



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월13일
(11) 등록번호 10-1706017
(24) 등록일자 2017년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) A61K 36/71 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A61K 36/71 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0074411
(22) 출원일자 2016년06월15일
심사청구일자 2016년06월15일
(65) 공개번호 10-2017-0015844
(43) 공개일자 2017년02월09일
(30) 우선권주장
1020150109242 2015년07월31일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130020095 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
(72) 발명자
최철용
광주광역시 서구 풍암순환로 10 호반중흥1단지 아
파트 105-203
장욱진
전라남도 장흥군 장흥읍 장흥대로 3492 계명아파
트 1005
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최석진

전체 청구항 수 : 총 2 항

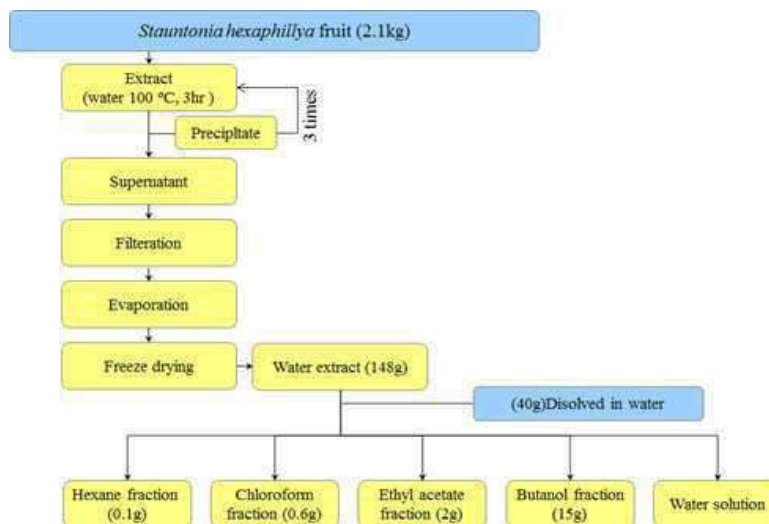
심사관 : 홍수민

(54) 발명의 명칭 **멸꿀 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 약학적 조성물**

(57) 요약

우리나라 천연자원인 멸꿀 열매 열수 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 고부가가치 기능성 약학적 조성물에 관한 것으로 멸꿀 열매 조추출물 또는 비극성가용추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 약학적 조성물은 인체에 부작용이 없으면서 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능이 뛰어나기 때문에 천연물인 멸꿀 열매 조추출물을 유효성분으로 사용함으로써 장기간 복용하여도 부작용 없이 안전한 알콜성 간 손상에 대한 간 보호에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 2236/30 (2013.01)

(72) 발명자

반상오

광주광역시 북구 평교로29번길 23

강후원

광주광역시 남구 독립로 70-1 백운 우방아이유셀아파트 107-402

김재용

전라남도 순천시 왕궁길 60 중흥파크맨션 304-207

이규욱

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136 성은연립주택 101-404

박성윤

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 215 부영6차아파트 606-705

이순택

경기도 고양시 일산서구 대산로226번길 24-3 (대화동)

박세준

전라남도 장흥군 안양면 우드랜드길 288 (기산리)

이동욱

전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 41 수창아트빌 203

김선오

광주광역시 북구 양일로 52-1 연제2차대주피오레아파트 201-1003

명세서

청구범위

청구항 1

멸꿀 열매 조추출물을 유효성분으로 포함하며, 상기 조추출물은 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매를 추출용매로 사용하여 추출한 것을 특징으로 하는 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 약학적 조성물

청구항 2

제1항에 있어서 알콜성 간손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 약학 조성물은 체중 kg당 50-200mg의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 약학적 조성물

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 천연원료인 멸꿀 열매 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 멸꿀(Stantonia hexaphylla)은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 으름덩굴과의 상록 덩굴 식물으로, 멸꿀나무라고도 한다. 상기 멸꿀은 암수 한그루로 원줄기는 약 5 m 정도 뻗어가고, 잎은 어긋나며 5개 내지 7개의 작은 잎으로 된 손바닥모양 겹잎이다. 작은 잎은 두껍고 달걀모양 또는 타원형이며, 가장자리가 밋밋하다.

[0003] 잎자루는 길이가 6 cm 내지 8 cm 정도이고, 작은 잎자루는 약 3 cm 정도이다. 꽃은 5월에 피고, 황백색이며 총상 꽃차례에 달린다. 암꽃의 작은 꽃가지는 가을에 적갈색으로 되고, 많은 피목이 있어 거칠다. 열매는 장과로 달걀모양 또는 타원형이고 길이가 5 cm 내지 10 cm이며, 10월에 적갈색으로 익고 과육은 으름보다 맛이 좋다. 종자는 달걀모양의 타원형으로 흑색이다. 상기 멸꿀은 주로 한국, 일본, 타이완또는 중국 등지에 분포한다. 우리나라에서는 주로 전라남도, 경상남도 및 충청남도 등의 남쪽지방의 계곡이나 숲 속에서 잘 생육한다.

[0004] 한편, 현대인들에게 음주는 필요 불가결한 것으로 과다한 음주는 일시적으로 두근거림, 두통, 갈증, 멀미, 위장장애, 설사 등의 숙취현상(hangover)을 유발하며, 만성적으로는 지방간, 간경화 등의 질환을 일으킬 수 있다. 숙취현상 중 두통은 두뇌 혈관의 확장 작용으로 인한 것이며, 갈증과 탈수현상은 에탄올이 뇌하수체에서 분비되는 항이노호르몬인 바소프레신의 분비를 억제함으로써 생기는 에탄올의 이노작용 때문이다. 또한, 위장장애 등의 소화기관 이상은 위산분비의 증가 때문으로, 가장 큰 원인은 간세포에 축적된 에탄올(ethanol)이나 아세트알데히드(acetaldehyde)의 독성 작용에 의한 것이다.

