

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0123476

(43) 공개일자 2019년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/03 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/03 (2013.01)*A61P 1/16* (2018.01)

(21) 출원번호 10-2018-0047239

(22) 출원일자 2018년04월24일

심사청구일자 2018년04월24일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

남택정

부산광역시 남구 고동골로 91-2(문현동,
부광연립)

최정욱

부산광역시 동래구 아시아드대로154번길 51(사직
동)

박주현

강원도 강릉시 강릉대로469번길 14(포남동, 대인
4차아파트)

(74) 대리인

김순웅

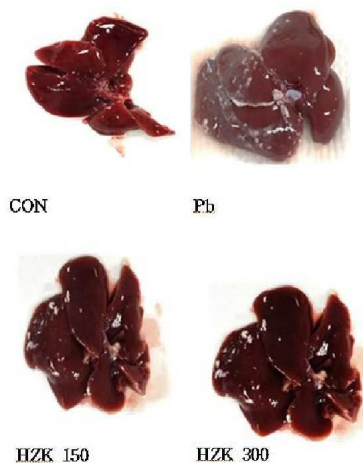
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 톳 추출물을 포함하는 납에 의한 간 손상 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 톳 추출물을 포함하는 납에 의한 간 손상 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 톳 추출물은 납에 의해 유도된 간 손상을 효과적으로 치료하는 효과를 가진다.

대표도 - 도12



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345250345

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축

연구과제명 수산과학연구소

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

연구기간 2017.09.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 톳을 증류수로 추출하는 것;
- 2) 상기 추출물을 원심분리하여 상층액을 분리하는 것;
- 3) 상기 상층액에 상층액의 2 내지 4배 부피의 에탄올을 가하고 당을 가라앉히는 것; 및
- 4) 가라앉힌 당을 여과하여 제거한 후 여과액을 감압 농축하는 것을 포함하는 추출 방법으로 추출된 톳 추출물을 포함하는 납에 의한 간 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 1) 단계에서의 톳은 톳 분말인 것인 납에 의한 간 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 3) 단계에서의 에탄올은 상층액의 3배 부피인 것인 납에 의한 간 손상 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 톳 추출물을 포함하는 납에 의한 간 손상 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 근래 미세먼지에 의한 대기 오염이 증가하고 있으며, 이러한 미세 먼지에는 납, 카드뮴, 아연, 니켈, 크롬 등의 중금속이 함유되어 있는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 중금속들이 인체에 흡수될 경우, 활성산소의 생성 등을 비롯한 다양한 기전을 통해 호흡기 및 순환기계 뿐만 아니라, 전신에 걸쳐 질환을 야기할 수 있으며, 관련 보고들이 다수 발표되어 있다(Donaldson and MacNee, 2001; Kumar and Jugdutt, 2003). 국립환경과학원의 조사에 따르면, 한국인의 체내 납 농도는 미국, 캐나다인에 비해 약 2배 높은 것으로 나타나며, 한국지질자원연구원의 조사에서는 초미세먼지 속의 납 함량이 일반 토양 속의 납 함량의 133배에 달한다고 밝히고 있다. 특히 이러한 초미세먼지가 입을 통하여 위로 들어갈 경우, 납의 71 %, 아연과 카드뮴의 80% 이상이 녹아 인체에 축적될 수 있다는 연구 결과도 있다. 상기 중금속 중 특히 납은 가연 가솔린에 포함되어 있어 대기에 다량으로 존재하고, 간에 축적되어 간독성을 야기할 수 있다. 이에 납에 의한 간 손상을 치료하는 것이 중요한 상황이다.

[0003] 한편, 해조류의 일종인 톳은 갈조식물 모자반과의 바닷말로 우수한 식이섬유소의 공급원일 뿐만 아니라 함황 산성 다당류인 후코이단과 혈액응고작용, 면역증강작용 등의 기능성이 있는 중성 다당류인 라미나란이 다량 함유되어있다 (Lee and Chung, 1991). 이에 본 발명의 발명자는 톳의 영양학적 장점을 바탕으로 톳 추출물이 납에 의한 간 손상을 치료한다는 것을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이에 본 발명의 목적은 톳 추출물을 포함하는 납에 의한 간 손상 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 발명자는 톳 추출물이 납에 의한 간 손상을 치료할 수 있다는 것을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다. 따라서 본 발명의 과제 해결 수단은 톳 추출물을 포함하는 납에 의한 간 손상 치료용 약학적 조성물이다.

