



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0119166
(43) 공개일자 2013년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/212 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0042112

(22) 출원일자 2012년04월23일

심사청구일자 2012년04월23일

(71) 출원인

건양대학교산학협력단

충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

신현중

전라북도 무주군 안성면 덕유산로 599

(72) 발명자

유영춘

대전광역시 유성구 은구비로 31 열매마을5단지
509동 2101호

김보연

대전광역시 유성구 어은로 57 한빛아파트 115동
1104호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

경일호

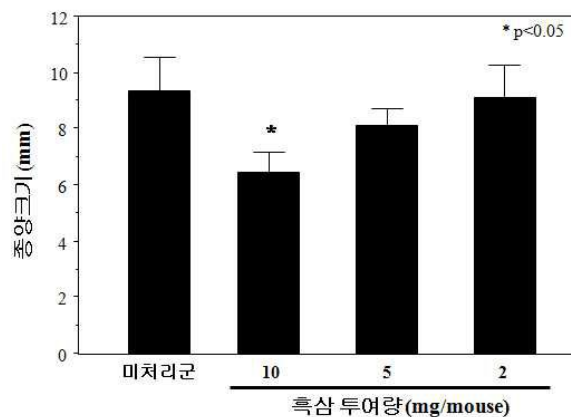
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **종양의 증식 및 전이억제 활성을 갖는 구증구포 흑삼 추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품**

(57) 요약

본 발명은 구증구포 흑삼추출물 및 이를 유효성분으로 하는 건강기능 식품에 관한 것으로서, a) 건조된 인삼을 온도 90~110℃, 압력 5~15기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계; b) 상기 a) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계; c) 상기 b) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계; d) 상기 c) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계; e) 상기 d) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계; f) 상기 e) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 5~15기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계; g) 상기 f) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계; h) 상기 g) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계; 및 i) 상기 h) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계를 포함하여 제조된 구증구포 흑삼의 추출물의 종양의 증식억제 활성, 암전이 억제활성 및 항암면역능의 증가 활성을 이용한 면역기능 개선 및 항종양 활성을 갖는 기능식품, 의약품 등 여러 분야에 폭 넓게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이상구

대전광역시 유성구 은구비로 31 열매마을5단지 50
4동 101호

심인섭

경기도 성남시 분당구 동판교로 155 봇들마을7단지
아파트 702동 2204호

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 건조된 인삼을 온도 90~110℃, 압력 5~15기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- b) 상기 a)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- c) 상기 b)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- d) 상기 c)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- e) 상기 d)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- f) 상기 e)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 5~15기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- g) 상기 f)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- h) 상기 g)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계; 및
- i) 상기 h)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 구증구포 흑삼의 제조방법.

청구항 2

제1항의 구증구포 흑삼을 이용한 흑삼추출물.

청구항 3

제2항의 구증구포 흑삼 추출물을 유효성분으로 함유하는 항암활성이 강화된 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 구증구포 흑삼추출물 및 이를 유효성분으로 하는 건강기능 식품에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 종양의 증식억제 활성, 암전이 억제활성 및 항암면역능의 증가 활성을 갖는 구증구포 흑삼추출물 및 이를 유효성분으로 하는 건강기능 식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인삼은 주로 한방에서 다년생 초본류의 뿌리를 약용으로 이용하는 식물이며, 고려인삼(*Panax ginseng*)으로 불리우고 있다. 인삼의 성분과 화학적 및 약리학적 특성은 사포닌(ginsenoside), 페놀 컴파운드(phenol compounds), 폴리아세틸렌(polyacetylene), 폴리사카라이드(polysaccharide) 등과 같은 다양한 성분이 함유되어 있는 것으로 밝혀져 있다. 특히 인삼에는 사포닌 성분으로 대표되는 생체의 기능조절에 유효한 성분이 다량으로 함유되어 있으며, 사포닌(ginsenoside) 성분은 면역기능, 항암작용, 항산화 활성, 신경장애 개선 혹은 당뇨와 고혈압과

같은 성인병의 예방과 증상개선 또는 치료 등에 유용한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 압과 관련된 인삼 혹은 홍삼의 생리활성에 관해서는 많은 연구결과가 보고되어, ginsenoside-Rb2, ginsenoside-Rg3, Rh1 및 Rh2 등이 높은 활성을 지니는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근에는 비사포닌계 화합물(다당체 및 폴리펩티드)도 면역기능의 조절과 종양의 억제에 기여하는 것으로 보고되고 있다.

