



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월08일
(11) 등록번호 10-2224178
(24) 등록일자 2021년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) A23L 5/20 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 5/23 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0092031
(22) 출원일자 2020년07월24일
심사청구일자 2020년07월24일
(56) 선행기술조사문헌
KR101717698 B1*
KR1020190005157 A*
KR1020140072421 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전남바이오산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
(72) 발명자
최철웅
광주광역시 서구 풍암순환로 54, 106동 1807호
김유진
전남 장흥군 장흥읍 건산남부길 31, 102동 403호
(74) 대리인
최석진

전체 청구항 수 : 총 4 항

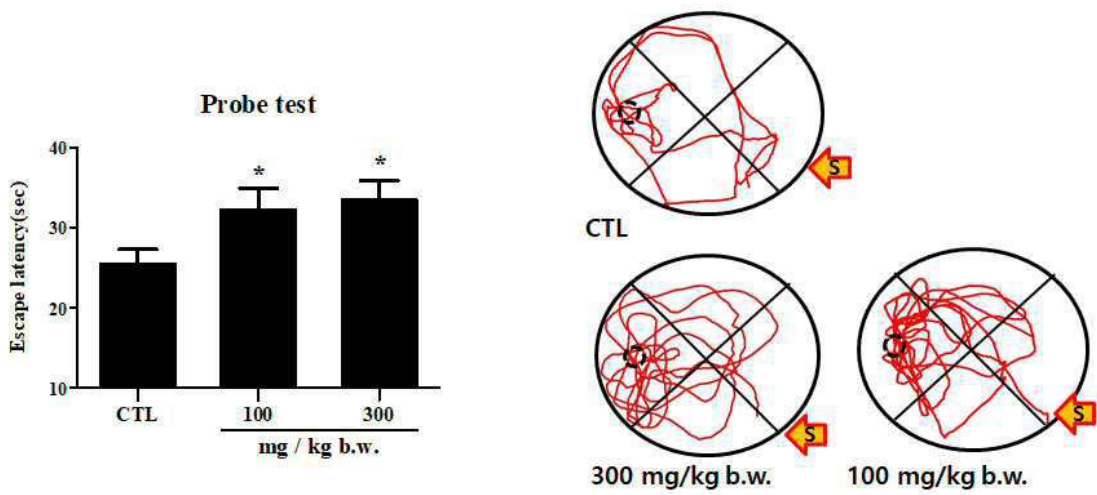
심사관 : 김현주

(54) 발명의 명칭 **붉가시나무(Quercus acuta Thunb.) 열매 또는 잎 추출물을 포함하는 인지능력 또는 기억력개선헌용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 붉가시나무 (Quercus acuta Thunb) 열매 또는 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지능력 및 기억력 개선 건강기능식품 조성물 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 퇴행성뇌질환에 기인한 인지능력 및 기억력 개선이 아닌 신경가소성 및 시냅스 재구성을 개선시킴으로서 일반 정상인을 대상으로 하는 인지능력 또는 기억력을 개선시킬 수 있는 건강기능식품 조성물로서 사용가능하다

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

(72) 발명자

배동혁

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

오둘리

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 202 부영5차아파트 503동 203호

오교녀

광주 서구 월드컵4강로 28번길 50-18, 101동 406호

홍지애

광주광역시 동구 계림로 30번길 15, 푸른길 두산위브 203동 402호

임소정

광주광역시 남구 임암동(효천2로 1) 시티프라디움 115동 705호

김초인

전남 장흥군 안양면 우드랜드길 288

이슬기

전라남도 순천시 이수로 224-29(덕암동, 현대아파트) 102동 811호

신자원

전라남도 장흥군 장흥읍 진골목길 4, 리치빌 306호

김영욱

전라남도 장흥군 장흥읍 동교3길 53

김재용

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

이학성

대전광역시 유성구 엑스포로 448(전민동, 엑스포아파트) 106-1205

오득실

광주광역시 남구 용정길 49(주월동, 신영루체빌 아파트) 101-1003

박종석

전라남도 나주시 그린로 276(빛가람동, 빛가람엘에이치4단지아파트) 408-302

김현우

전라남도 나주시 남평읍 지석로 167(나주 남평강변도시 양우내안애 리버시티 2차 206-401

명세서

청구범위

청구항 1

붉가시나무(*Quercus acuta* Thunb.)의 잎 또는 열매 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 붉가시나무 잎 또는 열매 추출물은 에탄올, 메탄올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군중에서 선택되는 1종 이상을 추출용매로 가용한 추출물인 것인 인지능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품 조성물

청구항 3

제1항의 건강기능성 식품 조성물이 0.01 내지 99.9 중량%의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 인지능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품

