(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0021266
(43) 공개일자 2014년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/734 (2006.01) *A61P 13/08* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0087408
(22) 출원일자 2012년08월09일
심사청구일자 2012년08월09일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
이효정
서울 성북구 아리랑로5길 85, 102동 501호 (돈암동, 돈암동더샵아파트)
고현숙
부산 부산진구 복지로 70, 216동 1402호 (개금동, 현대아이아파트)
조선미
서울 동대문구 회기로19길 9, 2층 305호 (회기동)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 5 항

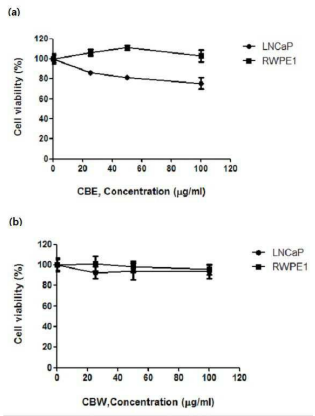
(54) 발명의 명칭 **산사자 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 산사자 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료를 위한 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 추출물은 항안드로겐 효과 또는 전립선 특이항원 억제 효과를 나타내며, 전립선염, 전립선 비대증, 전립선암과 같은 전립선 관련 질환의 개선 예방 내지 치료에 효과적이다.

대 표 도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

산사자(Crataegus pinnatifida) 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선염, 전립선 비대증 또는 전립선암으로 이루어진 군에서 선택되는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 질환의 예방 또는 치료는 안드로겐 수용체 발현 감소 작용에 의한 것인 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 질환의 예방 또는 치료는 전립선 특이 항원 억제 작용에 의한 것인 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1~4의 알코올 중에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출한 것인 약학 조성물.

청구항 5

산사자 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선염, 전립선 비대증 또는 전립선암으로 이루어진 군에서 선택되는 전립선 관련 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전립선 관련 질환을 예방 또는 치료하는 산사자 추출물의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 산사자는 우리나라 산야와 계곡에 자생하는 낙엽교목인 산사나무 Crataegus pinnatifida Bunge의 건조된 과실이다. 과실은 구형으로 지름 7-15㎜이다. 바깥면은 황갈색-회색을 띤 적갈색이며 많은 가는 주름이 있다. 한쪽에는 지름 5㎜의 오목하게 들어간 곳이 있고 그 주변에 가끔 꽃받침이 남아 있으며 다른 한쪽에는 과병 또는 이의 자국이 남아 있다. 횡절면은 5실로 되어 있으며 각 실에는 1개의 씨가 들어 있다. 씨는 공을 몇 개로 등분한 모양으로 길이 6-8㎜이며 그의 바깥면은 엷은 갈색이고 딱딱하며 질은 단단하다. 다른 이름으로는 아가위 또는 적과자등으로 불리며 예로부터 한방에서 건위, 소화, 수렴, 진통 등의 효과가 있는 것으로 알려져 왔다. 약리 성분으로는 카페산(caffeic acid), 구연산(citric acid), 코로솔릭 산(corosolic acid), 크라테골릭 산(crataegolic acid), 유스케픽 산(euscaphic acid), 하이페린(hyperin), 하이페로사이드(hyperoside), 프로카테추익 산(procatechuic acid), 피로갈롤(pyrogallol), 올레아놀 산(oleanolic acid), 우르솔릭 산(ursolic acid), 비텍신(vitexin) 등이 보고되어 있다. 또한 산사자는 항산화 항균, 순환계 질환, 동맥경화, 고지혈증, HIV-1 potease 저해 등의 생리 활성이 있는 것으로 보고되어 있다.

[0003] 한편, 항안드로겐 약물은 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는 등의 작용을 하는 물질로, 안드로겐작용을 억제하는 약물을 의미한다. 안드로겐은 남성호르몬으로 DNA의 특정부위와 상호작용하는 단백질 전사인자인 안드로겐 수용체(AR: androgenic receptor)를 경유하는 약리기전을 가지므로, 안드로겐 수용체의 발현을 억제함으로써 안드로겐 작용을 억제할 수 있는 것이다. 따라서 항안드로겐 약물은 안드로겐과 관련된 질환 또는 상태 등을 치료, 개선 또는 예방할 수 있으며, 안드로겐과 관련된 질환 또는 상태로는 전립선염, 전립선 비대증, 전립선암, 탈모, 여드름, 지성피부 등이 알려져 있다.