[0003] 이러한 이유로 국내에서는 인삼이 대량으로 재배되어 체질증강과 면역력 보강을 위하여 전통적인 민간요법으로 많이 사용되어 왔으며, 최근에는 국내와 일본 및 중국 등지에서 인삼에서 추출한 사포닌 성분(ginsenoside)을 의약품화하거나 의약품료로 응용하기 위한 소재로서 널리 사용되고 있다. 인삼의 생리활성을 좌우하는 주요성분은 사포닌(ginsenoside)으로 사포닌의 함량과 종류에 따라 효능에 차이가 생기게 된다. 인삼의 생리활성을 높이기 위한 시도로서 인삼에 열을 가하여 훈증하는 방식을 통해 사포닌 성분의 화학적 변화와 농축을 유도하여 생리활성의 강화는 물론 새로운 생리활성의 창출도 가능하다. 한 예로서 인삼을 1회 훈증하여 만든 것을 홍삼이라 부르며, 홍삼은 인삼보다 생리활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 인삼을 1회 열처리하여 만드는 홍삼은 열처리에 의한 성분의 변화에 의해 면역력과 기력 증강 등의 효과가 높아지는 것으로 알려져 있으며, 이로 인해 홍삼은 국내외에서 인삼제품의 대표적인 브랜드로서 인식되어져 있다. 한편 최근 국내에서는 기존의 방법과는 다른 새로운 인삼 가공법에 의해 인삼의 효능을 높이기 위한 일환으로 수삼을 정선하여 껍질이 존재하는 상태로 증숙(찜)과 건조과정을 9회 반복하여 만드는 구증구포(九蒸九暴) 가공법이 도입되었다. 구증구포 과정을 거치면서 검은 색을 띠게 되어 흔히 흑삼(黑蔘)이라 불리우며, 인체에 유용한 생리활성 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0004] 한편, 최근 면역기능과 관련되어 만연하는 질병으로서 알러지(또는 알레르기)와 아토피를 들 수 있으며, 면역력이 약한 어린이나 노인에게 있어서 이들 질병의 유병률은 대단히 높은 편이다. 특히 환경오염과 스트레스가 많은 현대사회에서는 면역기능과 관련된 질환은 점점 문제가 커지고 있는 실정이다.

[0005] 암은 우리나라에서는 사망률 1위를 점하고 있는 가장 위험한 질환으로, 사망원인의 약 25%를 차지한다. 암은 유전적 변이에 의해 발생한 비정상 세포가 증식, 이동, 전이 등의 복잡한 과정을 통해 악성암으로 발전하게 된다. 특히 악성 종양세포는 최초로 암이 발생했던 부위(원발소, primary tumor)에서 선택적으로 전이능을 획득한 세포가 원격장기(전이소, metastatic tumor)로 전이를 하게 되며, 이러한 성질을 가진 암세포는 운동성과 증식속도 및 주변 조직으로의 미세전이(micro-environmental metastasis) 능력이 높아 치료가 어렵게 된다. 한편 면역세포는 대식세포, 수지상 세포 및 NK세포 등이 비특이적 면역반응을 통해, 발생 초기단계부터 암세포를 감시하게 되어 제거하게 된다. 그 후에는 T세포를 주체로 한 세포매개 면역과 항체를 주체로 한 체액성 면역 등의 암세포 특이적인 면역반응이 유도되어 암세포의 증식을 억제하며 제거하는데 기여하게 된다. 그러므로 이들 면역세포의 활성을 상승시킴으로서 종양세포의 증식과 전이를 억제하는 항암활성 효과를 유도할 수 있다.

[0006] 오래 전부터 면역강화와 성인병의 예방을 목적으로 한 기능성 식품소재의 출처(source)로서 식물, 미생물 심지어 곤충에 이르기까지 천연에서 유래하는 다양한 생물체의 추출물과 단리물질이 이용되고 있고, 우리나라에서 오래 전부터 보약의 형태로 섭취되어 온 인삼을 특수한 방법으로 가공 처리한 구증구포 흑삼에 관하여 생리활성의 우수성에 대해서는 경험적 결과들이 다소 알려져 있으나, 아직까지 정확한 효능에 대한 과학적 실험결과나 홍삼과의 비교실험 결과 등에 대해서는 보고가 많지 않은 상태이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 흑삼의 생리활성이 우수함을 검증하고, 이를 이용한 항종양 활성을 갖는 식품을 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개번호 제10-2009-0094708호(발명의 명칭: 구증구포홍삼의 제조방법과 구증구포홍삼을 이용한 당대사조절강화 기능성 식품의 제조방법; 2009.09.08. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 구증구포 흑삼의 면역강화 작용과 암세포의 전이억제 작용을 이용한 면역기능 개선 식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 구증구포 흑삼의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 구증구포 흑삼을 이용한 흑삼 추출물 및 이를 유효성분으로 하는 건강기능식품을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- [0011] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0012] 구증구포 흑삼은 a) 건조된 인삼을 온도 90~110℃, 압력 5~15기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- [0013] b) 상기 a) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- [0014] c) 상기 b) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- [0015] d) 상기 c) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- [0016] e) 상기 d) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- [0017] f) 상기 e) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 5~15기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- [0018] g) 상기 f) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계;
- [0019] h) 상기 g) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계; 및
- [0020] i) 상기 h) 단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시키는 단계를 포함하여 제조한다.
- [0021] 본 발명은 상기와 같이 인삼을 상압(1기압) 및 고압(5~15기압)의 조건으로 반복 증숙함으로써 항암활성을 갖는 인삼사포닌 성분인 Rg3 및 Rh2의 함량이 증진되는 방법으로 구증구포 흑삼을 제조한다. 특히, 제1회차 및 제6회차 인삼의 증숙단계에서 고압의 5~15기압 하에서 증숙을 하고 나머지 제2회차 내지 제5회차 및 제7회차 내지 제9회차에서는 상압의 1기압 하에서 증숙을 함으로써 항암활성을 갖는 인삼사포닌 성분인 Rg3 및 Rh2의 함량이 증진되는 방법으로 구증구포 흑삼을 제조하는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 한편, 본 발명의 구증구포 흑삼추출물은 상기 방법으로 제조된 흑삼에 대하여 3 내지 7배(중량비)의 물을 가하여 3 내지 7시간 동안 방치한 다음, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올을 추출용매로 사용하여 추출함으로써 흑삼추출물을 제조할 수 있다. 이때, 추출은 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 물에 대하여 5 내지 15배(부피비)의 에탄올을 가하여 30 내지 70℃에서 1 내지 5시간 동안 추출한 다음, 여과하고, 용매를 제거하여 수형함이 바람직하다.

