



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월23일
(11) 등록번호 10-1841387
(24) 등록일자 2018년03월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2017-0044267
- (22) 출원일자 2017년04월05일
심사청구일자 2017년04월05일
- (56) 선행기술조사문헌
KR101443013 B1

- (73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
- (72) 발명자
최철웅
광주광역시 서구 풍암순환로 10 호반중흥1단지 아
파트 105동 203호
- 정명아
전라남도 화순군 화순읍 대리길 41, 광신프로그래
스
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
최석진

F. Nejatbakhsh et al, ' Review of local herbal compounds found in the Iranian traditional medicine known to optimise male fertility' , Andrology, 2016.9.29., Vol.49, 850-859*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 6 항

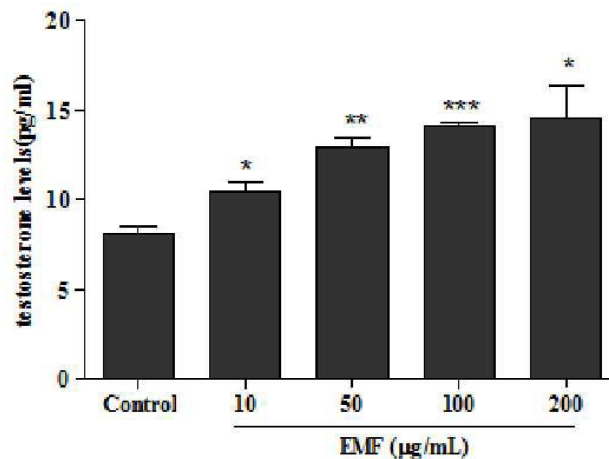
심사관 : 홍수민

(54) 발명의 명칭 **뜰보리수나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 남성 갱년기 증후군 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 뜰보리수나무(*Elaeagnus multiflora* Thunb.) 추출물을 유효성분으로 포함하며, 상기 뜰보리수 추출물은 물 또는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 질환 예방 또는 개선을 위한 약학 조성물을 제공함으로써 우리나라 천연 자원인 뜰보리수나무를 자원으로 이용하고, 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 독성이나 부작용 없이 안전하게 제공할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
 A23V 2200/302 (2013.01)
 A23V 2250/21 (2013.01)

(72) 발명자

오교녀

광주광역시 서구 월드컵4강로28번길 50-18 101동 403호 (화정동, 광명아파트)

강후원

광주광역시 남구 독립로 70-1 (백운동, 우방아이유셀아파트) 107동 402호

이규욱

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136 성은연립주택 101동 404호

김영욱

전남 장흥군 장흥읍 중앙로 81번지 2층

배동혁

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

반상오

전남 화순군 화순읍 대리길 41 광신프로그램스 101동 1805호

김재용

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

박성윤

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 215 부영6차아파트 606동 705호

임소정

광주광역시 서구 화개1로78번길 8 (금호동, 금호5차호반리젠시빌) 505동 303호

오들리

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 202 부영5차아파트 503동 203호

김유진

전라남도 장흥군 장흥읍 건산리 동교1길 16, 302호

홍지애

전라남도 화순군 화순읍 대리길 41, 광신프로그램스 101동 1205호

최은진

전라남도 담양군 무정면 내당길 31-2

조아라

광주광역시 남구 백양로 39번길 7-2, 푸르지오 301호

최학준

광주광역시 동구 동계로15번길 1-23 (동명동)

성락선

전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39 (수창아트빌아파트) 203호

이현미

전남 장흥군 안양면 우드랜드길 288

명세서

청구범위

청구항 1

뜰보리수나무(*Elaeagnus multiflora* Thunb.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 개선용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 뜰보리수나무 추출물은 물 또는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 질환 예방 또는 개선용 약학 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 추출물을 유효성분으로 포함하는 테스토스테론 저하를 동반하여 정자수 및 활동성 감소, 내장지방 증가, 근육량 감소, 근력감소, 골밀도 감소, 동맥경화 증가 및 경동맥혈관 두께 증가, 인슐린 저항성 증가, 지적활동, 인지능력, 공간 지남력의 감소, 피로, 우울, 성급함을 수분하는 기분변화, 수면장애, 체모의 감소 및 피부변화로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 남성 갱년기 증후군 예방 또는 개선용 약학 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 약학 조성물은 뜰보리수나무 추출물이 0.01 내지 10 g/day의 양으로 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 개선용 약학 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 약학 조성물은 뜰보리수나무 추출물이 0.01 내지 100중량%의 양으로 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 개선용 약학 조성물.

