



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0070831
(43) 공개일자 2023년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/67 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/67 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0156817
(22) 출원일자 2021년11월15일
심사청구일자 2021년11월15일

(71) 출원인
건국대학교 글로컬산학협력단
충청북도 충주시 충원대로 268 (단월동, 건국대학교글로컬캠퍼스)
(72) 발명자
최동국
충청북도 충주시 호암대로 17 레이크뷰아파트 913호
김인수
충청북도 충주시 충원대로 268 건국대학교(단월동, 건국대학교)
(74) 대리인
파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 16 항

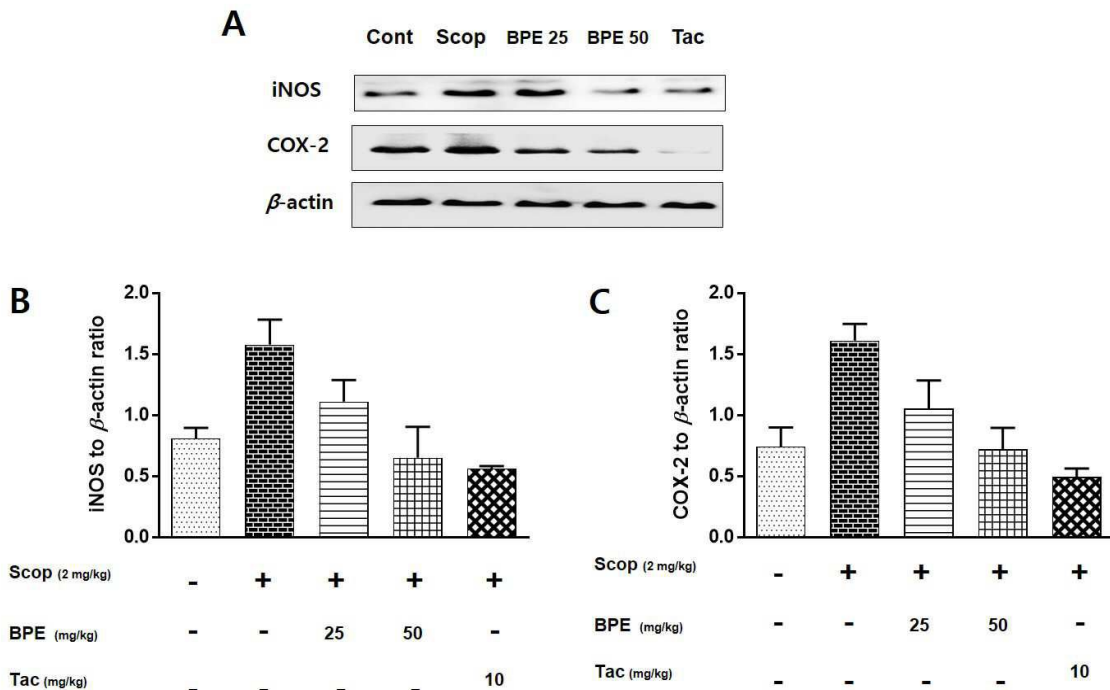
(54) 발명의 명칭 검은 후추 추출물을 포함하는 신경염증성 질환 및 인지기능 장애의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 검은 후추 추출물을 포함하는 신경염증성 질환 및 인지기능 장애 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 검은 후추 추출물을 포함하는 신경염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물, 및 검은 후추 추출물을 포함하는 기억력 증진 및 인지기능 개선용 조성물에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도12



본 발명의 검은 후추 추출물, 특히 검은 후추 에탄올 추출물에는 높은 함량의 피페린(piperine)이 포함되어 있으며, 인도산 후추(*Piper longum*)에 비해 세포독성 없이, LPS로 자극된 미세아교세포에서 유발된 염증반응을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 검은 후추 추출물은 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

나아가, 본 발명의 검은 후추 추출물은 스코폴라민으로 기억력 손상이 유도된 마우스를 이용한 Y-미로 실험(Y-maze test) 및 수동회피 실험(passive avoidance test)에서 기억력 증진효과를 나타내었으며, 아세틸콜린에스테라제 저해활성뿐만 아니라, BDNF-CREB 경로 활성화 효과를 확인하였으므로, 기억력 증진 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강기능식품에 유용하게 이용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345341783
과제번호	2021RIS-001
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지자체-대학협력기반지역혁신사업
연구과제명	(충북지역혁신플랫폼)충북대학교
기여율	1/1
과제수행기관명	(충북지역혁신플랫폼)충북대학교
연구기간	2021.08.19 ~ 2022.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 검은 후추 추출물은 에탄올에 의해 추출되는 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 검은 후추 추출물은

- i) NO, iNOS 및 COX-2를 포함하는 염증반응 매개인자(inflammatory mediators) 생성 억제;
- ii) IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 를 포함하는 염증성 사이토카인(cytokines) 생성 억제;
- iii) NF- κ B 서브유닛 p65의 핵 내로의 전좌 억제, I κ B- α 인산화 및 분해 억제; 및
- iv) p38, JNK, ERK 및 IRF3 인산화 억제를 통한 TLR4 하류 경로 억제;를 통해 신경염증을 조절하는 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신경염증 질환은 다발성 경화증, 신경모세포종, 허혈성 뇌졸중, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅턴 질환, 크로이츠펠트야콥병, 외상 후 스트레스 장애, 우울증, 주의력 결핍장애(ADHD), 정신분열증 또는 근위축성측색경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 검은 후추 추출물은 에탄올에 의해 추출되는 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 검은 후추 추출물은

- i) NO, iNOS 및 COX-2를 포함하는 염증반응 매개인자(inflammatory mediators) 생성 억제;
- ii) IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 를 포함하는 염증성 사이토카인(cytokines) 생성 억제;

- iii) NF- κ B 서브유닛 p65의 핵 내로의 전좌 억제, I κ B- α 인산화 및 분해 억제; 및
- iv) p38, JNK, ERK 및 IRF3 인산화 억제를 통한 TLR4 하류 경로 억제;를 통해 신경염증을 조절하는 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 신경염증 질환은 다발성 경화증, 신경모세포종, 허혈성 뇌졸중, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅턴 질환, 크로이츠펠트야콥병, 외상 후 스트레스 장애, 우울증, 주의력 결핍장애(ADHD), 정신분열증 또는 근위축성측색경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 검은 후추 추출물은 에탄올에 의해 추출되는 것을 특징으로 하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 검은 후추 추출물에 의해 뇌의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질에서 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase; AChE) 활성을 저해하거나,

BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)-CREB(cAMP responsive element binding protein) 경로가 활성화되는 것을 특징으로 하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 인지 기능 장애는 경도인지장애, 주의력 결핍장애(ADHD), 우울증, 알츠하이머병 및 노인성 치매(senile dementia)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 13

검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 검은 후추 추출물은 에탄올에 의해 추출되는 것을 특징으로 하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 검은 후추 추출물에 의해 뇌의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질에서 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase; AChE) 활성을 저해하거나,

BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)-CREB(cAMP responsive element binding protein) 경로가 활성화되는 것을 특징으로 하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 인지 기능 장애는 경도인지장애, 주의력 결핍장애(ADHD), 우울증, 알츠하이머병 및 노인성 치매(senile dementia)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 검은 후추 추출물을 포함하는 신경염증성 질환 및 인지기능 장애 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 검은 후추 추출물을 포함하는 신경염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물, 및 검은 후추 추출물을 포함하는 기억력 증진 및 인지기능 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 뇌의 식세포(phagocyte)인 미세아교세포(Microglia)는 슈퍼옥사이드(superoxide)와 신경독(neurotoxin)을 생성함으로써 만성 신경염증을 유발할 수 있으며, 미세아교세포에서 생산되는 활성화제 및 신경독성 물질은 파킨슨 병등과 같은 신경염증에 의해 유발되는 질병의 병리학적 진행과 직접 관련이 있다.

[0004] 특히, 미세아교세포 활성화는 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 및 다발성 경화증(multiple sclerosis; MS)과 같은 다발성 신경 퇴행성 장애의 발병 기전과 연결되어 있다. 종양괴사인자(tumor necrosis factor- α ; TNF- α), 인터루킨-1 β (interleukin-1 β ; IL-1 β), 인터루킨-12(interleukin-12; IL-12), 인터루킨-6(interleukin-6; IL-6), 프로스타글란딘(prostaglandin E2; PGE₂) 및 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase-2; COX-2) 등과 같은 전염증성 사이토카인과의 관련성도 입증되었다. 다른 독소는 지질다당류(Lipopolysaccharide), 6-OHDA 및 과산화수소(H₂O₂)와 같은 신경독으로 정립되어 있다. 이들 독소는 미소아교세포를 자극하여 NF- κ B, p38, MAPK, JNK, ERK 및 IRF3과 같은 염증 경로를 활성화시키는 것으로 보고되었다 (Kim, D.C., *et al.*, *Molecules*, 22(12):2130, 2017; He, X., *et al.*, *Toxicology letters*, 283: 58-68, 2018; Lim, H.-W., *et al.*, *Food and chemical toxicology*, 72: 265-272, 2014; Cho, D.-Y., *et al.*, *Molecules*, 21(12):1718, 2016). 그러므로, 미세아교세포 활성화 조절은 신경 염증을 약화시키는 중요한 치료 전략으로 작용할 수 있다.

[0006] 한편, 검은 후추(*Piper Nigrum*)는 쌍떡잎식물 후추목 후추과의 상록 덩굴식물로서, 주로 입질, 생리통, 결핵, 수면장애, 호흡기 감염, 만성 소화관 관련 통증 등의 치료에 효과적인 치료제로 주로 사용되어왔다.

[0008] 이에, 본 발명에서는 효과적인 신경염증억제제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 검은 후추 추출물, 특히 검은 후추 에탄올 추출물에는 높은 함량의 피페린(piperine)이 포함되어 있을 뿐만 아니라, 인도산 후추(*Piper longum*)에 비해 세포독성 없이, LPS로 자극된 미세아교세포에서 유발된 염증반응을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

[0009] 또한, 검은 후추 추출물은 스코폴라민으로 기억력 손상이 유도된 마우스를 이용한 Y-미로 실험(Y-maze test) 및 수동회피 실험(passive avoidance test)에서 기억력 증진효과를 나타내었으며, 아세틸콜린에스테라제 저해활성 뿐만 아니라, BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) - CREB (cAMP responsive element binding protein) 경로 활성화 효과를 확인하였다.