[0004] 또한, 전립선 특이 항원 억제제는 전립선 특이 항원(prostate specific antigen)의 발현억제 등에 의해 전립선 특이 항원을 억제하는 약물로, 전립선 특이항원을 억제함으로써 전립선 특이항원의 영향을 받는 전립선염, 전립선 비대증, 전립선암과 같은 질환 또는 상태 등을 치료, 개선 또는 예방할 수 있다.

[0005] 전립선은 호두모양의 기관으로 남성에서 요도가 시작되는 주위를 둘러싸고 있고, 방광의 아래에 있는 점액성 물

질을 생성하는 기관으로서, 전립선의 유일한 기능은 번식을 위하여 정자를 보호하고 활발하게 하는 정액을 생성하는 것이다. 전립선은 나이가 들면서 자라고 커지는 특성을 갖고 있으며, 대부분의 포유동물들은 방광으로부터 소변을 배출하는 통로인 요도가 전립선을 통과하는 특성을 가지고 있다. 이러한 전립선의 해부학적 특성으로 인해 남성에게는 나이가 들어갈수록 소변 배출과 관련된 문제가 종종 초래될 수 있으며, 전립선 관련 질환을 포함한 각종 질환이 유발되기도 한다.

[0006] 상기 전립선 관련 질환은 전립선염(Prostatitis), 전립선 비대증(Benign prostatic hyperplasia), 전립선암(Prostate cancer)을 포괄하는 용어이다.

[0007] 상기 전립선염은 전립선의 감염 또는 염증으로 정의된다. 전립선염으로 인한 고열, 몸살, 및 경직은 비록 급성인 경우도 있기는 하지만 대부분이 만성적이어서, 표준 치료법에도 불구하고 비교적 재발률이 높은 일종의 불치의 질환이라고 할 수 있다. 통계적으로 살펴보면, 20에서 50대 남성의 30% 이상이 전립선 질환을 앓고 있으며, 비뇨기과 외래 환자의 25% 이상을 차지하는 흔한 질환이지만 완치율이 매우 낮아, 상기 환자들 중 80 ~ 90%가 재발성으로서 매우 심각한 문제를 갖고 있다. 전립선염은 전립선 조직의 염증에 의해 유발되고, 그 증상으로는 소변을 유난히 자주 보고 소변 줄기가 가늘어지며 배뇨통과 하복부, 회음부에 불쾌한 통증과 극심한 고환통 또는 요통 등이 나타난다. 또한 이러한 증상은 음주나 과로 후에 더욱 심해져 성기능 저하, 조루증상 및 피로 등의 전신증상을 나타내기도 한다. 특히, 만성 전립선염은 성인 남성에게서 매우 흔한 질환이다. 전립선염은 모든 전립선암과 실질적으로 연관이 있으며 다른 특이사항이 없는 경우에도 조직검사에 의하면 염증이 존재할 수 있다. 만성 전립선염에 걸린 경우, 공통적으로 골반의 통증으로 시작하여 소변불리, 임포텐스 그리고 불임과 같은 증상이 뒤따른다. 전립선염에 의하여 야기되는 전형적인 증상인 '소변불리'는 야간에 잦은 소변불리로 인한 수면부족, 소변줄기의 약화 및 소변의 단락 등의 증상을 나타내는 것이다. 상기 전립선 비대증은 전립선이 커지는 질환을 말한다. 남성의 배뇨 장애 질환 중에서 가장 높은 빈도를 차지하는 이 질환은 남성이 나이가 들어감에 따라 발생빈도가 증가하며, 60세 이상의 노인에게서는 비교적 흔하게 나타나는 질환으로, 고령화됨에 따라 상기 질환의 발생이 급증하고 있다.

[0008] 상기 전립선 비대증은 전립선이 커지면서, 빈뇨, 야간빈뇨, 배뇨 시작의 지연 및 방뇨력의 감퇴 현상을 보인다. 가끔 회음부의 불쾌감이나 중압감, 하복부의 긴장감을 느끼기는 것을 경과하면서, 초기에 보이던 자극 증상 및 배뇨 증상이 심해지고 갑자기 소변을 보지 못하는 경우도 생기게 된다. 이후, 배뇨량은 더욱 감소하고 잔뇨량은 늘어나게 되며 신장에 무리한 영향을 주는 경우에 이르게 된다.

