(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0111015
(43) 공개일자 2021년09월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/899 (2006.01) *A61K 36/07* (2006.01)
A61P 25/20 (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/899 (2013.01)
A61K 36/07 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0026015
(22) 출원일자 2020년03월02일
심사청구일자 2020년03월02일

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(72) 발명자
임기택
강원도 춘천시 후석로 325 포스코더샵 아파트 112동 2308호
뎁 두타 사얀
강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명과학대학 1호관 307동 207호
(74) 대리인
구현서

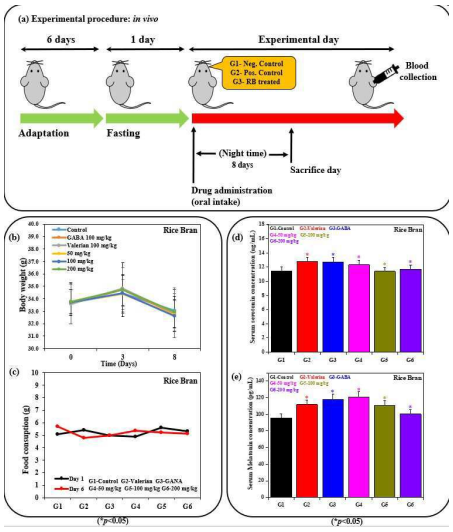
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **천연물 유래 수면 유도 및 면역 증강용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 쌀겨를 유효성분으로 포함하는 수면 유도용 및 멜라토닌 분비 유도, 그리고 쌀겨 및 능이버섯 혼합물의 면역 증강용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 쌀겨 추출물은 멜라토닌 분비 등에 효과가 있고, 수면유도에 개선에 효과가 있고, 쌀겨 및 능이버섯 혼합물은 면역 증강 효과를 가지고 있어서 기능성 식품 또는 약학적 용도로 사용될 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61P 25/20 (2018.01)
C12N 5/0662 (2013.01)
C12N 2500/74 (2013.01)
C12N 2500/76 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ012854
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농업공동연구사업
연구과제명	쌀 부산물을 이용한 고부가 천연수면유도 바이오소재 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

유효량의 쌀겨 추출물을 유효성분으로 포함하고, 여기서 상기 유효량은 쥐 체중 기준으로 50mg/kg체중인 것을 특징으로 하는 수면 유도용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물에서 상기 쌀겨 추출물은 열수 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

유효량의 쌀겨 추출물을 유효성분으로 포함하고, 여기서 상기 유효량은 쥐 체중 기준으로 50mg/kg체중인 것을 특징으로 하는 멜라토닌 분비 유도용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 조성물에서 상기 쌀겨 추출물은 열수 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

유효량의 쌀겨 추출물을 유효성분으로 포함하고, 상기 유효량은 쥐 체중 기준으로 50mg/kg체중인 조성물을 동물에 투여하여 상기 동물에서 수면을 유도하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 동물은 인간을 제외한 포유류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

유효량의 쌀겨 추출물을 유효성분으로 포함하고, 상기 유효량은 쥐 체중 기준으로 50mg/kg체중인 조성물을 동물에 투여하여 상기 동물에서 멜라토닌 분비를 증가시키는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 동물은 인간을 제외한 포유류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

쌀겨 및 능이버섯을 유효성분으로 포함하고, 여기서 쌀겨 및 능이버섯의 중량비는 5:5인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 조성물은 면역글로블린 G의 수준을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

인 비트로에서 인간 중간엽 줄기 세포(hMSC)에 쌀겨 및 능이버섯의 중량비가 7:3인 쌀겨 및 능이버섯을 유효성분으로 포함하는 조성물을 처리하여 상기 줄기세포에서 5일 배양한 것과 비교하여 10일간 배양한 세포에서 5-하이드록시트립타민(hydroxytryptamine) 1B 유전자의 발현을 감소시키는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 쌀겨 및 능이버섯은 추출물의 형태인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 천연물 유래 수면 유도 및 면역 증강용 조성물에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체의 중요한 생리작용 중 하나인 수면은 인간의 기본적인 기능을 유지하는데 필수적이며, 뇌 또는 신체의 손상을 회복시키는 과정이다. 수면은 삶의 질과 기능에 커다란 영향을 미치고 있으며, 전체 환자의 약 30%는 수면장애를 앓고 있다고 보고 되었다. 특히 수면은 면역 시스템과 밀접한 관계가 있다. 중추 신경계 (CNS)는 자율신경계 및 신경내분비 경로를 통해 면역 체계의 표적 세포에 신호를 보내 면역 기능을 조절한다.

[0003] 이러한 경로에 의해 생성되고 방출되는 신경전달물질과 호르몬은 면역 세포와 상호 작용하여 싸이토카인(Cytokine) 생성이 되는데, 생성된 싸이토카인은 수면을 조절한다. 뿐만 아니라 수면장애는 의욕저하 및 정신적 피로를 유발하며, 집중장애 등의 사회심리적인 현상과 신경 생리학적 현상까지 건강상의 문제를 야기시키고 전체적인 질병 회복에 악 영향을 끼친다.

[0004] 이러한 수면장애를 치료하기 위해서 환자들은 다양한 수면제를 복용을 하고 있다. 수면제는 트리아졸람(triazolam), 로라제팜(Lorazepam), 디아제팜(diazepam) 등의 성분을 포함하고 있는 벤조다이아제핀(benzodiazepine)계열과 졸피뎀 성분이 대표적인 비벤조디아제핀 계열(non-benzodiazepine)과 독세핀(Doxepin), 트라조돈(Trazodone) 등의 성분을 포함하는 항우울제 계열로 나뉜다.

[0005] 그러나 이러한 수면제 복용은 중독이 될 수 있으며, 장기 복용 시에 두통, 어지러움 등 부작용이 있어 규제가 요구되고 있다. 따라서 수면을 개선하고 부작용이 없는 천연물 소재의 수면 유도제를 개발하는 것이 중요하다고 판단되었다.

[0006] 한편, 면역계는 자연저항, 비특이성 면역체계 및 특이성 면역체계로 구분할 수 있다. 자연저항(1차 방어선)이란 미생물을 위시한 모든 침입자들을 그들의 종류에 관계없이 막아내는 해부생리학적 요소들을 말하며, 비특이적 면역(2차 방어선)은 자연저항을 돌파하여 체내로 들어온 침입자들을 제거하는 식세포로 구성된 방어체계를, 그리고 특이성 면역계(3차 방어선)는 림프구들로 구성된 면역체계를 말하는데, 이중 특이성 면역계는 기억능 및 자기와 비자기를 구분할 수 있는 능력을 지닌 고도로 발달한 면역체계이다.

[0007] 또한, 백혈구는 2차 또는 3차 방어선을 구성하여 1차 방어선을 돌파하여 체내에 들어온 이물을 담당하게 되며, 세균, 바이러스 감염 또는 염증 반응 시, 대식세포 및 림프구 활성의 조절은 의약품의 치료 효과 결정에 있어서 중추적인 역할을 한다. 대식세포(Macrophage)는 다양한 기능을 가진 세포로 산화적 스트레스 상황에서 여러 가지 사이토카인(cytokine)과 일산화산소(NO)를 생성하여 면역체계에서 중요한 역할을 한다. 특히 대식세포에서 리포 다당류(Lipopolysaccharide; LPS), 사이토카인, TNF-α와 같은 자극에 의해 발현되는 iNOS는 장시간 동안 다량의 NO를 생산하여, NFκB 활성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 활성화된 대식세포에 의한 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide anion, O2-), 과산화수소(hydrogen peroxide, H2O2)와 같은 활성산소종(reactive oxygenspecies; ROS) 및 일산화질소(nitric oxide, NO)의 생산은 비특이적 면역에 있어서 중요한 세포독성 및 세포활성억제기작이다.

[0008] 또한, 대식세포는 항원을 제시하거나(antigen-presenting), 종양을 없애거나(tumoricidal) 미생물세포를 죽이는(microbicidal) 세포로서, 세포매개(cell-mediated) 또는 체액성 면역(humoral immunity)에 중심적인 역할을 하는 조절세포로, 활성화된 대식세포에서 생산되는 NO는 비특이적 숙주방어기작인 대식작용을 하고, 세균 및 암세포의 증식억제 활성을 보인다. 뿐만 아니라 대식세포는 많은 라이소솜을 가지고 있고 이들은 산성가수분해효소와 과산화효소를 함유하고 있다. 또한 유리면 과 플라스틱 표면에 강하게 부착하는 성질이 있으며 미생물이나 종양세포 등을 활발하게 탐식한다. 상기 세포는 IFN-γ등의 사이토카인 수용체를 가지고 있다. 이들은 보체성분, 인터페론, 인터루킨-1 및 종양괴사인자 같은 사이토카인을 생산하며 T-세포로부터 생산되는 여러 가지 사이토카인에 의해 기능이 증강될 수 있다.

[0009] 따라서 현재 전 세계적으로 면역력 증강을 통해 건강을 증진시키고자 많은 연구가 진행되고 있고, 최근에는 합성화합물에 대한 부작용 문제점들이 대두되고 있어 천연물로부터 면역증강을 효과적으로 도출할 수 있는 소재의 개발에 연구가 집중되고 있다.

[0010] [선행 특허 문헌]

[0011] 대한민국 공개특허 10-2018-0090198

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 천연물 유래 수면 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 천연물 유래 면역 증강용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 유효량의 쌀겨 추출물을 유효성분으로 포함하고, 여기서 상기 유효량은 쥐 체중 기준으로 50mg/kg체중인 것을 특징으로 하는 수면 유도용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물에서 상기 쌀겨 추출물은 열수 추출물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0016] 또한 본 발명은 유효량의 쌀겨 추출물을 유효성분으로 포함하고, 여기서 상기 유효량은 쥐 체중 기준으로 50mg/kg체중인 것을 특징으로 하는 멜라토닌 분비 유도용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 유효량의 쌀겨 추출물을 유효성분으로 포함하고, 상기 유효량은 쥐 체중 기준으로 50mg/kg체중인 조성물을 동물에 투여하여 상기 동물에서 수면을 유도하는 방법.

[0018] 또한 본 발명은 유효량의 쌀겨 추출물을 유효성분으로 포함하고, 상기 유효량은 쥐 체중 기준으로 50mg/kg체중인 조성물을 동물에 투여하여 상기 동물에서 멜라토닌 분비를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 동물은 인간을 제외한 포유류인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0020] 또한 본 발명은 쌀겨 및 능이버섯을 유효성분으로 포함하고, 여기서 쌀겨 및 능이버섯의 중량비는 5:5인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 면역글로블린 G의 수준을 증가시키는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0022] 또한 본 발명은 인 비트로에서 인간 중간엽 줄기 세포(hMSC)에 쌀겨 및 능이버섯의 중량비가 7:3인 쌀겨 및 능이버섯을 유효성분으로 포함하는 조성물을 처리하여 상기 줄기세포에서 5일 배양한 것과 비교하여 10일간 배양한 세포에서 5-하이드록시트립타민(hydroxytryptamine) 1B 유전자의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0025] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입,근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0026] 경구 투여시, 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0027] 상기 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 상기 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-1000 ㎎/kg 범위 내이다. 용어 "약학적 유효량"은 수면장애를 예방 또는 치료하는데 충분한 양을 의미한다.

[0028] 상기 조성물은 당해 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이

때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는, 수면 유도를 위한 식품조성물을 제공한다.

[0030] 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 001 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 002 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있으나, 이는 당업자에 의해 제품에 맞게 용이하게 결정될 수 있다.

[0031] 상기 식품 조성물은 상기 추출물 이외에도 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 정제, 캡슐제, 환제, 액제 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0032] 본 발명의 식품조성물은 필수 성분으로서 상기 두 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0033] 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0034] 본 발명의 식품 조성물은 상기 성분 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 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.

[0035] 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 화합물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0036] 이하 본 발명을 설명한다.

[0037] 본 발명의 조성물의 효과를 평가하기 위해, 수컷 쥐의 혈청 멜라토닌 및 세로토닌 농도를 측정했다. 또한, 수면 촉진에 대한 발레리안 및 상업용 GABA의 결과는 본 발명의 조성물의 영향을 상호 연관시키는 데 사용되었다.

