



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0105718
(43) 공개일자 2015년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/07 (2006.01) A61K 36/537 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0027617

(22) 출원일자 2014년03월10일

심사청구일자 2014년03월10일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

권오란

서울 용산구 서빙고로 69, 105동 3401호 (용산동 5가, 파크타워아파트)

정세원

서울 종로구 평창문화로 119, 나동 102호 (평창동, 일성빌라트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

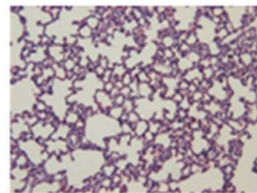
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 색전증 예방 및 치료용 약학적 조성물**

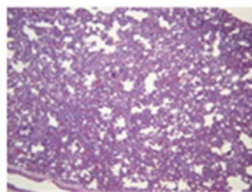
(57) 요약

본 발명은 상황버섯(*Phellinus baumii*) 및 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 색전증(thromboembolism) 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물은 폐색전증(Pulmonary thromboembolism) 유도 동물모델에서 유의적인 폐색전증 치료효과를 나타내고, 혈행개선 및 염증에 관여하는 COX 발현을 현저히 억제하며, 특히, 상황버섯 및 단삼을 5:1 중량비율로 혼합한 추출물은 단삼 또는 상황버섯과 비교하여 우수한 폐색전증 치료효과를 나타냄을 확인함으로써 상기 상황버섯과 단삼 혼합추출물은 색전증의 예방 또는 치료를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

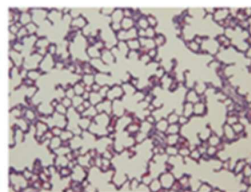
대표도 - 도1



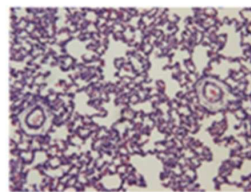
정상대조군



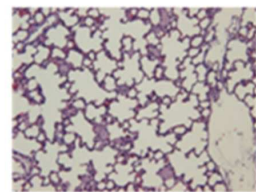
대조군



아스피린군



5:4



5:1

색전증 유도

(72) 발명자

김철민

부산광역시 남구 분포로 111 LG메트로시티1차아파트 141동 2302호

임예니

서울 서초구 서초대로74길 27, 강남역 한화오벨리스크 405호 (서초동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415131434

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 산업기술연구기반구축사업

연구과제명 항노화산업 지원을 위한 인프라구축 및 제품개발

기 여 율 1/1

주관기관 부산대학교 산학협력단

연구기간 2012.12.01 ~ 2015.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

상황버섯(*Phellinus baumii*) 및 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 색전증(thromboembolism) 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 혼합추출물은 상황버섯 및 단삼을 1:1 내지 10:1의 중량비로 혼합한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 혼합추출물은 물, C₁ 내지 C₂ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 색전증 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 혼합추출물은 상황버섯 및 단삼을 1:1 내지 10:1의 중량비로 혼합한 것을 특징으로 하는 건강식품.

청구항 6

상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 혈행개선용 약학적 조성물.

청구항 7

상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 혈행개선용 건강식품.

청구항 8

상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 항혈전용 약학적 조성물.

청구항 9

상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 항혈전용 건강식품.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 상황버섯(*Phellinus baumii*) 및 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 색전증(thromboembolism) 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

정맥혈전색전증(Venous thromboembolism: VTE)은 심부정맥혈전증(deep vein thrombosis: DVT) 또는 폐색전증(Pulmonary thromboembolism)으로 불리고 일반적으로 예방가능한 질병이다. 정맥혈전색전증은 산업화된 국가에서 1년에 1000명 중 한두 명 비율로 발생한다. 심부정맥혈전증은 주로 하반신에 발생할 뿐만 아니라 팔, 뇌의 부비강, 내장에서 발생한다. 종아리 정맥의 심부정맥혈전증은 작은 혈전과 적은 장기 후유증을 일으킨다. 그에 반해서, 근위 심부정맥혈전증은 오금, 대퇴부 및 장골 정맥에서 종종 폐색전증을 유도하고, 흔히 후혈전 증후군을 일으킨다(Tienan Zhu, Isabelle Martinez and Joseph Emmerich, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29:298-310).

[0003]

폐색전증(Pulmonary thromboembolism)은 심부정맥혈전이라고도 불리며, 신체의 다리 깊은 곳에 위치한 정맥에서 생성된 혈전이 정맥 벽에서 떨어져, 혈관을 타고 우심방, 우심실을 경유하여 폐의 혈관으로 이동하여 폐의 혈관을 막아버림으로써 발병된다. 폐색전증은 적절한 시기에만 발견되면 비교적 쉽게 치료할 수 있는 질병이지만, 호흡곤란, 실신, 기침 및 객혈 등으로 나타나는 모호하고 특징적이지 않은 초기 증상들로 인해 그 진단이 매우 어려우며, 미국에서는 매년 최소 630,000건이 발병하는 세 번째로 큰 사망의 원인으로 꼽히고 있다(대한민국 공개특허 2012-0056312호). 혈관이 손상을 입으면 혈관내피세포의 손상과 혈소판의 활성화가 일어난다. 트롬복산 A2(Thromboxane A2: TXA2), 엔도텔린(endothelin) 및 트롬빈(thrombin)과 같은 혈관 수축 인자들이 분비되어 혈관 평활근 세포의 수축을 유발하여 혈관이 수축된다. 또한, 내피세포 손상으로 산화질소(nitric oxide: NO)의 분비가 줄게 되면 혈관 수축과 혈소판 응집이 일어나게 된다. 폐색전증은 이러한 요인들로 인한 혈관손상으로 혈전이 생성되어 정맥 혈전이 쌓이게 된다. 이들 혈전이 떨어져 나가 폐동맥을 폐색시킴으로써 폐색전증으로 인한 질병, 사망이 발생하게 되는 것이다.

[0004]

사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase, 이하 'COX'라고 약칭함)는 아라키돈산(arachidonic acid, 이하 'AA'라고 약칭함)으로부터 프로스타글란딘(prostaglandins, 이하 'PGs'이라고 약칭함)의 생합성에 관여하는 효소로, 생체 내에서 COX-1과 COX-2의 두가지 이성 효소로 존재하는 것으로 밝혀져 있다(Cell , 83, 345, 1995). COX-1은 구조성 효소(constitutive enzyme)로, 정상상태에서 발현하여 위장관보호, 신장기능조절과 같은 신체의 항상성의 유지에 관여하는 반면, COX-2는 유도성 효소(inducible enzyme)으로, 염증이나 기타 면역 반응시 세포분열인자(mitogen)나 사이토카인류(cytokines)에 의해 세포내 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다(J. Biol. Chem. , 271, 33157, 1996). 비스테로이드성 소염진통제(Nonsteroidal antiinflammatory drug, 이하 'NSAIDs'라고 약칭함)들은 COX-2 효소를 억제함으로써 소염 진통효과를 나타내지만, COX-1 효소 또한 불필요하게 억제하기 때문에 위장관 출혈이나 신장 독성과 같은 부작용이 발생하는 것으로 알려져 있다(Proc. Natl. Acad. Sci . USA, 91, 3228 (1994); Proc.Natl. Acad.Sci . USA, 91, 12013(1994)). 따라서, COX-2를 선택적으로 저해할 수 있는 물질에 관한 연구가 활발히 진행되고있고(WO 9606840; Bioorg. Med. Chem. Lett. 5, 2377, 1995; Ann. Report. Med. Chem. , 211, 1997), 최근 셀레브렉스(celebrex) 또는 바이옥스(vioxx)가 COX-2를 선택적으로 억제하면서 위장관 출혈 등의 부작용을 완화시킨 약물로 개발되어 시판되고 있다.