발명의 효과

[0006] 본 발명의 톳 추출물은 납에 의한 간 손상을 치료하는 효과를 가지는 바, 납에 의한 간 손상 치료용 약학적 조성물로 사용되기에 적합하다.

도면의 간단한 설명

[0007] 도 1은 본 발명 실시예의 톳 추출물의 제조 과정을 간략화한 도이다.
 도 2는 본 발명 실험예에서 사용된 흰 쥐의 투여 정보를 간략화한 것이다.
 도 3은 본 발명 실시예의 대조군, Pb군, HZK 150 및 300 군의 GOT 값을 나타낸 그래프이다.
 도 4는 본 발명 실시예의 대조군, Pb군, HZK 150 및 300 군의 GPT 값을 나타낸 그래프이다.
 도 5는 본 발명 실시예의 대조군, Pb군, HZK 150 및 300 군의 TBARS 값을 나타낸 그래프이다.
 도 6은 본 발명 실시예의 대조군, Pb군, HZK 150 및 300 군의 간 조직에서의 SOD 활성 값을 나타낸 그래프이다.
 도 7은 본 발명 실시예의 대조군, Pb군, HZK 150 및 300 군의 간 조직에서의 CAT 활성 값을 나타낸 그래프이다.
 도 8은 본 발명 실시예의 대조군, Pb군, HZK 150 및 300 군의 간 조직에서의 GSH 함량 값을 나타낸 그래프이다.
 도 9는 본 발명 실시예의 대조군, Pb군, HZK 150 및 300 군의 MAPKs 인산화의 웨스턴 블롯팅을 나타낸 도이다.
 도 10은 본 발명 실시예의 대조군, Pb군, HZK 150 및 300 군의 NF- κ B 경로 발현에 대한 웨스턴 블롯팅을 나타낸 도이다.
 도 11는 본 발명 실시예의 대조군, Pb군, HZK 150 및 300 군의 Nrf2 경로 발현에 대한 웨스턴 블롯팅을 나타낸 도이다.
 도 12는 본 발명 실시예의 대조군, Pb군, HZK 150 및 300 군의 간 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0008] 본 발명은 톳 추출물을 포함하는 납에 의한 간 손상 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명에 있어서 ‘톳’은 모자반과에 속하는 해조로서 그 학명이 “*Hizikia fusiforme*”인 것을 지칭한다.

[0010] 상기 톳 추출물은 1) 톳을 증류수로 추출하는 것;

[0011] 2) 상기 추출물을 원심분리하여 상층액을 분리하는 것;

[0012] 3) 상기 상층액에 상층액의 2 내지 4배 부피의 에탄올을 가하고 당을 가라앉히는 것; 및

[0013] 4) 가라앉힌 당을 여과하여 제거한 후 여과액을 감압 농축하는 것을 포함하는 추출 방법으로 추출된다.

[0014] 상기 1) 단계에서의 톳은 톳 분말인 것이 바람직하다.

[0015] 상기 1) 단계에서의 증류수는 톳 분말 중량의 20 내지 30배 사용하는 것이 바람직하다. 이보다 적게 사용할 경우, 유효 성분이 제대로 추출되지 않을 수 있으며, 이보다 많게 사용할 경우 전체 추출 과정에 사용되는 비용이 상승하는 문제점이 있다.

[0016] 상기 3) 단계에서의 에탄올은 상층액 부피의 2 내지 4배 사용하는 것이 바람직하다. 이보다 적게 사용할 경우, 유효 성분이 제대로 추출되지 않을 수 있으며, 이보다 많게 사용할 경우 전체 추출 과정에 사용되는 비용이 상승하는 문제점이 있다.