[0038] 또한, RBS의 세포 독성은 WST-1 및 혈청 면역 글로불린 분석에 의해 평가되었다. RBS의 경구 투여 후의 영원한 체중은 RBS 5 : 5 및 7 : 3 혼합비가 대사 독성이 낮다는 것을 시사한다. 그러나, IgG 및 IgA 수준의 실질적인 증가 (RBS 5:5)는 본 발명의 조성물의 면역 증강 효과를 추가로 입증한다.

[0039] 게다가, 세로토닌 성 유전자 (5-HTT, 5-HT 1B 및 MAO-A) 발현은 또한 세로토닌 및 멜라토닌의 GABA- 유도 된 신호 전달을 분석하기 위해 실시간 PCR에 의해 연구되었다. 본 발명의 결과는 본 발명의 조성물은 혈액에서 세로토닌/멜라토닌 수준을 높여서 수면을 긍정적으로 촉진 할 수 있으며 세로토닌 계를 통해 매개되는 것으로 보인다. 따라서, 본 발명의 조성물은 잠재적으로 수면 유도 및 면역 증강을 위한 기능성 식품 재료 또는 의약 보충제로서 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0040] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 쌀겨 추출물은 세포 증식에 긍정적인 영향을 미쳤으며 쥐의 혈청 멜라토닌 농도를 높였고, 특히, 50 mg/kg의 RB 및 GRB 추출물은 처리되지 않은 그룹과 비교하여 수면 관련 멜라토닌 분비를 상당히 개선시켰다.

[0041] 또한 본 발명의 쌀겨와 능이버섯 혼합물은 세라토닌 및 멜라토닌 분비 등에 효과가 있고, 수면유도에 개선에 효과가 있고, 면역 증강 효과를 가지고 있어서 기능성 식품 또는 약학적 용도로 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 본 발명에서 쌀겨(RB) 및 쌀겨와 능이(S. aspratus) 버섯 조성물의 제조에 대한 개략도,

도 2는 수면 촉진 시험에 대한 실험 절차 및 일정을 나타낸 그림, (a) 체외 실험 및 (b) 생체 내 실험,

도 3은 지정된 시간 간격에서 쌀겨(RB) 및 γ-아미노부티르산 (GABA)의 존재하에 인간 골수 중간엽 줄기 세포(hMSC)의 세포 독성 평가를 나타낸 그래프로, 도시 된 모든 데이터는 3 회 실험의 평균 ± SD이고, 별표는 통계적으로 유의미한 차이를 나타냄(* p <0.05),

도 4는 지시된 시간 간격으로 쌀겨(50, 100 및 200 mg/kg) 투여 후 래트의 체중 변화를 나타낸 그래프로, 값을 분석하고 대조군(GABA 및 발레리 안)과 비교 하였고, 제시된 모든 데이터는 2 개의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD, n = 3임,

도 5는 GABA로 유도된 세로토닌/ 멜라토닌 신호 전달 경로의 가능한 메커니즘을 나타낸 그림으로,

CNS에서, 5-HT는 세로토닌 성 뉴런에 의해 5-HTP를 통해 트립토판으로부터 합성된다. 5-HT는 5-HTT 수용체에 의해 세포 내부로 운반된다. 5-HT의 상승된 수준은 MAO-A 전사 인자의 유전자 발현을 긍정적으로 유발한다. 외인성 GABA는 뉴런의 세포막에 위치한 GABAergic 수용체에 의해 인식되며 MAO-A 유전자의 오퍼레이터 영역에서 세포질 전사 인자 (KLF11 및 R1)의 결합을 촉진한다. GABA 및 5-HT는 함께 양성 피드백 루프를 통해 MAO-A 전사 인자의 초기 합성을 유발하여 MAO-A 단백질의 합성을 초래한다. 5-HT는 MAO-A에 의해 5-HIAA로 대사되어 소포에 저장되거나 5-HT1B / 1D 수송 체에 의해 말초 혈액으로 다시 수송된다. CNC: 중추 신경계; 5-HT : 5-하이드록시트립타민; 5-HTTP:5-하이드록시트립토판; 5-HTT : 5- 하이드 록시트립타민 수송체; MAO-A : 모노아민 옥시다제-A; GABA : γ- 아미노부티르산; KLF11 : 크럽펠 유사인자 11; R1 : MAO-A의 억제제 전사 인자; FOXO1 : 포크헤드 박스 단백질 O1; 5-HIAA : 5- 하이드록시인돌아세트산; 5-HT1B / 1D : 5- 하이드 록시트립타민 수송체 1B / 1D; Ub : 유비퀴틴.

도 6은 본 발명의 쌀겨 추출물을 이용한 인 비트로 실험 과정 및 그 세포 생존률 및 세로토닌 성 유전자 발현 결과를 나타낸 그림,

도 7은 본 발명의 쌀겨 추출물을 이용한 인 비보 실험 과정 및 그 체중, 사료 섭취 및 혈청 세로토닌과 멜라토닌 결과를 나타낸 그림,

도 8은 본 발명의 발아 쌀겨 추출물을 이용한 체중, 사료 섭취 및 혈청 세로토닌과 멜라토닌 결과를 나타낸 그림,

도 9는 본 발명의 쌀겨 추출물을 이용한 혈청에서 면역 글로불린 생산에 대한 효과를 나타낸 그래프.

도 10은 8 일의 급여 후 혈청에서 면역 글로불린 생산에 대한 RBS의 효과를 나타낸 그래프, (a) IgG, (b) IgA 및 (c) IgM. 제시된 모든 데이터는 2 개의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD, n = 3이고, 별표는 통계적으로 유의미한 차이를 나타냄(* p <0.05 및 ** p <0.01).

도 11은 인간 중간엽 줄기 세포(hMSC)에서 세로토닌 관련 유전자 발현에 대한 본 발명의 RBS 조성물의 효과를 나타낸 그래프, 5 일 및 10 일 후 본 발명의 RBS 조성물(50 μg/mL 및 1000μg/mL) 존재시 세로토닌 관련 유전자 마커 (5HTT, 5HT-1B 및 MAO-A) 발현의 실시간 PCR (qRT-PCR) 분석 인큐베이션을 β- 액틴으로 표준화하고 상대 mRNA 함량 (a & b)으로 제시하였다. 제시된 모든 데이터는 2 개의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD, n = 3이고, 별표는 통계적으로 유의미한 차이를 나타냄(* p <0.05),

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0044] <u>실시예 1: 샘플 준비 및 추출</u>

[0045] 철원오대미 쌀겨와 능이 버섯 추출물은 철원 농업 협동 조합 (한국 철원)과 쿤밍 존리 버섯 (중국 쿤난)에서 구입하였다.

[0046] 쌀겨(이하, 'RB'라고도 함) 및 발아 쌀겨(이하, 'GRB'라고도 함) 샘플을 이중 증류수로 2 회 세척하고 2 일 동안 건조시켰다. 그 후, 쌀겨를 기계 분쇄하여 미분말을 얻었다. 이어서, 95 ℃에서 1 시간 동안 이중 증류수로 샘플을 추출하였다. 이어서, 유도된 용액을 여과하고,이 과정을 2 회 반복하였다. 마지막으로, 추출물을 회전식 증발기 (EYELA 회전식 증발기, 일본) 및 동결 건조 (동결 건조기, EYELA® 동결 건조 유닛 2200, 도쿄 리카키카

이 컴퍼니,일본)에 의해 72 시간 동안 농축시켜 분말 형태로 만들었다.

[0047] 쌀겨와 능이 버섯(Sarcodon aspratus) 조성물(이하, 'RBS'라 함)의 최적 혼합 비율을 결정하기 위해 혼합 비율을 7 :3, 5:5 및 3:7 (w/w)로 제조하였다. 혼합 샘플을 95 ℃에서 1 시간 동안 이중 증류수로 추출하였다. 이어서, 추출된 용액을 여과하고,이 과정을 2 회 반복하였다. 마지막으로, 추출물을 회전 증발기(EYELA 회전식 증발기, 일본) 및 동결 건조 (동결 건조기, EYELA® 동결 건조 유닛 2200, 일본 도쿄 리카 키카이 컴퍼니)에 의해 72 시간 동안 농축시켜 분말 형태로 만들었다. 전체 추출 절차 및 샘플 준비는 도 1a 및 b에 나타내었다.

[0048] 실시예 2:생화학 분석:

[0049] γ- 아미노부티르산(GABA)의 측정 :

[0050] RBS 추출물에 존재하는 GABA의 양은 Zhang and Bown [1. Zhang G, Bown AW. The rapid determination of γ-aminobutyric acid. Phytochemistry. 1997 Mar 1;44(6):1007-9]에 기술된 프로토콜에 의해 정량화되었다.

[0051] 요약하면, 순수한 GABA 분말(≥ 99 %, 미국 Sigma-Aldrich)을 사용하여 표준 곡선을 얻었다. 다음, 400 ㎕의 메탄올을 0.1 g의 쌀겨와 각 추출물 (7:3, 5:5 및 3:7)에 첨가하고, 혼합물을 75 ℃에서 30 분 동안 수조로 건조시켰다. 최종 반응은 1 mL의 70 mM lanthanum chloride(LaCl3)를 첨가한 다음 15 분 동안 15,000 rpm에서 원심 분리하여 수행하였다. 원심 분리 후, 700 μL의 상청액을 160 mL의 0.1 M 수산화 칼륨(KOH; Sigma-Aldrich, USA)과 함께 교반하고 15,000 rpm에서 10 분 동안 원심 분리하였다. 대략 200μl의 0.5M 피로인산칼륨(K4P207), 150μl의 4mM 니코틴 아미드 아데닌 디 뉴클레오티드 포스페이트(NADP) 및 50μL의 GABase (2U/mL; Sigma-Aldrich, USA)를 550μL의 상청액에 첨가하고 흡광도를 340nm (A1)에서 측정되었다. 마지막으로, 50 μL의 20 mM α-케토글루타르 산 나트륨 염 (≥ 98 %, Sigma-Aldrich, USA)을 첨가하여 반응을 정지하고, 340 nm에서 흡광도를 측정하였다 (A2). GABA의 양은 A1과 A2의 차이로 계산되었다.

[0052] β- 글루칸의 측정:

[0053] RBS 추출물(7:3, 5:5 및 3:7)에 존재하는 β-글루칸의 양은 제조업체의 지침에 따라서 혼합 결합 (1,3 : 1,4) β- 글루칸 키트 (Megazyme Inc., USA)를 사용하여 측정되었다. β-글루칸의 양은 총 및 α- 글루칸의 차이를 측정함으로써 계산되었다. β- 글루칸 함량을 결정하기 위해 모든 샘플을 100 mg에 대해서 3 회 반복하였다.

[0054] 실시예 3: 인 비트로 연구:

[0055] 세포 배양 및 유지:

[0056] hMSC는 한국 세포주 은행(서울대학교 의과 대학 KCLB)에서 수집했다. hMSC는 앞서 기술한 공정에 따라 배양되었다[Seonwoo H, Jang KJ, Lee D, Park S, Lee M, Park S, Lim KT, Kim J, Chung J. Neurogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells on Graphene-Polycaprolactone Hybrid Nanofibers. Nanomaterials. 2018 Jul;8(7):554;Jin B, Choung PH. Recombinant human plasminogen activator inhibitor-1 accelerates odontoblastic differentiation of human stem cells from apical papilla. Tissue Engineering Part A. 2016 Apr 5;22(9-10):721-32].

[0057] 요약하면, 세포 배양은 10 % 소 태아 혈청(FBS; Welgene Inc., 대한민국) 및 1 % 항생제-항진균제 (Anti-Anti; 100X, Gibco, USA), 페니실린(10000 단위/mL), 스트렙토마이신(10000 μg/mL) 및 암포테리신 B (25 μg/mL) 포함를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Welgene Inc., Republic of Korea)를 사용하여 37℃, 5% CO2를 포함하는 습도 조건에서 수행하였다(Steri-Cycle 370 Incubator; Thermo-Fischer Scientific, USA)수행하였다. 그 배지는 3 일마다 교체되었다. 세포 성장이 70-80 %에 도달한 후, 이들은 분리되고, 계수되었으며, 컨푸루언스되기 전에 1mL의 0.25 % 트립신-에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA; Gibco, USA) 용액으로 계대시켰다. 실험을 위해서는, 계대 3 및 5의 hMSC가 사용되었다.

[0058] 세포 생존력/증식 분석:

[0059] RBS 처리 군의 경우, 3 개의 hMSC 계대를 96- 웰 플레이트 (1 × 10^4/웰)에 5 일 동안 시딩하고 37 ℃에서 5 % CO2에서 배양하였다(Steri-Cycle 370 Incubator; Thermo Fischer Scientific, USA).