[0005]

상황버섯(*Phellinus linteus*)은 목질진흙버섯이라고도 하며, 동의보감에서는 상목이(桑木耳)라는 이름으로 탕액편에 기록되어 있다. 갓은 지름 6 내지 12 cm, 두께 2 내지 10cm로, 반원 모양, 편평한 모양, 둥근 산 모양, 말굽 모양 등 여러 가지 모양을 하고 있다. 표면에는 어두운 갈색의 털이 짧고 촘촘하게 나있다가 자라면서 없어지고 각피화한다. 검은빛을 띤 갈색의 고리 홈이 나 있으며 가로와 세로로 등이 갈라진다. 가장자리는 선명한 노란색이고 아랫면은 황갈색이며 살도 황갈색이다. 자루가 없고 포자는 연한 황갈색으로 공 모양이다. 다년생으로 뽕나무 등에 겹쳐서 나는 목재부후균이며, 초기에는 진흙 덩어리가 뭉쳐진 것처럼 보이다가 다 자란 후에는 나무 그루터기에 혀바닥을 내민 모습이어서 수설(樹舌)이라고도 한다. 상황버섯이 함유하고 있는 다당

체가 면역체계를 활성화시켜 항암 활성 및 면역활성, 항종양 효과를 나타내는 것으로 널리 알려져 있어 지금까지 우리나라를 비롯하여 일본과 중국 등에서 많은 연구가 진행되어 있고, 연구결과에서 상황버섯의 다당체 성분이 항암 및 면역 증강에 효과가 있는 것으로 나타났으며, 귀중한 약재로서 한국에서는 대량으로 재배하고 있다. 약용하기 위해 달이면 노란색이거나 연한 노란색으로 맑게 나타나며, 맛과 향이 없는 것이 특징이다. 맛이 순하고 담백하여 먹기에도 좋으며, 한국, 일본, 오스트레일리아, 북아메리카 등에 자생한다.

[0006]

자소과 식물(Labiatae)의 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)은 중국 동북 산야에서 자생 또는 재배되는 다년생 초본이다. 단삼에는 페난트라퀴논(phenanthraquinone)계 색소:탄시논(tanshinone) I 자갈색 (I), 탄시닌(tanshinone) II 적색 (II), 크립토탄시논(cryptotanshinone) 등색 (III), 그밖에 탄시놀(tanshinol) I, II가 알려져 있다. 그러나 이 성분들의 약리작용에 대해서는 아직 알려진 바 없고, 단삼의 수침액은 각종 피부진균에 대하여 약간의 억제작용이 있는 것으로 알려진바 있으나, 단삼 및 상황버섯 혼합추출물의 폐색전증(pulmonary embolism)에 대한 효과에 대해서는 알려진바 없다.

[0007]

이에, 본 발명자들은 색전증 예방 및 치료제를 개발하기 위하여 연구하던 중, 상황버섯과 단삼이 혼합된 혼합추출물이 폐색전증이 유도된 랫트에서 유의적인 마비증상 개선효과, 혈전형성 감소효과 및 혈관손상 보호효과를 나타내고, 혈전생성 및 염증에 관여하는 COX 발현을 유의적으로 억제하며, 특히 단삼 또는 상황버섯과 비교하여 상황버섯 및 단삼 혼합추출물이 현저한 폐색전증 치료효과를 나타냄을 확인함으로써 상기 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 색전증 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

본 발명의 목적은 상황버섯(*Phellinus baumii*) 및 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 색전증(thromboembolism) 및 혈행개선 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상황버섯(*Phellinus baumii*) 및 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 색전증(thromboembolism) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010]

또한, 본 발명은 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 색전증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0011]

또한, 본 발명은 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 혈행개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012]

또한, 본 발명은 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 혈행개선용 건강식품을 제공한다.

[0013]

또한, 본 발명은 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 항혈전용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014]

아울러, 본 발명은 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 항혈전용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0015]

본 발명의 상황버섯(*Phellinus baumii*) 및 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 혼합추출물은 폐색전증(Pulmonary thromboembolism) 유도 동물모델에서 유의적인 폐색전증 치료효과를 나타내고, 혈행개선 및 염증에 관여하는 COX 발현을 현저히 억제하며, 특히, 상황버섯 및 단삼을 5:1 중량비율로 혼합한 추출물은 단삼 또는 상황버섯과 비교하여 우수한 폐색전증 치료효과를 나타냄을 확인함으로써 상기 상황버섯과 단삼 혼합추출물은 색전증(thromboembolism)의 예방 또는 치료를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1은 색전증을 유도한 폐 조직에서 폐병변에 대한 상황버섯 및 단삼 혼합추출물의 효과를 나타내는 도이다.

도 2는 색전증을 유도한 후 동맥을 분리하여 동맥 두께 변화에 대한 상황버섯 및 단삼 혼합추출물의 효과를 나타내는 도이다.

도 3은 색전증을 유도한 랫트에서 COX-1 및 COX-2 단백질 발현 정도에 대한 상황버섯 및 단삼 혼합추출물의 효과를 웨스턴 블롯을 통해 확인하여 나타낸 도이다:

(A)는 웨스턴 블롯 분석으로 COX-1 및 COX-2 단백질 발현 정도를 나타내며, (B)는 (A)의 COX-1 단백질 발현 정도를 정량화하여 그래프로 나타낸 것이며, (C)는 (A)의 COX-2 단백질 발현 정도를 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

Saline : 생리식염수;

AS : 아스피린군;

PB : 상황버섯;

SM : 단삼.

도 4는 색전증을 유도한 랫트에서 TXA2 및 PGE2 발현 정도에 대한 상황버섯 및 단삼 혼합추출물의 효과를 확인하여 나타낸 도이다:

(A)는 TXA2의 발현 정도를 나타내며, (B)는 PGE2의 발현 정도를 나타낸다.

Saline : 생리식염수;

AS : 아스피린군;

PB : 상황버섯;

SM : 단삼.