[0017] 본 발명의 톳 추출물은 납에 의한 간 손상에 대한 치료 효과를 나타낸다.

[0018] 본 발명의 명세서에서 “치료”는 질환의 완치뿐만 아니라, 증세의 부분적 완치, 호전 및 경감을 포함한다.

[0019] 상기 약학적 조성물은 일반적으로 약물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제를 포함할 수 있고, 사용될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에이스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐리롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마

그네슘 스테아레이트, 및 광물유를 들 수 있다.

[0020] 상기 약학적 조성물을 제제화하는 경우 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등을 포함할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용액, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용액, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 웨텍솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[0022] 본 발명의 명세서에서 “약학적으로 유효한 양”은 질환을 치료하기에 충분하고, 위험은 충분히 낮은 양을 의미하며, 구체적인 값은 투여 대상의 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0023] 또한 본 발명의 약학적 조성물은 간 또는 비뇨기 질환의 치료에 사용되는 종래의 다른 약물과 병용하여 사용할 수 있다. 종래의 다른 약물과 병용하는 경우, 순차적으로 혹은 동시에 투여될 수 있으며, 이는 통상의 기술자에게 용이하게 결정될 수 있다.

[0024] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0026] 실시예

[0027] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0029] 톳 추출물의 제조

[0030] 1) 톳 분말의 제조

[0031] 부산광역시 기장군에서 채취한 톳을 깨끗한 물에 3 내지 4회 수세하여 염분 및 불순물을 제거하고, 수세, 정선 및 탈수의 과정을 거쳐 동결 건조기로 건조한 후 식품 분쇄기로 분말화하여 톳 분말을 제조하였다.

[0032] 2) 톳 추출물의 제조

[0033] 3구 플라스크에 5L의 증류수와 상기 톳 분말 200g을 침지시키고 상온에서 4시간 동안 교반하여 추출하였다. 그 후 원심분리(3,000rpm, 4℃, 30분)하여 상층액을 분리하였으며, 상층액의 3배 부피의 에탄올을 처리하여 저온에서 24시간 동안 반응시켜 당을 가라앉혔다. 그 후 감압 여과하여 당을 제거한 후, 여과액을 감압 농축하였다. 당은 친수성이 강하여 물에 잘 용해되고, 이에 물과 잘 섞이는 용매를 넣어줌으로서 극성을 낮추어 당을 침전시키고 여과를 통해 당을 제거한 것이다. 원심분리 후 얻어진 잔사를 같은 방법으로 한 번 더 추출하였고, 이를 증류수에 녹이고 동결 건조하여 본 발명의 톳 추출물을 수득하였다. 도 1은 본 발명에 따른 톳 추출물의 제조 공정도이다.

[0035] 실험 동물

[0036] 납에 의한 간 독성에 관한 톳 추출물의 간 보호 메커니즘을 규명하기 위하여 대조군(con), 납 25mg/kg 단독 투

여군(Pb), 납 25mg/kg+뿔 추출물 150mg/kg 투여군(HZK 150), 및 납 25mg/kg+뿔 추출물 300mg/kg 투여군(HZK 300)에 대하여 각 군마다 7마리의 흰 쥐를 실험 동물로 사용하였다. 모든 실험군에 정상 식이와 음용수를 매일 공급하였다. 대조군은 10일간 증류수 경구 투여와 마지막 5일 동안 생리식염수 0.5ml를 복강 투여하였다. Pb군은 10일간 증류수를 경구 투여하고, 마지막 5일 동안 납 25mg/kg/일을 복강 투여하였다. HZK 150 및 300 군은 각각 뿔 추출물 150 및 300mg/kg/일로 뿔 추출물을 10일 동안 경구 투여하였으며, 마지막 5일 동안 납 25mg/kg/일을 복강 투여 하였다. 이를 도 2로 간략화하였다.

