



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0000818
(43) 공개일자 2017년01월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/64 (2015.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/64 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0097967(분할)
(22) 출원일자 2016년08월01일
심사청구일자 2016년08월01일
(62) 원출원 특허 10-2015-0088794
원출원일자 2015년06월23일
심사청구일자 2015년06월23일

(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동)
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
윤은영
전라북도 전주시 완산구 오공로 71,
호반베르디움APT 107동 1202호
황재삼
전라북도 완주군 이서면 출판로 25 에코르1
단지APT 102동 1003호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이성렬, 이한욱, 이성준

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 장수풍뎡이 유충 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 간보호 및 항암용 조성물

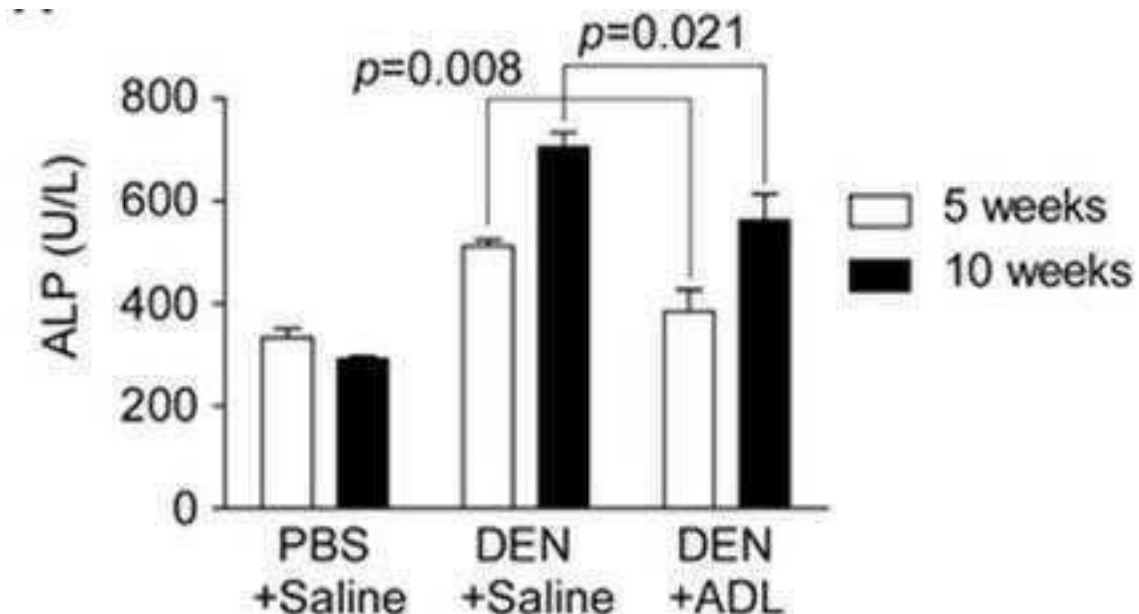
(57) 요약

본 발명은 장수풍뎡이 유충 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 간보호 효과와 항암 활성 활성을 나타내는 조성물에 관한 것이다.

DEN으로 처리된 쥐에서는 혈중 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase ,ALP) 농도, TUNEL positive 간세포

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



의 숫자, 간 손상으로 인해 형성되는 duct의 개수, 간세포에서의 지방축적, Masson's trichrome 염색에서 콜라겐 염색 정도 등, 급성 혹은 만성 간 손상과 관련된 지표들이 모두 증가되지만, 장수풍뎡이 유충 동결건조 분말을 함께 경구투여하게 되면, 이와 같은 간 손상의 지표들이 통계적으로 유의미한 수준으로 감소하게 되는 것을 확인할 수 있었다. 장수풍뎡이 유충 분획물들을 여러 종류의 암세포주에 처리하였을 때, 에틸아세테이트 분획물이 암 세포들에 대해서 아포토시스와 세포괴사와 같은 세포죽음을 유도하는 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 더불어 에틸아세테이트 분획물은 암세포의 대사를 교란할 수 있었고, 오토파지를 유도할 수 있는 활성을 가지고 있었다.

(52) CPC특허분류

A23V 2200/30 (2013.01)

(72) 발명자

강병현

울산광역시 울주군 범서읍 구영로 101-7 507동 70 4호 (구영리, 구영2차푸르지오아파트)

이지은

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 공학1관 703호 (반연리)

조다은

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 공학1관 703호 (반연리)

이안중

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 공학1관 703호 (반연리)

박혜경

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 공학1관 703호 (반연리)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00896901

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 농업공동연구/국책기술개발

연구과제명 장수풍뎡이 식품등록을 위한 원료특성 분석 및 인체 위해성 평가_장수풍뎡이 식용 소재화를 위한 분말제조 조건 확립 및 성분분석, 장수풍뎡이 추출물의 간암모델에서의 약리활성 검정

기 여 율 1/2

주관기관 국립농업과학원

연구기간 2012.05.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00896903

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 농업공동연구/국책기술개발

연구과제명 장수풍뎡이 식품등록을 위한 원료특성 분석 및 인체 위해성 평가_장수풍뎡이 식용 소재화를 위한 분말제조 조건 확립 및 성분분석, 장수풍뎡이 추출물의 간암모델에서의 약리활성 검정

기 여 율 1/2

주관기관 국립농업과학원

연구기간 2012.05.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

장수풍뎡이 유충(*Allomyrina dichotoma* larva; ADL) 유래 분획물을 유효성분으로 함유하는 항암용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 분획물은 상기 장수풍뎡이 유충을 에탄올로 추출한 후 이를 에틸아세테이트(EtOAc)에 의해 분획한 것인 항암용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 전립선암, 자궁경부암, 간암, 난소암, 폐암, 직장암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 예방 또는 치료용 조성물인 것을 특징으로 하는 항암용 약학 조성물.

청구항 4

장수풍뎡이 유충(*Allomyrina dichotoma* larva; ADL) 유래 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 분획물은 상기 장수풍뎡이 유충을 에탄올로 추출한 후 이를 에틸아세테이트(EtOAc)에 의해 분획한 것인 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 암은 전립선암, 자궁경부암, 간암, 난소암, 폐암, 직장암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 장수풍뎡이 유충을 유효성분으로 함유하는 간보호 및 항암용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 장수풍뎡이 유충을 유효성분으로 함유하는 간보호를 위한 조성물에 관한 것일 뿐 아니라 장수풍뎡이 유충 추출물 유래 에틸 아세테이트 분획물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

예로부터 동식물자원들은 다양한 질병들을 치료하기 위한 전통민간요법으로 널리 사용되어 왔으며, 전통적인 천연약용자원들은 과학기술의 발전과 함께 질병을 치료할 수 있는 혁신적인 치료약물을 도출해 낼 수 있는 공급처로 활용되어 왔다[1, 20, 27, 40].

[0003]

특히, 항암약물들의 예를 들어보면, 전체 항암약물 중에서 절반정도가 천연물 혹은 그로부터 유래된 물질이라는 사실에서 알 수 있듯이 자연으로부터 얻을 수 있는 천연 약용 자원들에 대한 연구가 새로운 약물개발에 많은 기여를 하고 있다[5, 27]. 약리활성을 가지는 신물질을 탐색하기 위한 천연물에 대한 연구는 식물과 미생물 등을 대상으로 전 세계적으로 이미 활발하게 진행되고 있고, 그 동안 이런 연구가 수행된 적이 없는 생명체들로

탐색범위가 점차 확대되어가고 있는 추세이다[20, 27].

