



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월20일
(11) 등록번호 10-1829583
(24) 등록일자 2018년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/45 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/45 (2013.01)
A61K 9/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0068604
(22) 출원일자 2017년06월01일
심사청구일자 2017년06월01일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160025414 A
Molecular nutrition & food research, 2015,
59(6), 1130-1142*
Journal of Functional Foods, 2014, 11, 62-70*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
(72) 발명자
최철웅
광주광역시 서구 풍암순환로 10 호반중흥1단지 아
파트 105동 203호
오들리
전라남도 화순군 화순읍 광덕로 202 부영5차아파
트 503동 203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최석진

전체 청구항 수 : 총 5 항

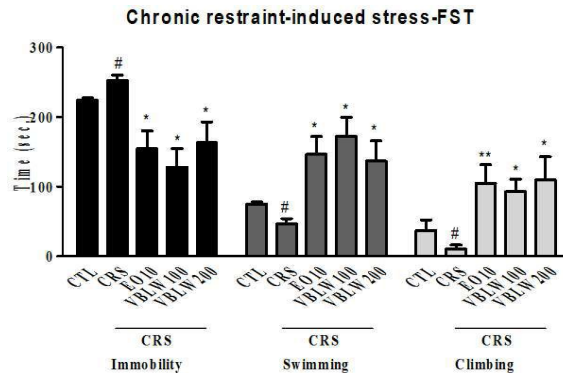
심사관 : 민경남

(54) 발명의 명칭 모새나무(Vaccinium bracteatum Thunb.) 잎 추출물을 포함하는 스트레스성 질환 및 우울증 예 방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 우리나라 천연자원인 모새나무 잎 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함으로써 제조 원료를 자연에 서식하는 식물 로 대체함으로 제조생산단가 절감과 수입대체 및 수출효과를 기대할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 9/16 (2013.01)

A61K 9/20 (2013.01)

A61K 9/48 (2013.01)

(72) 발명자

김유진

전라남도 장흥군 장흥읍 건산리 동교1길 16, 302호

최은진

전라남도 담양군 무정면 내당길 31-2

이현미

광주광역시 동구 무등로 417-9 (산수동, 동진맨션) 2동 304호

배동혁

전라남도 화순군 화순읍 칠층로 61-28 104동 401호 (대리, 대성베르힐아파트)

오교녀

광주광역시 서구 월드컵4강로28번길 50-18 101동 403호 (화정동, 광명아파트)

정명아

전라남도 화순군 화순읍 대리길 41, 광신프로그램스 101동 1805호

홍지애

전라남도 화순군 화순읍 대리길 41, 광신프로그램스 101동 1205호

김광수

전라남도 장흥군 장흥읍 읍성로 153-2

강후원

광주광역시 남구 독립로 70-1 (백운동, 우방아이유헬아파트) 107동 402호

김재용

전라남도 순천시 왕궁길 60 (조례동, 중흥3차아파트) 304동 207호

반상오

전남 화순군 화순읍 대리길 41 광신프로그램스 101동 1805호

박성윤

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 215 부영6차아파트 606동 705호

성락선

전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39 (수창아트빌아파트) 203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0003950

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국과학기술진흥원(KIAT)

연구사업명 창의산업거점기관지원사업

연구과제명 바이오상용기술고도화 플랫폼 구축 사업

기 여 율 1/1

주관기관 (재)전남생물산업진흥원 천연자원연구센터

연구기간 2015.04.01 ~ 2020.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 모새나무 잎 추출물은 물, 에탄올, 메탄올 이들의 혼합물로 추출된 것 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 모새나무 잎 추출물의 1일당 투여량은 체중 kg당 0.1 내지 2000 mg의 함량으로 제공되는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 조성물의 제공은 정제 및 캡슐제, 과립제, 액제 형태로 제조되는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항의 약학적 조성물이 0.01 내지 99.9 중량%의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 치료용 약제

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 천연원료인 모새나무 잎 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인간이 심리적 혹은 신체적으로 감당하기 어려운 상황에 처했을 때 느끼는 불안과 위협의 감정을 스트레스라 하며, 스트레스 반응으로는 불안, 우울, 초조와 같은 심리적 반응이나 식욕 저하와 같은 신체적 반응이 나타난다.

[0003] 우울증은 의욕 저하와 우울감을 주요 증상으로 하여 다양한 인지 및 정신 신체적 증상을 일으켜 일상 기능의 저하를 가져오는 질환을 말한다. 우울장애는 감정, 생각, 신체 상태, 그리고 행동 등에 변화를 일으키는 심각한 질환으로 한 개인의 전반적인 삶에 영향을 준다. 우울증은 일시적인 우울감과 다르며 개인적인 약함의 표현이거나 의지로 없앨 수 있는 것이 아니다.

[0004] 우울장애는 매우 흔한 정신질환의 하나로, 국가에 따른 비교에서 유병률의 차이를 많이 보인다. 미국이나 유럽, 뉴질랜드 등은 주요 우울장애 평생 유병률이 10.1%~16.6%로 높은 수준을 보이는데 비하여, 한국이나 중국을 비롯한 비서구권국가에서는 5% 이하의 낮은 수준의 유병률을 보인다.

[0005] 2011년 보건복지부의 정신질환상태 역학조사에서는 주요우울장애 평생유병률이 6.7%, 일년유병률이 3.1%로서 2006년 역학연구에 비하여 다소 높은 수준의 유병률을 보이나, 서구권 국가에 비하여 낮은 수준이며, 비서구권 국가들과는 비슷한 수준이거나 다소 높은 수준이었다. 우울증의 분명한 원인에 대해서는 아직 명확하지 않으나 다른 정신 질환과 같이 다양한 생화학적, 유전적 그리고 환경적 요인이 우울증을 야기할 수 있다. 우울증은 다른 질환과는 달리 전문가의 적절한 치료를 받으면 상당한 호전을 기대할 수 있고 이전의 정상적인 생활로 돌아가는 것이 가능하다.

[0006] 한편 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.)는 진달래목의 쌍떡잎 속씨식물로 해변의 산지에서 자란다. 높이가 1~3m로, 작은가지는 회갈색에서 회색이고 거의 털이 없다. 잎은 어긋나고 두꺼우며 타원형 또는 긴 타원형으로 두꺼운 가죽같은 질감을 갖는다. 가장자리에 잔 톱니가 있으며 뒷면 밑에 작은 선점(腺點)이 있으며, 꽃은 6월에 피고 홍백색이 돌며 밑으로 처지는 총상꽃차례[總狀花序]에 종처럼 생긴 꽃이 10여 개씩 달리고 포(苞)가 남아 있다. 열매는 장과로 둥글고 흰가루로 덮이며 지름 6mm 정도로 10월에 익으며 먹을 수 있다.

[0007] 최근 현대인의 생활수준이 향상됨에 따라 부작용이 거의 없고 자연에서 채취가 가능한 천연자원에 대해서 관심이 높아지고 있다. 특히, 인체에 필요한 영양소를 우수하게 함유하거나 질병의 예방과 회복에 특이하게 도움을 주는 천연 기능성물질을 함유한 건강식품에 대한 연구가 활발히 진행됨에 따라 모새나무 또한 그 기능에 대한 조사가 실시되고 있으나, 아직까지는 영양학적 가치나 생리활성 기능성에 대한 관련정보가 부족한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국내 공개특허 제10-2016-0025414호에서는 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방, 치료 또는 개선용 약학적 조성물 및 식품 조성물을 개시하고 있다.