[0005] 이와 같은 에탄올의 분해기작 뿐 아니라 에탄올의 독성학적 연구에 대해서도 다양하게 이루어졌는데, 에탄올의 독성은 신경학적 측면에서 관찰될 뿐만 아니라 유전학적으로도 영향을 끼친다는 보고가 있다(J.Caballeria, et al., Life Sci.,41: 1021-1727, 1986). 최근 들어, 에탄올의 독성을 경감시키거나 독성의 발현을 저해할 수 있는 많은 물질에 대한 연구와 실험이 진행되고 있으며, 그 결과 천연식품이나 한약재료로부터 추출한 성분을 함

유한 다양한 건강보조식품이 이와 관련되어 개발되고 있다(김정한 등, 한국농화학회지, 38(6): 549-553, 1995).

[0006] 소량의 알코올 섭취는 신체의 피로와 정신적인 긴장감을 해소하는 데 도움을 주고 소화액의 분비를 자극하여 식욕을 증가시키며, 최근에는 적당한 알코올의 섭취가 동맥경화 같은 심혈관계 질환을 예방할 수 있다는 연구들이 보고 되고 있다. 그러나, 과량의 알코올이나 만성적인 알코올의 섭취는 소화관 점막을 손상시키며 이로 인한 영양소 흡수장애와 영양결핍이 문제시되며 모든 장기와 조직에 대해서 유해한 손상을 미친다. 특히 알코올 대사에 중추적 역할을 담당하는 간세포의 장애를 초래하고, 알코올성 간염, 지방간 및 간경변의 원인이 되고 있다.

[0007] 만성적인 알코올 섭취시 알코올 대사작용이 촉진되어 산소 소비량이 증가함에 따라 간조직의 부분적인 저산소증과 피사를 초래하거나 알코올 대사시 생성되는 유리 라디칼에 의해 지질과산화물의 반응이 촉진되어 간 조직을 손상시킬 수도 있다. 이러한 경우, 간조직의 중성지질 및 콜레스테롤 함량이 크게 증가하고, 활성산소가 증가하여 간 세포내 microsome의 약물대사 효소를 유도 증진하여 일상 복용하는 약물들이 중간 대사생성물인 free radical들을 과량 생성하여 독성을 유발하기도 한다. 항산화효소의 활성도가 낮아지면 제거되지 못한 자유라디칼들은 불포화 이중결합을 파괴하고 aldehyde, dialdehyde, short-chain hydrocarbon을 생성하는 연쇄반응을 개시하여 각 조직의 지질과산화를 촉진시킨다. 인체는 정상적인 생리 상태에서는 free radical의 생성과 항산화 방어체계(antioxidant defense system)의 활성이 균형을 이루고 있으나 체내에서 free radical이 다량 생성되거나 혹은 항산화 방어체계의 기능이 감소되면 이 균형이 깨어진 상태인 산화적 스트레스가 증가한다.

[0008] 알코올을 과다섭취하면 알코올 또는 알코올 산화 과정에서 생성되는 중간 대사산물에 의해 각종 대사성 질환 및 알코올성 간 질환이 발생할 수 있다. 알코올은 alcohol dehydrogenase, CYP450, catalase에 의해 분해되어 acetaldehyde로 대사되며 과량의 알코올 대사에 의해 생성된 acetaldehyde는 acetaldehyde-protein 부산물과 지질과산화물을 생성시켜 간 독성에 관여한다.

[0009] 알코올에 의한 자유기의 생성은, 알코올의 대사 및 아세트알데히드의 대사 과정중에 이루어지거나, 장기간 존재하는 hydroxyethyl에 의해 자유기가 생성되는 등 기전이 매우 다양하고 그 결과로서 지질 과산화가 일어난다(Pratt 등 1990). 지질과산화의 최종 산물로서 측정되는 MDA는 생체 조직에서의 과산화적 손상의 생화학적 인 지표로서 널리 사용되고 있다.

[0010] 따라서 만성적인 알코올의 섭취에 의해 증가된 체내의 산화적 스트레스를 감소시키고 알코올의 독성으로부터 조직을 보호하고 예방하여 알코올로 인한 질병이나 유해 작용을 해소시키기 위한 연구가 중요시되고 있는 실정이다. 본 발명에서는 우리나라의 전통적인 식물자원을 활용할 목적으로 천연원료인 멀꿀 열매를 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 멀꿀 열매 추출물을 함유하는 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 국내공개특허공보 제10-2011-0060002호는 숙취 개선용 조성물에 관한 것으로, 비병원성 미생물을 이용한 후발효차 추출물과 키토올리고당을 적정비율로 포함하여, 숙취의 주원인인 아세트알데하이드를 분해하는 알데하이드 탈수소효소의 활성화에 대한 시너지 효과를 통한, 숙취 개선, 혈중 아세트알데하이드 농도 감소, 간장 보호 및 피로 회복을 위한 숙취 개선용 조성물이 개시되어있다.

(특허문헌 0002) 국내공개특허공보 제10-2011-0033644호는 혈중 알코올 분해 속도를 촉진시키는 숙취 해소용 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 헛개나무, 인진쑥, 칩, 대잎등글레, 배초향, 영경귀 및 감초의 추출물을 포함한 숙취해소용 조성물에 관한 구성이 개시되어, 각 성분을 적절한 배합비율로 혼합 사용함으로써 각 성분을 개별적으로 사용한 경우와 비교하여 높은 상승작용을 나타내고, 혈중알코올 분해 속도 상승을 포함하여 알코올에 의한 간 손상 및 위염증의 억제효과를 나타낸다.