청구항 4

제3항에 있어서, 건강기능성 식품은 정제, 캡슐제, 연질 캡슐제, 과립제, 액제 중에서 선택되는 어느 하나의 형태로 제조되는 것인 인지능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 붉가시나무 (*Quercus acuta* Thunb) 열매 또는 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지능력 및 기억력개선 건강기능식품 조성물 관한 것이다. 더욱 상세하게는 본 발명에 따른 조성물은 퇴행성뇌질환에 기인한 인지능력 및 기억력개선이 아닌 신경가소성 및 시냅스 재구성을 개선시킴으로서 일반 정상인을 대상으로 하는 인지능력 또는 기억력을 개선시킬 수 있는 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자연계에 존재하는 식물체는 그 종류가 매우 다양할 뿐만 아니라 유용한 생리활성 성분을 함유하고 있는 경우가 많고, 이러한 식물체 유래 성분들은 인공적으로 합성 혹은 변형과정을 거쳐 생성되는 화합물에 비해 대체로 안정성이 우수하며, 자연계에 존재하는 물질이므로 자연분해가 가능하기 때문에 분해되거나 배출되지 않아 체내에 축적되는 문제가 적다. 이에 본 발명자는 부작용 없이 효과적으로 인지능력 및 기억력을 개선할 수 있는 식물체 유래 인지능력 및 기억력을 개선에 효과적인 건강기능성 식품을 개발하고자 국내 자생하는 식물들을 탐색해 왔다.

[0003] 본 발명자들은 인지능력 및 기억력을 개선에 보다 효과적인 물질을 개발하기 위하여 다양한 식물체를 대상으로 스크리닝을 시도하였으며, 이들 중 붉가시나무(*Quercus acuta* Thunb.)가 그 가능성이 있음을 발견하게 되었다. 붉가시나무는 전라남도, 경상남북도 및 제주도의 표고 170~500m의 양지바른 산기슭과 계곡에서 많이 자라는 상록활엽교목이다. 높이 20m, 지름 60cm 이상으로 자라는 나무로 어린 가지에는 갈색 털이 밀포한다. 잎은 어긋나며 긴 타원형 또는 긴 난형으로 길이 7~13cm이고 가장자리가 밋밋하다. 꽃은 1가화로서 5월에 피고 열매는 길이 2cm로서 다음해 10월에 익는다. 목재의 빛깔이 붉은빛을 띠기 때문에 붉가시나무라는 이름이 붙었다.

[0004] 국내 천연자원인 붉가시나무를 원료로하여 바탕으로 보다 세부적이고 본격적인 연구를 통해 붉가시나무의 열매

또는 잎 추출물이 NMDA, AMPA 수용체에 의해 형성되는 LTP(Long-term potentiation) 활성화 경로를 따른다는 결과 및 수용체의 증가로 그 신호가 강화됨을 확인하였다. 또한 LTP뿐만 아니라 신경가소성 주요인자인 p-CREB에 영향을 미치는 p-ERK, p-CaMKII의 발현 증가를 확인하고 신경 가소성 활성화 기전을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0005] 한편, 종래의 인지능력 및 기억력개선용 조성물과 관련한 선행 기술들은 대부분이 노인성 치매 질환과 관련한 것들이 주를 이루며, 본원발명과 같이 일반 정상인을 대상으로 하는 인지능력 또는 기억력을 개선시킬 수 있는 효과가 우수한 조성물과 관련한 선행기술은 부족한 실정이다.

[0006] 즉, 기존의 선행기술은 대부분이 β -amyloid를 이용한 퇴행성뇌질환인 알츠하이머 모델과 scopolamine을 투여한 건망증 모델 등을 활용하여 기억력개선 기전을 확인하고자 했지만, 환자가 아닌 일반인을 대상으로는 관련 기전의 연결이 어려운 상황이다. 하지만 본 발명은 노인성 퇴행성뇌질환이 아닌 일반 정상인을 대상으로 인지 및 기억력을 강화할 수 있는 기전을 선정하여 본 발명을 완성함으로써, 퇴행성뇌질환 환자가 아닌 건강기능식품의 목적에 부합하는 일반인(청소년기 학습 등)을 대상으로 보다 더 효과적인 접근이 될 것으로 판단되어진다.

[0007] 따라서 본 발명은 붉가시나무 추출물을 활용하여 해마세포에서의 기억력개선 관련 신경가소성 인자를 측정하는 한편 해마세포에서의 시냅스 재구성 인자 및 이에 따른 장기강화작용, 신경가소성인자 활성화 기전을 탐색함으로써 일반 정상인을 대상으로 하는 인지능력 또는 기억력을 개선시킬 수 있는 효과가 우수한 조성물의 제공을 하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국내 등록번호 제10-1480899호는 굴피나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 개선, 인지능력 개선, 치매 예방, 지연 또는 치료 효과를 갖는 기능성 건강보조식품을 개시한다. 본 발명의 약체학적 조성물은 굴피나무 추출물을 유효성분으로 함유하고 있어, 부작용 없이 치매를 예방, 지연 또는 치료할 수 있고, 기억력 및 인지능력을 개선할 수 있다.

