



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년02월04일  
 (11) 등록번호 10-1356614  
 (24) 등록일자 2014년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 36/232** (2006.01) **A61P 25/28** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2008-0038046  
 (22) 출원일자 2008년04월24일  
 심사청구일자 2011년10월13일  
 (65) 공개번호 10-2009-0112261  
 (43) 공개일자 2009년10월28일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 Neurobiology of Learning and Memory, 79,  
 2003, pp.11-18\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**동국대학교 산학협력단**  
 서울특별시 중구 필동로1길 30 (필동3가, 동국대학교)  
 (72) 발명자  
**구병수**  
 경기도 안양시 동안구 부림로 34, 우성꿈마을 20  
 2동 1201호 (평촌동)  
**정윤관**  
 서울특별시 강남구 압구정로 201, 74동 105동 (압  
 구정동, 현대아파트)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**김순용**

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 김강필

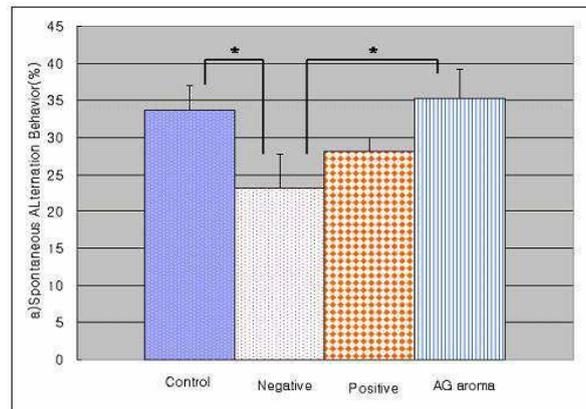
(54) 발명의 명칭 **당귀로부터 추출한 향유를 포함하는 알츠하이머병 치료를위한 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 알츠하이머병을 치료 또는 예방하는 약학적 조성물, 아로마테라피용 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 상기 약학적 조성물은 당귀에서 노루말핵산(n-hexane)으로 추출한 향유를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 약학적 조성물은 c-준 N-터미널 키나아제(c-Jun N-terminal kinase)의 인산화를 억제, p38 미토겐 활성화 단백질 키나아제(p38 mitogen- activated protein kinases)의 인산화를 억제, 세포외 신호조절 키나아제(extracellular signalregulated kinase)의 인산화를 억제 및 tau 단백질의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 한다.

상기와 같은 약학적 조성물에 의하면, 천연이나 한약에서 추출한 향산화, 항염증 물질이 알츠하이머병의 예방과 치료에 도움을 줄 수 있으며, 비용이 비교적 적게 들며, 쉽게 적용이 가능하고, 일상 생활에서 접근하기 쉬운 방법으로서 대중적으로 사용할 수 있는 이점이 있다.

**대표도** - 도1



(72) 발명자

**전송희**

서울특별시 서대문구 통일로26길 28, 무악청구1차  
110동 1306호 (홍제동)

**김건우**

경기 용인시 기흥구 동백5로 41, 3009동 904호 (중  
동, 성산마을신영지웰)

**김호준**

경기도 고양시 일산서구 주엽로 122, 문촌 뉴삼익  
아파트 1601동 1005호 (주엽동)

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

당귀 분말을 노루말핵산(n-hexane)으로 48시간 동안 추출한 향유를 포함하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제 1 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 c-준 N-터미널 키나아제(c-Jun N-terminal kinase)의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

**청구항 4**

제 1 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 p38 미토겐 활성화 단백질 키나아제(p38 mitogen- activated protein kinases)의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 세포외 신호조절 키나아제(extracellular signalregulated kinase)의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

**청구항 6**

제 1 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 tau 단백질의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

**청구항 7**

당귀 분말을 노루말핵산(n-hexane)으로 48시간 동안 추출한 향유를 포함하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병의 개선 또는 예방용 아로마테라피용 조성물.

**청구항 8**

당귀 분말을 노루말핵산(n-hexane)으로 48시간 동안 추출한 향유를 포함하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병의 개선 또는 예방용 건강기능식품 조성물.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 알츠하이머병을 치료 또는 예방하는 약학적 조성물, 아로마테라피 용 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 상기 약학적 조성물은 당귀에서 노루말핵산으로 추출한 향유를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 약학적 조성물은 c-준 N-터미널 키나아제의 인산화를 억제, p38 미토겐 활성화 단백질 키나아제의 인산화를 억제, 세포외 신호조절 키나아제의 인산화를 억제 및 tau 단백질의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 한다.