(특허문헌 0002) 국내 등록특허 제10-1230644호에서는 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.)의 추출물을 함유하는 피부미백용 화장품 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 화장품 조성물은 피부에 안전하고 인간 타이로시나제 활성을 억제함으로써 멜라닌 생성억제효과를 가져 피부 미백 효과를 가지는 모새나무 추출물을 함유하는 피부미백용 화장품 조성물을 개시하고 있다.

(특허문헌 0003) 국내 등록특허 제10-1016787호에서는 상업 추출물, 이의 다이클로로메탄 분획물 또는 이로부터 분리된 활성분획물 또는 퍼퓨린-7 디메틸 에틸에스테르, 하이드록시-페오포르바이드 A 에틸에스테르, 페오포르바이드 A 에틸에스테르, 디데하이드로-로도클로린 에틸메틸에스테르, 하이드록시 페오포르바이드 A 메틸에스테르 또는 페오포르바이드 A 메틸에스테르 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 식욕 억제, 우울증의 예방 및 개선, 또는 불안증의 예방 및 개선용 식품 조성물을 개시하고 있다.

(특허문헌 0004) 국내 등록특허 제10-0780333호에서는 복분자 추출물을 포함하는 불안, 우울증 및 치매의 예방 및 치료와 기억 증진용 조성물에 관한 것으로, 각종 스트레스, 폐경, 음주, 흡연 등 환경적 요인으로 인하여 호르몬 및 신경전달물질의 변화와 뇌손상을 받고 있는 현대인들의 불안, 우울증 및 치매의 예방 및 치료와 기억력 증진 효과를 유발하는 약제 및 건강보조식품에 이용할 수 있는 복분자 추출물을 포함하는 불안 및 우울증의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 생리활성기능에 대해서는 확실하게 알려지지 않은 천연자원인 모새나무의 기능성 식품 조성물 및 약학적 조성물을 제공하기 위해, 모새나무 열매로부터 유효성분을 추출하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 모새나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 우리나라 천연자원인 모새나무 잎 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 기능성 식품 조성물의 추출방법은 모새나무 잎 400 g을 증류수 8 L를 가하고, 환류추출기를 이용하여 100℃에서 온도가 올라간 후 3시간 동안 가열, 추출하여 얻어진 추출물을 감압 필터 후 감압 농축하여 31.52 g의 농축액을 얻었다.
- [0012] 상기 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 중 어느 하나에서 가용한 추출물을 유효성분으로 포함하는 추출물은 0.01 내지 99.9 중량%의 양으로 포함하는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 정제 및 캡슐제, 연질 캡슐제, 과립제, 액제 또는 음료 중에서 선택된 하나 이상의 형태로 제조될 수 있다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명은 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 잎 추출물은 사지를 전혀 움직이지 않는 부동시간을 감소시키므로 항우울 효과가 뛰어났으며, 80% 메탄올 추출물보다 열수 추출물에서 항우울 효과가 높게 관찰되어 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 활용가능하며, 또한 제조 원료를 자연에 서식하는 식물로 대체함으로써 제조생산단가 절감과 산업화를 통한 수입대체 및 수출효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 모새나무 잎 추출물을 1일 투여한 생쥐에 대한 forced swimming test (FST)에 있어서, 부동 시간 (immobility time), 수영 시간 (swimming time), 기어오른 시간 (climbing time)을 대조군, 에스시탈로프람 옥살산염 투여군 생쥐와 비교한 그래프를 나타낸다.
- 도 2은 본 발명의 모새나무 잎 추출물을 6일 투여한 생쥐에 대한 forced swimming test (FST)에 있어서, 부동 시간 (immobility time), 수영 시간 (swimming time), 기어오른 시간 (climbing time)을 대조군, 에스시탈로프람 옥살산염 투여군 생쥐와 비교한 그래프를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 모새나무 잎 추출물을 투여한 생쥐에서 스트레스 호르몬 수준에 있어서 대조군, 에스시탈로프람 옥살산염 투여군 생쥐와 비교한 그래프를 나타낸다.
- 도 4은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 만성 구속스트레스로 유도된 생쥐에서 forced swimming test (FST)에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 만성 구속스트레스로 유도된 생쥐에서 open field test (OFT)에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 만성 구속스트레스로 유도된 생쥐에서 스트레스 호르몬 수준에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 만성 구속스트레스로 유도된 생쥐의 해마 (HC) 부위에서 신경전달물질인 세로토닌, 노르에피네프린, 도파민 수준에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 만성 구속스트레스로 유도된 생쥐의 전전두피질 (PFC)부위에서 신경전달물질인 세로토닌, 노르에피네프린, 도파민 생성에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 9은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 SH-SY5Y 세포 (neuroblastoma, human dopaminergic neuronal cell)에 미치는 세포독성 정도 및 정신적 스트레스 호르몬인 Corticosterone 처리를 통한 신경세포독성 유도에 미치는 신경세포 보호효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 10은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 PI3K/Akt 및 PKA/ERK signaling pathway를 통해 신경세포보호 효과를 나타냄을 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 5-HT₆ 수용체 유전자가 발현된 세포주에서 5-HT 에 의해 유도된 세포 내 cAMP의 증가를 억제하는 효과를 나타낸 그래프를 나타낸다.

도 12은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 5-HT_{2A} 수용체 유전자가 발현된 세포주에서 5-HT 에 의해 유도된 세포 내 Ca²⁺의 증가를 억제하는 효과를 나타낸 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 1. 모새나무 잎 열수 추출물의 제조

[0016] 모새나무 잎 400 g을 증류수 8 L를 가하고, 환류추출기를 이용하여 100℃에서 온도가 올라간 후 3시간동안 가열, 추출하였다. 얻어진 추출물을 감압 필터 후 감압 농축하여 31.52 g 의 농축액을 얻었다.

[0017] 2. 모새나무 잎 80% 메탄올 추출물의 제조

[0018] 모새나무 잎 20 g을 80 % 메탄올 20L를 가하고, 환류추출기를 이용하여 100℃에서 온도가 올라간 후 3시간동안 가열, 추출하였다. 얻어진 추출물을 감압 필터 후 감압 농축하여 6.99 g 의 농축액을 얻었다.

[0019] 3. 실험동물 및 사육

[0020] 모새나무 잎 추출물의 항우울 효과 측정을 위한 실험동물로서 생후 6주령 된 수컷 ICR 마우스를 ㈜샘타코 (SAMTACO, Korea)부터 구입하여 동물 사육실에서 일정한 조건 (온도: 22±2℃, 습도:50±5%, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 일주일간 적응시킨 후 사용하였다.

[0021] 4. 모새나무 잎 추출물을 이용한 정상 쥐에서 항우울 동물행동실험

[0022] 수컷 ICR 마우스에 본 발명의 모새나무 잎 추출물을 경구투여 하였으며, 비교군으로는 항우울제로 사용되는 에스시탈로프람 옥살산염을 경구투여하였다. 이들은 실험에 따라 1일 또는 6일 투여하였다.

[0023] Forced swimming test (FST)는 본 시험 (post-swim) 전날에 예비실험 (pre-swim)으로 원통모양의 수조 (직경 20 cm, 높이 40 cm)에 25℃ 내외의 수돗물을 실린더 바닥에서부터 15 cm까지 부은 후, 생쥐를 집어넣고 15분간 강제로 수영을 시키고, 물에서 건져 올려 마른 수건으로 닦고 사육상자로 돌려보냈다. 약물 투여 1일 또는 6일 후에 본 시험 (post-swim)을 시행하였으며, 실린더에 생쥐를 넣고 6분 동안 강제 수영을 시행하면서 비디오 촬영을 하였다. 기록된 영상에서 최초 1분간을 제외하고, 나머지 5분 동안 동물의 행동을 3가지로 분류하여 분석하였는데, 동물이 얼굴을 포함한 상체의 일부뿐만 수면 위로 드러낸 채 약간의 움직임만 나타낼 뿐 물위에 떠 있는 행동 (부동자세, immobility behavior), 실린더 주위를 수평방향으로 움직이면서 앞발과 뒷발을 물장구를 치는 행동 (수영, swimming behavior), 벽을 향해 앞발을 물 밖으로 차올리는 다소 격렬하게 움직이면서 벽을 긁는 행동 (기어오르기, climbing behavior)으로 구분하여 각각의 시간을 측정하였다.