[0023] 또한, 본 발명의 구증구포 흑삼추출물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은본 발명의 흑삼 또는 흑삼 추출물을 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용 가능한 결합제(예: 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필셀룰로오스), 붕해제(예: 카복시메틸셀룰로오스칼슘, 전분글리콜산나트륨), 희석제(예: 옥수수전분, 유당, 콩기름, 결정셀룰로오스, 만니톨), 활택제(예: 스테아린산 마그네슘, 탈크), 미제(예: 백당, 과당, 솔비톨, 아스파탐), 안정제(예: 카복시메틸셀룰로오스나트륨, 알파 또는 베타 싸이클로덱스트린, 구연산, 백납), 보존료(예: 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 안식향산나트륨) 및 향료(예: 에틸바닐린, 마스킹후레바, 멘톨후라보노, 허브향)와 혼합하여 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 액제 등의 제제로 제조될 수 있다.

발명의 효과

[0024] 이상에서와 같이, 본 발명에 따른 구증구포 흑삼은 면역강화 작용과 종양억제 및 암전이 억제 작용이 우수하여 이를 이용한 면역기능 개선 및 항종양 활성을 갖는 건강기능식품, 의약품 등 여러 분야에 폭넓게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 흑삼 추출물 경구투여에 의한 암세포 증식억제의 예방적 효과를 나타낸 그래프이다.
 도 2는 흑삼 추출물 경구투여에 의한 암세포 증식억제의 치료적 효과를 나타낸 그래프이다.
 도 3은 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 암세포 혈관신생 억제효과를 나타낸 그래프이다.
 도 4는 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 NK 세포살해활성 유도효과를 나타낸 그래프이다.
 도 5는 NK세포를 제거한 마우스에서 흑삼 추출물의 항암활성 변화를 나타낸 그래프이다.
 도 6은 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 마우스 림프구 증식반응의 상승효과를 나타낸 그래프이다.
 도 7은 흑삼 추출물 투여에 의한 T세포로부터 사이토카인 분비 증가활성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.

[0027] <실시예 1>

[0028] 구증구포흑삼 추출물의 제조

[0029] 본 발명은 인삼을 상압(1기압) 및 고압(5~15기압)의 조건으로 반복 증숙하여 제조된 항암활성을 갖는 인삼사포닌 성분인 Rg3 및 Rh2의 함량이 증진되는 방법에 의해 제조된 흑삼 추출물을 제조하였다.

[0030] 흑삼은 다음과 같이 제조하였다.

[0031] a)건조된 인삼을 온도 90~110℃, 압력 5~15기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시켰다.

[0032] b)상기 a)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시켰다.

[0033] c)상기 b)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시켰다.

[0034] d)상기 c)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시켰다.

- [0035] e)상기 d)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시켰다.
- [0036] f)상기 e)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 5~15기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시켰다.
- [0037] g)상기 f)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시켰다.
- [0038] h)상기 g)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시켰다.
- [0039] i)상기 h)단계의 인삼을 온도 90~110℃, 압력 1기압에서 1~3시간 동안 증숙한 다음, 50~70℃에서 1~3시간 동안 건조시켜 최종적으로 흑삼을 제조하였다.
- [0040] 상기와 같이 제조된 흑삼에 대하여 3 내지 7배(중량비)의 물을 가하여 3 내지 7시간 동안 방치한 다음, 상기 물에 대하여 5 내지 15배(부피비)의 에탄올을 가하여 30 내지 70℃에서 1 내지 5시간 동안 추출한 다음, 여과하고, 용매를 제거함으로써 흑삼 추출물을 제조하였다.
- [0041] 흑삼 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품
- [0042] 액제의 제조
- [0043] 상기 흑삼 추출물의 동결건조분말 100mg, 이성화당 10g, 만니톨 5g을 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 허브향을 적량 가한 다음 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.
- [0044] 캡슐제의 제조
- [0045] 상기 흑삼 추출물의 동결건조분말 100mg에 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 완전히 혼합한 후 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0046] <실시예 2>
- [0047] 구중구포 흑삼에 의한 종양증식 억제활성
- [0048] In vivo 실험계에서 상기 실시예 1의 흑삼 추출물의 항암활성을 조사하기 위하여 암세포를 동계(syngeneic) 마우스에 이식하는 모델을 이용하여 암세포의 증식, 암세포의 전이, 암세포에 의한 혈관신생의 억제효과를 측정하였다. 즉, B16-BL6 melanoma 암세포를 이용한 실험은 C57BL/6 마우스를, Colon 26 carcinoma를 이용한 실험은 Balb/c 마우스를, L5178Y-ML25 백혈병 암세포를 이용한 실험은 DBA2 마우스를 이용하여 수행하였다.
- [0049] 2-1. 흑삼 추출물(Black ginseng)에 의한 암세포의 증식억제 활성
- [0050] 암세포 증식억제에 대한 예방적 효과 측정
- [0051] 먼저, in vivo 모델에서 흑삼 추출물(Black ginseng)에 의한 암세포의 증식억제 활성을 조사하였다. 흑삼 추출물을 그룹당 5마리의 마우스 당 2mg/mouse, 5mg/mouse, 10mg/mouse씩 1일 1회씩 연속 3일간 경구투여한 후 B16-BL6 melanoma암세포(5×10^5 /site)를 마우스의 등에 이식하고 9일째에 암세포 증식억제의 예방적 효과를 관찰하였다.
- [0052] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