**배경 기술**

- [0002] 현대의학의 발달로 인한 수명증가에 따른 노인인구의 증가로 치매에 관한 관심이 날로 커지고 있고, 더욱이 치매는 완치가 힘들고 환자 주변사람들에게 미치는 과급효과가 커서 사회적으로도 큰 문제가 되고 있다.
- [0003] 뇌의 만성적 변성질환을 일으켜 치매를 유발하는 원인은 많으나, 특히 알츠하이머병(Alzheimer's disease)에 의한 치매가 전체 치매의 가장 많은 비중을 차지하고 있다. 알츠하이머형 치매는 1907년 Alois Alzheimer에 의해 처음 언급되었다.
- [0004] 초기에는 65세 이전에 발병한 치매환자로 국한되었으나, 최근에는 나이에 상관없이 65세 이후에 발병하는 치매에서도 임상적, 병리조직학적, 미세구조적, 신경생화학적으로 알츠하이머병과 유사한 소견이 나타남에 따라 알츠하이머형 노인성 치매(senile dementia of Alzheimer type: SDAT) 라고 불려지고 있다. 치매는 주로 노년기에 많이 생기며 현재 심장병, 암, 뇌졸중에 이어 4대 주요 사인으로 불릴 정도로 중요한 기질적 장애의 하나이다.
- [0005] 알츠하이머형 치매의 병인론에 대해서는 아직 확실히 밝혀진 것이 없으나, 병인으로 알루미늄 중독설, 면역기능 장애설, 유전학적 가설, 아세틸콜린 대사 장애설 등이 주로 받아들여지고 있다.
- [0006] 한의학(韓醫學)에서 경악전서 잠증모(景岳全書 雜證謨)의 전광편(癲狂篇)에 치태와 유사한 '치애'라 병명이 언급되었고, 청대(淸代)의 진사택(陳士澤) 등에 의해 태병에 대한 언급이 있었으며, 역대 의서(歷代 醫書)에 기록된 태병의 증상이 치매와 유사한 점을 발견할 수 있다.
- [0007] 상기 치매의 인지적 증상을 치료하는데는 Cognex(tacrine, Parke Davis), Aricept(donepezil, Pfizer), Exelon(rivastigmine, Novartis), Reminyl(galantamine, Evans) 등의 4가지 약물이 대표적으로 사용되어져 왔다. 이들 약물의 주작용은 아세틸콜린의 가수분해를 가역적으로 저해하여 아세틸콜린을 증가시키는 것이며, 그러므로, 이는 콜린성 신경이 기능적으로 손상되지 않았을 때 가장 효과적이다. Cognex의 경우 질병의 초기 및 중간 단계의 환자들에게 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 떨림증, 현기증, 구토증, 간독성 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 효능과 부작용에서 개선된 새로운 제품으로 1996년에 Aricept 제품이 판매되면서 이 제품은 Cognex보다 훨씬 우수하여 사용되었으나, 이 제품 역시 현기증, 구토, 설사, 근육경련 등의 부작용이 있다고 보고되었다. 한편, 이들 약물은 알츠하이머병 자체를 멈추거나 되돌릴 수는 없으며, 더욱이 얼마나 오랫동안 환자들이 이러한 약들을 복용해야 하는지 또 얼마나 오랫동안 효과가 있는지에 대해서는 아직 명확하지 않다.
- [0008] 상기 약물에 대한 대체요법으로서 향기요법이 대두되었는데, 향기요법은 다양한 천연식물에서에서 추출한 천연 향유성분(essential oil)을 질병의치료와 예방에 이용하여 신체적 건강은 물론 정신적 건강까지 도모하는 것으로 산후우울증의 증상을 감소시키는 효과가 있으며, 중년 여성의 우울, 스트레스, 갱년기증상의 감소효과가 있고, 입시 스트레스로 인한 집중력 저하와 정신적 무기력증을 호소하는 수험생에게 있어 뇌파검사상의  $\beta$ 파의 증가를 나타내 수험생의 정신적 각성에 효과가 있음이 밝혀졌다.
- [0009] 신의비전(神醫秘傳), 본초강목(本草綱目), 동의보감(東醫寶鑑) 등의 의서(醫書)에서 향기요법에 대한 기록이 있으며, 현대에 이르러 서는 향기요법은 한의학의 한 영역으로 대두되어 연구 및 임상활용에 많은 관심이 고조되고 있는 상황이다.
- [0010] 당귀(當歸)는 보익약(補益藥) 중에서 보익약(補血藥)의 대표약으로써 성미(性味)는 감신온(甘辛溫)하며, 귀경(歸經)은 심경(心經), 간경(肝經), 비경(脾經)이며 효능(效能)은 보혈화혈(補血和血), 주경지통(調經止痛), 윤조활장(潤燥滑腸)한다.
- [0011] 향기를 내는 당귀중(當歸中)의 휘발유(揮發油) 주성분은 butylidene phthalide, n-valerop-henone-o-carboxylic acid, dihydrophthalic anhydride와 다량의 자당(蔗糖), 비타민 B12, 비타민A류 물질이다.
- [0012] 당귀향기(當歸香氣)의 효과에 대해서 Chen은 당귀 에센셜 오일(essential oil)의 향기가 항우울작용이 있음을 보고하였고, Zhao는 당귀 에센셜 오일의 향기가 니코틴(nicotine) 중독으로 올 수 있는 도파민(dopamine)의 상승에 대해 억제효과가 있어 니코틴 중독에 유효한 효과가 있음을 보고하였다. 그러나, 아직까지는 당귀의 향기가 기억증진의 효과가 있는가에 대한 연구는 미흡한 상태이다.
- [0013] 이에 본 발명자는  $\beta$ -amyloid 1-42의 투여로 뇌세포손상에 의한 치매유발동물에 당귀향기를 흡입하도록 하여 동물행동실험과 JNK, p38, ERK의 인산화 및 tau의 인산화를 측정된 결과 당귀향기역의 뇌세포 활성화 및 기억증진

효과에 유의한 결과를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

[0014] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서 안출된 것으로서, c-준 N-터미널 키나아제(c-Jun N-terminal kinase)의 인산화를 억제, p38 미토겐 활성화 단백질 키나아제(p38 mitogen- activated protein kinases)의 인산화를 억제, 세포외 신호조절 키나아제(extracellular signalregulated kinase)의 인산화를 억제 및 tau 단백질의 인산화를 억제하여 효과적으로 알츠하이머병을 치료하고, 천연이나 한약에서 추출한 항산화, 항염증 물질로서 질병을 치료함으로써 비용이 비교적 적게 들며, 쉽게 적용이 가능하고, 일상 생활에서 접근하기 쉬운 방법으로서 대중적으로 할 수 있는 알츠하이머 병을 치료하기 위한 약학적 조성물, 치료제 및 아로마테라피오일을 제공하는데 목적이 있다.

**과제 해결수단**

[0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 알츠하이머병을 치료 또는 예방하는 약학적 조성물은 당귀에서 노루말핵산(n-hexane)으로 추출한 향유를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 상기 당귀는 산형과에 속한 다년생 초목(草木)으로 우리나라에서는 참당귀의 뿌리를 가을에 채취한 것을 건조하여 이용하고 있다. 성질은 溫 무독하고 미는 감신(甘辛)하며, 귀경(歸經)은 심간비경(心肝脾經)이며, 효능은 보혈화혈(補血和血), 주경지통(調經止痛), 윤조활장(潤燥滑腸)하며 결취(結聚), 붕루(崩漏), 혈허두통(血虛頭痛), 현훈(眩暈), 위비, 장조변난(腸燥便難), 용저창양(癰疽瘡瘍) 등을 치료한다. 당귀의 감미는 보하고 신미는 산하며 고미는 설하고 온성은 통기케하여 보혈화혈하며 또한 행기지통하는 효능이 있어 심 간 비 삼로 작용한다.

