



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0034133
(43) 공개일자 2016년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7034 (2006.01) A61K 36/185 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0125304

(22) 출원일자 2014년09월19일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

재단법인 전남생물산업진흥원

전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

기성환

광주광역시 서구 화정로180번길 2, 101동 301호

(화정동, 금호타운)

방미애

광주광역시 북구 우치로537번길 10, 103동 101호

(일곡동, 동아아파트)

조승식

전라남도 무안군 삼향읍 삼향로 41 더트리폴리앙

101-2102호

(74) 대리인

특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 10 항

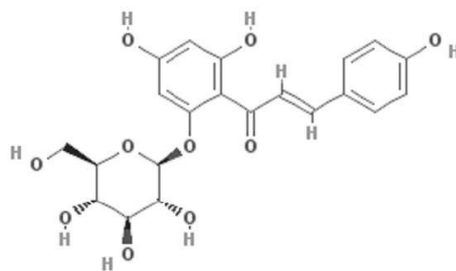
(54) 발명의 명칭 히어리로부터 분리된 화합물을 포함하는 간 보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 히어리로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 간 질환 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 히어리로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 또는 간 보호 및 간 기능 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 히어리로부터 분리된 화합물은 식용으로 사용되는 식물 유래 추출물로서 부작용의 문제가 없고, 간세포에 대한 독성도 없으며, 간세포 보호 효과가 우수하므로, 본 발명의 간 보호용 조성물은 간 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물 또는 간 기능 개선 또는 간 보호용 식품 조성물 뿐만 아니라, 피로회복 또는 숙취해소와 관련된 다양한 용도로 응용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 311013-03-1-HD110

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 생명산업기술개발사업 연구개발 분야 융복합

연구과제명 순천지역에 농림자원을 활용한 고부가가치 지역 Brand 식품개발

기 여 율 1/1

주관기관 순천대학교

연구기간 2013.08.19 ~ 2014.08.18

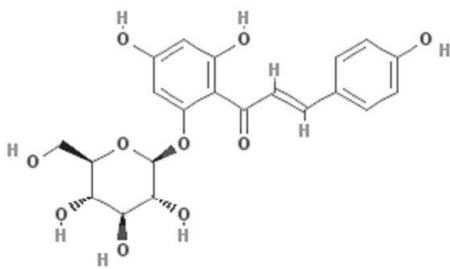
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리페포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 간 보호용 조성물.

[화학식 1]



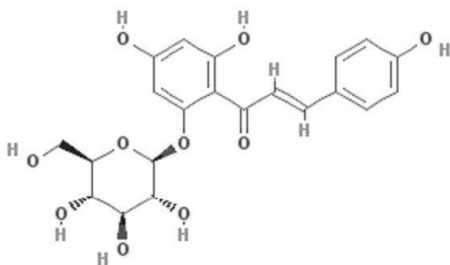
청구항 2

상기 화학식 1의 구조를 갖는 이소살리페포사이드(isosalipurposide)는 히어리 꽃으로부터 분리된 것인 간 보호용 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리페포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 간 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물.

[화학식 1]



청구항 4

상기 화학식 1의 구조를 갖는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide)는 히어리 꽃으로부터 분리된 것인 간 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 간 질환은 간 독성 질환, 약물성 간 손상, 바이러스성 간 손상, 간염, 간경화 및 간암으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나인 간 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 조성물은 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염의 함량이 전체 조성물에 대하여 0.001 내지 99.9 중량%인 것인 간 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물.

청구항 7

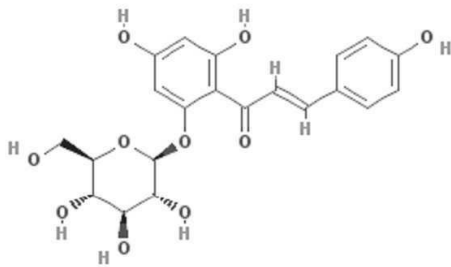
제3항에 있어서,

상기 조성물의 제형은 정제, 알약, 캡셀제, 환제, 산제, 과립제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 크림, 로션제, 연고제, 경고제, 액제, 에어로솔제, 유동엑스제, 엘릭서, 침제, 향낭제, 패취제 및 주사제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 간 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물.

청구항 8

상기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 9

상기 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide)는 히어리 꽃으로부터 분리된 것인 간 보호 및 간 기능 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 간 보호 및 간 기능 개선용 식품 조성물은 건강기능성 식품인 간 보호 및 간 기능 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 간 보호 효과가 있는 식물 유래 성분, 구체적으로 히어리로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 간 보호용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 간은 인간의 신체 장기 중 생체 내 대사가 가장 활발하게 일어나는 장기로 인체 내 장기 중 가장 큰 장기이기도 하다. 상기 간은 소화기계와 전신순환계 사이에 위치하면서 외부에서 들어온 생체 외 물질로부터 전신을 방어하는 기능을 수행하고 있다. 또한, 상기 간은 각종 대사작용, 해독, 분해, 합성 및 분비를 담당하는 매우 중요한 장기이다.

[0003] 보다 구체적으로, 상기 간은 에너지 대사를 관리하는 기능이 있어, 음식물에서 흡수된 모든 영양소들이 간에서 에너지를 생산할 수 있는 물질로 대사되어 전신에 공급되거나 저장되며, 약 2,000여종의 효소, 알부민, 응고인자들의 혈청단백, 담즙산, 인지질, 콜레스테롤 등의 지방 등이 간에서 합성되고 저장되며 분배된다. 또한 간은 각종 대사산물을 담관을 통해 십이지장으로 배설하는 기능 및 면역기능이 있어 우리의 생명유지에 중요한 역할을 하고 있다. 또한, 해독 및 분해 기능으로서 간에서 약물, 술, 독성물질 등을 해독시키므로, 간세포는 손상되기 쉽고 따라서 약물성, 독성, 알코올성 간질환 등이 흔히 발생할 수 있다. 또한, 생체 내로 들어온 생체 외 물질은 일단 간을 통과하게 되므로 간은 영양소 이외에도 많은 독성물질에 노출될 위험이 다른 장기 보다 많아서 그만큼 손상될 확률도 매우 높다.

