



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월09일
(11) 등록번호 10-1704895
(24) 등록일자 2017년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/04 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/04 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0025025
(22) 출원일자 2015년02월23일
심사청구일자 2015년02월23일
(65) 공개번호 10-2016-0102670
(43) 공개일자 2016년08월31일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130094145 A*
KR100793081 B1
KR1020040057103 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
신라대학교 산학협력단
부산광역시 사상구 백양대로700번길 140 (캐법동, 신라대학교)
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
동국대학교 경주캠퍼스 산학협력단
경상북도 경주시 동대로 123 (석장동)
(72) 발명자
문일수
경상북도 경주시 황성로69번길 13-6 청우아파트 303동 1303호
홍용기
부산광역시 해운대구 해운대해변로 85 경동아파트 103동 703호
(뒤편에 계속)
(74) 대리인
서장찬, 박병석

전체 청구항 수 : 총 5 항

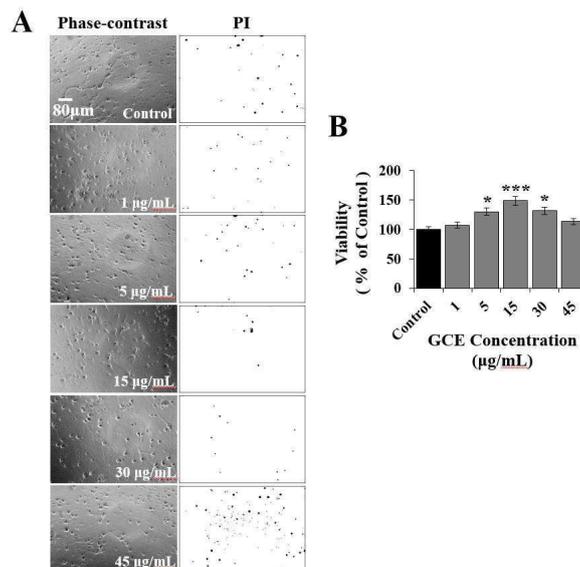
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 그라실라리옵시스 코르다의 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품

(57) 요약

본 발명은 그라실라리옵시스 코르다(*Gracilariopsis chorda*)의 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품에 관한 것이다. 본 발명의 유효 성분은 헤조류 유래의 신규한 추출물로서 유해 산화 스트레스로부터 헤마신경세포를 보호함으로써 각종 퇴행성 질환의 예방, 개선 또는 치료에 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 36/02 (2013.01)

(72) 발명자

최재석

부산광역시 해운대구 선수촌로 95 삼해대림아파트
106동 2501호

최인순

부산광역시 해운대구 해운대해변로 163 현대베네시
티아파트 101동 2503호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415119607

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 지역연고산업육성사업

연구과제명 글로벌 헬스케어 기능성 소재 산업화 사업

기여율 1/1

주관기관 신라대학교

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

그라실라리옵시스 코르다(*Gracilariaopsis chorda*) 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 헌팅톤 질환, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어지는 군으로부터 선택되는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 퇴행성 질환은 산화 스트레스에 의한 것임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 산화 스트레스는 저산소증 치료를 위한 재산소화(reoxygenation), 또는 허혈증(ischemia) 치료를 위한 재관류(reperfusion)에 의한 재산소화에 의하여 발생하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

ROS(reactive oxygen species)의 생성을 억제, 또는 세포자연사(apoptosis) 또는 세포괴사(necrosis)에 의한 뇌신경세포의 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

그라실라리옵시스 코르다(*Gracilariaopsis chorda*) 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 헌팅톤 질환, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어지는 군으로부터 선택되는 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강 기능 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 그라실라리옵시스 코르다(*Gracilariaopsis chorda*)의 에탄올 추출물(이하, 'GCE'로도 칭함)을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 수명의 증가로 유해산소 스트레스에 관련된 퇴행성 신경질환에 걸릴 가능성이 증가하고 있다. 세계적으로 65세 이상의 노령 인구는 급격하게 증가되고 있어 2000년에 4억2천만명에서 2030년에는 9억7천3백만명으로 증가될 것으로 추산된다(Castellani et al., 2010). 저산소증 뇌손상(hypoxic brain injury)은 뇌에 산소 공급이 충분하지 못한 것으로 알츠하이머씨병(Alzheimers disease)과 파킨슨씨병(Parkinsons disease)과 같은 여러 가지 퇴행성 뇌질환(neurodegenerative disease)에서의 뇌신경 세포 사멸을 초래한다.

[0003] 급성 혹은 만성 뇌질환에서 신경 세포사는 흔히 산화 스트레스(oxidative stress)에 기인한다(Lee et al., 2007). 저산소증에 빠졌다가 다시 재관류가 될 때(hypoxia/reoxygenation, H/R) 산화 스트레스가 일어나며, 이 과정에는 유해 산소(reactive oxygen species, ROS)가 관여한다. ROS에는 superoxide anion(O_2^-), 과산화수소

(hydrogen peroxide, H₂O₂), 및 수산화기(hydroxyl radical, OH⁻) 등이 있다(Orrenius et al., 2007). 과도한 ROS의 생성은 세포자연사(apoptosis)를 유도하며(Bredesen et al., 1995), 이의 특징은 뉴클레오솜 분절(nucleosomal fragmentation)(Willie et al., 1980)과 사립체막전위(mitochondrial membrane potential, MM P)의 소실이다(Liu et al., 1996; Susin et al., 1996).

[0004]

순수 화합물 약제를 장기간 복용하면 환자가 여러 가지 부작용을 일으키기 때문에 연구자들은 H/R에 의한 자유기(free radical) 생성을 방지하는 천연물을 찾고 있다. 해조류(marine algae 혹은 seaweed)는 산화 스트레스와 관련된 퇴행성 신경 질환에 대한 잠재적 치료제로 각광을 받고 있다(Swing, 2003). 예로서, *Eisenia bicycles*과 그 phlorotannin 성분은 산화 스트레스 하에서 망막의 ganglion cell death를 방지하며(Kim et al., 2012), 갈조류 *Laminaria japonica*에서 추출한 fucoidan은 과산화수소에 의한 pheochromocytoma cell의 자연사(apoptosis)를 억제한다(Gao et al., 2012). 최근에는 해조류 *Gelidium amansii*와 *Sargassum fulvellum*의 에탄올 추출물이 해마신경세포의 생존율을 증가시키는 신경성장효능(neurotrophic effects)이 있음이 밝혀졌다(Hannan et al., 2012, 2013, 2014). 이러한 보고들은 신경성장인자는 신경세포보호 작용도 있음을 의미한다. 보다 확실한 증거로, 신경성장인자 NGF는 산화 스트레스에 노출된 해마신경세포 및 대뇌피질신경세포의 손상을 줄인다(Shigeno et al., 1991; Shimohama et al., 1993). 하지만, 아직까지 H/R에 의한 산화 스트레스에 노출된 중추신경계(central nervous system, CNS) 신경세포에 미치는 해조류의 효능에 대한 연구보고는 없었다.