(특허문헌 0003) 국내공개특허공보 제10-2010-0119150호는 생약 혼합 추출물을 함유하는 숙취해소용 조성물에 관한 것으로, 율피의 추출물 또는 율피, 연자육 및 지구자의 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로한다. 이로부터 ADH와 ALDH의 활성을 촉진시켜서 알코올과 아세트알데히드의 분해를 촉진하는 효과발휘하여 숙취 해소용 식품, 음료로서 유용하게 사용될 수 있다.

(특허문헌 0004) 국내등록특허공보 제10-0372561호는 천연 생약제 추출물을 포함하는 숙취해소용 조성물 및 이

를 유효성분으로 함유하는 건강보조식품에 관한 것으로, 두충, 홍삼, 결명자 및 황연으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 천연 생약제 추출물 40 ~ 80 중량%, 어성초, 대황, 갈근 및 유자로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 천연 생약제 추출물 5 ~ 40 중량%, 삼백초, 신선초, 감나무잎 및 대추로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 천연 생약제 추출물 5 ~ 40 중량%, 감초, 쑥, 및 녹차로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 천연 생약제 추출물 5 ~ 15 중량%를 포함하는 숙취해소 및 간장 보호효과가 우수한 숙취해소용 조성물 및 이를 유효성분으로 함유하는 건강보조식품에 관한 것이다.

(특허문헌 0005) 그러나 상기 선행기술들은 본 발명에서 목적으로 하는 멸꿀 열매 조추출물을 이용한 알콜성 간 손상에 대한 간 보호용 약학조성물과는 재료 및 함유 성분에서 차이를 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 우리나라 천연자원인 멸꿀열매 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 고부가가치 기능성 약학조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 멸꿀열매 조추출물 또는 비극성가용추출물을 유효성분으로 포함하는 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 약학조성물을 제공한다.

[0014] 멸꿀열매 조추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 사용하여 추출한 것 일수 있으며, 추출용매를 사용하여 추출한 멸꿀열매 및 조추출물에 비극성가용 용매로서 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 분획용매로 사용하여 분획한 것일 수 있다.

[0015] 또한, 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 식품으로서 음료가 제공될 수 있고, 추출물은 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 전체 조성물의 0.01 내지 100중량%로 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 약학적 조성물은 인체에 부작용이 없으면서 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능이 뛰어나기 때문에 천연물인 멸꿀열매 조추출물을 유효성분으로 사용함으로써 장기간 복용하여도 부작용 없이 안전한 알콜성 간 손상에 대한 간 보호에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 멸꿀 열매를 나타낸 사진이다.

도 2는 멸꿀 열매 열수 추출물의 추출과 분획 모식도를 나타낸다.

도 3는 멸꿀 열매 열수 추출물에 대한 세포 생존율 측정결과를 나타낸다.

도 4는 멸꿀열매 열수 추출물에 대한 급성 알콜성 간 손상 생쥐의 간 조직 중 MDA 생성량 측정결과를 나타낸다.

도 5는 멸꿀열매 열수 추출물(200mg/kg)에 대한 만성 알콜성 간 손상 생쥐의 간 조직 중 MDA 생성량 측정결과를 나타낸다.

도 6는 멸꿀열매 열수 추출물(10,50,100, and 200mg/kg)에 대한 만성 알콜성 간 손상 생쥐의 간 조직 중 TBAR(MDA) 생성량 측정결과를 나타낸다.

도 7는 멸꿀열매 열수 추출물(10,50,100, and 200mg/kg)에 대한 만성 알콜성 간 손상 생쥐의 GOT activity 측

정결과를 나타낸다.

도 8는 멸꿀열매 열수 추출물(10,50,100, and 200mg/kg)에 대한 만성 알콜성 간 손상 생쥐의 GPT activity 측정결과를 나타낸다.

도 9는 멸꿀 열매 열수 추출물(10,50,100,200mg/kg)에 대한 간 조직 내 ALDH activity 측정결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명에서는 멸꿀열매 잎 조추출물 또는 비극성가용 추출물을 유효성분으로 포함하는 알콜성 간 손상에 대한 간 보호에 유효하게 작용하는 멸꿀열매 잎 추출물 함유 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 약학조성물이 제공된다.

[0019] 본 발명자들에 의해 출원되어 공개된 국내 특허출원번호 제10-2011-0082498호에서는 멸꿀 열매 열수 추출물 0.001중량% 내지 99중량%를 포함하는 간 보호용 조성물을 개시하고 있다. 상기 발명은 멸꿀 열매 열수추출물을 사용한 부분은 본 발명과 동일하나 상기 발명에서 사용된 사염화탄소(CC14) 또는 아세트아미노펜(APAP)과 같은 간 독성 약물로 유발된 간 손상에 대한 간 보호 조성물을 목적으로 하는 점으로 볼 때, 본원발명과 같이 알코올로 유발되는 간 손상에 대한 간 보호 조성물과는 그 용도와 작용 메카니즘에서 차이를 갖는다.

[0020] 구체적으로, 사염화탄소(CC14) 또는 아세트아미노펜(APAP)와 같은 간 독성 약물로 유발된 간 손상에 대한 간 보호의 경우, 지질과산화 억제, 혈청 중 GOT, GPT 수치 증가 억제, 사이토크롬 P450의 mRNA 발현량 억제, Nrf-2, HO-1 발현 증가여부를 유효성 평가항목으로 설정한다.

[0021] 반면에 숙취해소의 경우, 지질과산화 억제, 혈청 중 GOT, GPT 수치 증가 억제를 포함한 알코올대사의 주요 바이오 마커인 혈중알코올 농도 감소, 알코올탈수소효소 활성(ADH activity), 알데하이드탈수소효소 활성(ALDH activity) 증가여부를 유효성 평가항목으로 설정하여 실험한다.