[0017] 상기 당귀의 주요한 유효성분은 정유 및 쿠마린계 유도체인 데쿠신(decursin), 데시놀(decusinol), 노다케네티ن(nodakenetin), 베타-시토스테롤( $\beta$ -sitosterol), 엄벨리페란 노데카닌(umbelliferan nodakenin) 등과 부틸리덴 프탈리드(butylidene phthalide), 비타민B12, 비타민A류 등이 있다.

[0018] 상기 약학적 조성물은 약학적 부형제와 함께 사용될 수 있는데, 상기 약제학적으로 허용되는 부형제는 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제가 있다. 또한, 이외에도 멸균된 수용액, 비수용성 용제, 현탁용제, 유제 등을 포함할 수 있으며, 비수용성 용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 알츠하이머병을 치료 또는 예방하는 약학적 조성물은 당귀에서 노루말핵산(n-hexane)으로 추출한 향유를 포함하여 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 담체와 혼합하여 사용할 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스(glucose), 슈크로스(sucrose) 또는 덱스트린(dextrin e)과 같은 카보하이드레이트(carbohydrate); 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타치온(glutathione)과 같은 항산화제(antioxidants); 킬레이팅 물질(chelating agents); 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilisers)와 함께 사용될 수 있다.

[0020] 상기 알츠하이머병은 아밀로이드 베타( $\beta$ -amyloid)에 의하여 유발된 것을 특징으로 한다. 상기 알츠하이머병의 병리학적 특징을 살펴보면, 대뇌피질이나 해마에 생기는 뇌 위축 및 뇌내에 노인반(senile plaque)이나 신경원섬유농축체(neurofibrillary tangle)가 침착되어 일어난다. 상기 알츠하이머병의 발병과정을 관찰하면 아밀로이드 베타라는 단백질이 축적되고, 이어서 치매가 나타남과 동시에 신경원섬유농축체가 축적되는 현상이 일어난다.

[0021] 과량의 아밀로이드 베타가 생성되어 독성을 유발하는 작용 기전은 다양하지만 크게 두 가지의 이론으로 질병의 진행을 설명할 수 있는데, 그 중 한가지가 아밀로이드 베타가 소교세포(microglia cell)를 활성화시켜 신경 세포를 손상시키는 사이토카인을 생성하여 일련의 염증 반응을 유발하는 것이다. 상기 아밀로이드 베타가 소교세포를 활성화시켜 세포 독성을 유발할 수 있는지에 대해 지금까지 알려진 바에 의하면 스트레스 관련 미토겐-활

성화 단백질(mitogen-activated protein; MAP)키나아제(kinases)로 p38 MAP kinase(p38 MAPK)와 c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 활성화로 인해 세포 독성 및 세포 사멸이 이루어진다고 알려져 있다. 왜냐하면, 이러한 단백질의 활성을 억제하면 아밀로이드 베타에 의해 세포 독성이 저해되기 때문이다.

- [0022] 향기요법에 응용되는 당귀향을 내는 당귀 중의 휘발유 주성분은 부틸리덴프탈리드(butylidene phthalide), n-발러롭-헥논-o-카르복실산(n-valerop-henone-o-carboxylic acid), 디하이드로프탈릭 안하이드라이드(dihydrophthalic anhydride)와 다량의 자당, 비타민 B12, 비타민A류 물질이다.
- [0023] 상기 추출은 노루말핵산을 사용하는데, 상기 당귀의 중의 향유와의 극성이 유사하여 상기 향유가 보다 잘 추출되며, 열탕 추출은 상기 향기성분이 파괴되는데 비하여 노루말핵산을 사용하는 경우 상기 향기성분이 파괴되지 않고 추출할 수 있으므로 상기 노루말핵산으로 추출하는 것이 바람직하다.
- [0024] 바람직하게는 상기 당귀는 분말이고, 상기 추출은 실온에서 48시간 동안 이루어지는 것을 특징으로 한다. 상기 당귀를 분말을 내어 노루말핵산에 넣는 경우 표면적이 커지기 때문에 보다 잘 추출되며 추출시에 교반하면 더 바람직하다.
- [0025] 바람직하게는, 상기 약학적 조성물은 c-준 N-터미널 키나아제(c-Jun N-terminal kinase)의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 한다. 상기 c-준 N-터미널 키나아제의 활성화로 인하여 세포독성 및 세포 사멸이 이루어지므로 상기 c-준 N-터미널 키나아제의 인산화가 억제되면 상기 세포독성 및 세포사멸이 일어나지 않는다.
- [0026] 바람직하게는, 상기 약학적 조성물은 p38 미토젠 활성화 단백질 키나아제(p38 mitogen-activated protein kinases;p-38 MAPK)의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 한다. 상기 p-38 MAPK는 스트레스 유발시에 다량으로 발생되어 세포를 퇴화시키거나 사멸시키는 역할을 하는 물질이다. 상기 p-38 MAPK 인산화를 억제하여 염증을 억제하고 신경세포의 퇴화나 사멸을 방지하여 신경질환을 막는 것이다.
- [0027] 바람직하게는, 상기 약학적 조성물은 세포외 신호조절 키나아제(extracellular signalregulated kinase)의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 바람직하게는, 상기 약학적 조성물은 tau 단백질의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 하는 한다. 신경원섬유농 축제는 신경전달물질의 세포 간 이동통로인 신경세포 돌기를 구성하고 있는 미소섬유관이 엉켜 생긴 것으로, 최근의 연구결과를 보면 tau라는 단백질의 인산화와 더불어 비정상적인 축적과 관계가 있는 것으로 보고되었다. 신경세포 안에 존재하는 tau는 정상적인 상태에서는 미소섬유관이 엉키지 않도록 배열해주는 역할을 한다. 그러나 알츠하이머병 환자의 경우 tau 단백질에 비정상적인 인산화가 과도하게 일어남으로 인해 미소섬유관이 불규칙적으로 엉켜 신경세포 돌기가 제대로 뻗어나가지 못해 신경전달물질이 원활히 이동하지 못하여 궁극적으로 신경세포사멸을 유도하게 된다. 상기 약학적 조성물은 상기 tau 단백질의 인산화를 막음으로써 상기 신경세포사멸이 유도되는 것을 방지한다.
- [0029] 그리고, 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 알츠하이머병을 치료 또는 예방하는 아로마테라피용 조성물은 당귀에서 노루말핵산(n-hexane)으로 추출한 향유를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 아로마테라피오일은 자연요법 중 하나인 향기요법에 많이 사용된다. 상기 향기요법은 나무, 나무의 뿌리, 줄기 잎이나, 꽃 등에서 자연의 추출물(essential oil)들을 뽑아내서 그것을 흡입하거나 마사지 하거나 목욕하는 방법으로 스트레스의 완화와 경감을 통해 정신적으로 뇌파에 영향을 끼쳐 스트레스, 우울, 불안, 불면증, 두통 등의 정신적인 질환까지 그 효능이 있다. 상기 향유를 아로마테라피 조성물로 사용하면 기억력 증진에 효과가 있으며 치매를 방지하는 효과가 있다.
- [0030] 또한, 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 알츠하이머병을 치료 또는 예방하는 건강기능식품 조성물은 당귀에서 노루말핵산(n-hexane)으로 추출한 향유를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 당귀의 향유를 건강식품의 향료로 포함하게 하여 식품의 풍미를 향상시키고 알츠하이머병의 치료 또는 예방하는 효과를 갖는다.