선행기술문헌

비특허문헌

- Abbott, I.A., 1995. A decade of species of *Gracilaria* (sensu lato). *Taxonomy of alga*
Gracilaria temistipitata var. liui. Japanese Journal of Phycology 37, 187-193.
- Bossenmeyer, C., Chihab, R., Muller, S., Schroeder, H., Daval, J.L., 1998.
 Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through biphasic induction of protein synthesis in cultured rat brain neurons. Brain Research 787, 107-116.
- Bredesen, D.E., 1995. Neural apoptosis. Annals of Neurology 38, 839-851.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., Price, P.J., 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal™, a new serum-free medium combination. Journal of Neuroscience Research 35, 567-576.
- Castellani, R.J., Rolston, R.K., Smith, M.A., 2010. Alzheimer disease. Disease-a-Month: DM 56, 484.
- Chiang, Y.M., Lin, J.L., 1989. Nitrate uptake by nitrogen-starved plants of the red alga *Gracilaria temistipitata* var. liui. Japanese Journal of Phycology 37, 187-193.

[0005]

- Chojnacka, K., Saeid, A., Witkowska, Z., Tuhy, L., 2012. Biologically active compounds in seaweed extracts—the prospects for the application. Open Conference Proceedings Journal 3, 20-28.
- Coura, C.O., de Araújo, I.W., Vanderlei, E.S., Rodrigues, J.A., Quinderé, A.L., Fontes, B.P., Benevides, N., 2012. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 110, 335-341.
- Dang, H.T., Lee, H.J., Yoo, E.S., Shinde, P.B., Lee, Y.M., Hong, J., Jung, J.H., 2008. Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. Journal of Natural Products 71, 232-240.
- Ganesan, P., Kumar, C.S., Bhaskar, N., 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. Bioresource Technology 99, 2717-2723.
- Gao, Y., Dong, C., Yin, J., Shen, J., Tian, J., Li, C., 2012. Neuroprotective effect of fucoidan on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells via activation of PI3K/Akt pathway. Cellular and Molecular Neurobiology 32, 523-529.
- Hannan, M.A., Kang, J.Y., Hong, Y.K., Lee, H., Choi, J.S., Choi, I.S., Moon, I.S., 2013. The marine alga *Gelidium amansii* promotes the development and complexity of neuronal cytoarchitecture. Phytotherapy Research 27, 21-29.
- Hannan, M.A., Kang, J.Y., Hong, Y.K., Lee, H., Chowdhury, M.T.H., Choi, J.S., Moon, I.S., 2012. A brown alga *Sargassum fulvellum* facilitates neuronal maturation and synaptogenesis. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal 48, 535-544.
- Hannan, M.A., Mohibullah, M., Hong, Y.K., Nam, J.H., Moon, I.S., 2014. *Gelidium*

- amansii* promotes dendritic spine morphology and synaptogenesis, and modulates NMDA receptor-mediated postsynaptic current. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal 50, 445-452.
- Jha, R.K., Zi-rong, X., 2004. Biomedical compounds from marine organisms. Marine drugs 2, 123-146.
- Kim, K.A., Kim, S.M., Kang, S.W., Jeon, S.I., Um, B.H., Jung, S.H., 2012. Edible seaweed, *Eisenia bicyclis*, protects retinal ganglion cells death caused by oxidative stress. Marine Biotechnology 14, 383-395.
- Kostandy, B.B., 2012. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. Journal of Neurological Sciences 33, 223-237.
- Lee, Y., Park, H.W., Park, S.G., Cho, S., Myung, P.K., Park, B.C., Lee, D.H., 2007. Proteomic analysis of glutamate-induced toxicity in HT22 cells. Proteomics 7, 185-193.
- Lemasters, J.J., Qian, T., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Cascio, W.E., Trost, L.C., Herman, B., 1999. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 31, 305-319.
- Lin, Y.H., Tsai, J.S., Hung, L.B., Pan, B.S., 2010. Hypocholesterolemic effect of compounded freshwater clam protein hydrolysate and *Gracilaria*. Food Chemistry 123, 395-399.
- Liu, D.S., Zhou, Y.H., Liang, E.S., Li, W., Lin, W.W., Chen, F.F., Gao, W., 2013. Neuroprotective effects of the Chinese Yi-Qi-Bu-Shen recipe extract on injury of rat hippocampal neurons induced by hypoxia/reoxygenation. Journal of Ethnopharmacology 145, 168-174.

- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Moon, I.S., Cho, S.J., Jin, I., Walikonis, R., 2007. A simple method for combined fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry. *Molecules and cells* 24, 76-82.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47, 143-183.
- Puyal, J., Ginet, V., Clarke, P.G., 2013. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: A challenge for neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 105, 24-48.
- Rees, S., Harding, R., Walker, D., 2011. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. *International Journal of Developmental Neuroscience* 29, 551-563.
- Shigeno, T., Mima, T., Takakura, K., Graham, D.I., Kato, G., Hashimoto, Y., Furukawa, S., 1991. Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *Journal of Neuroscience* 11, 2914-2919.
- Shimohama, S., Ogawa, N., Tamura, Y., Akaike, A., Tsukahara, T., Iwata, H., Kimura, J., 1993. Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Research* 632, 296-302.
- Souza, B.W., Cerqueira, M.A., Martins, J.T., Quintas, M.A., Ferreira, A.C., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2011. Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 5589-5594.

- Suh, K.T., 1997. Classification of herbs in decoction part of Donguibogam. *Ph. D. Thesis*, Kyungsoong University, Busan, Korea, 138.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Kroemer, G., 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *Journal of Experimental Medicine* 184, 1331-1341.
- Swing, J.T., 2003. What future for the oceans? *Foreign Affairs* 82, 139-152.
- Tamatani, M., Che, Y.H., Matsuzaki, H., Ogawa, S., Okado, H., Miyake, S.I., Tohyama, M., 1999. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFκB activation in primary hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry* 274, 8531-8538.
- Vijayavel, K., Martinez, J.A., 2010. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of two Hawaiian marine Limu: *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta). *Journal of Medicinal Food* 13, 1494-1499.
- Willie, A.H., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 68, 251-306.
- Wu, Y., Ding, A.S., Wu, L.Y., Ma, Z.M., Fan, M., 2003. Establishment of the model of oxygen-glucose deprivation in vitro rat hippocampal neurons. *Chinese Journal of Applied Physiology* 19, 197-200.
- Yang, J.I., Yeh, C.C., Lee, J.C., Yi, S.C., Huang, H.W., Tseng, C.N., Chang, H.W., 2012. Aqueous extracts of the edible *Gracilaria tenuistipitata* are protective against H₂O₂-induced DNA damage, growth inhibition, and cell cycle arrest. *Molecules* 17, 7241-7254.
- Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N., Phromkunthong, W., 2009. Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand. *Plant Foods for Human Nutrition* 64, 218-223.
- Yeh, S.T., Lin, Y.C., Huang, C.L., Chen, J.C., 2010. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress. *Fish Shellfish Immunology* 28, 887-894.
- Zhu, F.F., Yin, Y.Y., Li, W.P., Li, W.Z., Wu, G.C., Gong, H.L., Zhang, W., 2009. Protective effect of extract of astragalus against injury induced by hypoxia/reoxygenation in hippocampus neuron. *Chinese Pharmacological Bulletin* 25, 213-216.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 퇴행성 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 해조류 유래의 신규한 용도의