[0022] 본 발명에서와 같이, 에탄올로 유발된 급성 간 손상, 만성 간 손상에 대한 간 보호의 경우, 알코올 대사에 의한 간 조직에서의 지질과산화를 가장 중요한 유효성평가항목으로 설정하여 결과를 도출하는 점, 에탄올 투여에 의한 만성 간 조직 손상에 따른 GOT, GPT의 변화, 에탄올 투여에 의해 생성되는 간 조직 내 독성물질인 알데하이드(aldehyde)를 분해하는 효소인 ALDH 효소 활성을 유효성평가항목으로 설정하여 결과를 도출하는 점으로부터 APAP, CC14로 유발된 간 손상에서의 지질과산화 억제와는 또 다른 메카니즘을 갖는다는 점에서 차이가 있음을 알 수 있다. 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다.

[0023]

1. 멸꿀 열매 열수 추출물 및 분획물 제조

[0025] 도 2는 멸꿀열매 추출물 및 유기용매에 의한 분획물을 얻는 과정을 나타낸다. 멸꿀 열매 2.1kg을 증류수로 수세한 다음, 증류수 40L를 가하고, 전기약탕기로 100℃에서 3시간 동안 가열, 추출하였다. 추출된 용액은 400 메쉬 여과포로 여과한 다음 감압회전농축기로 농축하였다. 여과 후 남은 잔사에 다시 동량의 증류수를 사용하여 동일과정으로 2번 더 추출, 여과 및 감압 농축한다. 농축된 열수추출물을 동결건조기 (Freeze dryer)에서 동결건조하였다. 멸꿀열매 열수추출물 148g(7.05%)을 얻었다.

2. 멸꿀 열매 열수추출물의 극성용매, 비극성용매 가용 분획물의 제조

[0027] 도 2에 도시된 바와 같이 제조된 멸꿀열매 열수추출물을 유기 용매를 이용하여 분획물을 제조하였다. 멸꿀열매의 극성용매, 비극성용매 가용 분획물의 제조는 멸꿀열매 열수 추출물 40g을 증류수 1L에 완전히 용해시킨 후 분획 여두 깔대기에 넣고 헥산(Hexane) 1L를 첨가하여 water 층과 hexane 층을 분리하였고 이와 같은 공정을 3번 반복하였다.

[0028] 동일한 과정을 통해 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol)을 순차적으로 가하여 각 분획물을 얻었고, 얻어진 각각의 분획물을 감압여과 장치로 여과하여 농축한 후 동결건조하여 용매를 완전히 제거한 뒤 본 실험에 사용하였다.

2.1. 헥산 가용성 분획 분리

- [0030] 멀꿀 열매 열수 추출물 40g을 1L의 증류수에 완전히 용해시킨 후에 분획 여두 깔대기에 넣고 hexan 1L를 첨가하여 hexan 불용성층(수층)과 hexan가용성층을 분리하였다. 다시 hexan 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 hexan 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.
- [0031] 2.2. 클로로포름 가용성 분획분리
- [0032] 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 분획을 수집하였다.
- [0033] 2.3. 에틸아세테이트 가용성 분획분리
- [0034] 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.
- [0035] 2.4. 부탄올 가용성 분획분리
- [0036] 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.
- [0037] 2.5 멀꿀열매 열수추출물 및 분획물 수득
- [0038] 멀꿀열매 열수추출물 40g에서 hexan 가용성 분획, 클로로포름 가용성 분획, 에틸아세테이트 가용성 분획 및 부탄올 가용성 분획을 감압 농축한 후에 동결건조하여 hexan분획 0.1g, 클로로포름 분획 0.6 g, 에틸아세테이트 분획 2g, 부탄올 분획 15g을 얻어 시료로 사용하였다.
- [0039] **3. 멀꿀 열매 열수추출물의 세포 독성시험 (by MTT assay)**
- [0040] 상기 실시예 1에서 제조된 멀꿀 열매 열수 추출물의 세포 독성을 측정하기 위하여, 쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 ATCC에서 구입하여 이용하였다. 상기 세포의 배양(Cell culture)에 사용된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/ Nutrient Mixture Ham's F12), FBS(fetal bovine serum), L-글루타민(L-glutamine) 및 페니실린-스트렙토마이신은 Gibco/BRL(USA)에서 구입하였다.
- [0041] 상기 RAW264.7 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 1% 페니실린 스트렙토마이신 및 1% L-글루타민을 첨가한 배양액을 사용하여 배양하였고, 37°C 습윤한 CO₂ 배양기(5% CO₂ /95% air)에서 배양하였다. 상기 세포가 배양접시의 약 80%가 차게 배양시킨 후, PBS(pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 세척하고, 0.25% 트립신 및 2.56 mmol/L EDTA를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다.
- [0042] 상기 배양한 세포는, 50,000 cells/well의 밀도로 48 well-plate에 분주하여, 24시간 더 배양하였다. 상기 24시간 경과 후, 아무런 처리를 하지 않고 LPS만 처리한 대조군과 LPS와 상기 실시예 1의 멀꿀 열매 추출물을 세포 생존에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 확인된 DMSO를 사용하여 다양한 농도로 제조된 멀꿀 열매 추출물을 처리한 실험군으로 나누어, 24시간 동안 더 배양시킨 후, 배양액을 제거하고 MTT 분석(MTT assay) 방법으로 살아있는 세포의 수를 측정하였다.
- [0043] 상기 MTT 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 우선, 세포배양 배지를 제거한 후 MTT를 1 mg/ml로 포함하는 DMEM/F12 배지를 웰 당 1 ml씩 처리하고, 37°C 습윤한 CO₂ 배양기에서 4시간 더 배양하였다. 이후 배지를 제거한 후, tetrazolium bromide salt를 제거하고, DMSO 200 μl를 분주하여 각 웰에 생성된 포르마잔 크리스탈을 용해시키고, 마이크로 플레이트리더(BIO-RAD)에서 540 nm파장으로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다. 상기 멀꿀 열매 추출물로 처리한 결과는 상기 실험을 동일하게 3회 수행하여, 측정된 값의 평균 값으로 도 3에

나타내었다.

