(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0082122
(43) 공개일자 2025년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/64 (2015.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/64 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0169360
(22) 출원일자 2023년11월29일
심사청구일자 2023년11월29일

(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
김성렬
전라북도 완주군 이서면 농생명로 166
김기영
전라북도 완주군 이서면 농생명로 166
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

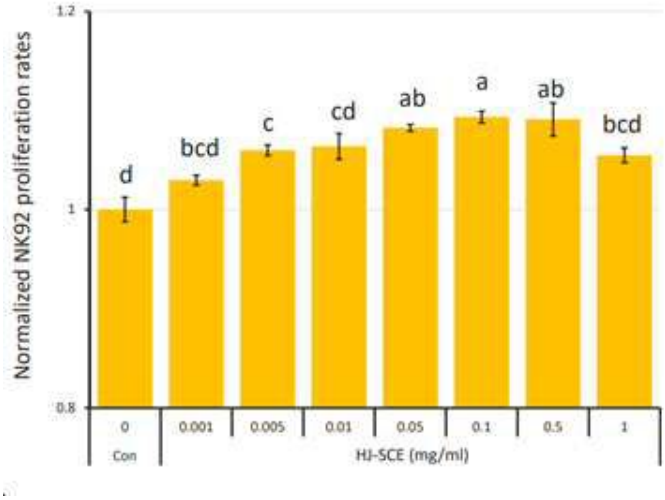
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **자연살해세포의 증식 및 항암 증진 효과를 가지는 홍잠 추출물을 포함한 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 자연살해세포의 증식 및 항암 증진 효과를 가지는 홍잠(弘蠶, Steamed/freeze-dried Mature Silkworm) 추출물을 포함한 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 누에(silkworm, *Bombyx mori* L.) 숙잠을 수증기로 찌고 동결건조하여 얻은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 암의 예방 또는 치료/개선용 약학적 조성물 및 건강기능식품의 유효성분으로서의 홍잠 또는 홍잠 추출물은 각종 고형암 및 혈액암 세포에 대한 세포 독성을 나타내므로 암의 예방 또는 치료/개선용 조성물로 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 상기 홍잠 또는 홍잠 추출물은 식용으로 사용되어 인체에 독성을 나타내지 않으며 추출액, 분말, 환, 정 등의 다양한 형태로 가공되어 상시 복용이 가능한 형태로 조제할 수 있는 뛰어난 효과가 있으므로 제약 산업 및 식품 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/204 (2013.01)

(72) 발명자
강상국
전라북도 완주군 이서면 농생명로 166
김성완
전라북도 완주군 이서면 농생명로 166
이지혜
전라북도 완주군 이서면 농생명로 166
박종우
전라북도 완주군 이서면 농생명로 166
고영호
서울시 영등포구 버드나루로 55 도헌연구센터 1005C
김유희
서울시 영등포구 버드나루로 55 도헌연구센터 1005E
유엔 띠 딴 탐
서울시 영등포구 버드나루로 55, 1005E

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395077685
과제번호	RS-2022-RD010366
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농업정책지원기술개발사업
연구과제명	홍잠의 기능성분 구명 및 ICT 기반 안정생산 체계 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2025.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

홍잠(弘蠶) 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 홍잠은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크로 이루어지는 군으로부터 선택되는 누에 품종 기원인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 홍잠 추출물은 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 두부암, 경부암, 흑색종, 대장암, 결장직장암, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암, 식도암, 림프종 및 백혈병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

홍잠(弘蠶) 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는, 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 홍잠 추출물은 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크로 이루어지는 군으로부터 선택되는 누에 품종 기원인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 홍잠은 상기 홍잠은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크로 이루어지는 군으로부터 선택되는 누에 품종 기원인 것을 특징으로 하는, 건강기능식품.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 두부암, 경부암, 흑색종, 대장암, 결장직장암, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암, 식도암, 림프종 및 백혈병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품.

청구항 9

홍잠(弘蠶) 또는 홍잠 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자연살해세포의 증식 및 항암 증진 효과를 가지는 홍잠(弘蠶, Steamed/freeze-dried Mature Silkworm) 추출물을 포함한 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 누에(silkworm, *Bombyx mori* L.) 숙잠을 수증기로 찌고 동결건조하여 얻은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 누에(*Bombyx mori* L.)는 알, 누에, 번데기, 나방의 4단계를 거치는 완전 탈바꿈 곤충으로서, 통상 누에라 함은 "누에나방과(Bombycidae)에 속하는 누에나방의 유충"을 말한다. 누에 유충은 평생 뽕잎을 먹으며 빠르게 성장하며 동시에 대량 사육이 가능하여 예로부터 잠사곤충, 식용곤충, 약용곤충으로 사용되어 왔다. 최근에는 자세한 유전정보가 알려지면서, 다양한 유전 실험과 생리 실험에 사용되고 있다.

[0004] 누에 유충 및 누에 번데기는 단백질, 유리 아미노산, 단일불포화지방산 또는 다가불포화지방산, 미네랄 및 섬유질 등이 풍부하여 영양학적으로 우수하다고 알려져 있으며, 국내에서는 이미 식품원재료로 등록되어 있다. 또한, 우리나라 동의보감, 본초강목 등의 고서에서는 누에 효능이 기록되어 있으며, 민간에서는 영양실조, 폐결핵, 풍사, 익정, 중풍 등에 사용되어 왔다. 최근에는 항당뇨 활성 성분(deoxynojirimycin)이 보고되면서 기능성 식품 소재로도 각광받고 있으며, 생명과학 기술의 발달로 인해 화장품 및 의료용 소재로도 개발되고 있다.

[0005] 현재까지 국산 누에 품종은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크 등 250여종이 알려져 있으며, 잠사산업 뿐만 아니라, 관광, 체험, 화장품소재 및 약용 목적으로 지속적으로 새로운 품종들이 개발되고 있는 실정이다.

[0006] 누에의 생활사를 보면, 누에의 경우 알에서 5령을 거쳐 성장하며 5령 말까지의 유충기간 일수는 품종이나 환경에 따라 일정하지 않으나, 보통 20일 내외로 알려져 있다. 령은 잠과 잠 사이로 나누는 용어이며, 5령 누에는 4번 자고 일어난 누에를 말한다. 누에의 1령 누에를 개미누에라 부르는데 처음 크기는 2㎜ 이하로 매우 작으나, 5령이 되면 약 8㎝ 정도가 되어 개미누에의 약 8,000~10,000배의 크기로 성장하게 된다. 특히 누에는 5령 때 가장 많은 뽕잎을 먹으며 빠르게 성장하게 되는데, 통상 5령 3일 이후부터는 고치를 짓기 위해 실샘이 발달하며, 5령 7일이 지나면 더 이상 뽕잎을 먹지 않고 고치를 짓게 된다. 이때의 누에가 유충으로는 가장 큰 상태가 되며 이를 "숙잠"이라고 한다.

[0007] 고치를 짓기 직전의 누에인 숙잠은 몸속에 견사단백질이 가득 차서 맑고 투명하게 보이는 누에 상태이며, 숙잠 내 견사 단백질은 건조시 매우 딱딱한 구조로 변화되어 씹을수도 없으며, 만약 무리하게 씹다가는 치아가 손상되는 섭취 불가능한 상태로 존재한다. 따라서, 기존에는 5령 3일 이전의 누에 만을 식용 누에로 사용하였다. 그러나, 5령 3일보다 2배 이상 크기가 크며 영양성도 우수한 숙잠을 식용으로 제조하기 위해, 농촌진흥청에서 다년간 연구 끝에 숙잠을 식용할 수 있도록 하였으며, 그 방법은 누에를 빠르게 쪄서 익힌 후 이를 동결건조하여 소화흡수가 용이한 분말 상태로 제조하는 방법이며, 이렇게 제조된 누에를 "홍잠(弘蠶)"이라 명명하였다.