[0037] 시료의 채취를 위해 실험동물을 실험 종료 12시간 전부터 절식시킨 후, 에틸에테르로 흡입 마취하여 단두한 뒤 채혈하였다. 이를 실온에서 30분 간 방치한 후에 원심 분리(2,500rpm, 4℃, 20분)한 다음 혈청을 -70℃에 보관하여 시료로 사용하였다. 간 조직은 적출하여 생리식염수로 씻고 여과지로 수분을 제거하였다. 사진 촬영한 후 액체 질소로 동결하여 -70℃에 보관하였으며, 간 조직 시료로 사용하였다.

[0039] 실험예 1. 뿔 추출물에 의한 GOT/GPT 변화 측정

[0040] 혈액 생화학적 지표인 GOT 및 GPT 활성을 Reitman-Frankel 방법으로 측정하였다. 기질액 100 μ l를 시험관에 넣고 37℃에서 5분 동안 방치한 후 혈청 10 μ l를 넣어 잘 혼합하였다. 그 후 37℃의 수조에 넣어 GOT는 60분, GPT는 30분간 방치하였으며, 수조에서 꺼내 정색시액 100 μ l를 가하여 흔들여 섞었다. 이를 실온에 20분간 방치하고 0.4N 수산화나트륨 용액 1ml를 가하여 마개를 해전도 혼화하고 실온에 10분간 방치하였다. ELISA plate reader로 505nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0041] 납 투여에 따른 간 세포의 손상 정도는 GOT 및 GPT의 양을 측정하여 혈청 ml 당 Karmen 유닛으로 표시하였다. GOT 활성도는 대조군과 비교하였을 때 Pb 군의 경우 유의성 있게 증가하였으나, HZK 150, 300 군은 Pb 군에 비해 농도 의존적으로 감소하였다(도 3). GPT 활성도는 Pb 군은 유의성 있게 증가하였으며, HZK 150, 300 군은 Pb 군에 비하여 활성이 낮아졌다(도 4). GOT와 GPT 모두 간의 합성 능력 등으로 간 세포의 상해 정도를 분석할 수 있는 지표인 바, Pb 군의 GOT 및 GPT가 증가한 점으로부터 납에 의해 간 손상이 야기되었음을 확인할 수 있고, HZK 150, 300 군에서는 이러한 값이 회복되어 본 발명의 뿔 추출물이 간 손상에 대한 보호 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0043] 실험예 2. 싸이오바르비투르산 반응성 물질(TBARS) 측정

[0044] 채취한 흰 쥐의 간 조직을 얼음 위의 접시에서 1g 세절하여 TBARS 완충액으로 균질화하고, 지시 용액 1ml에 시료 1ml를 첨가하여 1분간 와류(vortex)시켜 실온에서 60분 동안 반응시켰다. 원심분리(15,000g, 24℃, 5분)하여 얻은 상층액의 532nm에서의 흡광도를 확인하였다.

[0045] 간 조직 내 TBARS 생성을 측정한 결과를 도 5로 나타내었으며, Pb군 및 HZK 150, 300 군이 대조군에 비해 그 값이 유의성 있게 증가하였고, Pb 군 보다 HZK 150, 300 군에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다는 것을 확인하였다.

[0046] 한 연구에서(Newairy 및 Abdou, 2009; Upasani 및 Balaraman, 2003) 납 처리는 말론디알데하이드(MDA) 수준을 증가시켜 지질 과산화의 증가를 초래하였다는 점이 밝혀진 바, 이러한 결과로부터 본 발명의 뿔 추출물이 유의성 MDA 수준을 감소시켜 지질 과산화를 방지한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0048] 실험예 3. 간 조직의 항산화 효소 활성 측정

[0049] 간 조직의 슈퍼옥사이드 디스무테아제(SOD), 카탈레이즈(CAT) 및 글루타티온(GSH) 효소 활성을 측정하였다. SOD 활성은 잔틴 옥시데아제와 하이포잔틴에 의해 생성되는 슈퍼옥사이드 라디칼 검출을 이용하여 측정하였다. 채취한 간 조직을 0.5g으로 세절한 다음 5ml SOD 완충액으로 균질화시켰다. 그 후 원심분리(1,500g, 4℃, 5분)하여 얻은 상층액을 효소원으로 사용하였다. 96-웰에 시료와 SOD 기준을 각각 10 μ l씩 분주하고, 희석시켜 만든 라디칼 검출액 200 μ l를 첨가한 후 잔틴 옥시데아제 20 μ l를 넣었다. 실온에서 진동기에 30분간 반응시킨 후, 450nm에서 흡광도를 측정하여 SOD 활성도를 계산하였다.