청구항 6

뜰보리수나무(*Elaeagnus multiflora* Thunb.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 개선용 기능성 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뜰보리수나무 (*Elaeagnus multiflora* Thunb.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 체내 테스토스테론의 분비를 증가시켜 남성 갱년기 장애 개선 또는 남성갱년기 질환에 대한 예방 및 치료를 위한 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 갱년기란 성 호르몬의 감소로 여러 증상이 나타나는 기간을 의미한다. 폐경기가 도래한 여성은 여성 호르몬이

급격히 감소하면서 여러 가지 신체 변화가 일어나므로 통상 여성에 한정되어 사용되어 왔다. 그러나 최근에는 남성에서도 노화에 따른 체내 남성 호르몬의 점진적 감소로 인해 내분기계의 변화가 초래되는 것이 보고되면서 남성 갱년기 증후군의 개념이 대두되고 있다. 2004년 국제남성노화학회(International Society for the Study of the Aging Male)에서 ‘후기발현 남성 성선기능저하증(late-onset hypogonadism, LOH)’, ‘가령성 테스토스테론결핍증후군(age-associated testosterone deficiency syndrome, TDS)’ 으로 명명했다.

[0004] 남성 호르몬인 테스토스테론(testosterone)은 주로 남성의 고환에서 생산되며 남성의 신체 건강, 정신 상태 등을 조절하고 남성다움과 성생활에 주도적인 역할을 한다. 그러나 30대 전후부터 해마다 약 1%씩 감소하여 50~70대 남성의 약 30~50%에서 남성호르몬이 정상치보다 감소되는 것으로 나타나는 것으로 보고되고 있다. 남성호르몬 감소 정도는 개인차가 크게 나타나는데, 주로 음주나 흡연, 비만, 잘못된 생활습관, 스트레스, 고혈압, 당뇨, 만성 질환 등이 남성 갱년기의 원인으로 지적되고 있으며, 스테로이드, 위장약(cimetidine), 이노제(spinloactone), 무좀약(ketocanazole) 등의 약물이 원인이 되기도 한다.

[0005] 이와 같은 남성 갱년기 장애(Andropause)는 연령의 증가와 관련된 임상적 및 생화학적 증후군으로 전형적인 증상 및 혈청 테스토스테론 수준의 결핍으로 정의되고 있으며, 여러 신체기관의 기능에 부정적인 영향을 초래할 수 있다. 동반되는 증상으로는 원인을 알 수 없는 무기력감, 만성 피로, 집중력 저하, 우울증, 불면증, 자신감 상실, 복부 비만, 체모의 감소, 근력 저하, 관절통, 피부노화, 안면홍조, 심계항진, 발한, 골다공증, 체중 및 근육량의 감소 등의 예를 들 수 있다.

[0006] 치료를 위해서는 폐경기 여성에 에스트로겐 대체요법을 사용하는 것과 유사한 방식으로 남성 호르몬 대체요법의 사용 가능성이 주장되고 있다. 한 연구에 따르면, 남성 갱년기 환자들을 테스토스테론 제형으로 치료하는 경우 상당한 개선 효과가 얻어지는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 남성 호르몬의 투여는 간, 지질 상태, 심혈관 및 전립선 질환 등에 역효과를 미칠 수 있다는 위험성 또한 보고되어 있다. 또한 선종 및 선암종에 비추어, 남성 갱년기에 기인하는 증상들을 갖는 환자의 약 30%는 남성 호르몬 대체 요법을 받을 수 없는 것으로 알려져 있다. 따라서 호르몬 대체 요법의 단점을 제공하지 않는 노화에 의한 또는 화학적이나 외과적 거세에 의해 유발된 남성 갱년기 증후군의 예방 및 치료에 유용한 신규 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

[0007] 한편, 뜰보리수(*Elaeagnus multiflora* Thunb.)는 정원에 심어 그 열매를 따먹는 정도의 정원수 정도로 알려져 있으나, 전통적으로 한방에서는 열매와 잎, 줄기, 뿌리 모두 약으로 사용하여 왔다. 뜰보리수나무는 우리나라 각지에 자생하는 *Elaeagnus* 속 식물로, 야앵도(野櫻桃) 또는 사월자(四月子)라고 불리며, 생약명으로 목반하(木半夏)로 알려져 있다. 흔히 집보리수나무, 참당보리수나무라고도 불리며, 어린 가지는 적갈색 비늘털로 덮여 있다. 외형은 보리수나무처럼 생겼으나, 열매가 커서 재배하기 때문에 뜰보리수나무라 불리며, 약으로 쓸 때는 주로 탕으로 하여 사용한다.

[0008] 잎은 어긋나며 길이 3~10cm의 긴 타원형으로서 양 끝이 좁아 날카롭고 가장자리에 톱니가 없다. 앞면에는 어릴 때 비늘털이 있으나 점차 없어지고, 뒷면에는 백색 비늘털과 갈색 비늘털이 섞여 있는 것이 특징이다. 꽃은 4~5월에 연한 황색으로 피는데 1~2개씩 잎겨드랑이에 달린다. 꽃에 흰색과 갈색의 비늘털이 있다. 꽃받침통은 밑부분이 급히 좁아져서 씨방을 둘러싸고 끝이 4개로 갈라지고, 4개의 수술과 1개의 암술이 있으며, 7월에 길이가 1.5cm 정도 되는 긴 타원형의 핵과가 달려 밑으로 처져 빨갱게 익는다. 수관은 낙엽떨기형태이고 높이 2~3m까지 자란다.