[0010] 따라서, 본 발명에서는 검은 후추 추출물이 신경염증 억제뿐만 아니라, 기억력 증진, 치매, 주의력 결핍장애 (ADHD) 및 우울증 예방에 효과적인 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 상술한 목적을 달성하기 위해,

[0018] 본 발명은 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 검은 후추 추출물은 에탄올에 의해 추출될 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 검은 후추 추출물은

[0022] i) NO, iNOS 및 COX-2를 포함하는 염증반응 매개인자(inflammatory mediators) 생성 억제;

[0023] ii) NF- κ B 서브유닛 p65의 핵 내로의 전좌 억제, I κ B- α 인산화 및 분해 억제; 및

[0024] iii) p38, JNK, ERK 및 IRF3 인산화 억제를 통한 TLR4 하류 경로 억제;를 통해 신경염증을 조절할 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 신경염증 질환은 다발성 경화증, 신경모세포종, 허혈성 뇌졸중, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅턴 질환, 크로이츠펠트야콥병, 외상 후 스트레스 장애, 우울증, 정신분열증 또는 근위축성측색경화증으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0027] 다른 목적을 달성하기 위해,

[0028] 본 발명은 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 검은 후추 추출물은 에탄올에 의해 추출될 수 있다.

[0031] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 검은 후추 추출물에 의해 뇌의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질에서 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase; AChE) 생성이 감소될 수 있다.

[0032] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 검은 후추 추출물에 의해 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)-CREB(cAMP responsive element binding protein) 경로가 활성화 될수 있다.

[0033] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 인지 기능 장애는 경도인지장애, 주의력 결핍장애(ADHD), 우울증, 알츠하이머병 및 노인성 치매(senile dementia)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 검은 후추 추출물, 특히 검은 후추 에탄올 추출물에는 높은 함량의 피페린(piperine)이 포함되어 있으며, 인도산 후추(*Piper longum*)에 비해 세포독성 없이, LPS로 자극된 미세아교세포에서 유발된 염증반응을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 검은 후추 추출물은 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

[0036] 나아가, 본 발명의 검은 후추 추출물은 스코폴라민으로 기억력 손상이 유도된 마우스를 이용한 Y-미로 실험(Y-maze test) 및 수동회피 실험(passive avoidance test)에서 기억력 증진효과를 나타내었으며, 아세틸콜린에스테라제 저해활성뿐만 아니라, BDNF-CREB 경로 활성화 효과를 확인하였으므로, 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강기능식품에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 검은 후추 추출물에 포함된 피페린 함량을 분석한 결과를 나타낸 데이터이다.
- 도 2는 검은 후추(*Piper nigrum*)의 추출방법에 따른 항염활성 및 세포독성 정도를 확인한 데이터이다. A는 열수 추출물, B는 메탄올 추출물, C는 70% 에탄올 추출물이다.
- 도 3은 인도산 후추(*Piper longum*)의 추출방법에 따른 항염활성 및 세포독성 정도를 확인한 데이터이다. A는 열수 추출물, B는 메탄올 추출물이다.
- 도 4는 LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에 검은 후추(*Piper nigrum*)의 추출방법에 따른 추출물 100ug/ml 농도별로 처리하였을 때, NO 발생 억제 효과(A) 및 세포 독성(B) 및 70% 에탄올 검은 후추 추출물을 농도별로 처리하였을 때, 세포 독성(C) 및 NO 발생 억제 효과(D)를 확인한 데이터이다.
- 도 5는 LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에 검은 후추 추출물을 농도별로 처리하였을 때, iNOS의 mRNA(A 및 B) 및 단백질(C 및 D) 발현정도를 확인한 데이터이다. A는 iNOS mRNA 발현정도를, B는 iNOS mRNA 증폭산물의 양을 정량화 하여 GAPDH에 대한 상대적 발현량을, C는 iNOS 단백질 발현정도를, D는 iNOS 단백질을 정량화하여 β -actin에 대한 상대적 발현량을 나타낸 데이터이다.
- 도 6은 LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에 검은 후추 추출물을 농도별로 처리하였을 때, COX-2의 mRNA(A 및 B) 및 단백질(C 및 D) 발현정도를 확인한 데이터이다. A는 COX-2 mRNA 발현정도를, B는 COX-2 mRNA 증폭산물의 양을 정량화 하여 GAPDH에 대한 상대적 발현량을, C는 COX-2 단백질 발현정도를, D는 COX-2 단백질을 정량화하여 β -actin에 대한 상대적 발현량을 나타낸 데이터이다.
- 도 7은 LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에 검은 후추 추출물을 농도별로 처리하였을 때, 세포질 내 p65 농도 및 I κ B- α 인산화 정도를 확인한 데이터이다. A 및 B는 I κ B- α 인산화 및 분해 억제 정도를, C 및 D는 세포질 내 p65 농도를, E 및 F는 핵 내 p65 농도를 나타낸 데이터이며, B, D 및 F는 각 단백질의 양을 정량화 하여 β -actin에 대한 상대적 발현량을 나타낸 데이터이다.
- 도 8는 LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에 검은 후추 추출물을 농도별로 처리하였을 때, IRF3, p38, JNK 및 ERK의 인산화 정도를 확인한 데이터이다. A 및 B는 IRF3 인산화 정도를, C 및 D는 JNK 인산화 정도를, E 및 F는 ERK 인산화 정도를, G 및 H는 p38 인산화 정도를 나타낸 데이터이며, B, D, F 및 H는 단백질의 인산화 정도를 총 단백질양에 대해 상대적으로 나타낸 데이터이다.
- 도 9은 스코폴라민으로 기억력을 손상시킨 마우스에 검은 후추 추출물을 처리하였을 때, 수동회피 실험(passive avoidance test) 결과를 나타낸 데이터이다.
- 도 10은 스코폴라민으로 기억력을 손상시킨 마우스에 검은 후추 추출물을 처리하였을 때, Y-미로 실험(Y-maze test) 결과를 나타낸 데이터이다. A는 마우스의 총 입장횟수(Total arm entry)를, B는 변경 행동력 점수(spontaneous alteration, %)를 확인한 데이터이다.

도 11는 스코폴라민으로 기억력을 손상시킨 마우스에 검은 후추 추출물을 농도별로 처리하였을 때, 뇌의 해마(hippocampus, A) 및 대뇌피질의 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase; AChE, B) 저해 활성 농도를 확인한 데이터이다.

도 12은 스코폴라민으로 기억력을 손상시킨 마우스에 검은 후추 추출물을 농도별로 처리하였을 때, iNOS 및 COX-2 mRNA 발현 정도를 확인한 데이터이다. A는 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현 정도를, B 및 C는 각 증폭산물의 양을 정량화 하여 GAPDH에 대한 상대적 발현량을 나타낸 데이터이다.

도 13는 스코폴라민으로 기억력을 손상시킨 마우스에 검은 후추 추출물을 농도별로 처리하였을 때, I κ B- α 인산화 정도를 확인한 데이터이다. A는 I κ B- α 인산화 및 분해 억제 정도를, B는 증폭산물의 양을 정량화 하여 β -actin에 대한 상대적 발현량을 나타낸 데이터이다.

도 14는 스코폴라민으로 기억력을 손상시킨 마우스에 검은 후추 추출물을 농도별로 처리하였을 때, BDNF(Brain-derived neurotrophic factor) 및 CREB(cAMP responsive element binding protein)의 단백질 발현량을 확인한 데이터이다. A는 CREB의 인산화 정도 및 BDNF 단백질 발현 정도를, B는 총 단백질 발현량에 대한 CREB 인산화 정도를, B는 β -actin에 대한 BDNF의 상대적 발현량을 나타낸 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명한다.

- [0041] **검은 후추 추출물 제조**
- [0042] 본 발명에서는 신경염증억제, 기억력 장애 및 인지기능 장애 개선 효과가 우수한 검은 후추 추출물을 추출하기 위해, 본 발명의 구체적인 일구현예에서, 물(열수), 메탄올, 70% 에탄올을 추출용매로 각각 사용하여 검은 후추 추출물을 수득하였다.
- [0043] 검은 후추 추출물 속에 포함된 유효물질의 함량을 확인하기 위해, 지표성분으로 피페린(piperine) 함량을 확인한 결과, 도 1 및 표 2에 나타난 바와 같이 열수 추출물에 비해 에탄올 추출물에 포함된 피페린의 함량이 6 ~ 8 배 이상 높은 것으로 확인되었다.
- [0044] 또한, 본 발명에서 사용한 검은 후추(*Piper nigrum*)와 다른 종의 차이를 확인하기 위해, 인도산 후추(*Piper longum*) 추출물과 비교실험을 수행하였다.
- [0045] 도 2에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물은 열수 추출물에서는 염증 억제 효능이 미약하게 나타났으며, 메탄올 추출물은 25 μ g/ml 농도에서 염증 억제 효능을 보였으나, 그보다 더 높은 농도에서는 높은 세포 독성을 보이는 것으로 나타났다. 반면, 70% 에탄올 추출물의 경우 100 μ g/ml 농도에서 세포 독성 없이 효과적으로 NO 발생을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0046] 인도산 후추의 경우, 도 3에 나타난 바와 같이, 열수 추출물에서는 염증 억제 효능이 크지 않았으며, 메탄올 추출물의 경우 200 μ g/ml 농도에서 염증 억제 효능을 보이는 것을 확인하였다.
- [0047] 하지만, 본 발명의 검은 후추 추출물이 인도산 후추에 비해 NO 발생 억제 효과가 우수한 것을 확인하였으며, 검은 후추 추출물 중에서도 세포 독성이 없는 70% 에탄올 추출물이 염증 억제 효능이 가장 우수한 것을 확인하였다.

- [0049] **신경염증 질환 예방 또는 치료용 조성물**
- [0050] 본 발명은 일 관점에서, 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명은 다른 관점에서, 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 검은 후추 추출물은 에탄올에 의해, 바람직하게는 70%(v/v) 에탄올에 의해 추출되는 것을 특징으로 한다.

- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 검은 후추 추출물은
- [0054] i) NO, iNOS 및 COX-2를 포함하는 염증반응 매개인자(inflammatory mediators) 생성 억제;
- [0055] ii) NF- κ B 서브유닛 p65의 핵 내로의 전좌 억제, I κ B- α 인산화 및 분해 억제; 및
- [0056] iii) p38, JNK, ERK 및 IRF3 인산화 억제를 통한 TLR4 하류 경로(downstream) 억제;를 통해 신경염증을 조절하는 것을 특징으로 한다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 신경염증 질환은 다발성 경화증, 신경모세포종, 허혈성 뇌졸중, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅턴 질환, 크로이츠펠트야콥병, 외상 후 스트레스 장애, 우울증, 주의력 결핍장애(ADHD), 정신분열증 또는 근위축성측색경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0059] 본 발명의 구체적인 일구현예에서, BV-2 미세아교세포에 다양한 농도의 추출 용매에 따른 검은 후추 추출물(100 μ g/ml)을 전처리 한 후 LPS로 자극시켰을 때, NO 생성 저해 및 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 도 4A에 나타난 바와 같이, 70% 에탄올 추출물 (100 μ g/ml)에서는 검은 후추 추출물에 의한 NO 생성 저해이 다른 추출 용매에 비하여 우수하고 세포 독성이 없음을 확인하였다. 이에, 본 발명에서는 검은 후추 추출물의 농도를 0.1 μ g/ml, 10 μ g/ml 및 100 μ g/ml으로 하여 NO 발생 정도 및 세포 독성 여부를 다시 한번 확인하였다. 그 결과 도 4C 및 도 4D에 나타난 바와 같이 검은 후추 추출물 농도 의존적으로 NO 발생을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였으며, 도 4C에 나타난 바와 같이, 70% 에탄올을 추출 용매로 한 검은 후추 추출물에 의한 세포 독성은 나타나지 않는 것을 확인하였다.
- [0060] 본 발명의 다른 구체적인 일구현예에서, LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에서 iNOS 및 COX-2 mRNA 및 단백질 발현 수준, NF- κ B (p65) 활성화 및 I κ B α 인산화/분해 및 p38, JNK, ERK 및 IRF3 인산화 억제를 통한 TLR4 하류 경로 억제에 대한 검은 후추 추출물의 효과를 확인하고자 하였다.
- [0061] 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물 농도 의존적으로 LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에서 iNOS 및 COX-2 mRNA 및 단백질 발현 수준이 억제되는 것을 확인하였다.
- [0062] I κ B- α 의 인산화/분해 및 핵으로의 p65 서브유닛의 핵 전좌(nuclear translocation)는 NF- κ B 활성화에 필수적이며, NF- κ B 신호 전달 경로는 BV-2세포에서 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인에 의해 활성화된다. 또한, NF- κ B는 LPS로 유도된 iNOS, COX-2 및 전염증성의 발현에 중요한 역할을 한다. 그러므로, 검은 후추 추출물의 신경염증 억제 기전을 이해하기 위해, LPS-자극된 BV-2 세포에서 p65의 전좌와 I κ B- α 의 인산화/분해 정도를 조사하였다.
- [0063] 도 7A 및 도 7B에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물에 의해 LPS-자극된 BV-2 세포에서 I κ B- α 인산화 및 분해가 현저하게 약화되는 것을 확인하였다. 또한, 도 7C 내지 도 7F에 나타난 바와 같이, 세포질 내 p65 농도는 검은 후추 추출물 농도 의존적으로 증가하는 반면, 핵 내 p65 농도는 감소하는 것으로 확인되었다. 이는 검은 후추 추출물에 의해 p65 서브유닛의 전좌(translocation)가 차단되는 것을 의미한다. 즉, 검은 후추 추출물에 의해 NF- κ B 활성화가 억제되어, LPS-자극된 BV2 미세아교세포에서 NO, iNOS 및 다른 전염증성 사이토카인을 억제하는 원인이 될 수 있음을 의미한다.
- [0064] 또한, 본 발명에서는 검은 후추 추출물이 전염증성 매개체 및 사이토카인 생성을 억제하는 기전을 확인하기 위해 LPS로 유도된 주요 TLR4 하류 신호 전달 경로를 조사하였다. BV2 미세아교세포를 LPS로 자극시키면 IRF3를 포함하는 다양한 방어기작이 활성화되며, IRF3는 iNOS 및 다른 사이토카인의 발현을 조절한다.
- [0065] 톨-유사 수용체 4(TLR4; Toll-like receptor 4)는 MyD88(myeloid differentiation 88)-의존 신호전달 과정 및 MyD88-비의존 신호전달 과정을 통해 증폭되는 선천적 면역 시그널링을 활성화시키며, LPS에 의해 TLR4가 활성화된다. 활성화된 TLR4는 Myd88-의존 신호전달 과정을 통해 NF- κ B의 초기 활성화 및 핵으로의 이동을 유도하고, MAPKs(mitogen-activated protein kinases)의 활성화를 유도한다. 상기 NF κ B와 MAPKs의 활성화는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 염증성 사이토카인을 분비시킨다.
- [0066] 도 8에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물 농도 의존적으로 p38, JNK, ERK 및 IRF3의 인산화가 억제되는 것을 확인하였으며, 이는 검은 후추 추출물에 의해 TLR4 하류 경로가 억제되고, 이로 인해 전염증성 매개체 및 사이토카인 생성이 억제되는 것을 의미한다.

- [0068] **기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 조성물**
- [0069] 본 발명은 또 다른 관점에서, 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.
- [0070] 본 발명은 또 다른 관점에서, 검은 후추 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 검은 후추 추출물에 의해 뇌의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질에서 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase; AChE) 활성이 저해되는 것을 특징으로 한다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 검은 후추 추출물에 의해 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)-CREB(cAMP responsive element binding protein) 경로가 활성화되는 것을 특징으로 한다.
- [0073] 본 발명에 있어서, 상기 인지 기능 장애는 경도인지장애, 주의력 결핍장애(ADHD), 우울증, 알츠하이머병 및 노인성 치매(senile dementia)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0075] 본 발명의 구체적인 일구현예에서, 검은 후추 추출물의 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료에 대한 효과를 확인하기 위해, 스코폴라민에 의해 유발된 인지 장애 질환 동물모델에 검은 후추 추출물을 투여하였다.
- [0076] 스코폴라민을 투여하면 콜린성 신경 기능의 퇴행과 기억력 상실증이 나타나는 것과 습득력, 즉각적인 대응법, 활동기억(Working memory)에 대한 결함이 나타난다고 알려져 있다 (Smith, 1988; Giacobini, E. and Cuadra, G.(1994)). 알츠하이머 질환 환자는 콜린성, 아드레날린성, GABA성 및 글루타메이트성 신경 등 거의 모든 신경에 이상이 초래되나, 특히 콜린성 신경의 손상 및 소실이 가장 심각한 것으로 확인되었다. 한편, 인지능력이 점진적으로 소실되는 질환인 노인성치매는 중추신경계의 콜린성 신경세포의 활성과도 관련이 있으며, 이는 뇌에서 아세틸콜린 및 콜린 아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase) 활성의 현저한 저하가 주된 원인으로 알려져 있다.
- [0077] 본 발명의 또 다른 구체적인 일구현예에서, 검은 후추 추출물에 의한 기억력 증진에 대한 효과를 확인하기 위하여 수동회피실험(Passive avoidance test)을 수행하였다. 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 수동 회피 행동 실험에서 밝은 방에 머무는 시간(latency time)은 스코폴라민 처리군은 기억력 손상이 유발되어 머무는 시간이 초기 습득단계와 유사한 것으로 관찰되었으며, 검은 후추 추출물을 투여한 군은 농도 의존적으로 머무는 시간이 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 검은 후추 추출물을 50 mg/kg으로 투여한 군은 타크린(tacrine) 처리군(양성대조군)과 유사한 머무는 시간을 보이는 것을 확인하였다.
- [0078] 본 발명의 또 다른 구체적인 일구현예에서, 검은 후추 추출물에 의한 기억력 증진에 대한 효과를 확인하기 위하여 Y-미로 실험(Y-maze test)을 수행하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 스코폴라민 처리군은 기억력 손상이 유발되어 마우스의 총 입장횟수(Total arm entry) 및 변경 행동력 점수(spontaneous alteration, %)가 낮게 확인된 반면, 검은 후추 추출물을 투여한 군은 양성대조군과 유사한 수준을 보이는 것을 확인하였다.
- [0079] 본 발명의 또 다른 구체적인 일구현예에서, 검은 후추 추출물이 스코폴라민에 의해 증가된 아세틸콜린에스테라아제의 활성을 억제하는지 확인하였다. 스코폴라민은 아세틸콜린에스테라아제(Acetylcholinesterase, AChE) 활성을 과활성 시키는 것으로 알려져 있으며, 아세틸콜린에스테라아제는 기억력 전달 신경물질로 알려진 아세틸콜린(Acetylcholine)을 분해시켜 그 기능을 상실시킨다.
- [0080] 도 11에 나타난 바와 같이, 뇌의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질에서 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase; AChE) 생성 정도를 측정된 결과, 스코폴라민 처리군에서 AChE 농도가 급격히 증가한 반면, 검은 후추 추출물 처리군은 농도 의존적으로 AChE 농도가 감소되는 것을 확인하였다. 특히, 검은 후추 추출물을 50 mg/kg으로 투여한 군은 타크린(tacrine) 처리군(양성대조군)과 AChE 농도가 유사한 것을 확인하였다.
- [0081] 본 발명의 또 다른 구체적인 일구현예에서, 검은 후추 추출물이 인지기능저하에서의 영향을 미치는 것으로 알려지는 염증반응 매개인자(inflammatory mediators)의 발현을 억제하는지 확인하였다. 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물 투여에 의해 뇌의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질에서 iNOS 및 COX-2 발현이 억제되는 것을 확인하였으며, 도 13에 나타난 바와 같이, IκB-α의 인산화 및 분해가 억제되는 것을 확인하였다.

- [0082] 본 발명의 또 다른 구체적인 일구현예에서, 검은 후추 추출물에 의해 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)-CREB(cAMP responsive element binding protein) 경로가 활성화는지 확인하였다. BDNF(brain-derived neurotrophic factor)는 신경 성장 촉진인자(nerve growth factor family) 중 하나로 신경 전달 물질의 조절이나 신경 가소성에 중요한 역할을 하며, 치매, 알츠하이머, 우울증 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 CREB(cAMP response element-binding protein)는 우울증 및 치매와 관련된 전사 인자 중 하나로 BDNF 유전자 발현에 중요한 역할을 하며 이는 상위신호전달분자인 ERK(extracellular signal regulated kinase)에 의해 조절된다.
- [0083] 도 14에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물을 투여한 마우스의 해마에서는 BDNF 수준이 증가되고, CREB에 대한 p-CREB 비율(p-CREB/CREB)이 높은 것을 확인하였으며, 검은 후추 추출물을 50 mg/kg으로 투여한 군은 타크린(tacrine) 처리군(양성대조군)과 유사한 결과를 보이는 것을 확인하였다.
- [0084] 즉, 본 발명에서는 검은 후추 추출물은 스코폴라민으로 기억력 손상이 유도된 마우스를 이용한 Y-미로 실험(Y-maze test) 및 수동회피 실험(passive avoidance test)에서 기억력 증진효과를 나타내었으며, 아세틸콜린에스테라제 저해활성뿐만 아니라, BDNF-CREB 경로 활성화 효과를 확인하였으므로, 본 발명의 검은 후추 추출물은 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강기능식품에 유용하게 이용할 수 있는 것을 확인하였다.
- [0086] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0087] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다. 상기 약학 조성물을 제제화나 제형화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0088] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용액, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수용액, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0089] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 약학 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 본 발명은 약학 조성물은 연구자, 의사, 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적인 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자 등에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국소 투여할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 약학 조성물은 1 ~ 10,000mg/kg/일의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회에 나누어 투여할 수도 있다.