[0024] 도 1은 본 발명의 모새나무 잎 추출물을 1일간 투여한 흰쥐에 대한 강제수영시험법에 있어서, 부동 시간 (immobility time), 수영 시간 (swimming time), 기어오른 시간 (climbing time)을 대조군, 에스시탈로프람 옥살산염 투여군 생쥐와 비교한 그래프를 나타낸다. 도 1 에 도시된 바와 같이, 각 약물을 1일 투여 후 강제 수영 시키는 동안 부동시간은 대조군 (234.59 ± 5.95 초) 과 비교하여 볼 때 비교군인 에스시탈로프람 옥살산염은 194.65 ± 11.55 초, 모새나무 잎의 열수 추출물 (VBLW 100 및 200mg/kg p.o)은 각각 155.14 ± 11.14 초, 173.78 ± 6.95 초, 모새나무 잎의 80% 메탄올 추출물 (VBL80%M 100 및 200mg/kg p.o)은 각각 191.83 ± 5.21 초, 189.81 ± 11.41 초로 모새나무 잎의 열수 추출물 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다 (P < 0.05). 그리고 기어 오른 시간은 대조군 (3.34 ± 0.88 초)과 비교하여 볼 때 비교군인 에스시탈로프람 옥살산염은 12.43 ± 3.47 초, 모새나무 잎의 열수 추출물 (100 및 200mg/kg p.o)은 각각 21.50 ± 3.02 초, 15.87 ± 1.72 초, 모새나무 잎의 80% 메탄올 추출물 (100 및 200mg/kg p.o)은 각각 25.45 ± 2.64 초, 15.22 ± 2.48 초로 유의성 있게 증가를 보였다 (P < 0.05).

[0025] 도 2은 본 발명의 모새나무 잎 추출물을 6일간 투여한 흰쥐에 대한 강제수영시험법에 있어서, 부동 시간 (immobility time), 수영 시간 (swimming time), 기어오른 시간 (climbing time)을 대조군, 에스시탈로프람 옥

살산염 투여군 생쥐와 비교한 그래프를 나타낸다. 도 2 에 도시된 바와 같이, 각 약물을 6일 투여 후 강제 수영 시키는 동안 부동시간은 대조군 (245.48 ± 4.05 초) 과 비교하여 볼 때 비교군인 에스시탈로프람 옥살산염은 169.65 ± 7.15 초, 모새나무 잎의 열수 추출물 (VBLW 100 및 200mg/kg p.o)은 각각 125.85 ± 7.90 초, 91.66 ± 12.86 초, 모새나무 잎의 80% 메탄올 추출물 (VBL80%M 100 및 200mg/kg p.o)은 각각 166.34 ± 8.36 초, 198.01 ± 4.73 초로 모새나무 잎 추출물 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다 ($P < 0.01$ and $P < 0.001$).

[0026] 그리고 수영 시간은 대조군 (51.82 ± 3.38 초)과 비교하여 볼 때 비교군인 에스시탈로프람 옥살산염은 128.16 ± 6.65 초, 모새나무 잎의 열수 추출물 (VBLW 100 및 200mg/kg p.o)은 각각 168.56 ± 7.28 초, 198.95 ± 14.33 초, 모새나무 잎의 80% 메탄올 추출물 (VBL80%M 100 및 200mg/kg p.o)은 각각 123.06 ± 7.69 초, 100.71 ± 4.68 초로 유의성 있게 증가를 보였다 ($P < 0.01$ and $P < 0.001$).

[0027] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 모새나무 잎 추출물은 사지를 전혀 움직이지 않는 부동시간을 감소시키므로 항우울 효과가 뛰어났으며, 80% 메탄올 추출물보다 열수 추출물에서 항우울 효과가 높게 관찰되었다.

[0028] **5. 모새나무 잎 추출물을 이용한 정상 쥐에서 혈청 내 스트레스호르몬인 코르티코스테론 (corticosterone) 측정**

[0029] 정상적인 상태에서 스트레스 호르몬인 코르티코스테론의 농도 변화에 미치는 영향을 각 약물 6일 투여 후 생쥐로부터 혈청 (serum)를 분리하여 Abnova ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

[0030] 도 3은 본 발명의 모새나무 잎 추출물을 투여한 생쥐의 혈청에서 스트레스 호르몬인 코르티코스테론 측정한 결과로, 모새나무 잎의 열수 추출물 (VBLW 100 및 200 mg/kg) 투여군은 스트레스 호르몬인 코르티코스테론 수치가 대조군 (control, 1943.10 ± 175.29 pg/ml) 과 비교하여 볼 때 비교군인 에스시탈로프람 옥살산염은 764.57 ± 97.50 pg/ml, 모새나무 잎의 열수 추출물 (VBLW 100 및 200 mg/kg p.o)은 각각 396.22 ± 75.73 pg/ml, 218.26 ± 34.16 pg/ml, 모새나무 잎의 80% 메탄올 추출물 (VBL80%M 100 및 200 mg/kg p.o)은 각각 608.10 ± 121.11 pg/ml, 420.92 ± 99.83 pg/ml 로 유의성 있게 스트레스 호르몬 농도가 감소하였다 ($P < 0.05$ and $P < 0.01$).

[0031] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 모새나무 잎 추출물은 강제수영시험법에 의하여 증가하는 스트레스호르몬을 감소시키므로 스트레스에 의해 증가한 corticosterone level을 유의적으로 감소시켰다.

[0032] **6. 모새나무 잎 추출물을 이용한 만성 구속 스트레스 (Chronic restraint stress, CRS) 에서의 항우울 동물행동 실험**

[0033] 수컷 ICR 마우스를 구입하여, 만성 구속 스트레스 (CRS) 는 3주간 하루 6시간 동안 (a.m 11시 ~ p.m 5시) 높이 20 cm, 직경 7 cm 의 아크릴 상자에 마우스를 넣어서 지속적인 구속스트레스를 부여하였다. 모새나무 잎의 열수 추출물은 각 농도별로 매일 동일시간에 구속 스트레스를 주기 30분 전에 경구 투여하였으며, 대조군 (control) 은 동일 부피의 saline을 투여하였고, 비교군으로는 항우울제로 사용되는 에스시탈로프람 옥살산염을 경구 투여하였다. 3주간의 구속 스트레스에 의한 자극이 끝난 다음 날에 동물행동평가는 진행하였으며, Forced swimming test (FST)를 평가하기 전에 Open field test (OFT)를 먼저 측정하였다. FST 평가가 끝난 다음에 부검하여 전혈채취 및 적출한 뇌 조직은 해마 (hippocampus)와 전전두피질 (prefrontal cortex)로 바로 분리하여 -70°C 에 보관하여 실험에 사용하였다.