[0009] 보리수나무(*Elaeagnus umbellata* Thunberg)와 외형적으로 유사하지만, 보리수나무는 잔가지에 흰 비늘털이 많고, 열매는 길이 1cm 미만으로 작아 뜰보리수나무와 구별된다. 뜰보리수나무는 <익생양술대전>에 따르면 주로 순환계 질병을 다스리며, 중독, 타박상, 풍비, 풍습, 행기, 행혈에 좋은 효과를 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 기침, 가래, 천식, 타박상, 치질, 혈액순환개선, 설사를 멎게 하는데 이용해 왔다. 특히 뜰보리수나무 열매는 오장을 보익하고 변열과 소갈을 없애며, 소화불량, 골수염, 부종, 생리불순, 치질, 허리 뻐 것 등을 낫게 하며, 아무리 오래되고 잘 낫지 않는 천식도 치유할 수 있다고 알려져 있고, 가래를 삭이고 피나는 것을 멎게 하며, 풍을 없애고 습을 내보내며, 음식을 체한 것을 내려가게 하고 인후통을 낫게 한다. 또한 기침, 피를 토하는 데, 가래, 객혈, 장출혈, 월경과다, 류머티즘, 황달에 좋은 효력이 있다.

[0010] 최근 전통적으로 알려진 이러한 뜰보리수나무와 같은 천연물의 효능을 연구하여 부작용이 거의 없고 질병의 예방과 회복에 도움이 되는 물질을 개발하기 위해 노력하고 있으나, 아직까지는 뜰보리수나무에 대한 영양학적 가치나 생리활성 기능성에 대한 관련정보가 부족한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 국내 등록특허공보 제10-1714568호에는 파극천, 토사자 및/또는 양과 생약 추출물은 정상 및 항암제약물투여 군에서 혈중 테스토스테론(testosterone) 수준을 현격하게 증가시키고, 남성호르몬생성과 관련된 StAR 단백질 표현을 현저하게 증가하였음을 확인하여 남성 갱년기 장애의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물, 건강기능식품 및 건강보조식품에 유용하게 이용될 수 있는 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 남성 갱년기 장애 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있다.
- (특허문헌 0002) 국내 등록특허공보 제10-1699152호에는 혈중 테스토스테론의 함량을 증가시키고 산화적 스트레스를 억제하며 근지구력과 운동능력을 향상시킴으로써 남성 갱년기 증상을 개선하는데 매우 효과적인 호로파 및 흑삼 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 남성 갱년기 증상의 예방 또는 치료용 조성물에 관하여 개시되어 있다.
- (특허문헌 0003) 국내 공개특허번호 제10-2015-0038906호에는 홍삼, 산약, 구기자, 산수유, 울금과 같은 생약의 추출물을 포함하며, 남성 갱년기 증후군의 여러 증상의 예방 또는 치료에 효과가 있는 조성물로, 발기능의 유의미한 향상, IIEF 테스트의 전반적 향상, AMS, ADAM, 음경도플러 시험을 통해 남성 갱년기 증상의 예방 내지 치료에 효과가 있음을 보여주며, 남성 호르몬의 큰 변화없이도 이러한 기능 개성이 이루어짐으로써 호르몬 대체요법으로 충분히 활용될 수 있는 생약 추출물을 포함하는 후기 발현 남성 성선기능저하증 내지 남성갱년기 증후군 예방 또는 치료용 조성물 및 건강 기능성 식품에 관하여 개시되어 있다.
- (특허문헌 0004) 국내 등록특허번호 제10-1688116호에는 여주 추출물을 포함함으로써 체내 테스토스테론 분비를 증가시킬 수 있는 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관하여 개시되어 있다.
- (특허문헌 0005) 그러나 상기 선행문헌은 본 발명의 딸보리수나무(*Elaeagnus multiflora* Thunb.) 추출물을 유효성분으로 포함하며 테스토스테론의 분비를 증가시키고, 노령의 쥐에서 근력을 강화시키며, 정자수를 증가시키고, 체중증가를 억제하면서 세포독성을 보이지 않는 것으로 나타나, 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물과는 그 구성 및 효과에서 차이를 보인다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 우리나라 천연자원인 딸보리수나무잎 또는 열매 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 딸보리수나무(*Elaeagnus multiflora* Thunb.) 잎 또는 열매 추출물을 유효성분으로 포함하며, 상기 딸보리수나무 잎 또는 열매 추출물은 물 또는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 질환 예방 또는 개선을 위한 약학 조성물을 제공한다.
- [0016] 상기 조성물에는 딸보리수나무 추출물이 0.01 내지 10 g/day의 양으로 포함하여 제조될 수 있고, 또는 딸보리수나무 추출물이 0.01내지 100중량%의 양으로 포함하여 제조될 수 있다

발명의 효과

- [0018] 본 발명은 딸보리수나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 남성 갱년기 증후군 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물을 통하여 우리나라 천연자원인 딸보리수나무를 자원으로 이용하고, 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 독성이나 부작용 없이 안전하게 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명의 딸보리수나무 잎 추출물이 TM3 세포에서 세포 생존율을 나타내는 것을 보여주는 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 딸보리수나무 열매 추출물이 TM3 세포에서 세포 생존율을 나타내는 것을 보여주는 도면이다.