- [0004] 곤충은 지구상에서 가장 크고 다양한 종족으로 알려져 있는데, 현재 확인된 종족만 약 100만종이 넘으며, 이는 실제의 절반에도 미치지 못한다고 예상될 정도로 다양한 환경에서 발견되고 있으며 독특한 생활사를 가지는 경우가 많다[2]. 곤충들은 각자가 살아가는 환경에 적응하고 생존하기 위해서 그들만의 독특한 생리조절 기전 및 물질들을 확보하는 방향으로 진화해 왔는데, 이와 같은 곤충의 생리활성물질들을 확보하게 된다면 새로운 약물 후보물질이 될 수 있을 것이다. 뿐만 아니라, 곤충들은 일부 약용으로 전통적인 민간요법에서 이미 활용되어 왔기 때문에, 이들을 대상으로 생리활성을 가진 물질 발굴을 위한 연구의 필요성은 꾸준히 제기되어 왔다[3, 28].
- [0005] 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma* larva; ADL)의 경우, 다양한 간질환에 대한 치료목적으로 우리나라를 포함하는 아시아국가들에서 전통적으로 활용되어 왔다[28, 41]. 장수풍뎅이 유충의 성분 및 생리활성에 대한 분석은 이미 진행된 적이 있는데, 유충에 대한 영양학적 성분분석 결과에서 유용한 필수불포화지방산의 함량이 높은 것으로 알려져 건강 식품으로써의 가능성이 보고된 바가 있다[43]. 그리고, 생화학적인 생리활성 분석에서는 활성산소를 억제하는 항산화 효능이 보고가 되었고[37], 항비만[4] 및 항치매[17] 효과도 *in vitro*에서 알려지고 있다. 다만, 관련 질병에 대한 연구들이 *in vitro*에서의 결과에 제한되어 있어, *in vivo* 및 임상에서의 유의성 있는 효과에 대한 연구는 더 필요한 것으로 생각된다. 또한, 장수풍뎅이로부터 항펩타이드[25] 및 탄수화물결합 단백질인 렉틴(lectin)[35] 유전자들이 추출되어 보고된 적이 있다.
- [0006] 그러나, 현재까지 전통적으로 알려진 간보호 및 간암억제 활성에 대한 연구가 장수풍뎅이를 대상으로 보고된 바가 없다.
- [0007] 독성화합물질을 꾸준히 실험동물에게 처리하게 되면 지방간에서 간경화로 진행될 뿐만 아니라 최종적으로 간암까지 유발하여, 실제 간암환자의 암 발생을 모사할 수 있는 실험동물 모델이 알려져 있는데[16], 유전독성을 유도할 수 있는 디에틸니트로사민(Diethylnitrosamine, 이하 DEN이라고 명명함)이 그런 물질 중에서 가장 많이 활용되고 있는 물질의 하나이며, 간암환자에서 만성적으로 진행되는 간질환을 비슷하게 모사할 수 있다[29, 32]. DEN의 간손상을 유도하는 작용기전은, 간세포에서 발현되는 시토크롬 P450(cytochrome P450)와의 반응으로 활성산소 생성을 촉진하게 되고 이때 발생하는 다량의 활성산소로 인해 간세포의 DNA 손상 및 세포죽음이 유도되어 결과적으로 간 손상을 유발되는 것으로 알려져 있다[39]. 만성적인 간질환에 대한 간 보호 효능을 보거나 항암 활성을 확인하고자 할 때, DEN으로 유도된 간독성 동물모델이 널리 활용되고 있다[8, 11, 16, 44].
- [0008] 본 발명에서 DEN을 13주 처리한 후, 간손상의 지표라고 할 수 있는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase; ALP)의 혈중농도, 간세포의 아포토시스 죽음 정도, 담관 반응(ductular reaction), 간세포에 지방축적 등이 모두 증가되었고, 상당히 진행된 만성 간 손상인 간 섬유화도 확인할 수 있었다[16, 39]. 이와 같은 간 손상의 지표들은 장수풍뎅이 유충분말의 섭취로 통계적으로 유의미한 수준에서 감소하는 것을 확인하였다.
- [0009] 관련 선행기술로는 한국등록특허 10-1027555 "혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 간보호 및 간염의 예방 및 치료용 조성물"과 한국등록특허 10-0498809 "귀뚜라미 추출물을 함유하는 간보호 효과, 강장효과, 알코올 해독, 과산화지질 생성 억제용 약학적 조성물"이 공개되어 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Baker, D. D., Chu, M., Oza, U. and Rajgarhia, V. 2007. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat Prod Rep* 24, 1225-1244.
- (비특허문헌 0002) Berenbaum, M. R. and Eisner, T. 2008. Ecology. Bugs' bugs. *Science* 322, 52-53.
- (비특허문헌 0003) Cherniack, E. P. 2010. Bugs as drugs, Part 1: Insects: the "new" alternative medicine for the 21st century? *Altern Med Rev* 15, 124-135.
- (비특허문헌 0004) Chung, M. Y., Yoon, Y. I., Hwang, J. S., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2014. Anti-obesity effect of *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae ethanol extract on 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Entomological Research* 44, 9-16.
- (비특허문헌 0005) Clardy, J. and Walsh, C. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432, 829-837.

- (비특허문헌 0006) de Groof, A. J. et al. 2009. Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype. *Mol Cancer* 8, 54.
- (비특허문헌 0007) Edinger, A. L. and Thompson, C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16, 663-669.
- (비특허문헌 0008) Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J. P., Rath, M. and Wagner, E. F. 2003. Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 112, 181-192.
- (비특허문헌 0009) Farrell, G. C. and Larter, C. Z. 2006. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43, S99-S112.
- (비특허문헌 0010) Felton, G. W. and Summers, C. B. 1995. Antioxidant systems in insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 29, 187-197.
- (비특허문헌 0011) Finnberg, N., Silins, I., Stenius, U. and Hogberg, J. 2004. Characterizing the role of MDM2 in diethylnitrosamine induced acute liver damage and development of pre-neoplastic lesions. *Carcinogenesis* 25, 113-122.
- (비특허문헌 0012) Fuchs, B. C. et al. 2014. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 59, 1577-1590.
- (비특허문헌 0013) Galluzzi, L. et al. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107-120.
- (비특허문헌 0014) Gouw, A. S., Clouston, A. D. and Theise, N. D. 2011. Ductal reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology* 54, 1853-1863.
- (비특허문헌 0015) He, C. and Klionsky, D. J. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93.
- (비특허문헌 0016) Heindryckx, F., Colle, I. and Van Vlierberghe, H. 2009. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol* 90, 367-386.
- (비특허문헌 0017) Kim, M., Youn, K., Yun, E. Y., Hwang, J. S., Ahn, M. R., Jeong, W. S. and Jun, M. 2014. Effects of solvent fractions of *Allomyrina dichotoma* larvae through the inhibition of in vitro BACE1 and beta-amyloid(25-35)-induced toxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Entomological Research* 44, 23-30.
- (비특허문헌 0018) Kim, R. D., Kim, J. S., Watanabe, G., Mohuczy, D. and Behrns, K. E. 2008. Liver regeneration and the atrophy-hypertrophy complex. *Semin Intervent Radiol* 25, 92-103.
- (비특허문헌 0019) Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. and Kioussi, C. 2012. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol* 887, 41-47.
- (비특허문헌 0020) Lachance, H., Wetzel, S., Kumar, K. and Waldmann, H. 2012. Charting, navigating, and populating natural product chemical space for drug discovery. *J Med Chem* 55, 5989-6001.
- (비특허문헌 0021) Lee, J. E. et al. 2014. Hepatoprotective and antineoplastic properties of *Protaetia brevitarsis* larvae. *Entomological Research* 44, 244-253.
- (비특허문헌 0022) Leenders, M. W., Nijkamp, M. W. and Borel Rinkes, I. H. 2008. Mouse models in liver cancer research: a review of current literature. *World J Gastroenterol* 14, 6915-6923.
- (비특허문헌 0023) Li, W. C., Ralphs, K. L. and Tosh, D. 2010. Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. *Methods Mol Biol* 633, 185-96.
- (비특허문헌 0024) Meinen, S., Barzaghi, P., Lin, S., Lochmuller, H. and Ruegg, M. A. 2007. Linker molecules between laminins and dystroglycan ameliorate laminin- α 2-deficient muscular dystrophy at all disease stages. *J Cell Biol* 176, 979-993.