[0034] 도 4은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 만성 구속스트레스로 유도된 생쥐에서 forced swimming test (FST)에 대한 효과를 나타낸 그래프이다. 도 4 에 도시된 바와 같이, 3주간 CRS 부여와 각각의 약물을 처치가 끝난 다음 날에 FST를 시행한 결과, 부동시간은 대조군 (224.22 ± 1.99 초) 과 비교하여 볼 때 구속스트레스군 (CRS)은 252.29 ± 4.67 초, 양성대조군 에스시탈로프람 옥살산염 (EO 10mg/kg p.o)은 154.74 ± 14.80 초, 모새나무 잎 열수 추출물 (VBLW 100 및 200 mg/kg p.o)은 각각 127.81 ± 18.28 초, 183.49 ± 15.27 초로 유의성 있는 감소를 보였다 ($P < 0.05$). 그리고 수영 시간은 대조군 (74.95 ± 1.90 초)과 비교하여 볼 때 구속스트레스군은 46.67 ± 4.29 초, 양성대조군 에스시탈로프람 옥살산염은 146.58 ± 14.84 초, 모새나무 잎 열수 추출물 (VBLW 100 및 200 mg/kg p.o)은 각각 172.40 ± 18.31 초, 116.91 ± 15.11 초로 유의성 있게 증가를 보였다 ($P < 0.05$). 또한, 기어오르기 시간은 대조군 (37.06 ± 8.90 초)과 비교하여 볼 때 구속스트레스군은 10.43 ± 3.37 초, 양성대조군 에스시탈로람 옥살산염은 105.23 ± 15.37 초, 모새나무 잎 열수 추출물 (VBLW 100 및 200 mg/kg p.o)은 각각 92.93 ± 11.98 초, 79.50 ± 20.75 초로 유의성 있게 증가를 보였다 ($P < 0.05$).

- [0035] Open field test (OFT) 는 실험동물의 활동성을 측정하는 평가법으로 동물의 활동성이 약물의 항불안 및 항우울 작용에 미치는 효과를 확인하는 실험방법이다. OFT 박스는 바닥면에 25분획되어 있는 직경 60 cm x 높이 20 cm 의 네모난 상자에 실험동물을 한 마리씩 넣어서 5분간 자발적으로 이동한 칸의 횟수를 측정하여 각 군마다 평균 값을 이용하여 활동성을 비교하였다.
- [0036] 도 5은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 만성 구속스트레스로 유도된 생쥐에서 open field test (OFT) 에 대한 효과를 나타낸 그래프이다. 도 5 에 도시된 바와 같이, control군 (133.09 ± 1.86 칸) 에 비해 구속스트레스군 (CRS, 88.00 ± 4.82 칸) 이 이동한 칸 횟수가 감소하였으며, 그에 반해 양성대조군 에스시탈로프람과 모새나무 잎 열수 추출물 (VBLW 100 및 200 mg/kg p.o)은 각각 182.73 ± 5.60 칸, 147.00 ± 3.64 칸, 158.22 ± 2.64 칸으로 구속스트레스군보다 활동성이 증가함을 확인할 수 있었다 ($P < 0.01$ and $P < 0.001$).
- [0037] **7. 모새나무 잎 추출물을 이용한 만성 구속 스트레스 (Chronic restraint stress, CRS) 에서의 혈청 내 스트레스 호르몬 및 해마 (hippocampus)와 전전두피질 (prefrontal cortex) 내 신경전달물질 측정**
- [0038] 3주간 구속스트레스 자극과 약물 투여한 다음날, 스트레스와 연관되는 혈청 코르티코스테론 수준과 적출한 뇌의 해마와 전전두피질에서 신경전달물질 (serotonin, dopamine, norepinephrine)에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0039] 도 6 에 도시된 바와 같이, 혈청 코르티코스테론 수치는 control군 (CTL)에 비해 구속스트레스군 (CRS)에서 유의적으로 증가하였고 ($P < 0.05$), 모새나무 잎의 열수 추출물군 (VBLW 100 및 300 mg/kg p.o)에서 구속스트레스군과 비교하여 유의적으로 스트레스호르몬인 코르티코스테론 수준이 감소하였다 ($P < 0.05$).
- [0040] 도 7과 8은 본 발명의 모새나무 잎 추출물이 만성 구속스트레스로 유도된 생쥐의 해마(hippocampus, HC)와 전전두피질 (prefrontal cortex, PFC) 부위에서 신경전달물질인 serotonin, norepinephrine, dopamine levels에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0041] 도 7 에 도시된 바와 같이, 해마부위에서 신경전달물질 (serotonin, norepinephrine, dopamine) 수준은 control군 (CTL)에 비해 구속스트레스군 (CRS)에서 감소하는 경향을 확인할 수 있었으며, 모새나무 잎의 열수 추출물군 (VBLW 100 mg/kg p.o)에서는 구속스트레스군과 비교하여 serotonin 과 norepinephrine수준이 유의적으로 증가하는 경향을 확인하였고 ($P < 0.05$), dopamine 수준에서는 모새나무 잎의 열수 추출물군 (100 및 200 mg/kg p.o)에서 유의적으로 증가하였다 ($P < 0.05$ and $P < 0.01$).
- [0042] 도 8 에 도시된 바와 같이, 전전두피질에서 신경전달물질 (serotonin, norepinephrine, dopamine) 수치는 control군 (CTL)과 비교하여 구속스트레스군 (CRS)에서 유의적으로 감소하였고 ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), 모새나무 잎의 열수 추출물 투여군 (VBLW 100 mg/kg p.o)에서는 구속스트레스군과 비교하여 serotonin과 dopamine 수준이 유의적으로 증가하였다 ($P < 0.01$). 모새나무 잎의 열수 추출물 투여군 (VBLW 100 및 200 mg/kg p.o)에서 norepinephrine 수준은 구속스트레스군과 비교하여 증가적인 경향을 보였으나 유의적 차이는 없었다.
- [0043] **8. 모새나무 잎 추출물을 이용한 뇌 신경세포인 SH-SY5Y 세포에서 스트레스 완화 활성 확인**
- [0044] SH-SY5Y cell (neuroblastoma, human dopaminergic neuronal cell) 을 1% antimicrobics/antibiotics와 10% FBS를 함유한 MEM 배지에서 배양하고 96-well plate에 세포수가 10^5 cell/ml가 되도록 seeding 한 후 24시간 배양하였다. 모새나무 잎 추출물이 신경세포에 미치는 세포독성을 확인하기 위하여 농도별로 처리하였다. 모새나무 잎의 열수추출물 처리 24시간 후, MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다.
- [0045] 도 9A은 모새나무 잎 추출물의 cytotoxicity를 측정하여 사용농도의 최대안전범위를 설정하였다. 사용 세포주는 SH-SY5Y 세포로서 모새나무 잎의 열수추출물 농도 1, 3, 10, 30, 100 μ g/ml 로 처리하여 세포독성 확인을 수행하였으며, 1, 3, 10, 30 μ g/ml 에서는 control (0 μ g/ml)과 비교하여 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 하지만 100 μ g/ml 농도에서는 control 군과 비교하여 유의적으로 세포 생존도가 감소하였다 ($P < 0.05$). 본 실험의 결과로 30 μ g/ml 내에서 실험을 수행하였다.
- [0046] 모새나무 잎 추출물의 정신적 스트레스에 대한 저항 활성을 세포수준에서 확인하기 위하여 스트레스 호르몬인 코르티코스테론이 유발하는 신경세포 손상에 보호효과를 확인하기 위하여 실험을 하였다. 사용 세포주는 SH-SY5Y 세포로서 코르티코스테론 (corticosterone)을 농도별로 24시간 처리하여 세포독성을 확인하여 50-60% 세포 독성을 보이는 농도를 결정하여 실험에 사용하였다 (data not shown). 모새나무 잎 추출물의 신경세포 보호효과

확인은 실험 세포주를 96-well microplate에 분주하여 24시간 배양한 다음, 모새나무 잎 추출물을 2시간 처리하고 1mM 코르티코스테론을 처리하여 24시간 배양시켰다. 24시간 후, 세포 생존율 (cell viability)는 MTT assay를 이용하여 측정하였다.