[0044] 상기 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 열수 추출물을 다양한 농도, 구체적으로 10 µg/ml 내지 200 µg/ml까지 농도별로 처리하고, 24시간을 처리한 경우에도, 아무런 시료를 처리하지 않고 LPS 만 처리한 대조예와 비교한 결과, 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 열수 추출물을 다양한 농도로 처리한 경우 모두 세포의 증식에 별다른 영향을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 결과로부터 멸균 열매 열수 추출물은 200 µg/ml까지는 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

[0045] **4. 실험 동물, 사육**

[0046] 멸균열매 열수 추출물의 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능 측정을 위한 실험동물로서 체중 22~24g, 4주령 된 수컷 생쥐(ICR mouse, male)를 샘타코 사에서 구입하여 정상군(normal), 대조군(control), 시료 투여군으로 나누고 각 군당 5마리씩 배치하였다. 실험동물들은 온도 22±2℃, 상대습도 65±5%로, 명암 12시간 주기의 환경에서 7일 동안 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 고형사료(삼양사료) 및 물은 충분히 공급하였다.

[0047] **4.1 알코올 유발 급성 및 만성 간 손상 유도 동물 모델 실험 및 시료 처리**

[0048] 전체 실험조는 급성 및 만성 실험 2개조로 나누었으며, 환경적응 7일 후 4주 동안 1회/1일 주기로 멸균 열매 열수추출물(10, 50, 100, and 200mg/kg) 시료를 투여하고 30분 후 5g/kg EtOH(50% with saline)농도의 유도제를 투여하는 만성 실험조와 환경적응 7일 후 1주일 동안 1회/1일 주기로 멸균열매열수추출물 (50, 100 and 200mg/kg) 시료를 투여하고 30분 후 5g/kg EtOH(50% with saline)농도의 유도제를 투여하는 급성실험조로 나누어 진행하였다.

[0049] 각각의 실험 조 마지막 날 시료 및 유도제 최종투여 후 절식 및 절수를 실시하고 이로부터 18시간 경과 후 에테르 마취하에 개복하여 복부 대동맥에서 채혈한 후 1,500rpm 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 간 조직을 적출하여 -70℃에 보관 후 실험에 사용하였다.

[0050] **5. 멸균열매 열수 추출물의 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능실험결과**

[0051] **5.1 멸균열매 열수추출물의 알콜성 급성 간 손상 유발 생쥐의 간 조직에서 지질과산화 억제 효능 측정**

[0052] 도 4는 멸균 열매 열수 추출물(50, 100 and 200mg/kg)에 대한 급성 알콜성 간 손상 생쥐의 간 조직 중 MDA 생성량 측정결과를 나타낸다. 앞서 실시한 알코올성 급성 간손상 유발 생쥐의 간 조직 0.2g을 1.5ml EP tube에 옮긴다. PBS buffer 1ml을 homogenizer glass tube에 넣고 간 조직을 균질화 시킨다.

[0053] 72% TCA 195ul (final conc. 10%)를 넣고 4℃에서 12,000rpm으로 15분 동안 원심분리 한다. 상층액을 새 EP tube에 옮기고 원심분리를 한번 더 실행한다. 상층액 0.6ml을 새 EP tube에 옮긴다. 0.8% TBA 272ul (final conc. 0.25%)를 상층액에 넣는다. 95℃에서 boiling한다. Control 색깔이 분홍색으로 바뀌면 얼음에서 반응을 정지시킨다. 상층액 100ul를 96well plate에 옮기고 생성된 MDA(말론디알데하이드)의 양을 532nm에서 흡광도를 통해 측정한다.

[0054] 도 4에 나타난 바와 같이, 에탄올을 처리하지 않은 정상군의 경우, 낮은 MDA 분비량이 확인되었고, 에탄올로 유발한 대조군(급성)의 경우 지질과산화가 유발됨으로써 MDA의 함량이 현저하게 증가하는 것이 확인되었다. 또한 멸균 열매 열수추출물(50, 100 and 200mg/kg)을 처리한 실험군의 경우, 에탄올과 함께 처리했음에도 불구하고, MDA의 분비량이 농도 의존적으로 대조군(100% 기준)에 비해 각각 31.9%(50mg/kg), 29.7%(100mg/kg), 29.9%(200mg/kg) 낮게 측정되었고, 이는 양성대조군 보다도 더 낮은 MDA분비량임을 확인하였다. 양성 대조물질(YM: 200mg/kg)을 투여한 양성대조군의 경우, 대조군(100% 기준)에 비해 41.7% 낮은 MDA분비량을 확인하였다.

[0055] 이로부터 멸균열매 열수추출물이 MDA생성을 억제 즉, 지질과산화 활성 억제효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0056] **5.2 멸균 열매 열수추출물의 알콜성 만성 간 손상 유발 생쥐의 간 조직에서 지질과산화 억제 효능 측정**

[0057] 도 5는 멸균열매 열수 추출물(200mg/kg)에 대한 만성 알콜성 간 손상 생쥐의 간 조직 중 MDA 생성량 측정결과를 나타낸다. 앞서 실시한 알코올성 만성 간손상 유발 생쥐의 간 조직 0.2g을 1.5ml EP tube에 옮긴다. PBS buffer 1ml을 homogenizer glass tube에 넣고 간 조직을 균질화 시킨다.