**효 과**

- [0031] 이상에서 상술한 바와 같이 상기와 같은 본 발명에 따른 알츠하이머병을 치료 또는 예방하는 약학적 조성물에 따르면, 당귀 추출향의 흡입만으로 아밀로이드 베타의 투여에 의한 세포 독성의 지표인 JNK 와 p38의 인산화가 억제하는 효과와 알츠하이머병 환자에서 특징적으로 보이는 tau의 인산화 억제효과 및 신경교세포의 활성지표인

GFAP의 발현도 억제효과가 있다. 그리고, 뇌 세포의 독성 저해뿐만 아니라 동물 행동실험에서 기억력 손상의 회복 효과도 있으며, 또한 이러한 효과는 기존에 알려진 알츠하이머병의 증상치료제인 tacrine보다 효과가 더 좋게 나타나므로, 천연이나 한약에서 추출한 항산화, 항염증 물질이 알츠하이머병의 예방과 치료에 도움을 줄 수 있으며, 비용이 비교적 적게 들며, 쉽게 적용이 가능하고, 일상 생활에서 접근하기 쉬운 방법으로서 대중적으로 할 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

[0032] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예를 상세히 설명하고자 한다.

[0033] <실시예 1 - 실험준비>

[0034] **[실시예 1-1 실험동물]**

[0035] 실험동물은 오리엔트바이오(주)에서 구입한 외관상 건강한 ICR계 mouse로 웅성 6주령(20-26g)을 40마리를 사용하였으며, 1 케이지 당 5마리씩 넣어두었고 온도 22±1℃, 습도 55±1%, 12시간 light-dark cycle의 통제된 사육실(동국대 일산병원 동물실)에서 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 7일 동안 사육시킨 후 실험에 사용하였다.

[0037] **[실시예 1-2 시약준비]**

[0038] 뇌 손상을 유발시키기 위해 사용한 β-amyloid 1-42 peptide fragments (Sigma), Control에는 β-amyloid 42-1, Positive에는 치매치료제로 tacrine (Sigma)을 사용하였다. 50ul Hamilton syringe와 26-gauge needle, perfusion시 Formalin 조성의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 NaHPO<sub>4</sub>, 0.9% Saline 조성의 NaCl, perfusion 후 brain 저장 시 PBS 조성의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaCl, TRITON X-100, brain section 후 장기보존액 조성은 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Sucrose, Polyvinyl pyrrolidone(PVP-40), Ethylene glycol는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였다. 그리고 마취제는 Ketamine과 Xylazine을 사용하였다.

[0039] **[실시예 1-3 당귀 향기액 조제]**

[0040] 실험에 사용한 당귀는 제천산 참당귀로 동국대일산한방병원에서 구입하였다. 당귀 1kg을 분말로 만든 다음, *n*-hexane 2ℓ를 넣고 실온에서 48시간 방치하여 추출하였다(Scheme 1). 방치하는 동안 가끔 저어주면서 가능한 많은 정유 香氣이 추출되도록 하였다. 추출액을 여과한 다음, 여액인 *n*-hexane을 증류하여 제거하고황갈색의 맑은 정유 향기액 16g을 얻었다.

[0041] <실시예 2 - 실험군의 구성>

[0042] 실험군은 1주일간 적응 사육시킨 후 group당 10마리씩 4group으로 나누고, 대조군과 실험군을 하기 표 1과 같이 설정하였다.

**표 1**

그룹	내용
대조군(Control group)	아밀로이드 베타 42-1를 주입하여 치매가 유발되지 않은 그룹
음성대조군(Negative group)	아밀로이드 베타 1-42를 주입하여 치매를 유발한 그룹
양성대조군(Positive group)	아밀로이드 베타 1-42를 주입하여 치매를 유발한 후 7일간 치매치료제로 알려진 tacrin을 투여한 그룹
당귀 향유 실험군(AG aroma group)	7일간 향기액을 흡입시킨 후 아밀로이드 베타 1+42를 주사하고 다시 당귀 향기액을 7일간 24시간 흡입시킨 그룹(흡입량은 1케이지 당 4그램씩 배당하였음)

[0044] AG aroma group은 7일간 당귀 정유액 향기를 24시간 흡입하게 하였고, 이외 group은 별다른 처치하지 않은 상태

에서 Control을 제외한 세 group은  $\beta$ -amyloid 1-42를, Control group은  $\beta$ -amyloid 42-1을 Laursen & Belknap의 방법에 따라 50 $\mu$ l Hamilton microsyringe를 이용하여 26 gauge needle로 bregma에 2.4mm 깊이로 5 $\mu$ l를 intracerebroventricular injection하였다. 다시 7일간 AG aroma group은 향기를 흡입시키고, Positive group은 7일간 tacrine(sigma)을 5mg/kg의 양을 i.p로 injection하였다. 다음날, Y-maze task를 실시하고, 이어 passive avoidance task의 training trial을 실시하였다. 다시 24시간 후 passive avoidance task의 retention trial을 실시한 후 brain의 hippocampus 부위를 적출하여 immunocytochemistry, western blot을 실시하였다.