- [0053] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 5mg/mouse과 2mg/mouse로 투여한 그룹에서는 암세포 증식억제 활성이 관찰되지 않은 반면에, 10mg/mouse로 투여한 그룹에서 유의한 암세포 증식억제 활성이 관찰되었다.
- [0054] 암세포 증식억제에 대한 치료적 효과 측정
- [0055] 상기와 동일한 실험모델에서 B16-BL6 melanoma 암세포(5×10^5 /site)를 먼저 이식한 후, 흑삼 추출물을 상기 실시예와 동일한 방법으로 경구투여한 후 9일째에 암세포 증식억제의 치료적 효과를 관찰하였다.
- [0056] 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0057] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 암세포 증식억제에 대한 예방적 효과와 거의 동일하게 10mg/mouse로 투여한 그룹에서만 암세포 증식억제 효과가 관찰되었다.
- [0058] 이상의 결과로부터 흑삼추출물의 10mg/mouse의 경구 투여는 암세포의 증식에 대해 예방적 혹은 치료적으로 유의한 억제효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.
- [0059] 2-2. 흑삼 추출물(BG) 경구투여에 의한 실험적 폐전이 억제활성
- [0060] B16-BL6 암세포 폐전이 모델에 있어서 흑삼추출물 경구 투여에 의한 암전이 억제효과측정
- [0061] B16-BL6 melanoma 암세포의 실험적 폐전이에 대한 흑삼 추출물 경구투여의 암전이 억제활성을 조사하였다.
- [0062] 그룹 당 5마리의 C57BL/6 마우스에 B16-BL6 melanoma 암세포(4×10^4)를 정맥주사를 통해 이식하기 전 3일 동안 흑삼 추출물을 그룹 당 2mg/mouse, 5mg/mouse, 10mg/mouse의 투여량으로 1일 1회씩 C57BL/6 마우스에 경구 투여하는 방법으로 흑삼 추출물의 암전이의 예방적 효과를 측정하였다.
- [0063] 또한, 그룹 당 5마리의 C57BL/6 마우스에 B16-BL6 melanoma 암세포(4×10^4)를 정맥주사를 통해 이식한 후 3일 동안 흑삼 추출물을 그룹 당 2mg/mouse, 5mg/mouse, 10mg/mouse의 투여량으로 1일 1회씩 C57BL/6 마우스에 경구 투여하는 방법으로 흑삼 추출물의 암전이 치료적 효과를 측정하였다. 상기 암전이 억제효과는 B16-BL6 melanoma 암세포 이식 14일째에 마우스의 폐에 전이된 암세포 콜로니(colony)를 계측하여 판정하였다.
- [0064] 그 결과를 하기의 표 1에 나타내었다.

표 1

B16-BL6 암세포 폐전이 모델에 있어서 흑삼 추출물 경구투여에 의한 암전이 억제효과

처리군	폐전이 수	
	평균 ± 편차 (억제율, %)	범위
미처리군 (종양 대조군)	104 ± 11	(93 - 115)
종양 이식 전 투여		
흑삼 (2 mg/mouse)	93 ± 14	(79 - 107)
흑삼 (5 mg/mouse)	74 ± 21 (28.8) *	(53 - 95)
흑삼 (10 mg/mouse)	56 ± 16 (46.2) **	(40 - 72)
종양 이식 후 투여 t		
흑삼 (2 mg/mouse)	97 ± 18	(79 - 115)
흑삼 (5 mg/mouse)	81 ± 19 (22.1)	(62 - 100)
흑삼 (10 mg/mouse)	47 ± 21 (54.8) **	(26 - 68)

* p<0.05; ** p<0.01, Student's two-tailed t test 에 의한 미처리군과의 통계학적 유의차

[0065]

[0066] 상기의 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 흑삼 추출물에 의한 예방적 전이억제 효과는 5mg/mouse과 10mg/mouse씩 투여한 군에서 관찰되었으며, 흑삼 추출물에 의한 치료적 전이억제 효과는 10mg/mouse씩 투여한 그룹에서 관찰되었다.