[0047] 도 9B 은 정신적 스트레스 호르몬인 코르티코스테론 처리를 통한 신경세포 손상에 모새나무 잎 추출물의 신경세포보호효과를 나타낸 그래프이다. 코르티코스테론의 사용농도는 50-60% 세포독성을 보이는 1mM을 실험에 사용하였으며, 코르티코스테론과 함께 모새나무 잎의 열수추출물을 처리하였을 때, 3, 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포생존도가 유의적으로 증가한 것을 확인하였다 ($P < 0.01$).

[0048] 모새나무 잎 추출물의 코르티코스테론이 유도하는 신경세포 손상에 대한 신경세포보호효과의 작용 signaling pathway를 확인하고자 실험하였다. 사용세포주는 SH-SY5Y 세포로서 PI3K (phosphoinositide 3-kinase), mTOR, PKA (protein kinase A) 및 MAPK/ERK kinase pathway의 pharmacological inhibitors 인 wortmanin, rapamycin, H89 및 PD98059를 1시간 세포에 전처리한 다음, 모새나무 잎의 열수추출물 (3 $\mu\text{g/ml}$)를 2시간동안 처리하였다. 약물처리 2시간 뒤 코르티코스테론 (1mM)을 24시간동안 처리한 다음 세포 생존율 (cell viability)는 MTT assay를 이용하여 측정하였다.

[0049] 도 10 은 PI3K, mTOR, PKA 및 MAPK/ERK kinase (MEK) 의 pharmacological inhibitors를 처리한 상태에서 모새나무 잎의 열수 추출물의 신경세포보호효과에 미치는 signaling pathway 을 나타낸 그래프이다.

[0050] 실험에 사용한 inhibitor만 처리하여 세포생존에 미치는 효과를 확인하였는데, PI3K inhibitor 인 wortmanin 의 mTOR inhibitor (rapamycin), PKA inhibitor (H89), MAPK/ERK kinase (MEK) inhibitor (PD98059)를 24시간 처리한 상태에서는 세포독성이 나타나지 않았다. 코르티코스테론이 처리된 군 (54.45 \pm 4.04 %) 과 비교하여 모새나무 잎의 열수추출물 (VBLW) 3 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리된 군이 75.21 \pm 1.75 % 의 보호효과를 보였다 ($P < 0.05$). pharmacological inhibitors 와 모새나무 잎의 열수추출물 그리고 코르티코스테론을 처리한 군에서는 코르티코스테론과 모새나무 잎의 열수추출물이 처리된 군과 비교하여 PI3K inhibitor (44.84 \pm 1.40 %, $P < 0.001$), mTOR inhibitor (52.46 \pm 2.82 %, $P < 0.01$), PKA inhibitor (51.08 \pm 2.27 %, $P < 0.05$), MEK inhibitor (50.34 \pm 2.31 %, $P < 0.01$)으로 유의적으로 신경세포보호효과를 차단하는 것을 볼 수 있었다.

[0051] 따라서 이 결과를 토대로, 모새나무 잎의 열수추출물이 코르티코스테론이 유도하는 세포손상에서 PI3K/AKT 및 PKA/ERK signaling pathway를 통해 신경세포보호효과를 나타낸다.

[0052] **9. 모새나무 잎 추출물을 이용한 5-HT₆ 수용체 유전자가 발현된 세포주에서 cyclic AMP 활성 측정**

[0053] 세포주는 human serotonin 5-HT₆ receptor gene 발현된 stably Human astrocytoma 1321N1 cells를 Perkin Elmer로부터 구입하여 이용하였고, 세포를 24시간 배양 후 상등액 배지를 제거하고 phosphodiesterase inhibitors IBMX (0.5 mM) 와 Ro 20-1724 (0.1 mM)를 포함한 1X PBS로 배지 교체 후 모새나무 잎의 열수 추출물을 농도별로 30분 처리하여 얻은 cell lysate를 측정하였다 (약물단독시료). 또한 모새나무 잎 추출물을 15분 처리 후 5-HT 100 μM 을 15 분 처리한 cell lysate (약물전처리시료, 약물+5-HT) 는 R&D Systems cAMP Assay kit 실험 방법에 따라 측정하였다.

[0054] 도 11 에 도시된 바와 같이, 모새나무 잎의 열수 추출물 단독 처리 시, cyclic AMP 활성에 미치는 효과는 없음을 확인할 수 있었다. 모새나무 잎의 열수 추출물을 각 농도별로 15분 처리한 다음에 5-HT을 15분 처리한 결과에서는 5-HT (100 μM) 만을 처리 하였을 때 cAMP 활성을 0으로 보고 계산한 결과, 5-HT₆ 수용체-specific 증가하는 cyclic AMP에서 모새나무 잎의 열수 추출물이 5-HT₆ 수용체의 antagonistic-effect를 보였다.

[0055] **10. 모새나무 잎 추출물을 이용한 5-HT_{2A} 수용체 유전자 발현된 세포주에서 세포내 Ca²⁺ 활성 측정**

[0056] CHO-K1 세포주 (Chinese Hamster Ovary Cell) 를 ATCC로부터 구입하고 배양액 (RPMI 1640, fetal bovine serum 10%, penicilin 100 IU/ml, streptomycine 100 $\mu\text{g/ml}$)을 사용하여 96-well black wall/clear bottom (BD Falcon)에 세포를 분주한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 세로토닌 2A 수용체 (5-HT_{2A} receptor) 각각 cDNA를 플라스미드 트랜스펙션 시약인 lipofectamine 2000을 이용하여 48시간동안 세포내 일시적으로 발현시킨 세포를 실험에 사용하였다. 형광염색 전에 세포는 HEPES-buffered solution (155 mM NaCl,

2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 3 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH 7.4) 으로 1회 세척한 다음, 세포내 칼슘농도를 측정하기 위한 형광염료로 Fura-2/AM을 최종 5 μM 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 빛이 차단된 상태에서 60분간 반응시켰다. 60분 후 HEPES-buffered solution로 1회 세척한 다음 세포내 칼슘농도 측정은 high-throughput system (HTS) system을 이용하여 340/380nm 빛이 선택적으로 노출되도록 한 다음, 디지털 형광 분석기에 의해 분석된 340/380nm ratio 값을 측정하였다. 세포내에 존재하는 Fura-2/AM은 Ca²⁺과 결합한 상태에서는 340 nm에서 excitation되고, 결합하지 않은 상태에서는 380 nm에서 excitation되므로, 340/380 nm ratio값의 증가는 세포내 Ca²⁺과 결합한 fura-2/AM이 많아졌다는 의미가 된다.

[0057] 세로토닌 (5-HT) 100 μM을 처리하여 얻은 값을 control 로 사용하였고, 모새나무 잎의 열수 추출물을 1, 3, 10, 30, 100 μg/ml 농도로 1분간 전 처리한 후 5-HT 100 μM을 처리하여 세포내 칼슘양의 변화를 확인하였다. 참고로 도 10 에서 각 항목의 에러바 위에 표기된 숫자는 실험에 사용된 세포의 수를 의미한다.