도 5는 혈관내피세포에서 PCA에 의해 생성되는 산화질소를 측정하여 나타낸 도이다:

(A)는 산화질소 생산을 녹색 형광으로 나타내며, (B)는 DAF-2를 이용해서 산화질소 생산량을 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 혈관내피세포에서 T2A에 의해 생성되는 산화질소를 측정하여 나타낸 도이다:

(A)는 산화질소 생산을 녹색 형광으로 나타내며, (B)는 DAF-2를 이용해서 산화질소 생산량을 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 혈관내피세포에서 상황버섯:단삼 = 5:1 비율 혼합추출물에 의해 생성되는 산화질소를 측정하여 나타낸 도이다:

(A)는 산화질소 생산을 녹색 형광으로 나타내며, (B)는 DAF-2를 이용해서 산화질소 생산량을 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 혈관내피세포에서 eNOS의 인산화에 대한 T2A, PCA 및 상황버섯과 단삼 5:1 비율 혼합추출물의 효과를 확인하여 나타낸 도이다.

PB : 상황버섯;

SM : 단삼.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

- [0018] 본 발명은 상황버섯(*Phellinus baumii*) 및 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 색전증(thromboembolism) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 상황버섯 및 단삼 혼합추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0020] 1) 상황버섯 및 단삼에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0021] 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및
- [0022] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.
- [0023] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출용매는 물, C1 내지 C2 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출용매는 건조된 상황버섯 및 단삼에 0.1 내지 10배로 하는 것이 바람직하고, 0.3 내지 5배 첨가하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 추출온도는 20 내지 70℃인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출시간은 12 내지 48시간인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것일 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것일 수 있으나 이에 한정하지 않는다.
- [0025] 상기 혼합추출물은 상황버섯 및 단삼을 1:1 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 바람직하고, 10:3 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 보다 바람직하며, 5:1의 중량비로 혼합하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 상기 혼합추출물은 상황버섯 및 단삼을 혼합한 후 추출할 수 있고, 상황버섯 및 단삼을 각각 추출한 추출물을 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 상기 색전증은 폐색전증(Pulmonary thromboembolism)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 실험동물에서의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물의 색전증 예방 및 치료 효과를 확인하기 위해서, 상황버섯 및 단삼 추출물을 제조하였고, 이를 혼합하여 각 실험군 별 투여하였고(표 1 참조), 콜라겐과 에피네프린을 이용하여 폐색전증을 유도한 랫트에서 상황버섯 및 단삼 혼합추출물의 효과를 확인하였다(표 2 참조).
- [0029] 또한, 본 발명자들은 실험동물의 폐 조직학적 변화를 확인하기 위하여 폐 조직을 떼어내어 슬라이드를 만들어 확인한 결과, 비율을 달리한 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 투여군에서 간질의 증가 및 혈전 형성이 대조군에 비해 감소하였고, 특히, 혼합추출물 비율 5:1 군이 혼합추출물 5:4 군에서보다 정상대조군과 비슷하게 혈전 형성이 적은 것을 확인하였고(도 1 참조), 동맥 조직학적 두께 변화를 확인하기 위하여 동맥을 분리하여 슬라이드를 만들어 확인한 결과, 비율을 달리한 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 투여군에서 정상대조군의 동맥 두께와 유사하게 정상적인 두께를 유지하였고, 특히, 혼합추출물 비율 5:4 군에서 혼합추출물 비율 5:1 군에 비해 혈관 내 탄력 섬유 간의 간격이 벌어져 혈관이 두꺼워진 것을 관찰하였다. 따라서, 콜라겐, 에피네프린으로 인한 혈관 손상에 대한 보호 효과가 혼합추출물 5:1 군이 5:4 군에 비해 크다는 것을 확인하였다(도 2 참조).
- [0030] 또한, 본 발명자들은 단핵 세포에서 COX-1과 COX-2 발현 정도와 이에 따른 혈장에서의 TXA2와 PGE2 생성 정도를 확인하기 위하여 랫트의 복부 동맥에서 혈액을 채취하여 단백질을 추출하여 확인한 결과, COX-1 발현은 혼합추출물 5:1 비율에서 정상대조군과 비슷한 발현 수준을 통계적 유의성을 가지며 나타내었고, COX-2 발현은 혼합추출물 5:1 비율에서 아스피린과 함께 정상대조군과 비슷한 발현을 나타냄을 확인하였고(도 3 참조), TXA2에서는 혼합추출물 비율 두 군 모두에게서 폐색전증 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, PGE2에서는 혼합추출물 5:4 군에 비해 5:1 군에서 통계적으로 유의하게 정상군과 비슷한 수치를 나타냄을 확인하였다(도 4 참조).
- [0031] 또한, 본 발명자들은 세포에서의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물의 색전증 예방 및 치료 효과를 확인하기 위하여 혈관내피세포를 배양하여 산화질소의 생성을 확인한 결과, 상황버섯 지표물질인 PCA는 농도 의존적으로 세포 내 산화질소의 발현이 증가하고 세포 밖 산화질소의 발현 또한 증가하며(도 5 참조), 단삼 지표물질인 T2A는 농도에 상관없이 산화질소 생성에 아무런 효과를 나타내지 않았으나(도 6 참조), 5:1 비율 혼합추출물에서는 농도가 증가함에 따라 산화질소 생성이 세포 안과 밖 모두에게서 농도 의존적으로 증가함을 확인하였고(도 7 참조), 혈

관확장물질인 eNOS의 인산화 정도를 확인한 결과, PCA와 T2A는 대조군 대비 아무런 차이가 없으나 5:1 비율 혼합추출물에서는 3배 이상의 eNOS 인산화가 일어남을 확인하였다(도 8 참조). 이를 통해 상황버섯 및 단삼 5:1 혼합추출물은 상황버섯 및 단삼 각각의 효과에 비해 현저한 효과를 가짐을 확인하였다.

[0032] 따라서, 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물은 폐색전증 유도 동물모델에서 유의적인 폐색전증 치료효과를 나타내고, 혈행개선 및 염증에 관여하는 COX 발현을 현저히 억제하며, 특히, 상황버섯 및 단삼을 5:1 중량비율로 혼합한 추출물은 상황버섯 또는 단삼과 비교하여 우수한 폐색전증 치료효과를 나타냄을 확인함으로써 상기 상황버섯과 단삼 혼합추출물은 색전증의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0033] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0034] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0035] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 조성물은 비경구 투여시 피부 외용 또는 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사를 통할 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 색전증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0038] 상기 혼합추출물은 상황버섯 및 단삼을 1:1 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 바람직하고, 10:3 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 보다 바람직하며, 5:1의 중량비로 혼합하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0039] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물은 폐색전증 유도 동물모델에서 유의적인 폐색전증 치료효과를 나타내고, 혈행개선 및 염증에 관여하는 COX 발현을 현저히 억제하며, 특히, 상황버섯 및 단삼을 5:1 중량비율로 혼합한 추출물은 단삼 또는 상황버섯과 비교하여 우수한 폐색전증 치료효과를 나타냄을 확인함으로써 상기 상황버섯과 단삼 혼합추출물은 색전증의 예방 또는 개선을 위한 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0040] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0041] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