[0067] Colon 26 암세포 폐전이 모델에 있어서 흑삼 추출물 경구투여에 의한 암전이 억제효과

[0068] Colon 26 암세포의 실험적 폐전이에 대한 흑삼 추출물 경구투여의 암전이 억제활성을 조사하였다.

[0069] 그룹 당 5마리의 Balb/6 마우스에 Colon 암세포(4×10^4)를 정맥주사를 통해 이식하기 전 3일 동안 흑삼 추출물을 그룹 당 2mg/mouse, 5mg/mouse, 10mg/mouse의 투여량으로 1일 1회씩 Balb/6 마우스에 경구 투여하는 방법으로 흑삼 추출물의 암전이의 예방적 효과를 측정하였다.

[0070] 또한, 그룹 당 5마리의 Balb/6 마우스에 Colon 암세포(4×10^4)를 정맥주사를 통해 이식한 후 3일 동안 흑삼 추출물을 그룹 당 2mg/mouse, 5mg/mouse, 10mg/mouse의 투여량으로 1일 1회씩 Balb/6 마우스에 경구 투여하는 방법으로 흑삼 추출물의 암전이 치료적 효과를 측정하였다.

[0071] 상기 암전이 억제효과는 Colon 암세포 이식 14일째에 마우스의 폐에 전이된 암세포 콜로니(colony)를 계측하여 판정하였다.

[0072] 그 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.

표 2

Colon 26 암세포 폐전이 모델에 있어서 흑삼 추출물 경구투여에 의한 암전이 억제효과

처리군	폐전이 수	
	평균 ± 편차 (억제율, %)	범위
미처리군 (종양대조군)	74 ± 18	(56 - 92)
종양 이식 전 투여		
흑삼 (2 mg/mouse)	69 ± 11	(58 - 80)
흑삼 (5 mg/mouse)	51 ± 10 (31.1)	(41 - 61)
흑삼 (10 mg/mouse)	38 ± 12 (48.6) *	(26 - 50)
종양 이식 후 투여		
흑삼 (2 mg/mouse)	71 ± 9	(62 - 80)
흑삼 (5 mg/mouse)	59 ± 13 (20.3)	(46 - 72)
흑삼 (10 mg/mouse)	36 ± 8 (51.4) *	(28 - 45)

* p<0.01, Student's two-tailed t test 에 의한 미처리군과의 통계학적 유의차

[0073]

[0074] 상기의 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, B16-BL6 melanoma 암세포의 경우와 유사하게 5mg/mouse 및 10mg/mouse의 투여량으로 연속 3회 경구투여한 그룹에서 실험적 폐전이의 억제효과가 확인되었다.

[0075] L5178Y-ML25 암세포 비장 및 간장 전이모델에 있어서 흑삼추출물 경구 투여에 의한 암전이 억제효과 측정

[0076] L5178Y-ML25 암세포 비장 및 간장 전이에 대한 흑삼 추출물 경구투여의 암전이 억제활성을 조사하였다.

[0077] 그룹 당 5마리의 CDF1 마우스에 L5178Y-ML25 암세포(4×10^4)를 정맥주사를 통해 이식하기 전 3일 동안 흑삼 추출물을 그룹 당 2mg/mouse, 5mg/mouse, 10mg/mouse의 투여량으로 1일 1회씩 CDF1 마우스에 경구 투여하는 방법으로 흑삼 추출물의 암전이의 예방적 효과를 측정하였다.

[0078] 또한, 그룹 당 5마리의 CDF1 마우스에 L5178Y-ML25 암세포(4×10^4)를 정맥주사를 통해 이식한 후 3일 동안 흑삼 추출물을 그룹 당 2mg/mouse, 5mg/mouse, 10mg/mouse의 투여량으로 1일 1회씩 C57BL/6 마우스에 경구 투여하는 방법으로 흑삼 추출물의 암전이 치료적 효과를 측정하였다.

[0079] 상기 암전이 억제효과는 L5178Y-ML25 암세포 이식 14일째에 마우스의 비장 및 간장에 전이된 암세포에 의한 장기중량의 증가를 계측하여 판정하였다.

[0080] 그 결과를 하기의 표 3에 나타내었다.

표 3

L5178Y-ML25 암세포의 비장 및 간장 전이모델에 있어서 흑삼 추출물 경구 투여에 의한 암전이 억제효과

처리군	평균 중량 (g) ± 편차, (저해율, %)	
	간장	비장
정상군	1.05 ± 0.1	0.09 ± 0.02
미처리군 (종양대조군)	3.45 ± 0.52	0.22 ± 0.04
종양 이식 전 투여		
흑삼 (2 mg/mouse)	3.33 ± 0.45	0.20 ± 0.02
흑삼 (5 mg/mouse)	2.24 ± 0.38 (35.1) *	0.15 ± 0.04 (31.8) *
흑삼 (10 mg/mouse)	2.10 ± 0.32 (39.1) *	0.14 ± 0.03 (36.4) *
종양 이식 후 투여		
흑삼 (2 mg/mouse)	3.42 ± 0.22	0.21 ± 0.01
흑삼 (5 mg/mouse)	2.32 ± 0.18 (32.8) *	0.16 ± 0.02 (27.3) *
흑삼 (10 mg/mouse)	2.14 ± 0.16 (38.0) *	0.13 ± 0.02 (40.9) *

* p<0.01, Student's two-tailed t test 에 의한 미처리군과의 통계학적 유의차

[0081]

[0082] 상기의 표 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, L5178Y-ML25 암세포에 있어서 5 mg/mouse의 투여량부터 유의한 암전이 억제효과가 관찰되었으며, 그 암전이 억제활성은 예방적 및 치료적으로 모두 유의한 것으로 확인되었다.