[0060] 또한, GABA (≥99 %; Sigma-Aldrich, USA) 및 RB를 사용하여 세포 독성을 평가하였다. 인큐베이션 1 일, 3 일 및 5 일 후 샘플의 세포 생존율을 평가하기 위해 WST-1 분석 (EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit 174 ;; DoGenBio Co., Ltd., Korea)을 수행하였다. 처리되지 않은 플레이트는 대조군으로 간주되었다. WST-1은 미토콘드리아 탈수소 효소 민감성 염료이다. 건강한 세포는 염료를 포획하고 테트라졸륨 염을 절단하여 포르마잔을 형

성한다.

[0061] 따라서, 웰에서 생성된 포르 마잔 염료의 양은 살아있는 세포의 수에 정비례한다. 450 nm의 흡광도 값(기준값으로서 625 nm)을 갖는 분광 광도계 (Infinite® M Nano 200 Pro; TECAN, Switzerland)로 생성된 색상을 정량화하였다. 모든 샘플을 3 회 반복하였고, 데이터는 평균 OD ± 표준 편차로 제시하였다.

[0062] 실시예 4: 인 비보 연구:

[0063] 동물 관리 및 유지 관리:

[0064] 본 발명에서 사용된 동물은 체중 34-35g의 7주령 ICR 수컷 흰쥐를 사용하였다 (ORIENTBIO Inc, Republic of Korea) 사용된 동물은 7일간의 사육환경에서 적응 기간을 거쳤다. 사육환경은 온도 21 ± 2℃, 습도 35±2%, 조명시간 12시간 (20:00 소등)인 절연된 방음 녹음실에 유지되었다.

[0065] 쥐는 음식과 충분한 물에 자유롭게 접근 할 수 있었다. 신뢰할 수있는 과학적 자료의 생산에 필요한 동물의 수와 고통을 겪는 동물의 수를 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다.

[0066] 동물 처리:

[0067] 쌀겨 관련 실험 랫트는 5개 또는 6 개의 그룹 (n = 5)으로 나누었다:: G1- 대조군(처리 없음), 양성 대조군[발레리안(G2) 및/또는 GABA(G3)], G3 또는 G4-RB (50mg/kg), G4 또는 G5-RB (100mg/kg) 및 G5 또는 G6-RB (200 mg/kg).

[0068] 조성물 관련 실험 랫트는 5 개의 그룹 (n = 5)으로 나누었다:G1-음성 대조군(처리 없음), G2-양성 대조군 (발레리안 또는 GABA), G3-RBS 3:7 (200mg/kg), G4-RBS 5:5 (200 mg/kg) 및 G5-RBS 7:3(200 mg/kg).

[0069] 밤주기 동안 매일 경구 섭취로 동물에게 급여하였다. 동물 관리 및 치료와 관련된 모든 절차는 강원 대학교 동물 실험 윤리위원회(강원대학교 동물 관리 및 사용위원회, 허가 번호 KW-170922-1)의 승인에 따라 수행되었다.

[0071] 혈청 멜라토닌, 세로토닌 및 면역 글로불린의 측정:

[0072] 경구 투여 5 일 후, 혈청 중 멜라토닌 및 세로토닌의 농도를 측정하였다. 혈청의 분리를 위해 잘 확립된 프로토콜이 사용되었다. 요약하면, 모든 처리 및 대조군으로부터의 혈액을 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA; Sigma-Aldrich, USA)을 함유하는 사전 냉각된 1.5mL 튜브에서 취하여 얼음 위에 두었다. 다음, 샘플을 실온으로 되돌리고 20 분 동안 인큐베이션한 후, 2,500 rpm에서 10 분 동안 원심분리 하였다. 상청액을 새로운 튜브로 옮기고 사용하기 전에 -70 ℃에서 보관 하였다.

[0073] 멜라토닌은 마우스 MT ELISA 키트 (ELabScience, USA, USA)로 측정하였고, 세로토닌 농도는 세로토닌 ELISA 키트 (Abcam, ab133053, 대한민국)로 측정 하였다.

[0074] 면역 글로불린 (IgG, IgM 및 IgA)의 총 농도는 마우스 Ig ELISA 키트 (Abcam, 대한민국)에 의해 희석 된 혈청으로부터 측정되었다. 전체 실험 절차에서, 실험 랫트의 체중은 1 일, 5 일 및 8 일에 동시에 측정되었다. 모든 실험은 오후 1시 사이에 수행되었다. 오후 4시 분석 전에 12 시간 동안 금식시켰다. 생체 내 실험을 위한 실험 절차 및 타임 라인이 도 2에 나와 있다.

[0075] RNA 분리 및 실시간 PCR:

[0076] 요약하면, hMSC를 60 × 15 mm 배양 접시에 시딩하고 5 %에서 10 % FBS 및 1 % 항생제-항진균제로 보충된 DMEM 배지에서 7 일과 14 일 동안 37 ℃에서 CO2 % 조건에서 배양하였다.

[0077] 제조업체의 지침에 따라 TRIzol® 시약(Thermo-Fischer Scientific, USA)으로 총 RNA를 추출했다. 3 ㎍의 전체 RNA를 역전사 효소(Superscript II RTase; Invitrogen, MD, Gaithersburg, MD) 및 SYBR Green Master Mix (Bio-Rad, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하는데 사용하였다. cDNA 합성은 고속 가열 냉각 시스템 (Dai-Bath Heating System, 대한 사이언티픽 (주), 한국)을 사용하여 수행하였다.

[0078] mRNA- 발현은 Bio-Rad 실시간 시스템 (CFX96TM Maestro Real-Time System, Bio-Rad, USA)을 사용하여 qRT-PCR에 의해 정량화되었다. 반응 조건은 95 ℃에서 15 초 동안 39 사이클의 변성, 60 ℃에서 1 분 증폭을 포함했다. 모든 반응을 3 회 반복하고 하우스 키핑 유전자 β- 액틴으로 정규화하였다.

[0079] 대조군 및 RBS 처리 군의 유전자 발현 수준을 연구하기 위해,주기 임계 값을 계산하고 비교하였다. 대조군 hMSC

및 처리된 세포에서의 상대 mRNA 발현을 히스토그램으로 분석하였다. 구체적인 프라이머 세트 (예 : β- 액틴, 5HTT, 5HT-1B 및 MAO-A)는 표 1에 나열되어 있다. 모든 프라이머는 BIONEER® Inc. (대전, 대한민국)에 의해 합성되었다.

[0080] 본 발명의 모든 통계 분석은 Origin Pro 9.0 소프트웨어 (Origin Pro v9.0, Origin Lab Corp., Massachusetts, USA)를 사용하여 상이한 그룹들간에 유의한 차이를 결정하기 위해 일원 분산 분석에 의해 수행되었다. 데이터는 3 회 실험의 평균 ± 표준 편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 * p <0.05로 간주되었다.

표 1

[0082]

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
β-actin	GCGCAAGTACTCTGTGTGGA	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC
5-HTT	TCTGAAAAGCCCCACTGGACT	TAGGACCGTGTCTTCATCAGGC
5-HT-1B	TGGCGTCAAGCCAAAGCGGA	AACTGGGCTCGGGTCAAGCG
MAO-A	GGAGAAGCCCAATCTCGCAGGC	GGGAATGCACCACGGAATGGGT

[0083] 표 1은 실시간 polymerase chain reaction (qRT-PCR)에 사용된 특정 유전자 프라이머에 대한 표로,

[0084] 약어는 β-*actin*: cytoskeleton β-protein; *5-HTT*: 5-hydroxytryptamine transporter; *5-HT-1*$_B$: 5-hydroxytryptamine receptor 1B; *MAO-A*: monoamine oxidase A

[0085] 상기 실시예의 결과를 하기에서 기재한다.

[0086] <u>GABA 및/또는 β- 글루칸 함량의 정량:</u>

[0087] GABA (C4H9NO2)는 광범위하게 분포된 아미노산이며 과일, 채소 및 섬유와 같은 다른 식품의 주요 공급원이다.

[0088] 본 발명의 RB 추출물로부터 수득된 GABA의 상대 함량을 정량화하고 표 2에 제공한다.

[0089] 또한 본 발명의 쌀겨 및 S. 아스프라투스 조성물로부터 수득된 GABA 및 β- 글루칸의 상대 함량을 정량화하고 표 3에 제공하였다.

[0090] 조성물에서 RB 함량이 증가함에 따라 GABA 및 β- 글루칸의 농도가 증가한 다 RB와 S. aspratus. 7 : 3 혼합물에서 GABA 및 β-글루칸의 상대 함량은 각각 0.05 ± 0.01 % (w / w) 및 1.87 ± 0.06 % (w / w)였다. 따라서 RB : S. 아스프라 투스 혼합물(7 : 3)에 RB의 첨가는 GABA뿐만 아니라 β- 글루칸의 농도를 증가시켰다.

표 2

[0091]

RB (w/w)	GABA (%)
50 mg/kg	0.005 ± 0.01
100 mg/kg	0.03 ± 0.00
200 mg/kg	0.05 ± 0.01

[0092] 표 2는 3 가지 상이한 농도의 RB 추출물에서의 γ-아미노부티르산 (GABA) 함량을 나타낸 표로, 표시된 모든 데이터는 3 회 실험의 평균±SD임.

표 3

[0094]

RBS (w/w)	β-glucan (%)	GABA (%)
3 : 7	1.45 ± 0.01	N.D.[§]
5 : 5	1.56 ± 0.09	0.03 ± 0.00
7 : 3	1.87 ± 0.06	0.05 ± 0.01

[0095] 표 3은 본 발명의 RBS 조성물의 세 가지 다른 혼합물에서 베타- 글루칸 및 γ-아미노 부티르산 (GABA) 함량을 나타낸 표로, 표시된 모든 데이터는 3 회 실험의 평균 ± SD이고, § N.D. = 결정 안됨

[0096] 세포 독성 평가:

[0097] 처리된 (50 ㎍, 100 ㎍, 150 ㎍, 200 ㎍ 및 300 ㎍ / mL) hMSC의 세포 독성을 WST-1 분석에 의해 평가하였고, 도 10b에 도시하였다. 배양 5 일 후 대조군과 비교하여 모든 처리 군에서 세포 생존율이 증가한 것으로 나타났다. 그러나, 생존 세포의 최대 수는 150 ㎍/mL (* p <0.05)의 존재 하에서 발견되었으며, 더 높은 농도의 추출물에서도 그들의 생체 적합성을 나타낸다. 따라서, RB 추출물은 상업적 GABA보다 세포 증식을 유도할 수 있으며 향후 기능성 식품 또는 약물로 개발 될 수 있다고 제안된다.

[0098] 또한 처리된 (RBS = 3 : 7; 5 : 5 및 7 : 3) hMSC의 세포 독성은 WST-1 분석에 의해 평가되었고,도 3에 도시되어있다.

[0099] 본 발명의 혼합 조성물의 농도는 동결 건조된 분말을 삼중 증류수에 용해시켜 50 ㎍/mL 및 100 ㎍/mL로 설정되었다.

[0100] 24 시간의 인큐베이션 후 대조군과 비교하여 모든 처리 군에서 세포 생존율이 증가한 것으로 나타났다. 그러나, 7:3으로 처리된 그룹(100 mg / mL)의 존재하에 생존 세포의 최대 수 (113.7 %)를 얻었으며, 이는 더 높은 농도의 조성물에서도 그들의 생체 적합성을 나타낸다.

[0101] 상업적 GABA 및 RB의 존재하에 세포 생존도 또한 평가되었고 도 7에 제시되어있다. 두 경우 모두, GABA (200 ㎍ / mL 및 300 ㎍ / mL) 및 RB(150 μg / mL) 처리 군 둘 모두에서 5 일의 배양 후 향상된 세포 증식이 관찰되었다. 따라서, 본 발명의 혼합된 RBS 조성물 (7 : 3)은 RB 또는 GABA 단독의 것보다 세포 증식을 유도 할 수 있고 기능성 식품 또는 약물로 개발될 수 있다고 제안된다.

[0102] 혈청 세로토닌 및 멜라토닌 농도에 대한 본 발명의 추출물 및 조성물의 효과:

[0103] 수면은 진화 적으로 보존 된 행동 상태이며 포유류에서 생물학적 시계의 중요한 조절인자 중 하나이다. 세로토닌 또는 5-하이드록시트립타민 (5-HT)은 중추 (CNS)와 말초 신경계 (PNS)에 분포된 세포 외 다기능 신호 전달 분자이다.