(특허문헌 0002) 국내 공개번호 제10-2019-0117262호는 이팝나무 잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 개선, 인지능력 개선, 치매 예방, 지연, 치료 또는 개선용 조성물을 개시하고 있다. 상기 조성물은 기억력 및 인지능력을 향상시킬 수 있으며, 아세틸콜린에스테라제 저해활성, 베타 아밀로이드의 생성 및 응집저해활성, 베타 아밀로이드 플라그 생성저해활성을 통해 부작용 없이 치매를 효과적으로 예방, 지연, 개선 또는 치료할 수 있다

(특허문헌 0003) 국내 등록번호 제10-2008774호에는 곱피, 강황, 건강 및 홍삼 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 개선, 인지능력 개선, 치매 예방, 지연, 치료 또는 개선용 조성물을 개시한다. 상기 조성물은 단기 기억력, 공간 기억력, 공간 인지능력 등 기억력과 인지능력을 향상시킬 수 있으며, 대뇌의 피질 영역 및 해마 영역의 베타-아밀로이드 축적 억제 및 베타-아밀로이드의 응집 억제를 통해 부작용 없이 치매를 효과적으로 예방, 지연, 개선 또는 치료할 수 있다.

(특허문헌 0004) 국내 등록번호 제10-1828379호는 해당화 꽃 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 기억력 개선, 인지능력 개선, 치매 예방, 지연, 개선 또는 치료용 조성물을 개시한다. 상기 조성물은 해당화 꽃의 에탄올 추출물, n-헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 n-부탄올 분획물 중에서 선택된 것을 유효성분으로 함유하여, 아세틸콜린에스테라제 저해활성, 베타-시크레타제 저해활성 및 베타-아밀로이드 응집 저해활성을 나타내어 부작용 없이 치매를 효과적으로 예방, 지연, 개선 또는 치료할 수 있을 뿐만 아니라 기억력 및 인지능력을 개선할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 우리나라의 천연 식물자원을 활용할 목적으로 천연원료인 붉가시나무를 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 인지능력 및 기억력개선 건강기능식품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 붉가시나무(*Quercus acuta* Thunb.) 의 잎 또는 열매 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인지능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품조성물 및 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 본원발명의 붉가시나무 잎 또는 열매 추출물은 에탄올, 메탄올 및 이들의 혼합물로 이루어진 균중에서 선택되는 1종 이상을 추출용매로 가용한 추출물인 것을 특징으로 한다.
- [0012] 본원발명의 인지능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품은 붉가시나무 잎 또는 열매 추출물을 포함하는 조성물이 0.01 내지 99.9 중량%의 양으로 포함되는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 또한, 상기 건강기능성 식품은 정제, 캡슐제, 연질 캡슐제, 과립제, 액제 중에서 선택되는 어느 하나의 형태로 제조되는 것을 특징으로 하는 인지능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품 및 약품을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 붉가시나무 열매 또는 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 NR2A, NR2B, PSD95의 발현을 증가시켜 LTP(Long-term potentiation)가 형성될 때 나타나는 신경세포 말단의 리모델링(synapse remodeling)에 영향을 주고, 증가된 NMDA 수용체, AMPA 수용체의 하위 시그널인 p-ERK, p-CaMK II의 신호가 강화되어 LTP 형성에 도움을 주어 일반 정상인의 인지능력 또는 기억력을 개선시킬 수 있는 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본 발명에서 사용된 붉가시나무의 원료인 잎, 열매의 사진을 나타낸다.
- 도 2는 붉가시나무의 원료인 잎 또는 열매로부터 얻어진 동결건조물을 나타낸다.
- 도 3은 태아 쥐(SD rat-embryo)의 뇌 해마에서 1차배양(primary culture)한 세포에 붉가시나무 열매, 잎 추출물을 처리한 후, 기억력 개선 주요 인자로서 신경세포 가소성에 영향을 미치는 p-CREB 수준을 측정된 결과를 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 붉가시나무 열매 또는 잎 추출물이 기억력 개선 주요요소인 시냅스 재구성(synapse remodeling) 지표로서 신경세포 NMDA 수용체(Subunit: NR2A, NR2B) 및 AMPA 수용체(subunit: GluR1), PSD-95 단백질의 발현에 미치는 효과를 측정된 결과이다.
- 도 5는 해마세포에서의 시냅스 재구성에 따른 장기강화작용 및 신경가소성인자 활성화 기전을 탐색하기 위해 ERK와 CaMK II의 발현에 미치는 효과를 측정된 결과이다.
- 도 6은 붉가시나무 잎 또는 열매 추출물이 모리스 수중미로실험(Morris water maze test)에서 흰쥐(SD-rat)의 장기, 단기 기억력에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 모리스 수중미로실험에서 과생된 단서탐색실험(probe test)에서 붉가시나무 잎 또는 열매 추출물이 흰쥐의 장기 기억력에 미치는 효과를 나타낸 결과이다.
- 도 8은 붉가시나무 잎 또는 열매 추출물이 수동회피실험(Passive avoidance test)에서 흰쥐의 기억력에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 붉가시나무 추출물을 함유하는 인지능력 또는 기억력개선용 조성물과 관련한 구체적인 내용을 상세히 설명하면 다음과 같다. 도 1은 본 발명에서 사용된 붉가시나무의 원료인 잎, 열매의 사진을 나타내고, 도 2는 붉가시나무의 원료인 잎, 열매로부터 얻어진 동결건조물을 나타낸다.
- [0017] **1. 붉가시나무(*Quercus acuta* Thunb) 잎 열수 추출물의 제조**
- [0018] 붉가시나무 잎 추출물은 물 또는 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이들의 혼합 용매 중에서 선택되는 어느 하나로 부터 가용하여 제조한다. 건조된 붉가시나무 잎 500g에 7.5L 증류수를 첨가하여 100℃에서 3시간 동안 가열하여 열수 추출하였다. 상기 추출된 열수 추출물은 감압 농축 및 동결 건조하여 붉가시나무 잎 열수 동결건조물 91.2g을 얻었다.
- [0019] **2. 붉가시나무 열매 열수 추출물의 제조**
- [0020] 건조된 붉가시나무 열매 500g에 10L 증류수를 첨가하여 100℃에서 3시간동안 가열하여 열수 추출하였다. 상기