[0045]

[0046] <실시예 3 - Y-maze task>

[0047] Y자형 미로 측정 장치는 3개의 통로(arm)를 뻗어 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이 25cm, 높이 14cm, 폭 5cm이고 동일한 각도로 위치한다. Y자형 미로의 한 통로의 끝에 실험동물의 머리 부분이 향하도록 하고 7분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 한다.

[0048] 동물의 움직임을 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것(arm entry)으로 본다. 동물의 움직임을 교차횟수(alternation)로 나타내는데, 교차횟수란 동물이 연속적으로 3개의 통로를 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의된다. 자발적인 교차 행동량은 실제 교차횟수와 최대 가능한 교차횟수(즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분비이다. 1마리 당 7분간 미로 내 움직임을 측정하였다.

[0049] 도 1과 도 2를 참고하여 살펴보면,  $\beta$ -amyloid 1-42를 주입한 group은 Control group에 비해 공간지각 능력이 현저히 저하됨을 관찰할 수 있었다. 그러나, 당귀향을 미리 흡입시킨 group에서는  $\beta$ -amyloid 1-42 투여에 의한 행동 변화가 거의 관찰되지 않았다. 거의 Control group 수준의 공간지각 능력을 보였다. 또한 치매 치료제를 투여한 group 보다도 더 효과가 좋은 것으로 관찰되었다(도 1). 그리고 각각의 팔로 들어가는 횟수는 각 group 당 차이를 보이지 않았다(도 2). 따라서 이러한 결과는 일반적인 운동능력에는 각 group 당 차이가 없음을 시사한다.

[0050] <실시예 4 - Passive avoidance task>

[0051] [실시예 4-1 Passive avoidance test 장치]

[0052] 측정기기는 내부가 두 개의 방으로 구성된 상자(shuttle box, 53cmW × 44cmH × 33cmD)의 가운데에 guillotine door가 있으며 한쪽 방에는 바닥(grid floor)전체에 전기쇼크(scrambled foot-shock)를 가할 수 있는 장치가 되어 있다.

[0053] [실시예 4-2 Training trial]

[0054] Test는 실험군 또는 대조군 각 1마리씩 한쪽 방에 넣고 15초간의 탐색시간을 준 뒤, 위에서 조명과 소음을 가하면 가운데의 guillotine door를 통과하여 조용하고 어두운 다른 방(쇼크실)에 도달한다. 쥐가 쇼크실에 들어가면 자동적으로 guillotine door가 닫히면서 전기쇼크가 가해진다. 쇼크는 0.3mA의 전류를 3초간 통하게 하였으며 쥐가 foot-shock를 받은 후에 꺼내어 home cage에 다시 넣어둔다. 이러한 방법으로 각각 7마리의 실험군과 대조군에 대하여 전기쇼크를 가하였다. 120초 동안에 쇼크실로 들어가지 않는 쥐는 실험대상에서 제외시켰다.

[0055] [실시예 4-3 Retention trial]

[0056] 24시간 후, 위의 training을 받은 쥐에 대해 전기쇼크를 실시했을 때, 약물의 기억증진효과가 있으면 쥐가 전날의 쇼크를 기억하여 쇼크실로 잘 들어가지 않게 된다. 따라서 도달시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억효과가 좋을 것을 나타낸다. 이 때, 쇼크실 도달시간(step-through latency time)은 300초(cut-off time)까지 측정하였다.

[0057] 도 3을 참고하면, 당귀향을 미리 흡입한 group은  $\beta$ -amyloid 1-42 만을 주입한 group에 비해 유의하게 기억능력이 향상되었으며 거의 Control group 수준으로 나왔다.

[0058] <실시예 5 - Immunohistochemistry>

[0059] Immunohistochemistry 방법은  $\beta$ -Amyloide 1-42를 주입하고 5일 후에 4% PFA로 Transcardially Perfusion 한 후 30% sucrose에 넣어 cryoprotected시킨다.  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 유지되는 cryosection microtome을 사용하여 35um 로 coronally section한다. Section 된 조직들은 cryoprotectant에 담근 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한다. 항체는 Glial fibrillary acidic protein(rabbit anti-GFAP,1:200, Chemicon)을 사용하였다.

[0060] PBS에서 Coating slide에 절편 된 조직을 올려놓은 후 3번 PBS로 washing 한 후 Blocking solution(1% Bovine serum,albumin 과 0.2% Triton X-100)을 도포하여 실온에서 30분간 반응시킨다, 3번 PBS로 washing 해준 후 Antibody를 PBS에 희석하여 도포해준 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 Overnight 시킨다. 다음날 3번 PBS로 washing 해준 후 Biotinylated rabbit Secondary Antibody를 도포하여 2시간동안 실온에서 반응시킨 후 DAB 발색반응을 유도한다. 마지막으로 mount 용액을 도포하여 coverslip을 덮는다. 사진촬영은 olympus(BX-UCB)microscopy 를 이용하였다.

[0061] 도 4를 참고하면, glial fibrillary acidic protein(GFAP)은 뇌에서 염증반응이나 손상, 알츠하이머 등의 뇌질환 시에 증가하는 단백질로 알려져 있으므로 이 단백질의 면역염색을 통하여 뇌의 어느 부위에 이 단백질이 증가되었는지를 관찰하였다. GFAP staining 결과  $\beta$ -amyloid 1-42를 주입한 group에서는 GFAP의 염색이 진하게 되었으며 향을 미리 흡입한 group에서는 Control group과 비슷한 상태로 GFAP의 양이 증가하지 않았다(도 4).

[0062] <실시예 6 - Western blotting analysis>

[0063] 뇌를 적출한 후 해마를 분리하여 완충액(50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 30 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NaF, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , prot-ease inhibitor cocktail)을 넣고 균질기를 이용하여 균질화하였다. 균질액을 12000 rpm에서 15 분간 4도에서 원심분리 후 상층액만을 얻었다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid(BCA, Pierce)법을 사용하였다. 상층액은 4X Lamllie의 완충액 (62.5 mmol/l Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)을 넣고 95 도에서 boiling 하였다. 정량된 단백질 시료 50 ug를 4-12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel(Invitrogen) 전기 영동법(SDS-PAGE)으로 분리되었고, nitrocellulose paper(Amersham)로 옮겼다. 단백질을 옮겨진 막을 Ponceau-S로 염색하여 단백질이 완전하게 옮겨졌음을 확인하고 0.1% Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline(TBS-T)으로 씻은 후 5% 탈지 분유액으로 30분 이상 blocking하였다. 항 인산화 p38(p-p38), p38, 항 인산화 MAPK(p-MAPK), MAPK, 항 인산화 JNK(p-JNK), JNK, 항 인산화 tau(p-tau, Ser262) 및 tau 항체 (Cell signaling tech. USA)와 함께  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 동안 반응시킨 후 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후 blot을 2차 항체와 함께 1시간동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 막을 씻고 enhanced chemiluminiscence system(ECL, Pierce)으로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비(LAS-3000, Fuji)를 이용하였다.