[0104] 멜라토닌은 뇌 중앙 근처의 시상 부에 위치한 송과선에 의해 분비되는 호르몬의 한 유형이다. 송과선은 세로토닌과 멜라토닌을 생성하고 신경 내분비 경로를 통해 분비되는데, 이는 인간을 포함한 일주 척추 동물의 수면 패턴을 조절한다.

[0105] 상기 본 발명의 RB 추출물(50 mg/kg, 100 mg/kg 및 200 mg/kg)과 GRB 추출물의 경구 투여 후 쥐의 체중 변화 (34.54 ± 0.08 g) 및 일일 음식 섭취량은 다른 시간 간격으로 도 7b-c 및 도 8a에 나타내었다. 처리를 받지 않은 래트 그룹은 음성 대조군으로 간주되었다. 8 일의 투여 후 대조군과 처리 군간에 유의 한 체중 차가 관찰되지 않았다.

[0106] 또한 여러 시간 간격으로 본 발명의 조성물 (3:7, 5:5 및 7:3)의 경구 투여 후 래트 (34.54 ± 0.08 g)의 체중 변화와 관련하여 처리하지 않은 랫트 그룹을 음성 대조군으로 간주되었다. 8 일의 투여 후 대조군과 처리군간에 유의한 체중 차이가 관찰되지 않았다.

[0107] 혈청 내 세로토닌 및 멜라토닌 농도를 ELISA 키트로 정량하여 수면 유도를 위한 본 발명의 RB 추출물 및 RB 추출물과 S. 아스프라투스 혼합물의 역할을 평가했다. 양성 대조군은 발레리아나 오베날리스 (Valriana officinalis)에서 추출한 천연 물질인 발레리아또는 GABA로 처리하였다.

[0108] RB 및 GRB 추출물로 처리된 래트 그룹의 혈청에서 세로토닌 및 멜라토닌 농도는도 7d-e 및 도 8c-d에 제공된다. 대조군의 혈청 내 세로토닌 농도는 각각 11.9±0.60 ㎍/mL (음성 대조군) 및 13.4±0.55 ㎍/mL (양성 대조군)로 측정되었다.

[0109] 투여 8 일 후 50 mg/kg, 100 mg/kg 및 200 mg/kg 존재시 혈청 내 세로토닌 농도는 12.93 ± 0.32 μg/mL, 12.12 μg/mL 및 11.96 ± 0.28 μg / mL로 계산되었고 이것은 세로토닌 수준의 현저한 감소가 없음을 시사한다 (* p <0.05). 그러나, 멜라토닌 농도의 현저한 증가가 RB 처리 된 그룹 (50 mg/kg)의 존재에서 관찰되었다.

[0110] 본 발명의 결과 쥐의 피하 투여하는 동안 RB의 추가는 수면 승진 관련 호르몬 생산에 영향을 준다는 것을 시사한다. 따라서, 본 발명의 쌀겨 추출물 및 7 : 3 혼합비를 갖는 본 발명의 RBS 조성물이 항우울제 및 수면 유도

제로서 사용되는 것이 제안된다.

[0111] 면역글로불린 (IgG, IgA, IgM) 농도에 대한 본 발명의 조성물의 효과 :

[0112] 면역글로불린(Igs)은 전염병에 대한 면역 반응에서 중요한 역할을 한다. Ig는 특정 항체가 항원을 인식할 때 체액성 면역 반응을 유도한다. 면역글로불린 G (IgG), 면역글로불린 A (IgA) 및 면역글로불린 M (IgM)은 많은 체액성 면역 반응에 주로 관여하며 이펙터 분자와 강하게 상호 작용하는 Ig의 이소 타입이다. IgG, IgA 또는 IgM은 능동 방어 반응 동안 단핵구, 대식세포, 호중구 및 기타 면역 세포와 같은 식세포와 관련이 있다.

[0113] 본 발명에서, 본 발명자들은 총 혈청 Ig (IgG, IgA 및 IgM) 레벨에서 본 발명의 RB 추출물과 RB : S. 아스프라투스 혼합 조성물의 역할을 평가하였다. 경구 섭취 8 일 후, 혈청 Ig 수준을 마우스 Ig ELISA 키트로 측정하고, 유의한 차이를 계산하고 대조군과 비교하였다 (도 9 및 10).

[0114] 본 발명의 결과는 100 mg/kg RB 추출물 복용 후 혈청 Igs의 증가 수준이 최대이었고, 이것은 쥐 Ig의 면역 증강에 작용을 한다는 것을 나타낸다. 종합하면, RB 보충제의 적용은 쥐의 선천적인 면역 반응뿐만 아니라 수면을 효과적으로 증가시킬 수 있다.

[0115] 또한 혈청 IgG 및 IgA 수준은 5:5 RBS 급여 후 대조군과 비교하여 유의미하게 증가하였고 7.5 ± 2 mg / mL (* p <0.05) 및 2.2 ± 2 μg / mL(* p <0.05)로 계산되었다.

[0116] 그러나 도 10에 표시된 것과 같이. 그러나, 대조군 및 다른 군과 비교하여 혈청에서 IgA 수준(1.8 mg / mL, * p <0.01)에서 유의미한 감소 (각각 -0.3 및 14.29 %)는 없었다.

[0117] 본 발명의 결과는 혈청 Igs의 증가된 수준은 본 발명의 조성물의 5:5 RB:S. aspratus의 조성비에서 최대를 나타내었고, 이것은 Ig의 면역증강 활성과 관련하여 본 발명의 조성물의 최적 조건을 알 수 있었다.

[0118] 유전자 발현 및 GABA- 유도된 세로토닌 신호 전달:

[0119] 5-HT는 수면/각성 주기, 온도 조절, 운동, 음식 습관, 혈액 응고 및 심혈관 항상성과 같은 다양한 생리 기능을 나타내는 모노아민 신경 전달 물질이다.

[0120] 5-HT는 주로 G-단백질-결합 막 통과 수용체 (GPCR)를 통해 말초 기관에 작용한다. 장에서 합성된 5-HT는 혈액-뇌 장벽 (BBB)을 통과할 수 없기 때문에 기능면에서 독립적이다. 세포질 막을 통한 5-HT 수송은 5-HT 수송체 (5HTT) 또는 세로토닌 수송체 (SERT)에 의해 매개된다.

[0121] 본 발명에서, 정량적 실시간 중합 효소 연쇄 반응에 의해 5 일 및 10 일 후 RB 보충제(150 ㎍/mL)의 존재하에 세로토닌 성 유전자 발현(5HTT, 5HT1B 및 MAO-A)을 평가하였으며, 이것을 도 6c-e에 제시되어있다.

[0122] 또한 본 발명에서, 본 발명자들은 정량 실시간 중합 효소 연쇄 반응에 의해 5 일 및 10 일 후 본 발명의 RBS 조성물(7 : 3 조성비)의 존재하에 세로토닌 관련 유전자 발현(5HTT, 5HT1B 및 MAO-A)을 평가하였으며,도 11에 나타내었다.

[0123] 세로토닌 관련 유전자(5HTT, 5HT1B 및 MAO-A)가 또한 대조군 세트에서 발현되었다. 그러나, 5HTT 및 MAO-A 유전자의 발현은 배양 10 일 후 본 발명의 조성물의 존재 하에서 더 높았다. MAO-A의 유전자 발현은 5HT1B의 발현을 제외하고 대조군보다 ~ 0.42 (50 ㎍ / mL) 및 ~ 1.6 (100 ㎍ / mL) 배 높았다는 점에 주목할 만하다.

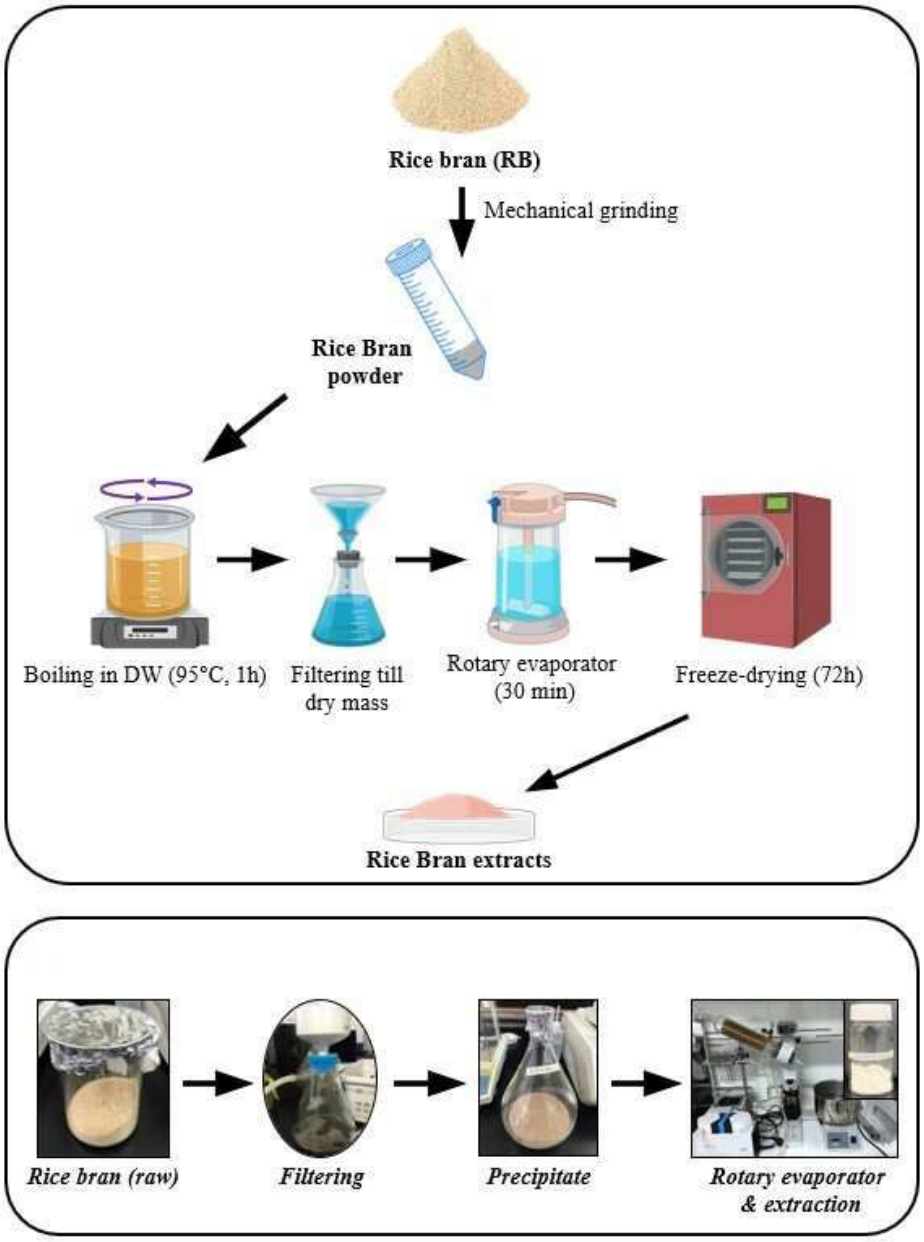
[0124] 수면은 세로토닌과 멜라토닌이라는 두 가지 주요 신경 호르몬의 높은 수준에 의해 조절되는 복잡한 생리학적 과정이다. CNS에서, 5-HT는 세로토닌 관련 뉴런에 의해 5- 하이드록시트립토판 (5-HTP)을 통해 트립토판으로부터 합성된다. 세로토닌의 증가된 수준은 모노아민 산화효소 (MAO)에 의해 조절된다. 5-HT 수준의 증가는 MAO 단백질의 합성을 초래하는 MAO mRNA의 전사를 유발한다. 이어서 5-HT를 MAO에 의해 5-하이드록시인돌아세트산 (5-HIAA)으로 이화시킨다. 5-HIAA는 소포에 저장되거나 5HT1B (rat) 5HT1B / 1D (human) 수송 체에 의해 방출된다.

[0125] 본 발명의 결과 MSCs 외인 GABA 응용 프로그램 MAO A 유전자의 전사를 직접 조절하는 것이 좋다. 본 발명의 RBS 조성물로 유도된 세로토닌 신호 전달을 보여주는 가상 모델이 도 5에 나타내었다.

