(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0061108
(43) 공개일자 2011년06월09일

(51) Int. Cl.
A61K 36/288 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0117649
(22) 출원일자 2009년12월01일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
이현화
광주광역시 남구 진월동 한신아파트 201-1003
김종세
광주광역시 동구 동명1동 901-11
윤중식
전라남도 화순군 화순읍 일심리 서라아파트 401-703
(74) 대리인
황주명, 성정현, 위병갑

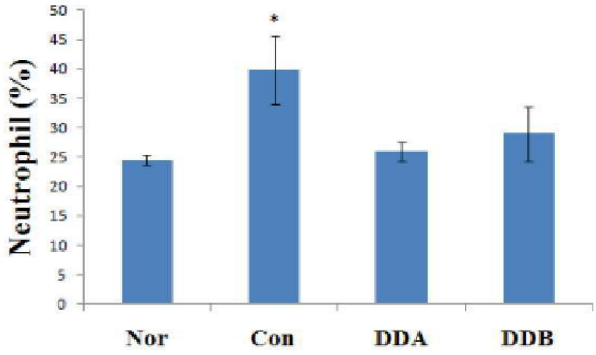
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 흰민들레 추출물을 유효성분으로 함유하는 간암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 흰민들레 추출물을 유효성분으로 함유하는 간암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 흰민들레 추출물은 AST와 ALT의 활성을 감소시키고, 항산화 활성이 우수하며, 카탈라아제의 활성을 증가시켜 과산화수소의 양적 감소를 통해 간세포의 손상을 억제시킬 수 있어 간암을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있으며, 천연 추출물질이므로 인체에 부작용이 없기 때문에 건강 기능성 식품의 소재로 사용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

흰민들레(Taraxacum coreanum) 추출물을 유효성분으로 함유하는 간암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 흰민들레 추출물은 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물인 것을 특징으로 하는 간암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 흰민들레 추출물은 5 ~ 50㎎/㎏ 투여되는 것을 특징으로 하는 간암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 흰민들레 추출물은 프리라디칼의 생성을 감소시켜 SOD 활성을 증가시키고, 카탈라아제의 활성을 증가시켜 과산화수소를 양적으로 감소시킴으로써 간세포의 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 간암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 식품 또는 간암 예방 또는 치료용 식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 흰민들레 추출물을 유효성분으로 함유하는 간암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간암(Hepatoma)은 전 세계적으로 가장 흔한 암 중의 하나이며, 특히 남자에게서 많이 발생한다. 간암이란 간의 대부분을 차지하는 간 세포에서 기원하는 악성 종양을 말한다. 넓은 의미로는 간에 생기는 모든 종류의 악성 종양(예를 들면 간내 담관암)이나 다른 기관의 암이 간에 전이되어 발생하는 전이성 간암까지도 포함하지만, 간세포암종이 간암 중 가장 흔하기 때문에 일반적으로는 간 세포에서 발생하는 간세포암종만을 의미한다.

[0003] 간암의 주요 원인은 B형 간염바이러스(HBV), C형 간염바이러스(HCV)에 의한 급성 및 만성 감염이며, 이들 바이러스에 의한 만성 감염의 결과 간경변증이 발생하고 장기간 염증이 진행하면서 간암으로 진행되는 경우가 대부분이다. 이외에도 알코올성 간질환, 혈색소증, 흡연, 아플라톡신(aflatoxin)과 같은 독소에 의한 간 손상 등의 만성 간 질환이 모두 간암의 원인이 될 수 있다.

[0004] 간암은 진행 속도가 매우 빠르므로 조기 검진이 무엇보다 중요하다. 간암의 치료방법으로는 수술로 암조직을 제거하는 방법, 경동맥 화학 색전술, 경피적 에탄올 주입술, 고주파 응고 치료를 이용하여 암세포를 사멸시키는 방법 등이 있으나, 이들 방법은 간암의 크기가 너무 크거나, 큰 혈관이 침범되어 있거나 다른 장기에 암이 전이되어 있는 경우 효과적이지 못하거나 값이 비싼 단점이 있다.

[0005] 간암을 치료하기 위해서는 항암제를 단독 또는 복합으로 주사하여 치료하는 것이 가장 효과적인 방법이다. 그러나 기존에 쓰이고 있는 알킬화제나 항대사제, 항암 항생제, 알칼로이드 등 항암제들은 대부분 간암에 대해서는 작용효과를 나타내지 못하며 심지어 이들 중 일부는 다른 암세포에는 효과적이나 간기능에는 오히려 장애를 가

져오는 경우도 있다. 따라서 간기능에 장애를 주지 않으면서 특별히 간암에 효과적인 항암제를 개발하는 것이 시급하다.

[0006] 최근에는 COX 억제제, 레티노이드 유사체, 비타민 K2, 녹차, 인삼 등의 간암 예방효과를 가지면서 인체에 대한 부작용을 최소화할 수 있는 천연식물자원을 이용하여 간질환 치료와 예방 및 항암치료의 효능을 높이려는 실험적 연구가 활발히 보고되고 있다(Kim & Kang, 1991; Kweon & Woo, 1994; Moon et al., 1997; Kim et al., 2002; Moon et al., 2006; Yun et al., 2006; Yun et al., 2007).

[0007] 한편, 민들레(Taraxacum platycarpum)는 국화과에 속한 다년초로 봄에 어린 잎을 나물로 먹는다. 한방에서는 꽃피기 전의 식물체를 포공영(蒲公英)이라는 약재로 쓰는데, 열로 인한 종창·유방염·인후염·맹장염·복막염·급성간염·황달에 효과가 있으며, 열로 인해 소변을 못 보는 증세에도 사용한다. 민간에서는 젖을 빨리 분비하게 하는 약제로도 사용한다.

[0008] 특히 민들레의 리놀산과 콜린 성분은 고혈압, 심장병, 간질환 등 성인병에 효과가 있으며, 담즙분비 촉진, 항류마티스 등에 약재로 이용되고 있다(Cho et al., 2002; Yun et al., 2002). 또한, 대장의 유익한 장내 미생물의 개선(Park et al., 2002), 혈당 및 혈중지질함량을 개선(Cho et al., 2000), 항암효과(Ko SG, Koh SH, Jun CY, Nam CG, Bae HS, Shin MK., Biol Pharm Bull. 10:1604-1610, 2004), 위장관의 변질과 비정형 세포증식의 치료효과(Liu XR, Han WQ, Sun DR., hongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 10:602-603. 1992), 항바이러스 작용(Zheng M.Zhong Xi Yi Jie HeZa Zhi. 1:39-41,1990) 등에 민들레 추출물과 민들레로부터 분리된 성분을 이용하는 것이 보고되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 부작용이 없으면서도 간암에 효과가 우수한 새로운 천연추출물질을 이용한 조성물을 개발하던 중, 흰민들레에서 추출한 물질이 우수한 간세포 손상 억제효과 및 항산화활성이 있어 간암을 예방 또는 치료할 수 있는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 흰민들레 추출물을 유효성분으로 함유하는 간암 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 흰민들레(Taraxacum coreanum) 추출물을 유효성분으로 함유하는 간암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 흰민들레 추출물은 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 흰민들레 추출물은 20 ~ 70mg/kg 투여될 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 흰민들레 추출물은 프리라디칼의 생성을 감소시켜 SOD 활성을 증가시키고, 카탈라아제의 활성을 증가시켜 과산화수소를 양적으로 감소시킴으로써 간세포의 손상을 억제할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 식품을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약제를 제공한다.

효 과

[0017] 본 발명에 따른 흰민들레 추출물은 AST와 ALT의 활성을 감소시키고, 항산화 활성이 우수하며, 카탈라아제의 활성을 증가시켜 과산화수소의 양적 감소를 통해 간세포의 손상을 억제시킬 수 있어 간암을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있으며, 천연추출물질이므로 인체에 부작용이 없기 때문에 건강 기능성 식품의 소재로 사용할 수 있는 효과가 있다.

[0018] 또한, 본 발명에 따른 흰민들레 추출물은 혈액 내 유해물질의 제거뿐만 아니라 간세포에 독성을 야기하는 수은을 방어하는 효과가 있으며, 높은 항산화 활성을 나타내는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 흰민들레 추출물의 신규 용도에 관한 것으로서, 흰민들레 추출물을 유효성분으로 함유하는 간암 예방 또는 치료용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0020] 일반적으로 흰민들레(Taraxacum coreanum)는 쌍떡잎식물 초롱꽃목 국화과에 속하는 여러해살이풀로 민들레와 비슷하지만 꽃이 백색이고 잎이 서는 것이 많으므로 구별된다. 이러한 흰민들레는 포공영, 금잠로 및 지정으로 불리어지고 있다. 어린 순을 묵나물로 하고 꽃은 약용으로 하는데, 예로부터 민간과 한방에서는 강장, 해열, 이뇨, 건위, 거담, 해독 등에 이용되어 왔을 뿐 흰민들레 추출물이 간암에 효과가 있다는 내용은 보고된 바가 없다.

[0021] 이에 본 발명에서는 이러한 흰민들레 추출물이 간세포 손상을 억제하여 간암에 효과가 있다는 사실을 최초로 규명하였다.

[0022] 본 발명에서 정의되는 “추출물”은 흰민들레의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물임을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명에서 정의되는 “조추출물”은 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 프로판올, 이소프로판올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 에탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[0024] 본원에서 정의되는 “극성용매 가용 추출물”은 물, 메탄올, 부탄올, 아세톤 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되어진 용매, 바람직하게는 메탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[0025] 본원에서 정의되는 “비극성용매 가용 추출물”은 헥산, 시클로헥산, 클로로포름, 디클로로메탄, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되어진 용매, 바람직하게는 헥산 또는 에틸아세테이트에 가용한 추출물을 포함한다.

