 함) 에탄올 추출물을 각각 얻어 하기 실험의 시료로 사용하였다.

[0091] **[실험예 1: *In vivo* 상에서 석류 추출물의 스트레스 완화 활성]**

[0092] 1-1. 석류 추출물에 대한 세포독성

[0093] 상기 제조예의 석류의 추출방법에 따른 열수와 20% 및 80% 에탄올(주정)추출물에 따른 세포독성을 일차배양한 흰쥐 뇌세포를 대상으로 MTT 측정법으로 측정하였다.

[0094] 상기 제조예 1의 흰쥐 태아에서 뇌세포를 분리하여 상기 제조예의 석류 추출물을 처리한 후 세포 생존도(cell viability)를 측정하여 각 석류 추출물의 세포 독성 결과를 도 1에 나타내었다.

[0095] 보다 구체적으로, 흰쥐 태아(E16-18)의 뇌 조직을 신속히 분리한 후 트립신(trypsin)을 처리하여 hippocampal cell(해마), cortical cell(대뇌피질), striatal cell(선조체) 등 단일세포들로 분리한다. Neurobasal 배지 (Gibco 사)와 B-27 supplement (Gibco 사)가 함유된 배양액에 분리된 단일세포들을 목적에 따라 배양접시에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 14일 동안 배양하였다. 각각의 시료를 처리하여 24시간 후 세포 사멸을 관찰하였다. 상기 석류 추출물은 상기 제조예 2의 석류 열수 추출물 및 에탄올 수용액 추출물 각각에 대하여 농도를 0.3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml로 조절하여 실험을 실시하였으며, 측정결과를 도 1에 나타내었다.

[0096] 상기 도 1에 나타난 바와 같이, 해마, 대뇌피질, 선조체에서 분리한 세포들에서 모두 독성이 확인되지 않았다. 구체적으로, 24시간 후 MTT를 이용하여 세포독성을 확인한 결과 석류 추출물, 구체적으로 열수추출물, 20% 주정 추출물 및 80% 주정추출물 모두 유의적으로 감소하는 경향은 보이지 않았으며, 가장 고농도인 30 µg/ml에서 세

포독성은 나타나지 않았다.