[0008] 따라서 홍잠이란 명칭은 5령 7일 이 후부터 견사선을 분비하기 전의 숙잠 누에를 수증기로 찐 다음 동결건조한 '쪄서 익히고 말린 숙잠'을 말하며, 2017년 농촌진흥청에서 대국민 공모를 통해 결정된 이름으로 '넓고 다양한 기능성으로 인간을 이롭게 하는 누에'라는 의미를 가지고 있다.

[0009] 현재까지 전임상 실험과 임상 실험을 수행하여 밝혀진 누에 내지 홍잠의 건강 기능 증진 효과는 기억력 개선 효과, 파킨슨병 발병 예방 및 치료 효과, 근감소증 예방 및 치료 효과, 위장관 보호 효과, 간 기능 증진 효과, 간암 전이 억제 효과, 간의 알콜 분해 증진 효과, 피부 미백 효과 및 발모 촉진 효과 등이 알려져 있으나, 홍잠의 항암 효과에 대해서는 알려진 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Ji S. D. et al, 2019. J. Asia-Pacific Entomology 22: 969-974; 홍잠의 영양성분 분석

(비특허문헌 0002) 이현태, 2019. Kor. J. Seric. Sci. 55. 40-43; 홍잠의 건강 기능성

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 홍잠 (Steamed/freeze-dried Mature Silkworm) 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 홍잠은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크 등을 포함한 모든 국산 누에 품종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 누에 품종 기원인 것이 바람직하다.

[0016] 상기 홍잠 추출물은 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0017] 상기 암은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 두부암, 경부암, 흑색종, 대장암, 결장직장암, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암, 식도암, 림프종 및 백혈병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0018] 또한, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0019] 상기 홍잠은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크 등을 포함한 모든 국산 누에 품종 기원인 것이 바람직하다.

[0020] 상기 홍잠 추출물은 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0021] 상기 암은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 두부암, 경부암, 흑색종, 대장암, 결장직장암, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암, 식도암, 림프종 및 백혈병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0022] 또한, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 암의 예방 또는 치료/개선용 약학적 조성물 및 건강기능식품의 유효성분으로서의 홍잠 또는 홍잠 추출은 각종 고형암 및 혈액암 세포에 대한 세포 독성을 나타내므로 암의 예방 또는 치료/개선용 조성물로 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 상기 홍잠 또는 홍잠 추출은 식용으로 사용되어 인체에 독성을 나타내지 않으며 추출액, 분말, 환, 정 등의 다양한 형태로 가공되어 상시 복용이 가능한 형태로 조제할 수 있는 뛰어난 효과가 있으므로 제약 산업 및 식품 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 3가지 추출 방법에 따른 4품종의 누에로 제조된 홍잠 분말의 추출 효율을 나타낸 것이다.

도 2는 HJ-SCE에 의한 NK92 세포의 증식효과를 나타낸 것이다.

도 3은 NK92 세포의 YAC-1 lymphoma에 대한 cytotoxicity가 HJ-SCE의 처리로 증가함을 보여주는 결과이다.

도 4는 NK92 세포의 K562 lymphoma에 대한 cytotoxicity가 HJ-SCE의 처리로 증가함을 보여주는 결과이다.

도 5는 NK92 세포의 PANC-1 췌장암 세포에 대한 cytotoxicity가 HJ-SCE의 처리로 증가함을 보여주는 결과이다.

도 6은 NK92 세포의 AsPC-1 췌장암 세포에 대한 cytotoxicity가 HJ-SCE의 처리로 증가함을 보여주는 결과이다.

도 7은 NK92 세포의 U87MG astrocytoma 뇌 종양 세포에 대한 cytotoxicity가 HJ-SCE의 처리로 증가함을 보여주는 결과이다.

도 8은 NK92 세포의 U373MG astrocytoma 뇌 종양 세포에 대한 cytotoxicity가 HJ-SCE의 처리로 증가함을 보여주는 결과이다.

도 9는 홍잠 추출물이 NK92MI 세포의 증식을 촉진하고 이동능력을 강화시켜 줌을 보여주는 결과이다.

도 10은 홍잠 추출물이 NK92MI 세포의 마이토콘드리아 기능을 증진시켜서, 세포의 에너지원인 ATP의 양을 증가시킴을 보여주는 결과이다.

도 11은 홍잠 추출물이 NK세포의 바이오마커와 세포 파괴에 관련된 유전자의 발현을 조절함을 보여주는 결과이다.

도 12는 홍잠을 급여받은 cyclophosphamide 면역저하 동물모델의 면역능력을 증진시켜 줌을 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0028] 본 발명의 발명자들은 홍잠의 항암 활성을 검정하기 위하여, 일정방법으로 재배된 4종 품종의 누에(숙잠)를 수증기로 찌고 동결건조하여 홍잠 분말을 준비하고, 이를 대상으로 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물을 제조한 후 이들의 항암 활성을 평가하였다. 상기 항암 활성을 갖는 홍잠 추출물은 고형암 및 혈액암 등 각종의 암의 예방 또는 치료/개선용 약학적 조성물 및 건강기능식품으로 활용될 수 있다.

[0029] 구체적으로, 본 발명자들은 민간에서 당뇨, 혈관계 및 순환계, 소화계, 신진대사계 등의 다양한 질환에 효과가 있다고 알려진 누에를 이용하여 항암용 약학적 조성물 및 건강기능식품을 개발하기 위하여, 유충 중 가장 크기가 크고 영양성이 우수한 숙잠을 홍잠으로 제조하고, 이를 대상으로 다양한 추출물을 조제하여, 이들의 항암 활성을 다양한 암세포주를 통하여 그 세포 독성을 평가한 결과, 여러 종류의 암세포주에서 항암 활성이 있음을 확인하였다.

[0030] 따라서, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0031] 상기 홍잠은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크로 이루어지는 군으로부터 선택되는 누에 품종 기원인 것이 바람직하다.

[0032] 상기 홍잠 추출물은 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0033] 상기 암은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 두부암, 경부암, 흑색종, 대장암, 결장직장암, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암, 식도암, 림프종 및 백혈병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0034] 또한, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0035] 상기 홍잠은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크로 이루어지는 군으로부터 선택되는 누에 품종 기원인 것이 바람직하다.

[0036] 상기 홍잠 추출물은 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0037] 상기 암은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 두부암, 경부암, 흑색종, 대장암, 결장직장암, 신장암,

전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암, 식도암, 림프종 및 백혈병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0038] 이하에서는, 본 발명의 홍잠 추출물의 제조 방법 및 효능 실험 등을 보다 구체적으로 설명한다.

[0039] 본 발명의 발명자들은 5령 7일 사육한 4종 누에 유충(백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크 품종)을 회수하고, 상기 4종 누에 유충을 수증기로 찌고 동결건조하여 얻은 홍잠 분말로부터 다양한 추출법을 통해 추출물을 조제하고, 상기 추출물의 암세포주에 대한 세포 독성을 평가하였다.

[0040] 본 발명의 조성물에 포함되는 "홍잠 추출물"은 5령 7일 사육한 4종의 누에 유충을 수확한 후 건조하고, 이를 100℃의 수증기로 15~30분 동안 찌고, 이후 동결건조하여 분말로 제조한 후, 다음의 다양한 추출법에 따라 제조하였다.