추출물을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 그라실라리옵시스 코드(*Gracilariopsis chorda*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0008] 상기 퇴행성 질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계 이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0009] 상기 퇴행성 질환은 산화 스트레스에 의한 것이 바람직하다.
- [0010] 상기 산화 스트레스는 저산소증 치료를 위한 재산소화(reoxygenation), 또는 허혈증(ischemia) 치료를 위한 재관류(reperfusion)에 의한 재산소화에 의하여 발생하는 것이 바람직하다.
- [0011] 상기 유효성분은 ROS(reactive oxygen species)의 생성을 억제, 또는 세포자연사(apoptosis) 또는 세포괴사(necrosis)에 의한 뇌신경세포의 사멸을 억제하는 것이 바람직하다.
- [0012] 또한, 본 발명은 본 발명의 상기 유효성분을 포함하는 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명의 유효 성분은 해조류 유래의 신규한 추출물로서 유해 산화 스트레스로부터 해마신경세포를 보호함으로써 각종 퇴행성 질환의 예방, 개선 또는 치료에 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1의 A 및 B는 정상 산소 환경에서 GCE의 해마신경세포에 대한 보호 효능(neuroprotective effect)을 보여주는 결과이다. 해마신경세포를 GCE(1 내지 45 µg/mL) 혹은 비히클이 함유된 배지에 배양하고, 배양 13일(DIV 13)에 프로피디움 이오디드(propidium iodide, PI)로 염색하여 세포생존율(cell viability)를 측정하였다. 도 1의 A는 다양한 GCE 농도에서 배양한 세포들의 대표적인 위상차현미경 및 PI 염색 형광현미경 사진들이다. 형광 이미지를 흑백으로 바꾸고 반전하여 PI 신호(즉, 죽은 세포)가 검게 보이도록 하였다. 크기막대 = 80 µm(모든 그림에 적용). 도 1의 B는 생존률로서 살아있는 세포(즉, PI 비염색 세포)의 백분율(퍼센트)로 나타내었으며, 비히클 처리 대조군에 상대적으로 표준화하였다. 데이터막대기(bar)는 means ± SEM을 나타낸다. 값들은 세 번의 독립적 실험의 결과로서 통계학적 유의성은 비히클 처리 대조군과 비교하였다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA).

도 2의 A 및 B는 저산소/재산소화(hypoxia/reoxygenation, H/R) 후 GCE에 의한 ROS 생성 억제 효능을 나타낸다. GCE(15 µg/mL) 혹은 비히클이 함유된 배지에 해마신경세포를 배양하였다. DIV 9일에 배양을 0, 1, 2, 혹은 3시간 저산소 환경에 두었다가 정상산소 환경(normoxia)에서 24시간 더 배양하였다. ROS의 수준은 형광표지자 DCFDA로 염색하여 정량하였다. 도 2의 A는 전형적인 DCFDA 염색사진을 나타낸다. 크기막대 = 40 µm(모든 그림에 적용). 도 2의 B는 ROS(+) 세포들의 백분율을 나타낸다. 데이터막대기(bar)는 means ± SEM을 나타낸다. 값들은 세 번의 독립적 실험의 결과로서 통계학적 유의성은 비히클 처리 대조군과 비교하였다. *** $p < 0.001$ (Student's *t* test).

도 3의 A 및 B는 저산소/재산소화(H/R) 후 GCE의 DNA 분절 방지에 미치는 효능을 나타낸다. GCE(15 µg/mL) 혹은 비히클이 함유된 배지에 해마신경세포를 배양하고, DIV 6일에 저산소(1.5시간) 처리하였다. 이들을 정상산소 환경에서 24 혹은 48시간 더 배양한 후 고정하여 phospho-H2AX 항체로 염색하였다. 도 3의 A는 대표적인 면역형광 이미지들이다. 핵 내 개별 점박이(puncta)를 보여주기 위하여 박스로 표시한 핵들을 확대하여 삽입도에 나타내었다(화살표머리). 크기막대 = 12 µm(모든 그림에 적용). 도 3의 B는 핵 하나당 점박이의 수를 나타낸다. 데이터막대기(bar)는 means ± SEM (n = 30개 핵)을 나타낸다. 값들은 세 번의 독립적 실험의 결과로서 통계학적 유의성은 비히클 처리 대조군과 비교하였다. *** $p < 0.001$ (ANOVA).

도 4의 A 및 B는 저산소/재산소화(H/R) 후 GCE의 세포자연사(apoptosis) 억제에 미치는 효능을 나타낸다. GCE(15 µg/mL) 혹은 비히클이 함유된 배지에 해마신경세포를 배양하고, DIV 9일에 저산소(3시간) 처리하였다. 이들을 정상산소 환경에서 48 혹은 96시간 더 배양한 후 Annexin V (AN; green)와 PI (red)로 이중염색하였다.

도 4의 A는 AN/PI로 염색한 대표적인 위상차현미경 및 형광현미경사진들이다. 전형적인 AN(+)/PI(+) 세포들(boxed)을 확대하여 삽입도에 나타내었다. 크기막대 = 12 μm (모든 그림에 적용). 도 4의 B는 자연사세포[AN(+)/PI(+)] 백분율로서 GCE(-) H/R 비처리 대조군에 대비하여 표준화하였다. 데이터막대기(bar)는 means ± SEM (n = 30개 핵)을 나타낸다. 값들은 세 번의 독립적 실험의 결과로서 통계학적 유의성은 GCE(-) H/R 비처리 대조군과 비교하였다. ***p < 0.001 (ANOVA).

도 5의 A 및 B는 저산소/재산소화(H/R) 후 GCE의 뉴클레오솜간 DNA 분절(internucleosomal DNA fragmentation) 억제에 미치는 효능을 나타낸다. GCE (15 μg/mL) 혹은 비히클이 함유된 배지에 해마신경세포를 배양하고, DIV 9일에 저산소(3시간) 처리하였다. 이들을 정상산소 환경에서 96시간 더 배양하고 DNA를 분리하였다. DNA를 1.5% 아가로즈겔에 전기영동하고 에티디움 브로마이드(ethidium bromide, EtBr)로 염색하였다. 도 5의 A는 아가로즈겔 전기영동 후 대표적인 DNA 사다리화(laddering) 현상을 보여준다. 손상 받지 않은 DNA의 위치는 화살 혹은 화살표로 표시하였다. 분자크기(molecular sizes)는 가장 왼쪽에 염기쌍(base pairs, bp)로 나타내었다. 도 5의 B는 도 5의 A에 나타난 각각의 DNA 사다리 밴드의 강도 그래프를 구하고, 이들을 중첩하여 상대적 강도를 비교하기 쉽도록 나타내었다(강도의 정도는 임의적 수치임).