- [0091] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 건강기능식품, 식품 첨가제 또는 식이보조제로 사용될 수 있다. 본 발명의 검은 후추 추출물을 식품 첨가제로 사용할 경우, 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0092] 또한 상기 건강기능식품 조성물의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 변경될 수 있다. 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 검은 후추 추출물은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하여 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 양으로 첨가될 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0093] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나, 본 발명의 검은 후추 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0094] 본 발명의 건강기능식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린 등의 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 ~ 10중량%, 바람직하게는 0.01 ~ 0.1중량%로 포함된다.
- [0095] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있으며, 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제 비율은 크게 제한되지는 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 ~ 0.1중량% 범위내로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0097] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- [0098] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

- [0100] **후추 종류 및 추출 용매에 따른 NO 발생 및 세포 생존율 확인**
- [0101] 1-1 : 검은 후추 추출물 제조
- [0102] 본 발명에서는 검은 후추(*Piper nigrum*) 추출물을 제조하기 위해, 물(열수), 에탄올(70%) 및 메탄올을 이용하여 추출물을 제조하였다.
- [0103] 먼저, 열수 추출물을 제조하기 위해, 마른 검은 후추에 50℃의 열수를 10배수로 첨가한 다음, 24시간동안 진공 환류하여 추출액을 수득하였다. 추출과정을 3회 반복하여 회수된 추출액을 농축하여 얻어진 농축액을 동결건조하여 검은 후추 열수 추출물을 제조하였다.
- [0104] 에탄올 추출물은, 마른 검은 후추에 70% 에탄올을 10배수로 첨가한 다음, 24시간동안 진공 상온상에 보관하여 추출액을 수득하였다. 추출과정을 3회 반복하여 회수된 추출액을 농축하여 얻어진 농축액을 동결건조하여 검은 후추 에탄올 추출물을 제조하였다.
- [0105] 메탄올 추출물은, 마른 검은 후추에 100% 메탄올을 10배수로 첨가한 다음, 24시간동안 진공 상온상에 보관하여 추출액을 수득하였다. 추출과정을 3회 반복하여 회수된 추출액을 농축하여 얻어진 농축액을 동결건조하여 검은 후추 메탄올 추출물을 제조하였다.

[0107] 1-2 : 지표성분 함량 확인

[0108] 상기에서 추출한 검은 후추 추출물 속에 포함된 유효성분의 함량을 측정하기 위해, 지표성분으로 피페린 (piperin) 함량을 측정하였다.

[0109] 피페린 함량은 HPLC를 이용하여 측정하였으며, HPLC 칼럼은 C18 (YMC 2.1 mm X 100 mm, 2.7 μm)을 이용하여 등용매 이동상(isocratic mobile phase) 조건으로 분석하였다. 구체적인 분석조건은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0111] 피페린 함량 분석 조건

Instrument	Agilent Technologies 6410 Triple Quad (LC-MS/MS)
Column	YMC triart-C18 (2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm)
Solvent	A; 0.1% Formic acid in Water, B; 0.1% Formic acid in Acetonitrile
Flow rate	0.4 mL/min
Injection vol.	5 μl
Gradient	0 min : 5% B solvent 30min : 100% B solvent 32min : 100% B solvent

표 2

[0113] 피페린 함량

샘플	면적	농도 (ppm)	시료mg당 피페린함량
에탄올추출물	530,541,466	100ppm	655.50 ug
열수 추출물	377,132,403	500ppm	91.62 ug

[0114] 도 1 및 표 2에 나타난 바와 같이 열수 추출물에 비해 에탄올 추출물에 포함된 피페린의 함량이 현저하게 높은 것을 확인하였다.

실시예 2

[0116] 검은 후추 추출물의 NO 발생 억제 효과 확인

[0117] 본 발명에서는 검은 후추 추출물의 신경염증 억제 효능을 확인하기 위해, NO 발생 억제 정도와 세포 독성 여부를 확인하고자 하였으며, 본 발명에서 사용한 검은 후추(*Piper nigrum*)와 다른 종의 차이를 확인하기 위해, 인도산 후추(*Piper longum*) 추출물과 비교실험을 수행하였다.

[0118] 검은 후추 추출물은 상기 실시예 1의 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 메탄올 추출물을 사용하였으며, 인도산 후추는 실시예 1과 동일한 방법으로 열수 추출물 및 메탄올 추출물을 제조하였다.

[0120] 2-1 : 검은 후추 추출물 농도에 따른 세포 생존율 확인

[0121] 검은 후추 추출물 농도에 따른 세포 독성 정도를 측정하기 위해 공지된 방법(Kim, J J, *et al.*, *Journal of Ethnopharmacology*, 140:213-221, 2012)에 따라 BV-2 세포 생존율을 측정하였다.

[0122] BV-2 미세아교세포는 공지된 방법으로 수득하였다 (Kim, B.W. *et al.*, *PLoS One*, 8:e55792. 2013). 간략하게 세포는 5% FBS(Fetal bovine serum; PAA Laboratories Inc.; 캐나다) 및 50 μg/ml 페니실린-스트렙토마이신 (penicillin-streptomycin)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco/Invitrogen; 미국) 배

지에서 37℃, 5% CO₂조건에서 배양하였다.

- [0123] 먼저, BV-2 미세아교세포가 각 웰당 3×10^5 cells/ml이 되도록 6-웰에 분주하고 6시간 동안 배양한 다음, 검은 후추 추출물 및 인도산 후추 추출물의 농도가 각각 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 및 200 µg/ml이 되도록 첨가하여 1시간 동안 전처리하였다. 그 후 신경염증 유발 인자인 LPS(200ng/ml)를 처리하고 24시간 동안 BV-2 미세아교세포를 자극하였다.
- [0124] 24시간 후에 상등액을 제거한 다음, MTT(500 µg/ml)을 포함한 DMEM 배지를 각 웰에 첨가하여 37℃에서 4시간 배양하였다. 배양 후, 상등액을 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide); Compound Diluent/(1%) Vehicle control, Sigma, 미국)를 각 웰에 첨가하여 포마잔(formazan)을 용해하였다. 마이크로 플레이트 판독기(Tecan Trading AG, 스위스)를 이용하여 550 nm에서 광학 밀도를 측정하고, 그 값을 HTB 유도체 미처리군(대조군)과 비교하였다.
- [0125] 실시예에서 모든 데이터는 그래프 패드 프리즘 버전 5.01(Graph Pad Prism version 5.01; Graph Pad, Inc., 미국)을 사용하여 분석하였다. 모든 데이터는 생체 외 또는 조직학적 및 생화학적 실험의 경우, 3회 반복 실험이 수행된 3회 이상의 독립적인 실험의 평균±표준오차(as mean ± standard error)로 나타내었다.
- [0127] 2-2 : 검은 후추 추출물 농도에 따른 NO 발생 억제 효과 확인
- [0128] 검은 후추 추출물에 의한 신경염증 억제 활성을 확인하기 위해, 아질산염(NO) 발생 억제 효능을 확인하였다.
- [0129] BV2 미아세교세포의 세포 생존율 및 NO 농도 측정은 세포를 각 웰당 3.0×10^5 cells/ml이 되도록 6-웰 플레이트에 분주한 다음, 검은 후추 추출물 및 인도산 후추 추출물의 농도가 각각 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 및 200 µg/ml이 되도록 첨가하여 1시간 동안 전처리하였다. 그 후, 신경염증 유발 인자인 LPS(200 ng/ml)를 처리하고 24시간 동안 BV2 미아세교세포를 자극시켰다.
- [0130] 아질산염(NO)의 측정은 그리스(Griess) 시약을 이용한 NO 어세이 키트(NO assay kit; Abcam)를 사용하였으며, 측정 방법은 키트의 사용설명서에 따라 진행하였다. 세포배양액 100 µl 및 그리스 시약을 혼합한 후 10분간 반응시키고 540 nm의 흡광도에서 관찰하였으며, 농도는 표준곡선(standard curve)을 이용하여 최종 확인하였다.
- [0132] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물은 열수 추출물에서는 염증 억제 효능이 미약하게 나타났으며, 메탄올 추출물은 25 µg/ml 농도에서 염증 억제 효능을 보였으나, 그보다 더 높은 농도에서는 높은 세포 독성을 보이는 것으로 나타났다. 반면, 70% 에탄올 추출물의 경우 100 µg/ml 농도에서 세포 독성 없이 효과적으로 NO 발생을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0133] 인도산 후추의 경우, 도 3에 나타난 바와 같이, 열수 추출물에서는 염증 억제 효능이 크지 않았으며, 메탄올 추출물의 경우 200 µg/ml 농도에서 염증 억제 효능을 보이는 것을 확인하였다.
- [0134] 하지만, 본 발명의 검은 후추 추출물이 인도산 후추에 비해 NO 발생 억제 효과가 우수한 것을 확인하였으며, 검은 후추 추출물 중에서도 세포 독성이 없는 70% 에탄올 추출물이 염증 억제 효능이 가장 우수한 것을 확인하였다.
- [0135] 따라서, 이후의 실험에서는 검은 후추 에탄올 추출물을 이용하여 신경염증 억제 효능, 기억력 증진, 및 인지 기능 개선 효과를 확인하였다.

실시예 3

- [0137] **LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에서 추출용매에 따른 NO 발생 억제 및 세포 생존율에 대한 검은 후추 추출물 효과**
- [0138] 3-1 : 검은 후추 추출 용매에 따른 NO 발생 억제 효과 확인 및 세포 생존율 확인
- [0139] 검은 후추 추출물에 의한 신경염증 억제 활성을 확인하기 위해, 상기 실시예 2-2와 동일한 방법으로 실험을 수행하였으며, 각 추출용매는 열수(Dw), 메탄올(Mt), 50% 에탄올(50% Et), 70% 에탄올(70% Et) 및 70% 에탄올 추

출물을 물에 녹인 후 원심분리 후 상층액(Sup) 및 침전물을 이용하여 검은 후추 추출물이 100 µg/ml 농도가 되도록 각각 처리하였다.

[0140] 그 결과 도 4A에 나타난 바와 같이, 검은 후추의 70% 에탄올 용매를 사용한 추출물 및 70% 에탄올 추출물의 원심분리 후 상층액이 NO 발생을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였으며, 도 4B에 나타난 바와 같이, 70% 에탄올 추출물의 원심분리 후 침전물에서는 세포독성이 나타남을 확인하였으나, 70% 에탄올을 추출용매로 사용한 검은 후추 추출물 및 70% 에탄올 추출물의 원심분리 후 상층액에 의한 세포 독성은 나타나지 않는 것을 확인하였다.

[0142] 3-2 : 검은 후추 추출물 농도에 따른 NO 발생 억제 효과 확인 및 세포 생존율 확인

[0143] 검은 후추 추출물에 의한 신경염증 억제 활성을 확인하기 위해, 상기 실시예 2-2와 동일한 방법으로 실험을 수행하였으며, 검은 후추 추출물이 1 µg/ml, 10 µg/ml 및 100 µg/ml 농도가 되도록 각각 처리하였다.

[0144] 그 결과 도 4C에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물 농도 의존적으로 NO 발생을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였으며, 도 4D에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물에 의한 세포 독성은 나타나지 않는 것을 확인하였다.