[0050] 각 군별 간 조직에서의 SOD 활성을 비교한 것을 도 6으로 나타내었으며, 대조군에 비해 Pb, HZK 150, 300 군에서 그 값이 유의성 있게 증가하였음과 Pb군에서 증가된 SOD에 비해 HZK 150, 300 군의 SOD 활성이 농도 의존적

으로 감소하였다는 점을 확인할 수 있다. 이는 납에 투여로 인해 증가된 활성 산소를 제거하기 위한 방어기작으로 SOD가 증가하였고, 본 발명의 톱 추출물에 의해 SOD 효소 활성이 안정화되었음을 나타낸다.

[0051] CAT 효소 활성도는 카탈레이즈와 메탄올 및 과산화수소의 반응으로 생성된 포름알데히드를 측정하였다. 채취한 흰 쥐의 간 조직 0.5g을 세절하여 CAT 완충액에 넣어 균질화시켰으며, 원심분리(10,000g, 4℃, 15분)하여 상층액을 얻었다. 상층액, 포름알데히드 기준, 양성 대조군을 각각 20 µl씩 분주하고, 1X 카탈레이즈 분석 완충액 100 µl, 메탄올 30 µl씩 분주한 후 희석한 과산화수소 20 µl를 넣고 실온 진동기에서 20분간 반응시켰다. 과요오드산 칼륨 30 µl을 첨가하고, 카탈레이즈 퍼팔드(purpald) 30 µl를 각 웰에 분주하여 실온에서 10분동안 반응시키고, 카탈레이즈 과요오드산 칼륨 10 µl을 첨가하여 실온의 진동기에서 5분간 반응시켰다. 그 후 540nm에서 흡광도를 확인하였다.

[0052] 간 조직 내 CAT 활성 변화를 측정한 결과를 도 7로 나타내었다. Pb군에서 대조군보다 조금 감소하였고, HZK 150, 300군의 CAT 활성에서는 미미한 회복을 보였으나, 유의성을 나타내지는 않았다. 스피리루나를 이용한 납에 의한 간 손상 보호 효과 관련 연구(Johny et al., 2010.)의 결과에서 CAT 활성이 대조군에 비해 납 단독 투여군과 스피리루나 투여군이 유의하게 낮았고, 납 단독 투여군에 비해 대조군과 스피리루나 투여군이 높게 나타났다는 것을 참조하면, Pb군에서 나타난 CAT 활성이 조금 저하되는 경향은 SOD 활성에 의해 전환된 과산화수소를 빠르게 해독하지 못해 납이 체내에 머물면서 간 조직을 손상시키는 것으로 판단된다. HZK 150, 300 군에서는 추출물 투여로 미미하지만 본 발명의 톱 추출물로 인해 미미하지만 활성이 회복된 것으로 해석된다.

[0053] GSH 함량은 간 조직의 0.5g을 얼음 위의 접시에서 세절한 후, 인산 완충액(pH 6-7, 1mM EDTA) 용액으로 4℃에서 균질화하고, 이를 4℃, 10,000g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 효소원으로 사용하여 측정하였다.

[0054] GSH 함량 측정 결과를 도 8로 나타내었다. Pb군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, HZK 150, 300 군에서는 납으로 유도된 간 손상에 대해 감소된 GSH 함량이 농도 의존적으로 유의하게 증가함을 확인하였다. 이는 납 투여로 인해 다량의 과산화수소가 생성되고, 이를 소거하기 위해 GSH가 생성되며, 본 발명의 톱 추출물이 간 세포의 GSH 함량을 회복시킨다는 점을 나타낸다.