- [0042] 본 발명의 건강 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100g 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g 이다.
- [0043] 상기 외에 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 혈행개선용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0045] 상기 혼합추출물은 상황버섯 및 단삼을 1:1 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 바람직하고, 10:3 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 보다 바람직하며, 5:1의 중량비로 혼합하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물은 폐색전증 유도 동물모델에서 유의적인 폐색전증 치료효과를 나타내고, 혈행개선 및 염증에 관여하는 COX 발현을 현저히 억제하며, 특히, 상황버섯 및 단삼을 5:1 중량비율로 혼합한 추출물은 단삼 또는 상황버섯과 비교하여 우수한 폐색전증 치료효과를 나타냄을 확인함으로써 상기 상황버섯과 단삼 혼합추출물은 혈행개선용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0047] 또한, 본 발명은 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 혈행개선용 건강식품을 제공한다.
- [0048] 상기 혼합추출물은 상황버섯 및 단삼을 1:1 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 바람직하고, 10:3 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 보다 바람직하며, 5:1의 중량비로 혼합하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물은 폐색전증 유도 동물모델에서 유의적인 폐색전증 치료효과를 나타내고, 혈행개선 및 염증에 관여하는 COX 발현을 현저히 억제하며, 특히, 상황버섯 및 단삼을 5:1 중량비율로 혼합한 추출물은 단삼 또는 상황버섯과 비교하여 우수한 폐색전증 치료효과를 나타냄을 확인함으로써 상기 상황버섯과 단삼 혼합추출물은 혈행개선을 위한 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0050] 또한, 본 발명은 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 항혈전용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0051] 상기 혼합추출물은 상황버섯 및 단삼을 1:1 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 바람직하고, 10:3 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 보다 바람직하며, 5:1의 중량비로 혼합하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물은 폐색전증 유도 동물모델에서 유의적인 폐색전증 치료효과를 나타내고, 혈행개선 및 염증에 관여하는 COX 발현을 현저히 억제하며, 특히, 상황버섯 및 단삼을 5:1 중량비율로 혼합한 추출물은 단삼 또는 상황버섯과 비교하여 우수한 폐색전증 치료효과를 나타냄을 확인함으로써 상기 상황버섯과 단삼 혼합추출물은 항혈전용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0053] 또한, 본 발명은 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 항혈전용 건강식품을 제공한다.
- [0054] 상기 혼합추출물은 상황버섯 및 단삼을 1:1 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 바람직하고, 10:3 내지 10:1의 중량비로 혼합하는 것이 보다 바람직하며, 5:1의 중량비로 혼합하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0055] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물은 폐색전증 유도 동물모델에서 유의적인 폐색전증 치료효과를 나타내고, 혈행개선 및 염증에 관여하는 COX 발현을 현저히 억제하며, 특히, 상황버섯 및 단삼을 5:1 중량비율로 혼합한 추출물은 단삼 또는 상황버섯과 비교하여 우수한 폐색전증 치료효과를 나타냄을 확인함으로써 상기 상황버섯과 단삼 혼합추출물은 항혈전을 위한 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0056] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0057] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0058] <실시예 1> 상황버섯(*Phellinus baumii*) 추출물의 제조

[0059] 본 발명에 사용된 상황버섯 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0060] 구체적으로, 상황버섯(경기도 두원농산, 한국) 10kg을 세척 및 건조하여 추출탱크에 투입하고, 80% 에탄올을 상황버섯 중량의 5배로 첨가하고 60℃에서 3시간 환류냉각 추출하였다. 상기 추출과정에서 추출액은 종이 여과지로 여과하였으며, 상기 여과액에 다시 80% 에탄올을 첨가하고, 60℃에서 3시간 동안 추출하고, 추출액은 종이 여과지를 이용하여 여과하였다. 상기 여과액은 50℃ 이하에서 감압농축하였다.

[0061] <실시예 2> 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 제조

[0062] 본 발명에 사용된 단삼 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0063] 구체적으로, 단삼(NutraMax, 중국)을 세척하여 건조시켜 10kg을 추출탱크에 투입하고, 상기 <실시예 1>과 동일한 방법으로 단삼 추출물을 제조하였다.

[0064] <실시예 3> 상황버섯 및 단삼 혼합추출물의 제조

[0065] 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 제조하기 위하여, 상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>에서 제조한 상황버섯 추출물 및 단삼 추출물을 각각 5:4 또는 5:1 중량 비율로 혼합하여, 상황버섯 및 단삼 5:4 혼합추출물 또는 상황버섯 및 단삼 5:1 혼합추출물을 제조하였다.

[0066] <실시예 4> 실험 동물에서의 상황버섯과 단삼 혼합추출물의 색전증(thromboembolism) 예방 및 치료 효과 확인

[0067] <4-1> 실험 동물의 준비

[0068] 상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>의 방법으로 제작된 상황버섯 및 단삼 추출물을 혼합하여 실험 동물에 투여하여 색전증 예방 및 치료 효과를 확인하였다.

[0069] 구체적으로, 실험 동물은 생후 5주령의 sprague-dawley종(중앙실험동물 구매) 수컷 흰 쥐 40마리를 대상으로 하였다. 실험 동물은 한 마리씩 스테인레스강 우리에서 사육하였고, 식이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 동물 사육실은 온도 23±1℃, 습도 50±5% 내외로 유지시켰으며, 조명 주기는 12시간 주기로 일정하게 하였다. 실험 동물은 1주일 간 실험실 환경에 적응시킨 후 난괴법에 의해서 8마리씩 5그룹으로 나누었다. 실험군 및 각 실험군 별 투여 추출물은 하기 [표 1]과 같이 설정하였다.

표 1

실험 디자인

[0070]

	실험군	투여 추출물
정상군 (Sham 주사)	정상군	생리식염수(Saline) 투여

폐색전증 유도군 (콜라겐, 에피네프린 주사)	대조군	생리식염수(Saline) 투여
	아스피린군(AS)	아스피린(AS) 150mg/kg b.w/day 투여
	상황버섯(PB) : 단삼(SM) = 5 : 4	상황버섯(PB) 500mg/kg b.w/day + 단삼(SM) 400mg/kg b.w/day 투여
	상황버섯(PB) : 단삼(SM) = 5 : 1	상황버섯(PB) 500mg/kg b.w/day + 단삼(SM) 100mg/kg b.w/day 투여

[0071] <4-2> 폐색전증(Pulmonary thromboembolism) 유도로 인한 마비증상 보호 효과 확인

[0072] 상기 [표 1]의 시험물질 투여는 1일 1회 경구투여로 7일간 진행하였으며, 마지막 날 12시간 절식시킨 랫트에 시험물질을 경구투여하고 1시간 후 콜라겐(collagen)(Chrono-log)과 에피네프린(epinephrine)(Chrono-log) 혼합용액 (150ug 콜라겐 + 3ug 에피네프린/rat)을 꼬리정맥에 주사한 후 15분간 폐동맥 경색에 의한 마비의 지속 또는 마비로부터의 회복 여부를 관찰하여 시험물질의 폐색전증(Pulmonary thromboembolism)에 대한 효과를 확인하였다.