[0026] 본 발명의 흰민들레 조추출물을 수득하는 방법을 설명하면, 우선 흰민들레를 채취하여 건조시킨 다음 세절하여 마쇄기로 갈아 미세분말화한 후, 흰민들레 시료중량의 약 1 ~ 30배, 바람직하게는 약 1 ~ 10배에 달하는 부피(w/v%)의 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등과 같은 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 증류수를 가하여, 10 내지 100℃, 바람직하게는 40 ~ 90℃에서 1 ~ 48 시간, 바람직하게는 20 내지 30시간 동안 열수추출, 냉침추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출 또는 가보법을법 등의 추출방법, 바람직하게는 열수추출법으로 약 1 내지 7회, 바람직하게는 1 내지 3회 추출한 후 여과하여 상층액을 모으고 감압 농축하여 본 발명의 흰민들레 조추출물을 얻을 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명의 극성용매 또는 비극성용매 가용 추출물은 상기에서 얻은 조추출물 중량의 약 1 내지 150배, 바람직하게는 5 내지 100배 부피(w/v%)의 물을 분산시킨 후, 헥산, 에틸 아세테이트 및 부탄올을 순차적으로 물의 약 1 내지 10배, 바람직하게는 1 내지 5배의 부피를 가하여 1 내지 5 회, 바람직하게는 2 내지 4회 분획하여 본 발명의 극성 용매 또는 비극성용매 가용 추출물을 수득할 수 있다.

[0028] 본 발명에서는 보다 구체적으로 흰민들레 추출물이 혈청 중의 혈청내 아미노기전이효소의 활성을 억제하고, 과산화이온 불균등화효소의 활성을 증가시켜 항산화 작용을 하며, 카탈라아제의 활성을 증가시켜 과산화수소의 양을 감소시켜 간세포의 손상을 억제할 수 있음을 규명하였다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명자들은 본 발명에 따른 흰민들레 추출물을 N-니트로소디에틸아민(DEN)으로 간손상을 유발한 흰쥐에 투여하여 간암 발생에 미치는 효과를 확인하기 위하여 혈청내 아미노기전이효소(Transaminase)의 활성도, 과산화이온 불균등화효소(SOD) 활성도, 카탈라아제(Catalase) 활성도를 측정하였다(실시예 1 참조). 그 결과, 간손상 수치를 나타내는 AST 및 ALT의 활성 억제효과를 나타내었으며, SOD활성을 증가시켜 항산화 활성이 우수하고, 카탈라아제의 활성을 증가시켜 과산화수소의 양적 감소로 간세포의 손상을 억제한 것을 확인할 수 있었다(도 3 내지 도 6 참조).

[0030] 한편, 본 발명의 일실시예에서 흰쥐에 간암을 유발하기 위해 사용한 상기 "N-니트로소디에틸아민(N-nitrosodiethylamine, DEN)"은 니트로소디알킬아민에 속하는 $(CH_3CH_2)_2N-NO$의 분자식을 갖는 무취의 황색 액체이며, 주로 사람과 동물의 간장이나 신장에 궤양 또는 암을 일으키는 물질로 잘 알려져 있다.

[0031] 상기 "혈청내 아미노기전이효소"는 AST(Aspartate aminotransferase, SGOT)와 ALT(Alanine aminotransferase, SGPT)를 말하며, 이들은 간세포 내의 미토콘드리아에 존재하는 효소로서 간조직세포의 손상에 의해 혈청 중의 활성도가 증가되어지며, 이러한 활성도의 상승은 간질환에서 일어나고 특히 만성간염의 경우는 현저하게 증가된다.

[0032] 상기 "과산화이온 불균등화효소(Superoxide Dismutase, SOD)"는 체내의 대표적인 활성산소를 제거시키는 효소로서 몸 안에 필요 이상의 활성산소가 생겼을 때 이것을 중화하는 작용을 하는데, 두 분자의 초과산화물(Superoxide)를 과산화수소와 산소분자로 환원시키는 작용을 가지고 있다.

[0033] 상기 "카탈라아제(catalase)"는 생체 내 생명현상에 필수적인 산화환원반응의 일종으로 생성되는 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 반응을 촉매하는 효소이며 우리 몸속의 간, 적혈구, 신장에 들어 있다. 이것은 다수의 과산화수소 생성효소들과 복합체를 형성하여 퍼옥시좀(peroxisome)에 주로 분포하고 과산화수소 증가에 따른 조직손상을 방어하는 효능이 있다.

[0034] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 흰민들레 추출물이 우수한 간세포 손상 억제효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

[0035] 한편, 활성산소는 몸에서 해로운 작용을 하는 산소를 말하는 것으로, 산소는 인간에게 없어서는 안될 중요한 물질로서 우리가 호흡을 할 때 체내에 흡수되어 세포 안에서 에너지를 생성하는 역할을 한다. 이때 흡수된 산소의 일부가 체내에서 화학반응을 일으켜 독성을 갖는 성분으로 변성되는데, 이러한 독성이 있는 산소가 바로 활성산소이다. 이렇게 변성되는 이유는 대기 오염물질속의 프레온가스, 배기가스, 식품첨가물, 식품과산화물, 화학약품, 자외선, 전자파, 스트레스, 인공합성 화학물질로 만든 약품 등에 기인하는 것으로, 활성산소는 세포와 염색체까지도 변질시키는 강력한 산화력을 가지고 있어 몸을 병들게 하고 노화를 촉진시키게 된다.

[0036] 따라서 본 발명의 민들레 추출물이 인체의 노화를 촉진시키는 원인 중 하나인 활성산소를 제거하는 항산화 활성을 가지고 있으므로 산화적 스트레스로 인해 발생하는 질환들을 예방, 개선 및 치료하는데 천연항산화제로 사용될 수 있으며, 항암식품 소재로 사용될 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 본 발명자들은 본 발명의 흰민들레 추출물이 수은으로 유발된 간손상에 미치는 영향을 확인하기 위하여 혈청내 아미노기전이효소(Transaminase)의 활성도, 과산화이온 불균등화효소(SOD)와 카탈라아제의 활성도를 측정하였다(실시예 2 참조). 그 결과, 본 발명의 민들레 추출물이 수은으로 유발된 간손상시 AST와 ALT 수치를 감소시키고, SOD와 카탈라아제 활성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(도 10 내지 도 13 참조).

[0038] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 흰민들레 추출물이 혈액내 유해물질의 제거뿐만 아니라 간세포에 독성을 야기하는 수은을 방어하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

[0039] 또한, 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 본 발명자들은 본 발명의 민들레 추출물의 세포독성 및 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능, SOD 항산화 활성, APX 항산화 활성, CAT 항산화 활성을 측정하였다(실시예 3 참조). 그 결과, DPPH 라디칼 소거능의 RC_{50} 값은 높은 활성을 보였으며, SOD 항산화 활성, APX 항산화 활성 및 CAT 항산화 활성 또한 높게 나타났다(도 21 내지 도 23 참조).

[0040] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 흰민들레 추출물이 높은 항산화 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0041] 그러므로 본 발명은 본 발명에 따른 흰민들레 추출물을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있으며, 간세포 또는 간조직의 손상을 억제 또는 치료하고, 간암에 대하여 항암 활성을 가질 수 있다.

[0042] 본 명세서에서 "항암"이라는 용어는 암 질환의 치료 즉, 암세포의 증식을 억제하거나 암세포를 죽이는 것뿐만 아니라, 암 질환의 예방, 즉 암 발병 이전에 암에 대한 저항력을 높이는 것도 함께 포함하는 것으로 해석된다. 따라서 본 명세서에서 "간암 예방 또는 치료"라는 용어와 "간세포 또는 간조직의 손상을 억제 또는 치료"라는 용어 및 "항암"이라는 용어는 혼재하여 사용되었다.

[0043] 상기 "치료하는"이란 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환

또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치료"란 용어는 "치료하는"이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서 암의 "치료" 또는 "치료요법"은 다음의 하나 이상을 포함할 수 있다. 즉, (1) 암의 성장을 저해함, 즉, 그 발달을 저지시킴, (2) 암의 확산을 예방함, 즉, 전이를 예방함, (3) 암을 경감시킴, 즉, 암의 퇴행을 야기시킴, (4) 암의 재발을 예방함, 및 (5) 암의 증상을 완화함(palliating) 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0044] 또한, 상기 본 발명의 조성물은 간암의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 갱년기 증상의 예방 및 개선용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 흰민들레 추출물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 간세포 손상 또는 간암의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[0046] 본 발명에 따른 흰민들레 추출물의 약학적으로 유효한 양은 5 ~ 50 mg/day/체중kg, 바람직하게는 20 ~ 40 mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 갱년기 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0047] 또한, 상기에서 약학적으로 허용되는이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 간암의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 갱년기 증상의 예방 및 개선용 조성물은 갱년기 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[0050] 따라서 본 발명은 흰민들레 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 약제를 제공할 수 있다.

[0051] 나아가 본 발명에 따른 간암의 예방 또는 치료용 조성물은 우수한 간세포 손상 억제 효과, 항산화 활성을 통해 간암 증상을 완화시키는 효과를 제공할 뿐만 아니라, 천연에서 추출한 물질로 약물에 대한 독성 및 부작용도 없어 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있으므로 상기 본 발명의 조성물은 체내에 대해 매우 안정한 특징이 있다.

[0052] 또한, 본 발명의 조성물은 간암의 예방 또는 개선 효과를 목적으로 하는 식품에 첨가할 수 있으며, 따라서 상기 본 발명의 조성물을 간암의 예방 또는 치료를 위한 식품용 조성물로 사용할 수 있다.

[0053] 그러므로 본 발명의 간암의 예방 또는 치료를 위한 식품용 조성물은 간암 증상의 예방 및 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.