- (비특허문헌 0025) Motobu, M., Amer, S., Yamada, M., Nakamura, K., Saido-Sakanaka, H., Asaoka, A., Yamakawa, M. and Hirota, Y. 2004. Effects of antimicrobial peptides derived from the beetle *Allomyrina dichotoma* defensin on mouse peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Vet Med Sci* 66, 319-322.
- (비특허문헌 0026) Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Hasko, G., Hawkins, B. J., Madesh, M. and Pacher, P. 2007. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat Protoc* 2, 2295-2301.
- (비특허문헌 0027) Newman, D. J. and Cragg, G. M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75, 311-335.
- (비특허문헌 0028) Pemberton, R. W. 1999. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 65, 207-216.
- (비특허문헌 0029) Qi, Y. et al. 2008. Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 122, 2682-2688.
- (비특허문헌 0030) Ratcliffe, N. A., Mello, C. B., Garcia, E. S., Butt, T. M. and Azambuja, P. 2011. Insect natural products and processes: new treatments for human disease. *Insect Biochem Mol Biol* 41, 747-769.
- (비특허문헌 0031) Sawai, H. and Domae, N. 2011. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochem Biophys Res Commun* 411, 569-573.
- (비특허문헌 0032) Schiffer, E. et al. 2005. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology* 41, 307-314.
- (비특허문헌 0033) Shen, L., Hillebrand, A., Wang, D. Q. and Liu, M. 2012. Isolation and primary culture of rat hepatic cells. *J Vis Exp*
- (비특허문헌 0034) Streeter, I. and Cheema, U. 2011. Oxygen consumption rate of cells in 3D culture: the use of experiment and simulation to measure kinetic parameters and optimise culture conditions. *Analyst* 136, 4013-4019.
- (비특허문헌 0035) Sueyoshi, S., Yamamoto, K. and Osawa, T. 1988. Carbohydrate binding specificity of a beetle (*Allomyrina dichotoma*) lectin. *J Biochem* 103, 894-899.
- (비특허문헌 0036) Suh, H. J. and Kang, S. C. 2012. Antioxidant activity of aqueous methanol extracts of *Protaetia brevitarsis* Lewis (Coleoptera: Scarabaeidae) at different growth stages. *Nat Prod Res* 26, 510-517.
- (비특허문헌 0037) Suh, H. J., Kim, S. R., Lee, K. S., Park, S. and Kang, S. C. 2010. Antioxidant activity of various solvent extracts from *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae. *J Photochem Photobiol B* 99, 67-73.
- (비특허문헌 0038) Verna, L., Whysner, J. and Williams, G. M. 1996. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther* 71, 57-81.
- (비특허문헌 0039) Vesselinovitch, S. D. and Mihailovich, N. 1983. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res* 43, 4253-4259.
- (비특허문헌 0040) Wang, C. Y., Bai, X. Y. and Wang, C. H. 2014. Traditional Chinese medicine: a treasured natural resource of anticancer drug research and development. *Am J Chin Med* 42, 543-559.
- (비특허문헌 0041) Wu, P., Dugoua, J. J., Eyawo, O. and Mills, E. J. 2009. Traditional Chinese Medicines in the treatment of hepatocellular cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Exp Clin Cancer Res* 28, 112.

(비특허문헌 0042) Youn, K. and Jun, M. 2013. In Vitro BACE1 Inhibitory Activity of Geraniin and Corilagin from *Geranium thunbergii*. *Planta Med* 79, 1038-1042.

(비특허문헌 0043) Youn, K., Kim, J. Y., Yeo, H., Yun, E. Y., Hwang, J. S. and Jun, M. 2012. Fatty Acid and Volatile Oil Compositions of *Allomyrina dichotoma* Larvae. *Prev Nutr Food Sci* 17, 310-314.

(비특허문헌 0044) Zalatnai, A. and Lapis, K. 1994. Decreased hepatocarcinogenic effect of diethylnitrosamine in experimentally induced liver cirrhosis in rat: delay or inhibition? *Cancer Lett* 79, 1-7.

(비특허문헌 0045) Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R. and Yan, G. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 23, 525-531.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 장수풍뎅이 유충을 유효성분으로 함유하는 간보호 효과를 살펴보고자 한다. 또한, 본 발명은 장수풍뎅이 유충의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 항암효과를 확인한 후, 이를 통하여 상기 장수풍뎅이의 다양한 유용성을 밝히는데 그 목적이 있다.
- [0012] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 간보호를 위한 약학 조성물은 간 보호 효과를 나타내는 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma* larva; ADL)을 유효성분으로 함유하는 것이 특징이다.
- [0014] 본 발명의 간보호를 위한 식품 조성물은 간 보호 효과를 나타내는 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma* larva; ADL)을 유효성분으로 함유하는 것이 특징이다.
- [0015] 상기 간보호 효과란 혈중 알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase) 활성을 감소, 간조직에서 담소관 반응(ductular reaction)감소, 간 세포의 지방축적 억제 및 콜라겐 침착 억제 중 어느 하나 이상의 효과를 나타내는 것이 특징이다.
- [0016] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 항암용 약학 조성물은 암예방 및 치료효과를 나타내는 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma* larva; ADL) 유래 분획물을 유효성분으로 함유하는 것이 특징이다.
- [0017] 본 발명의 암예방 및 개선효과를 나타내는 식품 조성물은 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma* larva; ADL) 유래 분획물을 유효성분으로 함유하는 것이 특징이다.
- [0018] 상기 분획물은 상기 장수풍뎅이 유충을 에탄올로 추출한 후 이를 분획하여 얻은 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물로 이루어지는 것이 특징이다.
- [0019] 상기 암은 전립선암, 자궁경부암, 간암, 난소암, 폐암, 직장암 및 유방암 중 선택된 1종 이상인 것이 특징이다.
- [0020] 본 발명의 항암효과를 갖는 장수풍뎅이 유충 유래 분획물의 제조방법은 장수풍뎅이 유충을 고압멸균한 후 이를 동결건조 한 다음, 이를 분쇄하는 제1단계;상기 제1단계에서 분쇄된 장수풍뎅이 유충분말과 에탄올을 혼합하여 장수풍뎅이 에탄올 추출물을 제조하는 제2단계 및 상기 제2단계에서 제조된 장수풍뎅이 유충 에탄올 추출물을 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물로 순차적으로 분획하여 분획물을 얻는 제3단계;를 포함하는 것이 특징이다.
- [0021] 상기 제2단계의 장수풍뎅이 유충 에탄올 추출물은 상기 에탄올 12ℓ 당 상기 분쇄된 장수풍뎅이 유충 분말을 0.5~2kg을 혼합시키는 것이 특징이다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 의해, 장수풍뎅이 유충의 간보호 효과를 생화학적, 세포생물학적 분석방법으로 확인함으로써, 향후 장수풍뎅이 유충에서 독성물질로부터 간을 보호할 수 있는 물질을 분리할 수 있는 가능성이 있게 된다.

[0023] 또한, 장수풍뎅이 유충 추출물 유래 에틸아세테이트 분획물의 세포죽음 작용과 자가소화작용(autophagy) 유도 활성을 확인함으로써, 암세포에 대한 세포죽음을 유도할 수 있는 활성물질을 분리할 수 있는 가능성이 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1A는 DEN 유도 간독성 모델에서 ADL분말의 간보호 효과를 확인하고자 혈액내 알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP)의 활성도를 그래프로 나타낸 도면이다.

도 1B는 TUNEL 염색을 통해 간세포의 아포토시스(Apoptosis)를 본 도면이다.

도 1C는 TUNEL 양성 반응을 나타내는 세포(%)를 그래프로 나타낸 도면이다.

도 2A는 DEN 유도 간독성 모델에서 ADL분말의 간보호 효과를 확인하고자 H&E 염색을 통해 조직학적 변화를 본 도면이다.

도 2B는 담관의 수를 그래프로 나타낸 도면이다.

도 2C는 Steatotic cell(%)을 그래프 나타낸 도면이다.

도 3A는 DEN 유도 간독성 모델에서 ADL분말의 간보호 효과를 확인하고자 Masson's trichrome 염색을 통해 간섬유화 정도를 살펴본 도면이다.

도 3B는 간섬유화 정도를 그래프화 하여 나타낸 도면이다.

도 4A는 ADL분획물의 항암활성을 확인하고자 다양한 조직의 암세포주에 대하여 ADL분획물을 처리하였을 때 세포 생존율을 MTT assay를 통해 측정하였으며, 각 암세포 생존 백분율을 그래프로 나타낸 도면이다.

도 4B는 일차 간세포를 대상으로 ADL분획물을 처리하였을 때 세포 생존 백분율을 그래프로 나타낸 도면이다.

도 5는 다양한 조직의 암세포주에 대하여 ADL분획물을 처리하였을 때 아포토시스와 세포괴사를 측정하기 위하여 Sytox와 AnnexinV염색을 수행하여 flow cytometry로 분석한 도면이다.

도 6A는 ADL 분획물들의 세포대사 교란 능력을 확인하고자 세포 산소 소모량 OCR을 측정한 도면이다.

도 6B는 ADL 에틸아세테이트와 헥산 분획물에서 기본 호흡량(basal respiration), ATP 합성 및 최대호흡량의 변화를 본 도면이다.