추출된 열수 추출물을 감압 농축 및 동결 건조하여 붉가시나무 열매 열수 동결건조물 56.2g을 얻었다.

[0021] 실시예 I. 붉가시나무 열매, 잎 추출물을 이용한 *In vitro* 실험

[0022] 1. 실험세포 준비

[0023] 실험에 사용한 모든 세포는 1차 배양 해마 신경세포(primary cultured Hippocampal neurons)로 이 세포는 임신 18일에서 19일의 SD rat (Sprague-Dawley rat, 샘타코 코리아)의 태아로부터 분리하였다. 해부현미경을 이용하여 해마 신경조직을 물리적으로 분리한 후 0.25% 트립신이 첨가된 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)에 넣어 37°C에서 10 분간 처리하였다.

[0024] 트립신을 HBSS로 수회 세척한 후 1 ml 피펫을 이용하여 조심스럽게 피펫팅 하여 단일세포로 분리하였다. 분리된 세포는 poly-L-lysine(0.5 mg/ml)으로 미리 코팅해둔 배양 접시에 Neurobasal/B27 medium(0.5 mM L-glutamine, 25 μM glutamate, 25 μM 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin)을 채워 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 세포배양 4일, 11일에 배지를 교환하여 배양 14일째 실험에 사용하였다.

[0025] 2. 해마세포에서의 기억력개선 관련 신경가소성 인자 측정

[0026] 세포 내 p-CREB는 phospho-CREB(Ser133) sandwich ELISA Kit을 이용하여 측정하였다. 14일간 배양한 1차 배양 해마 신경세포는 샘플 처리 최소 1시간 전 B-27이 없는 배지로 교환하였다. NMDA 수용체(N-methyl-D-aspartic acid receptor)의 작용제인 NMDA(N)와 AMPA 수용체(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor)의 작용제인 AMPA(A)를 양성대조군으로 사용하기 위해 NMDA 100 μM, AMPA 100 μM을 붉가시나무 잎(QAL), 열매(QAF) 열수 추출물과 함께 처리하였다.

[0027] 붉가시나무 잎 또는 열매 열수 추출물 1, 3, 10, 30, 100 μg/ml을 10분간 처리한 후 차가운 PBS로 세척 하고 얼음 위에서 세포 분쇄하였다. 분쇄한 세포액은 BCA 단백질 정량방법에 따라 정량한 후 p-CREB 측정에 사용하였다. 300 μg/μl의 단백질을 희석용액에 희석하여 microwell plate에 넣고 4°C에서 12시간 이상 반응시킨다. microwell plate를 세척한 후 detection antibody, HRP-Linked secondary antibody, TMB substrate를 순서대로 반응시킨 후 반응을 멈추고 Microplate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과를 도 3에 나타내었다.

[0028] 도 3에 나타낸 바와 같이 양성 대조군으로 사용한 NMDA 100 μM, AMPA 100 μM을 처리한 경우 p-CREB가 대조군에 비해 각각 127.16±5.81%, 162.91±1.14% 유의적으로 증가함을 확인하였다. 붉가시나무 잎 열수 추출물 1, 3, 10, 30, 100 μg/ml을 처리한 경우 p-CREB가 대조군에 비해 각각 112.22±2.06%, 104.57±1.25%, 107.74±2.40%, 132.80±3.39%, 121.27±3.37%로 유의성 있게 증가함을 확인하였다. 붉가시나무 열매 열수 추출물 1, 3, 10, 30, 100 μg/ml을 처리한 경우 p-CREB가 대조군에 비해 각각 108.92±1.87%, 103.65±4.29%, 108.53±1.73%, 155.82±5.14%, 147.16±2.58%로 유의성 있게 증가함을 확인하였다.