[0054] 본원에서 상기 "식품"이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

[0055] 본원발명에 따른 간암 증상의 예방 또는 치료용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 캔디류, 쵸코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌

등), 음료(예, 과실 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0056] 또한, 상기 "기능성 식품"이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0057] 또한, 본원발명에서 상기 "음료"란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 갱년기 증상의 예방 및 개선용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0058] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본원발명의 갱년기 증상의 예방 및 개선용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0059] 본원발명의 간암 증상의 예방 또는 치료용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0060]

[0061] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] **<제조예>**

[0063] **민들레 추출물의 제조**

[0064] 본 발명자들은 열수추출방법을 이용하여 흰민들레 추출물을 제조하였는데, 흰민들레(Taraxacum coreanum) 100g을 균질기로 고속 2분, 저속 3분간을 3회 반복하여 조직을 파쇄한 후, 증류수 1L를 가한 다음 75 ~ 80℃의 가열맨틀상에서 24시간 진탕하여 여과한 여액을 동결건조하여 사용하였다.

[0065] **<실시예 1>**

[0066] 본 발명자들은 상기 제조예에서 제조한 본 발명의 민들레 추출물이 DEN으로 유발된 간손상에 미치는 영향을 알아보고자, 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0067] **<1-1> 실험동물 준비**

[0068] 본 발명자들은 체중 210±10g의 웅성 흰쥐(Sprague-Dawley strain)를 샘타코(오산, 대한민국)로부터 구입하여 온도 23±2℃, 습도 50±5%의 환경조건을 유지시킨 사육장(HB-404AS)에서 식이와 음용수를 제한없이 공급하면서 일주일간 적응시켰다.

[0069] **<1-2> 실험군 설정 및 시료 투여**

[0070] 정상군을 제외한 모든 실험동물은 N-니트로소다이에틸아민[N-nitrosodiethylamine](DEN, Sigma chemical Co.,

USA) 200mg/kg을 0.9% 식염수 1mL에 용해하여 1주 간격으로 2회 복강 투여하였다. 정상군은 통상적인 사료와 물을 공급하였으며, 대조군은 간암이 유발된 후부터 식염수 0.5mL을 실험기간 동안 매일 구강 투여하였다. 실험군(DDA, DDB)은 DEN을 투여한 2주 후부터 8주 동안 민들레 추출액 건조 분말을 생리식염수 0.5mL에 용해하여 각각 30, 60mg/kg을 구강 투여하였다.

[0071] **<1-3> 혈액학적 검사**

[0072] 본 발명자들은 DEN으로 유발된 간손상에서 호중구 함량비와 림프구 함량비를 측정하였다. 우선, 대조군과 실험군의 흰쥐에 우레탄 200mg/kg을 복강 투여하여 마취한 다음, 흉곽을 열고 심장 채혈을 하였다. 채혈된 혈액을 EDTA에 넣은 다음 곧바로 혈구측정기(K-800, Sysmax, Japan)를 사용하여 호중구와 림프구를 측정하였다. 정상군(Nor)은 생리식염수(saline)을 단독으로 처리하였고, 대조군(Con)은 DEN을 단독으로 투여하였고, 실험군(DDA, DDB)는 DEN과 본 발명에 따른 민들레 추출액을 투여하였다. 이때, DDA는 민들레 추출액 30mg/kg, DDB는 민들레 추출액 60mg/kg을 투여하였다.

[0073] (1) 호중구 함량비의 변화

[0074] 대조군(39.8±5.83%)은 정상군(24.48±0.88%)에 비하여 호중구의 백혈구 대비 함량비율이 통계적으로 유의성(*p<0.05)있게 증가하였으나, DDA군(25.97±1.67%)과 DDB군(28.99±4.7%)은 대조군에 비해 함량비율이 감소하였다(도 1 참조).

[0075]

[0076] (2) 림프구 함량비의 변화

[0077] 정상군(69.56±1.23%)에 비하여 대조군(52.95±5.26%)은 림프구의 함량비율이 통계적으로 유의성(*p<0.05)있게 감소하였으나, DDA군(69.01±0.77%)과 DDB군(67.23±0.69%)은 대조군에 비하여 함량비율이 증가하였다(도 2 참조).

[0078] **<1-4> 혈청내 아미노기전이효소(Transaminase) 활성측정**

[0079] 본 발명자들은 본 발명에 따른 민들레 추출물이 혈청내 아미노기전이효소의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 혈청내 AST와 ALT의 활성을 Reitman & Frankel(1957)의 방법에 따라 kit 시약(아산제약)을 사용하여 측정하였다.

[0080] AST와 ALT 기질액 1.0 mL을 시험관에 넣고 37℃에서 5분간 방치한 다음 혈청 0.2 mL을 넣어 잘 혼합한 다음 37℃에서 AST는 60분, ALT는 30분간 반응시킨 다음 정색 시액 1.0 mL을 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 20분간 방치하여 반응을 종료시키고, 0.4N NaOH 용액 10 mL을 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간 방치하였다가 505 nm에서 흡광도(Photometer 5010, Germany)의 변화를 측정하였다.

[0081] 그 결과, AST의 활성은 대조군(76±3.92 U/L)이 정상군에(58±4.33 U/L) 비하여 유의적인(*p<0.05) 증가를 보였으며, DDA군은 63±1.76 U/L을 나타내어 대조군에 비하여 감소하였다(도 3 참조). ALT의 활성은 대조군이 42±3.15 U/L인데 비하여 DDA군에서는 33±3.33 U/L으로 나타나 증가억제 현상은 보였으나 유의성은 없었다(도 4 참조).

[0082] 따라서 본 발명자들은 상기 결과를 통해 본 발명의 민들레 추출물이 DEN으로 유발된 간손상에서 AST와 ALT 수치의 증가를 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0083] **<1-5> 흰쥐 간조직으로부터 과산화이온 불균등화효소(SOD) 추출 및 활성도 측정**

[0084] 본 발명자들은 본 발명에 따른 민들레 추출물이 SOD활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 흰쥐 간조직으로부터 과산화이온 불균등화효소(SOD, Superoxide Dismutase)를 추출하여 SOD의 활성변화를 측정하였다. 실험을 위해 우선, 대조군과 실험군 흰쥐로부터 간조직만을 신속히 분리하여 과산화 SOD를 추출하였다. 채취된 간조직은 증류수로 3회 세척한 후, 수크로오스 버퍼[0.25M 수크로오스, 1mM EDTA와 10 mM 트리스(pH 7.4)]를 간조직 시료

에 4배 용량으로 첨가하여 세절한 다음 균질액을 얻기 위하여 균질기(JANKE & KUNKEL, ULTRA-TURRAX T25, Germany)를 이용하여 4℃에서 균질화 하였다. 이 균질액을 10,000 xg, 4℃에서 15분 동안 원심분리하여 얻은 상층액을 SOD 활성을 측정하기 위한 효소원으로 이용하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad assay를 이용하였으며, -70℃의 초저온 냉동고(deep freezer)에 보관하면서 실험에 이용하였다. SOD 활성도는 SOD 분석 키트(Dojindo, Japan)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 후 SOD 활성도를 계산하였다.

[0085] 그 결과, SOD 활성도는 정상군(99±0.47%)에 비하여 DEN을 단독 투여한 대조군(79±2.5%)은 통계적으로 유의성(*p<0.05)있게 감소되었지만, 민들레 추출물을 투여한 DDA군(108±3.14%)과 DDB군(115±2.82%)은 대조군에 비해 통계적으로 유의성(#p<0.05)있게 증가되었다(도 5 참조).

[0086] 따라서 본 발명자들은 상기 결과를 통해 민들레 추출물이 SOD 활성을 증가시키는 것을 확인하였으며, 이와 같이 민들레 추출물 투여군의 SOD 활성이 대조군에 비해 다소 높게 나타나는 것은 민들레 추출물의 대사로 인해 자유라디칼의 생성이 감소하여 유도하지 않은 것으로 사료된다.

[0087] **<1-6> 흰쥐의 간조직으로부터 카탈라아제(catalase)의 추출 및 활성도 분석**

[0088] 본 발명자들은 본 발명에 따른 민들레 추출물이 카탈라아제(Catalase) 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, Beers and Sizer(1952)의 방법에 준하여 50 mM 인산칼슘 완충액(pH 7.2)에 기질인 10mM H_2O_2에 효소액을 가하여 최종 반응액이 3.0mL이 되게 한 다음 25℃에서 30초간 반응시키면서 240nm 파장에서 소실되는 H_2O_2의 양을 측정하여 카탈라아제 활성도를 측정하였다. 효소 활성도의 단위는 15초간에 1 mg의 단백이 반응하여 환원시킨 H_2O_2를 μmole로 나타내었다.

[0089] 그 결과, 카탈라아제의 활성은 정상군(3722±48.54 U/mL)에 비하여 대조군(2552±149.64 U/mL)에서 유의적(*p<0.05)으로 낮게 나타났으며, DDA군(4881±74.31 U/mL)과 DDB군(4569±149.01 U/mL)은 대조군에 비하여 유의적(#p<0.05)으로 증가하였다(도 6 참조).

[0090] 따라서 본 발명자들은 상기 결과를 통해 민들레 추출물이 카탈라아제의 활성을 증가시키는 것을 확인하였으며, 이러한 결과는 SOD의 작용에 의해 생성된 과산화수소를 분해하기 위해 카탈라아제의 활성이 증가한다(Deng & Zhang, 1991)는 보고와 연관이 있으며, 민들레 추출물의 투여로 카탈라아제 활성이 증가하여 과산화수소의 양적 감소로 간세포의 손상을 억제하였을 것으로 사료된다.