도 3은 본 발명의 딸보리수나무 잎 추출물이 TM3 세포에서 테스토스테론 분비를 증가시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이다.

도 4는 본 발명의 딸보리수나무 열매 추출물이 TM3 세포에서 테스토스테론 분비를 증가시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이다.

도 5는 본 발명의 딸보리수나무 잎 추출물이 노령의 수컷 쥐에서 체내 테스토스테론 분비를 증가시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이다.

도 6은 쥐의 근력을 측정하기 위해 이용한 로타로드 (rotarod) 운동기구를 보여주는 도면이다.

도 7은 본 발명의 딸보리수나무 잎 추출물이 노령의 수컷 쥐에서 근력을 증진시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이다.

도 8은 쥐의 피로도를 측정하기 위해 이용한 트레드밀(treadmill) 운동기구를 보여주는 도면이다.

도 9는 본 발명의 딸보리수나무 잎 추출물이 노령의 수컷 쥐에서 피로도를 경감시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이다.

도 10은 본 발명의 딸보리수나무 잎 추출물이 노령의 수컷 쥐에서 정자수를 증가시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 딸보리수나무 (*Elaeagnus multiflora* Thunb.) 잎 또는 열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물에 관한 것이다. 이하 구체적인 실시예를 들어 상세히 설명한다.

[0023] **1. 딸보리수나무잎 및 열매 추출물 제조**

[0024] **1.1 딸보리수나무 열수추출물의 제조**

[0025] 딸보리수나무잎 및 열매 추출물은 물 또는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매 중에서 선택되는 어느 하나의 용매를 이용하여 추출할 수 있다. 구체적으로는 수분이 제거된 딸보리수나무의 잎 100g을 증류수로 수세한 다음, 증류수 1L를 첨가하고, 환류 추출기에서 3시간 동안 100℃로 가열, 추출하였다. 여과지(와트만 41번)을 이용하여 여과하고 여액을 감압 및 농축하였다. 여과 후 남은 잔사에 다시 동량의 증류수를 사용하여 동일과정으로 1회 더 추출, 여과 및 감압 농축하였다. 농축된 열수추출물을 동결건조기(freeze dryer)를 이용하여 -50℃에서 48시간 동안 동결 건조시켰다. 이상의 방법으로 상기 열수추출물을 추출용매에 따라, 딸보리수 잎 열수 추출물 16.8g (16.8%)를 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하 “EM” 이라 명명함).

[0026] 딸보리수나무 열매 추출물은 건조된 딸보리수 열매 100g에 증류수 1L를 첨가하고, 환류 추출기에서 3시간동안 100℃로 가열, 추출하였다. 여과지(와트만 41번)을 이용하여 여과하고 감압 및 농축하였다. 여과 후 남은 잔사에 다시 동량의 증류수를 사용하여 동일과정으로 1회 더 추출, 여과 및 감압 농축하였다. 농축된 열수추출물을 동결건조기(freeze dryer)를 이용하여 -50℃에서 48시간 동안 동결 건조 시켰다. 이상의 방법으로 상기 열수추출물을 추출용매에 따라, 딸보리수 열매 열수 추출물 12.4g (12.4%)를 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하 “EMF” 라 명명함).

[0028] **1.2 딸보리수나무의 극성용매, 비극성용매 가용 분획물의 제조**

[0029] 상기 단계의 딸보리수나무 열수 추출물은 유기용매를 이용하여 다음과 같이 분획하였다.

[0030] **1.2.1 hexan 가용성 분획분리**

[0031] 딸보리수나무 추출물 12.4g을 5L의 증류수에 완전히 용해시킨 후에 분획 여두에 넣고 hexan 5L를 첨가하여 hexan 불용성층(수층)과 hexan가용성층을 분리하였다. 다시 hexan 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 hexan 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.

[0032] **1.2.2 클로로포름 가용성 분획분리**

[0033] hexan불용성 분획(수층)에 클로로포름 5L를 가하여 섞은 후에 클로로포름가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 클로로포름 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 클로로포름 불용성 분획 및 가용성 분

획을 수집하였다.

[0034] 1.2.3 에틸아세테이트 가용성 분획분리

[0035] 클로로포름 불용성 분획(수층)에 에틸아세테이트 5L를 가하여 섞은 후에 에틸아세테이트 가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 에틸아세테이트 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 에틸아세테이트 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.

[0036] 1.2.4. 부탄올 가용성 분획분리

[0037] 에틸아세테이트 불용성 분획(수층)에 부탄올 5L를 가하여 섞은 후에 부탄올 가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 부탄올 불용성층을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 부탄올 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.