- [0097] 1-2. 산화적 스트레스에 대한 석류추출물의 신경세포 보호효과 확인
- [0098] 상기 제조예의 추출용매에 따른 석류 추출물 처리로 산화적 스트레스로 인한 신경세포 보호효과를 확인하여 도 2에 나타내었다.
- [0099] 상기 실험에 사용한 세포는 일차배양한 흰쥐의 해마신경세포를 사용하였다. 석류 추출물을 농도별(0.3 mg/ml, 10 mg/ml)로 24시간 동안 전처리한 후, H₂O₂를 100 μM의 농도로 넣고 24시간 반응한 것과 석류추출물만을 처리하여 총 48시간 처리한 것을 MTT방법으로 생존율을 비교하여 시료에 의한 신경세포 보호효과를 관찰하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0100] 상기 도 2에 나타낸 바와 같이, 과산화수소(H₂O₂)만을 처리한 경우 세포 생존도가 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 약 90%로 감소했으며, 석류 추출물로 전처리를 통한 세포보호효과는 추출용매 및 농도와 관계없이 모든 조건에서 산화적 스트레스로 인한 신경세포 보호효과가 없음을 확인하였다.
- [0101] 1-3. 석류 추출물 농도에 따른 세포 생존도 확인
- [0102] 석류 추출물의 정신적 스트레스에 대한 저항 활성을 세포수준에서 확인하기 위하여 스트레스 호르몬인 코르티졸(cortisol)의 신경세포 손상 유발물질 처리에 따른 자극에 대한 반응 실험을 하였다.
- [0103] 상기 제조예의 추출용매에 따른 석류 추출물 처리로 신경세포 보호효과를 확인하여 도 3에 나타내었다.
- [0104] 상기 제조예의 일차배양한 흰쥐 해마 신경세포를 준비하여, 아무것도 처리하지 않은 대조군, 상기 세포에 대하여 코르티졸을 처리한 음성대조군 및 상기코르티졸을 처리하고 상기 제조예의 석류 추출물을 처리한 실험군으로 나누어서 실험을 실시 하였다.
- [0105] 상기 제조예의 일차배양한 흰쥐 해마 신경세포에 대하여 석류 추출물을 추출용매별로 구분하여 24시간 동안 1, 3, 10, 30, 100 및 300 mg/ml의 농도로 전처리한 후 코르티졸을 24시간 동안 가한 후, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 배지에 처리하여 4시간 동안 반응시킨 후, 배지를 제거하고, DMSO(dimethyl sulfoxide)를 이용하여 살아있는 세포 내 미토콘드리아의 dehydrogenases에 의하여 생성된 보라빛의 결정을 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 생존율을 확인하여 도 3에 나타내었다.
- [0106] 상기 도 3에 나타난 바와 같이, 석류 열수추출물의 경우 0.1 mg/ml 농도에서 세포 생존도가 93.30% 인 경우를 제외하고, 다른 모든 농도에서는 대조군과 유사한 생존율을 나타내었고, 20% 에탄올추출물 또한 열수추출물보다는 낮으나 세포 생존도가 증가하는 것을 확인 하였다. 80% 에탄올추출물의 경우 각각의 농도에서 86.42%(0.1 mg/ml), 89.25%(0.3 mg/ml), 83.70%(1 mg/ml), 77.98%(3 mg/ml), 71.31%(10 mg/ml)의 생존율을 보여 보호효과가 미미한 것을 확인할 수 있었다.
- [0107] 따라서, 석류 열수추출물 및 20% 에탄올추출물에서 정신적 스트레스로 인한 신경세포손상의 보호효과가 우수하며 특히 열수추출물의 효과가 가장 뛰어난 바, 이하 석류 열수추출물을 이용하여 하기 실험을 실시하였다.
- [0108] 1-4. 산화적 스트레스(H2O2) 및 정신적 스트레스(코티졸)에 의한 세포 손상 기전과 관련된 세포내 발현 인자 확인(ERK-P, NFKB)
- [0109] 세포에 활성산소종이나 UV 등 물리·화학적 스트레스가 오면 다양한 신호전달경로의 단백질인산화효소가 활성화되어 다음단계의 안산화효소를 활성화시킨다. 일련의 연속적인 세포질 내 단백질인산화효소의 활성화가 일어나면 활성화된 단백질이 핵 내부로 이동하여 타겟 단백질의 유전자 발현을 증가시키며, 그 결과로 세포의 증식, 생존, 분화, 사멸 등의 세포생리가 조절된다.
- [0110] 스트레스와 가장 밀접한 연관을 가지고 있는 NF-κB의 발현과 EKR의 인산화 발현 및 석류 추출물에 의한 변화를 확인하였다. 석류 열수추출물을 일차배양한 흰쥐 해마신경세포에 전처리 한 후 (0.3 mg/ml) cortisol 또는 H₂O₂(과산화수소)를 처리하였을 때 NF-κB, ERK 등의 발현을 HTS를 이용하여 확인하여 도 4a 내지 도 4f에 나타

내었다. 파란색은 hoechst dye를 이용하여 핵을 염색한 것이며, 녹색은 NF-κB, ERK의 발현을 antibody를 이용하여 형광염색하여 HTS를 이용하여 촬영한 것이다. 이를 통하여 각각의 세포에서 나타내는 intensity를 측정하여 추출물 처리에 의한 다양한 인자들의 발현 및 변화를 분석하였으며, 통계 분석은 스튜던트 T 시험법(Student's t-test)으로 수행되었다.

[0111] 상기 도 4a 내지 도 4c에 나타난 것과 같이, 과산화수소를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였을 때 세포내 NF-κB와 인산화된 ERK의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으나, 석류열수추출물 전처리에 의한 감소효과는 나타나지 않았다.

[0112] 한편, 상기 도 4d 내지 도 4f에 나타난 것과 같이, 코르티졸을 처리하여 정신적 스트레스를 유도한 실험군 또한 세포내 NF-κB와 인산화된 ERK의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 석류 열수추출물 전처리에 의하여 발현이 억제되는 현상을 관찰할 수 있었다.

[0113] 이에 석류추출물은 신경세포 보호효과의 기전은 과산화수소와 같은 산화적 스트레스에 의한 세포손상과는 기전이 다른 것으로 확인되었으며, 정신적 스트레스 호르몬인 코티졸에 의한 세포 사멸에 대한 보호효과가 특이적으로 작용되고 있음을 확인하였다.