[0009] 상기 전립선암은 호르몬 수용체 매개 성인 암 중 미국에서 발생률 1위의 암이며, 우리나라에서도 최근 발생이 급격히 증가하여 현재 성인 암 중 발생 증가율 1위이다. 안드로겐(Androgen, 남성 호르몬)은 생식계의 발달과 유지 및 전립선의 성장에 필수적이고 스테로이드계 호르몬 수용체 상과(steroid hormone receptor superfamily)에 속하는 리간드 의존 호르몬 수용체의 활성을 조절할 뿐만 아니라 이러한 호르몬 수용체들은 전립선 암의 발달과 진행에 깊은 관련이 있다[Park, S.K. et al. Prostate. 66(12):1285-91 (2006); Taplin M.E. et al. J Cell Biochem. 15;91(3):483-90, 2004; Chen, L. et al. Mol Cancer Ther. 4(9):1311-9, 2005; Yoon, H.G. et al. Mol Endocrinol. 20(5):1048-60, 2006].

[0010] 전립선 관련 질환은 안드로겐 호르몬에 영향을 받아 성장 분화하기 때문에 그 수용체인 안드로겐 수용체와 전립선 염, 비대증, 암 등 전립선 질환에서 혈액에 다량으로 분출되는 전립선 특이 항원(prostate specific antigen) 조절이 중요하다. 실제 임상에서 혈액 내 전립선 특이 항원 농도를 전립선 암 등의 질환에 1차적 검사 방법으로 사용하고 있다. 안드로겐 수용체의 경우 그 발현이 줄게 되면 전립선 암의 성장 및 분화에 악영향을 미치게 된다.

[0011] 상기 만성 전립선염 및 전립선 비대증은 많은 남성들에게 있어서 심각한 증상을 보이지는 않을 수 있지만, 삶의 질에 심각하게 영향을 주는 고질적인 질환이며, 진단이 어렵고 완치 역시 어렵다. 또한, 상기 전립선암은 평균 수명의 증가 및 식생활 양식의 서구화 등으로 발병률이 증가하고 있는 추세이며, 상기 암으로 인한 사망률 역시 빠르게 증가하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) KR 10-2010-0114413, 2010.11.17

(특허문헌 0002) KR 10-2009-0042148, 2009.05.14

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 항안드로겐 효과 또는 전립선 특이 항원 억제 효과를 가지는 조성물을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명은 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 전립선 관련 질환에 대한 억제 효과를 갖는 천연 약재 조성물을 개발하기 위하여 연구를 진행하던 중 산사자가 항안드로겐 효과 또는 전립선 특이항원 억제 효과를 갖는다는 사실을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0015] 본 발명의 추출물은 부작용이 없으며 안전한 천연 제재인 산사자를 이용한 전립선 관련 질환 예방 및 치료제이다.

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산사자 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 산사자 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 항안드로겐 효과 또는 전립선 특이항원 억제 효과를 가진다.

[0018] 본 발명에 있어서, 산사자는 Crataegus pinnatifida Bunge의 건조된 과실로, 구입하거나 직접 채취한 것일 수 있다. 산사자 과실을 가지는 산사나무는 한국, 일본 중국 등에 널리 분포하고 있어 저비용으로 원료확보가 용이하다.

[0019] 본 발명에 있어서, 전립선 관련 질환은 전립선염, 전립선 비대증, 전립선암 등을 들 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서, 전립선 관련 질환 예방 또는 치료는 항안드로겐 작용에 의해 일어날 수 있으며 바람직하게는 안드로겐 수용체 발현 감소 작용에 의한 것일 수 있다. 또한, 전립선 관련 질환 예방 또는 치료는 전립선 특이 항원의 억제에 의한 것일 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, 추출 방법은 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있다. 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 추출 용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물, 바람직하게는 C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 에탄올 수용액을 사용하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 용매의 양은 산사자 건조 중량의 2 내지 15 배로 한다. 본발명의 산사자 추출물은 산사자 추출물 총중량에 대하여 0.1중량% 내지 95중량%의 함량을 가진다.

[0022] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 산사자 추출물 100중량부에 대해 0.1 ~ 90중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 산사자 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calciumcarbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현

탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0026] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 산사자 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 ㎎/㎏이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0027] 아울러, 본 발명은 산사자 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 관련 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0028] 본 발명의 산사자 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0029] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 산사자 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0030] 상기 외에 본 발명의 산사자 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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 산사자 추출물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 산사자 추출물을 포함하는 조성물은 항안드로겐 효과 또는 전립선 특이항원 억제 효과를 가지며, 특히, 전립선염, 전립선 비대증, 전립선암 등의 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 전립선암 세포주에 산사자 추출물 처리시, 세포외로 배출되는 전립선 특이 항원의 비율을 나타내는 그래프이다.