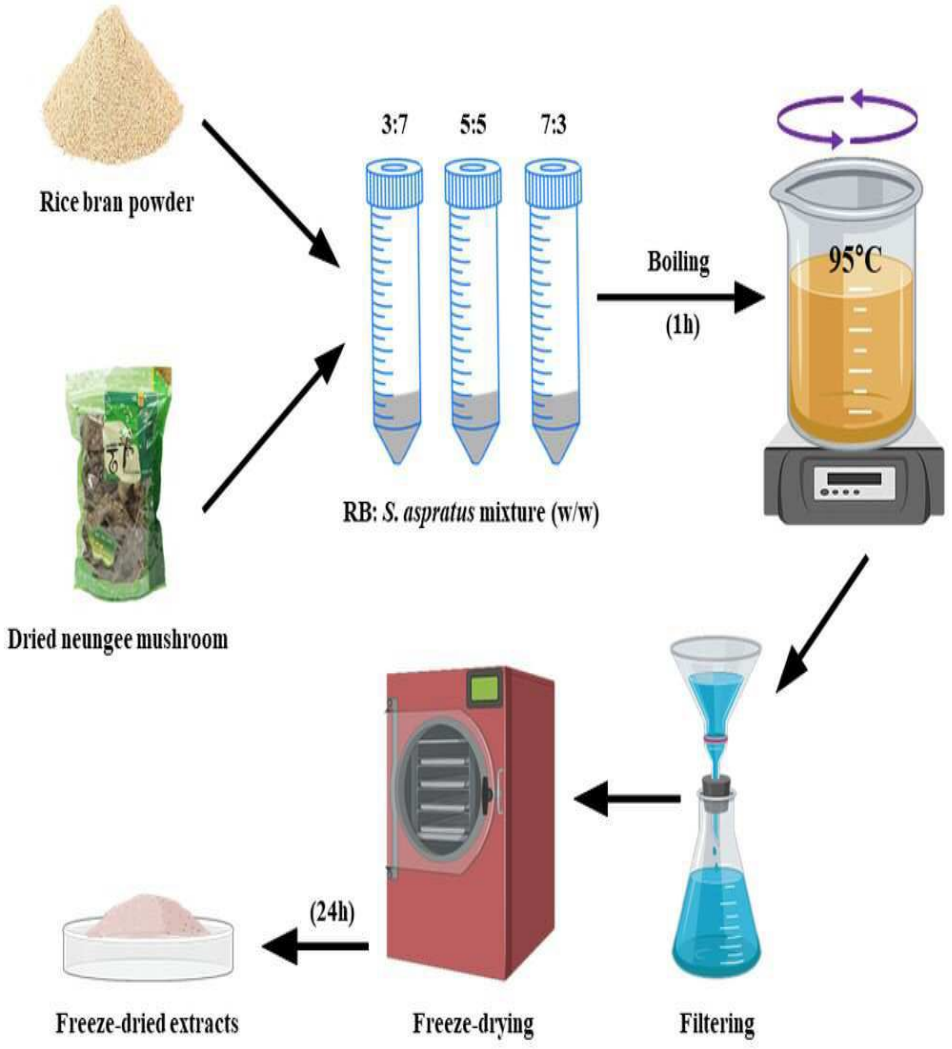
도면

도면1a

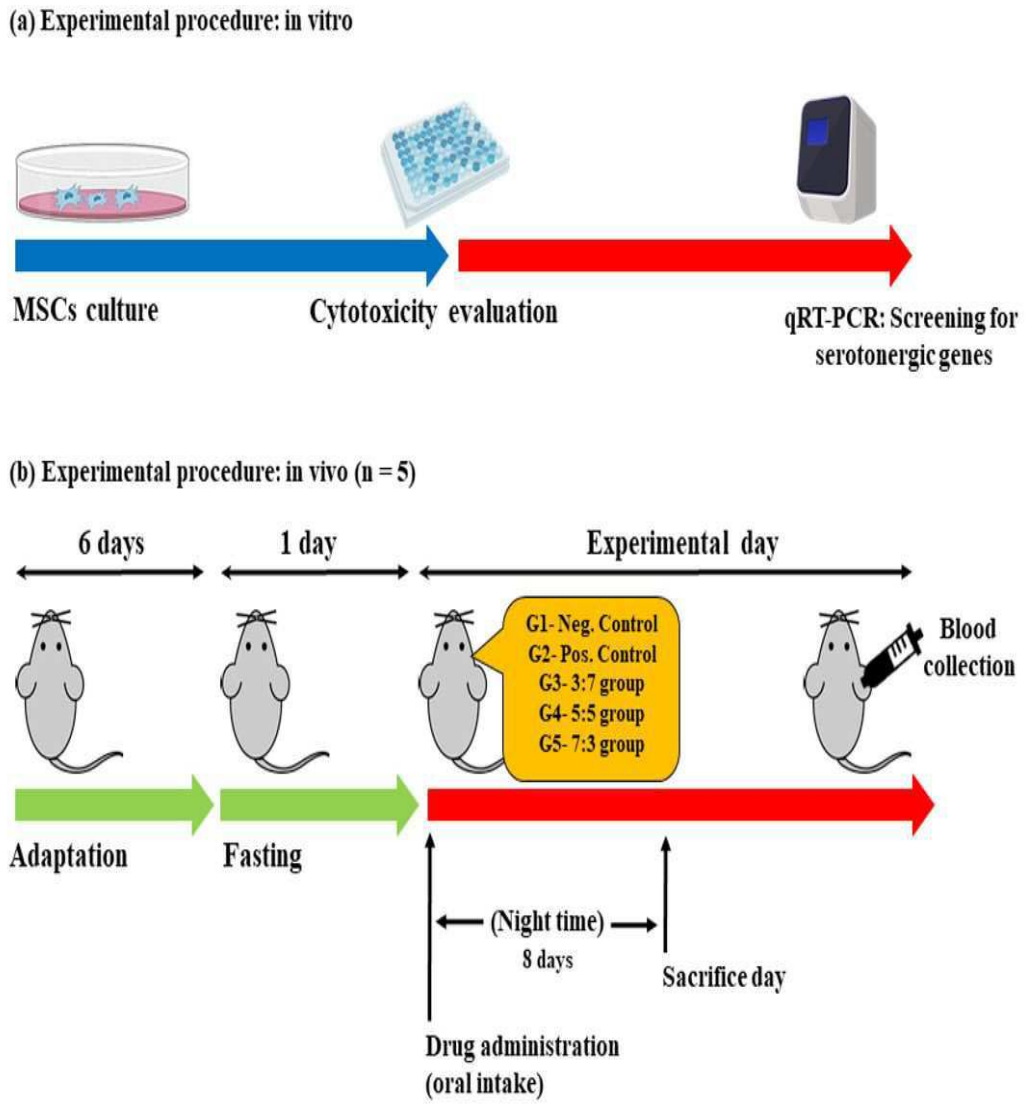
Rice Bran



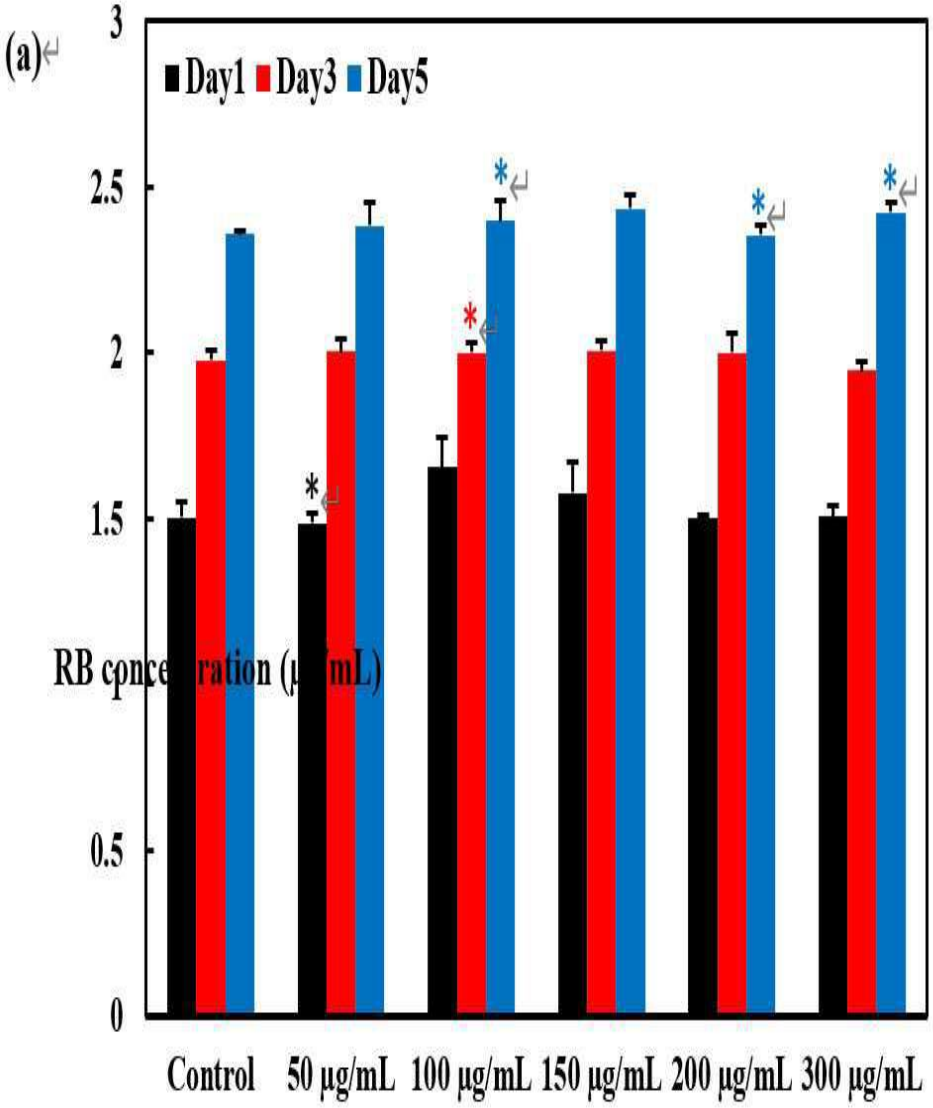
도면1b


Rice bran powder
Dried neungee mushroom
3:7
5:5
7:3
RB: S. aspratus mixture (w/w)
Boiling
(1h)
95°C
Filtering
Freeze-drying
(24h)
Freeze-dried extracts

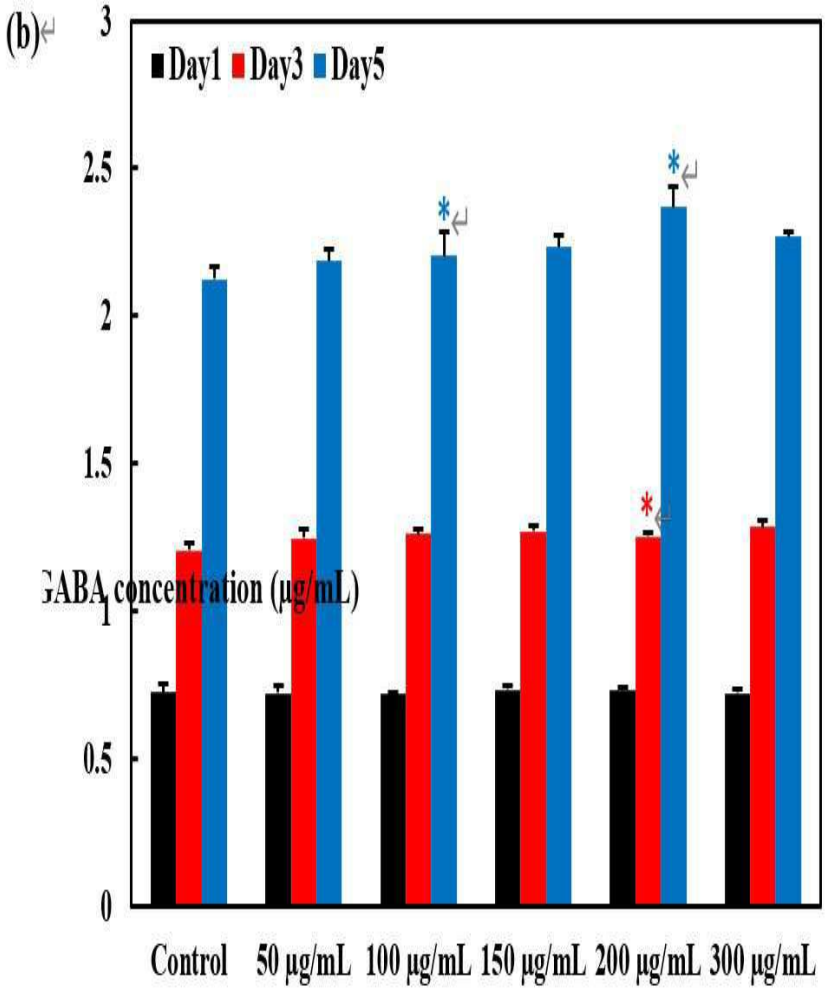
도면2


(a) Experimental procedure: in vitro
MSCs culture
Cytotoxicity evaluation
qRT-PCR: Screening for serotonergic genes
(b) Experimental procedure: in vivo (n = 5)
6 days
1 day
Experimental day
G1- Neg. Control
G2- Pos. Control
G3- 3:7 group
G4- 5:5 group
G5- 7:3 group
Blood collection
Adaptation
Fasting
(Night time)
8 days
Sacrifice day
Drug administration
(oral intake)