[0029] 3. 해마세포에서의 기억력개선 관련 장기강화작용 시냅스 재구성 인자 측정

[0030] 세포 내 NMDA, AMPA 수용체 확인을 위해 14일간 배양한 1차 배양 해마 신경세포는 샘플 처리 최소 1시간 전 B-27이 없는 배지로 교환하였다. NMDA 수용체(N-methyl-D-aspartic acid receptor)의 작용제인 NMDA(N)와 AMPA 수용체(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor)의 작용제인 AMPA(A)를 양성대조군으로 사용하기 위해 NMDA 100 μM, AMPA 100 μM을 붉가시나무 잎(QAL), 열매(QAF) 열수 추출물과 함께 처리하였다.

[0031] 붉가시나무 잎 또는 열매 열수 추출물 1, 3, 10, 30, 100 μg/ml을 1분간 처리한 후 차가운 PBS로 세척 하고 얼음 위에서 세포 분쇄하였다. 분쇄한 세포액은 BCA 단백질 정량방법에 따라 정량한 후 실험에 4의 방법으로 western blot에 사용하였다. 웨스턴 블랏 분석을 위해 세포와 조직은 Syn-PER™ Synaptic protein Extraction reagent를 이용해 분쇄하였다. BCA 단백질 정량법을 이용하여 정량 후 단백질을 8%, 10% 폴리아크릴아마이드 젤로 분리한 다음 젤에 있는 단백질을 PVDF 막으로 전기이동시켰다. 막은 TBS-T(25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)에 녹인 5% 탈지분유로 1시간동안 블로킹한 후 일차, 이차 항체로 반응 시켰다.

[0032] 실험에 사용한 항체는 다음과 같다. 토끼 β-액틴(1:50000 희석), NR2A, NR2B, GluR1, PSD95, p-ERK, t-ERK, p-CaMK II, t-CaMK II(1:1000 희석), 토끼 HRP(Horseradish peroxidase)-linked 2차 항체와 함께 반응시켰다. 결합된 항체 복합체는 ChemiDoc™ MP Imaging system(BIO RAD)과 West Femto Maximum Sensitivity

Substrate(Thermo)를 사용하여 탐지하였다.

[0033] 도 4에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 양성 대조군으로 사용한 NMDA 100 μ M, AMPA 100 μ M을 처리한 군에서 AMPA 수용체의 subunit인 GluR1이 증가함을 확인하였고, NMDA 수용체의 subunit인 NR2A, NR2B가 증가함을 확인하였다.

[0034] 또한 PSD95의 발현 역시 대조군에 비해 양성대조군에서 증가함을 확인하였다. 붓가시나무 잎 열수 추출물 1, 3, 10, 30, 100 μ g/ml을 처리한 경우 대조군에 비해 GluR1, NR2B, PSD95의 발현이 증가함을 확인하였다. 붓가시나무 열매 열수 추출물 1, 3, 10, 30, 100 μ g/ml을 처리한 경우 NR2A, NR2B, PSD95의 발현이 증가함을 확인하였다.

[0035] 상기 결과를 바탕으로 붓가시나무 잎, 열매 열수 추출물이 LTP(Long-term potentiation)가 형성될 때 나타나는 신경세포 말단의 리모델링(synapse remodeling)에 영향을 주는 것을 확인하였다.

[0036] **4. 해마세포에서의 시냅스 재구성에 따른 장기강화작용 및 신경가소성인자 활성화 기전 탐색**

[0037] 세포 내 p-CaMK II, p-ERK 확인을 위해 상기 western blot 시험법을 활용하였으며, 양성대조군으로 사용된 NMDA, AMPA 와 붓가시나무 잎, 열매 열수 추출물의 처리시간은 1분으로 조정하여 실험하였다.

[0038] 도 5에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 양성 대조군으로 사용한 NMDA 100 μ M, AMPA 100 μ M을 처리한 군에서 p-ERK, p-CaMK II가 증가함을 확인하였다. 붓가시나무 잎 열수 추출물 1, 3, 10, 30, 100 μ g/ml을 처리한 경우 대조군에 비해 p-ERK, p-CaMK II의 발현이 증가함을 확인하였다.

[0039] 붓가시나무 열매 열수 추출물 1, 3, 10, 30, 100 μ g/ml을 처리한 경우 p-ERK, p-CaMK II의 발현이 증가함을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 붓가시나무 잎, 열매 열수 추출물이 NMDA, AMPA 수용체에 의해 형성되는 LTP(Long-term potentiation) 활성화 경로를 따른다는 것을 확인하였으며, 수용체의 증가로 그 신호가 강화됨을 확인하였다. 또한 LTP 뿐만 아니라 신경가소성 주요인자인 p-CREB에 영향을 미치는 p-ERK, p-CaMK II의 발현 증가를 포함함으로써, 세포 내 신호가 강화되어 LTP형성에 도움이 되고 신경가소성 활성화에 영향을 주는 것을 확인하였다.

[0040] **실시예 II. 붓가시나무 잎, 열매 추출물을 이용한 기억력개선 동물행동실험**

[0041] **1. 실험동물 및 사육**

[0042] 붓가시나무 열매 또는 잎 추출물의 인지능력 및 기억력 개선 효과 측정을 위한 실험동물로서 생후 6주령 된 수컷 SD-rat을 (주샘타코 (SAMTACO, Korea)부터 구입하여 동물 사육실에서 일정한 조건 (온도: 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도:50 \pm 5%, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 일주일간 적응시킨 후 사용하였다.