실시예 4

[0146] LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에서 iNOS 및 COX-2 mRNA 및 단백질 발현 수준에 대한 검은 후추 추출물 효과

[0147] 4-1 : iNOS 및 COX-2 mRNA 발현 수준 확인

[0148] BV-2 미세아교세포를 각 웰당 3×10^5 cells/웰 이 되도록 6-웰 플레이트에 분주하여 하룻밤 동안 배양한 다음, 검은 후추 에탄올 추출물이 1 µg/ml, 10 µg/ml 및 100 µg/ml 농도가 되도록 각각 첨가하여 1시간 동안 전처리하였다. 그 다음, 그 후, 신경염증 유발 인자인 LPS(200ng/ml)를 처리하고 24시간 동안 BV-2 미아세포를 자극시킨 다음, TRIzol 시약(Invitrogen Life Technologies, 미국)을 사용하여 전체 RNA를 분리하였다. Superscript™III 키트(Invitrogen)를 사용하여 총 RNA 2.5 µg을 역전사시킨 다음, 공지된 방법에 따라 특정 프라이머(표 3)를 사용하여 cDNA를 PCR로 증폭시켰다.

표 3

[0150] PCR 프라이머 서열 및 반응 조건

	프라이머 서열(5'-3')	서열 번호	생성물 크기(bp)	어닐링 온도(°C)	사이클
iNOS	F: 5'-GAG GTA CTC AGC GTG CTC CA-3'	1	444	56	27
	R: 5'-AGG GAG GAA AGG GAG AGA GG-3'	2			
COX-2	F: 5'-TGA GTG GTA GCC AGC AAA GC-3'	3	319	56	27
	R: 5'-CTG CAG TCC AGG TTC ATG G-3'	4			
GAPDH	F: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	5	472	57	25
	R: 5'-CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG-3'	6			

[0151] PCR은 변성(94°C, 5분), 증폭 20 ~ 28 사이클(94°C에서 30초, 50 ~ 57°C 에서 1분 및 72°C에서 1분) 및 연장(72°C에서 5분)으로 수행하였으며, PCR 증폭물은 1% 아가로스겔을 사용하여 분석하였다. GAPDH mRNA는 샘플 로딩 및 mRNA 무결성(integrity)에 대한 내부 컨트롤의 역할을 수행한다. 정량화를 위해 겔을 촬영하고 각 밴드에 대한 픽셀 강도를 이미지 J(Image J, NIH)를 이용하여 결정한 다음, 각 인자에 대한 mRNA 발현 정도를 GAPDH mRNA 밴드 강도를 이용하여 정규화하였다.

[0153] 4-2 : iNOS 및 COX-2 단백질 발현 수준 확인

[0154] BV-2 미세아교세포는 상기 실시예 4-1과 동일한 방법으로 세포를 배양하였다.

[0155] 세포는 PBS를 이용하여 두번 세척하고 4°C에 보관하였으며, 용해 버퍼(1 RIPA 용해버퍼, 프로테아제 저해제 각

테일 및 포스파타아제 저해제 카테일)을 처리한 다음 10분 동안 용해시켰다. 용해물은 4°C, 14,000 rpm에서 원심분리한 다음, 상등액을 수득하여 분석에 사용하였다. 동량의 단백질(20mg 또는 40mg)을 10% SDS-PAGE 겔로 전기영동 후 PVDF막(polyvinylidenediuforide membranes ; Millipore, Bedford, 미국)으로 트랜스퍼 시켰다.

[0156] 비특이적 결합을 막기 위해 트랜스퍼한 PVDF 막을 5% 탈지방유가 포함된 PBS를 이용하여 1시간 동안 반응시킨 다음, 1차 항체인 항-iNOS 항체(1:1000; Cell Signaling Technology, 미국), 항-COX-2 항체(1:1000; Santa Cruz Biotechnology, 미국) 및 항-β-actin 항체(1:2000; Sigma-Aldrich, 미국)를 처리하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 다음, PBS로 3회 이상 세척한 후, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase; HRP)가 부착된 2차 항체((1:4000; 마우스 및 고트, Santa Cruz, 미국; 래빗, Cell Signaling Technology, 미국)를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 멤브레인은 ECL 검출 키트(detection kit)와 발광 영상 분석기(Luminescent Image Analyzer; LAS-3000, 미국)를 사용하여 영상화하였다.

[0158] 그 결과 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물 농도 의존적으로 LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에서 iNOS 및 COX-2 mRNA 및 단백질 발현 수준이 억제되는 것을 확인하였다.

실시예 5

[0160] LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에서 NF-κB (p65) 활성 및 IκBα 인산화/분해에 대한 검은 후추 추출물 효과

[0161] NF-κB (p65) 활성 및 IκBα 인산화/분해에 대한 검은 후추 추출물 효과 확인하기 위해 상기 실시예 3-2와 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 단백질을 수득하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0162] IκBα 인산화/분해정도를 분석하기 위해 전체 세포 용해물을, p65 활성을 분석하기 위해 세포질 용해물 및 핵 용해물을 각각 샘플로 사용하였다.

[0163] 각각의 샘플 40μg을 10% SDS-PAGE 겔로 전기영동 한 다음, 분리된 단백질을 PVDF막(Millipore; 미국)으로 트랜스퍼 시켰다. 비특이적 결합을 차단하기 위해 PVDF막을 5% 스킴밀크가 포함된 PBS로 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체인 항-NF-κB항체, 항-IκBα 항체 및 항-p-IκBα 항체(1:1000; Cell Signaling Technology, 미국) 및 항-β-actin 항체(1:2000; Sigma-Aldrich, 미국)를 처리하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 다음, PBS로 3회 이상 세척한 다음, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase; HRP)가 부착된 2차 항체((1:4000; 마우스 및 고트, Santa Cruz, 미국; 래빗, Cell Signaling Technology, 미국)를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 멤브레인은 ECL 검출 키트(detection kit)와 발광 영상 분석기(Luminescent Image Analyzer; LAS-3000, 미국)를 사용하여 영상화하였다.

[0165] 도 7A 내지 도 7B에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물에 의해 LPS-자극된 BV-2 세포에서 IκB-α 인산화 및 분해가 현저하게 약화되는 것을 확인하였다. 또한, 도 7C 내지 도 7F에 나타난 바와 같이, 세포질 내 p65 농도는 검은 후추 추출물 농도 의존적으로 증가하는 반면, 핵 내 p65 농도는 감소하는 것으로 확인되었다. 이는 검은 후추 추출물에 의해 p65 서브유닛의 전좌(translocation)가 차단되는 것을 의미한다.

[0166] 즉, 검은 후추 추출물에 의해 NF-κB 활성화가 억제되어, LPS-자극된 BV2 미세아교세포에서 NO, iNOS 및 다른 전염증성 사이토카인을 억제하는 원인이 될수 있음을 의미한다.

실시예 6

[0168] LPS-자극된 BV-2 미세아교세포에서 TLR4 하류 신호 전달 경로에 대한 검은 후추 추출물 효과

[0169] 본 발명에서는 검은 후추 추출물이 전염증성 매개체 및 사이토카인 생성을 억제하는 기전을 확인하기 위해 LPS로 유도된 주요 TLR4 하류 신호 전달 경로를 조사하였다.

[0170] 상기 실시예 4-2와 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 단백질을 수득하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 전체 세포 용해물 40μg을 10% SDS-PAGE 겔로 전기영동 한 다음, 분리된 단백질을 PVDF막(Millipore; 미국)으로 트랜스퍼 시켰다. 비특이적 결합을 차단하기 위해 PVDF막을 5% 스킴밀크가 포함된 PBS로 1시간 동안 반응시켰다. 1

차 항체인 항-JNK 항체, 항-p-JNK 항체, 항-p38, 항-p-p38 항체, 항-ERK 항체, 항-p-ERK 항체, 항-IRF3 항체, 항-p-IRF3 항체(1:1000; Cell Signaling Technology, 미국) 및 항-β-actin 항체(1:2000; Sigma-Aldrich, 미국)를 처리하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응 시켰다. 그 다음, PBS로 3회 이상 세척한 다음, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase; HRP)가 부착된 2차 항체((1:4000; 마우스 및 고트, Santa Cruz, 미국; 래빗, Cell Signaling Technology, 미국)를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 멤브레인은 ECL 검출 키트(detection kit)와 발광 영상 분석기(Luminescent Image Analyzer; LAS-3000, 미국)를 사용하여 영상화하였다.

[0171] 도 8에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물 농도 의존적으로 p38, JNK, ERK 및 IRF3의 인산화가 억제되는 것을 확인하였으며, 이는 검은 후추 추출물에 의해 TLR4 하류 경로가 억제되고, 이로 인해 전염증성 매개체 및 사이토카인 생성이 억제되는 것을 의미한다.

실시예 7

[0173] **수동회피실험 (Passive avoidance test)**

[0174] 본 발명에서는 검은 후추 추출물의 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료에 대한 효과를 확인하기 위해, 스코폴라민에 의해 유발된 인지 장애 질환 동물모델에 검은 후추 추출물을 투여하였다.

[0175] 수컷 C57BL/6 마우스(25 g, 8주령)는 대한바이오링크에서 구입하였다. 이들을 5개의 그룹으로 나누어 표준조건 하에서 1주 순화하였으며 이후 실험에 사용되었다 (온도 22±2 °C, 습도 55±5 %, 12 h-명/암 사이클, 음식/물 자유식). 모든 실험은 실험동물관리기준(NIH publication No. 85-23, revised 1985)의 가이드라인과 건국대학교 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee)에 따라 수행하였다. 마우스는 6마리씩 5개의 그룹으로 나누었으며, 마우스에 투여한 검은 후추 추출물 및 스코폴라민은 생리식염수에 녹여 사용하였다.

[0176] 1) vehicle (무처리군, 음성대조군),

[0177] 2) 스코폴라민(Scopolamine) 2 mg/kg 처리군

[0178] 3) 스코폴라민(Scopolamine) 2 mg/kg + 검은 후추 추출물 25 mg/kg 처리군

[0179] 4) 스코폴라민(Scopolamine) 2 mg/kg + 검은 후추 추출물 50 mg/kg 처리군

[0180] 5) 스코폴라민(Scopolamine) 2 mg/kg + 타크린(tacrine) 처리군(양성대조군)

[0182] 검은 후추 추출물은 스코폴라민 처리 7일 동안 25 mg/kg 또는 50 mg/kg을 매일 마우스에 경구투여하였으며, 스코폴라민 2 mg/kg는 복강주사를 통하여 투여하였다.

[0183] 기억력 평가를 위해 수동 회피 실험을 진행하였으며, 수동 회피 행동을 위한 훈련 및 시험을 위해서는 두 개의 동일한 명/암 정방향 상자를 가진 미국 GEMINI 사(San Diego Instruments, San Diego, CA, USA)의 수동 회피 실험 시스템(Active and passive avoidance system)을 사용하였다. 이러한 장치는 명 챔버(밝은 방)와 암 챔버(어두운 방)를 가지고 있으며, 컴퓨터로 조절되는 문에 의해 구분된다. 마우스를 밝은 방에 넣은 후 빛을 주어 어두운 방으로 가게 한 후 전류를 통하게 하여 마우스가 이를 기억하게 하였다. 즉, 마우스가 어두운 방으로 들어가면 문이 자동으로 닫히고 5초간 0.5 mA의 전기적 발 쇼크(Electrical foot shock)를 준다. 이때, 협동물이 밝은 구획에 머무는 시간(step-through latency time)을 최대 300초까지 측정한다. 머무는 시간은 컴퓨터를 통해 기록, 저장하였으며, 전기적 쇼크 및 문의 개폐는 부착된 장치 시스템에 의해 조절되었다.