[0056] 실험예 4. 간 조직 단백질 발현 및 분석(Western Blot 분석)

[0057] 간 조직 0.05g을 RIPA 라이시스 완충액(2 µg/ml 펩스타틴, 2g/ml Na₃VO₄, 2 µg/ml NaF, 1 µg/ml 아프로티닌, 5 µg/ml 류페틴, 10 µg/ml 페닐메틸설포닐플루오라이드)속에서 균질화하고 원심분리(12,000rpm, 4℃, 20분)하여 상층액을 회수하였다. 단백질 농도는 BCA 단백질 분석 키트로 측정하였고, 단백질을 양을 50 µg/레인으로 동일하게 취하여 5X 시료 완충액과 섞어 수조에서 끓이고 7.5%, 10% 및 12.5% SDS-PAGE 겔에 웨스턴 블롯하였다. 표준 분자량은 이중 색상 마커(dual color marker)를 사용하였고, PVDF 멤브레인(Millipore, USA)으로 전달하였다. 멤브레인은 1% 소혈청알부민(BSA)/TBS-T로 블락(Block)하였고, 1차 항체에서 2시간 동안 상온 반응시키고, TBS-T로 15분간 2회 세척한 후 2차 항체를 1:10,000-5,000 비율로 희석하여 1시간 반응시켰다. 반응시킨 멤브레인을 TBS-T로 15분간 2회 세척한 후, uper Signal West Pico Luminol/Enhancer solution 와 Super Signal West Pico Stable Peroxide solution (Rockford IL, USA)을 사용하여 형광 젤 이미지 분석장치 (Azure biosystems)로 현상한 후 스캔하여 나온 밴드로 단백질 발현 수준을 확인하였다.

[0058] 본 실험예에서는 MAPK 경로의 ERK, JNK, p-38의 인산화를 확인하였으며, 도 9에서 나타난 바와 같이 Pb군에 비해 HZK 150, 300 군에서의 단백질의 인산화가 감소한 것으로 나타났다. 이는 세포의 생존, 스트레스 및 염증반응에 본 발명의 톱 추출물이 효과를 나타낸 것으로 판단된다. 전사인자인 NF-κB에서 역시 Pb군에 비해 본 발명의 톱 추출물 투여군이 발현 감소를 보였으며(도 10), 염증반응과 관련된 세포 내 효소복합체인 I-κB에서의 발현이 감소하였으며, 염증을 유발하는 단백질인 iNOS, COX-2에서도 그 발현이 억제되었다. 이로부터 본 발명의 톱 추출물이 항산화 및 항염증에 관여하는 것으로 판단되며, 또 다른 전사인자인 Nrf2에서는 본 발명의 톱 추출물 처리에 의해 발현이 증가하였고, NQO-1, HO-1, GST 발현 또한 증가하여 본 발명의 톱 추출물이 산화적 스트레스에 대한 방어 작용 및 염증에 대한 보호 효과를 가지는 것으로 판단된다(도 11).