도 6의 A 및 B는 저산소/재산소화(H/R) 후 GCE의 사립체 막전위 (mitochondrial membrane potential, MMP) 소실 억제에 미치는 효능을 나타낸다. GCE (15 μg/mL) 혹은 비히클이 함유된 배지에 해마신경세포를 배양하고, DIV 9일에 저산소(3시간) 처리하였다. 이들을 정상산소 환경에서 96시간 더 배양하고 MMP 수준을 형광표지자 JC-1으로 염색하여 측정하였다. 도 6의 A는 대표적인 JC-1 염색 이미지를 나타낸다. 크기막대 = 20 μm(모든 그림에 적용). 도 6의 B는 red/green 형광 강도의 비율을 나타낸다. 데이터막대기(bar)는 means ± SEM으로서, 값들은 세 번의 독립적 실험의 결과이며 통계학적 유의성은 GCE(-) H/R 대조군과 비교하였다. *p < 0.05, **p < 0.01 (ANOVA).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0016] 본 발명의 발명자들은 다양한 해조류를 대상으로 H/R 시행 후 해마신경세포의 손상 여부를 확인하였고, 그 결과 그라실라리옵시스 코르다(*Gracilariopsis chorda*)의 에탄올 추출물에서 가장 우수한 결과를 얻어 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 따라서, 본 발명은 그라실라리옵시스 코르다(*Gracilariopsis chorda*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0018] 상기 퇴행성 질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계 이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0019] 상기 퇴행성 질환은 산화 스트레스에 의한 것이 바람직하다.
- [0020] 상기 산화 스트레스는 저산소증 치료를 위한 재산소화(reoxygenation), 또는 허혈증(ischemia) 치료를 위한 재관류(perfusion)에 의한 재산소화에 의하여 발생하는 것이 바람직하다.
- [0021] 상기 유효성분은 ROS(reactive oxygen species)의 생성을 억제, 또는 세포자연사(apoptosis) 또는 세포괴사(necrosis)에 의한 뇌신경세포의 사멸을 억제하는 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 이러한 약학적 조성물에는 추가적으로 담체, 부형제 또는 희석제 등이 더 포함될 수 있으며, 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수도 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은

의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0024] 바람직한 구체예로서, 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 당 1 내지 5,000mg, 바람직하게는 100 내지 3,000mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경로를 통하여 대상에 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명에서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다. 본 발명에서 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 유효성분으로 포함하는 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

[0026] 본 발명의 건강 기능 식품은 퇴행성 질환의 예방 또는 개선에 효과적인 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 유효 성분을 포함하는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다. 본 발명의 활성 추출물은 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100ml를 기준으로 0.02 내지 10g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다. 본 발명의 건강 기능 식품은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제, 예컨대, 천연 탄수화물 및 다양한 향미제 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 포도당, 과당 등의 단당류, 말토오스, 수크로오스 등의 이당류 및 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 다당류와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이 있다. 상기 향미제로는 타우마틴, 레바우디오시드 A, 글리시리히진, 사카린, 아스파르탐 등을 사용할 수 있다. 상기 향미제의 비율은 본 발명의 건강 기능 식품 100ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g을 사용한다. 상기 외에 본 발명의 건강 기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 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 본 발명의 건강 기능 식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수도 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 상기 활성 분획물 100 중량부 당 0.01 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0027] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.

[0028] <실시예>

[0029] 1. 재료 및 방법

[0030] 1.1. 개꼬시래기(Gracilariopsis chorda) 시료의 수집 및 가공

[0031] 개꼬시래기를 한반도 남쪽의 해안선을 따라 수집하였다. 시료를 담수로 세척하여 착생식물과 염을 세척 제거하고 실온에서 1주일 동안 그늘에서 건조하였다. 이후에, 건조된 시료들을 분쇄기[HMF-340, 한일사(Hani1 Co.,) 한국, 서울 소재]로 분쇄하고 밀봉된 시료봉지 속에 -20℃에서 암실 조건하에 추가의 시험을 위해 저장하였다. 식물 명을 향명(local name) 또는 일반명(common name)으로 확인하였다(참조: Suh, 1997). 바우처(Voucher) 시료는 홍용기박사의 실험실(부경대, 한국 부산 소재)에 기탁하였다.

- [0032] 1.2. 개꼬시래기 에탄올 추출물(GCE)의 제조
- [0033] 개꼬시래기 시료 분말 2g이 들어있는 삼각플라스크에 95% ethanol을 50:1 (v/w)로 넣고 어두운 곳, 상온에서 200rpm으로 24시간 진탕하였다. 진탕이 끝나면 slurry를 10,000rpm으로 원심분리하고, 상등액을 멸균 솜으로 걸렀다. 걸러진 액을 감압으로 농축시키고 질소가스로 완전히 건조시켰다. 건조 개꼬시래기 에탄올 추출물(GCE)의 수율(yield)은 1.52%(w/w)였다. 건조한 ethanol 추출물을 8mg/mL 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 소량으로 분주하여 -20℃에 보관하였다.
- [0034] 1.3. 일차 해마신경세포의 배양 및 추출물 처리
- [0035] 세포배양에 필요한 시약들은 특별한 언급이 없는 한 Invitrogen 사(Carlsbad, CA, USA) 제품을 사용하였다. 임신 중인 랫트[스플라그-다울리(Sprague-dawley)]를 임신 13일째에 주문하여 12/12시간의 암실 주기 및 사료와 물에 자유로이 접근할 수 있도록 한 우리에 조절된 온도로 가두었다. 실험은 동국대학교 실험동물윤리위원회에 의해 승인되었다. 임신 18일째에, 임신한 랫트를 이소플루오란으로 마취시키고 태아를 수집하였다. 이후에 태아 해마를 너로부터 해부하고 신경세포 배양물을 앞서 보고된 바와 같이(참조: Brewer et al., 1993; 및 Goslin et al., 1998), 제조하였다.
- [0036] 요약하면, 해부된 해마를 헵크스 균형 염 용액(Hanks balanced salt solution: HBSS) 속에 수집하고, 조직을 HBSS 속에서 0.25%(w/v) 트립신으로 12분 동안 37℃에서 분해함으로써 해리시키고 불로 처리하여 등급화된 파스퇴르 피펫으로 연마하였다. 해리된 세포를 혈구계로 계수하고 3.0×10^4 개 세포/cm²의 밀도로 24-웰 배양 플레이트 속에서 폴리-DL-라이신(PDL)(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)으로 피복된 직경 12mm 유리 커버슬립 위에 접종(플레이팅)하였다. DNA 추출을 위한 배양은 40×10^4 개 세포/cm²의 밀도로 6-웰 배양플레이트에 접종하였다. 배양물을 B27 첨가물을 넣은, 혈청이 없는 뉴로베이잘 속에 유지하고 37℃에서 5% CO₂/95% 공기하에 배양하였다. GCE 또는 비히클[DMSO, 최종 농도 <1.0%(v/v)]을 세포 접종 전에 배지에 가하였다. 정상 대조군(배지만) 및 비히클 대조군(배지와 DMSO)을 시험 시료로 처리한 것과 항상 비교하였다.
- [0037] 1.4. 배양 유지와 저산소증/재산소화(H/R) 유도
- [0038] 매 4일마다 배양액 1/4을 새로운 배지로 교환하였다. H/R은 기존의 방법(Wu et al., 2003; Zhu et al., 2009)을 약간 수정하여 사용하였다. 간략히 설명하면, 지정한 시간에 배양 플레이트를 저산소 환경(94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂)으로 설정된 저산소증 유도 상자 모듈(Modular Incubator Chamber MIC-101; Billups-Rothenberg Inc., Del Mar, CA)에 넣고 37℃에 배양하였다. 저산소증 처리가 끝나면 배양 플레이트를 정상산소 환경의 배양조(95% air, 5% CO₂)로 옮겨 계속 배양하였다.
- [0039] 1.5. PI 염색을 이용한 세포생존을 측정
- [0040] 지정한 시간에 세포를 1.0 μM 농도의 PI 용액으로 상온에서 12분간 처리하고 Dulbeccos phosphate buffered saline (D-PBS, Invitrogen)으로 수세하였다. 위상차현미경사진과 형광현미경사진(red-fluorescence)을 찍었다. red 형광을 내는 PI 염색된 사망한 신경세포들을 계수하고 생존율을 H/R 처리하지 않은 대조군에 대비하여 표준화하였다.
- [0041] 1.6. Lactate dehydrogenase(LDH)를 이용한 세포독성(cytotoxicity) 측정
- [0042] 세포독성은 배지에 유리된 LDH를 정량하여 측정하였다. H/R 처리가 끝나면 CytoTox96 nonradioactive assay kit(Promega, Madison, WI)를 사용하여 LDH를 정량하고, H/R 처리하지 않은 대조군 세포에 대비하여 표준화하였다.
- [0043] 1.7. 세포내 ROS 측정
- [0044] 세포내 ROS 생성은 green 형광표지자 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) (Molecular Probes, Eugene, OR)를 사용하여 측정하였다. DCFDA를 10 μM 농도로 배지에 넣고, 어둠속에서 20분간 배양하고, PBS로 수세한 후 위상차현미경 및 형광현미경사진을 얻었다. green 형광을 내는 ROS 생성 세포를 계수하였다.
- [0045] 1.8. 항-phospho-H2AX 항체를 이용한 면역염색(Immunocytochemistry, ICC)
- [0046] 지정한 시간에 커버슬립에 있는 신경세포를 Dulbeccos phosphate buffered saline (D-PBS, Invitrogen)로 수세하고, paraformaldehyde/methanol 방법(Moon et al., 2007)으로 고정시켰다. 항-phospho-H2AX 토끼 일차항체