[0004] 간은 재생능력이 우수한 장기로 약간의 손상이 있을 경우에는 충분히 정상으로 회복되지만, 손상이 지속될 경우에는 간 조직의 일부가 완전히 파괴되고 간 기능도 저하되는 등 정상 간으로의 회복이 어려운 상태가 된다. 이러한 간 손상이 만성화되면 그 원인에 상관없이 간 섬유화 또는 간경화, 간암으로 진행된다. 간 섬유화, 간경화, 간암 등은 현재 뚜렷한 치료제 및 치료법이 없는 질환으로 그 사망률 또한 높은 질환이다. 그러므로, 간 손상이 만성화되기 전에 이러한 간 손상을 예방 및 치료하는 것이 간 섬유화, 간경화 또는 간암으로의 진행을 억제하는데 매우 중요하다.

[0005] 상기 간질환은 병이 생기는 원인에 따라 바이러스성 간질환, 알코올성 간질환, 약물독성 간질환, 지방간, 자가면역성 간질환, 대사성 간질환 및 기타 간질환으로 구분된다.

[0006] 간 질환은 초기에 자각증상이 없고 간 손상 정도가 심한 정도에 이르러서야 자각증상이 나타남으로써 간 질환의 조기 발견은 그만큼 어렵다. 이러한 이유로, 상기 간 질환은 우리나라뿐만 아니라 세계적으로도 사망원인의 수위를 차지하고 있으나, 효과적인 치료제 및 진단방법이 없는 실정이다. 이러한 간 질환의 심각성에도 불구하고 아직까지 간 질환의 효과적인 치료방법이 없는 실정으므로 간 조직의 구조 및 기능을 유지하면서 간 손상을 치료 및 예방할 수 있는 약물 개발이 절실히 필요한 상황이다.

[0007] 현재 간염, 간경화의 예방 및 치료를 위해 가장 일반적으로 사용하는 약제로는 우르소데옥시콜린산, 면역자극제, 항바이러스제, 실리마린, 운지다당체, 비타민 B군, 메티오닌 등이 사용되고 있으나 이 약제들 중 어느 것도 아직까지 임상적으로 만족스러운 효과를 제공하는 것은 없었다. 따라서, 최근에는 평상시 용이하게 섭취하여 간에 부담을 주지 않으면서도 간손상을 치료할 뿐 아니라 예방할 수 있는 방법을 찾고자 하는 노력이 진행되고 있다.

[0008] 또한, 현재까지 천연식물에서 추출되어 실제 임상에서 응용되고 있는 간기능 보호제로서는 ?실리버마리아넘(*Silybum marianum*)이라는 식물에서 추출된 실리빈(silybin), 실리디아민(silydiamine), 실리크리스틴(silycristine) 등의 이성체로 구성된 실리마린(silymarin) 제제가 있다. 이와 같이, 천연물로부터 간질환 치료제를 개발하려는 수많은 노력에도 불구하고 실제로 치료제로 현재 사용 중이거나 임상시험 중인 예는 소수에 불과하다.

[0009] 따라서, 간기능 예방과 관련하여, 항산화 효과가 있어 산화적 스트레스에 의한 간손상을 예방할 수 있고, 간세포를 보호할 수 있으며, 내성이나 안정성에 대한 문제가 대두되어지지 아니한 천연물질 유래의 간 보호 및 간 손상 예방에 유효한 성분과 이를 유효성분으로 하는 간 보호용 조성물, 간 질환 치료 또는 예방용 조성물 또는 간 보호 및 간 손상 예방에 효과가 있는 기능성 식품 조성물을 개발하는 것이 시급한 실정이다.

[0010] 기존에 보고된 천연자료, 특히 식물 추출물을 유효성분으로 하는 간 보호용 조성물과 관련하여, 공개특허 제 2014-0070734호나 등록특허 제1317551호, 천연자료로부터 유효성분을 분리한 등록특허 제0499877호나 등록특허

제0403722호 등이 제시되어 있으나, 상기 유효성분은 히어리와 전혀 상이한 식물에 해당하는 것으로, 히어리로부터 분리된 화합물을 이용한 간 보호용 조성물에 대한 내용은 아직 제시된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) KR 2014-0070734 A
(특허문헌 0002) KR 10-1317551 B
(특허문헌 0003) KR 10-0499877 B
(특허문헌 0004) KR 10-0403722 B