[0114] 1-5. 석류열수추출물이 세로토닌 수용체에 미치는 영향 확인

[0115] 석류열수추출물과 우울장애와의 연관성을 확인하기 위하여 우울증 치료제의 선택적인 작용수용체로 알려진 제6형 세로토닌 수용체(5-HT₆R)가 과발현된 세포주에 석류 추출물을 처리하고, 세로토닌 수용체에 의한 특이적 신호 전달경로인 cyclic AMP의 증가/억제효과를 확인하였다.

[0116] 세포주는 5-HT₆ 수용체 유전자가 발현된 Human astrocytoma 1321N1 세포를 이용하였고, 세포를 24시간 배양 후 상등액 배지를 제거하고 phosphodiesterase inhibitors IBMX (0.5 mM, SIGMA) 와 Ro 20-1724 (0.1 mM)를 포함한 PBS로 배지 교체 후 석류 추출물 열수, 석류 20% 에탄올(주정)추출물, 석류 80% 에탄올(주정) 추출물을 농도별로 30분 처리하여 얻은 세포 용해물을 측정하였다. 석류 추출물 15분 처리 후 세로토닌을 처리하여 용해한 세포를 cAMP Assay kit (R&D Systems) 실험 방법에 따라 활성 측정하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0117] 상기 도 5에서 확인할 수 있듯이, 석류 열수추출물을 30 μg/ml에서 23%, 100 μg/ml에서 50% 수준의 뛰어난 저해효과를 갖는 것으로 확인되었으며, 석류 20% 주정추출물은 100 μg/ml에서 37% 수준의 약한 저해효과를 갖는 것을 확인하였으나, 석류 80% 주정추출물은 그 효과가 미미한 것으로 확인되었다.

[0118] **[실험예 2: *In vivo* 우울증 동물 모델 상에서 석류 추출물의 스트레스 완화 활성]**

[0119] 2-1. 실험의 준비 및 방법

[0120] 석류 추출물의 스트레스 완화 활성에 대한 효과를 확인하기 위하여, 장기간 수면박탈을 통한 극심한 스트레스 유도로 발병되는 우울증 동물 모델을 이용한 실험을 수행하였다.

[0121] 수면박탈은 장기간 수면을 박탈할 수 있는 케이지를 별도 제작하고 (21 × 25 × 27 cm), 실험동물이 겨우 설 수 있는 작은 원통을 케이지 가운데에 배치하고 물을 채워, 줄거나 꾸벅일 때 마다 물에 닿거나 빠져 깊은 잠이 들 수 없는 환경을 마련하였다. 식이는 일반 실험동물용 사료를 임의대로 제공하고 음수는 별도로 제공하지 않았으며, 대신 케이지 안에 있는 물을 매일 갈아주는 방법으로 유도하였다.

[0122] 우울증 동물 모델 쥐는 Sprague-Dawley rat(SD rat) 계통의 150 ± 10 g 정도의 수컷(샘타코)을 이용하였다. 22 내지 24 °C의 온도와 60 내지 80 % 습도 환경을 유지하고, 실험 1주일 전에 낮과 밤의 사이클을 12시간 간격으로 설정하여, 각각 5마리씩 6군으로 나누었다.

[0123] 대조군은 넓은 받침대에서 수면, 식이, 음수가 모두 자유로운 상태를 제공하였다. 음성대조군은 상기 수면박탈 동물모델 쥐에 생리식염수를 경구투여 하였고, 양성대조군은 상기 수면박탈 동물모델 쥐에 카페인(caffeine)을 10 mg/kg의 농도로 경구 투여하였다.

[0124] 실험군은 상기 수면박탈 동물모델 쥐에 석류 열수추출물을 0.1 mg/ml의 농도로 생리식염수에 녹여 1일 2회씩 경구투여 하였다.