[0073] 구체적으로, 랫트에 콜라겐과 에피네프린의 혼합용액을 주사하면 혈전형성에 의하여 급성 폐경색이 발생하며 전신마비를 거쳐 15분 이상 마비가 지속됨을 관찰하게 된다. 이에 [표 2]에 개시된 바와 같이 정상 대조군에 비해 콜라겐과 에피네프린에 의해 폐색전증이 유도된 대조군에서는 8마리 중 5마리가 마비증상을 나타내어 37.5%의 보호효과만을 나타냈다. 아스피린군에서는 8마리 중 2마리만이 마비증상을 나타내어 75%의 보호효과를 나타내었고 혼합추출물 군에서는 상황버섯:단삼 비율이 5:4 또는 5:1 모두에게서 폐색전증에 대해 62.5%의 보호효과를 나타내었다. 정상 대조군에 비해 폐색전증이 유도된 대조군에서만 마비증상이 통계적으로 유의적으로 높게 나타났으므로 혼합추출물 군에서 폐색전증에 대한 보호효과가 있음을 확인하였다(표 2).

[0074] 표 2

랫트의 폐색전증에서 상황버섯과 단삼 혼합추출물의 효과

	Dose (mg/kg)	No.paralyzed/No.tested	Protection (%)
정상대조군	Saline	0/8	100
대조군	Saline	5/8	37.5
아스피린군	150	2/8	75
상황버섯 + 단삼	500 + 400	3/8	62.5
상황버섯 + 단삼	500 + 100	3/8	62.5

[0075] <4-3> 폐 조직학적 변화 확인

[0076] 상기 [표 1]에서 준비한 실험동물의 폐 조직학적 변화를 확인하기 위하여 폐 조직을 떼어내어 10% 포르말린에 24시간 이상 고정시킨 후 파라핀 블록을 만들어서 5um로 절단하여 슬라이드를 만들었다. 폐 조직 슬라이드들을 헤마톡시린(hematoxylin)과 에오진(eosin)을 이용하여 헤마톡시린-에오진 염색(H&E staining)을 하여 광학 현미경을 이용하여 병리학적 검사를 하였다.

[0077] 혈관 내 혈전 생성이 많이 될수록 폐포 크기가 작아지게 되는 폐병변에 대한 혼합추출물의 효과를 확인한 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 콜라겐과 에피네프린을 투여하여 폐병변을 유발시킨 군(대조군)에서는 정상 대조군에 비해 심한 간질의 증가와 더불어 혈관 내 혈전이 관찰되었다. 반면, 아스피린군에서는 폐병변이 대조군에 비하여 실질 증가 및 혈전 형성이 눈에 띄게 감소하였다. 비율을 달리한 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 투여군에서도 아스피린군과 유사하게 간질의 증가 및 혈전 형성이 대조군에 비해 감소하였다. 특히, 혼합추출물 비율 5:1 군이 혼합추출물 5:4 군에서보다 정상대조군과 비슷하게 혈전 형성이 적은 것을 확인하였다(도 1).

[0078] <4-4> 동맥 조직학적 두께 변화 확인

[0079] 상기 [표 1]에서 준비한 실험동물의 동맥 조직학적 두께 변화를 확인하기 위하여 동맥을 분리하여 OCT 컴파운드(compound)(Sakura Finetek USA Inc.)를 이용하여 -70℃에서 얼려 블록을 만든 후 동결절단기(cryostat microtome)(Leica)을 이용하여 -20℃에서 5um의 두께로 동결 절편하여 슬라이드를 만들었다. 동맥 조직 슬라이

드들을 헤마톡시린과 에오진을 이용하여 헤마톡시린-에오진 염색을 하여 광학 현미경을 이용하여 동맥의 두께 변화를 확인하였다.

[0080] 동맥 두께 변화에 대한 혼합추출물의 효과를 확인한 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 콜라겐과 에피네프린을 투여하여 폐병변을 유발시킨 군(대조군)에서는 정상대조군에 비해 혈관 내 탄력 섬유 간의 간격이 눈에 띄게 벌어져 혈관벽의 두께가 두꺼워짐을 확인하였다. 반면, 비율을 달리한 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 투여군에서는 정상대조군의 동맥 두께와 유사하게 정상적인 두께를 유지하였다. 특히, 혼합추출물 비율 5:4 군에서 혼합추출물 비율 5:1 군에 비해 혈관 내 탄력 섬유간의 간격이 벌어져 혈관이 두꺼워진 것을 관찰하였다. 따라서, 콜라겐, 에피네프린으로 인한 혈관 손상에 대한 보호 효과가 혼합추출물 비율 5:1 군이 5:4 군에 비해 크다는 것을 확인하였다(도 2).

[0081] <4-5> 단핵 세포(MNC, mononuclear cell)에서 COX-1, COX-2 발현 확인

[0082] COX(Cyclooxygenase)는 아라키돈산을 프로스타글란딘(PG)으로 변환시키는 효소로서 세포증식과 발암물질의 활성화에 관여하는데, COX-1과 COX-2 두 종류가 있다. COX-1은 대부분의 조직에 존재하며 PG를 생성함으로써 인체의 항상성을 유지하며 혈류 유지, 세포분화, 점액의 생성에 관여한다. 여기서 COX-1을 억제시키게 되면 혈소판 응집 인자인 TXA2의 생성을 막아 항혈소판 작용이 나타나게 된다. COX-2는 주로 염증부위에서 PG 생성과 관련이 있다. COX-2는 염증이 있을 때 사이토카인으로부터 유도되며 특히 PGE2는 염증과 통증의 매개물질로서 중요한 역할을 한다.

[0083] 이에, 본 발명자들은 콜라겐, 에피네프린으로 색전증을 유도하였을 때 단핵백혈구에서 COX-1, COX-2의 단백질 발현 정도와 이에 따른 혈장에서의 TXA2, PGE2 생성 정도를 확인하였다.

[0084] 구체적으로, 랫트의 복부 동맥에서 혈액을 채취하였다. 이때 혈액 응고 방지를 위해 EDTA(ethylene diamine tetra acetate) 튜브에 담은 후 원심분리 한 후 혈장을 분리하고 히스토페이크(Histopaque)1077(Sigma)을 이용하여 단핵 세포를 분리하여 실험 전까지 -70℃에 보관하였다.