발명의 내용

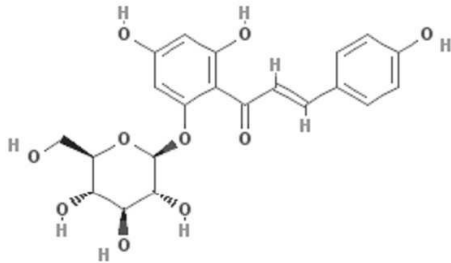
해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 개선하기 위한 것으로, 천연물질을 유효성분으로 포함하는 간 보호용 조성물, 간 질환 치료 또는 예방용 조성물 또는 간 보호 및 간 손상 예방에 효과가 있는 기능성 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 히어리로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 간 보호용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, 히어리로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 간 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, 히어리로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명자들은 부작용이나 내성 등의 안정성에 대한 문제가 없는 천연물질 유래의 간 보호용 조성물을 연구하던 중, 식용으로 사용할 수 있어 그 안정성이 보장된 히어리 추출물이 간보호 효과가 있다는 사전 연구 결과를 확인하고, 이로부터 추가적인 연구를 진행하여, 히어리의 지상부위 중 꽃의 추출물이 간보호 효과가 가장 우수하다는 것을 확인하여, 이와 관련된 연구를 더욱 진행하여, 히어리의 꽃의 추출물 및 분획물 중에서 가장 간보호 효과가 우수한 분획을 확인하여, 에틸아세테이트층의 분획이 간보호 효과가 가장 우수함을 확인하였으며, 추가적으로 상기 에틸아세테이트 분획층으로부터 분리된 화합물이 간세포를 이용하여 실험한 결과, 간세포에 대한 독성이 없고, 간세포를 이용하여 실험한 결과, 항산화 유전자 발현의 핵심 조절인자인 Nrf2의 핵내 이동 및 전사적 활성화를 촉진하고, t-BHP에 의한 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸로부터 간세포를 보호하여, 간 보호, 간 손상 예방 및 간 기능 개선 효과가 있는 것으로 확인되었으며, 도 2에 나타난 바와 같이 해당 화합물을 NMR 등을 통해 동정한 결과, 해당 화합물이 도 3에 나타난 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide)임을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0018] 본 발명은 히어리로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 간 보호용 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 구체적으로 상기 간 보호용 조성물은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[0020] [화학식 1]



[0021]

[0022] 상기 간 보호용 조성물은 의약 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다. 이러한 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 간 질환 치료 또는 예방용 의약 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 간 보호, 간 기능 개선 및/또는 간 손상 예방용 기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

[0023]

상기 히어리(*Corylopsis coreana*)는 송광납관화라고도 불리우며, 조록나무과로 전 세계적으로 27속 140종이 있고, 주로 동아시아에 분포하나, 드물게는 북아메리카 또는 중앙아메리카에도 분포한다. 조록나무과에 히어리속에 속하는 식물은 29종으로, 일본에 5종, 인도에 5종이 있고, 우리나라에는 1종이 생육하고 있으며, 이 중 우리나라에 자생하는 히어리속의 낙엽활엽의 관목 식물을 히어리(*Corylopsis coreana*, korean winter hazel)라고 부른다. 상기 히어리는 1910년 전남 순천 송광사에서 처음 발견되었고, 주로 국내에서는 지리산 지역에서만 자생하는 것으로 알려져 있으며, 특산식물로 1924년 학계에 등록된 수종이다. 상기 히어리는 낙엽활엽의 관목으로 1 m 내지 5 m까지 자라고, 줄기에는 피목이 많으며, 군집을 형성하고, 근맹아가 많이 올라와 커다란 집단을 형성하면서 철쭉, 진다래, 참싸리, 팔배나무, 신갈나무와 함께 혼생하며, 양지에서 잘 자라고 내한성이 강하여 영하 30도 이하에서도 동해를 입지 않으며, 내건성도 강하여 건조한 토양에서도 잘 자라는 것으로 알려져 있다. 상기 히어리는 가을에 잎이 노랗게 물들고, 생장속도가 느리지만 이른 봄에 피는 꽃과 가을에 물드는 노란색의 잎을 보기 위해 정원수로 많이 활용되고 있으나, 이에 대한 생물학적 활성 및 주요 구성성분에 대해서는 거의 보고되어 있지 않다.

[0024]

상기 히어리는 지상부, 지하부 또는 이들의 혼합물일 수 있고, 바람직하게는 지상부일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 꽃잎 수 있다.

[0025]

상기 히어리로부터 분리된 화합물은 히어리 추출물, 구체적으로, 히어리 꽃의 추출물, 일 예로, 히어리 꽃의 메탄올 수용액, 바람직하게는 80% 메탄올 수용액을 추출용매로 한 추출물의 에틸아세테이트 분획으로부터 분리하여 제조된 것일 수 있다.

[0026]

상기 추출물 제조에 사용된 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 회석수, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 회석수는 알코올을 50 내지 99.9%(v/v)로 물에 회석한 것일 수 있다.

[0027]

본 발명의 히어리로부터 분리된 화합물의 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 회석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 메탄올 수용액일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 80% 메탄올 수용액일 수 있다.

[0028]

또한, 상기 용매로 추출한 추출물로부터 분획물을 제조하기 위한 분획용매는 부탄올, 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하

나의 용매, 바람직하게는 에틸아세테이트일 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용할 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 분획물은 상기 추출물을 물에 용해시킨 후, 헥산 및 에틸아세테이트를 순차적으로 첨가하여 분리된 에틸아세테이트 분획물일 수 있다.

[0029] 본 발명의 히어리로부터 분리된 화합물, 구체적으로 상기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide)는 항산화 유전자 발현의 핵심 조절인자인 Nrf2의 핵내 이동 및 전사적 활성화를 촉진하고, t-BHP에 의한 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸로부터 간세포를 보호하여, 우수한 간 보호, 간 손상 예방 및 간 기능 개선 효과를 갖는 것으로 확인되었다.

[0030] 따라서 상기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 간 보호용 조성물은 간 질환의 치료 또는 예방이나 간 보호, 간 기능 개선 및 간 손상 예방을 위하여 사용될 수 있다.

[0031] 상기 간 질환은 일반적인 간 질환을 포함하는 개념이며, 일 예로 간 독성 질환, 약물성 간 손상, 바이러스성 간 손상, 간염, 간경화, 간암 및 간성 혼수로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 또한, 상기 간 보호, 간 기능 개선 또는 간 손상 예방 효과는 피로회복 효과 또는 숙취해소 효과로 응용될 수 있다.