- [0125] 2-2. *in vivo* 우울증 동물모델에서 석류 추출물의 스트레스 완화 효과 확인
- [0126] 실험이 진행되는 동안 수면박탈상태에 의한 스트레스 누적과 우울증 발생 및 이로 인한 다양한 변화 및 증상을 확인하기 위하여 실험동물의 생존율, 체중 및 다양한 행동학적 변화를 관찰하여 도 6 내지 도 8에 나타내었다.
- [0127] 도 6에 나타난 바와 같이 수면박탈상태가 지속될수록 대조군과 실험군은 물론, 양성 또는 음성대조군과 실험군 사이의 생존률에도 많은 차이가 나타났다. 수면이 자유롭게 제공된 대조군은 실험기간 동안 한 마리도 사망하지 않았으나, 수면박탈상태에 생리식염수를 투여한 음성대조군은 실험 6일째에 40%의 생존율을 보이다가 10일째에 모두 사망 하였다. 석류 추출물을 투여한 실험군은 5일 째에 80%의 생존율을 보이다가 10일째부터 실험종료일까지 60%가 생존하였다. 카페인을 투여한 양성대조군은 생존률이 5일째에 20%로 감소하여 15일째에 100%의 사망률을 보였다.
- [0128] 상기 결과를 바탕으로 수면박탈 쥐에 석류 추출물을 투여하는 하는 경우 스트레스 누적이 의하여 사망하는 것을 방지할 수 있는 효과가 있음을 확인 하였다.
- [0129] 도 7에 나타낸 바와 같이, 각 실험동물의 체중을 매일 측정하여 실험시작 전에 측정하였던 무게 대비 증가율을 측정한 결과, 대조군은 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하는 경향을 보였으나, 음성대조군은 체중이 감소하는 경향을 보였다. 그러나 수면박탈 상태에서 석류 추출물을 투여한 실험군의 경우 체중의 증가는 관찰되지 않았지만, 수면박탈 대조군(SD)에 비하여 현저하게 감소하지는 않았다.
- [0130] 설치류의 수면시간인 낮 동안에 졸림현상인 꾸벅임을 관찰하여 수면욕구 스트레스에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 수면박탈상태의 실험군에 대해서만 10분 동안 꾸벅이는 횟수를 측정하여 도 6에 나타내었다.
- [0131] 도 8에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비하여 석류 추출물을 투여한 실험군의 꾸벅임이 유의적으로 감소(* $p < 0.05$ vs SD군)하는 것을 확인할 수 있었다. 카페인을 투여한 양성대조군은 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다.
- [0132] 상기 우울증 동물모델 실험동물의 생존율, 체중 및 다양한 행동학적 변화를 관찰한 결과, 석류 추출물이 스트레스에 대한 저항성을 높여 우울증을 해소하는데 현저한 효과가 있음을 확인하였다.
- [0133] 2-3. *in vivo* 우울증 동물모델에서 뇌기능 수행능력 평가
- [0134] 수면박탈 스트레스를 통한 우울증 동물모델 상태에서 석류 추출물에 의한 실험군의 뇌기능 수행능력 및 행동변화를 평가하는데 사용하는 수동회피 실험 (passive avoidance test)을 수행하여 도 9에 나타내었다.
- [0135] 실험동물이 혐오하는 전기자극(75 V, 0.2 mA)을 가하고 24시간 후 전기자극이 주어졌던 상자 안에 다시 들어가 기까지 걸리는 시간을 측정하여, 수면박탈과 석류 추출물의 투여에 따른 뇌기능 수행능력 평가를 수행하였다.
- [0136] 도 9에 나타낸 바와 같이, 음성대조군의 경우 대조군과 비교하여 뇌기능이 감소하는 것을 확인 하였고, 실험군의 의하여 뇌기능이 다시 대조군 수준으로 회복되는 것을 확인하였는바, 석류 추출물이 뇌기능 치료에도 효과가 있음을 실험적으로 확인하였다.
- [0137] 2-4. *in vivo* 우울증 동물모델에서 석류 추출물의 반사행동에 미치는 영향 평가
- [0138] 수면박탈 스트레스를 통한 우울증 동물모델 상태에서 석류 추출물에 의한 실험군의 우울증의 주요증상인 통증에 의한 민감한 반사행동에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험으로 Hot plate 실험을 수행하고, 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0139] 온도조절이 가능한 금속판이 설치된 장비를 30℃에서 50℃까지 온도를 분당 2.5℃씩 상승하도록 조절하고 금속판 위에 실험동물을 올려놓고 실험을 진행하였다. 온도가 상승하는 동안, 실험동물을 관찰하여 발을 들어 핥거나, 발 구르기 등의 행동이 나타나는 온도를 측정하였다.
- [0140] 도 10에 나타낸 바와 같이, 비수면박탈군인 대조군, 석류 추출물만 처리한 군 및 카페인만 처리한 군의 경우 46℃ 정도의 수주에서 온도를 감지하였다, 그러나 수면 박탈군인 음성대조군의 경우 약 49℃ 정도에서 온도를 감지하였고, 수면박탈과 함께 석류 추출물을 투여한 실험군의 경우 음성대조군 보다는 감지 온도가 낮아진 것을

확인하였다.

[0141] 따라서 수면박탈에 의하여 신체능력이 감소하여 반사행동능력이 감소되나, 석류 추출물을 투여하는 경우 반사행동능력이 회복됨을 알 수 있다.