[0058] 도 12 은 본 발명의 모새나무 잎의 열수 추출물이 5-HT_{2A} 수용체 유전자가 발현된 세포주에서 5-HT에 의해 유도된 세포 내 Ca²⁺의 증가를 농도 의존적으로 억제시키는 효과를 나타낸 그래프이다. 모새나무 잎의 열수 추출물이 5-HT_{2A} 수용체에서 5-HT에 의해 유도되는 세포내 Ca²⁺의 증가에서 5-HT과 비교하여 세포 내 Ca²⁺을 억제시켜 5-HT_{2A} 수용체의 antagonistic-effects를 확인하였다. 도 10 에 도시된 바와 같이, 5-HT (100 μM)을 처리한 control 보다 모새나무 잎의 열수 추출물 1, 3, 10, 30, 100 μg/ml에서 각각 16.23 ± 2.03 %, 27.33 ± 1.35 %, 45.00 ± 1.22 %, 56.73 ± 2.23 %, 62.31 ± 1.10 % 로 5-HT_{2A} 수용체-특이적 세로토닌에 의해 유도된 세포내 Ca²⁺이 억제됨을 확인하였다.

[0059] **11. 모새나무 잎 추출물을 이용한 약제 또는 건강식품 제조**

[0060] 모새나무 잎 추출물을 유효성분으로 하는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 정제 및 캡슐제, 연질 캡슐제, 과립제, 액제 형태로 제조될수 있다. 또 다른 적절한 실시 형태에 따르면, 상기 조성물은 음료 첨가제로 제조할 수 있다. 상기 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약제 또는 건강식품은 상기 모새나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물이 0.01 내지 99.9중량%로 포함되도록 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 경피제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화하여 제조할 수 있다.

[0061] 멸균주사액의 경우, 상기 약학 조성물이 0.01 내지 99.9중량%로 포함하도록 하고 정제수 또는 포도당을 99.9 내지 0.01 중량%를 혼합하여 제조 가능하며, 캡슐제의 경우, 상기 약학조성물을 동결 건조하여 0.01 내지 99.9중량%로 포함하도록 하고, 비타민제, 칼슘제를 99.9 내지 0.01 중량%를 혼합하여 제조 가능하다.

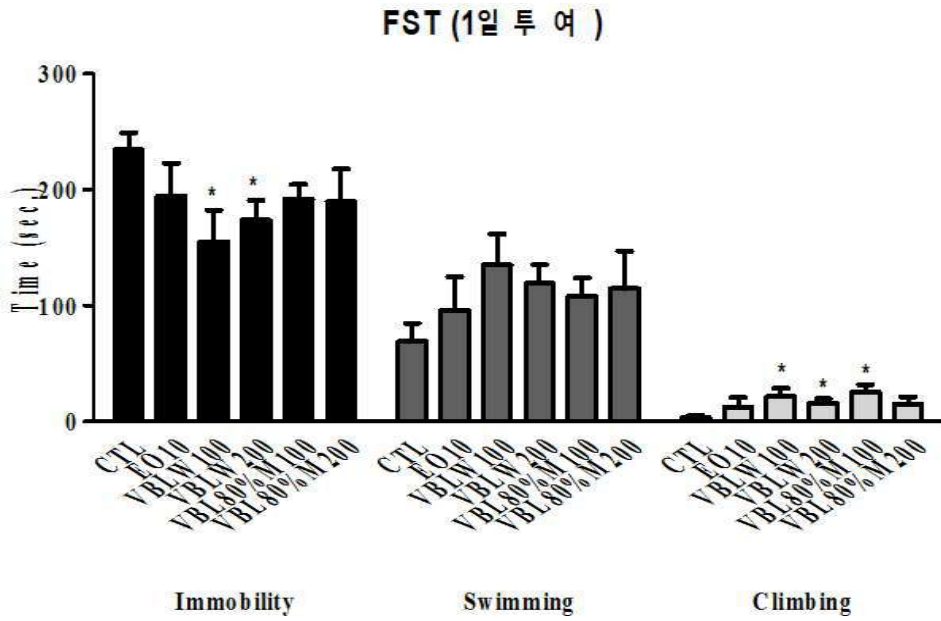
[0062] 상기 제조된 약학조성물의 1일당 투여량은 상기 추출물이 100 내지 200mg/kg 체중 포함되는 함량으로 제공하며, 또한 상기 약학 조성물을 0.01 내지 99.9중량%로 포함하는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 기능성 건강식품으로도 제조 가능하다.

산업상 이용가능성

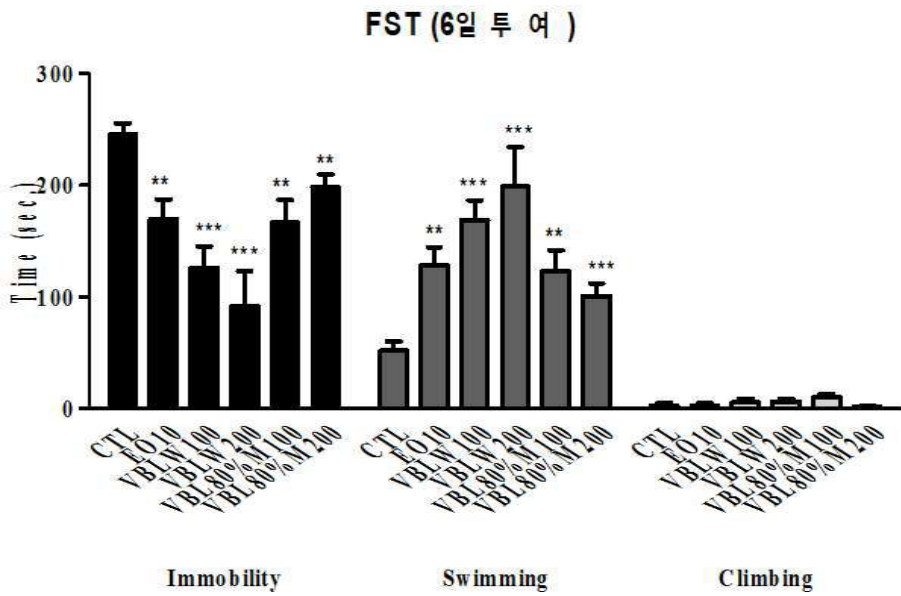
[0063] 본 발명은 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함으로써, 제조 원료를 자연에 서식하는 식물로 대체함으로써 제조생산단가 절감과 산업화를 통한 수입대체 및 수출효과를 기대할 수 있어 산업상 이용가능성이 있다.