[0043] **2. 기억력개선 동물행동실험 결과**

[0044] 실험동물 행동평가를 위한 수컷 흰쥐(SD-rat)에 본 발명의 붓가시나무 잎 또는 열매 추출물을 경구투여 하였으며(100, 300 mg/kg b.w.), 비교군(Control)으로는 시료를 투여하지 않은 무처리군을 사용하였다 (n=15). 시료는 총 21일간 1일 1회 투여하였으며, 22일째 부터 4일간 Morris water maze test를 수행하였으며, 27일부터 2일간 passive avoidance test를 진행하였다.

[0045] Morris water maze test (WMT)는 Water maze test는 Morris 실험법을 수정 보완한 것으로, 원형풀(diameter: 180 cm, height: 75 cm)에 물을 25 \pm 1 cm로 채우고, 탈출 platform(24 cm)을 수면 1 cm 아래에 숨겼다. 위치를 확인할 수 있게 벽의 4면에 공간단서를 설치하고, 탈지분유를 물에 풀어 도피대를 육안으로 확인할 수 없게 하였다. 실험 2일 전과 하루 전에 모든 실험군을 도피대가 없는 swimming pool에서 1분간 자유롭게 수영하게 해 수영하는 상황에 적응시켰다.

[0046] 본 실험에 들어가 첫번째 실험일에는 도피대가 놓인 사분면을 제외한 3곳 중 2곳에서 임의의 순서로 동물을 출발시켜 60초간 도피대를 찾도록 하였다. 도피대를 찾으면 그로부터 20초간 그 위에 머무르게 하고, 45초 안에 도피대를 찾지 못하면 실험자가 손으로 동물을 도피대까지 유도하여 20초간 머물도록 하였다. 20초간의 위치 학습이 끝나면 바로 임의의 분면에서 동물을 출발시켜 도피대까지 찾아가는 시간과 이동거리를 측정하였다. 도피대를 찾아 올라가면 20초의 시간을 주고 연속적으로 하루에 총 3번, 3일 동안을 시행하였다. 단, 2일, 3일째 에서는 전날 습득된 장기기억을 평가하고자 도피대까지 유도하는 초기 학습을 생략하였다. 모든 데이터는 pool 위에 설치된 카메라로 촬영되어 video tracking system(Panlab, Barcelona, Spain)으로 분석하였다.

[0047] 도 6은 본 발명의 붓가시나무 잎 또는 열매 추출물의 21일간 투여한 흰쥐에 대한 Morris water maze test

(WMT) 결과이다. 하루에 3회, 총 3일 동안의 도피대 탐색 시간 측정 중, 각 실험일에서 첫 번째 시도(First trials) 장기기억을 나타내는 지표이며, 3번째 마지막 시도는(Last trials) 단기기억을 나타내는 지표이다.

[0048] 장기기억 First trials, 1 day 에서는 유의적 차이가 없었지만 2 day에서는 대조군(81.58 ± 15.37 sec)에 비해 300 mg/kg b.w. 투여군에서(42.78 ± 8.96 sec) 유의적으로 ($P < 0.05$) 도피대 탐색 시간이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 3 day에서는 붉가시나무 100 (48.98 ± 16.29 sec) 및 300 mg/kg b.w. 투여군 (35.48 ± 22.83 sec)에서 대조군(73.89 ± 17.69 sec) 보다 유의적으로($P < 0.05$) 도피대 탐색 시간이 감소하였다. Last trials에서는 도피대 탐색 시간이 감소하는 추세를 보이긴 하였지만 대조군과 유의적 차이는 없었다.

[0049] 도 7는 본 Morris water maze test (WMT)에서 파생되어 장기 및 반복 기억을 측정하는 단서기억 측정 실험(Probe test) 결과이다. 3일간의 실험이 끝나면 24시간 후인 4일째에 probe trial을 시행하였다. 도피대 없이 90초 동안 자유 수영을 하게 하여 이전 도피대의 위치에 대한 기억을 보유하고 있는지(4분면 중, 도피대가 있었던 분면 유영시간)에 대한 검사를 실시하였다.

[0050] 실험결과, 100 mg/kg b.w. 투여군(32.27 ± 2.58 sec)과 300 mg/kg b.w. 투여군 (33.51 ± 2.40 sec)에서 대조군(25.55 ± 1.80 sec)에 비해 도피대가 있었던 분면에서의 유영시간이 유의적으로($P < 0.05$) 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0051] 도 8은 수동회피실험(passive avoidance test) 으로서 혐오자극에 대한 사건 기억력을 측정한 실험이다. 밝은 불빛이 드는 chamber와 암소의 chamber가 작은 통로로 붙어있는 shuttle box에서 밝은 불빛이 드는 chamber에 실험동물을 놓아두면 실험동물은 본능적으로 어두운 암소의 chamber로 들어가게 되며, 그때 electric shock(75 V, 0.5 mA, 50 Hz)를 이용하여 혐오자극을 주어 공포학습을 시킨다. 8시간 후 밝은 빛의 chamber에 실험동물을 두었을 때 어두운 암소의 chamber에 들어갈 때까지의 시간을 측정하여 이를 수치화하였다.