[0032] 따라서, 본 발명의 간 보호용 조성물은 간 질환의 치료 또는 예방용 의약 조성물로 응용되거나, 상기 간 보호용, 간 기능 개선용, 간 손상 예방용, 피로회복용 및/또는 숙취해소용 기능성 식품 조성물로 응용될 수 있다. 상기 식품조성물은 일 예로 상기 간 보호 및 간 기능 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물, 피로회복을 위한 건강기능성 식품 조성물 또는 숙취해소를 위한 건강기능성 식품 조성물일 수 있다.

[0033] 상기 건강기능식품은 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 간 보호용 조성물은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 전체 조성물 중량의 0.001 중량% 내지 99.9 중량% 또는 0.01 중량% 내지 50 중량% 또는 0.1 중량% 내지 30 중량% 또는 0.1 중량% 내지 15 중량% 포함될 수 있다.

[0035] 상기 히어리로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 간 보호용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0036] 상기 히어리로부터 분리된 화합물은 상기 간 보호용 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.

[0037] 이 경우 상기 조성물 내 상기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염의 함량은 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 화합물의 함량은 바람직한 함량으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.

[0038] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 또한, 상기 약학 조성물은 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 화학식 1의

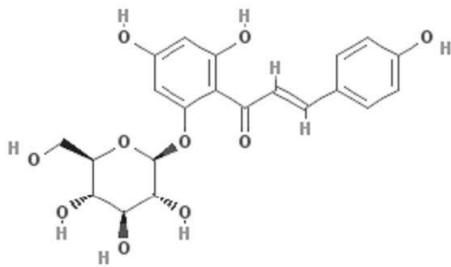
구조를 가지는 이소살리피포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 간 질환 치료 효과, 간 보호 효과, 간 기능 개선 효과 등이 있는 것으로 인정된 물질, 일 예로 간세포 보호용 물질, 간 질환 치료제 또는 간 기능 개선제 등으로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.

[0040] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0041] 본 발명은 또한, 하기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리피포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 간 질환 치료 또는 예방용 의약조성물을 제공한다.

[0042] [화학식 1]



[0043] 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이소살리피포사이드(isosalipurposide)는 히어리 꽃으로부터 분리된 것일 수 있다.

[0045] 상기 간 질환은 일반적인 간 질환을 포함하는 개념이며, 일 예로 간 독성 질환, 약물성 간 손상, 바이러스성 간 손상, 간염, 간경화, 간암 및 간성 혼수으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 간 독성 질환, 약물성 간 손상, 바이러스성 간 손상 및 간염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 또한, 상기 간 보호, 간 기능 개선 또는 간 손상 예방 효과는 피로회복 효과 또는 숙취해소 효과로 응용될 수 있다.

[0046] 상기 간 질환 치료 또는 예방용 의약조성물은 간 보호, 일 예로 독성 손상 등 외부 요건 또는 체내의 내부 요건에 의한 간 손상으로부터 간 또는 간 세포를 보호할 수 있으므로, 상기 간 질환의 예방 및 치료의 목적으로 사용가능하다.

[0047] 상기 간 질환 치료 또는 예방용 의약조성물은 상기 유효성분을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 혼합물로 제공되는 경우, 상기 유효성분은 상기 조성물 전체에 대해 0.001 내지 99.9 중량% 또는 0.1 내지 99.9 중량%로 포함될 수 있으나, 통상 0.001 내지 50 중량%의 함량으로 포함되는 것이 일반적이다.

[0048] 상기 담체 또는 부형제의 일예로는 물, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 락토스, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수, 텍스트로스, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 담체 또는 부형제는 2종 이상 사용될 수 있다.

[0049] 또한, 상기 간 질환 치료 또는 예방용 의약조성물을 약제화하는 경우, 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제,

계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있다.

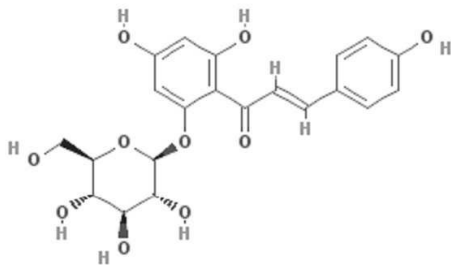
[0050] 또한, 본 발명의 간 질환 치료 또는 예방용 의약조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 간 질환 예방 또는 치료 활성을 갖거나 간 보호활성을 갖는 화합물 또는 식물 추출물을 포함한 물질을 더욱 포함할 수 있으며, 상기 유효성분 100 중량부에 대하여 각각 5 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.

[0051] 상기 간 질환 치료 또는 예방용 의약조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다. 구체적인 제형의 예로는 경고제, 과립제, 로션제, 리니멘트제, 리모나데제, 산제, 시럽제, 안연고제, 액제, 에어로솔제, 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제, 연고제, 유동엑스제, 유제, 현탁제, 전제, 침제, 점안제, 정제, 좌제, 주사제, 주정제, 캡셀제, 크림제, 환제, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 등이 있으며, 일 예로 정제, 알약, 캡셀제, 환제, 산제, 과립제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 크림, 로션제, 연고제, 경고제, 액제, 에어로솔제, 유동엑스제, 엘릭서, 침제, 향낭제, 패취제 및 주사제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0052] 본 발명에 따른 상기 간 질환 치료 또는 예방용 의약조성물은 경구 또는 비경구로 사용될 수 있으며, 예컨대 진피 내, 근육 내, 복막 내, 정맥 내, 피하 내, 코 안, 경막의 및 구강 경로를 통하여 사용될 수 있으며, 이의 투여량은, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 상기 간 질환 치료 또는 예방용 조성물은 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.1 내지 100 mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여가능하다. 그러나, 상기한 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며 상기 범위에 한정되지는 않는다.