[0142] 2-5. in vivo 우울증 동물모델에서 실험동물 혈액 내 코르티졸 함량 확인

[0143] 우울증 동물모델의 시험 동물의 혈액을 채취하여 혈장을 분리하고, 스트레스 호르몬으로 알려진 코르티졸(cortisol)의 함량을 측정하여 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0144] 도 11에 나타낸 바와 같이, 석류 추출물 자체만 투여한 경우 석류추출물 자체에 의한 코르티졸 함량의 변화는 나타나지 않았으며, 수면박탈 스트레스를 통한 우울증 동물모델 상태에서 음성대조군(수면박탈)의 코르티졸 함량이 대조군에 비하여 유의적으로 증가(**p<0.01)하는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 경향은 석류 추출물 투여에 의해 유의적으로 감소(음성대조군 대비 *p<0.05)하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0145] 따라서 석류 추출물에 코르티졸의 분비를 억제하는 효과 및 상기 분비 억제를 통해서 우울증을 예방 또는 치료하는 효과가 있음을 실험적으로 확인하였다.

[0146] **[제제예]**

[0147] **제제예 1. 산제의 제조**

[0148] RRO 200 mg

[0149] 유당 100 mg

[0150] 탈크 10 mg

[0151] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조할 수 한다.

[0152] **제제예 2. 정제의 제조**

[0153] RR20E 200 mg

[0154] 옥수수전분 100 mg

[0155] 유당 100 mg

[0156] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0157] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0158] **제제예 3. 캡셀제의 제조**

[0159] RR80E 200 mg

[0160] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0161] 락토오스 14.8 mg

[0162] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0163] 통상의 캡셀제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡셀제를 제조한다.

[0164] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0165] RRO 200 mg

- [0166] 만니톨 180 mg
- [0167] 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- [0168] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg
- [0169] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

- [0170] **제제예 5. 액제의 제조**
- [0171] RRO 200 mg
- [0172] 이성화당 10 g
- [0173] 만니톨 5 g
- [0174] 정제수 적량
- [0175] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

- [0176] **제제예 6. 건강 식품의 제조**
- [0177] RR80E 1000 mg
- [0178] 비타민 혼합물 적량
- [0179] 비타민 A 아세테이트 70 μg
- [0180] 비타민 E 1.0 mg
- [0181] 비타민 B1 0.13 mg
- [0182] 비타민 B2 0.15 mg
- [0183] 비타민 B6 0.5 mg
- [0184] 비타민 B12 0.2 μg
- [0185] 비타민 C 10 mg
- [0186] 비오틴 10 μg
- [0187] 니코틴산아미드 1.7 mg
- [0188] 엽산 50 μg
- [0189] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [0190] 무기질 혼합물 적량
- [0191] 황산제1철 1.75 mg
- [0192] 산화아연 0.82 mg
- [0193] 탄산마그네슘 25.3 mg
- [0194] 제1인산칼륨 15 mg
- [0195] 제2인산칼슘 55 mg
- [0196] 구연산칼륨 90 mg
- [0197] 탄산칼슘 100 mg

[0198] 염화마그네슘 24.8 mg

[0199] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시할 수 있고, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0200] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

[0201] RRO 1000 mg

[0202] 구연산 1000 mg

[0203] 올리고당 100 g

[0204] 타우린 1 g

[0205] 정제수를 가하여 전체 900 ml

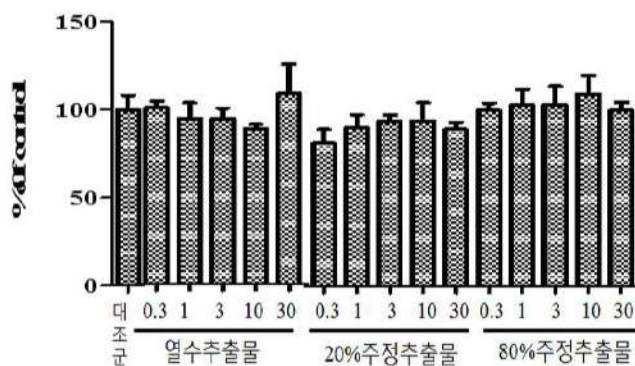
[0206] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 상기 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0207] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시 할 수 있다.