[0058] 72% TCA 195ul (final conc. 10%)를 넣고 4℃에서 12,000rpm으로 15분 동안 원심분리 한다. 상층액을 새 EP tube에 옮기고 원심분리를 한번 더 실행한다. 상층액 0.6ml을 새 EP tube에 옮긴다. 0.8% TBA 272ul (final conc. 0.25%)를 상층액에 넣는다. 95℃에서 boiling한다. Control 색깔이 분홍색으로 바뀌면 열음에서 반응을 정지시킨다. 상층액 100ul를 96well plate에 옮기고 생성된 MDA(말론디알데하이드)의 양을 532nm에서 흡광도를 통해 측정한다.

[0059] 도 5에 나타난 바와 같이, 에탄올을 처리하지 않은 정상군의 경우, 낮은 MDA 분비량이 확인되었고, 에탄올로 유발한 대조군의 경우 지질과산화가 유발됨으로써 MDA의 함량이 현저하게 증가하는 것이 확인되었다. 또한 멸균열매 열수추출물(200mg/kg)을 처리한 실험군의 경우, 에탄올과 함께 처리했음에도 불구하고, MDA의 분비량이 농도 의존적으로 대조군에 비해 낮게 측정되었다.

[0060] 이로부터, 멸균열매 열수추출물이 MDA생성을 억제 즉, 지질과산화 활성 억제효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0061] **5.3 멸균 열매 열수추출물의 알콜성 만성 간 손상 유발 생쥐의 간 조직에서 지질과산화 억제 효능 측정**

[0062] 도 6은 멸균열매 열수 추출물(10, 50, 100, and 200mg/kg)에 대한 만성 알콜성 간 손상 생쥐의 간 조직 중 MDA 생성량 측정결과를 나타낸다. 앞서 실시한 알코올성 만성 간손상 유발 생쥐의 간 조직 0.2g을 1.5ml EP tube에 옮긴다. PBS buffer 1ml을 homogenizer glass tube에 넣고 간 조직을 균질화 시킨다.

[0063] 72% TCA 195ul (final conc. 10%)를 넣고 4℃에서 12,000rpm으로 15분 동안 원심분리 한다. 상층액을 새 EP tube에 옮기고 원심분리를 한번 더 실행한다. 상층액 0.6ml을 새 EP tube에 옮긴다. 0.8% TBA 272ul (final conc. 0.25%)를 상층액에 넣는다. 95℃에서 boiling한다. Control 색깔이 분홍색으로 바뀌면 열음에서 반응을 정지시킨다. 상층액 100ul를 96well plate에 옮기고 생성된 MDA(말론디알데하이드)의 양을 532nm에서 흡광도를 통해 측정한다.

[0064] 도 6에 나타난 바와 같이, 에탄올을 처리하지 않은 정상군의 경우, 낮은 MDA 분비량이 확인되었고, 에탄올로 유발한 대조군의 경우 지질과산화가 유발됨으로써 MDA의 함량이 현저하게 증가하는 것이 확인되었다. 또한 멸균열매 열수추출물(10, 50, 100, and 200mg/kg)을 처리한 실험군의 경우, 에탄올과 함께 처리했음에도 불구하고, MDA의 분비량이 농도 의존적으로 대조군에 비해 낮게 측정되었다.

[0065] 특히, 멸균 열매 열수 추출물 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg을 투여한 실험군의 경우, MDA생성량이 알코올만 투여한 대조군(100%)에 비해 각각 57.4%(50mg/kg), 54.3%(100mg/kg), 59.1%(200mg/kg) 생성량을 확인하였다.

[0066] 이는 멸균 열매 열수 추출물 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg을 투여한 실험군의 경우, MDA 생성억제 효과가 알코올만 투여한 대조군(100%)보다 각각 142.6%, 145.7%, 140.9% 더 높은 효과가 있음을 확인해주는 결과이다.

[0067] 이로부터, 멸균열매 열수추출물이 MDA생성을 억제 즉, 지질과산화 활성 억제효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0068] **5.4 알콜성 만성 간 손상 유발 생쥐모델에서 멸균 열매 열수추출물에 대한 GOT/GPT 측정 실험**

[0069] 도 7은 멸균열매 열수 추출물(10, 50, 100, and 200mg/kg)에 대한 만성 알콜성 간 손상 생쥐의 혈청 중 GOT 활성도 측정결과를 나타내며, 도 8은 멸균열매 열수 추출물(10, 50, 100, and 200mg/kg)에 대한 만성 알콜성 간 손상 생쥐의 혈청 중 GPT 활성도 측정결과를 나타낸다. 마취된 mouse의 복부대동맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 채혈된 혈액은 3,000rpm에서 5min동안 원심분리하여 혈청을 얻었다.

[0070] 분리된 혈청 중 transaminase(GOT, GPT)의 활성도 측정을 위해서 사용한 기질은 GOT의 경우 L-aspartic acid와 a-ketoglutaric acid, GPT의 경우 L-alanine과 a-ketoglutaric acid이다. 이들 기질을 사용하여 37℃에서 39분 간 반응시킬 때 생성되는 pyruvic acid가 알칼리성 하에서 2,4-dinitrophenyl hydrazine과 작용하여 발색되는 hydrazine의 비색을 정량하는 Reitman-Frankel 법에 의해 조제된 진단용 kit(아산제약, 한국)를 사용하여 505nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0071] 활성도의 단위는 혈청ml당 Karmen unit로 표시하였다. 도 7과 8에 나타난 것처럼 멸균열매 열수추출물을 10, 50,

100, 200mg/kg 농도로 투여한 결과, 알코올을 투여하여 만성적으로 간 손상을 유도시킨 대조군과 비교했을 때 GOT, GPT 상승억제효과가 있는 것으로 나타났다.