(1:500; Upstate Biotechnology Inc., 현재는 Millipore사)를 넣고, 4°C에서 16~18시간 처리한 후, 이어서 2차 항체[Alexa Fluor 568-접합된 염소 항-토끼 IgG(1:1000), Molecular Probes, Eugene, OR)]를 넣고 상온에서 1시간 더 처리한 후 기술된 바와 같이(참조: Moon et., 2007) 마운팅하고 형광현미경 관찰하였다.

[0047] 1.9. Annexin V (AV)/PI 염색을 이용한 세포자연사 측정

[0048] 세포를 D-PBS로 수세하고 Alexa Fluor[®] 488 annexin V (Invitrogen) 및 PI (Sigma)로 상온에서 20분간 염색하였다. 세포를 annexin V binding buffer로 2회 수세하고, 위상차현미경 및 형광현미경(red 및 green 형광) 사진을 얻었다. annexin V 염색(green 형광)은 되지만 PI 염색(red 형광)은 되지 않는 자연사세포를 계수하고 H/R 처리하지 않은 대조군에 대비하여 표준화하였다.

[0049] 1.10. 아가로즈겔 전기영동을 이용한 DNA 분절(fragmentation) 측정

[0050] 배양한 해마신경세포(5 x 10⁶ 개)로부터 DNA를 분리하고(Tamatani et al., 1999) 0.5 μg/mL ethidium bromide가 포함된 agarose gel(1.5%)에 전기영동하고 ultraviolet transillumination으로 DNA를 검출하고 사진을 찍었다. DNA intensities의 plot profile은 NIH Image J (version 1.45)를 이용하여 얻었다.

[0051] 1.11. JC-1 염색을 이용한 사립체막전위(mitochondrial membrane potential, MMP)의 측정

[0052] 세포를 새 배지로 씻고 JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro-191 1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) (1 μg/mL; Molecular Probes)으로 CO₂ 세포배양조 속에서 20분간 처리하였다. 새 배지로 2회 씻은 후 green 및 red 형광사진을 얻고, 신경세포 각각의 red/green 형광비율을 NIH Image J (version 1.45) 프로그램을 사용하여 측정하였다.

[0053] 1.12. 영상획득, 최적화 및 정량

[0054] I3 S, N2.1 S 및 Y5 여과기 시스템이 장착된 현미경 DM IRE2(Leica Microsystems AG, 독일 베를린 소재)를 사용하여 위상차 및 형광영상(1,388 x 1,039 픽셀)을 고 해상 CoolSNAP CCD 카메라(Photometrics Inc., 미국 애리조나주 투산시 소재)로 Leica FW4000 소프트웨어를 사용하는 컴퓨터의 제어 하에 획득하였다. 세포 혹은 형광 반점의 정량화는 Image J (version 1.45) software와 cell counter plug-in (National Institute of Health, Bethesda, MA, USA)을 사용하였다. Gel imaging은 AlphaMager HP system (www.alphainnotech.com)을 이용하여 처리하였다.

[0055] 1.13. 데이터 분석

[0056] 결과는 means ± standard errors of means (SEMs)로 나타내었다. 데이터는 Student's *t* test 및 포스트 후둠칸 다중 비교(post hoc Duncan multiple comparison)로 변이의 단일-방식 분석(one-way analysis)을 사용하여 분석하였다. 통계학적 유의성은 *p* < 0.05으로 설정하였으며, SPSS software (version 16.0)을 사용하였다.

[0057] 2. 결 과

[0058] 2.1. 정상산소(normoxia) 환경에서 GCE의 해마신경세포의 보호효능(neuroprotective effect)

[0059] 시험관에서 배양하는 조건은 뇌신경세포에게는 스트레스이다. 따라서, 일부 세포는 정상산소 환경에서도 스트레스에 의하여 죽게 된다. 정상산소 환경에서 GCE의 신경세포보호 효능을 먼저 조사하였다. 다양한 농도의 GCE가 첨가된 배지에 해마신경세포를 배양하고, DIV 13일에 PI 염색한 결과(도 1의 A), GCE가 농도 의존적으로 세포생존율을 증가시키며(*p* < 0.001), 15 μg/mL 농도에서 대조군에 비하여 최고 148.71 ± 5.73% 증가를 나타내었다(도 1의 B). 이 농도는 H/R (3시간/96시간) 조건에서도 최고의 신경세포 보호효능을 보였기 때문에 이후의 실험은 15 μg/mL GCE 농도에서 실시하였다.