[0064] [실시예 6-1 당귀 정유액의 향기 흡입 후 JNK의 인산화 억제 효과]

[0065] 도 5를 참고하면, 당귀 향기액을 미리 흡입시켰을 때 세포가 스트레스를 받거나 사멸시에 활성화 된다고 알려진 단백질 중 JNK의 활성화와 인산화 억제 효과를 살펴보았다. 상기 도면의 C는 아밀로이드 베타 42-1을 나타내는 것이고, N은 아밀로이드 베타 1-42를 나타낸 것이며, S는 향기를 나타낸 것이다. 또한, P는 택린 치료제를 나타낸 것이다. 향기를 미리 1주일간 흡입시킨 뒤 beta-amyloid(1-42)를 주입하여 치매를 유발한 후 다시 1주일간 향기를 흡입시킨 group(S)는 선행 향기 흡입 없이 치매를 유발한 group (N)에 비해 JNK의 인산화가 크게 억제되었다. 그리고 치매를 유발하고 치매 치료제의 일종인 tacrine을 투여한 group(P)은 치매 유발 후 아무 처치를 받지 않은 group에 비해 약간 JNK의 인산화가 억제되었다(도 5). 이러한 결과는 당귀 향기 흡입이 기존의 치매 치료제에 비해 효과가 월등함을 입증하는 것이다.

[0066] [실시예 6-2 당귀 정유액의 향기 흡입 후 p38의 인산화 억제 효과]

[0067] 도 6을 참고하면, 당귀 향기를 미리 1주일간 흡입시킨 뒤  $\beta$ -amyloid(1-42)를 주입하여 치매를 유발한 후 다시 1주일간 향기를 흡입시킨 group은 선행 향기 흡입 없이 치매 유발 후 치매 치료제의 일종인 tacrine을 투여한

group에 비해 p38의 인산화가 크게 억제되었는데, 이는  $\beta$ -amyloid(42-1)를 주입하여 치매가 유발되지 않은 Control group과 비슷한 억제 효과를 보였다. 치매 유발 후 tacrine을 투여한 group은 치매 유발 후 아무런 처치를 받지 않은 group과 비교하였을 때 p38의 인산화 억제가 확인되지 않았다.(도 6) 상기 도면의 C는 아밀로이드 베타 42-1을 나타내는 것이고, N은 아밀로이드 베타 1-42를 나타낸 것이며, S는 향기를 나타낸 것이다. 또한, P는 양성대조군인 택린 치료제를 나타낸 것이다.

[0068] **[실시예 6-3 당귀 정유액의 향기 흡입 후 ERK의 인산화 억제 효과]**

[0069] 도 7을 참고하면, 당귀 향기를 미리 1주일간 흡입시킨 뒤  $\beta$ -amyloid(1-42)를 주입하여 치매를 유발한 후 다시 1주일간 향기를 흡입시킨 group은 선행 향기 흡입 없이 치매 유발 후 치매 치료제의 일종인 tacrine을 투여한 group에 비해 ERK의 인산화가 크게 억제되었는데, 이는  $\beta$ -amyloid(42-1)를 주입하여 치매가 유발되지 않은 Control group에 비해 우수한 억제 효과를 보였다. 치매 유발 후 tacrine을 투여한 group은 치매 유발 후 아무런 처치를 받지 않은 group과 비교하였을 때 ERK의 인산화 억제가 확인되지 않았다.(도 7) 상기 도면의 C는 아밀로이드 베타 42-1을 나타내는 것이고, N은 아밀로이드 베타 1-42를 나타낸 것이며, S는 향기를 나타낸 것이다. 또한, P는 양성대조군인 택린 치료제를 나타낸 것이다.

[0070] **[실시예 6-4 당귀 정유액의 향기 흡입 후 tau의 인산화 억제 효과]**

[0071] 도 8을 참고하면, 당귀 향기를 미리 1주일간 흡입시킨 뒤  $\beta$ -amyloid(1-42)를 주입하여 치매를 유발한 후 다시 1주일간 향기를 흡입시킨 group은 선행 향기 흡입 없이 치매 유발 후 치매 치료제의 일종인 tacrine을 투여한 group에 비해 tau의 인산화가 크게 억제되었는데, 이는  $\beta$ -amyloid(42-1)를 주입하여 치매가 유발되지 않은 Control group에 비해 우수한 억제 효과를 보였다. 치매 유발 후 tacrine을 투여한 group은 치매 유발 후 아무런 처치를 받지 않은 group과 비교하였을 때 tau의 인산화 억제가 확인되지 않았다. 상기 도면의 C는 아밀로이드 베타 42-1을 나타내는 것이고, N은 아밀로이드 베타 1-42를 나타낸 것이며, S는 향기를 나타낸 것이다. 또한, P는 양성대조군인 택린 치료제를 나타낸 것이다.

[0072] **Data 분석 및 통계처리**

[0073] 모든 측정값은 평균값 표준편차(mean±S.D.)로 표시하였고, 각 실험군간의 통계학적 분석은 window용 SPSS Program의 one-way ANOVA로 검정하여 p값이 0.05이하인 경우에 유의한 것으로 인정하였다. Immunocytochemistry, Western blot은 영상분석 관능검사를 시행하였다.