[0038] 1.2.5 물층 분획분리

[0039] 딸보리수나무 추출물 12.5g을 5L의 증류수에 완전히 용해시킨 후에 분획여두에 넣고 상기 헥산 가용성층, 클로로포름 가용성층, 에틸아세테이트 가용성층 그리고 부탄올 가용성층을 분획 분리 후 농축하여 남아있는 유기용매를 제거하고 물 분획을 수집하였다.

[0040] 이와 같은 딸보리수나무 열수 추출 및 분획물 수득과정을 통해 제조된 보리수나무 열수추출물 12.5g에서 헥산 가용성 분획, 클로로포름 가용성 분획, 에틸아세테이트 가용성 분획 및 부탄올 가용성 분획을 감압 농축한 후에 동결 건조함으로써 얻어진 분획물을 시료로 사용하였다.

[0042] **2. 딸보리수나무잎 및 열매 추출물의 세포독성 측정**

[0043] 본 발명의 딸보리수나무 잎, 열매 추출물의 효과를 확인하기 위해 세포 독성을 나타내지 않으면서 효과를 낼 수 있는 적합한 농도를 결정하기 위해 세포 독성 검사를 수행하였다. 딸보리수나무 잎 추출물의 세포 독성은 쥐의 고환세포에서 유래한 Leydig 세포인 TM3 세포주를 대상으로 측정하였다. TM3 세포는 DMEM에 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0044] TM3 세포를 96-well plate에 1×10⁴ cells/well 농도로 넣고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 딸보리수나무 잎 또는 열매 추출물을 10, 50, 100 및 200 µg/mL 농도로 각 well에 처리하고 24시간동안 배양하였다. MTT 용액을 첨가하고 3시간이 지난 후 상층액을 제거하고 DMSO를 well당 100 µL씩 첨가한 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 1과 도 2에 도시하였다. 참고로, 도 1 내지 도 5, 도 7, 도 9 내지 도 10에 도시한 모든 측정된 결과는 평균과 표준오차로 표기하고, 통계적 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 p값이 0.05 미만 (p<0.05)인 경우를 통계학적으로 유의하다고 보았다.

[0045] 도 1을 참고하면, 딸보리수나무 잎 추출물을 농도별로 (10, 50, 100 and 200 µg/mL) 처리하였을 때 세포 생존율이 대조군 (Control)에 비해 97%, 96%, 96%, 95%로 TM3 세포에 대해 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[0046] 도 2를 참고하면, 딸보리수나무 열매 추출물을 농도별로 (10, 50, 100 and 200 µg/mL) 처리하였을 때 세포 생존율이 대조군 (Control)에 비해 98%, 96%, 93%, 93%로 TM3 세포에 대해 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[0048] **3. TM3 세포의 테스토스테론 분비 증가 효과 측정**

[0049] TM3 세포를 24-well plate에 2×10⁵ cells/well 농도로 넣고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 딸보리수나무 잎 및 열매 추출물 (EM) 을 10, 50 및 100 µg/mL농도가 되도록 혼합하여 각 well에 처리하고 24시간 배양하였다. 상층액을 취한 후 Testosterone ELISA kit (ADI-900-065, ENZO Life Sciences, U.S.A)를 이용하여 테스토스테론 함량을 측정하고, 그 결과를 도 3과 도 4에 도시하였다.

[0050] 도 3을 참고하면, 딸보리수나무 잎 추출물을 농도별(10, 50, 100 and 200 µg/mL)로 처리하였을 때 대조군 (Control)에 비해 각각 15 pg/mL (130%), 17 pg/mL (148%), 18 pg/mL (150%) and 18 pg/mL (153%)로 테스토스테론 함량이 유의성 있게 증가하였다.

[0051] 도 4를 참고하면, 딸보리수나무 열매 추출물을 농도별로 (10, 50, 100 and 200 µg/mL)로 처리하였을 때 대조군 (Control) 에 비해 각각 11 pg/mL (133%), 13 pg/mL (166%), 14 pg/mL (181%) and 16 pg/mL (186%)로 테스토스테론 함량이 유의성 있게 증가하였다.

[0053] 4. 체중증가량 측정

[0054] 노령 수컷 쥐를 4주간 경구투여 후 딸보리수나무 잎 추출물 (EM)이 체중에 미치는 영향을 비교하여 결과는 표 1에 나타내었다.

표 1

[0055]

Groups	Body weight		
	Initial	Final	Gains(g/day)
Control	557.4±13.6	589.4±20.4	32.0±6.9
EM 50	556.1±17.2	572.3±20.7	16.3±3.9
EM 100	555.7±14.4	560.0±13.5	4.3±9.8

[0057] 표 1에서 보는 바와 같이, 실험기간동안 딸보리수나무 잎 추출물 (EM)을 투여한 실험군(50 and 100 mg/mL)의 체중증가량은 16g, 4g으로 대조군 (32g)에 비해 감소한 것을 확인하였다.

[0059] 5. 장기무게 측정

[0060] 노령 수컷 쥐를 4주간 경구투여 후 딸보리수나무 잎 추출물이 장기무게에 미치는 영향을 비교하여 표 2에 나타내었다.