[0052] 실험결과, 300 mg/kg b.w. 투여군 (298.71 ± 26.37 sec)에서 대조군(212.06 ± 33.06 sec)에 비해 밝은 빛의 chamber에 머문 시간이 유의적으로($P < 0.05$) 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0053] 본 발명의 결과로부터 붉가시나무(*Quercus acuta* Thunb.)의 잎 또는 열매 추출물을 이용하여 인지능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품 또는 약제로 제조 가능하다. 건강기능성 식품 또는 약제는 정제, 캡슐제, 연질 캡슐제, 과립제, 액제 중에서 선택되는 어느 하나의 형태로 제조될 수 있다.

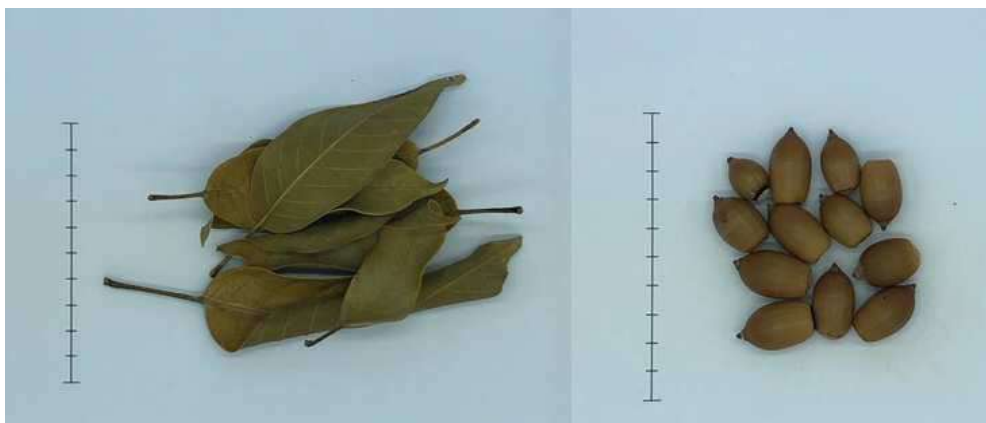
[0054] 이로부터 본 발명은 노인성 퇴행성뇌질환이 아닌 일반 정상인을 대상으로 인지 및 기억력을 강화할 수 있는 기전으로부터 퇴행성뇌질환 환자가 아닌 건강기능식품의 목적에 부합하는 일반인(청소년기 학습 등)을 대상으로 인지능력 또는 기억력 개선에 보다 더 효과적인 접근이 이루어질 것으로 판단된다.

산업상 이용가능성

[0055] 본 발명은 붉가시나무 (*Quercus acuta* Thunb) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공함으로써 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 건강기능성 식품 생산이 가능하여 산업상 이용가능성이 있다.

도면

도면1

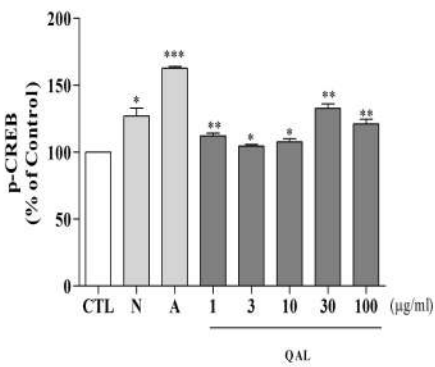


도면2

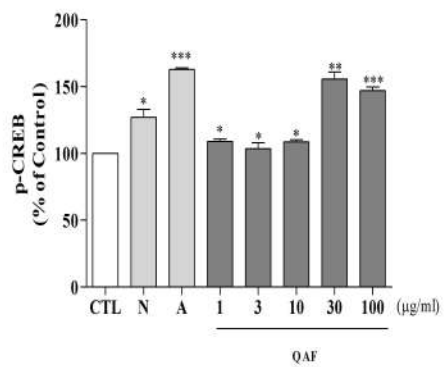


도면3

A.

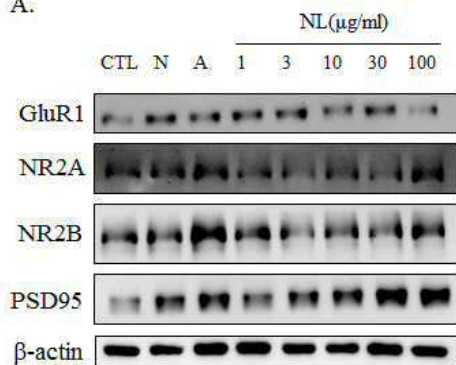


B.