도 2는 전립선 암세포주에 산사자 추출물 처리시, 안드로겐 수용체와 전립선 특이항원의 발현량의 변화를 웨스턴 블럿으로 확인한 결과이다.

도 3은 전립선 암세포주 또는 정상 전립선 세포주에 산사자 추출물 처리시, 전립선 암세포주에서 세포성장이 억제되는 것을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0034] **[제조예: 산사자 추출물의 제조]**

[0035] (1) 산사자 에탄올 추출물(CBE)을 다음과 같이 제조하였다.

[0036] 분쇄한 산사자(경동시장) 300g을 삼각플라스크(1.2L)에 넣고, 에탄올 1L를 첨가하여 24시간 동안 실온(섭씨 24도)에서 교반하였다. 교반 후 얻어진 추출물은 여과지(Advantec, No. 2)로 여과하고 감압농축기(EYELA N-1000, SB-100)로 감압 농축하였으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 그 결과 산사자 에탄올 추출물 32.85g을 얻었다.

[0037] (2) 산사자 열수 추출물(CBW)을 다음과 같이 제조하였다.

[0038] 분쇄한 산사자 300g을 3L를 약탕기에 넣고 하루 동안 끓인 후 추출물은 여과지로 여과하고 감압농축기에 농축하여 얻었다. 그 결과 산사자 열수 추출물 25.8g을 얻었다.

[0039] **<실시예 1> 산사자 추출물의 전립선 특이 항원 억제 효과 확인**

[0040] 산사자 추출물의 전립선 특이 항원 억제 효과를 확인하기 위해, 전립선 특이 항원 키트[Prostate Specific Antigen Kit(Alpco, cat#. 25-PSAHU-E01)]를 이용하여 하기 방법으로 실험하였다.

[0041] $5X10^5$개의 전립선암주 LNCaP세포(ATCC, USA)를 6 well 세포 배양지에 도말하고 24시간 경과 후 40ug/ml농도의 상기 제조예에서 제조한 산사자 에탄올 추출물(CBE), 산사자 열수 추출물(CBW)을 각각 24시간 처리한 후에 세포 부유물 층을 수거하여 전립선 특이 항원 키트를 이용하여 키트에서 제시하는 사용설명서에 따라 세포외로 배출된 전립선 특이 항원을 측정하였다.

[0042] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1은 전립선암 세포주에 산사자 열수 추출물 (CBW), 산사자 에탄올 추출물(CBE) 각각 처리시, 전립선 특이 항원이 분비되는 세포배양액의 전립선 특이 항원 비율을 나타낸 그래프이다. 산사자 추출물 처리 후 24시간이 경과한 때에 측정하였으며, PSA(%)는 전립선 특이 항원의 수치(비율)를 나타내고,(-)는 미처리 대조군을 의미한다.

[0043] 도 1에 나타낸 바와 같이, 산사자 에탄올 추출물과 산사자 열수 추출물에서 대조군에 비해 전립선 특이 항원의 비율이 감소함을 확인하였다. 특히, 산사자 에탄올 추출물을 처리한 경우, 대조군과 비교하여 25% 이상 전립선 특이 항원의 비율이 크게 감소하는 것을 확인하였다.

[0044] 상기 결과를 통해서, 산사자 추출물은 전립선 특이 항원 억제에 효과적인 물질인 것을 확인할 수 있었다.

[0045] **<실시예 2> 산사자 추출물의 안드로겐 수용체 및 전립선 특이 항원 단백질 발현 억제 효과 확인**

[0046] 산사자 추출물의 전립선 특이 항원 억제 효과와 항안드로겐 효과를 확인하기 위해, 웨스턴 블럿법을 이용하여 단백질 발현을 측정하였다.