[0041] 구체적으로, 열수 추출법은 홍잠 분말에 약 10배의 증류수를 첨가하여 고온 고압 멸균기를 이용하여 121℃에서 1시간 동안 추출을 진행한다. 추출된 용액은 원심분리를 하여 상등액을 확보한 후, 동결 건조시킨다.

[0042] 또한, 80% 에탄올 추출법은 홍잠 분말에 약 10배의 80% 에탄올을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 교반하여 추출을 진행한다. 0.45㎜ glass filter를 장착한 vaccum funnel을 이용하여 추출액을 분말과 분리를 한 후, vaccum evaporator를 이용하여 수분을 제거 하여 추출액을 제조한다.

[0043] 또한, 초임계 추출물(Supercritical fluid extracts)은 초임계 추출기(Supercritical fluid extractor; Suflux 1L SC-CO2 Extraction system Model: ISA-SCCO-S-1000-500, ILSHIN autoclave, DaeJeon Korea)를 이용하여 추출한다. 추출 온도는 reservoir 22~25℃, extractor 58~62℃, separator 39~41℃, heater 1 60℃, heater 260℃일 수 있다. 추출 압력은 reservoir 50~52 bar, extractor 345~355 bar, separator 49~51 bar일 수 있으며, 용매가 흐르는 속도는 0.02~0.04 L/Min일 수 있다. 추출시간은 100g의 분말당 1.5시간을 진행하며, 추출 후에 남아있는 홍잠 분말은 완전히 건조된 상태로 정유 성분이 제거되었음을 확인한다.

[0044] 본 발명의 상기 홍잠 추출물은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 두부암, 경부암, 흑색종, 대장암, 결장직장암, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암, 식도암 등의 고형암 및 림프종, 백혈병 등의 혈액암에 대한 농도 의존적 세포 독성을 나타낸다.

[0045] 따라서, 본 발명의 유효성분은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

[0046] 상기 암은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 두부암, 경부암, 흑색종, 대장암, 결장직장암, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암, 식도암, 림프종 및 백혈병으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0047] 본 발명의 유효 성분을 포함하는 약학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0048] 이러한 약학적 조성물에는 추가적으로 담체, 부형제 또는 희석제 등이 더 포함될 수 있으며, 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수도 있다.

[0049] 바람직한 구체예로서, 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등과 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0050] 바람직한 구체예로서, 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0051] 바람직한 구체예로서, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제,

좌제 등을 예시할 수 있다. 비수성용제, 현탁제에는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 포함될 수 있다. 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0052] 본 발명의 유효 성분은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 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. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0053] 바람직한 구체예로서, 본 발명의 약학적 조성물에서 유효성분의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 5,000mg, 바람직하게는 100 내지 3,000mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경로를 통하여 대상에 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0055] 본 발명에서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.

[0056] 본 발명에서 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.

[0057] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 암의 예방 또는 개선에 효과적인 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다.

[0058] 상기 암은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 두부암, 경부암, 흑색종, 대장암, 결장직장암, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암, 식도암, 림프종 및 백혈병으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0059] 본 발명의 유효성분을 포함하는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0060] 본 발명의 유효성분은 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100ml를 기준으로 0.02 내지 10g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.

[0061] 본 발명의 건강기능식품은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 식품학적으로 허용가능한 식품보조 첨가제, 예컨대, 천연 탄수화물 및 다양한 향미제 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0062] 상기 천연 탄수화물의 예로는 포도당, 과당 등의 단당류, 말토오스, 수크로오스 등의 이당류 및 덱스트린, 시클로덱스트린 등의 다당류와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등의 당알코올이 있다.

[0063] 상기 향미제로는 타우마틴, 레바우디오시드 A 또는 글리시르히진과 같은 스테비아 등의 천연 향미제 및 사카린, 아스파르탐 등의 합성 향미제를 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g을 사용한다. 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수도 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 유효성분 100중량부 당 0.01 내지 약 20중량부의 범위에서

선택되는 것이 일반적이다.

[0064] 또한, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0065] 상기 홍잠 또는 홍잠 추출물은 상기 약학 조성물이나 건강기능식품의 경우와 동일하게 준비될 수 있다.

[0066] 본 발명은 개체에서의 암의 적어도 하나의 증상 또는 징후를 치료하거나 이의 중증도를 개선시키거나 이의 감소시키거나 암의 성장을 억제하기 위한 방법을 포함한다. 본 발명의 이러한 양상에 따른 방법은 이를 필요로하는 개체에게 홍잠 또는 홍잠 추출물의 치료학적 유효량을 투여함을 포함한다.

[0067] 상기 "개체"는 암의 하나 이상의 증상 또는 징후를 나타내거나 고형 종양을 포함하는 암으로 진단되고 이의 치료를 필요로 하는 인간 또는 인간을 제외한 포유동물을 의미한다.

[0069] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 일 구체예일 뿐이며, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예의 범위로 한정되는 것은 아니다.

[0071] **[실시예]**

[0072] **1. 실험 방법**

[0073] **1.1. 홍잠 제조 방법**

[0074] 국립농업과학원 잠실에서 누에를 숙잠까지 뽕나무 잎을 가지고 사육을 하였다. 고치를 분비하기 바로 전의 숙잠을 수확을 하고 바로 수돗 물에 담가서 세척을 하면서 마취가 되게 하였다. 세척 과정에서 마취된 누에를 바로 압력이 걸리지 않는 찜기(금성)에서 130분 동안 수증기로 쪘다. 익힌 숙잠은 홍잠이라고 불리고, 보관의 편의를 위하여 급속 냉동하여 보관을 하거나, 동결 건조기로 수분을 제거한 후, 천연돌 롤러밀로 분말화하였다.

[0075] **1.2. 홍잠 추출액 제조 방법**

[0076] 4가지 다른 색의 고치를 만드는 품종 누에로 제조된 홍잠(백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크)의 기능성을 확인하기 위하여, 홍잠 분말에서 기능성 물질을 확보하기 위하여 열수 추출법과 80% 에탄올 추출법과 초임계 추출법을 이용하였다.

[0077] 열수 추출법은 10g의 홍잠 분말에 증류수를 첨가하여 100g으로 만든 후, 고온 고압 멸균기를 이용하여 121℃에서 1시간 동안 추출을 진행하였다. 추출된 용액은 원심분리를 하여 상등액을 확보한 후, 동결 건조를 완료하였다. 최초의 중량과 건조물의 중량을 비교하여 추출 효율을 계산하였다.

[0078] 80% 에탄올 추출법은 10g의 홍잠 분말에 80% 에탄올을 첨가하여 100g으로 만든 후, 상온에서 24시간 동안 교반하여 추출을 진행하였다. 0.45mm glass filter를 장착한 vaccum funnel을 이용하여 추출액을 분말과 분리를 한 후, vaccum evaporator를 이용하여 수분을 제거 하여 추출액을 제조하였다. 최종 수분이 제거된 추출액의 무게를 측정한 후, 최초 분말의 무게를 비교하여 추출 효율을 계산하였다.

[0079] 초임계 추출물(Supercritical fluid extracts)은 초임계 추출기(Supercritical fluid extractor; Suflux 1L SC-CO2 Extraction system Model: ISA-SCCO-S-1000-500, ILSHIN autoclave, DaeJeon Korea)를 이용하여 추출하였다. 추출 온도는 reservoir 22~25℃, extractor 58~62℃, separator 39~41℃, heater 160℃, heater 260℃였다. 추출 압력은 reservoir 50~52 bar, extractor 345~355 bar, separator 49~51 bar였고, 용매가 흐르는 속도는 0.02~0.04 L/Min 이었다. 추출시간은 100g의 분말당 1.5시간을 진행하였다. 추출 후에 남아있는 홍잠 분말은 완전히 건조된 상태로 정유 성분이 제거되었음을 확인하였다.