도 6C는 ADL 분획물의 오토파지 유도능을 western blot으로 분석한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하며, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 상세한 설명은 생략한다.

[0026] 본 발명은 Diethylnitrosamine (DEN)으로 유도된 간 독성 모델을 이용하여 장수풍뎅이 유충 분말에 대한 간 보호 효과를 in vivo에서 확인하였는데, 혈중 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)활성, 간 조직에서의 담소관 반응(ductular reaction), 간세포에서의 지방축적 및 콜라겐침착 등 DEN으로 인해 증가되는 급성 및 만성 간 손상 표지자들이 유충분말을 경구투여함으로써 감소되는 것을 확인하였다.

[0027] 또한 본 발명은 에탄올을 이용한 유충분말 추출물을 추가로 분획하여 헥산, 에틸아세테이트, 물 분획물들을 얻었고, 이중에서 에틸아세테이트 분획물에서 암세포에 대한 아포토시스, 세포괴사, 및 오토파지를 유도할 수 있는 세포독성이 있음을 확인하였다.

[0028] 이하, 본 발명인 간보호 효과와 항암 효과를 갖는 장수풍뎅이 유충 분말과 이의 분획물의 제조방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0029] 1. 제 1단계; 장수풍뎅이 유충 분쇄

[0030] 우선, 본 단계에서는 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma larva*)을 준비한다.

- [0031] 준비된 상기 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma larva*)은 고압 멸균한 후 건조한 다음 분쇄하여 분말형태로 제조한다.
- [0032] 다시말해, 상기 장수풍뎅이에는 다량의 수분이 함유되어 있기 때문에 수분이 완전히 없는 상태로 만들기 위해서는 건조과정을 거쳐야 한다. 이때, 상기 장수풍뎅이가 함유하고 있는 유효성분들의 변화를 최소화시키기 위해 동결건조를 통해 건조를 하는 것이 좋다.
- [0033] 그 다음 하기 추출의 용이성을 위해 상기 건조된 장수풍뎅이는 분쇄기를 이용하여 분말형태로 제조된다.
- [0034] 2. 제 2단계; 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 추출액 제조
- [0035] 본 단계에서는 상기 제조한 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma larva*) 분말을 용매에 추출한 후 감압농축하여 장수풍뎅이 추출물을 제조한다.
- [0036] 이때, 상기 용매 12ℓ 당 상기 분쇄된 장수풍뎅이 0.5~2kg을 혼합하는 것이 좋으며, 혼합하는 유충 분말이 0.5kg 이하일 경우는 유효성분 추출이 적어 간보호 효과가 미미하거나 나타나지 않을 수 있으며, 혼합하는 유충 분말이 2kg 이상일 경우는 장수풍뎅이 kg당 유효성분 추출 양이 적을 수 있다. 사용된 용매로는 에탄올을 사용하는 것이 좋으며, 이 에탄올은 어떠한 것을 사용하여도 무관하나, 장수풍뎅이 내에 함유된 유효성분을 가장 적절히 추출할 수 있도록 70~99%의 에탄올을 사용하는 것이 좋다.
- [0037] 상기 장수풍뎅이 분말은 에탄올에 완전히 침지시킨 다음 이를 230~270rpm으로 실온(20~25℃)에서 추출한 후 감압농축하여 추출물을 제조할 시 단시간에 장수풍뎅이의 유효성분이 다량 함유된 추출물을 제조하게 된다.
- [0038] 추출물을 필터하여 불용성물질을 제거한 후, rotary vacuum evaporator (EYELA, N-1100, 도쿄, 일본)로 용매를 제거한다.
- [0039] 3. 제 3단계; 장수풍뎅이 분획물 제조
- [0040] 본 단계에서는 상기 장수풍뎅이 유충 에탄올 추출물을 헥산(Hexane), 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물(H₂O)을 이용하여 1:1 동일한 비율로 순차적으로 분획한다.
- [0041] 이하, 본 발명인 간 보호 효과와 항암 효과를 나타내는 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma larva*; ADL) 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물 또는 식품 조성물에 대하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0042] 본 발명에는 상기 장수풍뎅이 유충이 간보호 약학조성물의 유효성분으로 포함된다.
- [0043] 또한 본 발명은 상기 장수풍뎅이 유충 추출물 유래 분획물이 항암용 약학조성물의 유효성분으로 포함된다.
- [0044] 이때, 상기 장수풍뎅이 유충, 또는 이의 분획물은 상기 약학조성물 전체 중량을 기준으로 0.01~50 중량부 함유되는 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는 0.1~20중량부를 함유하는 것이 좋다. 이는 상기 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma larva*), 또는 이의 분획물이 0.01 중량부 미만으로 함유되는 경우 약 효과가 떨어져 본 발명이 목적하는 약학 조성물로 사용하기 적합하지 않으며, 50 중량부를 초과하여 함유되는 경우 오히려 사용되는 유기용제로 인한 악영향이 발생할 우려가 있다.
- [0045] 이러한 상기 본 발명의 약학 조성물은 간 보호 또는 암 예방 및 치료를 목적으로 하는 천연물의약품에 함유될 수 있다. 이때 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0046] 이때 제형은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 중 어느 하나의 형태로 구성되며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수도 있다. 즉, 이는 사용 목적에 따라서 당업자가 어려움 없이 선정하여 이루어질 수 있으며, 그 첨가량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위내에서 선택될 수 있음을 의미한다.
- [0047] 상기 약학적으로 허용되는 담체로는 제제 할 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하며, 또한, 약학적으로 허용되는 부형제로는 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0048] 또 다른 관점에서의 본 발명은 장수풍뎡이 유충 또는 추출물 유래 분획물이 간보호 및 암예방을 목적으로 하는 식품 조성물의 유효성분으로 포함한다.
- [0049] 즉, 장수풍뎡이 유충 또는 이의 분획물을 식품 조성물의 유효성분으로 사용할 경우, 상기 그대로 사용하거나 다른 통상의 식품 조성물의 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품용 조성물 제조시에는 유효성분의 원료에 대하여 0.01 ~ 10 중량부, 바람직하게는 0.05 ~ 1 중량부의 양으로 첨가된다.
- [0050] 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.
- [0051] 이러한 상기 식품용 조성물은 간 보호 및 암 예방을 위한 목적으로 건강식품에 함유될 수 있으며 그 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.
- [0052] 상기 외에 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육으로 함유할 수도 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0053] 이하에서는 실시예 및 실험예를 들어 본 발명에 관하여 더욱 상세하게 설명할 것이나, 이들 실시예 및 실험예는 단지 설명의 목적을 위한 것으로 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0054] **<실시예 1> 본 발명의 간보호 효과를 갖는 장수풍뎡이 유충분말과 항암효과를 갖는 장수풍뎡이 유충 분획물 제조**
- [0055] 먼저, 장수풍뎡이 유충을 동결건조하여 수분이 완전히 제거된 상태의 건조물을 분쇄하여 얻은 분말((주)월드웨이, 연기군, 한국)을 1.2 kg을 준비하였다.
- [0056] 유기용매를 이용한 장수풍뎡이 애벌레 분말의 분획은 기존에 보고된 실험방법을 따랐다[42].
- [0057] 장수풍뎡이 분말 1.2kg을 95% 에탄올(EtOH) 12L 에 완전히 침지시켰다.
- [0058] 그 다음, 실온에서 7일동안 추출한 후, 감압농축하여 장수풍뎡이 에탄올 추출물을 제조하였다.
- [0059] 추출물은 필터하여 불용성 물질을 제거한 후, rotary vacuum evaporator (EYELA, N-1100, 도쿄, 일본)로 용매를 제거하였다
- [0060] 이렇게 제조된 장수풍뎡이 에탄올 추출물 379.66g를 헥산, 에틸 아세테이트, n-부탄올 및 물을 이용하여 1:1`동량으로 분획깔대기를 이용하여 각각 분리된 층을 분리하는 방법으로 순차적으로 분획하였다.
- [0061] 장수풍뎡이 1.2 kg에 95% 에탄올(EtOH) 12L 을 첨가하여 추출물 379.66g을 얻은 후, 용매의 극성을 달리하여 순차적으로 분획한 결과, 헥산(hexane) 분획은 313.90g, 에틸아세테이트(EtOAc) 분획은 0.78g, n-부탄올(n-butanol) 분획은 24.80g, 물(H₂O) 분획은 24.80g를 확보하였다.
- [0062] **<실시예 2> 간 독성 모델 제작**
- [0063] 모든 동물실험은 UNIST 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 : UNISTIACUC 13 - 015)을 거쳐 수행하였다. 실험에는 8주된 C3H/HeN 수컷 쥐(오리엔트바이오, 성남)를 사용하였다. 각 군은 C3H/HeN 수컷 쥐 10마리씩 나누었다. 50 mg/kg diethylnitrosamine(Sigma) 혹은 phosphate buffered saline(PBS)를 매주 1회씩 복강주사하여 간 독성 모델을 제작하였다.
- [0064] **<실시예 3> 일차 간 세포(Primary hepatocyte)추출**
- [0065] 일차간세포는 8주된 BALB/c 쥐(효창사이언스, 대구, 한국)를 이용하여 기존의 보고대로 추출하였다[13, 33]. 마