[0091] **<1-7> Total RNA 추출 및 RT-PCR(역전사중합효소연쇄반응)**

[0092] 흰쥐의 간을 획득하여 Trisol (Sigma, USA)를 사용하여 Total RNA를 분리하였다. Reverse transcription은 DEPC-DW로 최종부피를 50 uL로 맞춘 후 total RNA에 RT-프리믹스(바이오니아, USA) 혼합용액을 사용하여 cDNA를 합성하였다. RT 반응은 65℃에서 10분동안 RNA를 변성시키고, 42℃에서 1시간 동안 역전사하여 cDNA를 합성하고, 95℃에서 5분동안 MuLV 역전사효소(reverse transcriptase)를 불활성화시키는 과정으로 진행되었다.

[0093] PCR 반응은 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 1mM dNTP, 1단위(unit) DNA중합효소(Taq polymerase), 10pmol 5′ 와 3′ p-53 프라이머(primer) 그리고 RT 생성물을 첨가하고 PCR을 수행하였다. PCR 사이클은 95℃, 10분동안 변성(denaturation)시키고, 60℃에서 40초동안 결합(annealing)시킨 후, 72℃에서 40초동안 연장(extention)시키는 과정을 거쳐 PCR 생성물을 얻었다. β-액틴(β-actin)은 internal control로 수행하였다. 이렇게 얻어진 생성물은 1.5% 아가로오스 겔에서 전기영동하여 UV(Kodak, USA)에서 관찰하였다.

표 1

[0094] 프라이머 서열

종류	서열	사이즈	서열목록
p53 정방향	5'-GTCGGCTCCGACTATACCACTATC-3'	246bp	1
p53 역방향	5'-CTCTCTTTGCACTCCCTGGGGG-3'	246bp	2
β-actin 정방향	5'-AATGCATCCTGCACCACCAA-3'	189bp	3
β-actin 역방향	5'-GTAGCCATATTCATTGTCAT-3'	189bp	4

[0095] 그 결과, p53의 mRNA의 발현양은 민들레 추출물을 투여한 DDA군에서 정상군과 대조군에서 보다 더 증가됨이 관찰되었다(도 7 참조).

[0096] **<1-8> 조직학적 관찰**

[0097] 흰쥐의 간 조직을 적출하고 Bouin 용액을 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100Ⅰ, 100Ⅱ와 같이 알코올 농도를 상승시켜 탈수한 다음 자일렌(xylene)으로 투명화 과정을 거친 후 파라핀으로 포매하였고, 포매된 조직을 마이크로톰(microtome)을 사용하여 5㎛ 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 슬라이드 글라스 위에 부착시키고 자일렌으로 파라핀을 제거한 다음 100%, 90%, 80% 에탄올과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담구어 함수과정을 거치게 하였다. 일반적인 간조직의 변화를 관찰하기 위해 마토실린-에오신(Hematoxylin-Eosin) 염색을 시행하였고, 교원섬유의 관찰을 위하여 반 지에손(van Gieson) 염색을 시행하였다. 그리고 캐나다 발삼(Canada balsam)으로 봉합한 후 카메라 부착 광학현미경(BX51, Olympus)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다(×200 배율).

[0098] (1)광학현미경적 관찰

[0099] A는 정상군, B는 대조군, C는 DDA군(민들레 추출물 30mg/kg/day 투여), D는 DDB군(민들레 추출물 60mg/kg/day 투여)에서의 간조직을 나타낸 것이다.

[0100] 적출한 간조직을 광학현미경으로 관찰한 결과, 정상군의 간 조직은 뚜렷한 둥근 핵을 갖고 있었고 세포질은 거의 일정하게 에오신(eosin)으로 염색되었으며, 간소엽의 구조도 잘 배열되어 있었다(도 8A 참조). DEN과 사염화탄소를 투여한 대조군은 간소엽의 구조 및 핵의 형태가 불완전하고, 일부에서 세포질 공포화가 유발된 것을 관찰할 수 있었으며, 이로 인해 세포질의 염색성은 정상군과 DDA군보다 현저히 감소되었음을 확인할 수 있었다(도 8B 참조). 그러나 민들레 추출물을 투여한 DDA, DDB군들은 간소엽의 구조가 비교적 잘 유지되어 있었고, 핵 형태가 비교적 뚜렷하였다. 또한, 세포질의 염색성은 정상군과 유사하게 관찰되었으며 세포질의 공포화 현상은 관찰되지 않았다(도 8C, 8D 참조).

[0101] (2) 교원섬유 분포의 변화

[0102] 교원섬유 분포를 관찰한 결과, 정상군 간세포에서는 교원섬유에 대한 반응성을 보이는 섬유가 관찰되지 않았다(도 9A 참조). 그러나 DEN을 단독 투여한 대조군의 간세포에서는 혈관주변으로 강한 반응성을 보였다(도 9B 참조). 민들레 추출물을 투여한 DDA, DDB군들의 간세포에서는 약한 반응성을 보이는 교원섬유들이 관찰되었다(도 9C, 9D 참조).

[0103] **<실시예 2>**

[0104] 본 발명자들은 상기 제조예에서 제조한 본 발명의 민들레 추출물이 수은으로 유발된 간손상에 미치는 영향을 알아보고자, 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0105] **<2-1> 실험동물 준비**

[0106] 본 발명자들은 8~9주된 체중 35±2g의 ICR계 웅성 흰쥐를 샘타코(오산, 대한민국)로부터 구입하여 온도 23±2℃, 습도 50±5%의 환경조건을 유지시킨 사육장(HB-404AS)에서 식이와 음용수를 제한없이 공급하면서 일주일간 적응시켰다.

[0107] **<2-2> 실험군 설정 및 시료 투여**

[0108] 실험군은 대조군, 수은 단독투여군, 수은 중독 후 민들레 추출물 투여군으로 구분하여 실험을 진행하였다. 대조군은 1차 증류수를 공급하였고, 실험군은 수은 5㎎/㎏을 1일 경구 투여하여 중독시킨 후 일반식이를 공급한 군, 수은중독 후 민들레 열수추출물 3g/kg을 1일 1회 구강투여한 군으로 구분하였다. 각 실험군을 24, 48, 72, 96시간, 1주군으로 세분하여 각 실험군 당 생쥐 10마리를 사용하였다.

[0109] **<2-3> 혈청내 아미노기전이효소(Transaminase) 활성측정**

[0110] 실험 24시간 전부터 절식시킨 생쥐를 가벼운 에테르(ether) 마취 하에서 개복한 후 심장에서 혈액을 채취하고 간을 절취하였다. 채취한 혈액은 5㎖ 진공튜브(Greiner, Austria)에 담아 실온에서 30분 이상 방치한 후 3000rpm에서 각각 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청은 혈액자동분석기를 이용하여 AST(SGOT), ALT(SGPT)를 분석하였다.

[0111] 그 결과, 혈청 내 포함되어 있는 AST 수치는 대조군에 비하여 수은 투여군과 민들레 투여군 모두에서 감소하였으나 24시간군($P<0.05$)을 제외하고는 통계학적 유의성은 없었다. 민들레 투여군은 수은 투여군에 비하여 AST 수치가 감소하였으나 1주일군($P<0.05$)을 제외하고는 통계학적 유의성은 없었다(도 10 참조). ALT 수치는 대조군에 비해 수은 투여군은 증가하고 민들레 투여군에서는 감소하였으나 수은투여군의 96시간군($P<0.05$)을 제외하고는 통계학적 유의성은 없었다. 민들레 투여군은 수은 투여군에 비해 ALT 수치가 감소하였으나 96시간군 ($P<0.05$)을 제외하고는 통계학적 유의성은 없었다(도 11 참조).

[0112] 따라서 본 발명자들은 상기 결과를 통해 본 발명의 민들레 추출물이 AST와 ALT 수치를 감소시킴을 확인할 수 있었다.

[0113] **<2-4> 과산화이온 불균등화효소(SOD)와 카탈라아제의 활성도 측정**

[0114] 효소활성도 측정을 위하여 간조직의 1g당 4배량의 0.25M sucrose buffer (pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 균질기(10,000×g, 2분)로 균질화하였다. 이 균질액을 4℃, 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미균질액 부분을 제거한 후 상층액을 4℃, 15,000×g에서 20분간 원심분리하여 조효소원을 분리하였다.

[0115] SOD 활성은 Beauchamp and Fridovin(1971)의 방법에 따라 50mM carbonic buffer(pH 10.2), 0.1mM EDTA, 0.1mM Xanthine, 0.025mM nitroblue tetrazolium 그리고 조효소원이 포함된 용액을 25℃에서 10분간 반응시킨 후 xanthine oxidase(3.310-6mM)를 첨가하고 550nm에서 NBT의 광환원 정도를 측정하였다.

[0116] 카탈라아제(Catalase) 활성은 Aebi(1984) 방법에 따라 50mM potassium phosphate(pH 7.0)에 10mM H2O2와 조효소원을 가한 후 240nm에서 2분간의 흡광도 변화를 관찰하였다. 이때 1분 동안에 1uM의 H2O2를 분해하는 효소의 양을 1unit으로 하였다.

[0117] 그 결과, 간조직 중 SOD 활성은 대조군에 비하여 민들레 투여군의 SOD 활성 억제효율이 더욱 높게 나타났으며 통계학적으로 유의하였다($P<0.01$). 수은 투여군에 비하여 민들레 투여군에서 SOD 활성이 억제되었으나 48시간, 1주일군을 제외하고 통계학적 유의성은 없었다(도 12 참조). 카탈라아제 활성은 민들레 투여군에서 시간 경과에 따라 낮아졌으며 대조군과 비교하여 72시간군부터 통계학적으로 유의성을 나타내었다($P<0.05$). 수은 투여군에 비하여 민들레 투여군에서 활성은 낮았으나 통계학적 유의성은 없었다(도 13 참조).