표 2

[0061]

Groups	Testes(g)	Epididymis (g)	Seminal vesicle(g)	Ventral prostate(g)	Liver(g)	Kidney(g)	Spleen(g)
Control	4.28±0.10	1.42±0.14	1.55±0.19	0.80±0.07	15.82±0.59	3.74±0.08	0.92±0.05
EM 50	4.02±0.17	1.58±0.11	2.13±0.27	1.30±0.26	14.87±1.01	3.56±0.18	0.96±0.06
EM 100	4.23±0.08	1.53±0.02	2.41±0.31	1.55±0.13	14.08±0.91	3.57±0.07	0.94±0.06

[0063] 표 2에서 보는 바와 같이, 고환, 부고환, 정낭, 전립선, 간, 비장, 신장의 장기무게 변화를 측정된 결과, 딸보리수나무 잎 추출물 투여로 인한 유의적인 변화는 관찰되지 않았다.

[0065] 6. 체내 테스토스테론 분비 증가 효과 측정

[0066] in vivo 레벨에서의 테스토스테론 분비 증가 효과는 노령 수컷 쥐를 이용하여 확인하였다. 생후 6개월령의 SD rat를 1주일간 적응시킨 뒤, 딸보리수나무 잎 추출물 (EM)을 투여한 실험군과 투여하지 않은 대조군으로 나누어 실험에 사용하였다. 동물실험실의 사육조건은 온도 23±1℃, 습도 45±5%, 명암은 12시간 주기로 자동 조명 조절하고, 물과 식이는 자유롭게 섭취시켰다. 실험군은 딸보리수나무 잎 추출물을 50, 100 mg/mL 농도로 증류수에 녹여 매일 오전 같은 시간에 경구투여 하였으며, 대조군은 동량의 증류수를 경구투여 하였다. 4주 동안 경구 투여하였으며, 마지막 경구 투여 후 혈액을 채취한 후 4000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 대상으로 Testosterone ELISA kit (ADI-900-065, ENZO Life Sciences, U.S.A)를 이용하여 테스토스테론 함량을 측정하고 그 결과를 도 5에 도시하였다.

[0067] 도 5를 참고하면, 딸보리수나무 잎 추출물을 투여한 실험군 (50 and 100 mg/mL)에서는 대조군 (Control)에 비해 혈청내 테스토스테론 분비가 각각 211%, 287% 증가한 것을 확인하였다.

[0069] 7. 근력 강화 효과 측정

[0070] 딸보리수나무 추출물의 근력 강화 효과는 도 6에 도시한 회전가능한 원통형의 로타로드 (rotarod)를 이용하여 노령 수컷 쥐에게 운동을 시켜 근력상태를 평가하여 측정하였다. 사용한 쥐의 월령, 사육조건 및 딸보리수나무 잎 추출물의 투여 조건은 상기 체내 테스토스테론 분비 증가 효과 측정 실험과 동일하게 하고, 투여 마지막날에 회전속도 20 rpm의 로타로드 원통 위에서 쥐들을 강제로 걷게 하여 로타로드에 적응시켰다. 24시간 후, 동일한 속도로 회전하는 원통위에 다시 쥐들을 올려 걷게 하고, 쥐들이 원통위에서 균형을 잃고 떨어지는 시간을 측정하였다. 측정된 결과는 도 7에 도시하였다.

[0071] 도 7을 참고하면, 로타로드 운동을 통해 근력상태를 평가한 결과, 딸보리수나무 잎 추출물을 투여한 실험군 (50

and 100 mg/mL)의 로타로드 운동시간이 대조군 (Control)의 로타로드 운동시간 (29초)에 비해 각각 154초, 270초로 증가하여 근력 강화 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0073] **8. 피로도 개선 효과 측정**

[0074] 뜰보리수나무 추출물의 피로도 개선 효과는 도 8에 도시한 전기 혐오자극을 이용한 트레드밀(treadmill) 운동장치를 노령 수컷 쥐에게 적용하여 측정하였다. 트레드밀의 각도는 지상과 20°의 각도로 전기자극판 쪽으로 기울게 하였다. 사용한 쥐의 월령, 사육조건 및 뜰보리수나무 잎 추출물 (EM)의 투여 조건은 상기 체내 테스토스테론 분비 증가 효과 측정 실험과 동일하게 하고, 투여 마지막날에 10분간 적응 훈련을 시켰다. 24 시간후, 지구력운동 수행능력을 평가하기 위하여 9 m/min에서 3분간 운동을 시작하게 한 후, 매 3분마다 3 m/min의 속도로 운동 강도를 증가시켜 나가면서 탈진 시까지의 운동 지속시간을 측정하였다. 측정된 결과는 도 9에 도시하였다.

[0075] 도 9를 참고하면, 트레드밀 운동을 통해 운동지속시간을 측정한 결과, 대조군(9분)에 비해 뜰보리수나무 잎 추출물을 투여한 실험군 (50 and 100 mg/mL)의 운동지속시간은 각각 10분, 11분으로 증가하였으며 유의적인 변화는 관찰되지 않았다.