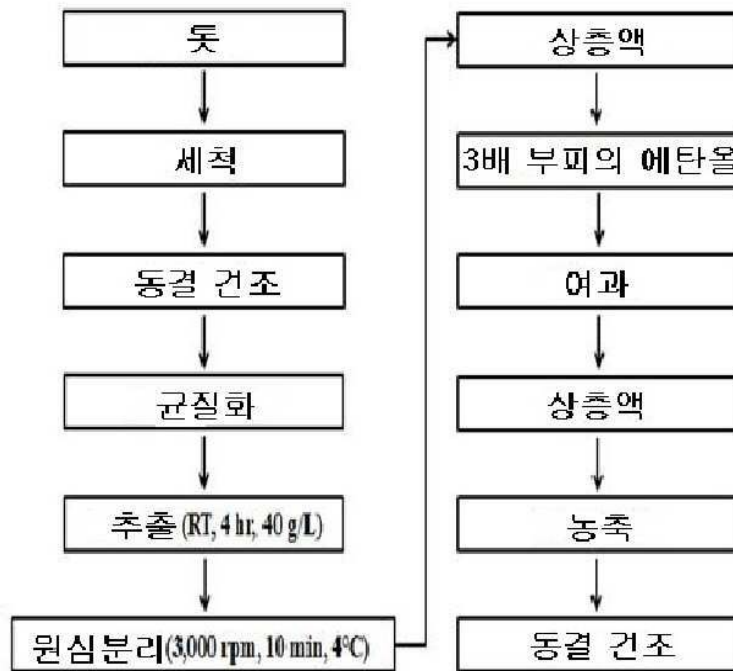
[0060] 실험예 5. 간 조직의 관찰

[0061] 간 조직에서의 조직학적 변화를 사진으로 기록하여 도 12로 나타내었다. 대조군은 무처리 군으로 정상적인 간의 형태로 붉은 색 및 윤기 나는 표면을 보였다. Pb군은 간의 크기가 증가하였으며, 잿빛으로의 색 변화 및 섬유화

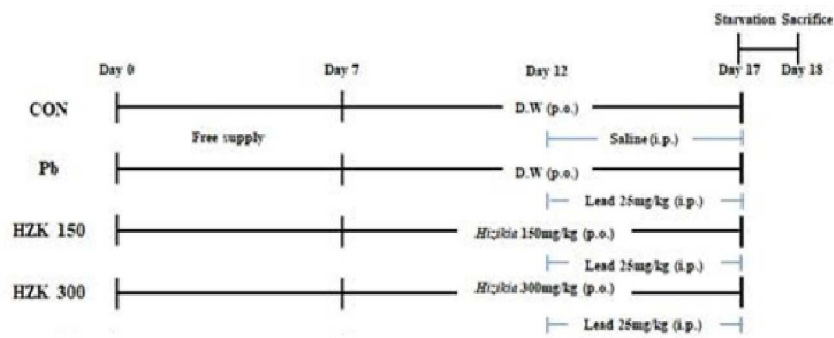
성 변화가 관찰되었다. HZK 150, 300의 경우 간의 색이나 크기가 대조군과 비슷하였으며, 농도에 의 한 변화도 관찰되지 않았고, 간 손상으로 추정되는 현상이 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이로부터 본 발명의 톱 추출물 이 간 손상을 보호하는 역할을 한다는 점을 확인하였다.