[0118] 따라서 본 발명자들은 상기 결과를 통해 본 발명의 민들레 추출물이 SOD와 카탈라아제 활성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0119] **<2-5> 조직학적 관찰**

[0120] (1) 광학현미경적 관찰

[0121] 광학현미경 관찰을 위하여 간을 10% Normal buffered formalin(NBF)에 24시간 고정한 후, 수세한 다음 에탄올 계열(70%, 80%, 90%, 95%, 100%)로 탈수하였다. 자일렌을 이용해 투명화시킨 후 파라핀 침투과정을 거쳐 경질 파라핀에 포매하였다. 파라핀 블럭을 마이크로톰(microtome)을 이용하여 4 ~ 5㎛로 박절한 다음, 헤마토실린-에오신(Hematoxylin-Eosin) 염색 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

[0122] 그 결과, 대조군은 간의 중심정맥을 중심으로 방사상으로 간세포삭이 배열되어 있었다(도 14 참조). 수은 투여 후 24시간군의 간 조직은 동양혈관의 내강의 팽대로 간세포삭이 불규칙하게 배열되어 있었다. 간세포 전반에 걸쳐 염증세포의 침윤 현상이 나타났다(도 15A 참조). 48시간군에서는 세포삭이 더욱 무질서하게 배열되었으며 동양혈관의 내강이 넓어져 있었다. 간세포에서의 핵의 응축현상이 현저하였으며 핵질의 밀도가 매우 낮았고 세포질 손상이 관찰되었으며 문맥주위에 염증세포의 침윤 현상이 관찰되었다(도 16A 참조). 72시간군은 간세포삭이 더욱 무질서하게 배열되고 동양혈관의 내강이 더욱 팽대되었으며 간세포의 팽대와 괴사세포가 관찰되었다. 문맥주위에 염증세포의 침윤현상이 현저하게 나타났고 호산성 현상이 관찰되었다(도 17A 참조). 96시간군은 간세포삭이 어느 정도 질서있는 배열을 이루었으나 동양혈관의 약간의 팽대 현상이 관찰되었고 일부에서 괴사세포가 관찰되었다. 간동맥 주변 조직의 손상이 매우 확대되어 관찰되었다(도 18A 참조). 1주일군은 간세포삭이 질서있는 배열을 이루었으나 일부 문맥에서 세포의 침윤현상과 괴사세포가 관찰되었다(도 19A 참조).

[0123] 민들레 추출물을 투여한 24시간군은 동양혈관 내강이 약간 팽대되었으나 간세포삭이 고르게 배열되어 있었다(도 15B 참조). 48시간군에서는 약간의 동모양혈관의 내강 팽대로 간세포의 배열이 약간 불규칙해졌으며 간세포의 팽창 현상과 괴사 세포가 일부 관찰되었다(도 16B 참조). 72시간군은 간세포의 팽대로 간세포삭의 배열이 무질서해졌으며 일부에서 괴사세포가 관찰되었다. 일부 문맥에서 세포의 침윤현상이 관찰되었다(도 17B 참조). 96시간군은 간세포삭이 비교적 고르게 배열되어 있는 상태로 관찰되었으나 문맥 주변 간세포들의 팽대현상이 뚜렷하게 관찰되었다(도 18B 참조). 1주일군은 간세포삭이 비교적 고르게 배열되어 있는 상태로 관찰되었다(도 19B 참조).

[0124] 따라서 본 발명자들은 간 조직의 광학현미경적 관찰에서 수은 투여군은 심한 조직괴사가 관찰되었지만 민들레 추출물 투여군에서는 문맥주위의 약간의 괴사와 심한 호중구 침윤현상이 발생한 결과를 통해 본 발명의 민들레 추출물이 수은으로 유발된 간손상을 보호하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0125] (2) 전자현미경적 관찰

[0126] 투과전자현미경 표본을 제작하기 위하여 간조직을 신속하게 1㎣ 크기로 세절하여 2.5% 글루타르알데히드(pH 7.4, 0.1M 카코딜레이드 완충액)용액으로 4℃에서 2시간 전고정시키고, 1% 오스뮴 테트라옥사이드 용액(4℃, pH 7.4, 0.1M 카코딜레이드 완충액)으로 1시간 동안 후고정하여, 통상적인 전자현미경 시료 처리법에 따라 처리한 후 우라닐 아세테이트와 구연산납(Lead citrate)으로 이중 염색하여 JEM-100CX Ⅱ형 투과전자현미경(80kV)으로 관찰하였다.

[0127] 그 결과, 수은을 투여한 96시간군에서 간세포의 핵이 함입되어 핵막주변이 불규칙해졌으며 미토콘드리아막 또한 파괴되어 불규칙한 형태로 관찰되었다. 그리고 조면소포체의 수조는 심하게 확장되고 분절되어 층판구조를 관찰할 수 없었으며 리보솜의 탈락현상이 관찰되었다(도 20A 참조). 민들레를 투여한 96시간군에서는 핵막이 일정한 형태이고, 전자밀도가 높은 여러 모양의 미토콘드리아가 세포질 전반에 걸쳐 관찰되었다. 그리고 조면소포체는 리보솜이 부착된 상태로 층판구조를 형성한 채로 관찰되었다(도 20B 참조).

[0128] 따라서 본 발명자들은 전자현미경적 관찰에서 수은 투여군은 간세포의 핵이 함입되어 불규칙해지고 미토콘드리아와 조면소포체의 수조가 팽대되고, 리보솜의 탈락이 관찰된 반면, 민들레 추출물 투여군은 핵이 정상적인 상태로 관찰되고 전자밀도가 높은 미토콘드리아가 분포되어 있으며, 리보솜이 부착된 층판구조를 형성하는 조면소포체가 관찰된 상기와 같은 결과를 통해 본 발명의 민들레 추출물이 수은으로 유발된 간 손상을 보호하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0129] **<실시예 3>**

[0130] 본 발명자들은 상기 제조예에서 제조한 본 발명의 민들레 추출물의 세포독성 및 항산화 활성을 측정하고자, 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0131] **<3-1> 실험준비**

[0132] 흰민들레는 전남 나주와 화순에서 채취하였으며, 채취 후 -78℃에서 동결건조하여 사용하였다. 본 발명에서는 흰민들레의 잎과 뿌리를 사용하였다.

[0133] Calu-6(인간 폐암세포주), HCT-116(인간 대장암세포주) 및 SNU-601(인간 위암세포주)는 한국세포주은행으로부터 얻었다.

[0134] **<3-2> 민들레 추출물의 제조**

[0135] 신선한 민들레의 잎과 뿌리를 물로 세척한 후 바로 동결 건조시켰으며, 건조된 민들레의 잎과 뿌리를 차가운 모르타르에서 분쇄하였다. 분말은 실온에서 24시간 동안 에탄올(민들레 g당 10㎖ 95% 에탄올)로 추출하였으며, 추출물은 회전 진공 농축기를 사용하여 40℃ 아래의 온도에서 걸렀다. 농축된 추출물은 95% 에탄올에 용해하여 -4℃의 어두운 곳에 보관하였다.

[0136] **<3-3> 페놀함량의 측정**

[0137] Folin-Ciocalteu 방법(Ket al., 1999)에 따라 페놀함량을 측정하였다. Folin-Ciocalteu 시약 700㎕를 민들레 추출물 50㎕에 넣은 후 vortex를 이용하여 섞은 후 3분 동안 놔두었다. 그런 다음, 상기 혼합용액에 10% 소듐 카보네이트 용액 100㎕를 첨가하고 증류수를 넣어 전체 용액이 1㎖가 되도록 하고 완전히 섞은 후, 실온에서 약 1시간 동안 방치하였다. 흡광도는 725㎚에서 측정하였으며, 각각 다른 농도(0, 25, 50, 100, 200 and 500 mg/100g)에서 기준용액으로는 타닌산(tannic acid)을 사용하였다.

[0138] 그 결과 하기 표 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 민들레 추출물은 높은 페놀함량을 보였는데 특히 흰민들레의 잎 추출물의 경우 368±11.5 mg/g의 높은 페놀 함량을 나타내었다.

표 2

[0139] 본 발명의 민들레 추출물의 페놀함량

추출물	페놀함량(mg/100g)
흰민들레 잎 추출물(KDL)	368 ± 11.5^{a}
흰민들레 뿌리 추출물(KDR)	273 ± 15.1^{b}

[0140] **<3-4> DPPH 분석**

[0141] DPPH 분석은 described by Blois(1958)의 방법으로 수행하였다. 민들레 추출물을 에탄올 용액에서 0.2mM DPPH와 혼합한 후, 실온에서 30분 동안 방치하였다. UV 흡광도는 517㎚에서 측정하였다. RC_{50}값은 자유라디칼 농도를 50%로 감소시키는 민들레 추출물의 농도를 말하는 것으로 단위는 ㎍/㎖로 나타내었다.

[0142] 그 결과, DPPH 라디칼 소거능의 RC_{50} 값은 흰민들레 잎 추출물 87.89 ㎍/㎖, 흰민들레 뿌리 추출물은 141.32 ㎍/㎖로 BHT의 123.04 ㎍/㎖보다 높은 활성을 보여주었다.

표 3

[0143] 본 발명의 민들레 추출물의 자유라디칼 소거 활성 측정결과

추출물	DPPH 분석 (RC_{50} ㎍/㎖)
흰민들레 잎 추출물(KDL)	87.89 ± 6.2^{b}
흰민들레 뿌리 추출물(KDR)	141.32 ± 9.5^{c}
대조군(아스코르브산)	≤ 25
BHT	123.04±7.91

[0144] **<3-5> 항산화 효소 활성 분석**

[0145] (1) 조효소 추출

[0146] 민들레를 추출 버퍼(50mM 포스페이트 버퍼, pH 7.0; 1% triton X-100; 1% PVP-40)에서 균질화하였다. 균질 현탁액을 12,000rpm에서 20분 동안 원심분리한 후, 상등액을 효소활성분석에 사용하였다. 단백질 함량은 기준물질로 BSA(bovine serum albumin)을 사용하여 Bradford et al(1976)의 방법으로 측정하였다.