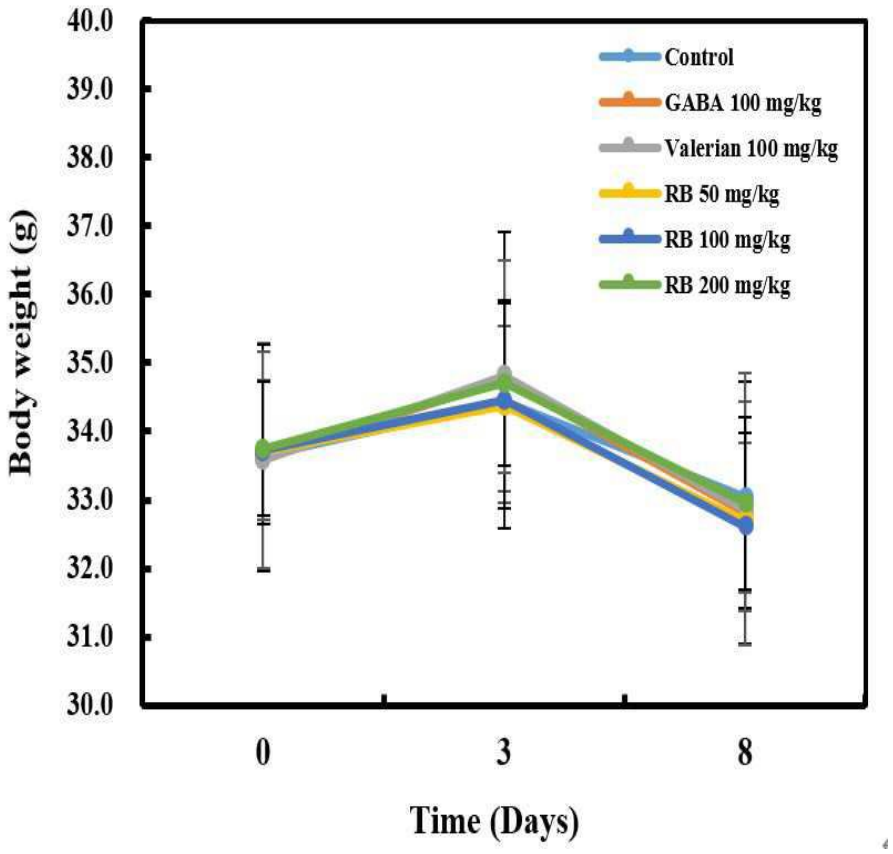
도면3a


(a)
Day1
Day3
Day5
3
2.5
2
1.5
0.5
0
Control
50 μg/mL
100 μg/mL
150 μg/mL
200 μg/mL
300 μg/mL

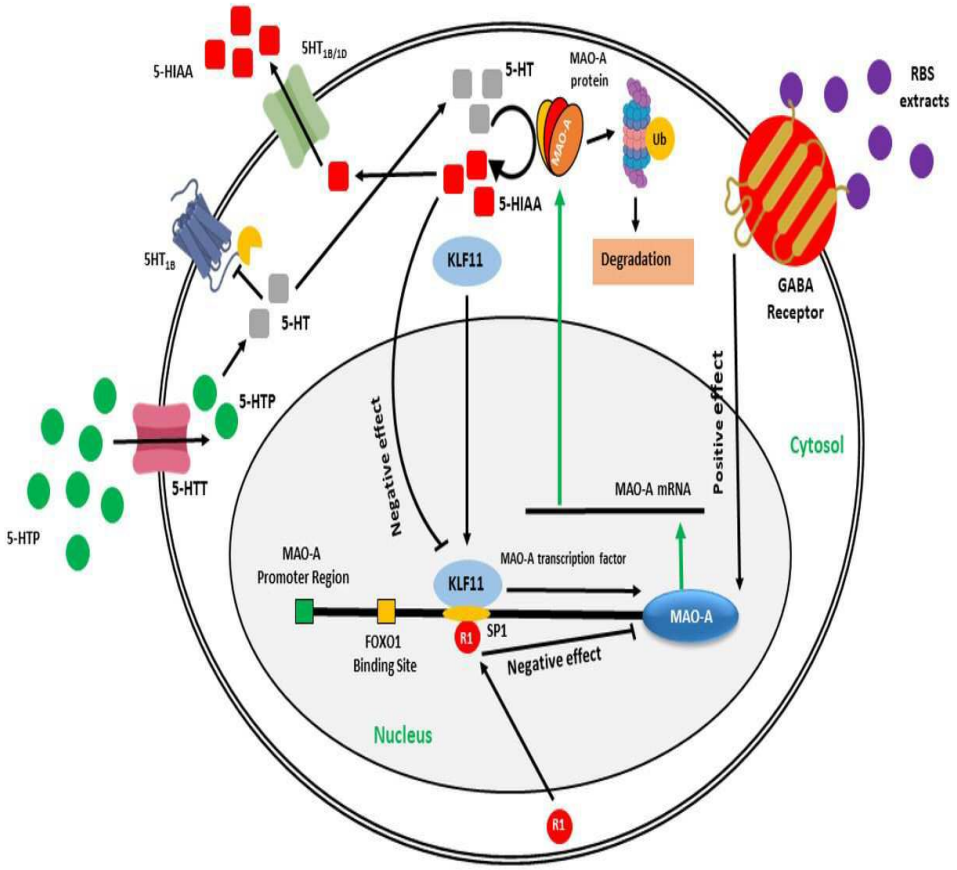
도면3b


(b)
Day1
Day3
Day5
GABA concentration (μg/mL)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Control
50 μg/mL
100 μg/mL
150 μg/mL
200 μg/mL
300 μg/mL

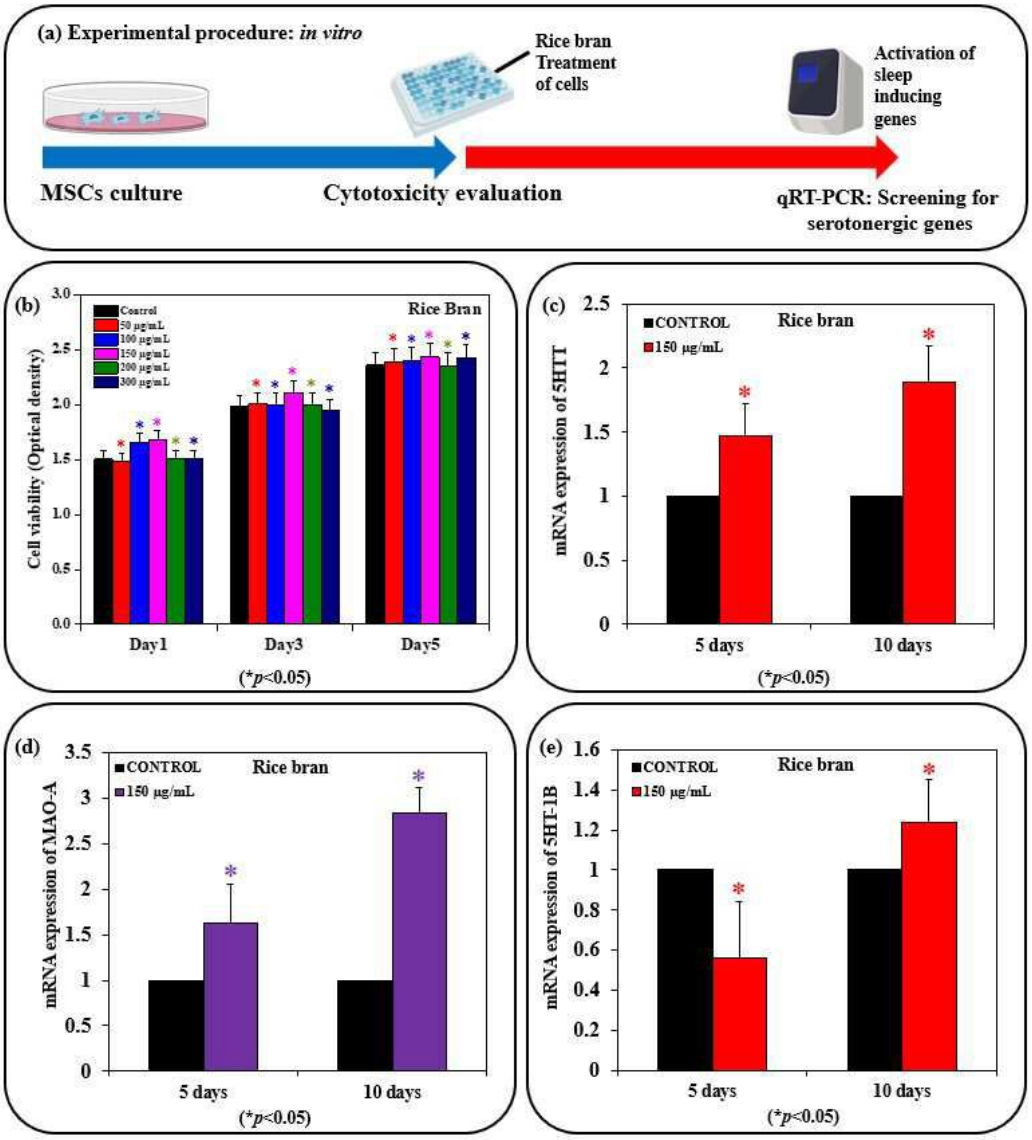
도면4


40.0
39.0
38.0
37.0
36.0
35.0
34.0
33.0
32.0
31.0
30.0
Body weight (g)
Control
GABA 100 mg/kg
Valerian 100 mg/kg
RB 50 mg/kg
RB 100 mg/kg
RB 200 mg/kg
0
3
8
Time (Days)