취된 쥐의 간에 콜라겐용액(collagenase solution)을 흘려보낸 후, 간 조직을 조각 내었고, 100 μ m cell strainer (BD, 미국)를 이용하여 조직덩어리는 걸러 제거해 낸다. 걸러진 세포들은 M199/EBSS medium (Hyclone, 미국)를 이용하여 원심분리 및 resuspension을 몇 차례 반복하여 세척한다. Percoll (Sigma, 미국) gradient를 이용하여 세포파괴물(cell debris)과 non-parenchymal cells을 제거하여 간세포(hepatocyte)만 획득한다. 확보한 간세포를 몇 차례 세척한 후, 10% fetal bovine serum (GIBCO, USA)이 포함된 M199/EBSS medium에 resuspend하고, 37°C, 5% CO₂조건에서 배양한다.

<실험예 1> 본 발명의 장수풍뎡이 유충 분말에서의 간보호 효과 확인

1) 혈액내 ALP 활성 측정

1. 실험방법

상기 실시예 2와 같이 간독성 모델을 제작한 후 장수풍뎡이 유충 분말을 0.5g/kg 혹은 생리식염수를 주 5회씩 경구투여하여 간 보호 효과 실험을 진행하였다. DEN과 유충분말을 5주와 10주 동안 처리한 후, orbital sinuses로부터 혈액 샘플들을 채취하여 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP) 활성을 측정하였다.

2. 실험결과

도 1A에서 보면, 5주 및 10주 후 혈액내 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)의 농도를 보면 장수풍뎡이 유충분말을 먹인 쥐에서 생리 식염수를 먹인쥐와 비교하여 통계적으로 유의미한 수준으로(5주차 p=0.008, 10주차 p=0.021) 감소된 것을 확인하였다.

2) TUNEL 염색(staining)

1. 실험방법

상기 실시예 2와 같이 간독성 모델을 제작한 후 장수풍뎡이 유충 분말을 0.5g/kg 혹은 생리식염수를 주 5회씩 경구투여하여 간 보호 효과 실험을 진행하였다.

DEN과 유충분말을 처리하고 13주가 지난 뒤에는 실험 쥐로부터 간 조직을 채취하여 조직화학적염색으로 분석하였다.

적출한 간 조직은 10% 포르말린 용액에 충분히 고정시킨 후 고정된 조직을 70, 80, 90, 95, 100% ethanol, xylene을 단계별로 사용하여 탈수와 투명화 과정을 거쳤고 포매하여 4 μ m의 절편을 만들어 세포자멸사가 진행 중인 세포의 핵을 염색하기 위해 TUNEL 염색을 수행하였다. TUNEL kit는 In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescent (Roche Diagnostic)을 사용하여 회사에서 제공하는 실험방법을 적용하였다. 조직은 물로 세척한 후 0.1% TritonX-100을 이용하여 세포 내 염색시약 투과성을 높였으며 30분 실온에서 반응하였다. PBS로 세척한 후 Blocking solution을 20분간 실온에서 반응하였다. PBS로 세척한 후 TUNEL reaction mixture를 60분 동안 37°C에서 어둡게 하여 반응하였다. PBS로 세척한 후 조직을 DAPI가 포함된 mounting용액에 봉입하였으며 형광 현미경을 통하여 TUNEL positive cell (green color)을 관찰하고 중복되지 않게 field를 세어 %로 표시하였다

2. 실험결과

13주 동안 DEN과 장수풍뎡이 유충분말을 처리한 후, 실험 쥐들로부터 간을 적출하여 TUNEL염색으로 간세포의 아포토시스(apoptosis)를 분석하였다. 도 1B에 TUNEL염색한 간조직의 사진을 나타내었고 도 1C에 TUNEL positive 세포(%)를 그래프화 하여 나타내었다. 도 1B와 도 1C에서 보는 바와 같이 DEN만을 처리한 경우에 TUNEL positive 세포들이 증가된 반면에, DEN의 처리와 함께 장수풍뎡이 분말을 섭취한 쥐에서는 TUNEL positive 세포의 숫자가 유의미한 수준으로 감소되었다. 도 BDML 화살표 머리는 TUNEL positive 세포를 가리킨다. 이와 같은 결과로부터, DEN으로 유도되는 간세포의 죽음이 장수풍뎡이 분말을 섭취함으로써 억제될 수 있음을 확인하였다.

3) H&E 염색(staining)

1. 실험방법

장수풍뎡이 유충 분말의 간 보호 효과를 좀더 구체적으로 보기 위해서 H&E염색으로 실험동물의 간조직을 분석하였다.

상기 실시예 2와 같이 간독성 모델을 제작한 후 장수풍뎡이 유충 분말을 0.5g/kg 혹은 생리식염수를 주 5회씩 경구투여하여 간 보호 효과 실험을 진행하였다.