[0047] $5X10^5$개의 전립선암 세포주 LNCaP세포를 6 well 세포 배양지에 도말하고 24시간 배양 후, 상기 제조예에서 제조한 산사자 열수 추출물 (CBW) 또는 산사자 에탄올 추출물(CBE)을 각각 50㎍/ml농도로 24시간 처리한 후에 세포를 수거하였다. 수거한 세포에 RIPA Buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS, 5 mM EDTA, protease inhibitor cocktail)를 처리하고 얼음에 30분간 방치한 후 원심분리기로 14000g의 속도로 30분간 원심 분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 Bradford 방법으로 정량을 하였다. 단백질 정량은 단백질 정량 키트 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였으며, 키트에서 제공하는 실험 사용설명서에 따라 수행하였다. 정량한 단백질의 50ug농도를 SDS-PAGE 젤에 처리하여 전기영동을 실시한 후, PVDF 멤브레인(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)에 단백질을 옮겨 놓았다. 그 후, PVDF 멤브레인을 5% 무지방 분유에 1시간 동안 담가 두어 멤브레인 표면에 비특이적 결합 단백질들을 제거시키고 1차 항체인 안드로겐 수용체 [AR(BD Phamingen, cat#554225)], 전립선 특이 항원[PSA(DAKO, cat# A0562)], 베타-액틴[β-actin(Sigma Aldrich)]을 각각 1:1000, 1:1000, 1:2000으로 희석하여 4℃에서 하루 동안 처리해 둔다. 마지막으로 2차 항체(HRPconjugated secondary antibody- AbD Serotec) 1시간 동안 상온에서 처리하고 ECL 시스템 키트를 이용하여 키트가 제공하는 사용설명서대로 수행하여 전립선 특이 항원 단백질과 안드로겐 수용체 단백질의 단백질 발현을 확인하였다.

[0048] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2는 전립선암 세포주에 산사자 추출물 처리 후, 전립선 특이 항원과 안드로겐 수용체 단백질 발현량 변화를 확인한 결과이다. (-)는 미처리 대조군을 의미하고, CBW는 산사자 열수 추출물, CBE는 산사자 에탄올 추출물을 의미한다. 또한, AR은 안드로겐 수용체, PSA는 전립선특이항원을 나타낸다.

[0049] 도 2에 나타낸 바와 같이, 산사자 에탄올 추출물을 처리한 군에서는 전립선 특이 항원 단백질과 안드로겐 수용체 단백질 모두 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 산사자 열수 추출물에서는 안드로겐 수용체 단백

질의 감소는 확인 할 수 있었지만 전립선 특이 항원 단백질의 감소는 미비하였다.

[0050] 상기 결과를 통해서, 산사자 추출물이 전립선 특이 항원 단백질과 안드로겐 수용체 단백질의 발현을 억제함으로써, 전립선 특이 항원의 발현을 억제하고 항안드로겐 효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

[0051] **<실시예 3> 산사자 추출물의 전립선암 세포 성장 억제 효과 확인**

[0052] 산사자 추출물이 전립선 암 세포주의 세포 성장에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 전립선 암세포주인 LNCaP과 정상 전립선 세포주인 RWPE-1에 대하여, XTT assay를 통해 세포 성장에 미치는 영향에 관하여 확인하였다.

[0053] 전립선암 세포주인 LNCaP 세포 또는 정상 전립선 세포주인 RWPE-1 세포를 각각 96well 세포배양접시에 $1X10^4$개의 세포를 도말하여 24시간 동안 37℃에서 배양한 후, 상기 제조예에서 제조한 산사자 열수 추출물, 산사자 에탄올 추출물을 각각 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100 ug/ml)로 세포에 처리하여 24시간 더 배양하였다. 그 후, XTT (2, 3-bis-2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl-2H-tetrazolium- 5carboxanilide)와 PMS(phenazinemethosulfate) 용액을 넣고 3시간 반응시키고 ELISA 리더로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

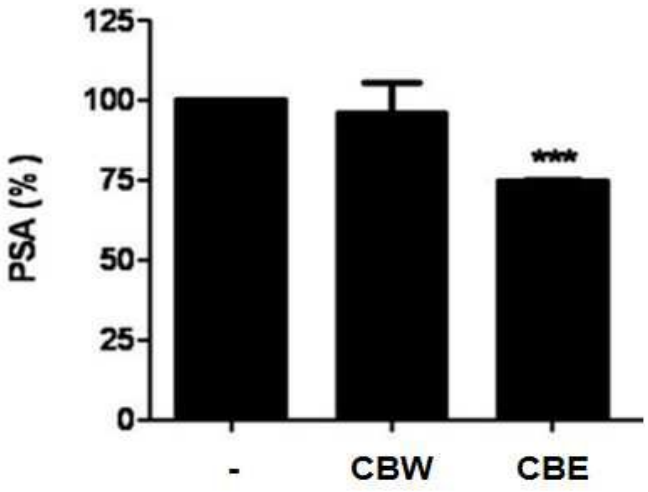
[0054] 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0055] 도 3 (a), (b)에 나타낸 바와 같이, 전립선암 세포주에 산사자 에탄올 추출물 또는 열 추출물 처리시 세포 성장이 억제되는 것을 확인 할 수 있었다. 특히, 산사자 에탄올 추출물을 처리한 경우[도 3 (a)], 세포성장율이 약 20% 정도 크게 감소하였으며, 정상 전립선 세포주에 산사자 추출물 처리시 세포 성장율이 감소하지 않음을 확인하였고 정상 세포 성장에 어떠한 영향도 끼치지 않음을 확인 하였다.