[0072] 따라서, 멸균 열매 열수추출물은 간 손상에 영향을 주지 않으며, 만성적 알코올 섭취로 인한 GOT, GPT 활성 상승을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0073] **5.5 멸균 열매 열수추출물에 대한 간 조직 내 ALDH activity 측정 실험**

[0074] 상기 알콜 실험을 실시한 쥐를 대퇴부 동맥에서 마지막 채혈 후(4h) 즉시 간을 적출하여 0.25M sucrose를 섞어 4도씨에서 homogenizer를 이용해 균질화하고. 이것을 600xg에서 15분간 원심분리를 하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상층액을 얻고, 다시 10,000g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 분리된 상층액은 ALDH assay buffer, developer, 조효소인 NAD+와 혼합한 뒤 37도씨에서 10분 간격으로 30분 동안 반응하여 생성되는 NADH의 양을 흡광도 450nm에서 측정하였으며(ALDH activity colorimetric assay kit, #731-100; BioVision), 활성도 단위는 단백질 1mg이 1분간 생성한 NADH의 양을 nmole로 표시하고 그래프 산출은 대조군(에탄올 처리군) 값에 대한 상대값(relative, %)으로 표기하였다.

[0075] 간 조직 중 ALDH activity 활성을 측정한 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 에탄올만 처리한 대조군에 비해 멸균 열매 열수 추출물(10, 50, 100, 그리고 200mg/kg)을 투여한 군에서 농도 의존적으로 ALDH activity가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] 구체적으로, 멸균 열매 열수 추출물 10mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg을 투여한 실험군의 경우, ALDH activity가 알코올만 투여한 대조군(70.9%)에 비해 각각 91.1%(10mg/kg), 97.3%(50mg/kg), 99.7%(100mg/kg), 106.7%(200mg/kg)로, ALDH activity (활성)이 정상군(100%)에 근접하게 회복하는 것을 확인하였다.

[0077] 특히, 멸균 열매 열수 추출물을 투여한 실험군의 경우, ALDH activity가 알코올만 투여한 대조군(100%)과 비교했을 때 각각 120.5%(10mg/kg), 137.2%(50mg/kg), 140.6%(100mg/kg), 150.5%(200mg/kg)로 농도 의존적으로 현저하게 증가 하는 효과를 확인하였다.

[0078] 이로부터 멸균 열매 열수추출물은 실험동물의 체중대비 일정한 비율로 투여함으로써 자연 생산물에 의한 알데히드 분해효소 활성증가에 관여함으로써 에탄올 투여로 인한 간 조직 내 독소인 알데히드(aldehyde) 분해촉진 효과를 갖는 것이 확인됨으로서 본 발명에 따른 조성물은 알코올 섭취 의하여 야기되는 알콜성 간 손상으로부터 간 조직을 보호 및 예방하는 데에 사용할 수 있다.

산업상 이용가능성

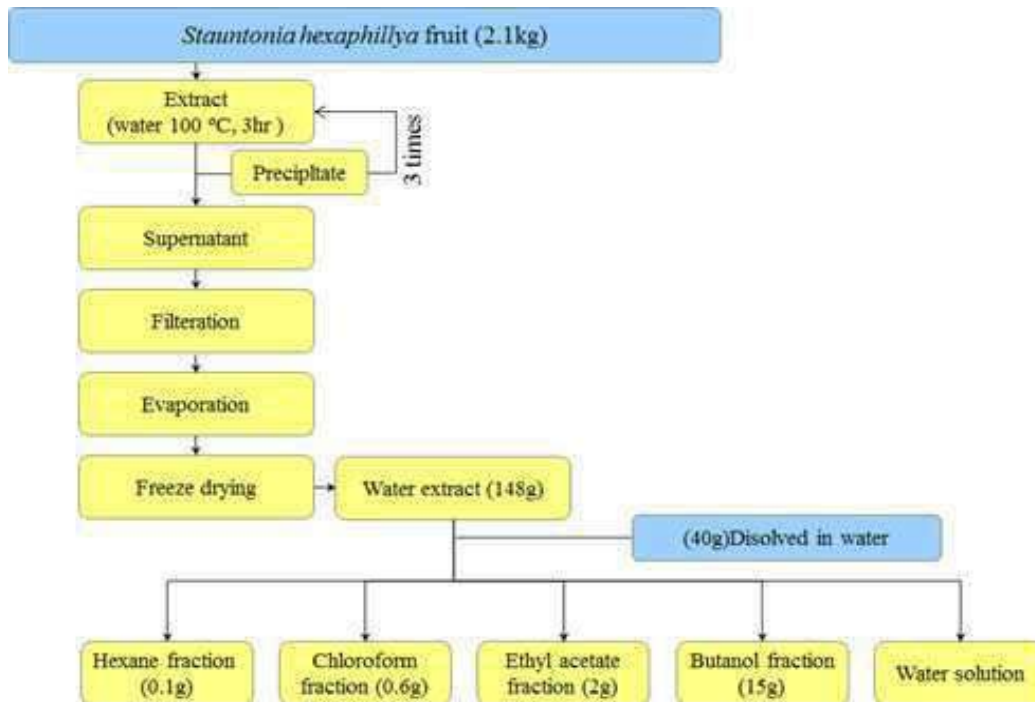
[0079] 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능을 갖는 약학 조성물로서 멸균 열매 추출물은 인체에 부작용이 없으면서 알콜성 간 손상에 대한 간 보호 기능이 뛰어나기 때문에 천연물인 멸균 열매 추출물을 유효성분으로 사용함으로써 장기간 복용하여도 부작용 없이 안전한 알콜성 간 손상에 대한 간 보호에 유용하게 사용될 수 있고 자연에서 식하는 식물로 대체함으로 제조생산단가 절감과 산업화를 통한 수입대체 및 수출효과를 기대할 수 있을 것이다.