- [0083] DEN과 유충분말을 처리하고 13주가 지난 뒤에는 실험 쥐로부터 간 조직을 채취하여 조직화학적염색으로 분석하였다.
- [0084] 간 조직을 10% 포르말린 용액에 고정시키고 파라핀 용액 안에서 고체화한 후 4 μm 로 절편한 조직을 슬라이드에 부착시키고 xylene 용액에 탈파라핀 시킨 후, 100, 95, 90, 80, 70% 저농도의 알코올 과정을 거쳐 함수하였다. 그 후 헤마톡실린(hematoxylin)용액 5분, 흐르는 물로 10분 세척한 뒤 1% acid-alcohol에 30초, 에오신에 1분 동안 처리하여 조직 염색을 실시하였다. 염색된 조직은 다시 70, 80, 90, 95, 100% alcohol의 순서로 탈수과정을 거치고 마지막으로 xylene에 10분씩 2번 처리하여 투명과정을 거쳐 봉입하였다. 헤마톡실린과 에오신(eosin) (H&E) 염색 후, 광학현미경으로 관찰하였다.
- [0085] 2. 실험결과
- [0086] 도 2A를 보면, DEN과 생리식염수(Saline)을 처리한 군에서, DEN으로 인해 간세포의 세포질에 비정상적인 지방 방울(lipid droplet)이 증가되었고 (steatotic cell 증가), 세포질이나 세포핵이 비정상적으로 커지는 현상도 확인할 수 있었으며, 비정상적으로 duct의 형성이 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0087] 도 2A에서 *는 steatotic cell을 나타내며, #은 세포질이나 세포핵이 비정상적으로 커져있는 곳을 나타내었다.
- [0088] 반면에, DEN과 함께 장수풍뎡이 유충분말(ADL)을 경구 투여한 경우에는 이와 같은 간 손상으로 인한 현상이 뚜렷하게 감소된 것을 확인하였다(도 2A). 특히, duct의 숫자(도 2B; $p<0.0001$)와 steatotic cell의 숫자(도 2C; $p<0.0001$)가 유의미한 수준으로 감소하였다. 간세포가 커지는 현상은 손상 받은 간에서 간세포가 재생될 때 나타나는 것으로 알려져 있고[18], 새로운 duct가 형성되는 담소관 반응(ductular reaction)[14] 및 steatosis도 간세포의 손상으로 나타나는 현상으로 이들이 심해지는 경우에 간경화 및 간암으로 진행될 수 있다고 보고되어 있다[9]. 따라서, 장수풍뎡이 분말의 경구 투여로 독성물질에 의한 간 손상을 억제할 수 있고, 향후 만성적 간 손상으로 인한 간경화 및 간암의 발생 가능성도 줄일 수 있을 것으로 사료된다.
- [0089] 4) Masson's Trichrome 염색
- [0090] 1. 실험방법
- [0091] 상기 실시예 2와 같이 간독성 모델을 제작한 후 장수풍뎡이 유충 분말을 0.5g/kg 혹은 생리식염수를 주 5회씩 경구투여하여 간 보호 효과 실험을 진행하였다. DEN과 유충분말을 처리하고 13주가 지난 뒤에는 실험 쥐로부터 간 조직을 채취하였다.
- [0092] 간 조직을 10% 포르말린 용액에 고정시키고 파라핀 용액 안에서 고체화한 후 4 μm 로 절편한 조직을 슬라이드에 부착시키고 xylene 용액에 탈파라핀 시킨 후, 저농도의 알코올 과정을 거쳐 함수 한 후 Bouin 용액 60℃에서 1 시간 매염하였다. 그 후 정제수 5분, Weigert iron hematoxylin 용액 10분, 정제수 5분, Biebrich scarlet-Acid fuschsin 용액 5분, 정제수 5분, Phosphotungstic/ Phosphomolybdic acid 용액 10분, Aniline blue 용액 5분, 정제수 5분, 1% acetic acid 수용액 1분 과정으로 염색을 하였다. 이 실험은 Masson's Trichrome Stain Kit을 이용하였다(Polyscience, Inc.). 후처리 과정으로 알코올을 이용하여 각 1분씩 70%, 80%, 90%, 95%, 100%의 수분을 없애기 위한 탈수(dehydration) 과정 후 xylene을 이용하여 2회 10분씩 처리하여 알코올을 제거하는 과정을 거친 뒤 봉입하였다. 간 섬유화의 수치화는 imageJ 프로그램을 사용하였으며 중복되지 않게 field를 세어 %로 표시하였다.
- [0093] 2. 실험결과
- [0094] DEN을 처리한 간 조직의 분석에서는 암의 형성을 확인할 수는 없었으나, 간 섬유화는 시작되었을 것으로 예상되어[12], 콜라겐(collagen)을 파란색으로 염색하여 세포질이나 근섬유등과 구별할 수 있는 Masson's trichrome 염색방법으로 간 섬유화 조직의 유무를 분석하였다[24]. 도 3A를 보면 Phosphate buffered saline (PBS)가 처리된 대조군그룹에서는 미미한 수준에서 푸른색 염색을 확인할 수 있었으나, DEN이 처리된 그룹에서는 15%이상의 부위에서 푸른색으로 염색되는 것을 확인하였다. 반면에, 장수풍뎡이 유충분말을 경구투여한 그룹에서는 콜라겐염색이 유의미한 수준에서 감소된 것을 확인하였다(도 3B; $p<0.001$). 도 3B에 상기의 결과를 그래프화 하여 나타내었다. 따라서, 유충분말의 간 보호 효과덕분에 DEN으로 유도되는 간 손상이 감소될 수 있었고, 장기간의 DEN처리로 인한 지속적인 간 손상으로 유도되는 간 섬유화 및 간 경화증도 감소될 수 있음을 확인하였다.
- [0095] <실험예 2> 본 발명의 장수풍뎡이 유충 분획물에서의 항암활성 확인
- [0096] 1) 세포생존률 측정

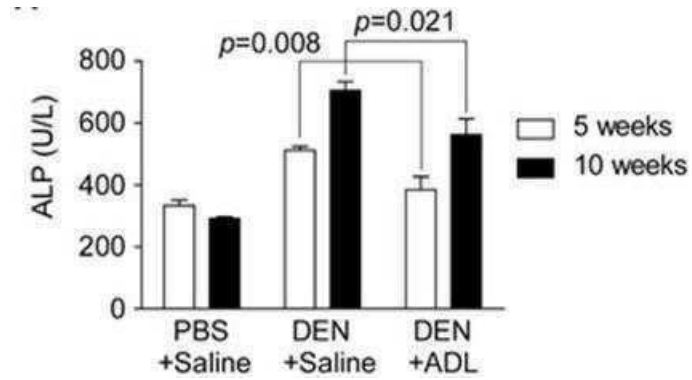
- [0097] 1. 실험방법
- [0098] 상기 실시예1과 같이 장수풍뎡이 유충 분획물을 제조하였다. 다양한 조직으로부터 유래된 암세포주에 대해서 세포독성을 측정하였고, 실험에는 전립선(22Rv1, PC3), 자궁경부(HeLa), 간(PLC/PRF5, Hep3B, SK-HEP-1, HepG2), 난소(SK-OV3), 폐(NCI-H460), 직장(HCT116), 유방(MDA-MB-231)으로부터 유래된 세포주들이 MTT 방법으로 사용되었다.
- [0099] 96 well plate에 5×10^3 /well개의 세포를 밤새 배양한 후, 24시간동안 도 4에 표시된 농도만큼의 추출물들을 처리하였다. 세포생존률측정을 위해서, 세포에 3(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 처리한 후, 형성된 포마잔 결정(formazan crystal)을 DMSO로 녹이고 595 nm에서의 흡광도를 Infinity M200 microplate reader (TECAN, Switzerland)로 측정하였다. 흡광도 값은 대조군과 비교하여 생존백분율(percent viability)로 표시하였다. 실험은 최소 2번 매번 triplicate으로 수행하였다.
- [0100] 통계분석방법으로 MTT에서의 세포생존률과 xenograft 실험에서의 종양크기 평균값은 Prism 5.0 (GraphPad, USA) 분석 소프트웨어를 이용하여 unpaired t-test를 수행하였고, p-value가 0.05보다 작은 경우 의미 있는 차이라고 간주하였다.
- [0101] 2. 실험결과
- [0102] 장수풍뎡이 유충분획물을 에탄올로 추출물을 만들고, 이 추출물에 대해서 핵산, 에틸아세테이트, 물로 추가 분획물을 만들어 항암활성을 확인하였다.
- [0103] 도 4A에서 보는 바와 같이 세가지 분획물들 중에서 에틸아세테이트 분획물은 거의 모든 암세포주에 대해서 2 mg/ml의 처리농도에서 강한 세포독성을 보여주었으나, 핵산은 동일한 농도조건에서 약간의 세포독성을, 물 분획물은 상당히 낮은 세포독성을 각각 보였다(도 4A). 세포독성의 암세포 선택성을 확인하고자, 쥐의 간으로부터 유래한 일차간세포를 대상으로 세포독성 실험을 진행하였는데, 2 mg/ml의 최고농도조건에서 모든 분획물들이 세포독성을 보이지 않았다(도 4B). 이상의 결과를 바탕으로 장수풍뎡이 유충 분획물에서 암세포에 선택적으로 작용하는 독성성분이 들어 있다고 사료되며, 특히 에틸아세테이트 분획물에서 그런 효과가 가장 큰 것을 확인하였다.
- [0104] 2) 아포토시스 유도능력 측정
- [0105] 1. 실험방법
- [0106] 상기 실시예1과 같이 장수풍뎡이 유충 분획물을 제조하였다.
- [0107] 장수풍뎡이 유충분획물들의 아포토시스 유도활성을 측정하기 위해서, 약물을 2mg/ml 농도로 처리한 후, CaspaTag in situ apoptosis detection kit (Millipore, 미국)을 이용하여 DNA량(propidium iodide, red fluorescence)과 caspase 활성화 정도(DEVDase activity, green fluorescence)를 형광표지하였다. FACS Calibur™ system (BD Biosciences, USA)장비로 세포형광을 측정하였고, 측정결과는 FlowJo software (TreeStar, USA)를 이용하여 분석하였다.
- [0108] 2. 실험결과
- [0109] 분획물들이 어떻게 세포죽음을 유도하는지 확인하고자 대표적인 세포죽음기전인 아포토시스, 세포괴사(necrosis), 오토파지(autophagy)중에서[7, 13], 아포토시스와 세포괴사를 측정할 수 있는 Sytox와 Annexin V 염색을 수행하여 flow cytometry로 분석하였다[26, 45].
- [0110] 도 5에서 보는 바와 같이 2 mg/ml의 처리조건에서 실험에 사용된 HepG2, PLC/PRF5, Hep3B 세포주들 모두에서 에틸아세테이트 분획물에서만 강한 세포죽음 활성을 확인할 수 있었던 반면에(Sytox positive, AnnexinV positive), 핵산 분획물에서는 약한 수준의 Annexin V염색증가만이 있었고, 실제 죽은 세포의 비율이 미미한 수준의 증가만이 있었다. 에틸아세테이트 분획물에서의 세포죽음 기전은 AnnexinV와 sytox의 염색이 동시에 증가 되는 것으로 보여지나(Hep3B의 경우), AnnexinV positive 및 negative 세포의 구별이 불명확한 경우도 있어(HepG2, PLC/PRF5), 세포주에 따라 아포토시스와 세포괴사가 혼재된 형태로 유도되는 것으로 사료된다[31].
- [0111] 3) Oxygen consumption rate (OCR) 분석
- [0112] 1. 실험방법
- [0113] 분획물들의 세포대사교란 능력을 확인하고자, 세포산소소모량(Oxygen consumption rate, OCR)을 측정하였다

[34].