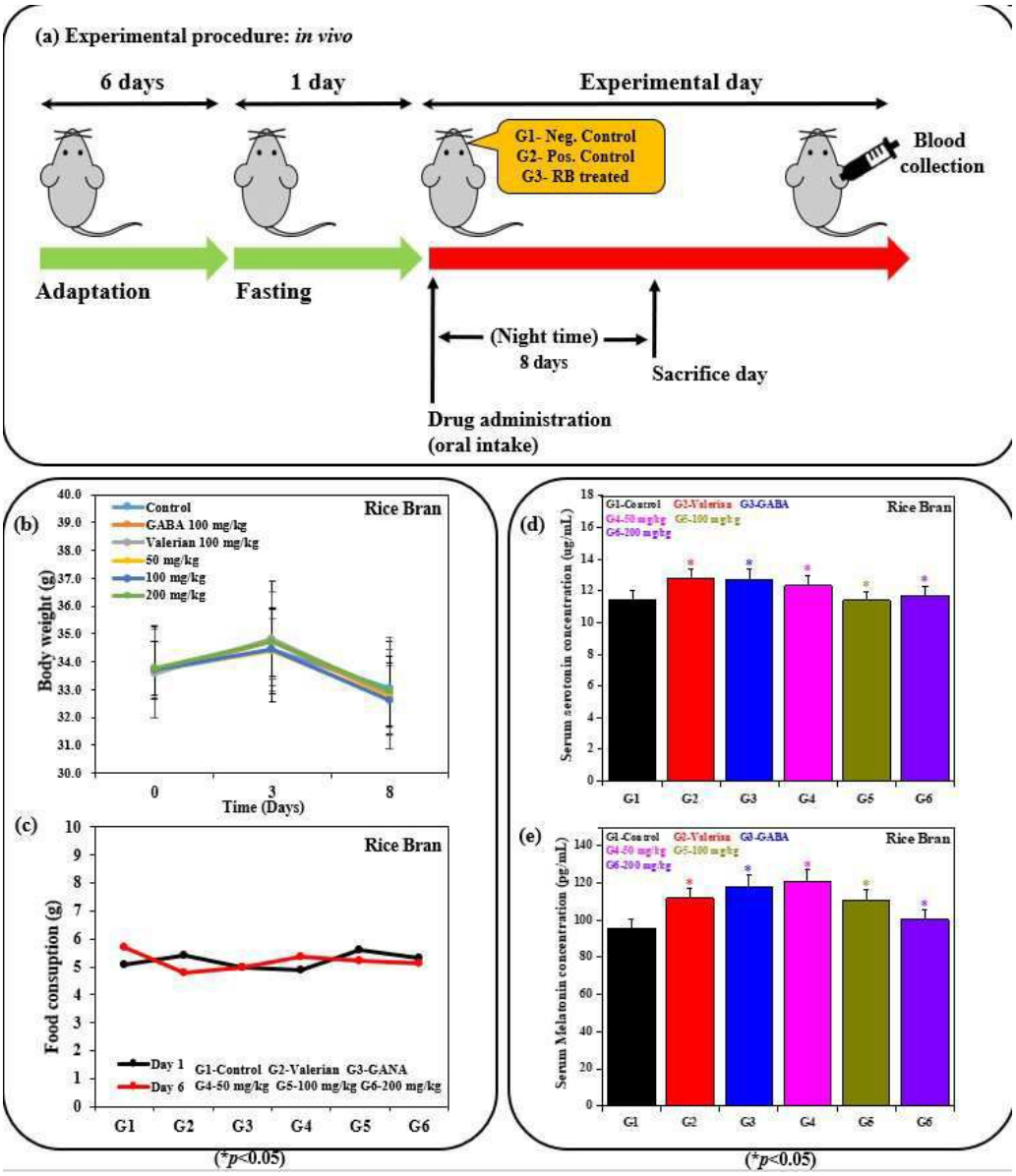
도면5


5-HIAA
5HT1B/1D
5-HT
MAO-A protein
MAO-A
Ub
RBS extracts
5-HIAA
5HT1B
KLF11
Degradation
GABA Receptor
5-HT
5-HTP
Negative effect
Positive effect
Cytosol
5-HTT
MAO-A mRNA
5-HTP
MAO-A Promoter Region
MAO-A transcription factor
KLF11
MAO-A
FOXO1 Binding Site
R1
SP1
Negative effect
Nucleus
R1

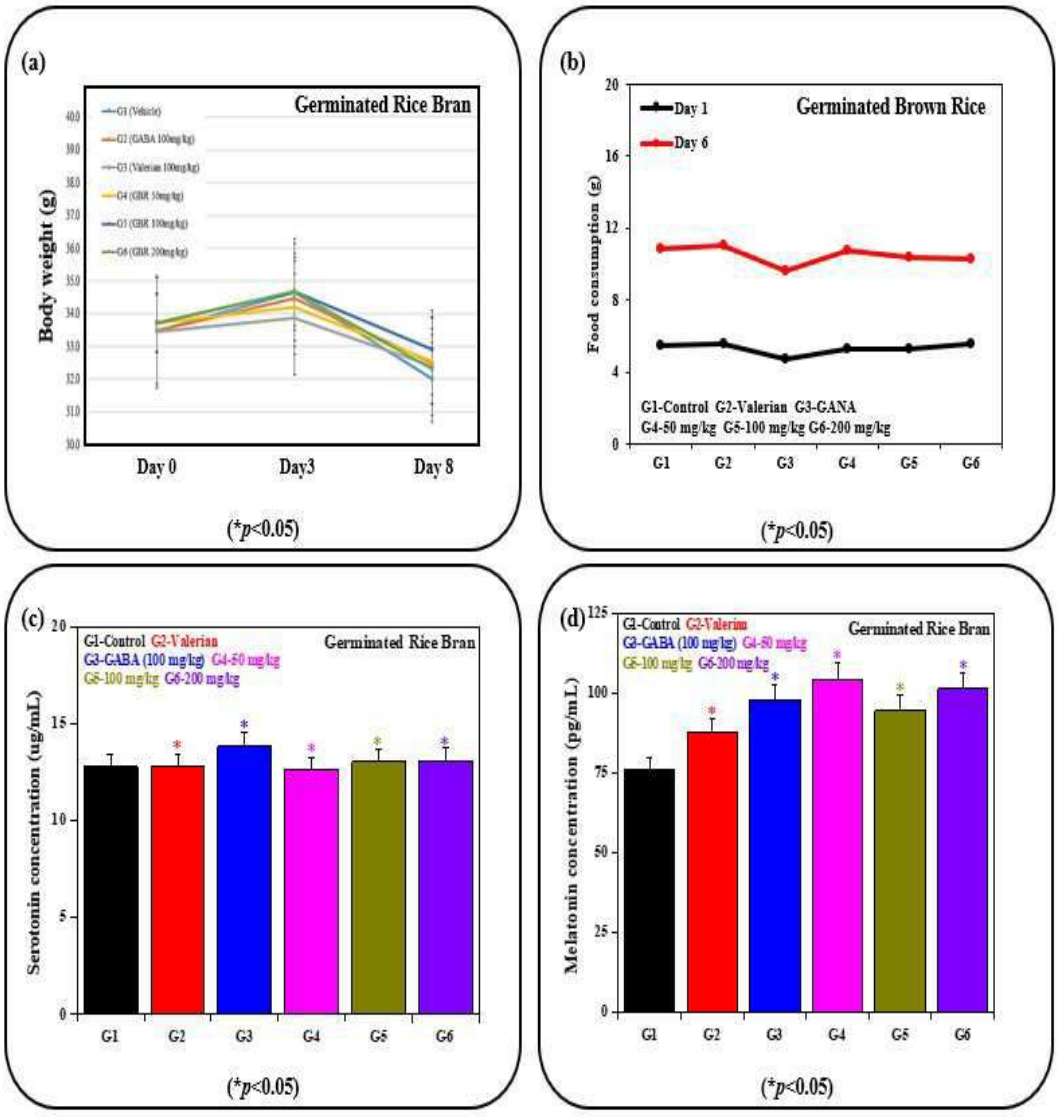
도면6


(a) Experimental procedure: in vitro
Rice bran Treatment of cells
Activation of sleep inducing genes
MSCs culture
Cytotoxicity evaluation
qRT-PCR: Screening for serotonergic genes
(b)
Rice Bran
Control
50 μg/mL
100 μg/mL
150 μg/mL
200 μg/mL
300 μg/mL
Cell viability (Optical density)
Day1
Day3
Day5
(*p<0.05)
(c)
Rice bran
CONTROL
150 μg/mL
mRNA expression of 5HTT
5 days
10 days
(*p<0.05)
(d)
Rice bran
CONTROL
150 μg/mL
mRNA expression of MAO-A
5 days
10 days
(*p<0.05)
(e)
Rice bran
CONTROL
150 μg/mL
mRNA expression of 5HT-1B
5 days
10 days
(*p<0.05)

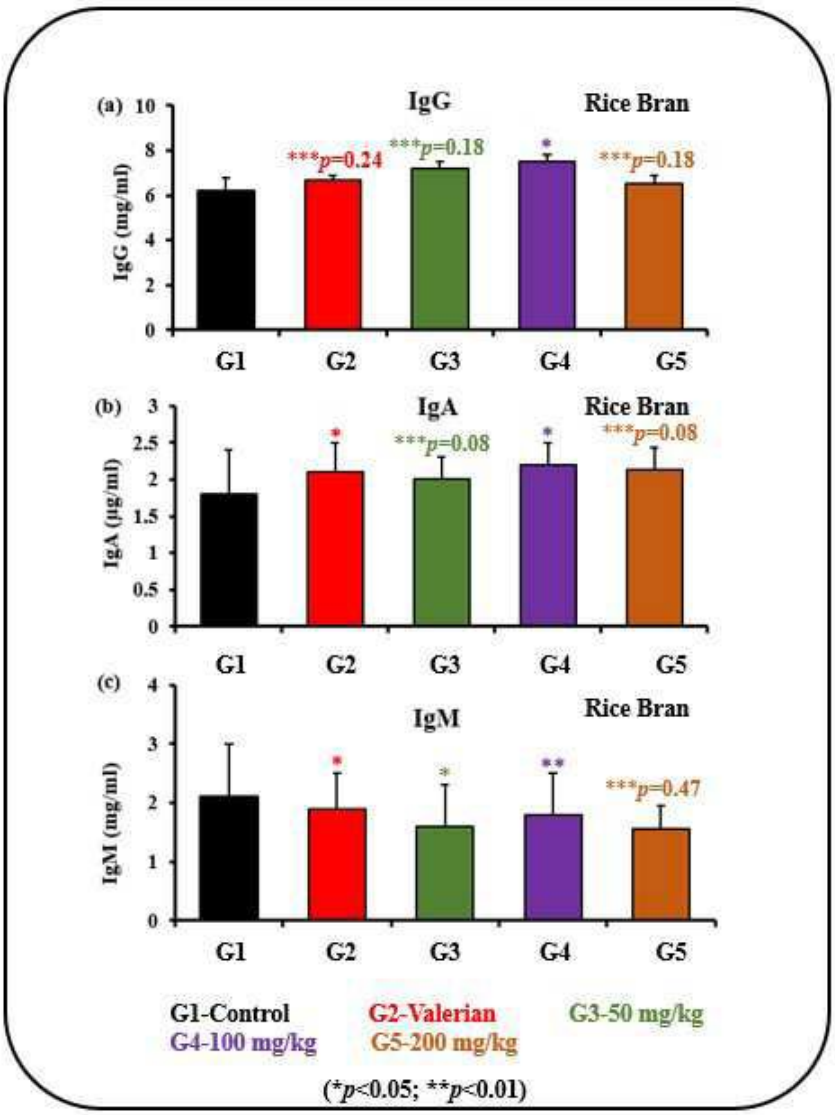
도면7


(a) Experimental procedure: in vivo
6 days
1 day
Experimental day
G1- Neg. Control
G2- Pos. Control
G3- RB treated
Blood collection
Adaptation
Fasting
(Night time)
8 days
Sacrifice day
Drug administration
(oral intake)
(b)
Rice Bran
Control
GABA 100 mg/kg
Valerian 100 mg/kg
50 mg/kg
100 mg/kg
200 mg/kg
Body weight (g)
Time (Days)
(c)
Rice Bran
Food consuption (g)
Day 1
Day 6
G1-Control G2-Valerian G3-GANA
G4-50 mg/kg G5-100 mg/kg G6-200 mg/kg
(*p<0.05)
(d)
Rice Bran
Serum serotonin concentration (ug/mL)
(e)
Rice Bran
Serum Melatonin concentration (pg/mL)
(*p<0.05)