[0080] **1.3. NK92 세포 배양 방법**

[0081] 다양한 홍잠 추출물의 면역력 증진 효과를 비교 연구하기 위하여, 자연살해세포 (Natural killer 92, NK92) 세포주와 NK92-MI 세포주를 ATCC에서 구입하여 사용을 하였다. NK92 세포 주와 NK92-MI 세포주는 11.2% Horse serum(Gibco™)을 포함한 MyeloCult™ H5100(StemCell Technologies)를 complete media로 사용을 하였다. NK92 세포주 배양 시에는 human IL2를 추가하여 세포의 증식이 가능하게 하였다. NK92-MI는 human IL2(hIL2)를 자가분비하는 hIL2-independent 세포주이다. 실험에 사용된 NK92와 NK92-MI 세포주들의 passage는 동일하였다.

[0082] **1.4. 홍잠 추출물의 NK 세포 증식 효과 비교**

[0083] 홍잠 추출물의 NK92 세포주의 증식 효과를 확인하기 위하여 NK92 또는 NK92MI 세포를 1 x 10^5/ml의 농도로 96 well plate에 분주한 후, 하루 동안 증식을 시킨 후, 다양한 농도의 LPS 또는 홍잠 추출물을 단독 또는 혼합하여 처리하였다. 24시간 동안 배양 후, 다양한 농도의 홍잠 추출물을 처리하였다. 48시간 동안 배양된 NK92 또는 NK92MI 세포들에 대하여, cell proliferation assay를 BIOMAX사의 Quanti-MaxTM WST-8 Cell Viability Assay Kit를 이용하여 측정하였다. 세포 배양액 총량의 1/10에 해당하는 WST-8 solution을 추가한 후, 1시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건에서 유지하였다. 세포 증식력을 계산하기 위하여 450 nm와 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 600 nm에서의 흡광도는 각각 처리군의 탁도를 나타내었다. 450 nm의 흡광도에서 600 nm의 흡광도를 빼면 실제 세포 증식 효과를 계산할 수 있는 보정된 흡광도였다.

[0084] **1.5. 홍잠 추출물의 NK92 cell cytotoxicity 활성 평가**

[0085] Mouse 유래 lymphoblast인 YAC-1 세포들과 인간 유래 lymphoblast인 K562 세포들에 대한 NK92 세포의 cytotoxicity가 HJ-SCE에 의해 증진되는지에 대한 연구를 진행하였다. Effector 세포인 NK92 세포와 Target 세포인 YAC-1 또는 K562 세포의 비율은 10:1이었다. Effector 세포인 NK92 세포를 2 x 10^4 cell/well로 접종을 하고 다양한 농도의 HJ-SCE (0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml)를 처리한 후, 24시간 뒤에 target 세포들을 2 x 10^3 cell/well의 비율로 접종하였다. 24시간 후에 LDH assay를 수행하여 HJ-SCE의 NK92 세포의 lymphoma에 대한 lysis activity를 증진 효과를 확인하였다.

[0086] 다음으로, 인간 Pancreatic tumor line인 PANC-1과 AsPC-1세포주들은 2 x 10^3 cell/well의 비율로 접종하고 24시간 동안 배양을 하여 부착되도록 하였다. 다양한 농도 (0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml)의 HJ-SCE에서 배양된 NK92 cell을 2 x 10^4 cell/well로 추가한 후, 24시간 동안 배양을 진행한 후, LDH assay를 수행하여 HJ-SCE가 NK92 세포의 pancreatic tumor cell line들에 대한 lysis activity 증진을 시키는지를 확인하였다.

[0087] 또한, 인간의 astrocytoma인 U-87 MG 세포주와 U-373 MG 세포주들을 2 x 10^3 cell/well의 비율로 접종하고 24시간 동안 배양하여 부착되도록 하였다. 0.05 mg/ml 농도의 HJ-SCE에서 배양된 NK92 cell을 2 x 10^4 cell/well로 추가한 후, 24시간 동안 배양을 진행한 후, LDH assay를 수행하여 HJ-SCE가 NK92 세포의 astrocytoma들에 대한 lysis activity 증진시키는지 확인하였다.

[0088] **1.6. 홍잠 추출물의 NK92MI cell migration 증진 효과**

[0089] NK세포들은 혈액을 순환하다가, 바이러스에 감염되거나 암세포화된 세포를 발견하면 이동하여 병든 세포를 제거한다고 알려져 있다. 그러므로, NK 세포들의 이동능력이 면연력과 높은 연관성이 있어서, 1 x 10^5 NK92MI 세포를 24 well insert hanging에 넣어준 후, 24 well plate에 다양한 농도의 HJ-SCE를 처리하였다. 24시간 배양 후에 insert hanging을 조심히 제거한 후, WTS-8 assay를 수행하여 이동한 NK92MI세포의 수를 확인하였다.

[0090] **1.7. 홍잠 추출물의 NK92 cell 마이토콘드리아 활성 증진 효과**

[0091] NK92 세포의 마이토콘드리아 컴플렉스 1 ~ 4 (MitoCom I~IV)의 활성을 측정하기 위하여 위에 언급된 방법으로 배양된 NK92 세포를 이용하였다. 마이토콘드리아 추출 완충액(0.25 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, and 1% BSA, pH 7.4)을 이용하여 세포를 파괴한 후, 4℃에서 150×g로 5 분간 원심분리하여 상등액을 확보한 후, 다시 900 ×g에서 원심분리하여 마이토콘드리아 침전물을 확보하였다. 마이토콘드리아 침전물은 200 μl 마이토콘드리아 추출 완충액과 혼합해준 후, 2개로 나누었다. 하나의 튜브에는 MitoCom I~III을 측정하기 위하여 155 μl를 넣어 주고, 45 μl가 있는 다른 튜브에는 MitoCOm IV를 측정하기 위하여 5 μl의 10 mM n-D-β-D maltoside를 첨가해 주었다. 모든 MitoCom I~IV의 활성은 HJ-SCE가 추가되지 않은 대조군을 이용하여 비교하였다.

[0092] **1.8. 홍잠 추출물에 의한 NK92 세포 ATP의 양 증진 효과**

[0093] 위에 언급된 방법으로 배양된 NK92 세포들을 2.5% $HClO_4$ (DaeJung Chemicals & Metals Co.) 용액에서 초음파 분쇄기를 이용하여 균질화하였다. 2.5 M KOH를 추가한 시료는 강하게 썩어 준 후, 4℃, 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 확보하여 ATP의 정량에 활용하고, 나머지 침전물은 단백질의 양을 측정에 활용하였다. ATP정량을 위하여 ATP 표준물질과 시료를 ATP 측정 완충액 (50 μM Luciferin, 1.25 μg/ml of Luciferase, 1

mM DTT, 20.875 mM Tricine, 4.175 mM MgSO4, 0.835 mM EDTA, 0.835 NaN3, Merck KGaA)과 혼합해주었다. 시료와 ATP 표준 용액의 Luminescence를 Victor Nivo™ multimode plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정한 후, ATP 표준 용액으로 제조된 표준 곡선으로 시료 안의 ATP의 양을 정량한 후, 단백질 농도로 보정하였다.