[0077] **7. 정자수 측정**

[0078] 노령 수컷 쥐를 4주간 경구투여 후 부고환의 미부를 잘라 1ml의 saline과 혼합하고 10 µL를 hemacytometer에 넣고 정자를 계수하고 희석배율을 곱해 부고환에 존재하는 총정자수를 계산하였다. 측정된 결과는 도 10에 도시하였다.

[0079] 도 10을 참고하면, 뜰보리수나무 잎 추출물을 투여한 실험군 (50 and 100 mg/mL)의 총 정자수는 대조군에 비해 각각 139%, 152% 증가한 것을 확인하였다.

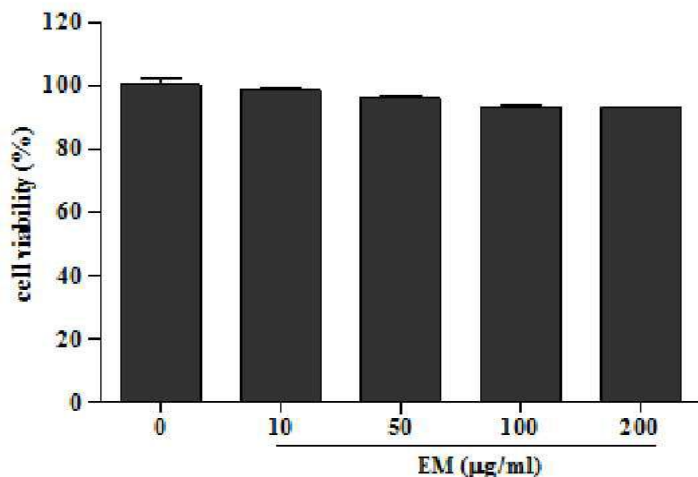
[0081] 상기의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 뜰보리수나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 남성 갱년기 증후군 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물은 TM3세포와 노령쥐에서 테스토스테론의 분비를 증가시키고, 노령의 쥐에서 근력을 강화시키며, 정자수를 증가시키고, 체중증가를 억제하면서 세포독성을 보이지 않는 것으로 나타나, 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 제공될 수 있음을 확인하였다.

산업상 이용가능성

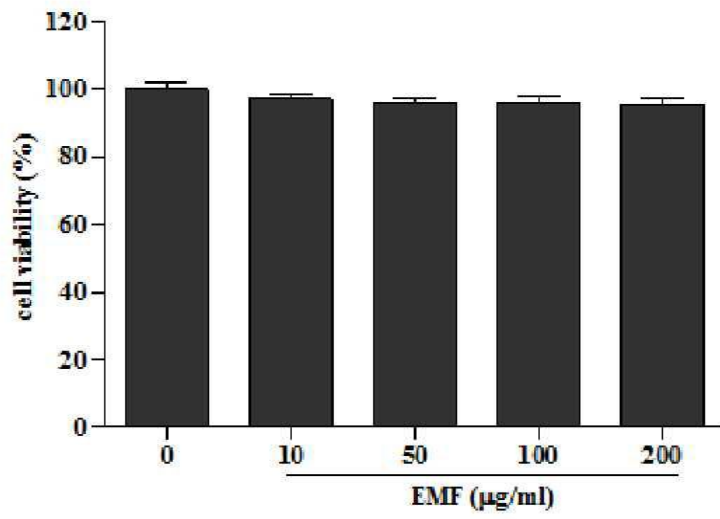
[0083] 본 발명의 뜰보리수나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 남성 갱년기 증후군 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물은 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 기능성 식품 등으로 이용될 수 있어 인류건강과 질병치료에 도움이 되므로 산업상 이용가능성이 있다.