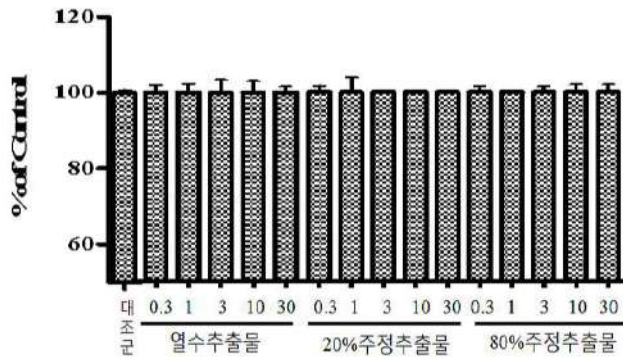
[0208] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

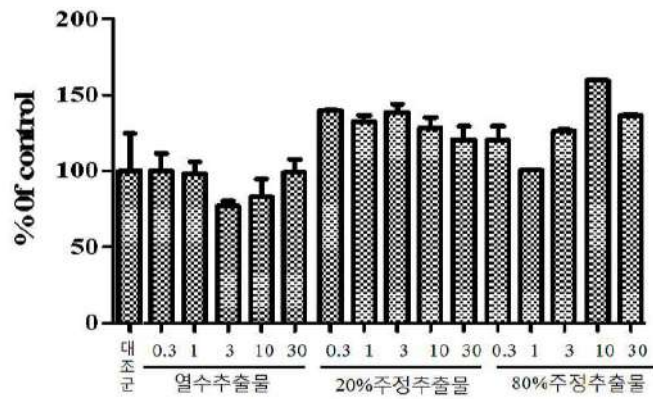
도면1a



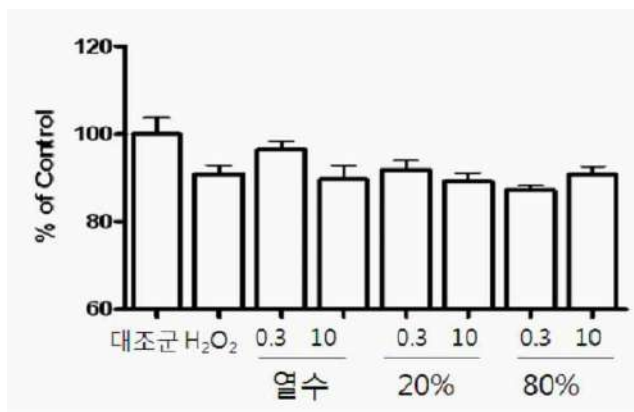
도면1b



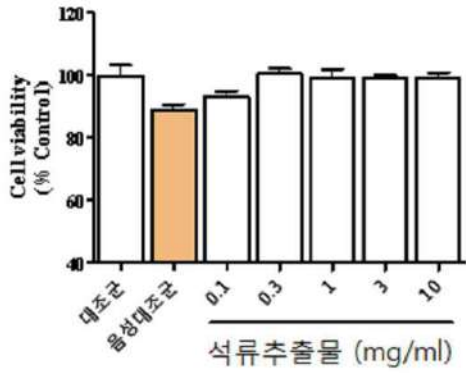
도면1c



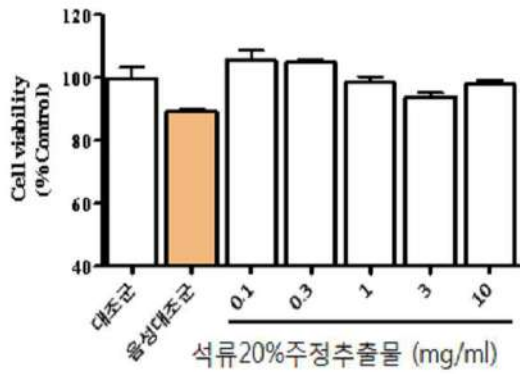
도면2