[0085] 단핵 세포는 1×10^5 cell/ml이 되도록 한 후 용해시켜서 단백질을 추출하였다. 단백질 정량은 BSA(bovine serum albumin, Bradford)법을 사용하였다. 정량된 단백질 시료 30ug은 10% SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF(polyvinylidene difluoride)멤브레인(membrane)(Bio-Rad)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% BSA를 포함하는 0.1% TBST(Tris-buffered saline)으로 -4℃에서 하룻밤 블로킹시켰다. TBST로 씻은 후 1차 항체(COX-1, COX-2(1:200 dilution; Santa Cruz), β -actin(1:1000 dilution; Santa Cruz))가 들어있는 5% BSA 액으로 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 5분씩 3회 씻은 후 2차 항체와 함께 상온에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBST에 씻은 뒤 ECL system(Invitrogen biotechnology)로 밴드를 가시화하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+(Bio-Rad)를 이용하였다.

[0086] 웨스턴 블롯 분석으로 COX-1, COX-2 발현 정도를 측정하여 도 3에 나타내었으며, 정량화하여 그래프로 나타내었다.

[0087] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, COX-1 발현은 통계적으로 유의하게 정상대조군에 비해 폐색전증을 유도한 대조군에서 COX-1의 발현이 2.7배 증가하였고, 혼합추출물 5:4 비율에서 2배 증가하였다. 반면, 혼합추출물 5:1 비율에서는 정상대조군과 비슷한 발현 수준을 통계적 유의성을 가지며 나타내었다.

[0088] 또한, COX-2 발현은 통계적으로 유의하게 정상대조군에 비해 폐색전증을 유도한 대조군에서 4.3배 증가하였다. 혼합추출물 5:4 비율에서는 3.7배 증가하였으나 혼합추출물 5:1 비율에서는 아스피린과 함께 정상대조군과 비슷한 발현을 나타냄을 확인하였다(도 3).

[0089] <4-6> TXA2, PGE2 생성 확인

[0090] COX 발현을 확인한 결과, 폐색전증을 유도한 대조군에서는 COX-1 증가로 인해 혈전생성물질인 TXA2를 많이 만들어 내므로, 혼합추출물 5:1 비율에서는 혈전생성예방 효과를 나타낼 것으로 보여, TXA2 및 PGE2의 수준을 측정하였다.

[0091] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 TXA2에서는 혼합추출물 비율 두 군 모두에게서 폐색전증 대조군에 비해 유의

적으로 낮게 나타났으나 두 군간에 차이는 없었다. 그러나 COX-2와 관계된 PGE2를 측정 한 결과 폐색전증을 유도한 대조군에 비해 혼합추출물 두 군 모두에게서 PGE2가 낮게 나타나며 혼합추출물 5:4 군에 비해 5:1 군에서 통계적으로 유의하게 정상군과 비슷한 수치를 나타냄을 확인하였다(도 4).

<실시에 5> 세포에서의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물의 색전증 예방 및 치료 효과 확인

동물실험에서 얻은 최적화된 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 비율 5:1과 각각의 지표물질(상황버섯 지표물질 : PCA(Protocatechuic acid), 단삼 지표물질 : T2A(Tanshinone 2A))로 HUVEC(human umbilical vein endothelial cells, 인간혈관내피세포)을 이용하여 혈관내피세포에서 생성되는 물질인 산화질소(Nitric oxide, NO)발현을 세포 안과 밖에서 농도 의존적으로 변화하는지 확인한 후 웨스턴 블롯을 통해 혈관확장물질인 eNOS(endothelial nitric oxide synthase) 발현 정도를 확인하였다.

<5-1> 혈관내피세포의 배양

혈관내피세포는 American Type Culture Collection으로부터 수득하였으며, 37℃, 5% CO₂, 95% 공기 조건에서 배양하였다. 10% FBS(Fetal bovine serum, Gibco)와 1% penicillin-streptomycin-neomycin(Gibco)이 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 사용하였다.

<5-2> 산화질소의 생성 확인

24-웰 플레이트에 웰 당 1×10^5 개의 농도로 배양한 후 90% 이상 세포가 찻을 때 실험을 진행하였다. 세포 밖 산화질소는 세포를 2시간 스타베이션(starvation) 시킨 후 농도에 맞게 시료를 처리한 후 빛 차단하여 37℃에서 10분 배양시킨다. 그 후 A23182를 처리한 후 빛 차단하여 37℃에서 5분 배양시킨다. 96-웰 플레이트에 분주 후 0.1μM DAF-2를 처리한 후 빛 차단한 채로 37℃에서 30분 배양시킨 후 형광검출기(파장 495-515nm; Thermo)로 측정하였다. 세포 내 산화질소는 세포를 2시간 스타베이션 시킨 후 DAF-2DA(diaminofluorescein-2-diacetate)를 처리한 후 빛 차단하여 37℃에서 30분 배양시킨다. HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)로 씻은 후 시료를 농도에 맞게 처리한 후 빛 차단하여 37℃에서 10분 배양시킨다. 이후 2% 파라포름알데하이드로 세포를 웰에 고정시키기 위하여 4℃에서 5분 배양시킨 후 현미경(Nikon)으로 형광 발현을 관찰하였다.

그 결과, 도 5, 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, 상황버섯 지표물질인 PCA는 25ug/ml이상의 높은 농도에서 농도 의존적으로 세포 내 산화질소의 발현이 증가하고 세포 밖 산화질소의 발현 또한 증가하며(도 5), 단삼 지표물질인 T2A는 농도에 상관없이 산화질소 생성에 아무런 효과를 나타내지 않았으나(도 6), 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 5:1 비율로 유지하며 농도를 달리 해본 결과 5:1 비율 혼합추출물에서 농도가 증가함에 따라 산화질소 생성이 세포 안과 밖 모두에게서 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다(도 7).

<5-3> eNOS의 발현 확인

100mm 플레이트에 1×10^6 cell/ml로 배양한 후 100% 세포가 찻을 때 실험을 진행하였다. 시료를 농도에 맞게 처리하여 37℃에서 10분 배양한 후 세척하여 모은 후 원심 분리하여 얻은 상층액은 제거한 후 남은 펠렛을 용해시켜서 단백질을 추출하였다. 단백질 정량은 BSA법을 사용하였다. 정량된 단백질 시료 30ug은 10% SDS-PAGE에 의해 분리하여 PVDF 멤브레인으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% 탈지유(skimmed milk)를 포함하는 0.1% TBST로 1시간 블로킹시켰다. TBST로 씻은 후 1차 항체(eNOS, phospho-eNOS(1:1000 dilution; Cell Signaling), β-actin(1:1000 dilution; Santa Cruz))가 들어있는 5% BSA 액으로 -4℃에서 하룻밤 반응시킨 후 TBST로 5분씩 3회 씻은 후 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 30분간 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBST에 씻은 뒤 ECL system(INTRON biotechnology)로 밴드를 가시화하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+(Bio-Rad)를 이용하였다.