도면

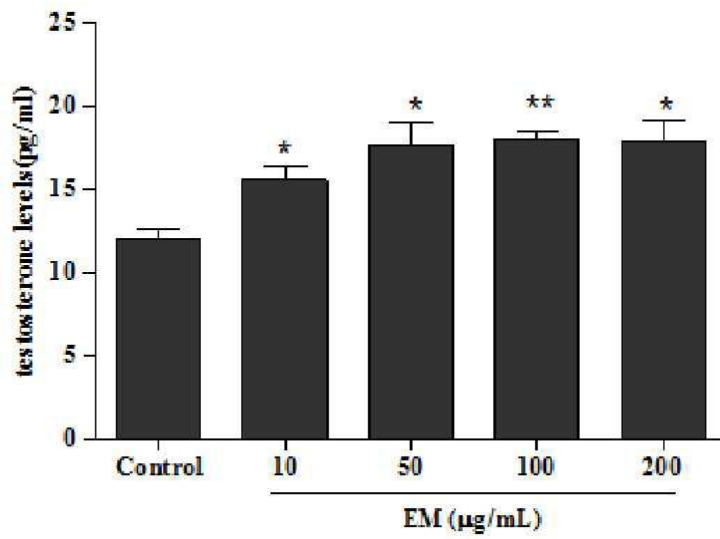
도면1



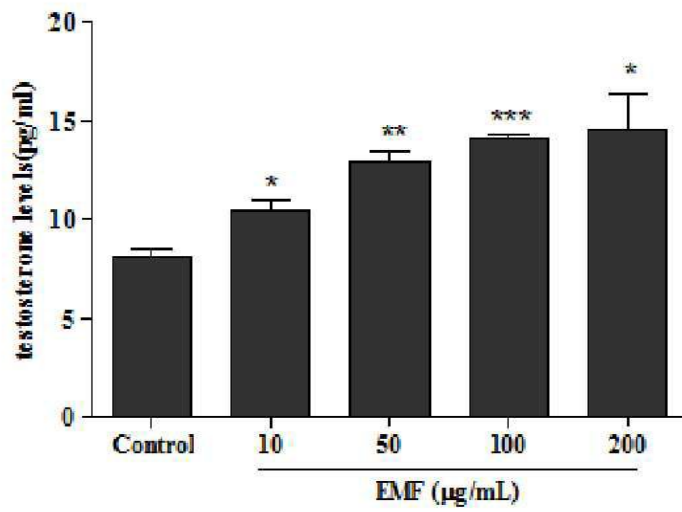
도면2



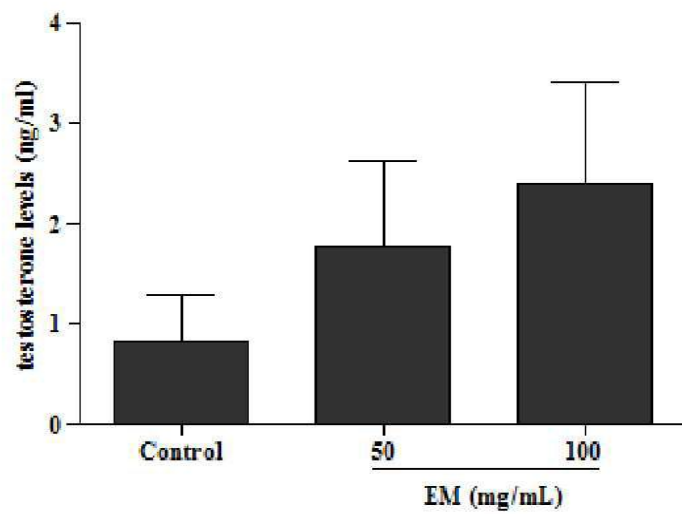
도면3



도면4



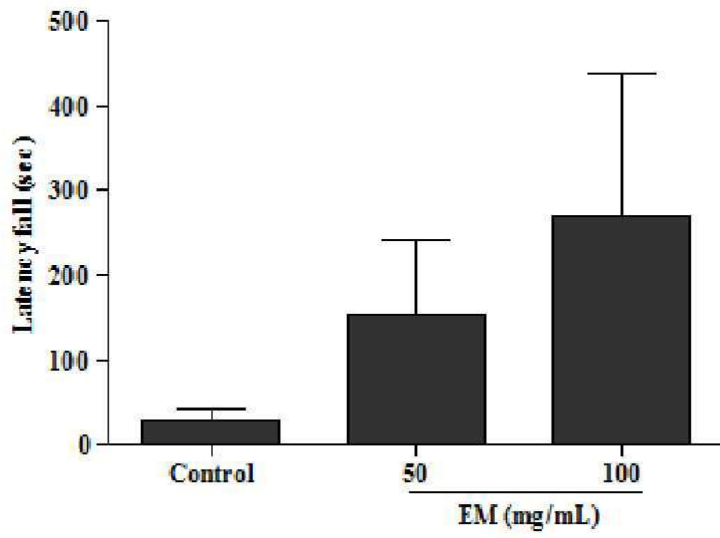
도면5



도면6



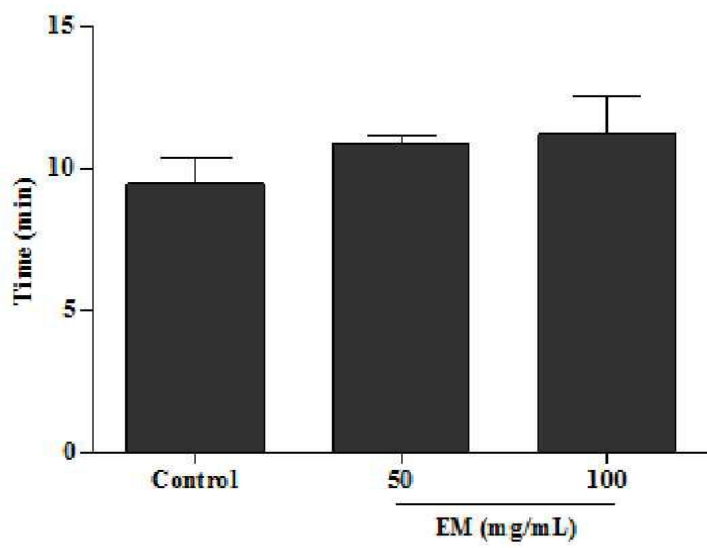
도면7



도면8



도면9



도면10