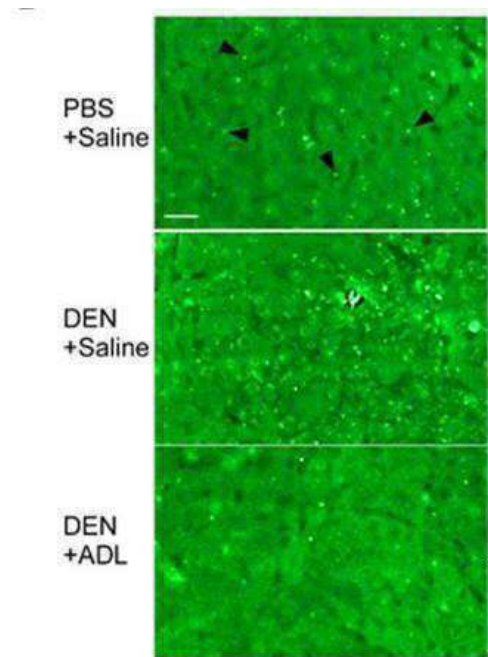
- [0114] 세포독성을 유도하지 않는 추출물 농도인 0.5 mg/ml이 사용되었고, 이런 농도조건에서 OCR에 전혀 영향을 주지 못했던 물 분획물은 실험에서 제외하였다.
- [0115] 2×10^4 개의 HepG2세포를 XF analyzer (Seahorse Bioscience, 미국)용 plate에 10% fetal bovine serum (GIBCO, USA)이 포함된 M199/EBSS medium을 사용하여 밤새 배양하였다. 세포의 산소소비량(oxygen consumption rate, OCR)을 측정하기 전에, bicarbonate-free medium으로 교체한 뒤, CO₂없이 세포배양기에서 1시간 배양하였다. 장수풍뎅이 추출물을 처리하기 전 20분 동안 세포의 basal level 의 OCR 값을 측정한 뒤 장수풍뎅이 유충 추출물을 0.5 mg/ml로 처리하고, 약 1 시간 동안 OCR의 변화를 측정하였고, 후에 0.5 μ M oligomycin, 1 μ M carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), 1 μ M rotenone, 1 μ g/ml antimycin A 등의 4가지 호흡 사슬 억제제를 순서대로 처리하면서, 다시 OCR변화량을 측정하였다. 측정결과는 Prism 5.0 (GraphPad, USA)을 통하여 분석하였다.
- [0116] 2. 실험결과
- [0117] OCR의 측정을 위해서 XF analyzer (Seahorse)를 사용하였고, 기본 호흡량(basal respiration), ATP 합성, 최대 호흡량은 oligomycin, FCCP, antimycin A/rotenone을 순차적으로 처리함으로써 계산하였으며, 이를 도 6A에 나타내었다[6].
- [0118] 에틸아세테이트와 헥산분획물들에서 기본 호흡량의 변화는 없었고, ATP 합성정도는 에틸아세테이트 및 헥산 분획물 모두에서 다소 감소하기는 하였으나, 최대 호흡량에서는 에틸아세테이트 분획물에서 뚜렷한 차이를 보였다(도 6B). 이상의 결과로부터 에틸아세테이트 분획물이 세포대사작용에 영향을 줄 수 있음을 알 수 있었고, 이런 대사교란 현상이 세포죽음 유도와 연결되어 있는지 확인하고자[13], 오토파지 유도능을 western blot으로 분석하였다(도 6C). 1 mg/ml의 농도조건에서 에틸아세테이트 분획물은 LC3-II form을 증가시켰으나(도 6C), 헥산과 물 분획물들은 LC3-II 형성에 영향이 없었다. LC3-II의 형성은 세포질에 존재하는 LC3-I이 lipid가 연결된 형태로 바뀔 때 전기영동에서 이동속도가 달라지는 것을 검출하는 것으로 오토파지 유도의 가장 좋은 근거로 폭넓게 활용되고 있다[15]. 이상의 실험결과들로부터, 에틸아세테이트 분획물이 세포의 호흡대사를 교란할 수 있음을 확인하였고, 오토파지라는 대사교란으로 유도되는 세포죽음기전이 활성화되는 것을 확인하였다.
- [0119] 장수풍뎅이 에틸아세테이트 분획물에 대한 추가 분리, 분획, 및 성분 분석을 하고, 다른 곤충추출물들과의 비교 분석을 하여, 아포토시스, 세포괴사, 오토파지 등의 세포죽음 기전을 유도하는데 관련된 물질들을 분리 동정할 필요가 있다. 이를 기반으로 생리활성을 가진 새로운 물질을 확보하고, 알려지지 않은 세포신호전달기전도 밝혀낼 수 있을 것으로 기대한다.
- [0120] 결론적으로, 장수풍뎅이 유충분말과 이의 분획물로부터 간 보호 효과와 항암활성을 확인하였으며, 실험에 사용된 유충 분획물들에 대한 추가 분획과 분석으로 생리활성을 가진 물질발굴이 가능할 것으로 기대한다.
- [0121] 상기의 본 발명은 바람직한 실시예 및 실험예를 중심으로 살펴보았으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 본질적 기술 범위 내에서 상기 본 발명의 상세한 설명과 다른 형태의 실시예 및 실험예들을 구현할 수 있을 것이다. 여기서 본 발명의 본질적 기술범위는 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