[0053] 본 발명은 또한, 하기 화학식 1의 구조를 가지는 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0054] [화학식 1]



[0055] 상기 식품 조성물은 기능성 식품 조성물 또는 건강기능식품일 수 있으며, 상기 식품 조성물은 간 보호 및 간 기능 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물, 피로회복을 위한 건강기능성 식품 조성물 또는 숙취해소를 위한 건강기능성 식품 조성물로 응용될 수 있다.

[0057] 본 명세서에서 식품 조성물이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 일 예로 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미할 수 있고, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.

[0058] 본 발명의 유효성분을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품은 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

- [0059] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 히어리로부터 분리된 화합물 또는 간 보호용 조성물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1 g 내지 20 g 또는 5 g 내지 12 g이다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.
- [0061] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 중량부 내지 200,000 중량부 범위에서 선택될 수 있다.
- [0062] 본 발명에서 기능성 음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.
- [0063] 상기 기능성 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명 조성물의 유효성분을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 g 내지 20 g 또는 5 g 내지 12 g일 수 있다.
- [0064] 또한, 상기 간 보호 및 간 기능 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 유효성분의 함량은 전체 식품 중량의 0.0001 중량% 내지 99 중량% 또는 0.001 중량% 내지 50 중량% 또는 0.01 중량% 내지 30 중량% 또는 0.1 중량% 내지 15 중량%로 포함할 수 있으며, 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.0002 g 내지 5 g 또는 0.03 g 내지 1g의 비율로 포함할 수 있다.
- [0065] 또한, 상기 간 보호 및 간 기능 개선용 식품 조성물의 섭취량은 섭취하고자 하는 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 일 예로, 본 발명의 식품 조성물은 유효성분을 기준으로 1일 0.0001 g/kg(유효성분의 양/체중) 내지 12 g/kg(유효성분의 양/체중) 또는 0.01 g/kg 내지 9 g/kg으로 투여될 수 있다. 투여방법은 하루에 한번 투여할 수 있고, 수회 나누어 투여할 수 있으며, 상기 투여량 및 투여방법은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0066] 본 발명의 히어리로부터 분리된 화합물은 식용으로 사용되는 식물 유래 추출물로부터 분리된 것으로서 부작용의 문제가 없고, 간세포에 대한 독성도 없으며, 간세포 보호 효과가 우수하므로, 본 발명의 간 보호용 조성물은 간 질환 치료 또는 예방용 의약품 조성물 또는 간 기능 개선 또는 간 보호용 식품 조성물 뿐만 아니라, 피로회복 또는 숙취해소와 관련된 다양한 용도로 응용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 간 보호, 간 기능 개선 및 간 질환 치료 또는 예방과 관련된 의료산업 및 식품산업의 분야에서 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0067]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 히어리 추출물 및 분획물의 제조과정과 분획물로부터 화합물을 분리하는 과정을 나타낸 순서도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 히어리 꽃 추출물의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리된 화합물의 NMR 결과를 나타낸 그래프로, 도 2a는 ¹H NMR 결과를 나타낸 그래프이고, 도 2b는 ¹³C NMR 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3는 본 발명의 일 실시예에 따른, 히어리 꽃 추출물의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리된 화합물의 구조를 나타낸 구조도이다.

도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른, 간세포를 이용하여 히어리로부터 분리된 화합물이 간세포에 대한 세포독성을 MTT assay법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 히어리로부터 분리된 화합물이 Nr f2의 핵내 이동 및 전사적 활성화 여부를 면역화학적 방법 및 루이퍼레이지 활성을 통하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6는 본 발명의 일 실시예에 따른, 히어리로부터 분리된 화합물이 t-BHP에 의한 간세포 사멸로부터 세포를 보호함을 MTT assay법과 LDH 분석법을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 히어리로부터 분리된 화합물이 t-BHP에 의한 간세포의 세포 손상 보호와 관련하여, 세포내 활성산소종을 측정하기 위해 DCFH-DA 억제 및 항산화 분자인 글루타치온의 회복 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 히어리로부터 분리된 화합물이 t-BHP에 의한 간세포의 세포 손상 보호와 관련하여, 세포사멸사 표지자인 PARP 및 Caspase3의 활성화 억제여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068]

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 구체적인 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 보다 상세히 설명하기로 한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 보다 명확하기 이해시키기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 보호 범위는 특허청구범위에 의하여 해석되어야 하고, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0069]

[실험예. 히어리 추출물로부터 화합물의 분리 및 간보호 활성 측정]

[0070]

제조예. 히어리 추출물로부터 간보호기능을 갖는 화합물의 분리

[0071]

히어리 추출물, 구체적으로 히어리 부위 중에서 간보호 기능이 가장 우수한 것으로 확인된 히어리 꽃 추출물로부터 간보호기능을 갖는 화합물을 도 1에 나타내는 방법으로 분리하였다.

[0072]

우선, 히어리는 전라남도 나주 지역에서 재배된 히어리를 구입한 후, 유수에서 3회 씻어내어 불순물을 제거한 후, 히어리를 꽃과 줄기로 구분하고, 상기 히어리 꽃, 히어리 뿌리 및 히어리 줄기를 각각 35℃에서 30시간 건조를 수행하여 상기 세척한 히어리를 완전히 건조시켰다. 상기 건조시킨 각각의 히어리 꽃, 히어리 뿌리 및 히어리 줄기를 분쇄하여 각각의 건조 시료를 제조하였다. 상기 각각의 꽃 건조 시료, 뿌리 건조 시료 또는 줄기 건조 시료 각 1 kg에 80% 메탄올 수용액 5 L를 각각 가하고, 15℃에서 72시간 동안 추출한 후에, 감압증발기를 사용하여 감압농축하였다. 상기 농축시킨 각각의 히어리 부위별 메탄올 수용액 조추출액을 400 mesh 여과포를 필터로 이용하여 제균 처리를 한 후, -20℃에서 동결건조하여 분말상태의 조추출물을 제조하였다. 상기 조추출물을 증류수에 녹여 각 히어리 부위 별 히어리 추출물 시료를 제조하였으며, 상기 제조한 히어리 추출물 시료는 사용시까지 -20℃에서 보관하였다.