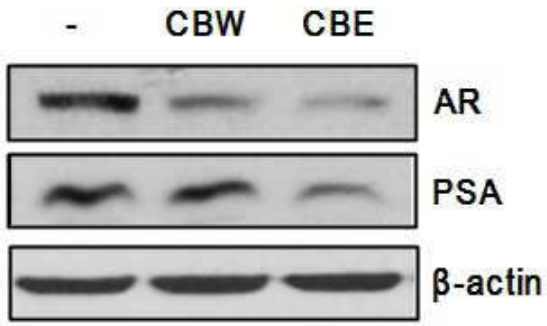
[0056] 상기 결과를 통해서, 산사자 추출물이 전립선암 세포주의 성장을 억제하여 항암효과를 나타내는 것을 나타내는 것을 확인 할 수 있었으며, 정상 전립선 세포주에는 산사자 추출물의 처리로 어떠한 영향도 끼치지 않음을 확인하였는바, 이를 통해서 산사자 추출물이 전립선암에 특이적인 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

도면

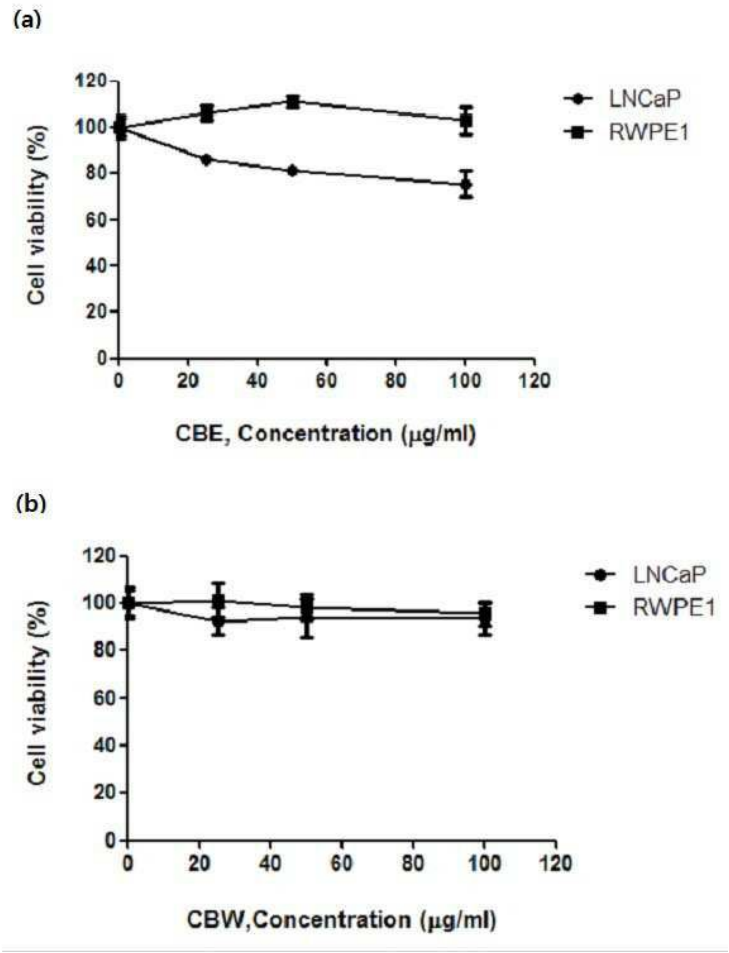
도면1



도면2


-
CBW
CBE
AR
PSA
β-actin

도면3


(a)
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
CBE, Concentration (μg/ml)
LNCaP
RWPE1
(b)
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
CBW,Concentration (μg/ml)
LNCaP
RWPE1