[0094] **1.9. Total RNA 추출, cDNA 합성 및 real time-quantitative PCR 실험 수행**

[0095] 위에 언급된 방법으로 배양된 NK92 세포들에서 TRIzol을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA 수준 검사를 A260/A280의 비율과 28S rRNA/18S rRNA의 비율로 확인하였다. DNase I을 이용하여 genomic DNA를 제거한 후, Superscript IV를 이용하여 cDNA를 합성하였다. CD56, Granzyme A와 B, IL-4, IL-10 과 Perforin등의 NK 세포의 세포 살해 관련 유전자들의 발현 변화를 ARIA MX RT-PCR machine과 software (Agilent, Santa Clara, CA, United States)를 이용하여 수행하였다. 목표 유전자들의 발현 변화는 2-ΔΔCT method 방법으로 비교 및 정량하였다. 본 발명에 사용된 프라이는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0096]

유전자		프라이머 서열
beta-actin	F	GGC ACC CAG CAC AAT GAA G (서열번호 1)
	R	GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT (서열번호 2)
CD56	F	TCT GGA TGG GCA CAT GGT G (서열번호 3)
	R	TGC TCT TCA GGG TCA GCG A (서열번호 4)
Granzyme A	F	GCG AAG GTG ACC TTA AAC TTT T (서열번호 5)
	R	TGA CTT CTC TCA GAG TAT CGG A (서열번호 6)
Granzyme B	F	GAA AGT GCG AAT CTG ACT TAC G(서열번호 7)
	R	TTG TTT CGT CCA TAG GAG ACA A (서열번호 8)
Perforin	F	GCT ATC GTT AGT GCT AGT GGA T (서열번호 9)
	R	ATC TGT CTG ATG CGT ATC CAA T (서열번호 10)
IL-10	F	GCC GTG GAG CAG GTG AAG (서열번호 11)
	R	GAA GAT GTC AAA CTC ACT CAT GGC T (서열번호 12)
IL-4	F	GCG ATA TCA CCT TAC AGG AGA TCA T (서열번호 13)
	R	GTT ACG GTC AAC TCG GTG CA (서열번호 14)

[0097] **1.10. 홍잠의 생체 내 NK 세포 기능 증진 효과**

[0098] 홍잠이 생체 내의 NK 세포의 증식과 항암 작용을 증진시키는 지를 확인하기 위하여 우리는 C57BL/6J 쥐를 6주간 정상 사료 또는 홍잠포함 사료(0.4g/Kg체중, 1.0g/Kg체중, 2.0g/Kg체중)로 사육한 후, 80 mg/Kg 체중의 비율로 면역저하제인 cyclophosphamide를 5일간 복강주사한 후, 5일간의 회복 기간을 거친 후, 비장을 추출하여 splenocyte를 확보하여 K562 세포주에 대한 cytotoxicity test를 위에 언급한 방법으로 진행하였다.

[0100] **2. 실험 결과**

[0101] **2.1. 다양한 추출방법에 따른 홍잠 분말 추출 효율 비교**

[0102] 홍잠 분말의 항암 효과에 대한 연구와 기능성 물질을 확인하는 연구를 진행하기 위하여, 3가지 다른 방법으로 4가지 품종으로 조제된 홍잠 분말로부터 추출액을 제조하였다. 가장 추출 효율이 높았던 추출법은 열수 추출법(Hot water extraction)이었다 (도 1의 A). 백옥잠 홍잠(White Jade HongJam, WJ)의 열수 추출 효율은 31.2 ± 1.28 %, 주황잠 홍잠(Juhwang Jam HongJam, HJH)의 열수 추출 효율은 29.2 ± 1.59 %, 대황잠 홍잠(Daehwang Jam HongJam, DHJ)의 열수 추출 효율은 28.3 ± 2.32 %, 골든실크 홍잠 (Goldensilk HongJam, GS)의 열수 추출 효율은 31.2 ± 1.67 % 였다. 품종 간에 열수 추출 효율은 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($P > 0.01$).

[0103] 이에 비하여 80% 에탄올 주정을 이용하여 추출한 경우에는 WJ의 경우는 10.3 ± 0.54 %, JHJ의 경우는 13.0 ±

0.98 %, DHJ의 경우는 11.35 ± 0.88 %, GS의 경우는 9.55 ± 0.79 % 였다(도 1의 B). 품종 간에 80% 에탄올 주정 추출 효율은 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (P > 0.01).

[0104] 초임계 추출기를 이용한 홍잠 분말의 추출 효율을 보면, WJ의 추출 효율은 11.4 ± 0.43 %, JHJ의 추출 효율은 12.5 ± 0.33 %, DHJ의 추출 효율은 13.2 ± 0.76 %, GS의 추출 효율은 13.3 ± 0.53 % 였다 (도 1의 C). 품종 간에 초임계 추출 효율은 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (P > 0.01).

[0105] **2.2. HJ-SCE에 의한 NK92 cell 증식 효과**

[0106] NK92 세포는 NK 세포에 대한 면역 관련 연구에 광범위하게 사용되는 세포주이며, 동시에 tumor 세포에 대한 새로운 치료제 개발을 위해서 사용되는 기반 세포 주이다. NK 세포들의 주요한 기능은 바이러스 등에 감염된 세포나 tumor 세포들을 인지하여 파괴함으로써 건강을 유지시켜 주는 기능을 한다. 본 발명에서는 HJ-SCE가 NK92 세포를 증식시킬 수 있는지 확인하는 연구를 진행하였다. 도 2의 결과에서 명확하게 드러나듯이, 대조군과 비교하여 HJ-SCE를 0.001 mg/ml에서 0.1 mg/ml에 처리한 경우에서는 농도 의존적으로 NK92 세포의 증식이 관찰되었다.

[0107] **2.3. HJ-SCE에 의한 NK92 세포의 혈액암 세포에 대한 cytotoxicity 증가**

[0108] YAC-1세포는 생쥐의 lymphoma cancer 세포로 NK92 세포의 cancer 세포에 대한 cytotoxicity를 연구하는데 광범위하게 사용되고 있다. HJ-SCE를 처리한 NK92 세포의 YAC-1세포에 대한 cytotoxicity assay를 확인한 결과를 보면, 0.05 mg/ml과 0.1 mg/ml의 HJ-SCE를 처리한 NK92 세포들의 YAC-1 세포에 대한 cytotoxicity가 증가함을 확인하였다(도 3).

[0109] 또한, K562 세포는 사람의 lymphoma cancer 세포로서 NK92 세포주의 cancer에 대한 cytotoxicity를 연구하는데 자주 사용되는 세포주 중의 하나이다. 0.05 mg/ml과 0.1 mg/ml의 HJ-SCE를 처리받은 NK92 세포들은 대조군보다 더 높은 K562 세포에 대한 cytotoxicity를 보여 주었다(도 4).

[0110] 이러한 결과는 NK92 세포의 lymphoma에 대한 cytotoxicity가 HJ-SCE를 처리하면 증가함을 보여주는 것이다.

[0111] **2.4. HJ-SCE에 의한 NK92 세포의 췌장암 세포에 대한 cytotoxicity 증가**

[0112] 췌장암은 현재 가장 진단이 어렵고 예후가 좋지 않은 암으로 알려져 있다. 췌장암 세포주인 PANC-1과 AsPC-1를 이용하여 NK92 세포의 췌장암 세포에 대한 cytotoxicity가 HJ-SCE 처리로 증가하는지에 대한 연구를 진행하였다.

[0113] HJ-SCE를 처리받은 NK92 세포는 PANC-1 췌장암 세포를 파괴하는 활성이 증가함을 확인하였다 (도 5). 구체적으로, 0.05 mg/ml과 0.1 mg/ml의 HJ-SCE가 처리된 NK92 세포의 PANC-1 세포주에 대한 cytotoxicity는 대조군보다 유의하게 증가하였음을 확인하였다.