[0073]

또한, 상기 히어리 80% 메탄올 수용액 추출액을 감압 농축하여, 메탄올 층을 제거하였다. 용매를 제거한 후, 건조하여 수득한 추출물을 물에 녹인 후, 상기 수용액에 녹인 추출물에 부피비를 기준으로 핵산을 1:1로 혼합하고, 핵산 층을 분리하는 방법을 2회 수행하였다. 상기 핵산 층을 수득하였고, 상기 핵산 층을 분리하고 남은 물 층에, 상기와 같이 부피비를 기준으로 1:1로 에틸아세테이트, 아세톤 및 부탄올을 혼합한 후, 물층을 제거하는 방법으로 2회 분획하여, 각각의 용매별 분획물을 제조하였다. 상기 수득한 추출물 및 분획물은 실험에 사용하기 전까지 냉동보관하였다.

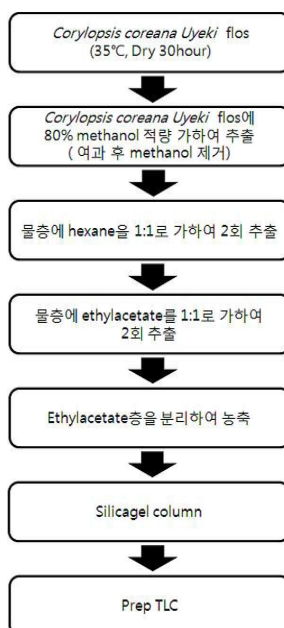
- [0074] 사전실험 결과, 상기 분획용매 별 분획물 중에서 간보호 기능이 가장 우수한 것으로 확인된 에틸아세테이트 분획물로부터(50g, 수율 5%) 화합물을 분리하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.
- [0075] 우선, 실리카겔을 상기 에틸아세테이트 분획물로 충전한 후, 헥산으로 평형화시킨 컬럼에 적량 적하하고, 컬럼 부피의 2배수에 해당하는 헥산을 통과한 후 헥산과 에틸아세테이트의 비를 10 : 1에서 1 : 5의 비율로 조정해가며, 각각의 분획을 수득하였다. 상기 수득한 각각의 분획에서 간보호 기능이 우수한 분획을 분리하여, 간보호 기능이 가장 우수한 것으로 확인된 분획을 감압 농축 후, 다시 preparative TLC에 적하하고, 클로로포름과 메탄올을 3 : 1의 조건에서 전개 후 Rf 0.5에 위치하는 물질을 추출하여 건조하였다. 상기 분리된 물질의 구조를 확인하기 위하여, Heteronuclear Multiple Bond Correlation experiment(HMBC) NMR 분석(^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR)을 수행하여, 구조를 결정하였으며, NMR 분석 결과를 도 2에 나타내었다. 상기 ^1H -NMR 결과(도 2a) 및 ^{13}C -NMR 결과(도 2b)를 분석한 결과, 상기 분리된 물질은 도 3에 나타낸 구조를 가지는 화합물 즉, 이소살리퍼포사이드(isosalipurposide)인 것으로 확인되었다.
- [0076] **실험예. 히어리 추출물로부터 분리된 화합물의 간보호기능 확인**
- [0077] 우선, 본 발명에서 분리된 화합물의 세포 독성을 확인하기 위하여, HepG2 세포주를 96well plate에 분주하고 well당 5×10^4 밀도로 세포를 배양한 후, 상기 히어리 추출물로부터 분리된 화합물 즉, 이소살리퍼포사이드를 농도별로 즉, 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM 및 100 μM 씩 처리한 후, MTT Assay로 세포독성을 측정하였다. 구체적으로, 상기 이소살리퍼포사이드를 농도별로 처리한 후, MTT 시약(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 0.2mg/ml을 처리하고 4시간 동안 방치하였다. 이후, 원심분리를 통해 상등액을 제거하고, DMSO 200 μL 를 첨가하여 생성된 formazan crystal 생성물을 용해시킨 후, ELISA microplate reader(TECAN, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 구하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0078] 상기 도 4에 나타낸 바와 같이, 아무런 시료를 처리하지 않은 대조군(도 4의 가장 왼쪽(-))과 실험한 모든 농도에서 유사한 세포 생존율이 확인되어, 상기 이소살리퍼포사이드는 100 μM 농도까지 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.
- [0079] 상기 실험 결과에서 확인된 바에 따라, 10 μM , 30 μM 및 100 μM 의 함량으로 이소살리퍼포사이드를 처리하여, 간세포 보호능을 확인하였다. 구체적으로, 상기과 같이 배양된 HepG2 세포주에 이소살리퍼포사이드를 10 μM , 30 μM 및 100 μM 의 함량으로 처리한 후, t-BHP 500 μM 를 처리하고, 상기과 같은 방법으로 MTT Assay를 수행하여, 세포생존율을 측정하였다. 음성대조군으로는 이소살리퍼포사이드를 처리하지 않고, 동량의 t-BHP를 처리하였으며, 그 결과를 도 6a에 나타내었다. 또한, LDH 분석법을 통해 세포 손상 정도를 확인한 결과를 도 6b에 나타내었다.
- [0080] 상기 도 6a에 나타낸 바와 같이, 이소살리퍼포사이드를 처리하지 않은 간세포주는 약 50%만 생존한 반면, 30 μM 및 100 μM 를 처리한 경우에는 아무런 처리를 하지 않은 대조군과 거의 유사한 결과가 확인되어, 상기 이소살리퍼포사이드는 간세포 보호에 매우 뛰어난 효과를 갖는 것으로 확인되었다. 또한, 상기 도 6b에 나타낸 바와 같이, 세포 손상 정도는 이소살리퍼포사이드를 처리하지 않은 음성대조군에 비하여 현저하게 감소하였으며, 농도의존적으로 감소 정도가 증가되었다.
- [0081] 이 후, 상기 HepG2 세포주를 이용하여, 간세포 보호와 관련된 유전자 및 단백질 관련 인자를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다.
- [0082] 우선, 상기 HepG2 세포주에 이소살리퍼포사이드를 10 μM , 30 μM 및 100 μM 를 처리한 후, 상기 이소살리퍼포사이드 처리에 따른 상기 HepG2 세포주의 Nrf2의 핵내 이동 여부 및 전사 활성화 여부를 면역화학적 방법 및 상대적 형광 활성(Luciferase activity)을 이용하여 확인하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0083] 상기 도 4a에 나타낸 바와 같이, 이소살리퍼포사이드 100 μM 를 처리한 후, 시간이 경과함에 따라 핵 내의 Nrf2 밴드가 짙어짐이 확인되었고, 도 4b에 나타낸 바와 같이, 이소살리퍼포사이드를 처리함에 따라 이를 처리하지 않은 대조군에 비하여 형광 활성이 유의적으로 증가하여, Nrf2의 전사가 활성화되는 것으로 확인되었다.
- [0084] 또한, 이소살리퍼포사이드의 간세포 보호능을 확인하기 위하여, 상기과 같이 배양된 HepG2 세포주에 이소살리퍼포사이드를 10 μM , 30 μM 및 100 μM 의 함량으로 처리한 후, t-BHP 500 μM 를 처리하고, 각각의 단백질에 대