그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 상황버섯 지표물질(PCA), 단삼 지표물질(T2A), 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 비율 5:1의 eNOS의 인산화 정도를 웨스턴 블롯을 이용해 확인해 본 결과 PCA와 T2A는 대조군 대비 아무런 차이가 없으나 혼합추출물 비율 5:1에서는 3배 이상의 eNOS 인산화가 일어남을 확인하였다(도 8).

따라서, 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 비율 5:1은 상황버섯 및 단삼 각각의 효과에 비해 현저한 효과를 가짐을

확인하였다.

<제조예 1> 약학적 제제의 제조

<1-1> 산제의 제조

본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물	2 g
유당	1 g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

<1-2> 정제의 제조

본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물	100 mg
옥수수전분	100 mg
유 당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<1-3> 캡슐제의 제조

본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물	100 mg
옥수수전분	100 mg
유 당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

<1-4> 환의 제조

본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물	1 g
유당	1.5 g
글리세린	1 g
자일리톨	0.5 g

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

<1-5> 과립의 제조

본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물	150 mg
대두추출물	50 mg
포도당	200 mg
전분	600 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섞씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

- [0132] <제조예 2> 건강식품의 제조
- [0133] <2-1> 밀가루 식품의 제조
- [0134] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [0135] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조
- [0136] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 0.1 ~ 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.
- [0137] <2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조
- [0138] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.
- [0139] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조
- [0140] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0141] <2-5> 전식의 제조
- [0142] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0143] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0144] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.
- [0145] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.
- [0146] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),
- [0147] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
- [0148] 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물(3 중량부),
- [0149] 영지(0.5 중량부),
- [0150] 지황(0.5 중량부)
- [0151] <제조예 3> 음료의 제조
- [0152] <3-1> 건강음료의 제조
- [0153] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0154]

<3-2> 야채 주스의 제조

[0155]

본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0156]

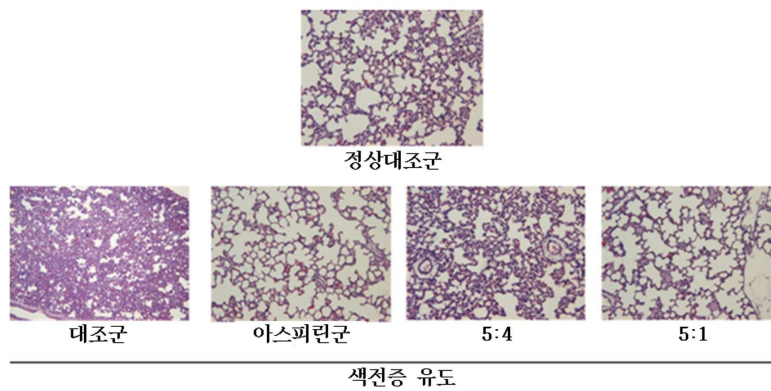
<3-3> 과일 주스의 제조

[0157]

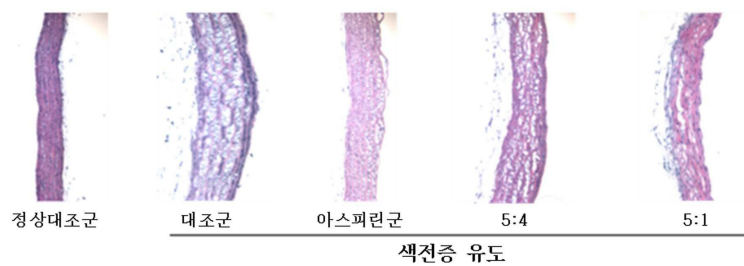
본 발명의 상황버섯 및 단삼 혼합추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