[0184] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 수동 회피 실험에서 밝은 방에 머무는 시간(latency time)은 스코폴라민 처리군은 기억력 손상이 유발되어 머무는 시간이 초기 습득단계와 유사한 것으로 관찰되었으며, 검은 후추 추출물을 투여한 군은 농도 의존적으로 머무는 시간이 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 검은 후추 추출물을 50 mg/kg으로 투여한 군은 타크린(tacrine) 처리군(양성대조군)과 유사한 머무는 시간을 보이는 것을 확인하였다.

실시예 8

[0186] **Y-미로 실험(Y-maze test)**

[0187] 본 발명에서는 검은 후추 추출물에 의한 기억력 증진에 대한 효과를 확인하기 위하여 Y-미로 실험(Y-maze test)을 수행하였다. 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 스코폴라민에 의해 유발된 인지 장애 질환 동물모델에 검은 후추 추출물을 투여한 다음, 스코폴라민 투여 30분 후에 실험을 수행하였다.

[0188] Y-미로실험의 장치는 3개의 가지(각 가지를 A, B, C로 정함)로 구성되어 있으며 각 가지(arm)의 통로 길이는 40 cm, 폭은 12 cm, 높이는 30 cm이고 세 개의 가지가 인접한 가지와 접하는 각도는 120도이고 모든 실험 장치는 폴리비닐 플라스틱(polyvinyl plastic)으로 구성되어 있다. 미로의 중앙에 마우스를 조심스럽게 놓고 7분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 마우스가 들어간 가지를 기록하였는데, 마우스가 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 반복하게 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 각 가지에 들어간 횟수 및 순서를 측정하여 마우스의 총 입장횟수(Total arm entry) 및 변경 행동력 점수(spontaneous alteration, %)를 평가하였다. 변경 행동력 점수는 3개의 가지를 순차적으로 들어가는 경우, 즉 ABC, BCA, CAB 등으로 정의하였으며, 하기 수학적 1로 계산하였다.

[0189] [수학적 1]

[0190] $\% \text{ alteration} = [\text{총 alteration 수}] / [\text{arm에 들어간 총 횟수} - 2] \times 100$

[0192] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 스코폴라민 처리군은 기억력 손상이 유발되어 마우스의 총 입장횟수(Total arm entry) 및 변경 행동력 점수(spontaneous alteration, %)가 낮게 확인된 반면, 검은 후추 추출물을 투여한 군은 기억력이 개선되어 양성대조군과 유사한 수준을 보이는 것을 확인하였다.

실시예 9

[0194] **스코폴라민에 의해 유발된 인지 장애 질환 동물모델의 아세틸콜린에스테라아제 활성에 대한 검은 후추 추출물 효능**

[0195] 본 발명에서는 검은 후추 추출물이 스코폴라민에 의해 증가된 아세틸콜린에스테라아제의 활성을 억제하는지 확인하였다. 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 스코폴라민에 의해 유발된 인지 장애 질환 동물모델에 검은 후추 추출물을 투여한 다음, 스코폴라민 투여 30분 후에 희생시켜 뇌를 적출하고 해마(Hippocampus)와 대뇌 피질(Cerebral cortex) 부분을 분리하였다. 동물 뇌 해마 및 대뇌피질에서 단백질을 분리한 다음, BCA 단백질 정량법을 통하여 정량하였다.

[0196] 아세틸콜린에스테라아제 활성은 바이오체인 키트(Biochain, CA, USA)를 이용하여 제조사의 실험방법에 따라 UV 마이크로플레이트 리더를 사용하여 흡광도 410nm에서 측정하였다.

[0198] 도 11에 나타난 바와 같이, 뇌의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질에서 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase; AChE) 생성 정도를 측정할 결과, 스코폴라민 처리군에서 AChE 농도가 급격히 증가한 반면, 검은 후추 추출물 처리군은 농도 의존적으로 AChE 농도가 감소되는 것을 확인하였다. 특히, 검은 후추 추출물을 50 mg/kg으로 투여한 군은 타크린(tacrine) 처리군(양성대조군)과 AChE 농도가 유사한 것을 확인하였다.

실시예 10

[0200] **스코폴라민에 의해 유발된 인지 장애 질환 동물모델의 염증성 단백질에 대한 검은 후추 추출물 효능**

[0201] 본 발명에서는 검은 후추 추출물이 인지기능저하에서의 영향을 미치는 것으로 알려지는 염증반응 매개인자(inflammatory mediators)의 발현을 억제하는지 확인하였다.

[0202] 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 스코폴라민에 의해 유발된 인지 장애 질환 동물모델에 검은 후추 추출물을 투여한 다음, 스코폴라민 투여 30분 후에 희생시켜 뇌를 적출하고 해마(Hippocampus)와 대뇌 피질(Cerebral cortex) 부분을 분리하였다. 동물 뇌 해마 및 대뇌피질에서 단백질을 분리한 다음, BCA 단백질 정량법을 통하여

정량하였다.

[0203] 동량의 단백질(20mg 또는 40mg)을 10% SDS-PAGE 겔로 전기영동 후 PVDF막(polyvinylidenediufioride membranes ; Millipore, Bedford, 미국)으로 트랜스퍼 시켰다. 비특이적 결합을 막기 위해 트랜스퍼한 PVDF 막을 5% 탈지방 유가 포함된 PBS를 이용하여 1시간 동안 반응시킨 다음, 1차 항체인 항-iNOS 항체(1:1000; Cell Signaling Technology, 미국), 항-COX-2 항체(1:1000; Santa Cruz Biotechnology, 미국) 항-IκBα 항체 및 항-p-IκBα 항체(1:1000; Cell Signaling Technology, 미국) 및 항-β-actin 항체(1:2000; Sigma-Aldrich, 미국)를 처리하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응 시켰다. 그 다음, PBS로 3회 이상 세척한 후, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase; HRP)가 부착된 2차 항체((1:4000; 마우스 및 고트, Santa Cruz, 미국; 래빗, Cell Signaling Technology, 미국)를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 멤브레인은 ECL 검출 키트 (detection kit)와 발광 영상 분석기(Luminescent Image Analyzer; LAS-3000, 미국)를 사용하여 영상화하였다.

[0205] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물 투여에 의해 뇌의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질에서 iNOS 및 COX-2 발현이 억제되는 것을 확인하였으며, 도 13에 나타난 바와 같이, IκB-α의 인산화 및 분해가 억제되는 것을 확인하였다.

실시예 11

[0207] **스코폴라민에 의해 유발된 인지 장애 질환 동물모델의 인지 기능 기전에 대한 검은 후추 추출물 효능**

[0208] 본 발명에서는 스코폴라민에 의해 유발된 인지 장애 질환 동물모델에 검은 후추 추출물을 투여하였을 때, BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)-CREB(cAMP responsive element binding protein) 경로가 활성화되는지 확인하였다.

[0209] 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 스코폴라민에 의해 유발된 인지 장애 질환 동물모델에 검은 후추 추출물을 투여한 다음, 스코폴라민 투여 30분 후에 희생시켜 뇌를 적출하고 해마(Hippocampus)와 대뇌 피질(Cerebral cortex) 부분을 분리하였다. 동물 뇌 해마 및 대뇌피질에서 단백질을 분리한 다음, BCA 단백질 정량법을 통하여 정량하였다.

[0210] 동량의 단백질(20mg 또는 40mg)을 10% SDS-PAGE 겔로 전기영동 후 PVDF막(polyvinylidenediufioride membranes ; Millipore, Bedford, 미국)으로 트랜스퍼 시켰다. 비특이적 결합을 막기 위해 트랜스퍼한 PVDF 막을 5% 탈지방 유가 포함된 PBS를 이용하여 1시간 동안 반응시킨 다음, 1차 항체인 항-BDNF 항체(1:1000; abcam), 항-CREB 항체(1:1000; abcam), 항-p-CREB 항체(1:1000; abcam) 및 항-β-actin 항체(1:2000; Sigma-Aldrich, 미국)를 처리하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응 시켰다. 그 다음, PBS로 3회 이상 세척한 후, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase; HRP)가 부착된 2차 항체((1:4000; 마우스 및 고트, Santa Cruz, 미국; 래빗, Cell Signaling Technology, 미국)를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 멤브레인은 ECL 검출 키트 (detection kit)와 발광 영상 분석기(Luminescent Image Analyzer; LAS-3000, 미국)를 사용하여 영상화하였다.

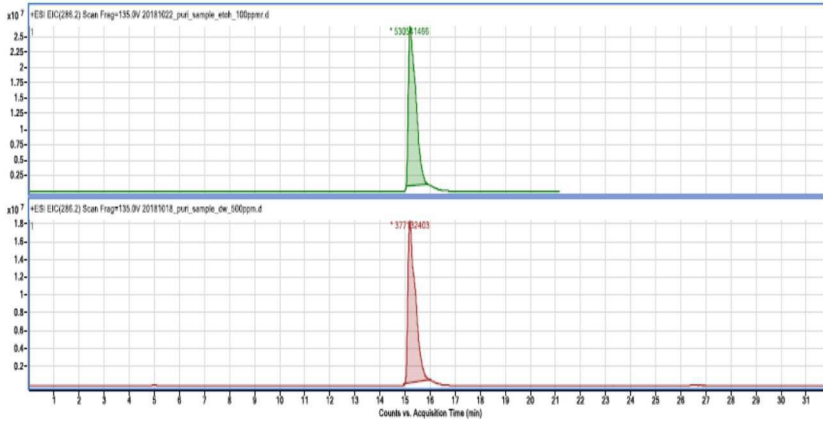
[0211] 그 결과 도 14에 나타난 바와 같이, 검은 후추 추출물을 투여한 마우스의 해마에서는 BDNF 수준이 증가되고, CREB에 대한 p-CREB 비율(p-CREB/CREB)이 높은 것을 확인하였으며, 검은 후추 추출물을 50 mg/kg으로 투여한 군은 타크린(tacrine) 처리군(양성대조군)과 유사한 결과를 보이는 것을 확인하였다.

[0212] 즉, 본 발명에서는 검은 후추 추출물은 스코폴라민으로 기억력 손상이 유도된 마우스를 이용한 Y-미로 실험(Y-maze test) 및 수동회피 실험(passive avoidance test)에서 기억력 증진효과를 나타내었으며, 아세틸콜린에스테라제 저해활성뿐만 아니라, BDNF-CREB 경로 활성화 효과를 확인하였으므로, 본 발명의 검은 후추 추출물은 기억력 장애 및 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강기능식품에 유용하게 이용할 수 있는 것을 확인하였다.