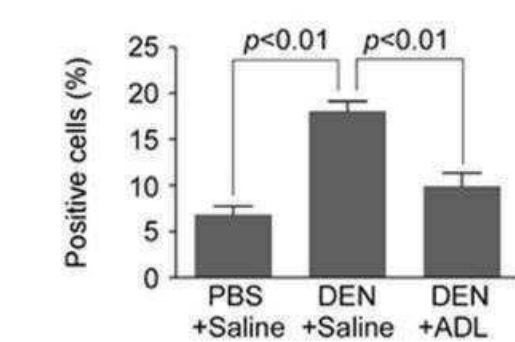
도면1a



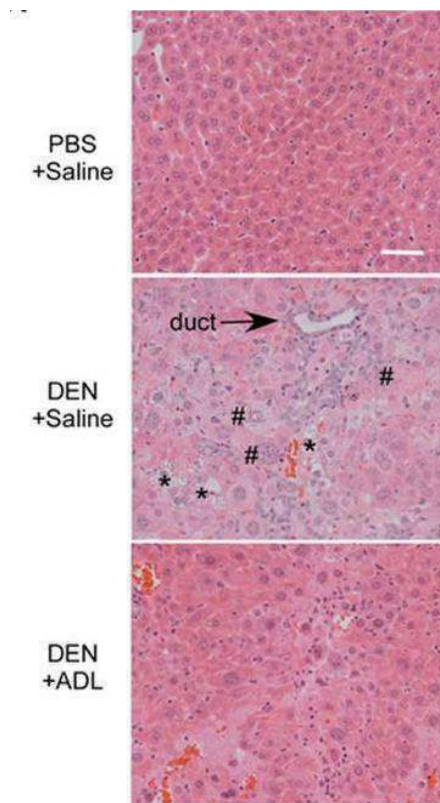
도면1b



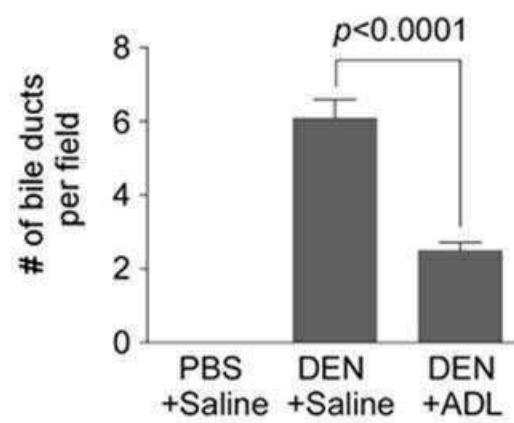
도면1c



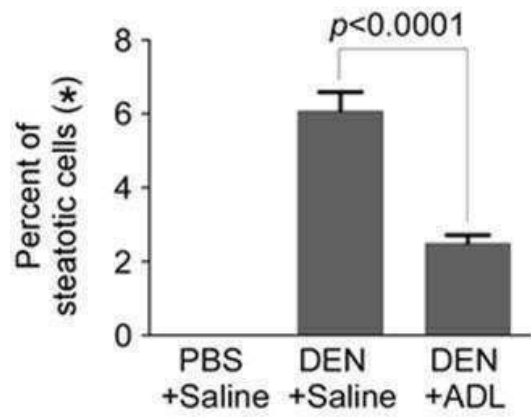
도면2a



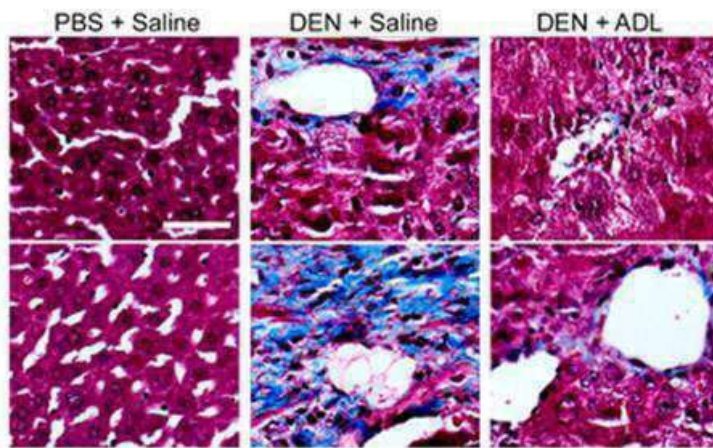
도면2b



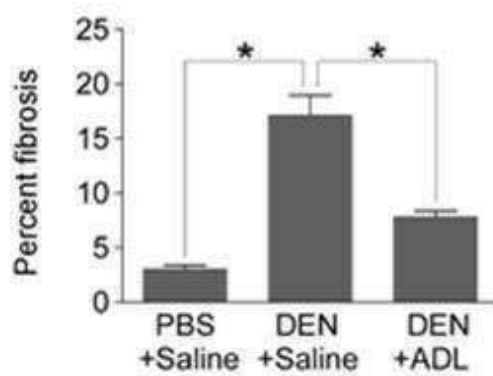
도면2c



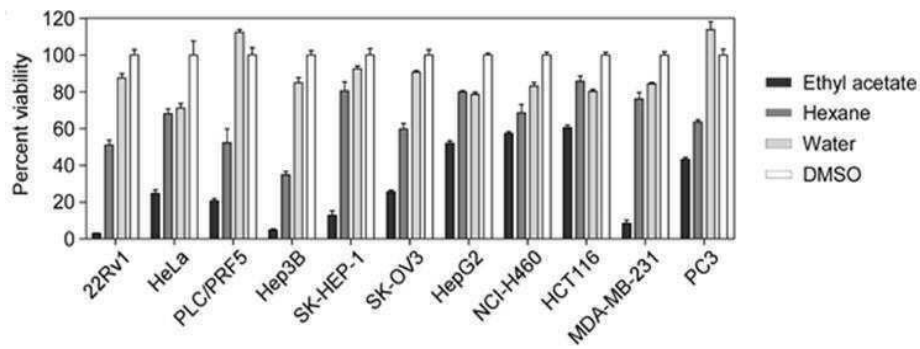
도면3a



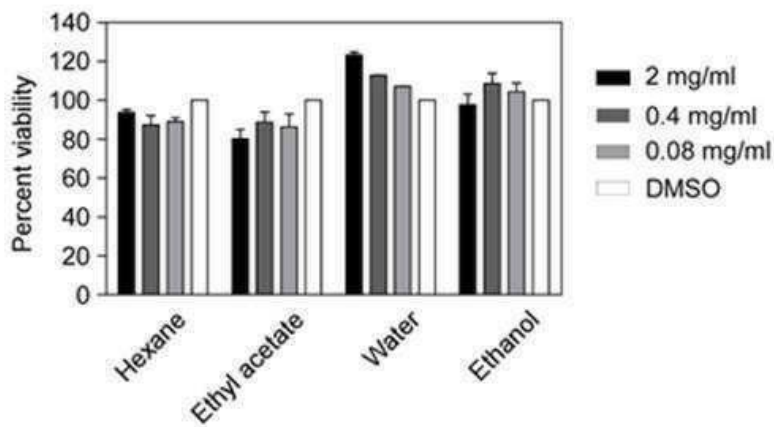
도면3b



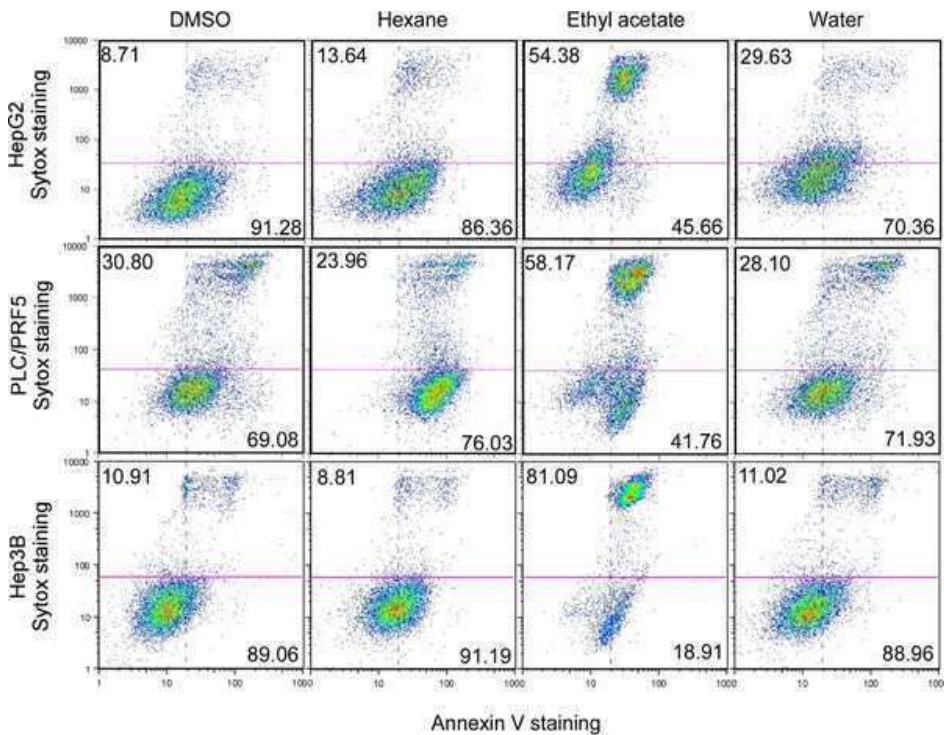
도면4a



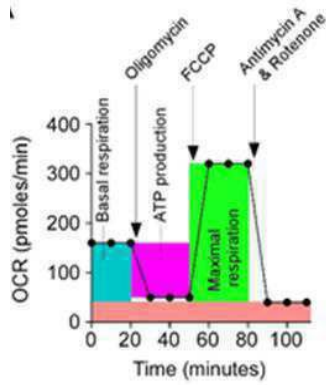
도면4b



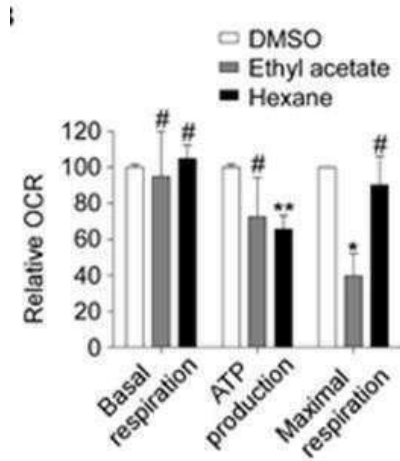
도면5



도면6a



도면6b



도면6c