[0114] 또 다른 췌장암 세포인 AsPC-1에 대한 NK92 세포의 cytotoxicity도 HJ-SCE를 처리하면 증가함을 확인하였다 (도 6). 0.1 mg/ml의 HJ-SCE를 처리받은 NK92 세포의 AsPC-1세포에 대한 독성은 대조군 대비 유의하게 증가함을 확인하였다.

[0115] 이러한 결과는 HJ-SCE가 NK92 세포의 다양한 췌장암 세포에 대한 cytotoxicity를 증가시킴을 보여주는 것이다.

[0116] **2.5. HJ-SCE에 의한 NK92 세포의 뇌종양 세포에 대한 cytotoxicity 증가**

[0117] Astrocytoma는 신경세포의 기능을 도와주는 역할을 하는 astrocytes가 암세포로 변이되면서 발생하는 암으로 예후가 매우 좋지 않다. Astrocytoma인 U87MG와 U373MG 암세포들에 대한 NK92의 cytotoxicity가 HJ-SCE 처리로 증가하는지에 대한 연구를 진행하였다.

[0118] 0.05 mg/ml의 HJ-SCE를 처리받은 NK92 세포는 대조군과 비교하여 유의하게 증가된 Astrocytoma에 대한 cytotoxicity를 보여주었다 (도 7 및 도 8).

[0119] 이러한 결과는 NK92 세포의 뇌종양 세포에 대한 cytotoxicity가 HJ-SCE에 의하여 증가함을 보여주는 것이다.

[0120] **2.6. 홍잠 추출물의 NK92MI세포에 대한 증식 효과 및 이동력 증진 효과**

[0121] NK세포들은 혈액으로 신체를 돌아 다니다가, 바이러스에 감염되거나 종양으로 변이된 세포들을 감지하면 혈관에서 병든 세포가 있는 곳으로 이동한다. 본 연구에서는 홍잠 추출물이 NK92MI 세포의 증식과 이동력의 증진에 도움을 줄 수 있는지를 확인하였다.

[0122] 홍잠 추추물을 처리한 NK92MI 세포 군에서는 대조군에 비하여 농도의존적으로 세포 증식효과가 관찰되었다(도

9). 그리고 NK92MI 세포의 이동 능력도 대조군에 비하여 1.0 mg/ml과 5.0 mg/ml 처리군에서는 통계적으로 유의하게 증진이 되었다. 낮은 농도 처리군도 통계적으로 유의하지는 않았지만, 대조군에 비하여 뛰어난 이동 능력을 보여주었다 (도 9).

[0123] 이러한 결과는 홍잠 추출물이 NK세포의 이동능력을 증진시켜줌을 보여준다.

[0124] **2.7. NK92 세포의 마이토콘드리아 기능 증진 효과**

[0125] 마이토콘드리아는 세포의 기능과 생존에 필요한 에너지인 ATP를 생산하는 세포 소기관이다. 본 연구에서는 홍잠 추출물이 NK92MI 세포들의 기능을 증진시키는 분자세포생물학적인 기전을 밝혀내기 위한 연구의 일환으로 마이토콘드리아 컴플렉 스(MitoCom)의 활성 측정 연구를 진행하였다.

[0126] 그 결과를 보면, MitoCom I의 경우 대조군에 비하여 홍잠 추출물 처리군에서 유의하게 증가된 활성이 측정되었다 ($P < 0.05$, 도 10). MitoComII의 경우는 대조군과 홍잠 처리군과 활성 차이가 없었다 ($P > 0.05$, 도 10). MitoComIII의 활성은 대조군과 비교하여 홍잠 처리군에서 농도의존적으로 활성이 증가됨을 확인하였다 ($P < 0.05$, 도 10). MitoComIV의 활성은 홍잠 추출물 1.0 mg/ml과 5.0 mg/ml 처리군에서 증가됨을 확인하였다 ($P < 0.05$, 도 10). 그리고 NK92MI 세포의 ATP의 양도 홍잠처리군에서 대조군 대비 증가하였고, 특히 1.0 mg/ml과 5.0 mg/ml에서는 2배이상 증가하였다.

[0127] 이러한 결과로부터 홍잠 추출물이 NK 세포의 마이토콘드리아 활성을 증진시켜서 NK 세포를 증식시키고, 이동력을 증진시켜서, 병든 세포들을 제거하는데 도움을 줌을 알 수 있었다.

[0128] **2.8. NK92 세포의 항암 효과에 대한 분자기전 연구**

[0129] 홍잠 추출물이 NK92 세포들이 가지는 다양한 종류의 암세포를 파괴할 수 있는 능력을 증진시켜 줌을 본 연구에서 보여주었다. 홍잠 추출물의 NK92세포의 항암 능력 증진 효과에 대한 분자 세포 생물학적인 기전 증진 효과에 대한 연구를 진행하였다.

[0130] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, NK 세포의 바이오마커인 CD56의 발현이 홍잠 추출물 처리군에서 증가되었고, 동시에 NK 세포가 암세포를 파괴할때 분비하는 Granzyme A와 Granzyme B와 Perforin의 발현이 증가됨을 확인하였다. 그리고 후천면역을 조절하는 사이토카인인 IL_4의 발현은 증가하고, NK세포의 활성을 감소시키는 역활을 하는 사이토카인인 IL-10은 높은 농도에서 발현이 감소되었다.

[0131] 이러한 결과로부터 홍잠 추출물이 NK 세포의 면역 관련 유전자들의 발현을 조절하여 병든 세포를 제거할 수 있는 능력을 증진시킴을 알 수 있다.

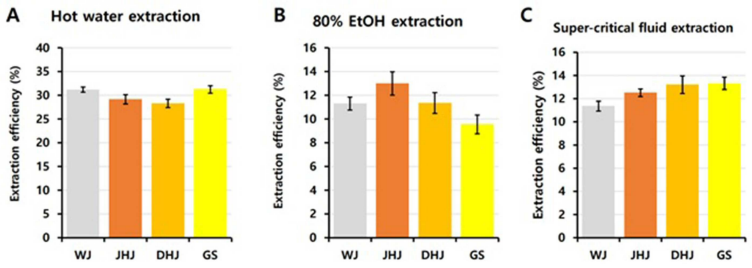
[0132] **2.9. 홍잠의 splenocytes의 항암력 증진 효과**

[0133] Cyclophophamide 복강 주사 (CPA-IP)로 유도된 면역력 저하 동물 모델을 이용한 홍잠의 NK 세포 기능 증진 효과를 연구하였다. 일반 사료(Normal food, Nf) 섭취 식염수 주사 대조군 (Sal-IP)과 비교하여, 홍잠 섭취군은 농도의존적으로 splenocyte의 암세포 파괴 능력이 증진됨을 확인하였다 (도 12). 일반 사료 급여 CPA-IP 면역력 저하 동물 모델의 경우는 대조군에 비하여 암세포 능력이 현저하게 낮아졌다($P < 0.05$, 도 12). 하지만, 홍잠을 0.4 g/Kg체중, 1.0 g/Kg체중과 2.0g/Kg체중의 비율로 급여받은 CPA-IP 면역저하 모델 동물의 경우 splenocyte의 항암능력이 회복됨을 확인할 수 있었다.

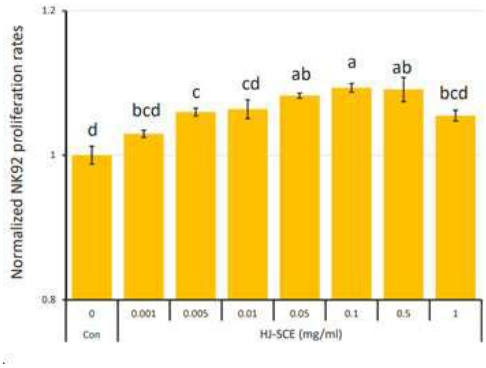
[0134] 이 결과는 홍잠 추출물 뿐만이 아니라 홍잠의 섭취로 인해 NK 세포의 활성이 증진되어 암세포를 파괴하는 능력이 증진됨을 알 수 있다.