[0060] 2.2. GCE의 유해산소(ROS) 생성억제 효능

[0061] GCE가 H/R에 의한 세포내 ROS 생성억제에 미치는 효능을 조사하였다. 배양 해마신경세포를 DIV 9에 저산소증을 유도하고 DCFDA 형광표지자를 이용하여 재산소화 24시간 후에 ROS의 생성정도를 측정하였다. 도 2의 A에서 보여 주는 바와 같이 저산소증 유도 시간(0, 1, 2, 3시간)이 증가할수록 GCE 처리[GCE(+)] 및 대조군[GCE(-)]에서 모두 ROS 생성 세포 수가 증가하였다. 하지만, GCE (15 μg/mL)를 처리한 경우 0, 1, 2, 3시간 각각 저산소증을 유도한 경우 GCE(-) 대조군에 비하여 유의하게(*p* < 0.001) ROS 생성 세포가 각각 5.11%, 12.36%, 11.39%, 및 20.33% 감소하였다(도 2의 B).

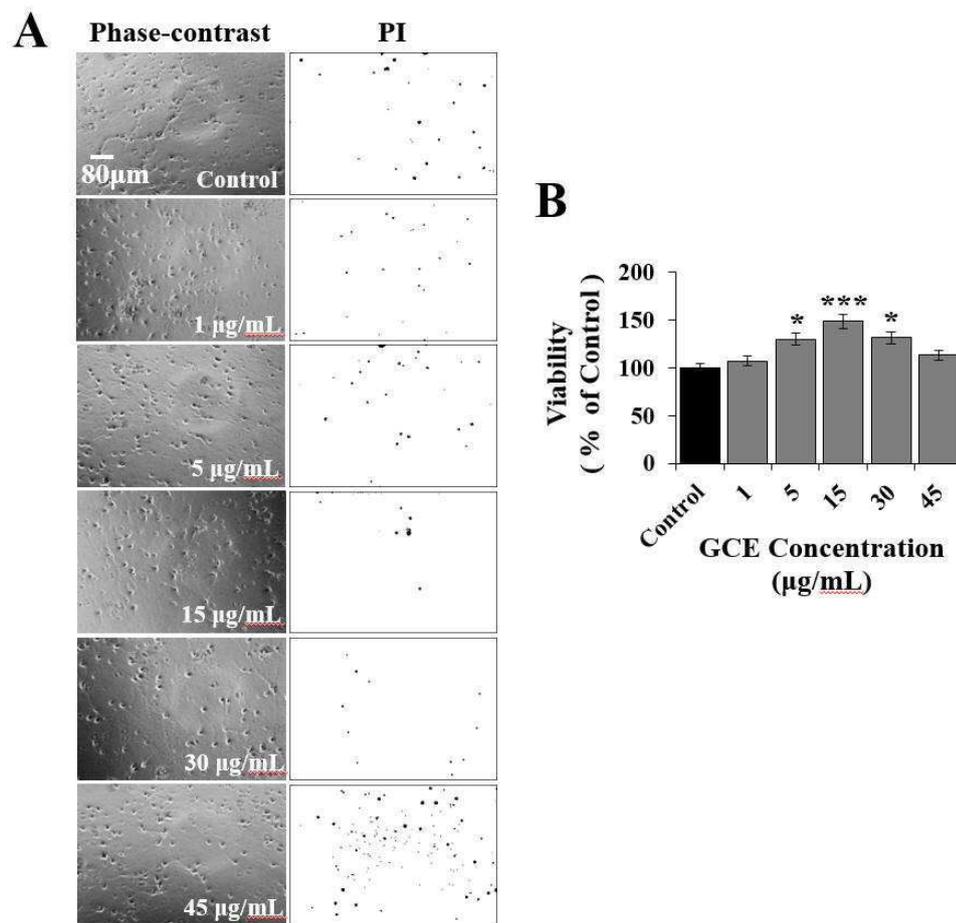
- [0062] 2.3. GCE의 DNA 분절(fragmentation) 억제 효능
- [0063] 해마신경세포를 DIV 6일에 1.5시간 동안 저산소증을 유도하고 재산소화 24시간 및 48시간 후에 항-phospho-H2AX 항체로 면역염색하였다(도 3의 A). 대조군(DMSO 처리)의 경우 24시간 후에는 phospho-H2AX에 염색되는 점박이(puncta)가 핵(nucleus) 당 저산소증 유도하지 않은 경우의 10.5 ± 4.9 개에서 재산소화 24시간 후에는 23.55 ± 7.9 개로 유의하게($p < 0.001$) 증가하였다. 한편 48시간 후에는 저산소증 유도하지 않은 경우의 14.25 ± 7.9 개에서 29.65 ± 10.5 개로 유의하게($p < 0.001$) 증가하였다. GCE ($15 \mu\text{g/mL}$)를 처리한 경우 이 점박이들의 수가 24시간 및 48시간 후에 각각 11.75 ± 5.1 개 및 12.6 ± 4.71 개로 유의하게($p < 0.001$) 감소하였다(도 3의 B).
- [0064] 2.4. GCE의 세포자연사(apoptosis) 억제 효능
- [0065] H/R 스트레스 세포자연사가 주된 세포사 종류이다. DIV 9일에 해마신경세포를 3시간 동안 저산소 처리하고, 재산소화 48시간 및 96시간 후에 Alexa Fluor[®] 488 아넥신 V(annexin V, AV)와 프로피디움 이오디드(propidium iodide, PI)로 염색하였다(도 4의 A). GCE(-) 대조군의 경우 H/R에 의하여 자연사[AV(+)/PI(+)] 세포의 비율이 $188.7 \pm 8.90\%$ (48시간) 및 $241.14 \pm 13.72\%$ (96시간)으로 유의하게($p < 0.001$) 증가하였다(도 4의 B) [GCE(-) H/R]. 하지만, GCE를 처리한 경우 자연사세포의 비율이 GCE(-) H/R 비처리 대조군의 $70.53 \pm 7.19\%$ (48시간) 및 $83.15 \pm 6.23\%$ (96시간)로 유의하게($p < 0.001$) 감소하였다(도 4의 B) [GCE(+) H/R].
- [0066] 2.5. GCE의 뉴클레오솜간(internucleosomal DNA fragmentation) DNA 분절 억제 효능
- [0067] 뉴클레오솜간 DNA 분절의 세포자연사의 특징으로 아가로즈겔 전기영동에서 DNA 사다리(laddering) 현상을 나타낸다. DIV 9일에 3시간 저산소증에 노출시키고 재산소화 96시간 후 DNA를 추출하였다. 이들을 1.5% 아가로즈겔에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 사진을 도 5의 A에 나타내었다. DNA의 강도를 나타내는 그래프인 plot profile은 도 5의 B에 나타내었다. H/R 처리하면 GCE(-) 배양의 경우 H/R 처리하지 않은 경우(도 5, no H/R)에 비하여 DNA laddering의 강도가 증가하였고, 잘라지지 않은 완전한(intact) DNA의 강도는 감소하였다(화살표머리) (도 5의 A-중간 레인 & 도 5의 B-H/R). 반면에 GCE를 처리한 경우(도 5의 A-오른쪽 레인 & 도 5의 B-H/R+GCE) GCE(-) H/R 세포 및 H/R 처리하지 않은 대조군에 비하여 DNA laddering의 강도가 약해졌으며 완전한 DNA의 강도도 증가되었다(도 5의 A, 화살표).
- [0068] 2.6. GCE의 사립체막전위(MMP) 소실 억제효능
- [0069] MMP 소실에 의한 사립체막의 기능장애는 세포자연사의 주요 개시 및 실행 역할을 한다. GCE가 MMP 유지에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양 해마신경세포를 DIV 9일에 3시간 동안 저산소 처리하였다. 재산소화 96시간 후 JC-1으로 염색하고 green (JC 단일체를 나타냄) 및 red 형광(영킨 JC를 나타냄) 사진을 얻고, 이들을 병합(merge)하였다(도 6의 A). H/R 처리 전에는 GCE를 처리하지 않은 세포[GCE(-) no H/R]의 경우 green (즉, 낮은 MMP)과 red 형광(즉, 높은 MMP) 사립체가 혼합되어 있었다. GCE(-) 배양을 H/R 처리할 경우[GCE(-) H/R] 대부분 green 형광을 나타내었으며, 반면에 GCE 처리 배양[GCE(+) H/R]은 대부분 red 형광을 나타내었다. Image J software로 전반적인 field intensities를 측정하고 red/green 형광 강도비율을 도 6의 B에 나타내었다. H/R (3 hr/96 hr) 처리[GCE(-) H/R]는 red/green 비율을 1.31 ± 0.29 [GCE(-) no H/R 대조군]에서 1.01 ± 0.23 로 유의하게($p < 0.05$) 증가시켰다(도 6B). 반면에 같은 조건에서 GCE(+) H/R 배양은 red/green 비율이 1.41 ± 0.46 로 유의하게($p < 0.01$) 증가되었다. 이러한 결과는 H/R 스트레스에서 GCE가 MMP 소실을 효율적으로 억제함을 의미한다.
- [0070] 3. 토 의
- [0071] 다른 인체조직에 비하여 뇌는 특별히 허혈 손상에 취약하다. 동물 모델로 실험한 결과 단시간의 허혈/재관류(ischemia/reperfusion, I/R)에도 대량의 신경세포사가 일어난다. 글루타메이트산 수용체의 과다 활성화에 의한 독성으로 정의되는 흥분성독성은 I/R에 의한 주된 세포사 기전으로 알려져 있다. 글루타메이트산 수용체의 과다 활성화는 세포내 칼슘농도[Ca²⁺]_i를 높이고, 이는 사립체의 기능억제, 단백질분해효소 활성화, ROS 축적, NO 유리 등 여러 가지 경로를 통한 세포사를 유도한다. 해마는 포유류 뇌 구조 가운데 가장 높은 밀도의 흥분성 아미노산 수용체를 갖는다. 이로 인하여 해마신경세포는 산화 스트레스와 퇴행성 신경 질환에 보다 민감하게 된다. 따라서 신경성 질환에 대처하기 위하여 산화 스트레스에 의한 신경손상을 방지하기 위한 치료 전략의 개발이 절실한 실정이다.