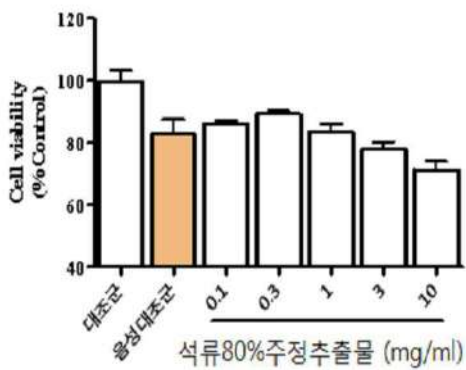
도면3a



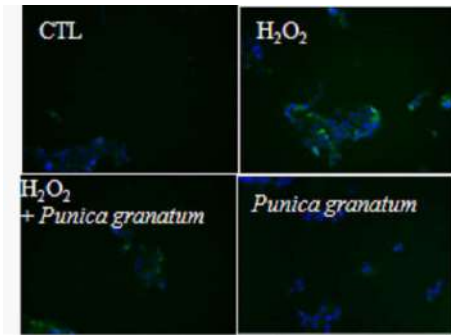
도면3b



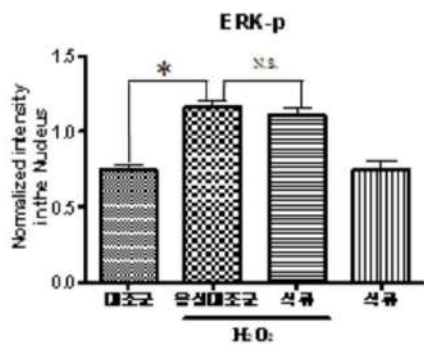
도면3c



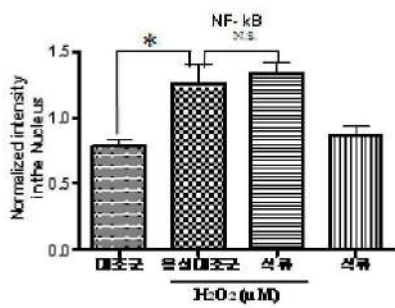
도면4a



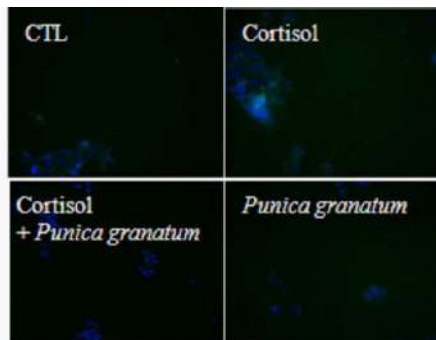
도면4b



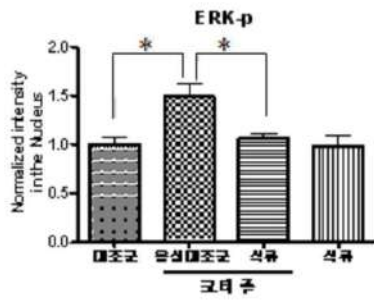
도면4c



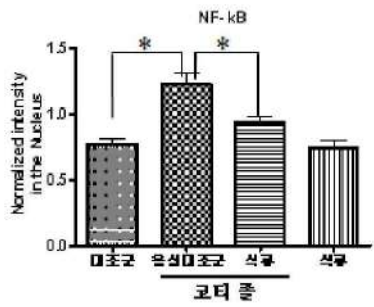