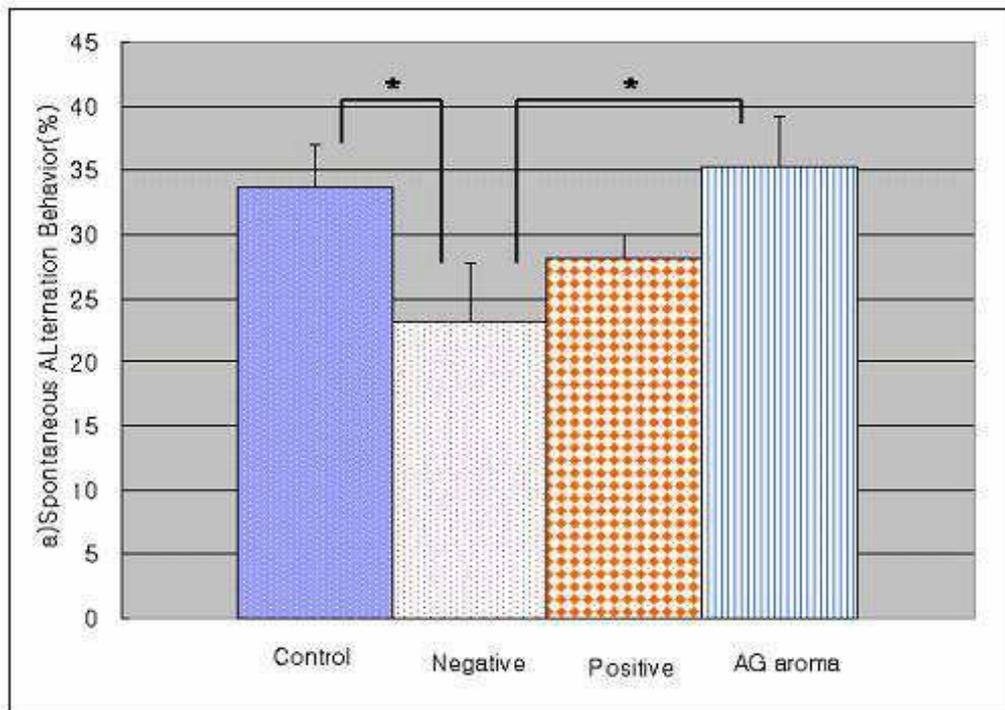
[0074] 본 발명은 도면에 도시된 일 실시예를 참고로 설명되었으나, 이는 예시적인 것에 불과하며, 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 타 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 등록청구범위의 기술적 사상에 의해 정해져야 할 것이다.

**도면의 간단한 설명**

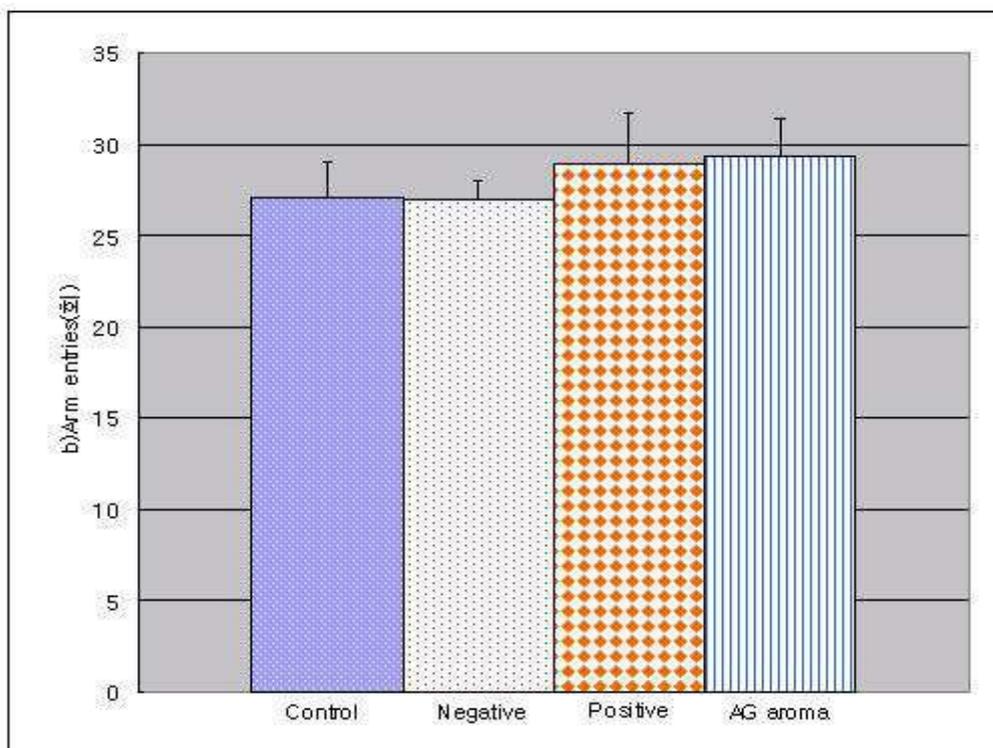
- [0075] 도 1은 Y-maze task 에 따른 대조군과 실험군의 공간지각 능력의 차이를 나타낸 그래프;
- [0076] 도 2는 Y-maze task 에 따른 대조군과 실험군이 Y자형 미로의 통로를 통과한 횟수를 나타낸 그래프;
- [0077] 도 3은 수동회피 학습에 의한 대조군과 실험군의 쇼크실 도달시간을 나타낸 그래프;
- [0078] 도 4는 대조군과 실험군의 해마에 신경교원섬유 산단백(glial fibrillary acidic protein)의 증가 여부를 나타낸 도면;
- [0079] 도 5는 대조군과 실험군의 해마에 c-준 N-터미널 키나아제의 억제 여부를 나타낸 도면;
- [0080] 도 6은 대조군과 실험군의 해마에 p38 미토겐 활성화 단백질 키나아제의 억제 여부를 나타낸 도면;
- [0081] 도 7은 대조군과 실험군의 해마에 세포의 신호조절 키나아제의 억제 여부를 나타낸 도면; 및
- [0082] 도 7은 대조군과 실험군의 해마에 tau 단백질의 인산화의 억제 여부를 나타낸 도면이다.