[0072] 이러한 목적을 위하여 본 발명의 발명자들은 흰쥐 해마신경세포 H/R 모델을 채택하고, 다양한 생리활성물질을 함유하는 것으로 알려진 해양 해조류 추출물들의 효용성을 조사하였다. 이 가운데 개꼬시래기 [*G. chorda*]가 가장 높은 신경보호활성을 보였다. 특히, 개꼬시래기 에탄올 추출물(GCE)는 H/R에 유도된 산화 스트레스에서 ROS 생성, DNA 이중나선 절단, 세포자연사, 뉴클레오솜간 DNA 분절, MMP 소실 등을 억제하여 신경세포의 생존율을 증가시켰다. 개꼬시래기속(Gracilariales 돌가사리목, Rhodophyta 홍조식물문)은 건강증진 효능이 있는 것으로 알려져 있는데, 예로서, *G. tenuistipitata*의 anti-hypercholesterolemic properties, *G. tenuistipitata*, *G. edulis*, *G. salicornia*, *G. biridae* 및 *G. cornea*의 항산화 효능, *G. verrucosa* 및 *G. cornea*의 항염증 효능, *G. salicornia* 및 *G. tenuistipitata*의 항미생물 효능 등이 알려져 있다. 이러한 다양한 건강증진효능은 polyphenols, polysaccharides, 색소 등 다양한 생리활성물질의 존재에 기인할 것임으로, 해조류는 건강증진효능을 갖는 방대한 물질자원을 제공한다.

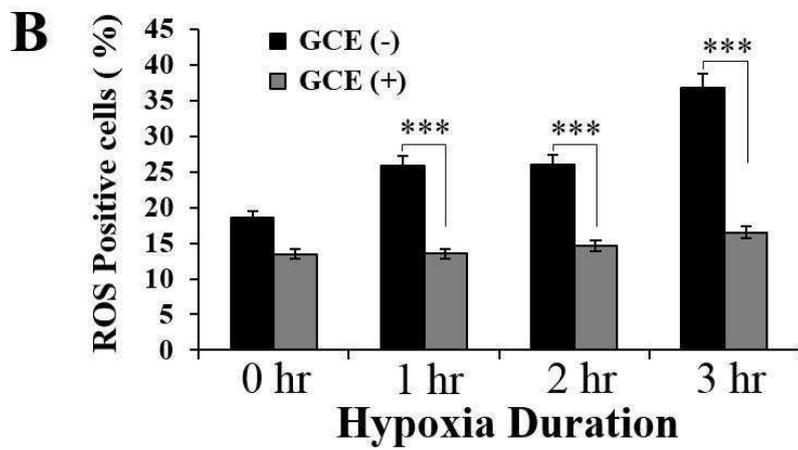
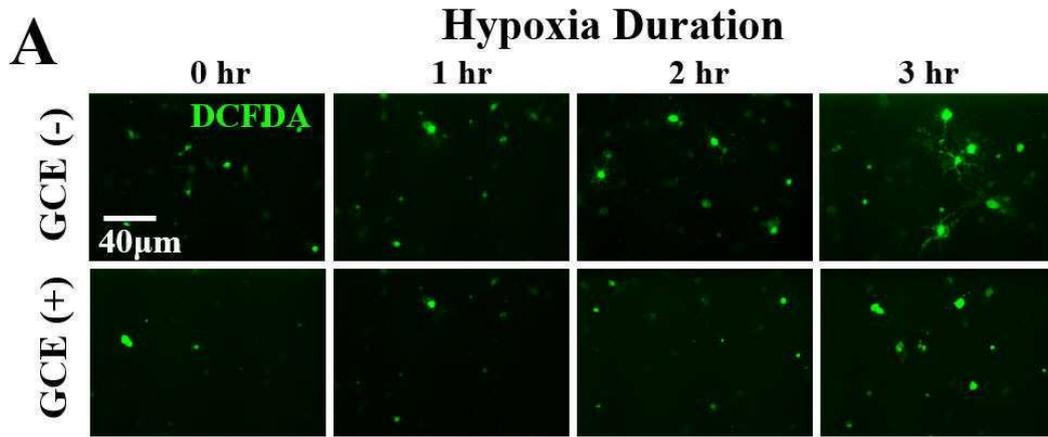
[0073] 홍조류(red alga)인 개꼬시래기는 전세계적으로 분포하고 있으며, 특히 열대 및 온대지역에 많이 서식한다. 개꼬시래기는 식품 등급의 아가(agar) 및 phycocolloids 생산에 이용되고 있다. 본 발명자들이 인지하는 한 본 연구는 개꼬시래기가 중추신경세포에 미치는 신경보호효능에 대한 최초의 연구이다. 식품재료로 사용되어 왔고, 어떠한 독성도 없는 것으로 알려져 있기 때문에 본 연구결과는 개꼬시래기가 생리활성물질의 훌륭한 자원으로서 신경성 질환을 치료한 잠재성이 있음을 보여준다.