한 웨스턴블롯을 수행하였다.

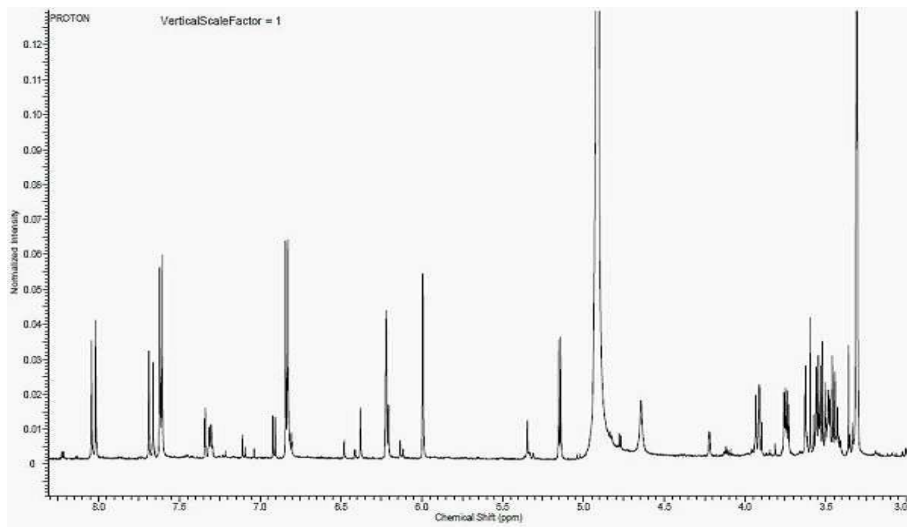
- [0085] 구체적으로, Laemmli UK 방법(1970)에 따라 Mighty Small II SE 250장치를 사용하여 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하였다. 보다 구체적으로, 상기 각각의 배양된 세포의 용해분획을 샘플회석완충액[63mM Tris (pH.6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 0.0013% bromophenol blue, 5% b-mercaptoethanol]에 회석하여 7.5%, 9% 젤을 사용하여 전극 완충액(1L 용액 중 Tris 15g, glycine 72g, SDS 5g 포함)내에서 전기영동하였다.
- [0086] 상기 전기영동이 끝난 젤은 전이용 전기영동장치를 이용하여 전이완충액[25mM Tris, 192mM glycine, 20% v/v methanol (pH.8.3)]내에서 190 mAmps로 1시간 동안 나이트로셀룰로오즈지에 단백질을 전이시켰다.
- [0087] 상기 단백질이 전이된 나이트로셀룰로오지에 Anti-PARP, Anti-Caspase 및 Anti-Nrf2 항체를 각각 1차 항체로서 반응시킨 후, 2차 항체로 Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG를 1시간 동안 반응시키고, ECL chemiluminescence system(Amersham, Gaithersburg, MA)을 사용하여 발색하였다. 상기, 시료 중 단백질 함량의 동질성은 anti- β -actin 항체(Sigma, St. Louis, MO)를 사용하여 확인하였다. 상기 측정된 결과를 도 7 내지 도 8에 나타내었다.
- [0088] 상기 도 7에 나타낸 바와 같이, 이소살리피포사이드는 t-BHP에 의한 DCFH-DA를 감소시켜 세포 내 활성산소종을 감소시킨 반면, 항산화 분자인 글루타치온을 증가시켜, 세포 보호 활성이 있는 것으로 확인되었다.
- [0089] 또한, 상기 도 8에 나타낸 바와 같이, 이소살리피포사이드는 t-BHP에 의한 간세포의 세포 손상과 관련하여, 세포자멸사 표시자인 PARP 및 Caspase 3과 관련하여, Caspase 3 및 PARP의 함량이 증가하여, Caspase 3의 활성화가 억제되고, 결과적으로 PARP의 활성화도 억제하는 것으로 확인되었으며, 이러한 억제능은 농도의존적인 것으로 확인되었다.
- [0090] 상기 결과로부터, 이소살리피포사이드는 t-BHP에 의한 간세포 손상 즉, 세포자살을 효과적으로 억제하며, 현상적으로도 세포자멸을 억제하는 것으로 확인되어, 상기 이소살리피포사이드는 간 보호 효과 및 간세포 손상에 의한 간질환의 치료, 개선 및 예방 효과가 있는 것으로 예상된다.