[0147] (2) SOD 활성 측정

[0148] SOD 활성은 Beauchamp and Fridovich (1971)의 방법으로 측정하였다. 50mM carbonic buffer(pH 10.2), 0.1mM EDTA, 0.1mM 크산틴(xanthine), 0.025mM 니트로블루 테트라졸륨(nitroblue tetrazolium) 및 조효소 추출물을 혼합하였다. 다음으로 혼합물을 20℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 3.3×10^{-6}mM 크산틴 산화효소(xanthine oxidase)를 첨가하였으며, 실온에서 240㎚에서 측정하였다.

[0149] 그 결과, 흰민들레의 잎 추출물(119 U/mg protein)이 뿌리 추출물(89 U/mg protein)보다 더 높은 SOD 항산화 효소 활성을 나타내었다(도 21 참조).

[0150] (3) APX 활성 측정

[0151] APX 활성은 Nacano and Asada(1981)의 방법으로 측정하였다. 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.0), 0.5mM 아스보르브산염(ascorbate), 0.1mM H_2O_2, 0.1 mM EDTA의 혼합용액 1㎖를 100㎕의 샘플과 함께 37℃에서 5분 동안 놔두었다. 290㎚에서 용액의 변화된 흡광도를 측정하였다.

[0152] 그 결과, 흰민들레의 잎 추출물(11 U/mg protein)이 뿌리 추출물(13.9 U/mg protein)보다 더 높은 APX 항산화 활성을 나타내었다(도 22 참조).

[0153] (4) CAT 활성 측정

[0154] CAT 활성은 H_2O_2를 사용하는 Aebi(1984)의 방법으로 측정하였다.

[0155] 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.0)와 10nM H_2O_2를 포함하는 용액을 준비하고, 실온에서 240㎚에서 분해되는 H_2O_2를 측정하였다. CAT 활성은 단백질 ㎎당 단위로 측정되며, 하나의 단위는 분당 1㎛의 H_2O_2 를 소비하는데 필요한 CAT 효소의 양으로 정의된다.

[0156] 그 결과, 흰민들레의 뿌리 추출물(2.9 U/mg protein)이 잎 추출물(4.3 U/mg protein)보다 더 높은 CAT 항산화 활성을 나타내었다(도 23 참조).

[0157] **<3-6> 세포독성 분석**

[0158] 세포독성을 분석하기 위하여 우선, Calu-6, HCT-116 및 SNU-601 세포주를 5%의 이산화탄소와 95%의 공기로 이루어진 대기, 37℃의 온도에서 배양하였다. 이때, 10% FBS(fetal bovin serum)와 1% antibiotic antimycotic solution이 공급되는 RPMI-1640 배지를 사용하여 세포주를 배양하였다.

[0159] 본 발명에 따른 민들레 추출물의 세포독성 활성은 MTT 분석으로 측정하였다. 10% FBS가 포함된 90㎕ RPMI 배지가 포함되는 각각의 96-웰 마이크로필터 플레이트에 세포(3×10^4)를 분주한 후 밤새 배양하였다. 24시간새 배양 100㎕의 새로운 배지와 추출물을 첨가하고, 플레이트를 48시간새동안 배양하였다. 그 후 세포를 1회 세척한 후 5㎎/㎖ MTT를 포함하는 FBS가 없는 배지 50㎕ 플레이트를다. 37℃에서 4시간새동안 배양한 후 배지를 버리고, 세포에 형성된 포마잔 블루(formazan blu고, 플50㎕ DMSO로 용해하였다. 540㎚에서 흡광도를 측정하였다. 대조

군과 비교했을 때 흡광도를 50%로 낮추는 농도(IC_{50})를 결정하였다. 세포생존률은 다음의 식으로 계산하였다.

[0160] 세포생존률(%) = (민들레 추출물을 처리했을 때의 흡광도/민들레 추출물을 처리하지 않을 때의 흡광도) × 100

[0161] 그 결과, 흰민들레의 뿌리 추출물을 처리했을 때의 IC_{50}의 값은 Calu-6 세포주에서는 522.34㎍/㎖, HCT-116 세포주에서는 532.74㎍/㎖, SNU-601 세포주에서는 614.85㎍/㎖로 세포독성을 나타내었다.

[0162] 또한, 흰민들레의 잎 추출물을 처리했을 때의 IC_{50}의 값은 Calu-6 세포주에서는 912.13㎍/㎖, HCT-116 세포주에서는 765.21㎍/㎖, SNU-601 세포주에서는 982.47㎍/㎖로 세포독성을 나타내었다.

표 4

[0163] 본 발명의 민들레 추출물의 세포독성 측정결과

추출물	세포주	세포독성 (IC_{50} ㎍/㎖)
흰민들레 잎 추출물(KDL)	Calu-6	912.13
	HCT-116	765.21
	SNU-601	982.47
흰민들레 뿌리 추출물(KDR)	Calu-6	522.34
	HCT-116	532.74
	SNU-601	614.85

[0164] 본 발명자들은 이러한 상기 <실시예 3>의 결과들을 통해 흰민들레의 추출물이 천연항산화제로 사용될 수 있으며, 나아가 항암식품 소재로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0165] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0166] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 DEN으로 유발된 간손상에서 호중구 함량비를 비교한 그래프이다.(Nor은 생리식염수만 처리한 정상군, Con은 DEN만 단독 처리한 대조군, DDA는 민들레 추출물을 30mg/kg 처리한 실험군, DDB는 민들레 추출물을 60mg/kg 처리한 실험군이다).

[0167] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 DEN으로 유발된 간손상에서 림프구 함량비를 비교한 그래프이다.

[0168] 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 DEN으로 유발된 간손상에서 혈청 중 AST 활성 정도를 비교한 그래프이다.

[0169] 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 DEN으로 유발된 간손상에서 혈청 중 ALT 활성 정도를 비교한 그래프이다.

[0170] 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 DEN으로 유발된 간손상에서 SOD의 활성 정도를 비교한 그래프이다.

[0171] 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 DEN으로 유발된 간손상에서 카탈라아제의 활성 정도를 비교한 그래프이다.

[0172] 도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 DEN으로 유발된 간손상에서 p53 mRNA의 발현량을 나타낸 것이다.

[0173] 도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 DEN으로 유발된 간조직을 광학현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

[0174] 도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 DEN으로 유발된 간세포의 교원섬유 분포의 변화를 van Dieson 염색법으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

[0175] 도 10은 본 발명의 다른 실시예에 따른 수은으로 유발된 간세포에 흰민들레 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여, 혈청 중 AST 활성 정도를 비교한 그래프이다.

[0176] 도 11은 본 발명의 다른 실시예에 따른 수은으로 유발된 간세포에 흰민들레 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여, 혈청 중 ALT 활성 정도를 비교한 그래프이다.

[0177] 도 12는 본 발명의 다른 실시예에 따른 수은으로 유발된 간세포에 흰민들레 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여, SOD의 활성 정도를 비교한 그래프이다.

[0178] 도 13은 본 발명의 다른 실시예에 따른 수은으로 유발된 간세포에 흰민들레 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여, 카탈라아제의 활성 정도를 비교한 그래프이다.

[0179] 도 14 내지 도 19는 는 본 발명의 다른 실시예에 따른 수은으로 유발된 간세포에 흰민들레 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여, 광학현미경적으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.(도 14: 대조군, 도 15A : 수은 투여후 24시간군, 도 15B : 민들레 추출물 투여후 24시간군, 도 16A : 수은 투여후 48시간군, 도 15B : 민들레 추출물 투여후 48시간군, 도 17A : 수은 투여후 72시간군, 도 15B : 민들레 추출물 투여후 72시간군, 도 18A : 수은 투여후 96시간군, 도 15B : 민들레 추출물 투여후 96시간군을 나타낸다).

[0180] 도 20은 본 발명의 다른 실시예에 따른 수은으로 유발된 간세포에 흰민들레 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여, 전자현미경적으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

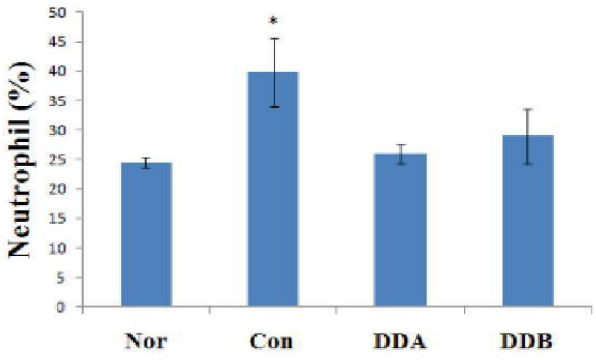
[0181] 도 21은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 흰민들레 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위하여, SOD의 활성 정도를 비교한 그래프이다.

[0182] 도 22은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 흰민들레 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위하여, APX의 활성 정도를 비교한 그래프이다.

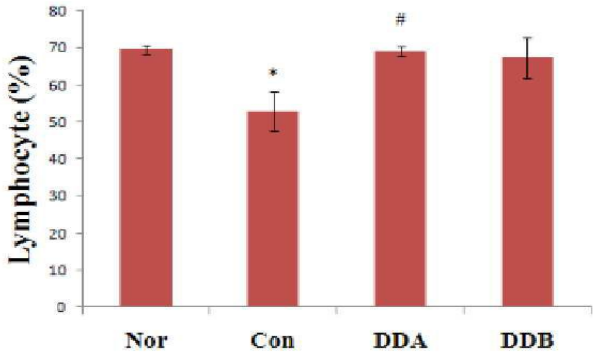
[0183] 도 23은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 흰민들레 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위하여, CAT의 활성 정도를 비교한 그래프이다.