도면

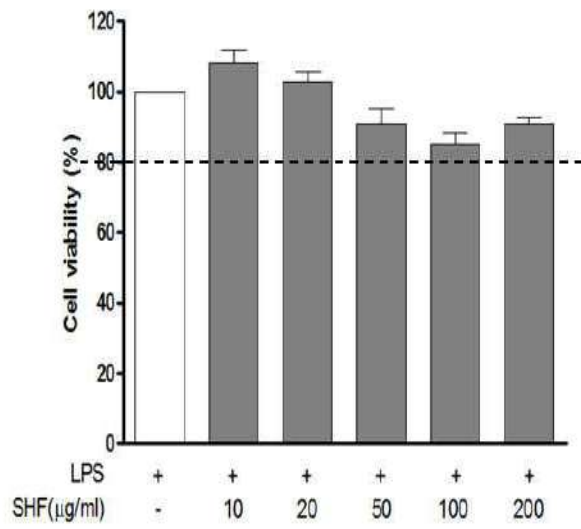
도면1



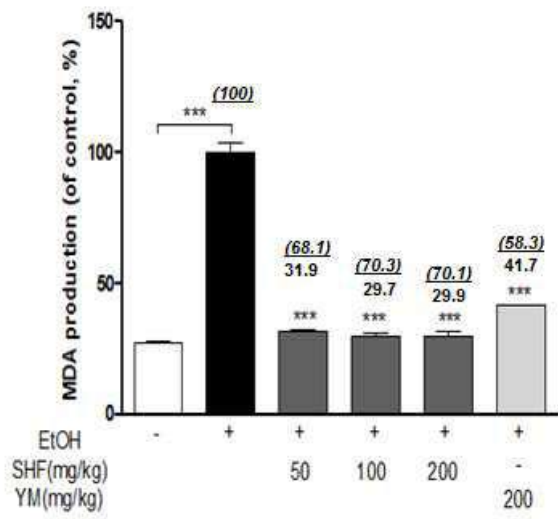
도면2



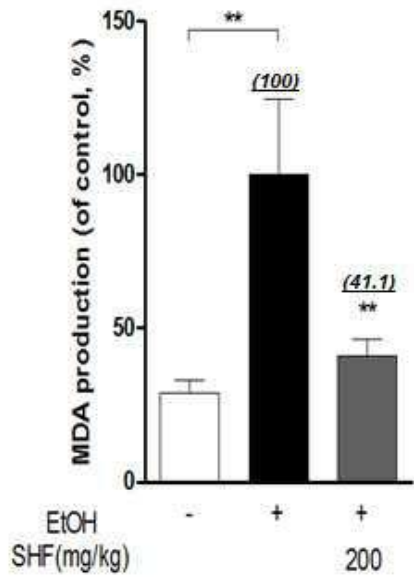
도면3



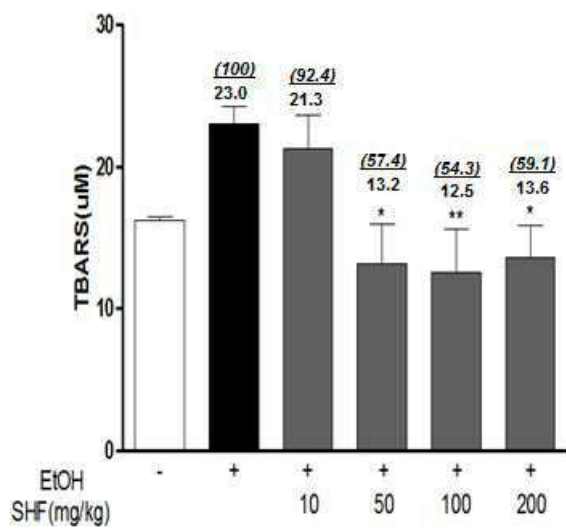
도면4



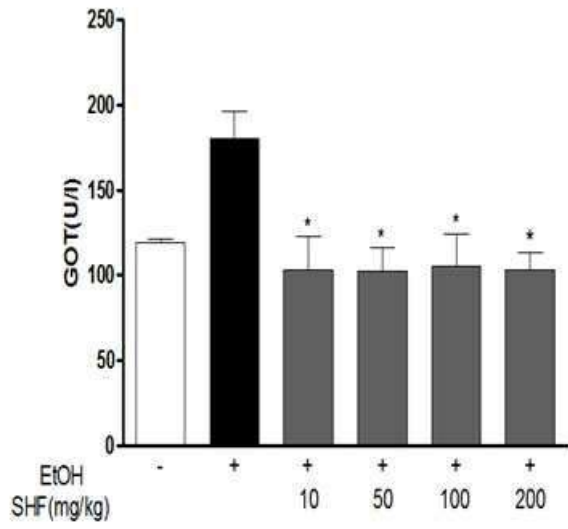
도면5



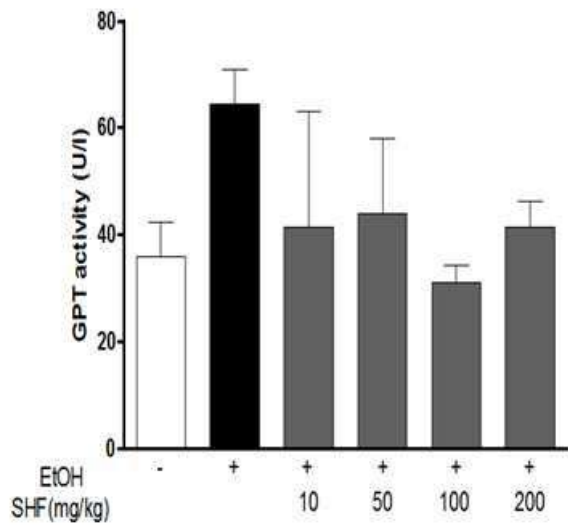
도면6



도면7



도면8



도면9