도면

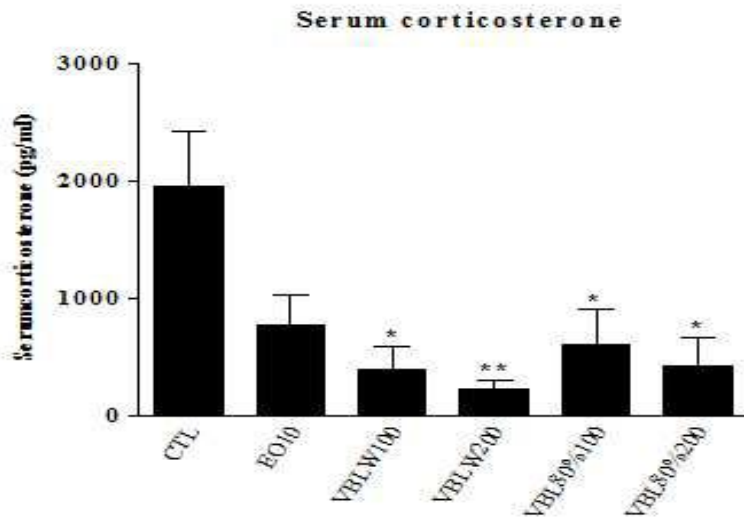
도면1



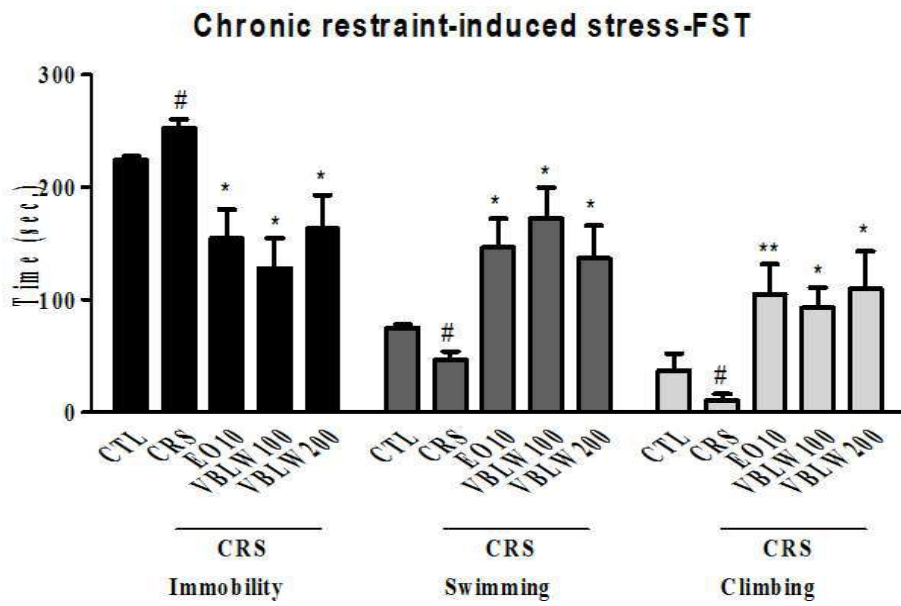
도면2



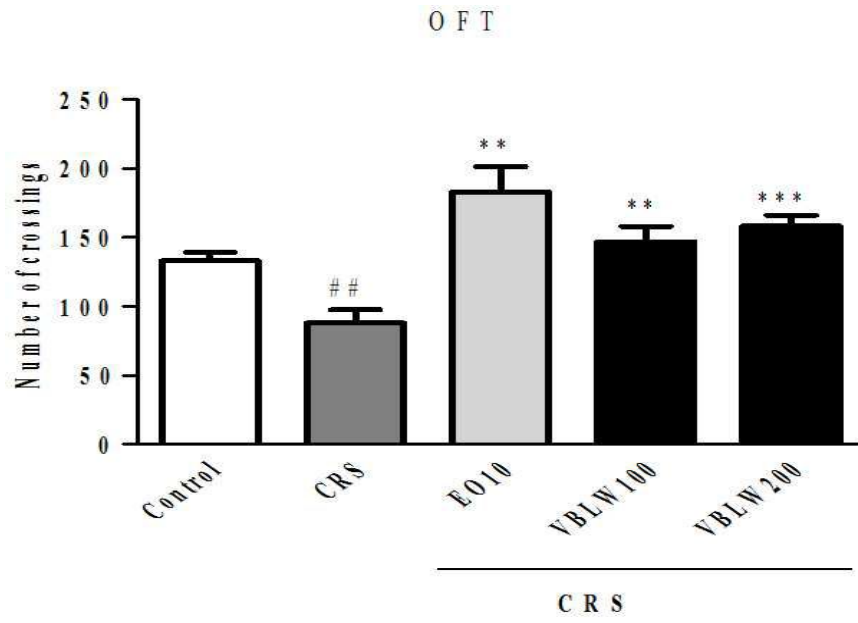
도면3



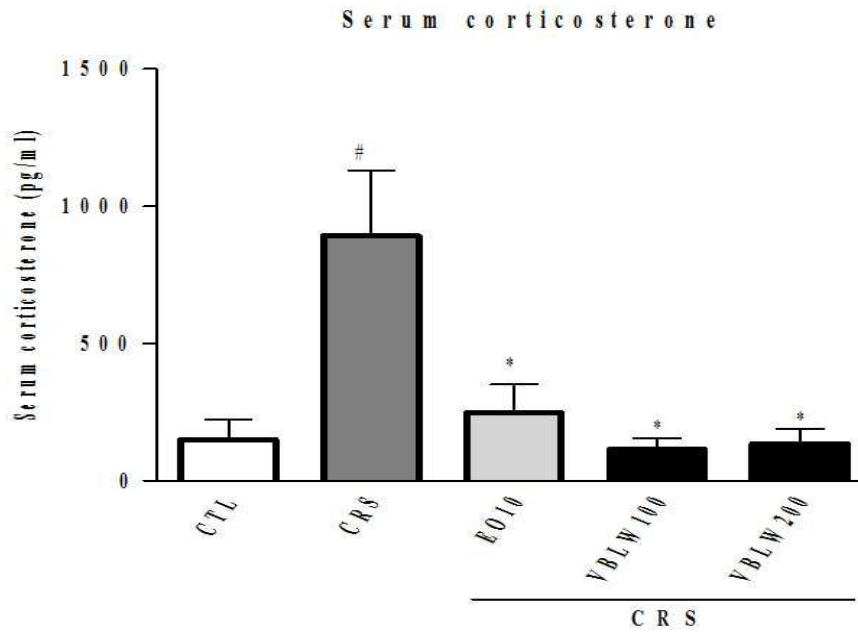
도면4



도면5

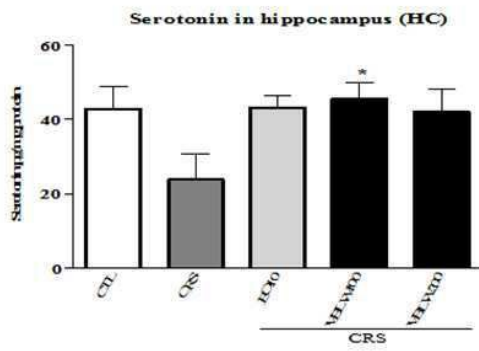


도면6

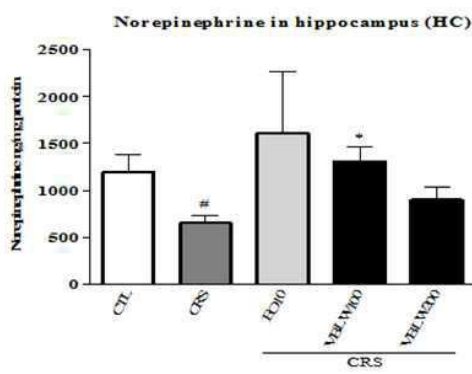


도면7

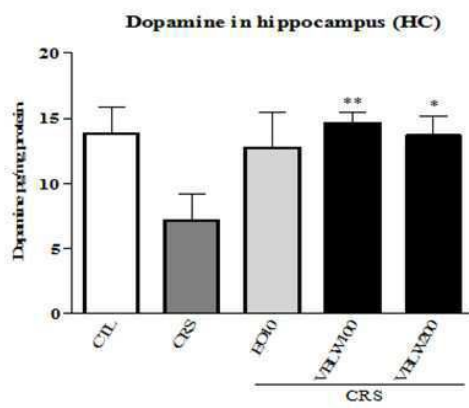
(A)



(B)

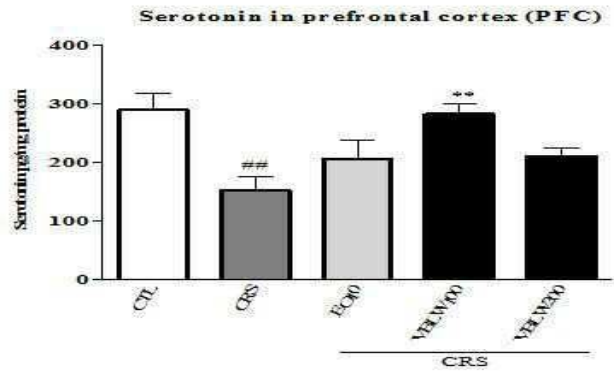


(C)