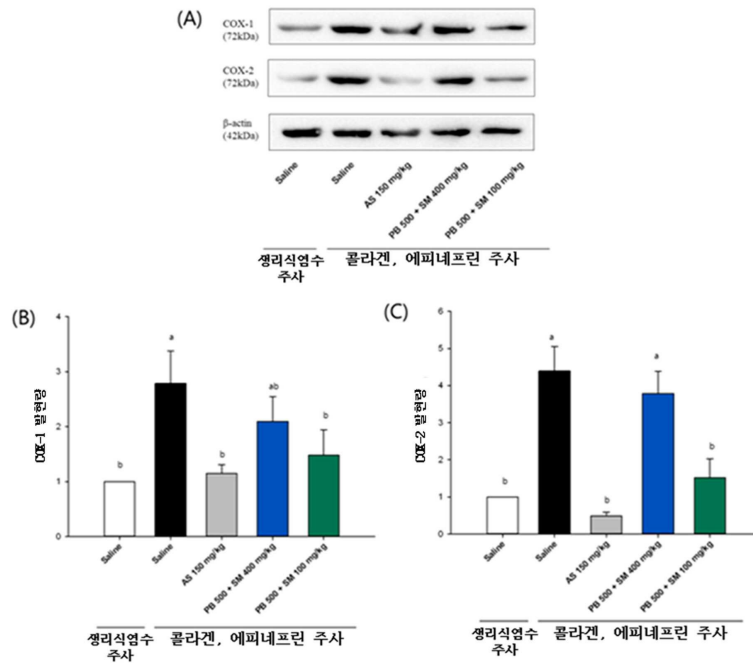
도면1



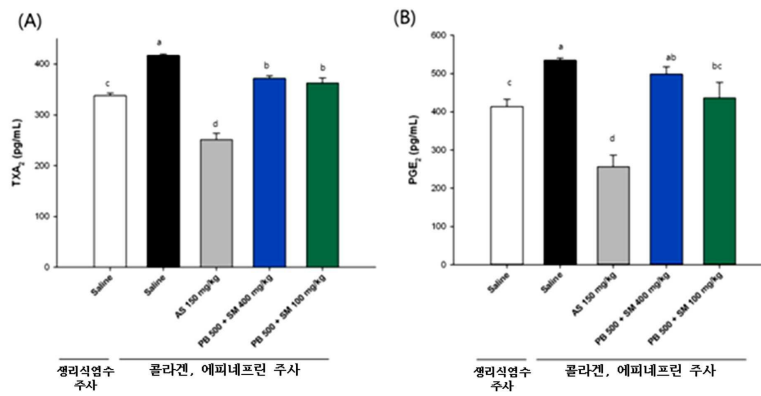
도면2



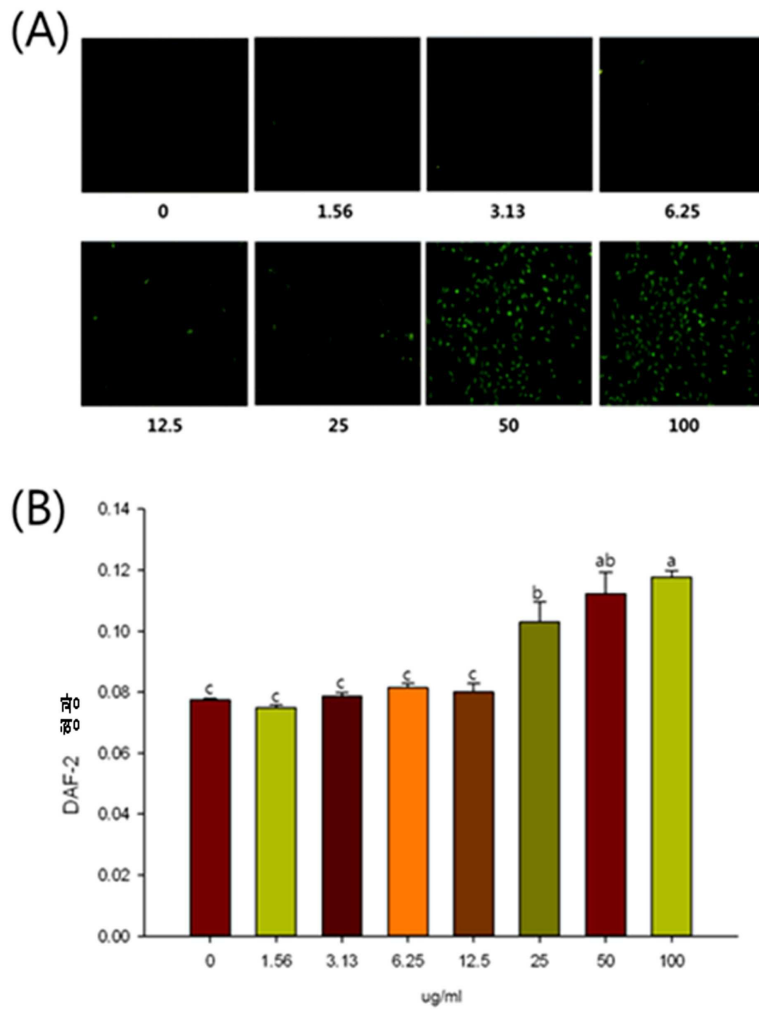
도면3



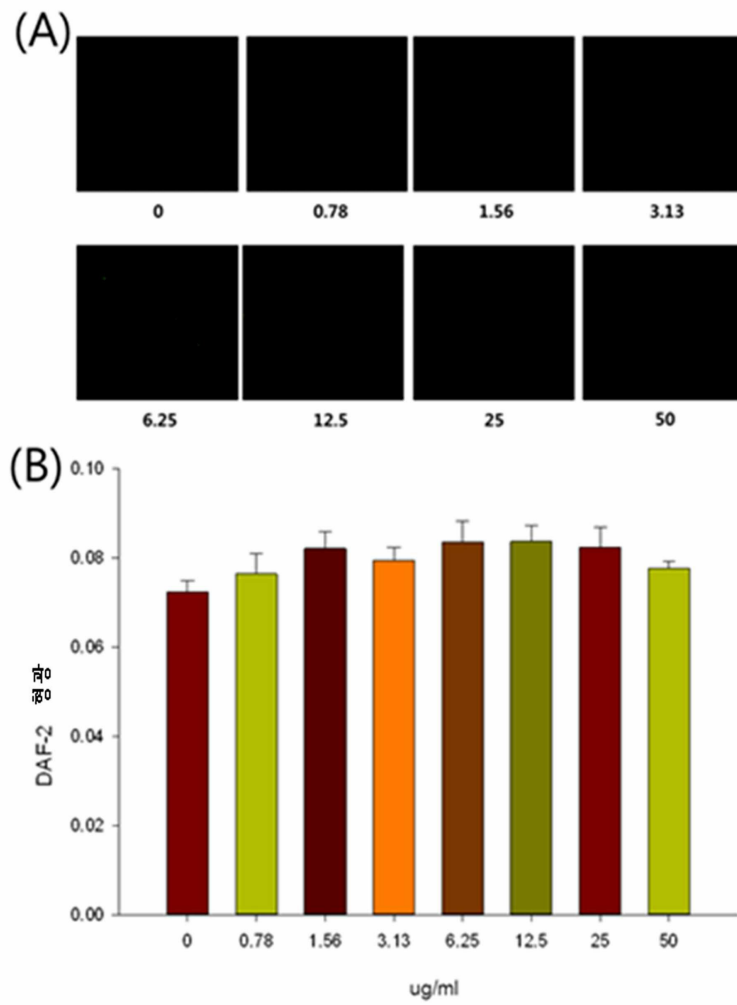
도면4



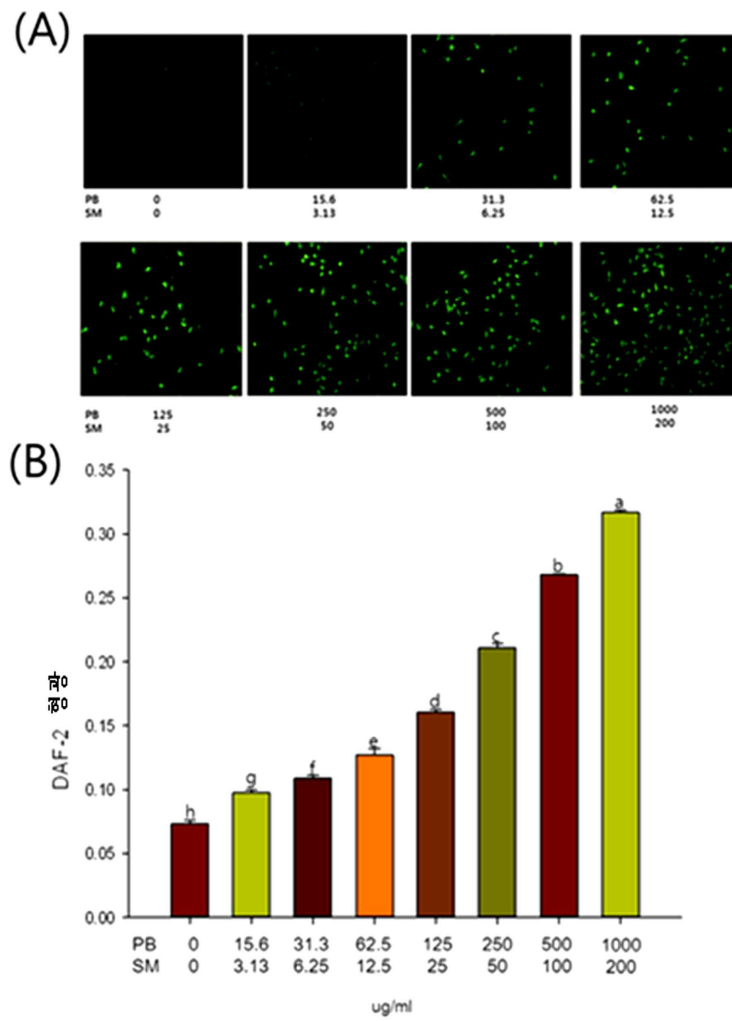
도면5



도면6



도면7



도면8