도면

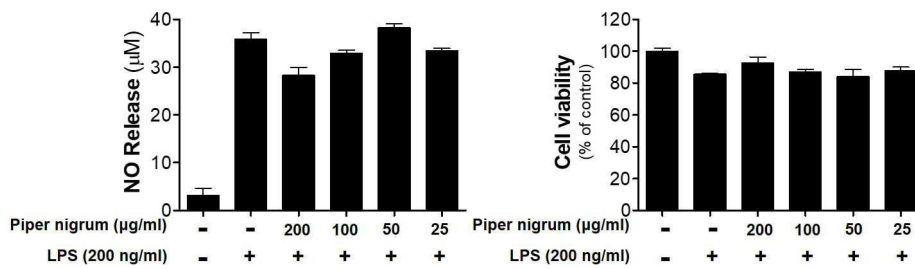
도면1

-시료 (상; EtOH추출물, 하; D.W. 추출물)

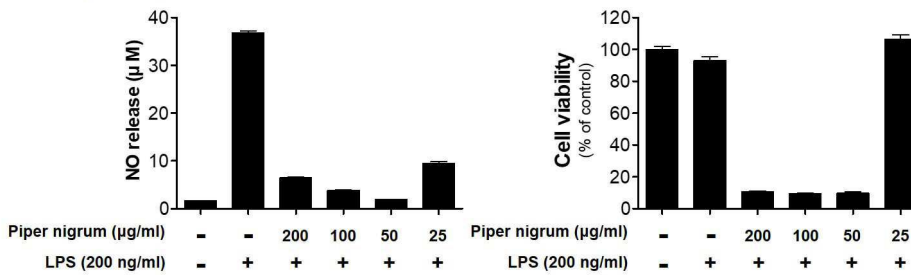


도면2

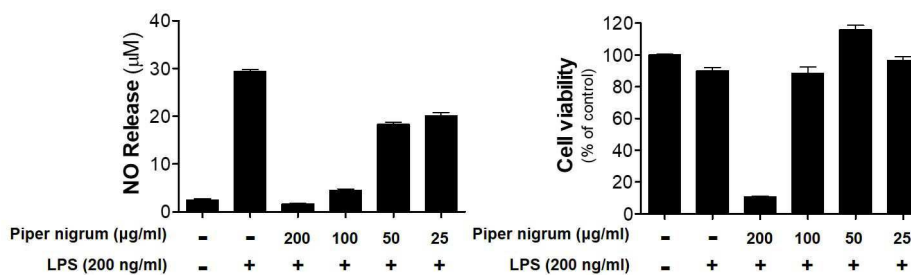
A Piper nigrum_DW



B Piper nigrum_MeOH

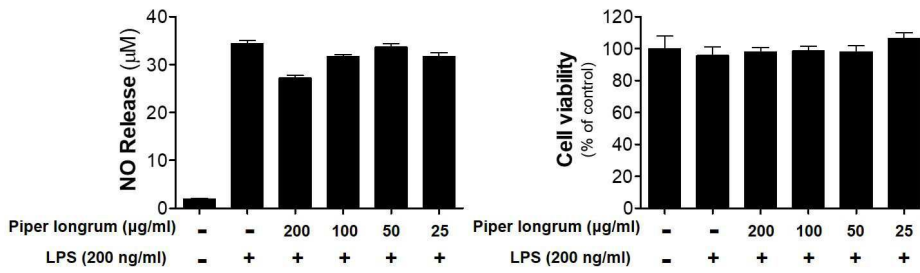


C Piper nigrum_EtOH

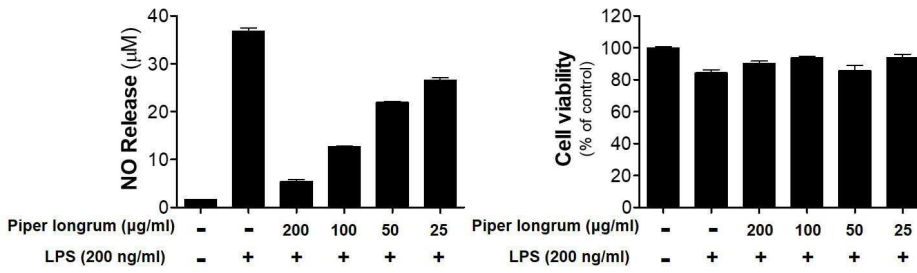


도면3

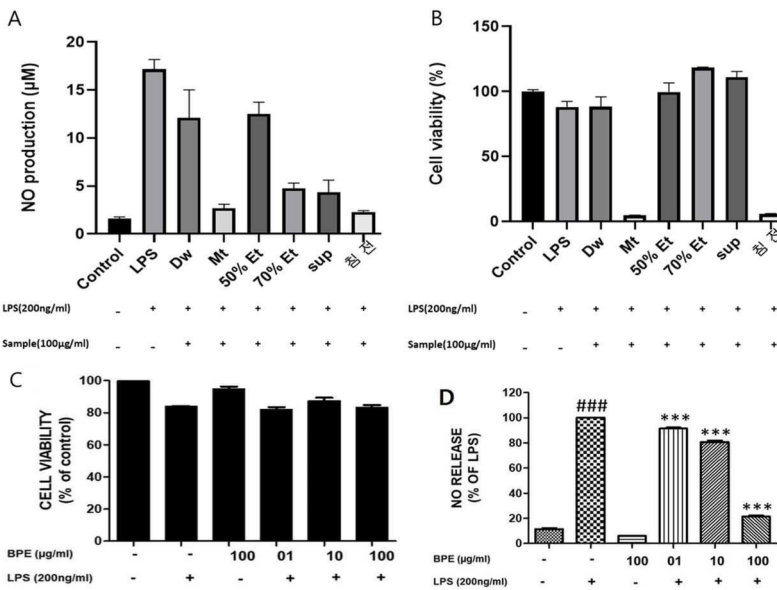
A Piper longrum_DW



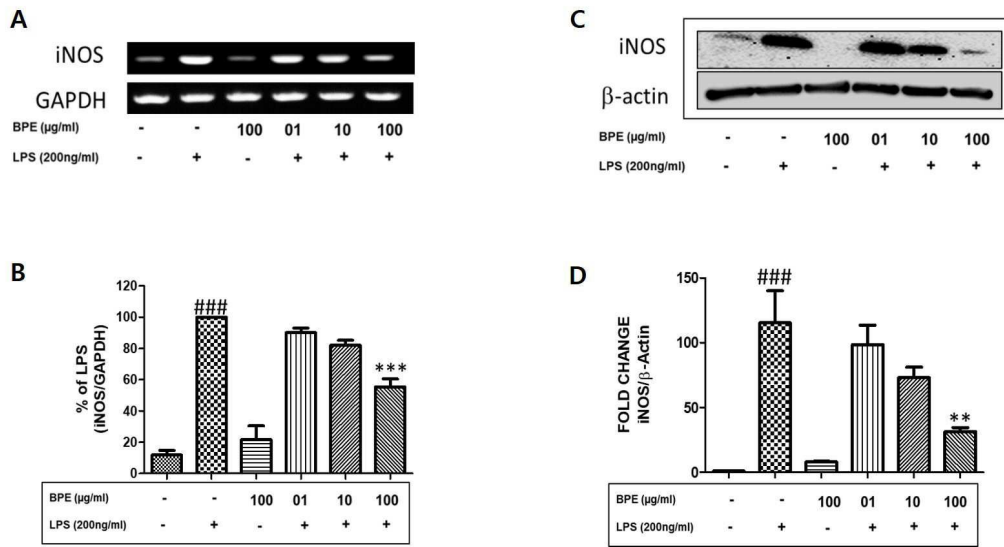
B Piper longrum_MeOH



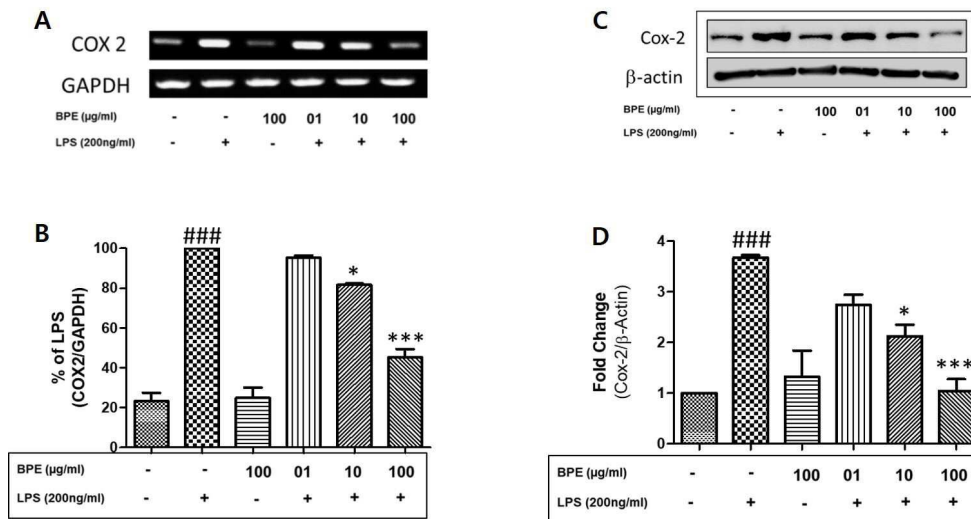
도면4



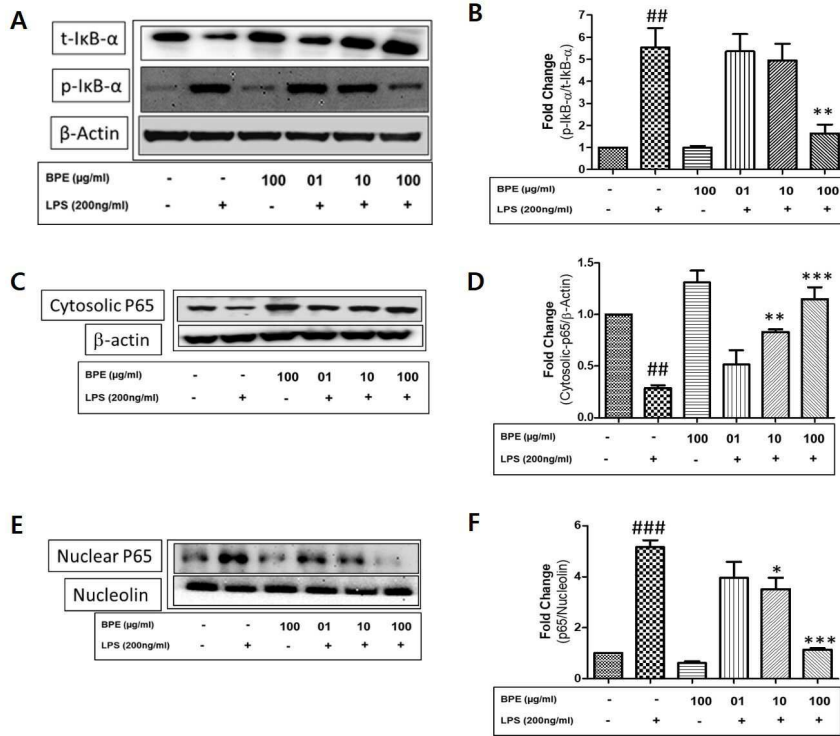
도면5



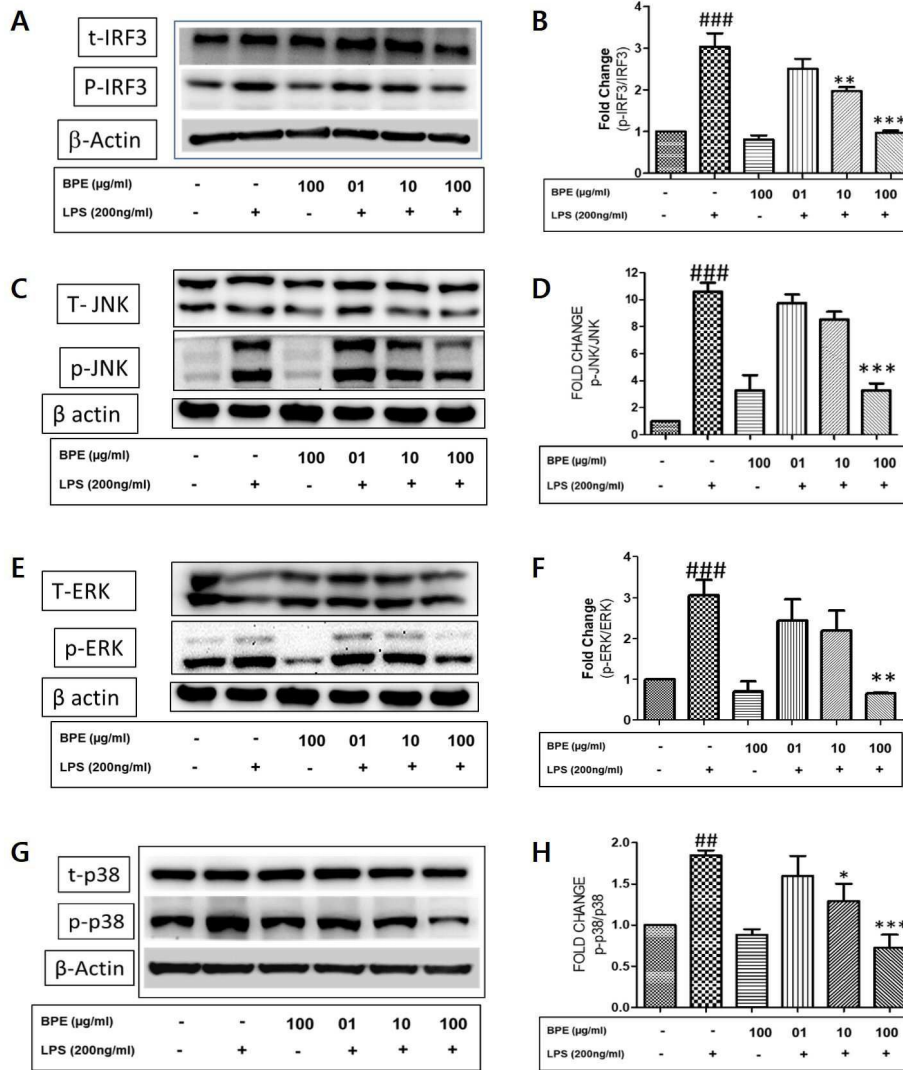
도면6



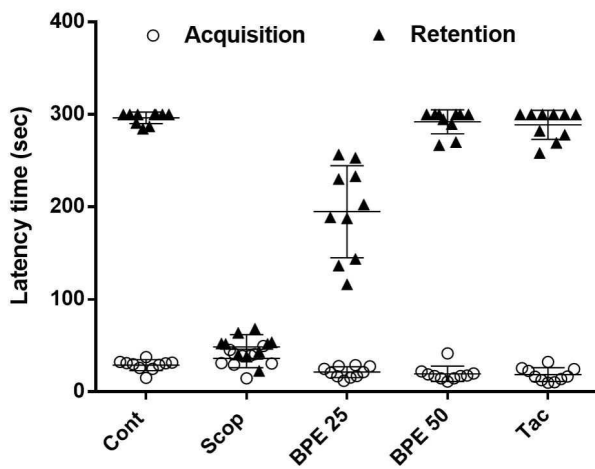
도면7



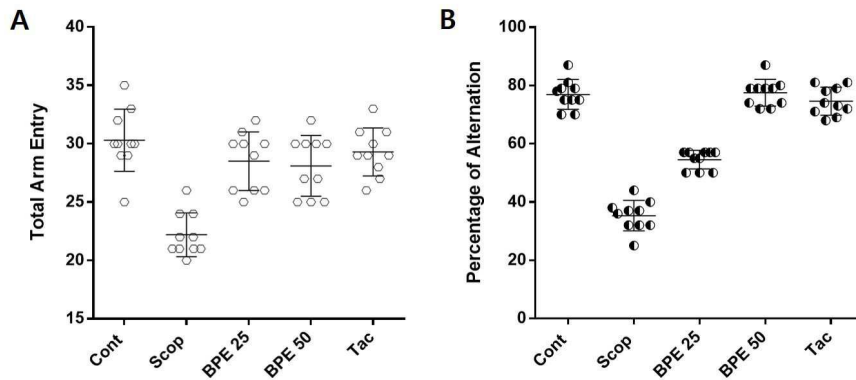
도면8



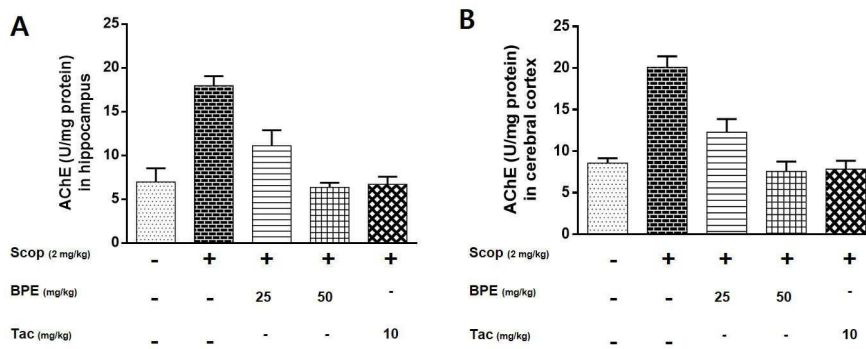
도면9



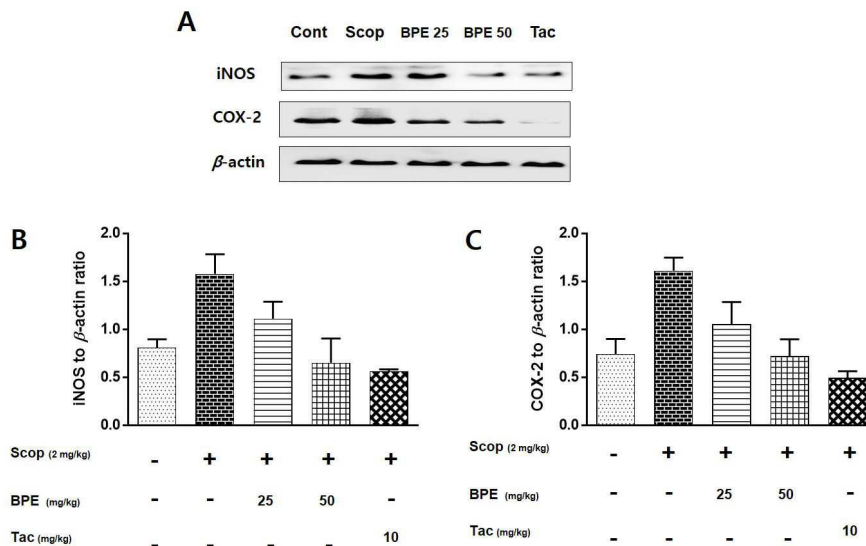
도면10



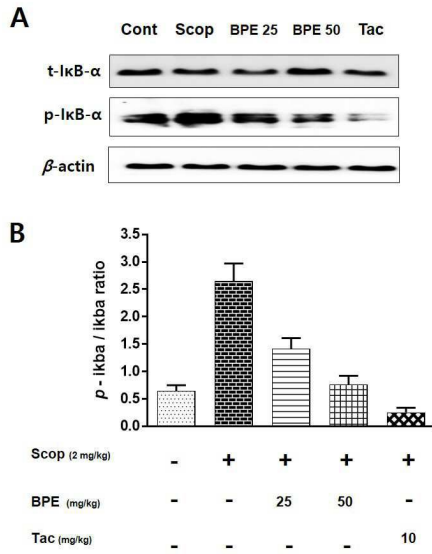
도면11



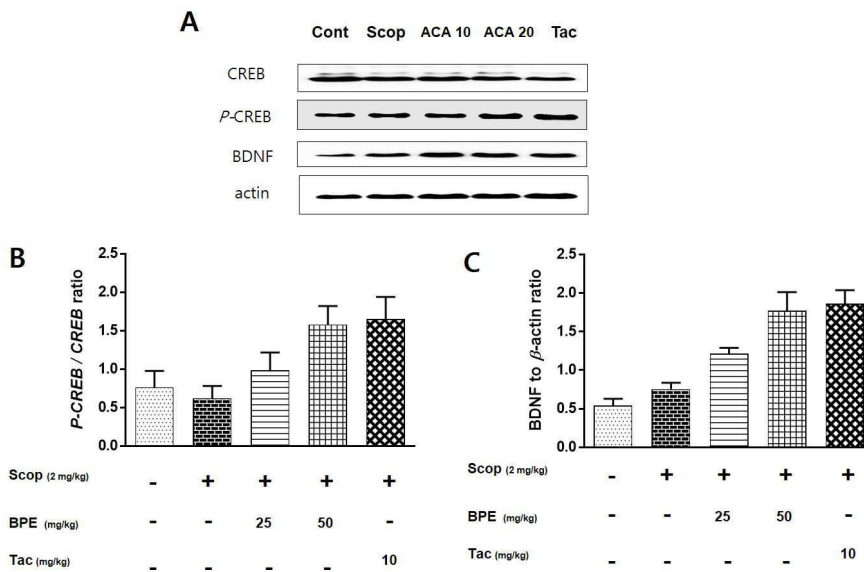
도면12



도면13



도면14



서열목록

- <110> GLOCAL Industry-Academic Cooperation Foundation Konkuk University
- <120> Composition for Preventing or Treating Neuroinflammatory Diseases and Cognitive Dysfunction containing Piper Nigrum Extract
- <130> PDPC214513
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> iNO_Forward primer
 <400> 1
 gaggtactca gcgtgctcca 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> iNO_Reverse primer
 <400> 2
 agggaggaaa gggagagagg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> COX-2_Forward primer
 <400> 3
 tgagtgtag ccagcaaagc 20
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> COX-2_Reverse primer
 <400> 4
 ctgcagtcca gttcatgg 19

 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH_Forward primer
 <400> 5
 accacagtcc atgcatcac 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_Reverse primer

<400> 6

ccaccacct gttgctgtag

20