도면

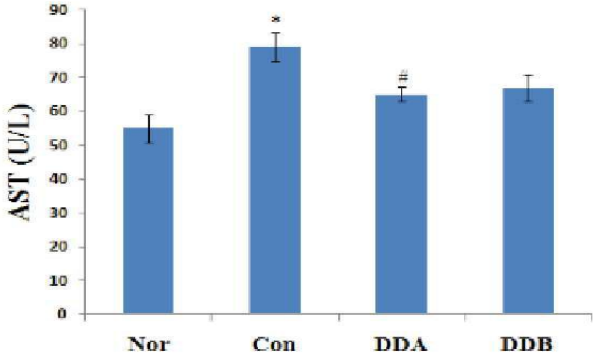
도면1



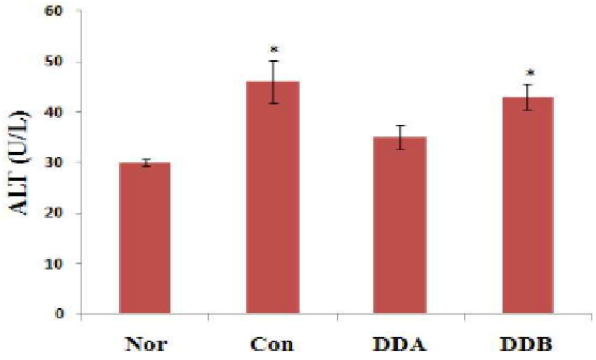
도면2


Lymphocyte (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
#
Nor
Con
DDA
DDB

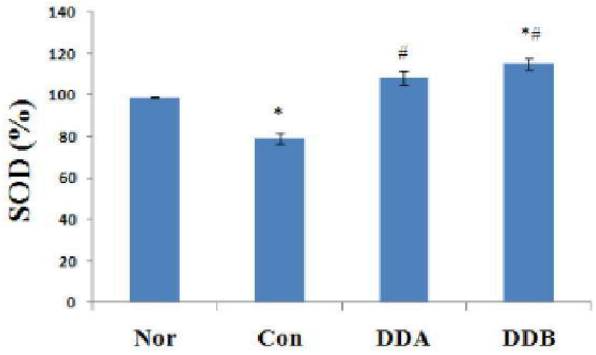
도면3


AST (U/L)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
#
Nor
Con
DDA
DDB

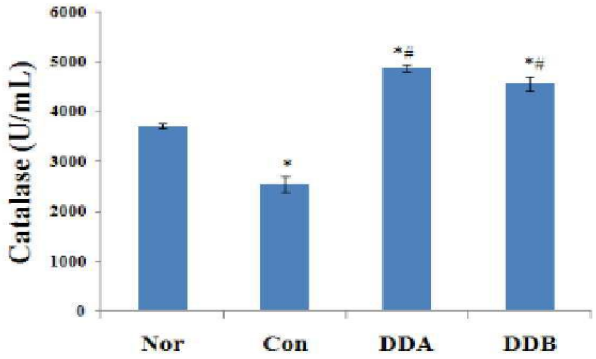
도면4


ALT (U/L)
60
50
40
30
20
10
0
*
*
Nor
Con
DDA
DDB

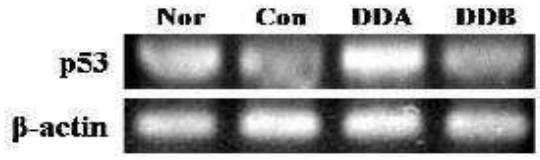
도면5


SOD (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
*
#
*#
Nor
Con
DDA
DDB

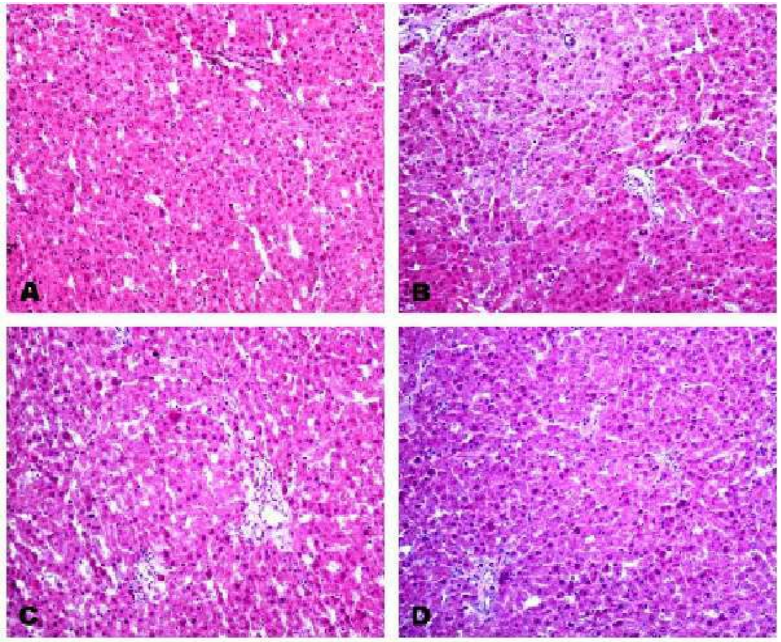
도면6


Catalase (U/mL)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
*#
*#
Nor
Con
DDA
DDB