[0083] 이상의 시험결과를 종합해 보면, 흑삼 추출물은 경구적으로 1일 1회씩 3일간 연속투여할 경우, 암세포에 의한 실험적 폐전이는 물론 백혈병 암세포(leukemia, L5178Y-ML25)에 의한 간 및 비장 전이를 예방적 혹은 치료적으로 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 하지만 투여량에 있어서는 마우스 당 10mg 정도의 투여량이 안정적인 효과를 거둘 수 있는 것으로 확인되었다.

[0084] 자연적 폐전이 모델에서 흑삼 추출물에 의한 암세포 증식 억제효과

[0085] 상기의 결과를 토대로, 다음으로 B16-BL6 melanoma를 이용한 자연적 폐전이 모델에서 10mg/mouse의 투여량에서 흑삼 추출물의 항암활성을 측정하였다.

[0086] 그룹 당 7마리의 C57BL/6 마우스에 B16-BL6 암세포를 마우스의 footpad에 피하주사로 이식하고, 21일째에 암세포 이식부위를 외과적으로 제거(surgical amputation)한 후, 암조직 제거 14일째에 마우스의 폐에 자연 전이된 암세포 콜로니(colony)의 수를 계측하였다. 흑삼 추출물은 상기 암세포 이식 후 암조직을 제거하기 전까지 5, 8, 11, 14, 17일째에 경구투여하는 조건과, 암조직 제거 후 다음 날부터 3일 간격으로 총 5회(22, 25, 28, 31, 34일째) 경구투여 하는 조건으로 각각 경구투여 하여 암전이 억제활성을 조사하였다.

[0087] 그 결과를 하기의 표 4에 나타내었다.

표 4

B16-BL6 암세포의 자연적 폐전이 모델에 있어서 흑삼 추출물 경구투여에 의한 암전이 억제 효과

처리군 (투여일)	원발소의 용적(mm ³)		폐전이 수 (저해율, %)	
	평균 ± 편차	(저해율, %)	평균 ± 편차	범위
미처리군	974 ± 217		54 ± 16	(38-70)
5,8,11,14,17	527 ± 139	(45.9)*	28 ± 9 (48.1) ^a	(19-37)
22,25,28,31,34			35 ± 12 (35.2)	(23-47)

* p<0.01, Student's two-tailed t test 에 의한 미처리군과의 통계학적 유의차

[0088]

[0089] 상기의 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 암조직 제거 전에 흑삼 추출물을 투여한 그룹에서 암조직의 유의한 증식억제와 전이억제가 관찰되었다. 하지만 암조직을 제거한 후에 흑삼 추출물을 경구투여한 그룹에서는 암세포의 폐전이 콜로니(colony)의 감소는 관찰되었으나 통계학적인 유의차는 인정되지 않았다. 즉 흑삼 추출물(10mg/mouse)의 경구투여에 의한 자연적 폐전이 억제효과는 암조직의 제거 전에 투여하는 것이 암전이의 치료적 효과를 유도하는 것으로 판단되었다.

[0090] <실시예 3>

[0091] 흑삼 추출물에 의한 암세포의 혈관신생 억제활성

[0092] 상기의 결과에서 흑삼 추출물의 경구투여에 의해 in vivo에서의 암세포의 증식이 유의하게 억제되는 것으로 나타났다으므로, 이번에는 B16-BL6 melanoma 암세포를 이용한 in vivo 혈관신생 실험모델에서 흑삼 추출물의 혈관신생 억제효과를 조사하였다.

[0093] B16-BL6 melanoma 암세포(5×10^5 /site)를 그룹 당 다섯 마리의 마우스의 등에 피하주사하여 이식한 후, 9~10일째에 종양조직 주변에 형성된 혈관의 수를 계측하는 방식으로 실험을 수행하였다. 이때 흑삼 추출물(10mg/mouse)은 암세포 이식 전 및 후에 1일 1회씩 총 3회 경구투여하였다.

[0094] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0095] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 흑삼 추출물을 암세포 이식 전 및 이식 후에 투여한 경우 모두에서 유의한 혈관신생 억제효과가 인정되었다.