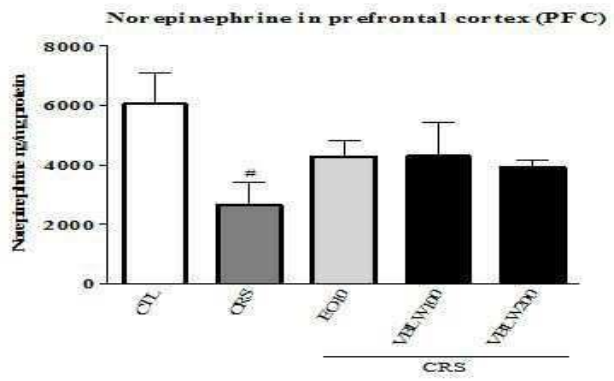


도면8

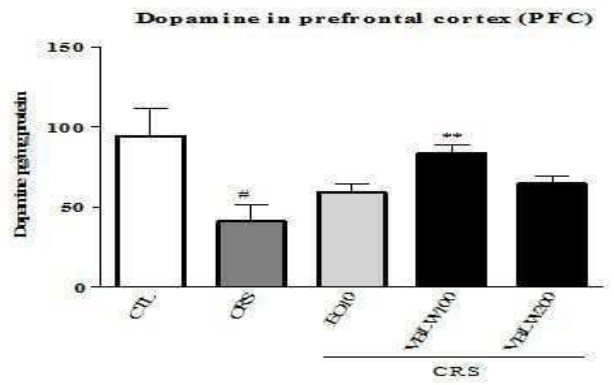
(A)



(B)

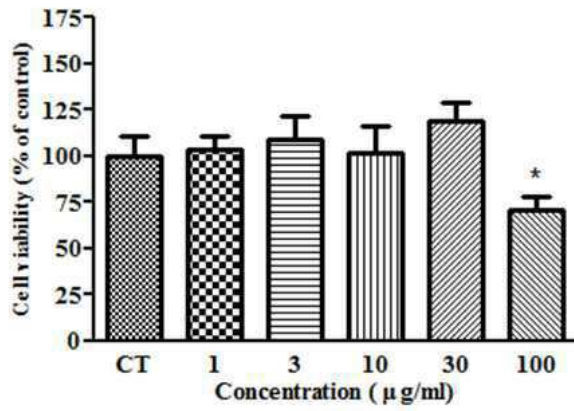


(C)

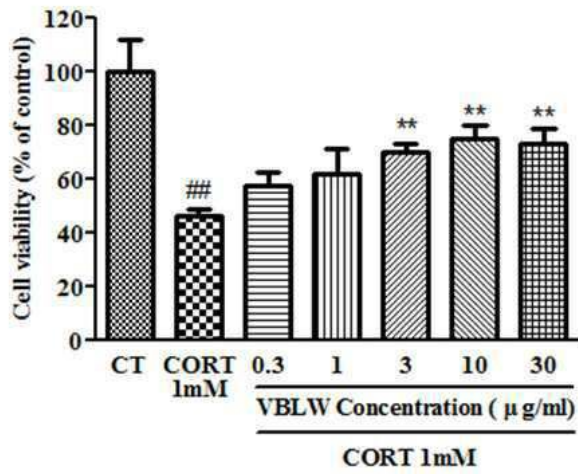


도면9

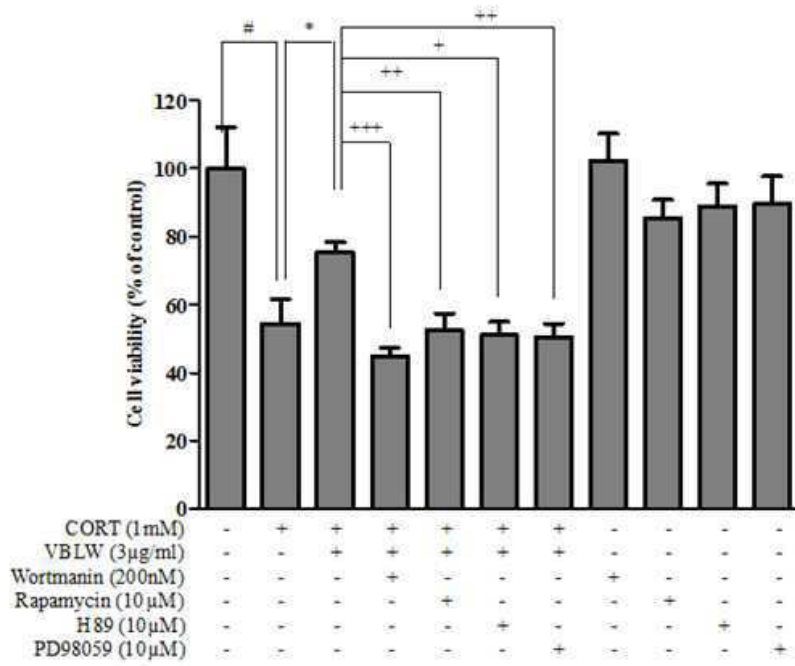
(A)



(B)

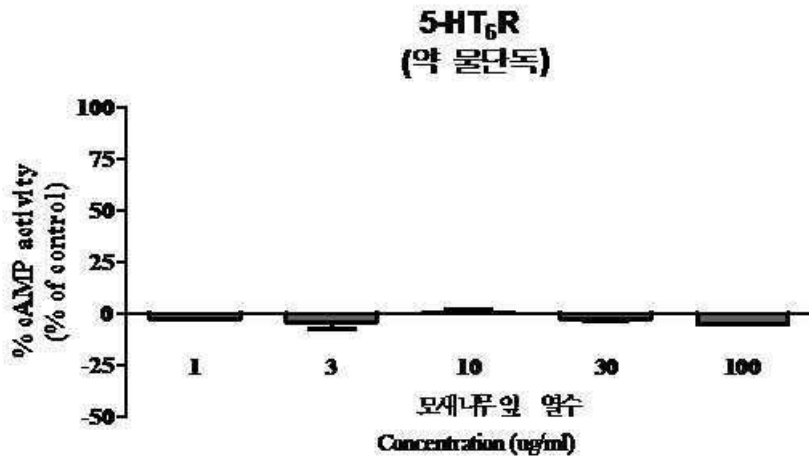


도면10

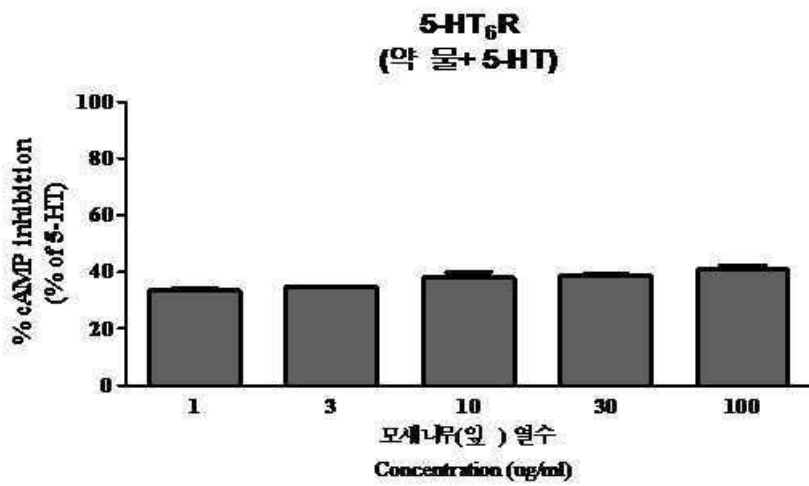


도면11

(A)



(B)



도면12