도면

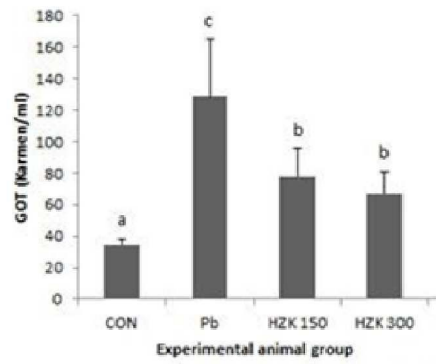
도면1



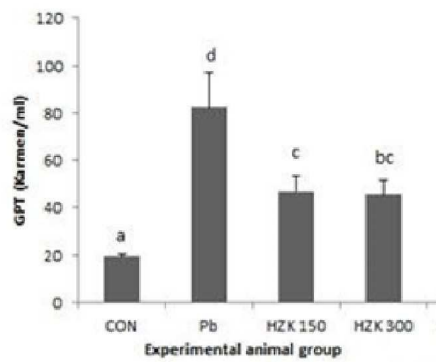
도면2



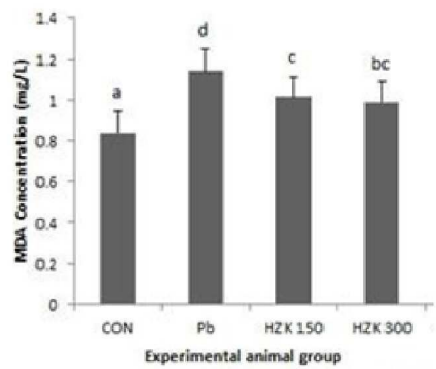
도면3



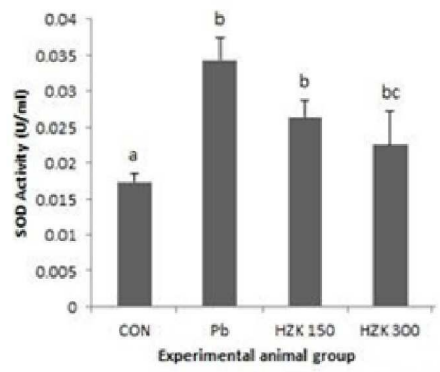
도면4



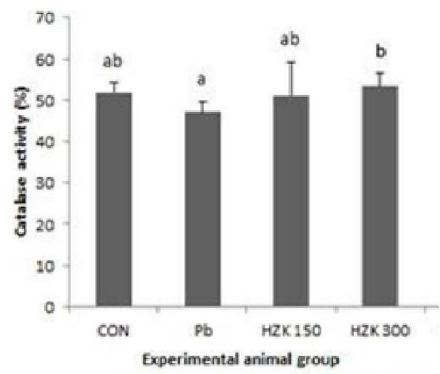
도면5



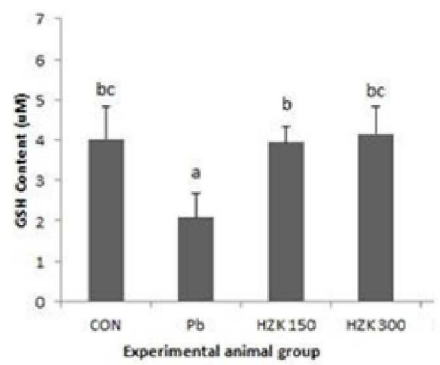
도면6



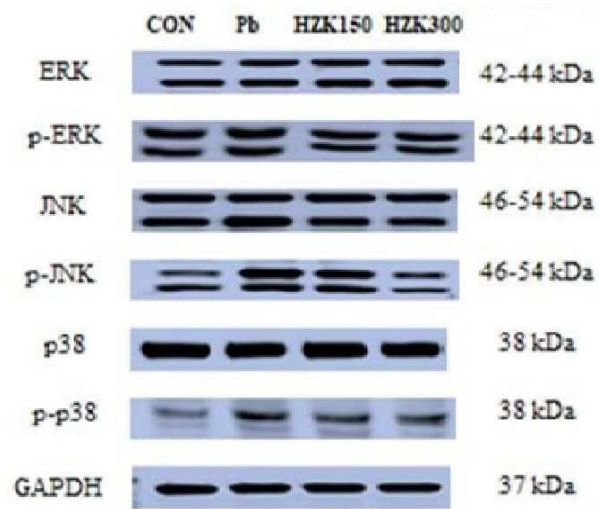
도면7



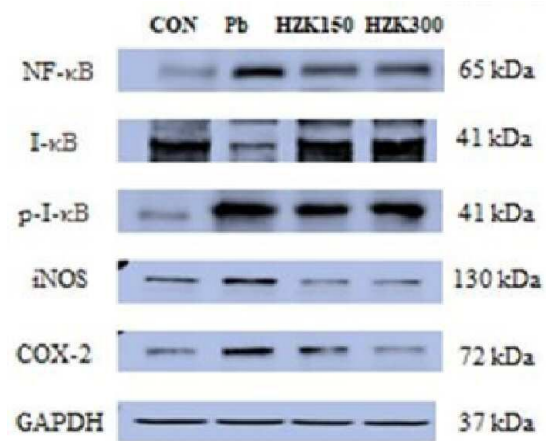
도면8



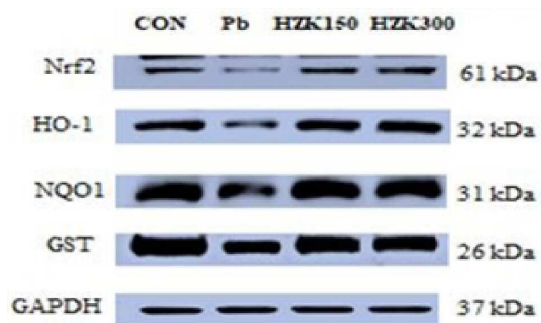
도면9



도면10



도면11



도면12



CON



Pb



HZK 150



HZK 300