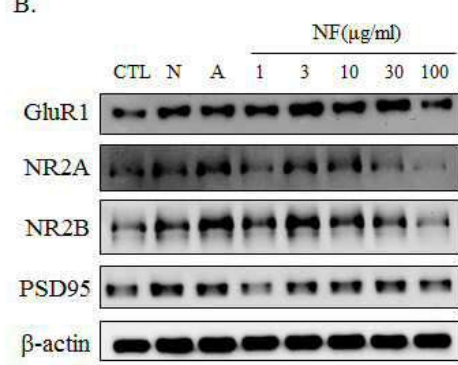


도면4

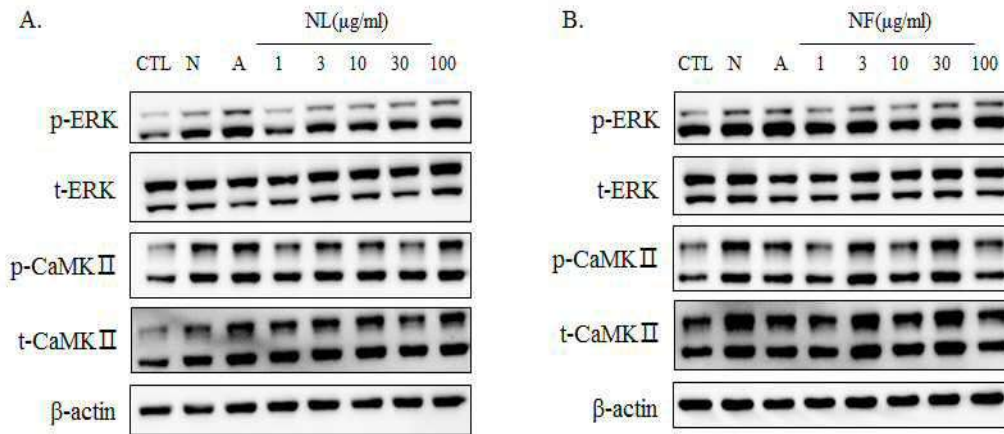
A.



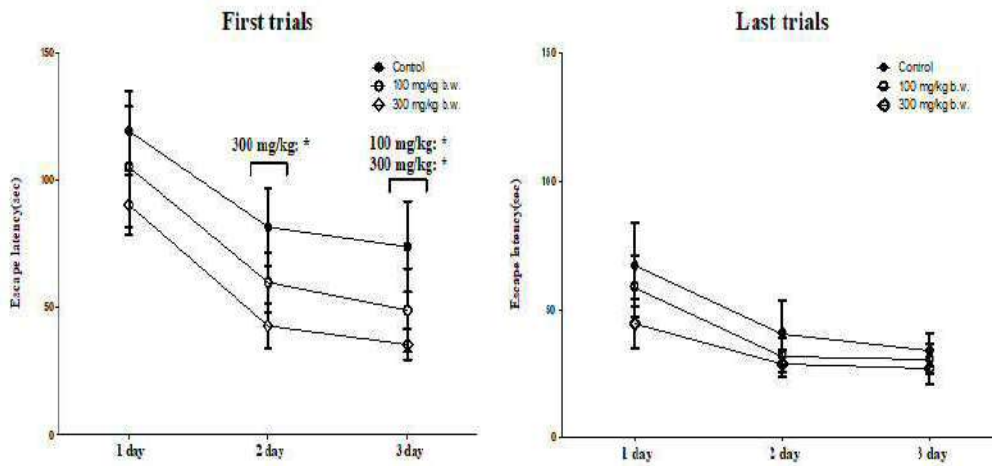
B.



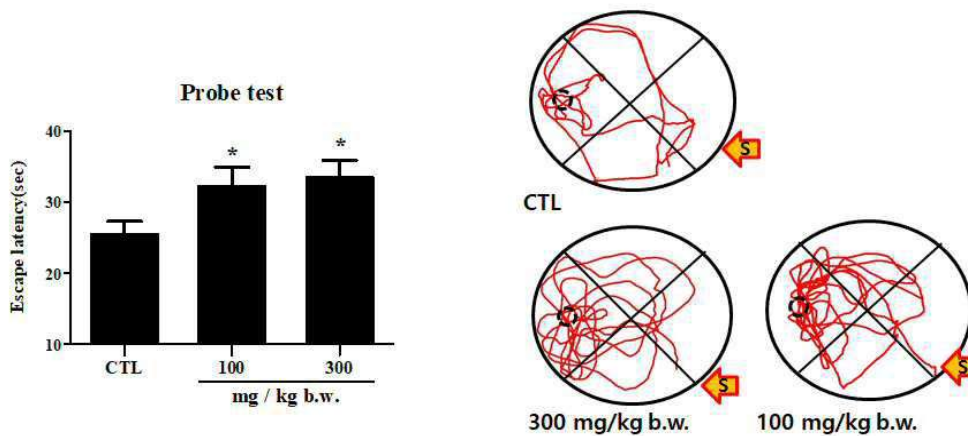
도면5



도면6



도면7



도면8