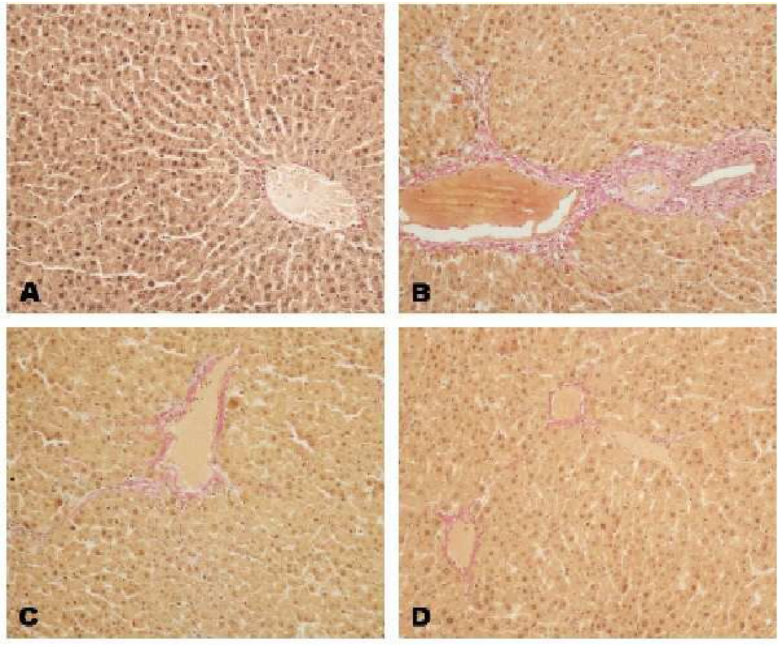
도면7


Nor
Con
DDA
DDB
p53
β-actin

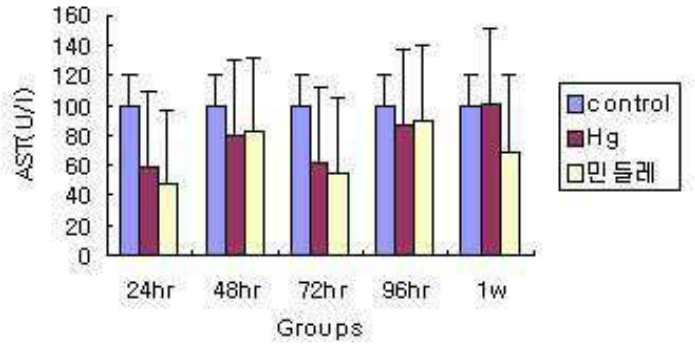
도면8



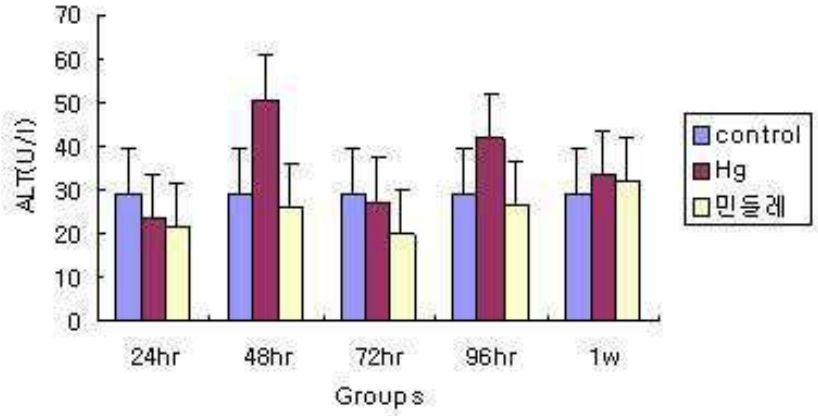
도면9



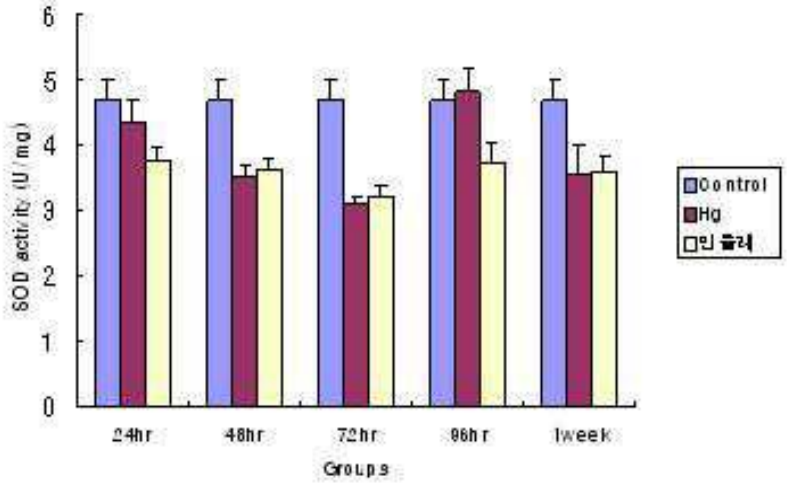
도면10



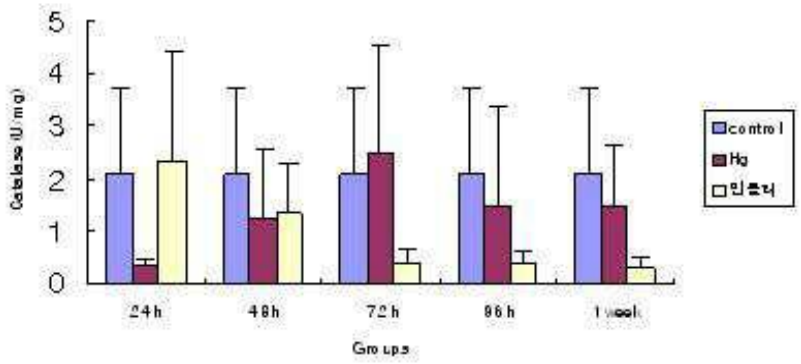
도면11



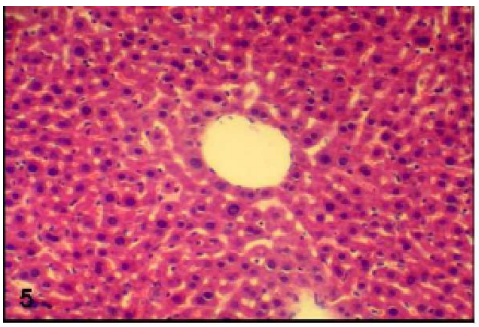
도면12



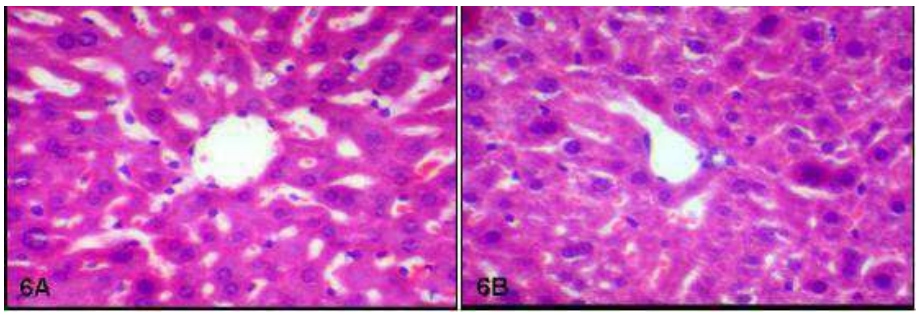
도면13



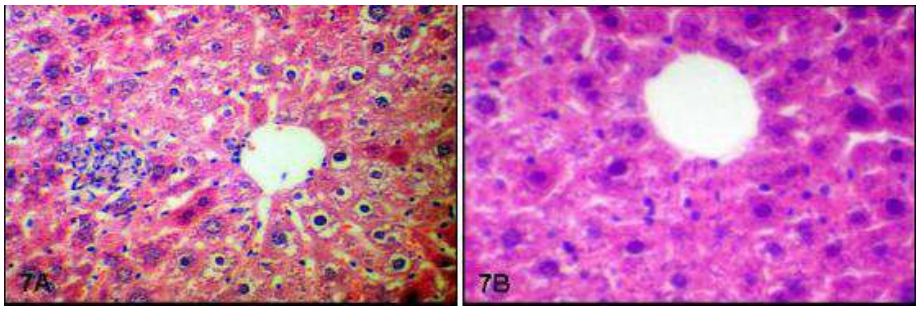
도면14



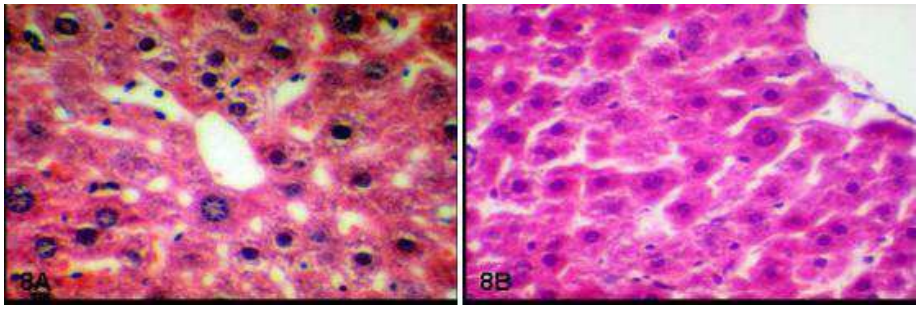
도면15



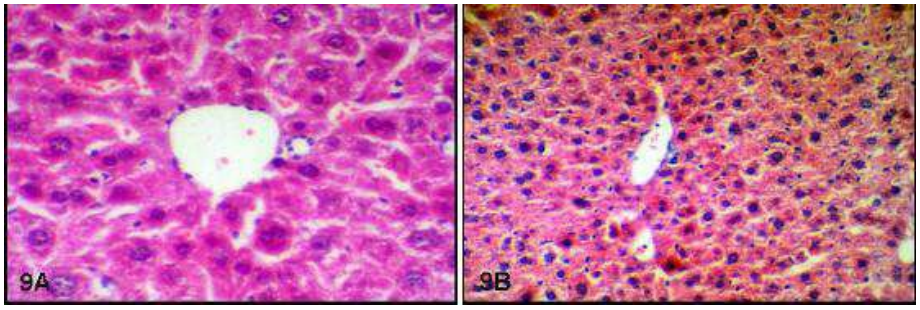
도면16



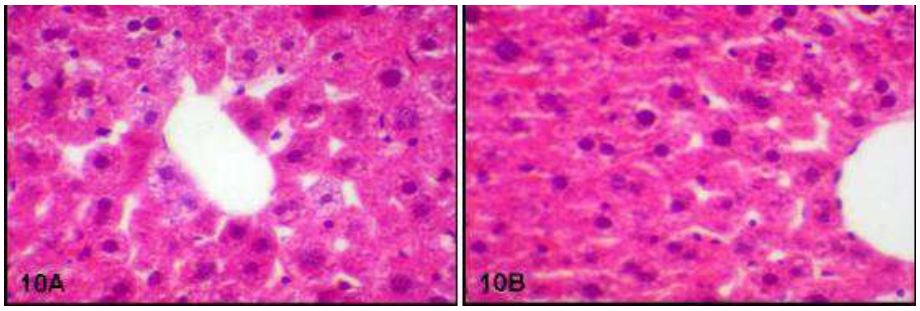
도면17



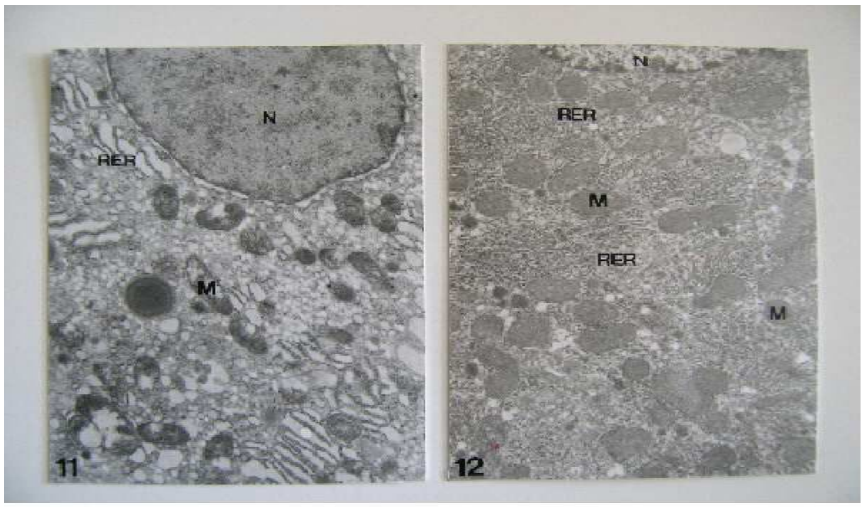
도면18



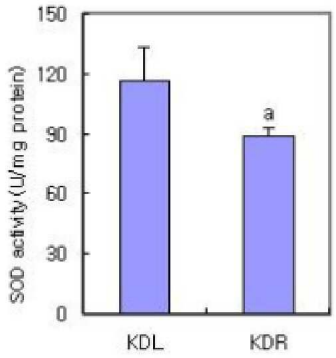
도면19



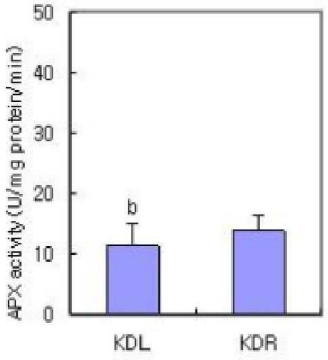
도면20



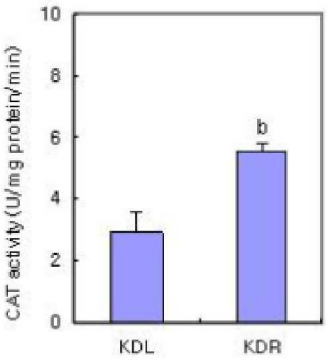
도면21



도면22



도면23



서 열 목 록

<110> INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION CHOSUN UNIVERSITY
<120> Composition for prevention and treatment of liver cancer comprising Taraxacum coreanum extracts

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> p-53 F

<400> 1
gtcggctccg actataccac tatc 24

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> p53 R

<400> 2
ctctctttgc actccctggg gg 22

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> beta-actin F

<400> 3
aatgcatcct gcaccaccaa 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> beta-actin R

<400> 4
gtagccatat tcattgtcat 20