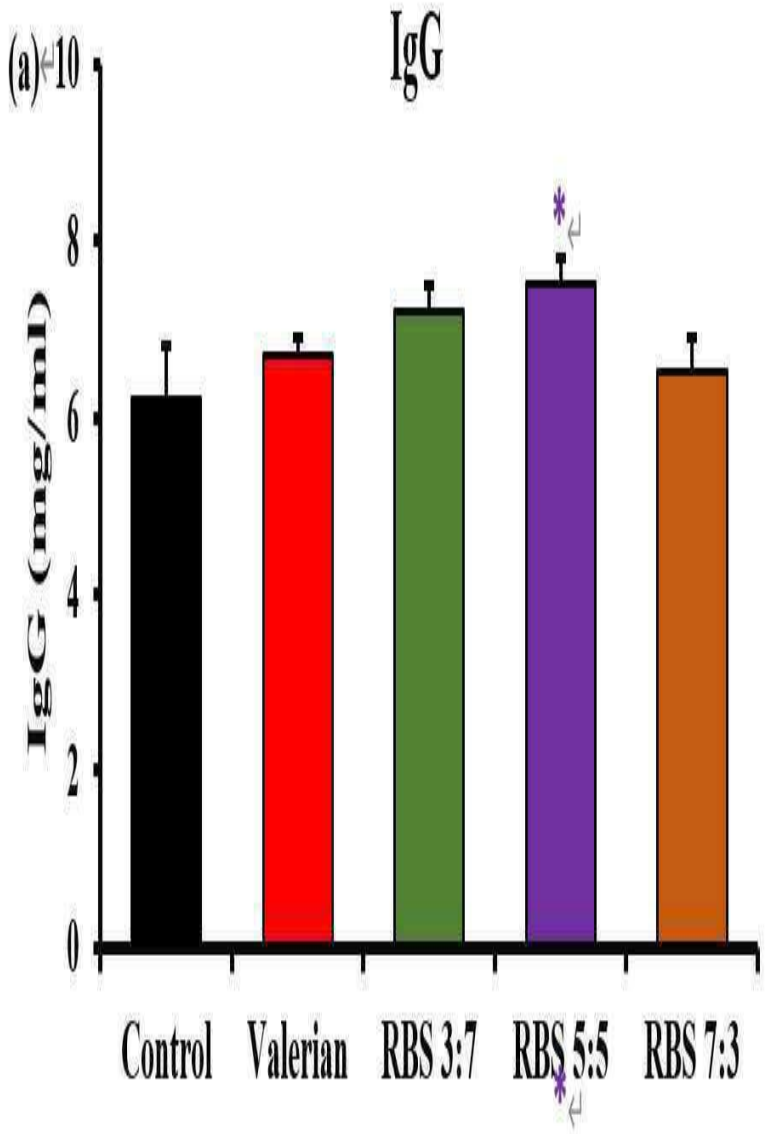
도면8


(a)
Germinated Rice Bran
Body weight (g)
Day 0
Day3
Day 8
(*p<0.05)
(b)
Germinated Brown Rice
Day 1
Day 6
Food consumption (g)
G1-Control G2-Valerian G3-GANA
G4-50 mg/kg G5-100 mg/kg G6-200 mg/kg
G1
G2
G3
G4
G5
G6
(*p<0.05)
(c)
G1-Control G2-Valerian
G3-GABA (100 mg/kg) G4-50 mg/kg
G5-100 mg/kg G6-200 mg/kg
Germinated Rice Bran
Serotonin concentration (ug/mL)
(*p<0.05)
(d)
G1-Control G2-Valerian
G3-GABA (100 mg/kg) G4-50 mg/kg
G5-100 mg/kg G6-200 mg/kg
Germinated Rice Bran
Melatonin concentration (pg/mL)
(*p<0.05)

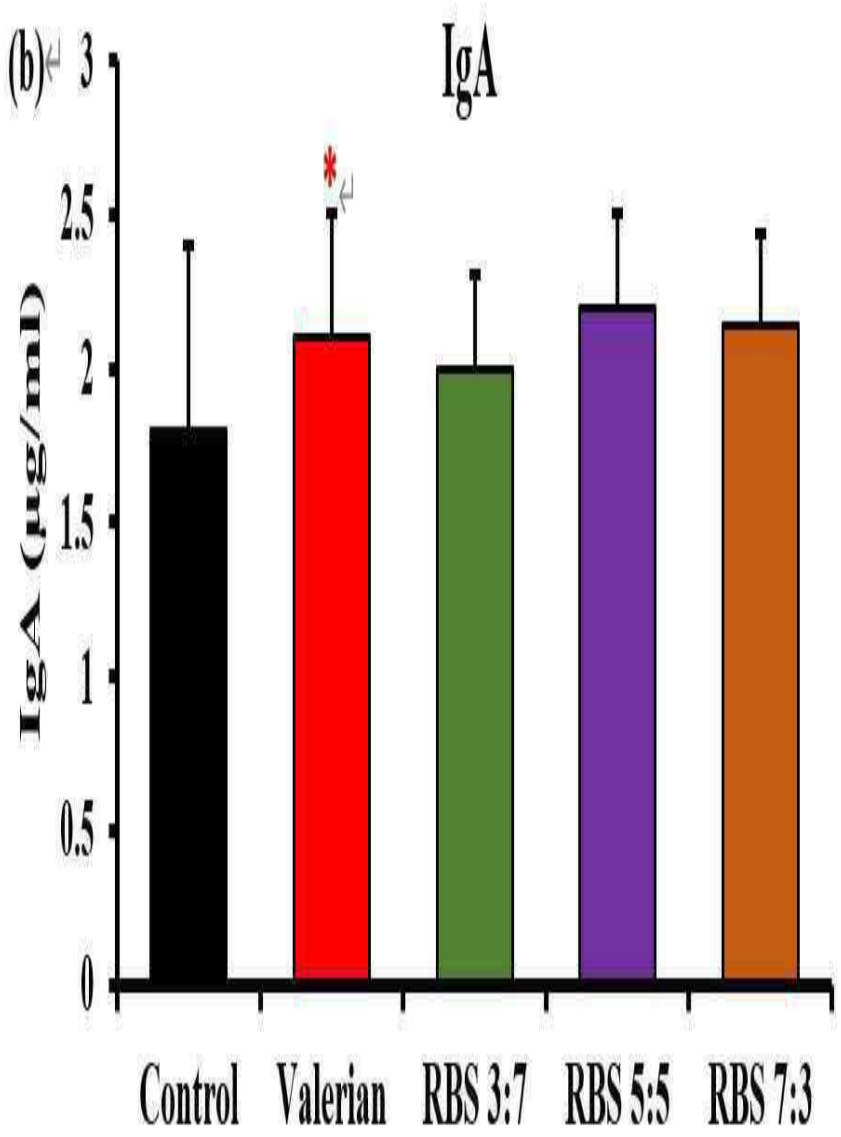
도면9


(a)
IgG
Rice Bran
IgG (mg/ml)
***p=0.24
***p=0.18
*
***p=0.18
G1
G2
G3
G4
G5
(b)
IgA
Rice Bran
IgA (μg/ml)
*
***p=0.08
*
***p=0.08
G1
G2
G3
G4
G5
(c)
IgM
Rice Bran
IgM (mg/ml)
*
*
**
***p=0.47
G1
G2
G3
G4
G5
G1-Control
G2-Valerian
G3-50 mg/kg
G4-100 mg/kg
G5-200 mg/kg
(*p<0.05; **p<0.01)

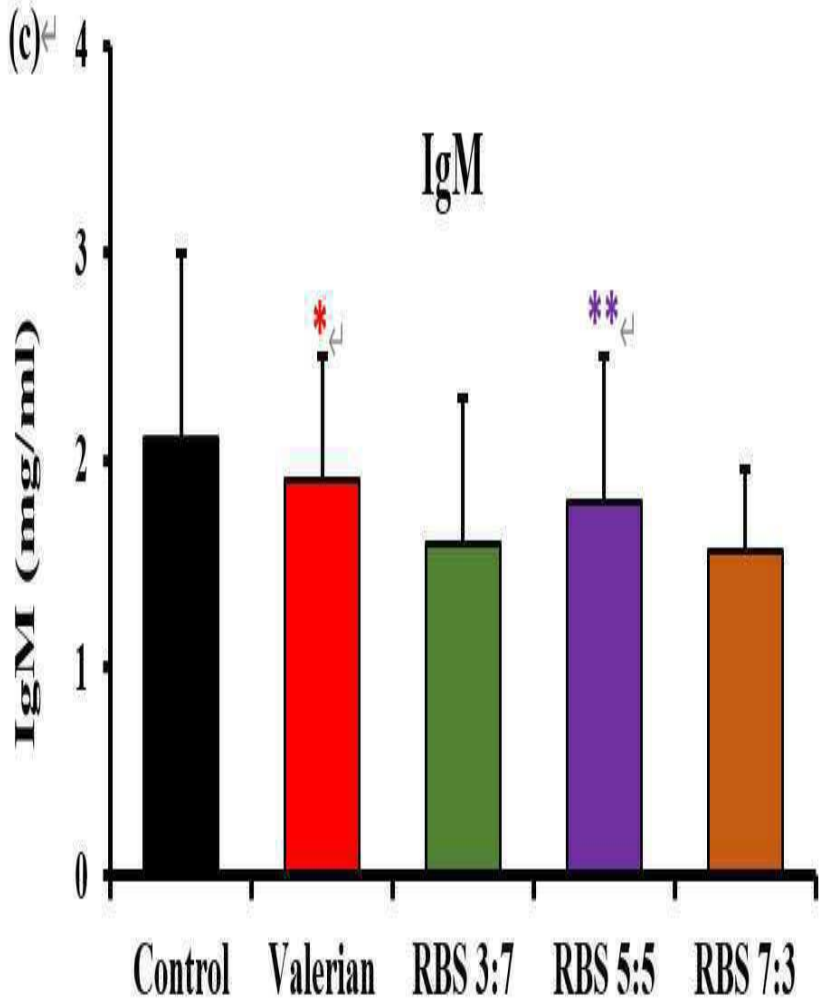
도면10a



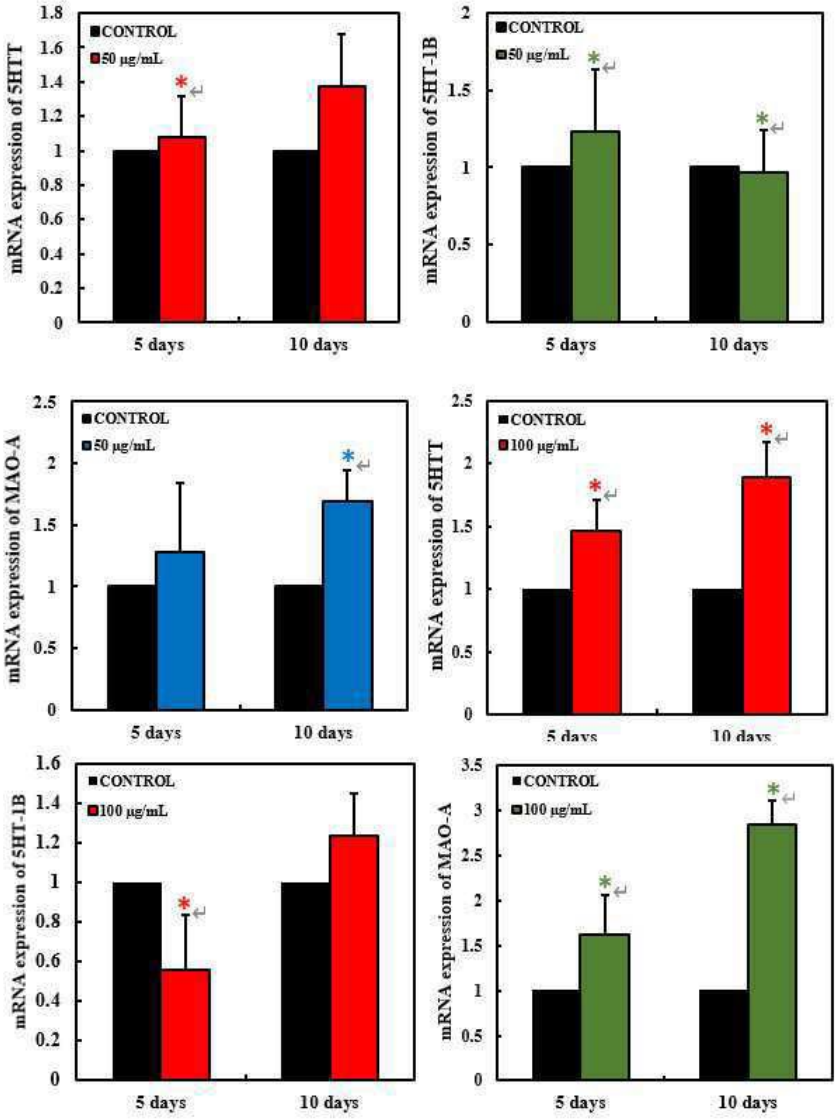
도면10b


(b)
IgA
IgA (μg/ml)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
Control
Valerian
RBS 3:7
RBS 5:5
RBS 7:3

도면10c



도면11


CONTROL
50 μg/mL
mRNA expression of 5HTT
5 days
10 days
CONTROL
50 μg/mL
mRNA expression of 5HT-1B
5 days
10 days
CONTROL
50 μg/mL
mRNA expression of MAO-A
5 days
10 days
CONTROL
100 μg/mL
mRNA expression of 5HTT
5 days
10 days
CONTROL
100 μg/mL
mRNA expression of 5HT-1B
5 days
10 days
CONTROL
100 μg/mL
mRNA expression of MAO-A
5 days
10 days