[0096] <실시예 4>

[0097] 흑삼 추출물 투여에 의한 NK세포의 세포상해활성 증가

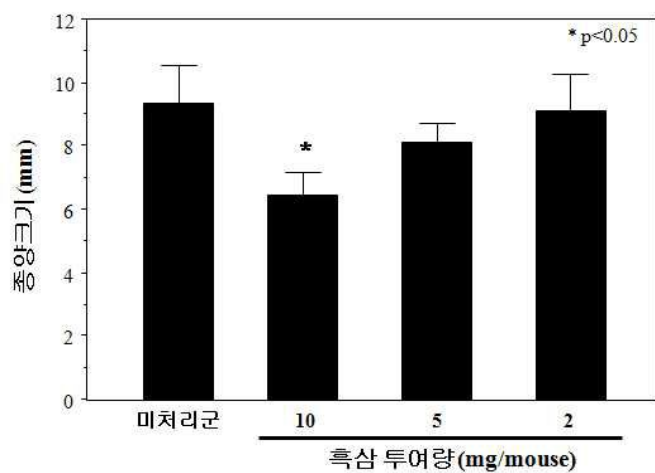
[0098] 종양에 대한 면역학적 반응 중에서 NK세포에 의한 암세포 상해활성은 매우 중요한 것으로 알려져 있다. 본 시험에서는 NK세포에 대한 흑삼 추출물의 활성화 유도효과를 조사하였다.

[0099] 흑삼 추출물을 그룹 당 다섯 마리의 마우스에 2mg/mouse, 5mg/mouse, 10mg/mouse의 투여량으로 1일 1회 연속 3일간 경구투여한 후, 비장세포를 분리하여 NK세포에 대한 sensitive cell인 Yac-1세포와 여러 가지 E/T ratio(Effector vs target ratio)로 혼합하고 8시간 배양한 후에 Yac-1 target cell의 살해활성을 Non-isotope Cell Lysis Assay Kit (Promega사)으로 분석하여 NK세포에 의한 암세포 살해활성을 계측하였다.

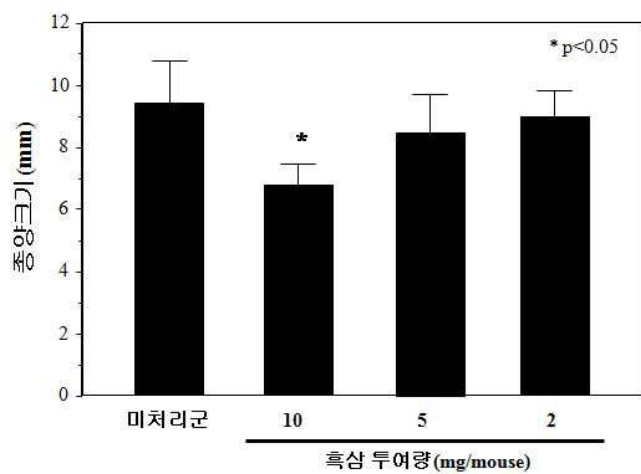
- [0100] 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0101] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 10mg/mouse의 흑삼 추출물을 투여한 그룹에서 가장 안정된 NK 세포살해활성이 관찰되었으며, 5mg/mouse를 투여한 그룹에서도 E/T ratio 100에서는 유의한 활성이 관찰되었다.
- [0102] NK세포의 활성화와 흑삼 추출물에 의한 항암활성과의 관련성 측정
- [0103] 상기 시험결과에서 보여진 NK세포의 활성화가 흑삼 추출물에 의한 항암활성과 관련 있는 것인가를 확인하기 위하여 생체 내에서 NK세포를 제거한 후 흑삼 추출물을 투여하는 경우에 항암효과가 어떠한 영향을 받는가를 조사하였다.
- [0104] C57BL/6 마우스 체내에서 NK세포를 제거하기 위하여 50배 희석한 rabbit anti-asialo GM1 serum(Wako chemicals)을 500 μ l씩 복강주사를 통해 암세포 이식 1일 및 3일 전에 투여하였다. 흑삼 추출물은 B16-BL6 melanoma 암세포에 의한 실험적 폐전이의 시험조건과 동일하게 암세포 이식 전에 1일 1회 총 3회에 걸쳐 10 mg/mouse의 투여량으로 경구투여 하였다.
- [0105] 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0106] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 암세포 이식 14일째에 암전이 억제효과를 측정한 결과, 흑삼 추출물의 투여에 의해 나타났던 암전이 억제효과가 NK세포를 in vivo에서 제거한 마우스에서는 전혀 관찰되지 않았다. 즉 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 암전이 억제효과는 NK세포의 활성화에 의한 기전이 매우 중요한 것으로 확인되었다.
- [0107] 흑삼 추출물 투여에 의한 비장세포 활성화 유도
- [0108] 흑삼 추출물의 경구투여에 의해 림프구(특히 T세포)의 활성화에 어떠한 영향을 미치는 가를 확인하기 위하여 흑삼 추출물 10mg/mouse를 1일 1회씩 총 3회 연속 경구투여한 후에, 최종 투여 1일, 3일 및 5일 후에 마우스의 비장세포를 회수하여 림프구의 mitogen에 대한 반응성과 T세포로부터의 사이토카인 분비에 대해 조사하였다.
- [0109] 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0110] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 비장세포의 세포증식반응에 있어서 흑삼 추출물을 투여한 마우스는 투여종료 1일째에 가장 높은 증식반응을 보였으며, ConA 및 LPS와 같은 mitogen에 대한 반응성도 가장 높은 것으로 확인되었다.
- [0111] 또한, T세포의 활성화를 자극하는 mitogen인 ConA를 처리한 세포의 배양상청을 이용하여 ELISA법에 의해 사이토카인을 정량하였다.
- [0112] 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0113] 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 경구투여 종료 후 3일째까지 TNF-a와 IL-6의 분비가 상승한 것으로 나타났다. 하지만 T 세포로부터 분비되는 다른 사이토카인 IL-2, IFN-g, IL-4 등에는 별다른 변화가 관찰되지 않았다(결과 미제시).
- [0114] 이상의 결과를 종합해 보면, 흑삼 추출물은 림프구 및 NK세포의 활성화를 유도하여 암세포에 대한 상해활성을 상승시키는 작용을 통해 암세포의 증식을 억제하고, 혈관신생을 저지하며, 나아가 암세포의 전이를 억제하는 효과를 갖는 것을 알 수 있었다.