도면

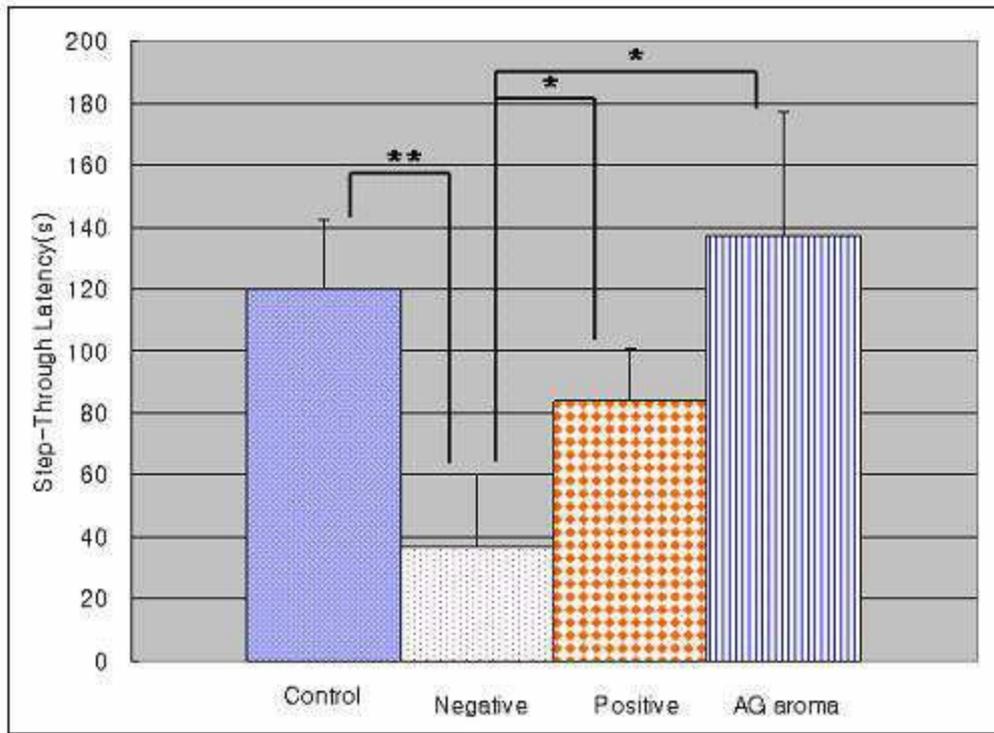
도면1



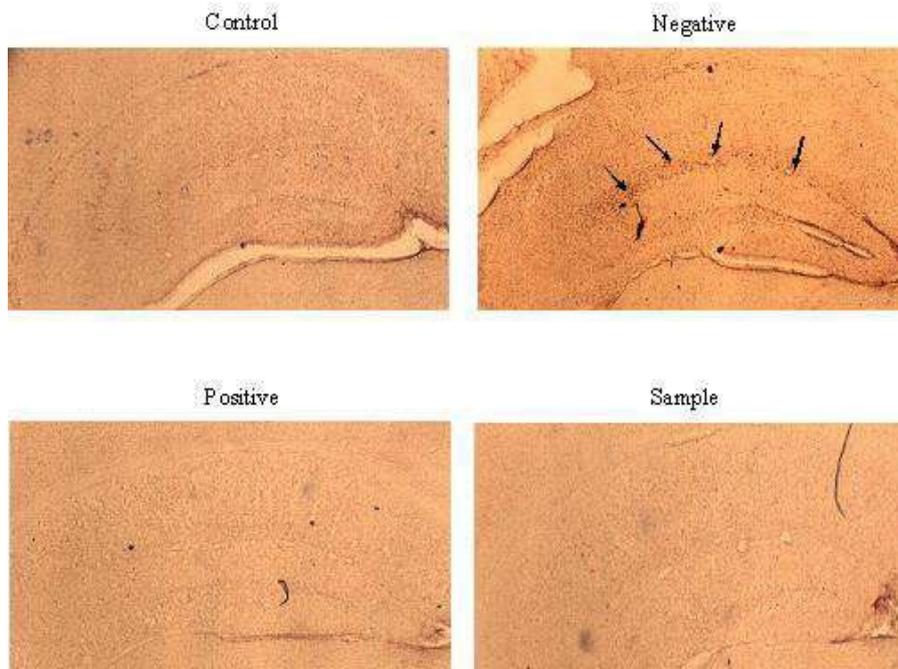
도면2



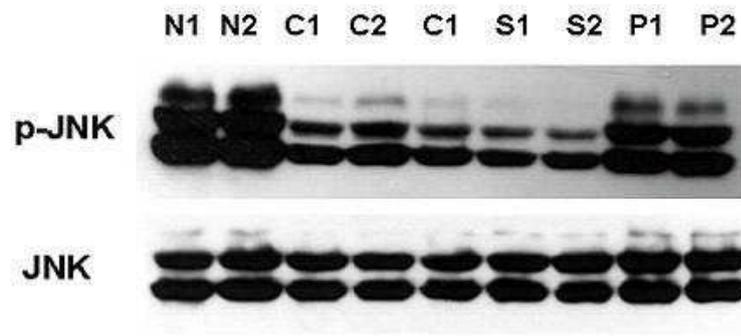
도면3



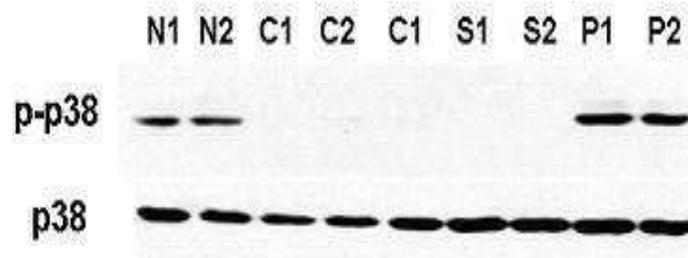
도면4



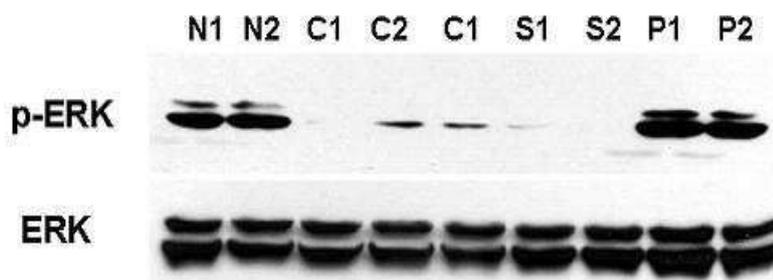
도면5



도면6



도면7



도면8