도면

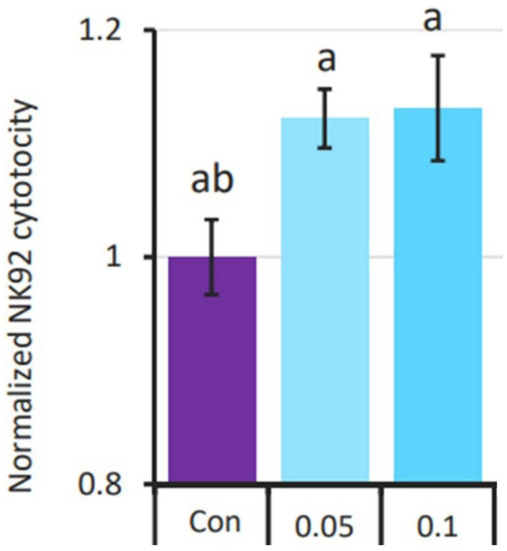
도면1



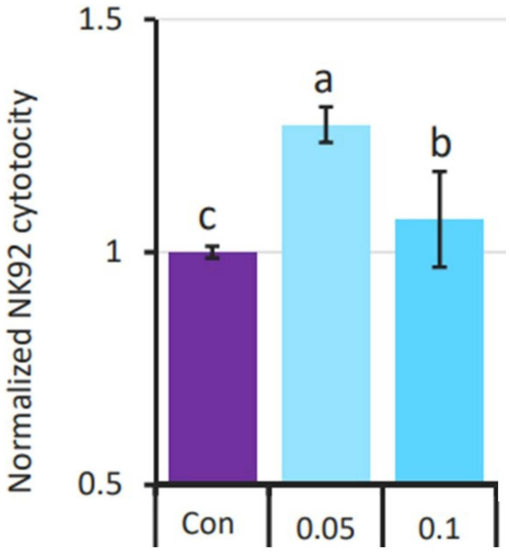
도면2



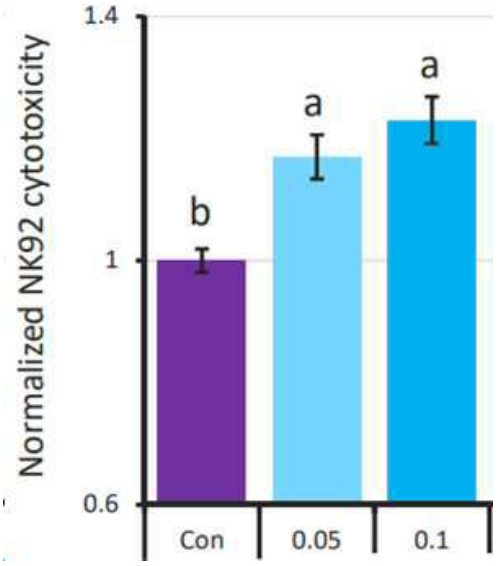
도면3



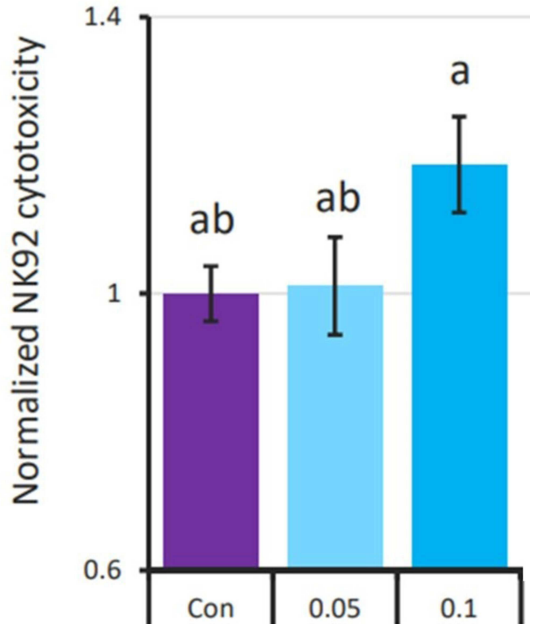
도면4


1.5
1
0.5
Normalized NK92 cytotocity
c
a
b
Con
0.05
0.1

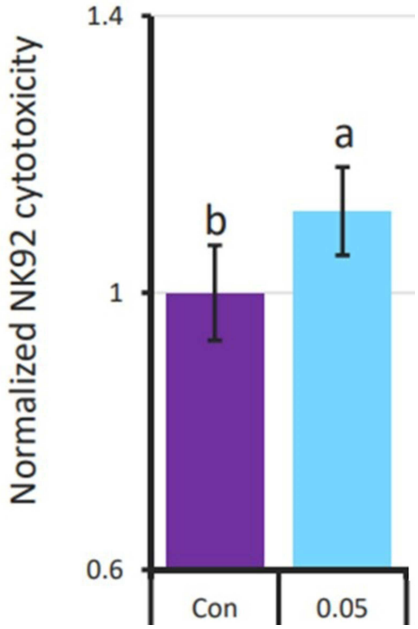
도면5


1.4
1
0.6
Normalized NK92 cytotoxicity
b
a
a
Con
0.05
0.1

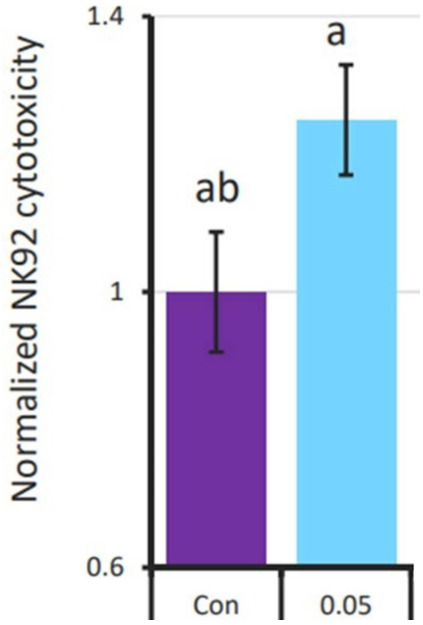
도면6


Normalized NK92 cytotoxicity
1.4
1
0.6
ab
ab
a
Con
0.05
0.1

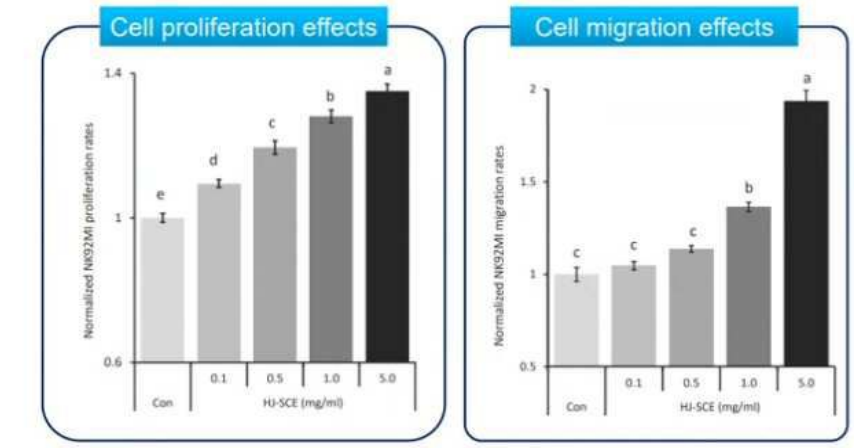
도면7


Normalized NK92 cytotoxicity
1.4
1
0.6
b
a
Con
0.05

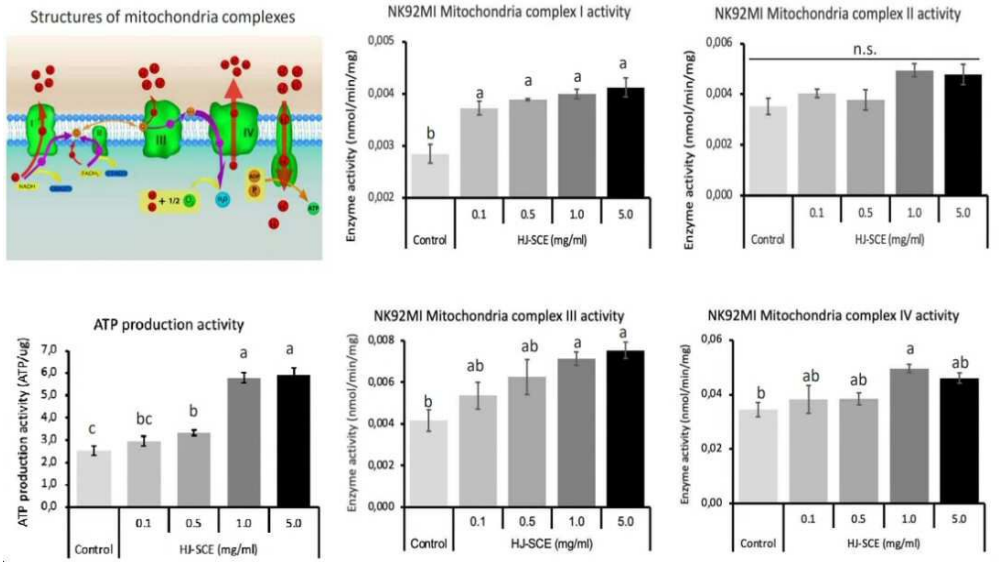
도면8


Normalized NK92 cytotoxicity
1.4
1
0.6
a
ab
Con
0.05

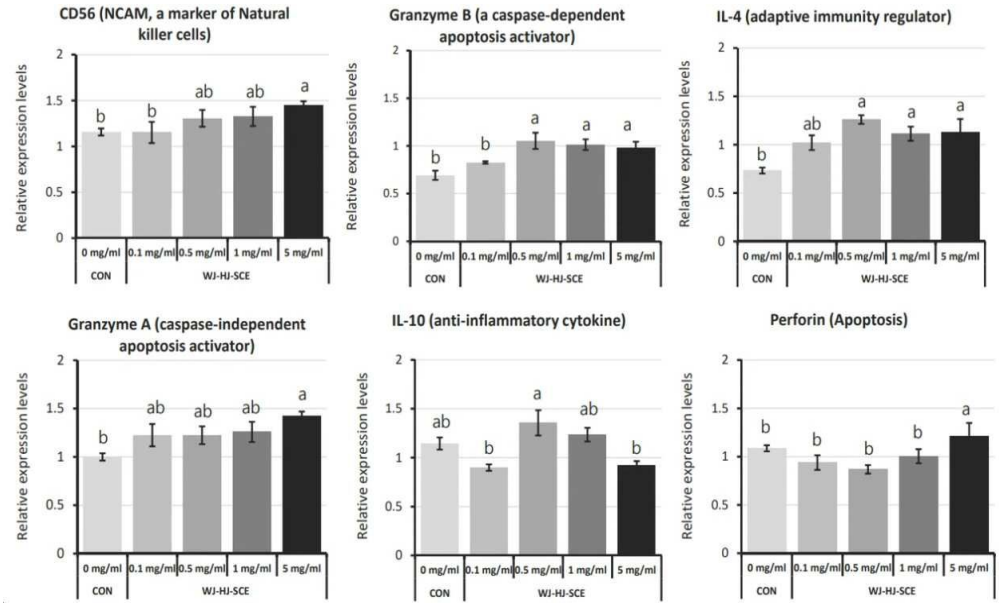
도면9


Cell proliferation effects
Normalized NK92MI proliferation rates
1.4
1
0.6
e
d
c
b
a
Con
0.1
0.5
1.0
5.0
HJ-SCE (mg/ml)
Cell migration effects
Normalized NK92MI migration rates
2
1.5
1
0.5
c
c
c
b
a
Con
0.1
0.5
1.0
5.0
HJ-SCE (mg/ml)