도면

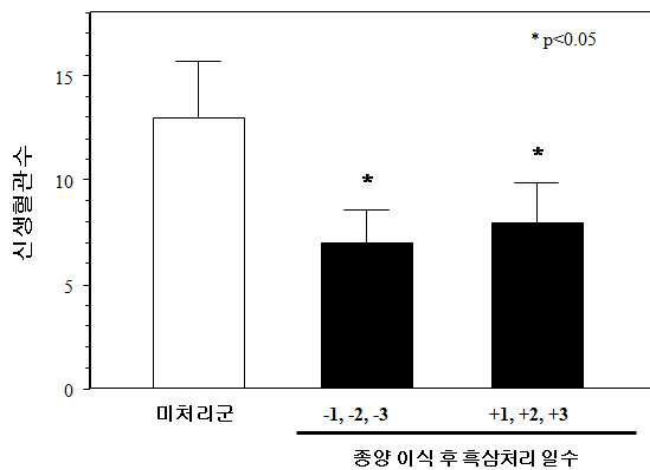
도면1



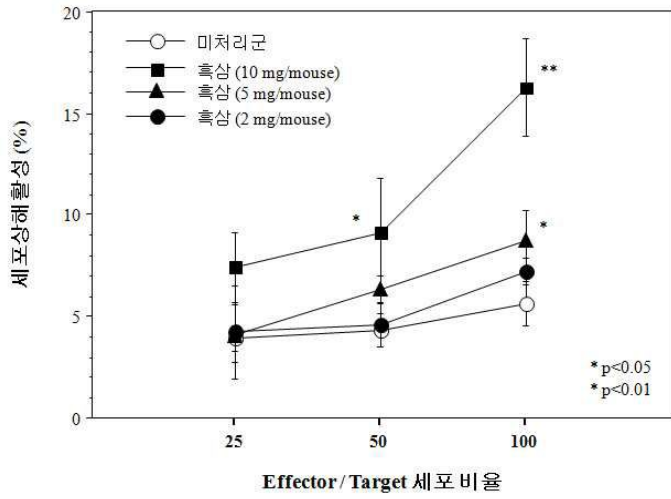
도면2



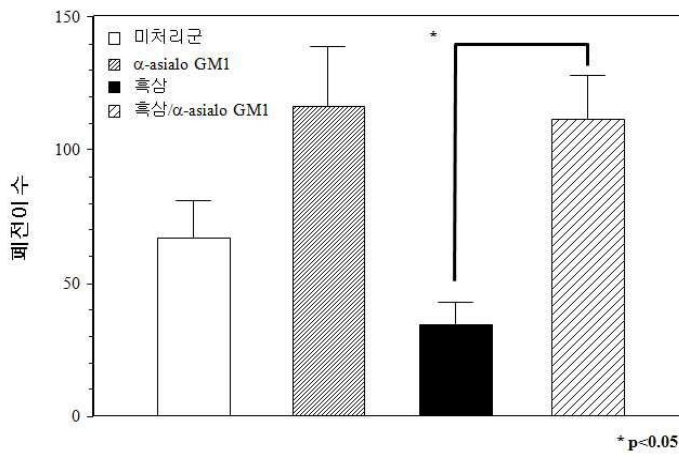
도면3



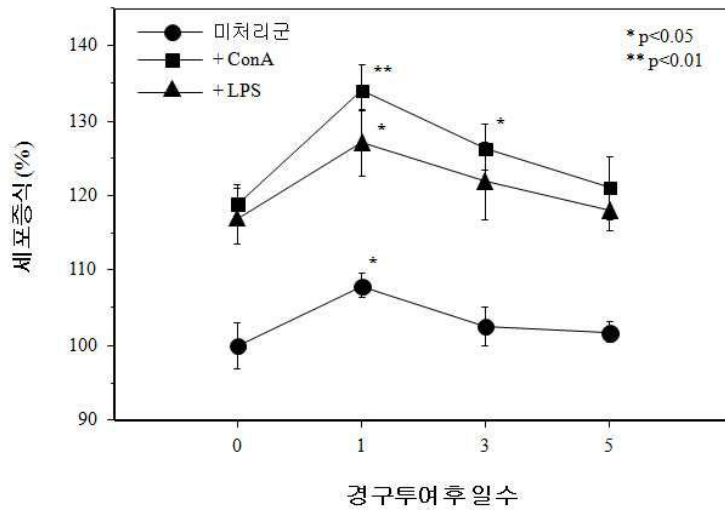
도면4



도면5



도면6



도면7