도면

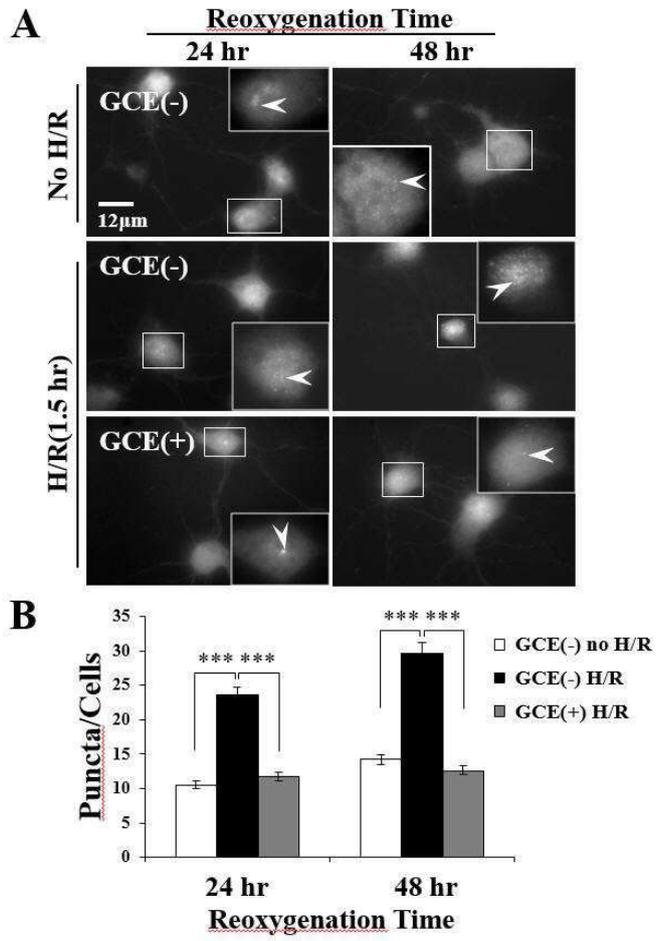
도면1



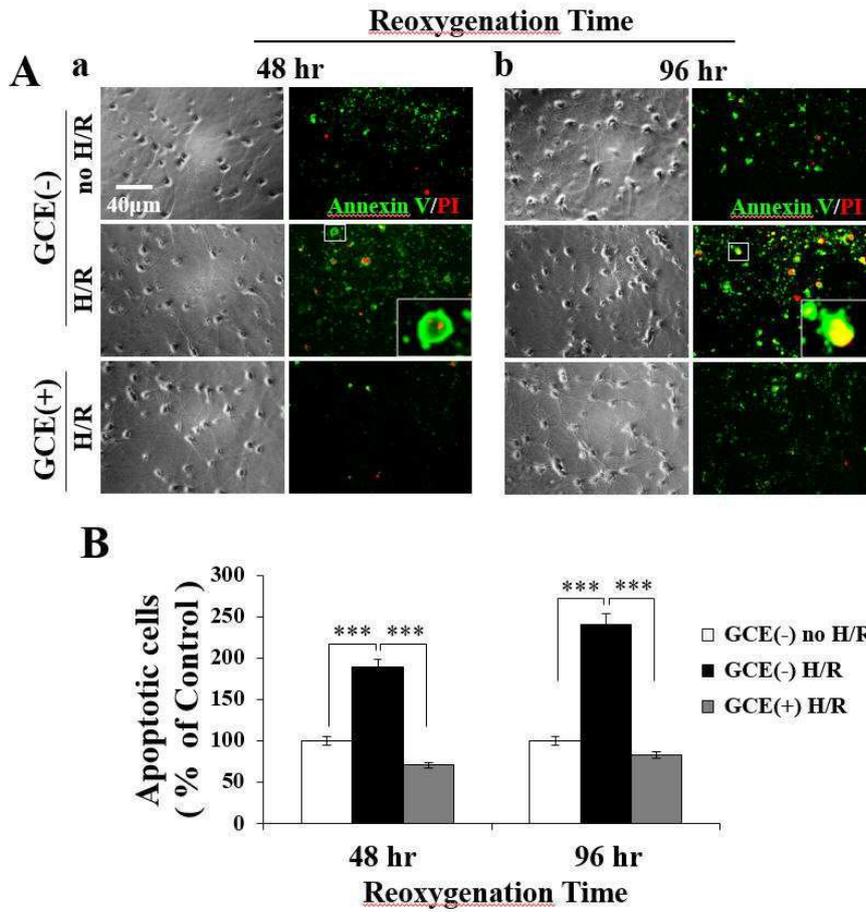
도면2



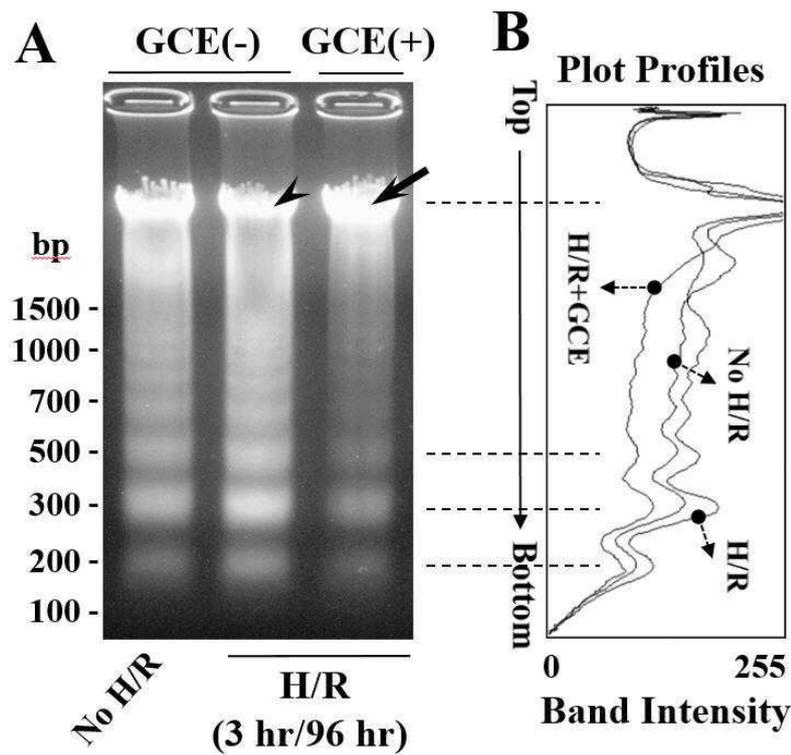
도면3



도면4



도면5



도면6