도면4d



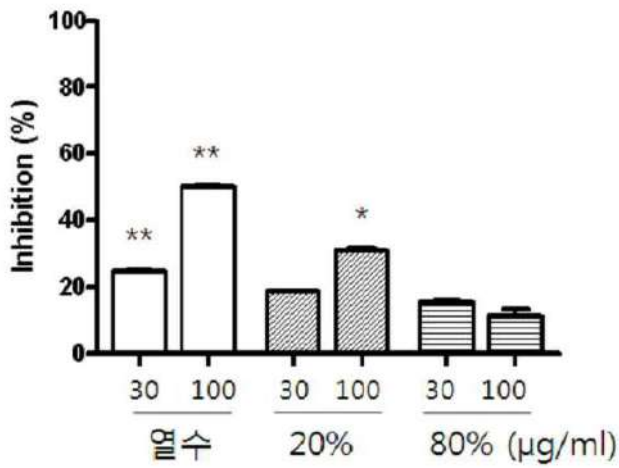
도면4e



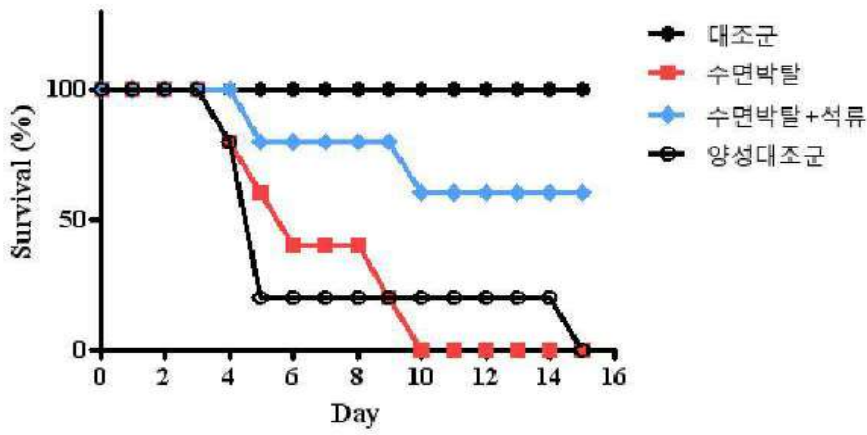
도면4f



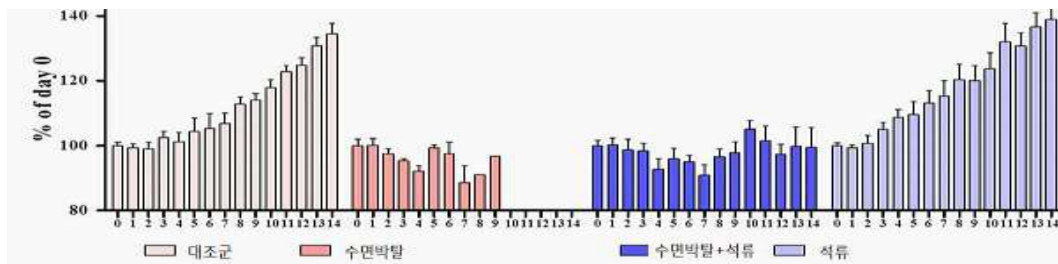
도면5



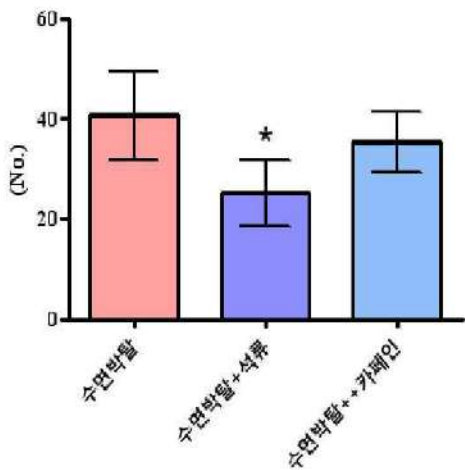
도면6



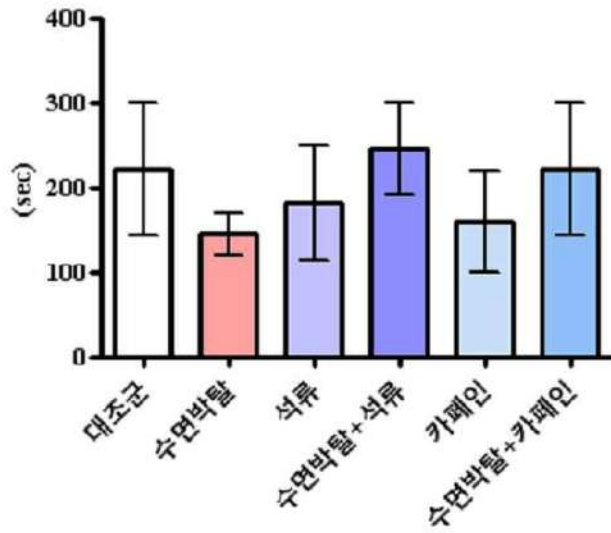
도면7



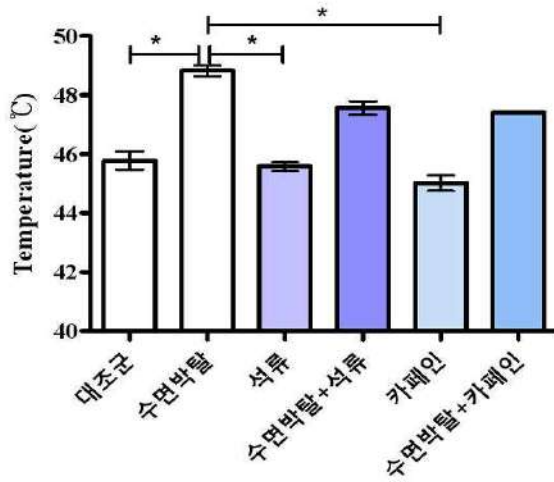
도면8



도면9



도면10



도면11