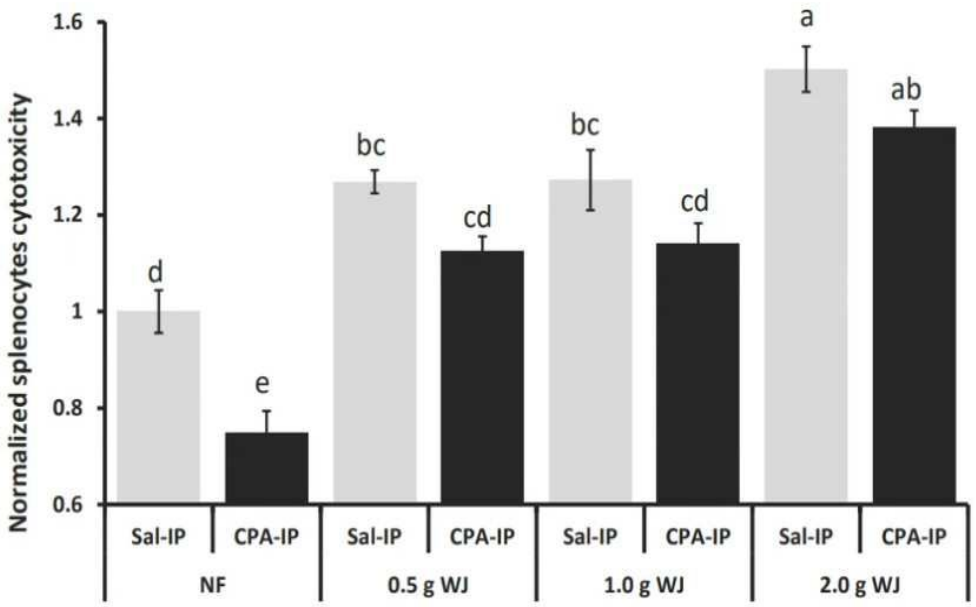
도면10


Structures of mitochondria complexes
NK92MI Mitochondria complex I activity
NK92MI Mitochondria complex II activity
n.s.
ATP production activity
NK92MI Mitochondria complex III activity
NK92MI Mitochondria complex IV activity
Enzyme activity (nmol/min/mg)
ATP production activity (ATP/ug)
Control
HJ-SCE (mg/ml)
0.1
0.5
1.0
5.0

도면11


CD56 (NCAM, a marker of Natural killer cells)
Granzyme B (a caspase-dependent apoptosis activator)
IL-4 (adaptive immunity regulator)
Granzyme A (caspase-independent apoptosis activator)
IL-10 (anti-inflammatory cytokine)
Perforin (Apoptosis)
Relative expression levels
0 mg/ml
0.1 mg/ml
0.5 mg/ml
1 mg/ml
5 mg/ml
CON
WJ-HJ-SCE

도면12


Normalized splenocytes cytotoxicity
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
d
e
bc
cd
bc
cd
a
ab
Sal-IP
CPA-IP
Sal-IP
CPA-IP
Sal-IP
CPA-IP
Sal-IP
CPA-IP
NF
0.5 g WJ
1.0 g WJ
2.0 g WJ

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.