도면

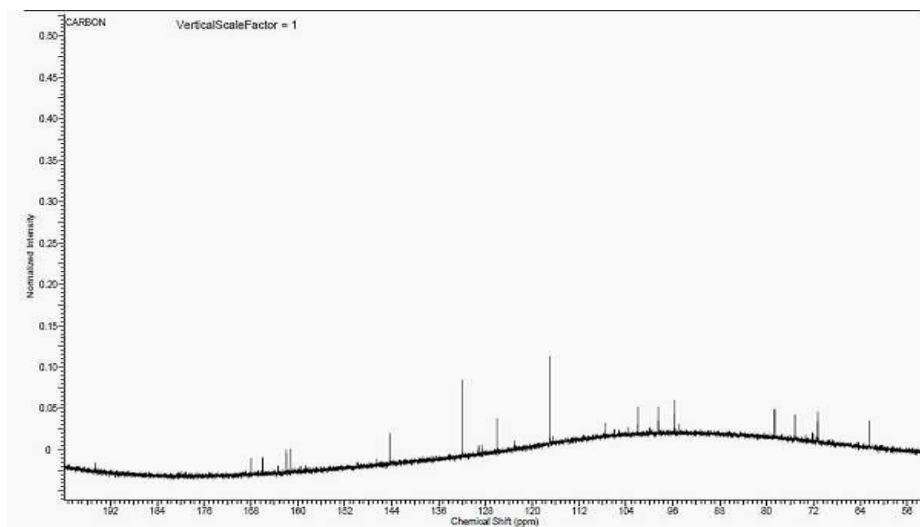
도면1



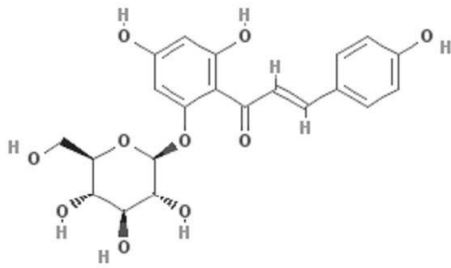
도면2a



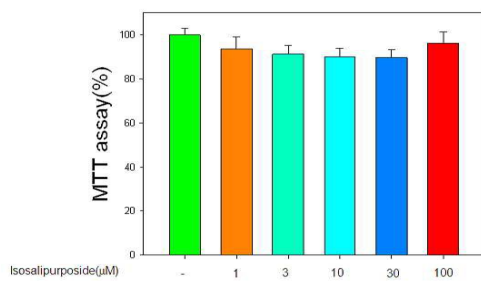
도면2b



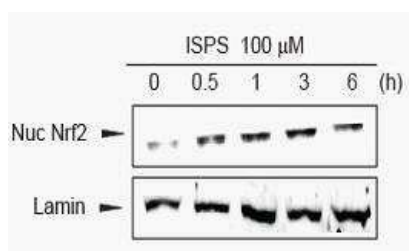
도면3



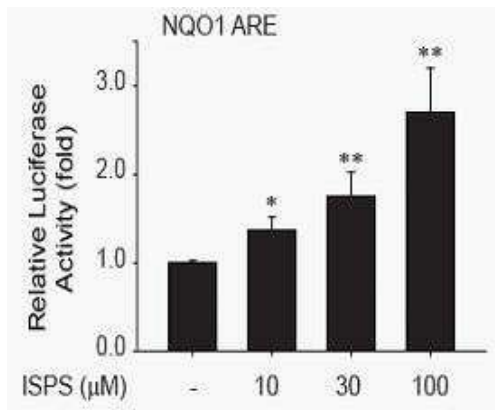
도면4



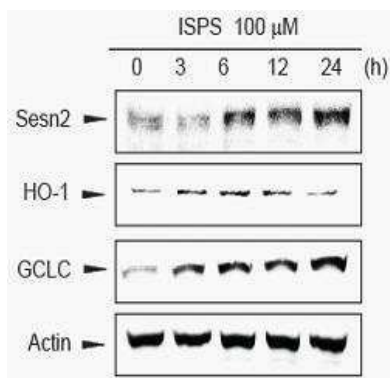
도면5a



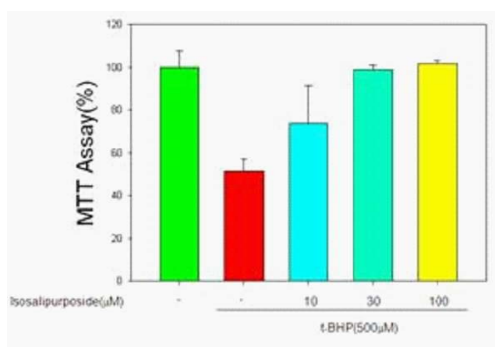
도면5b



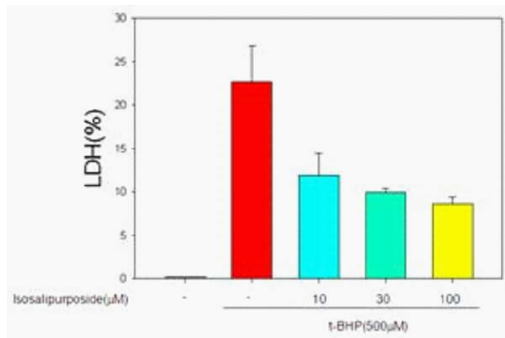
도면5c



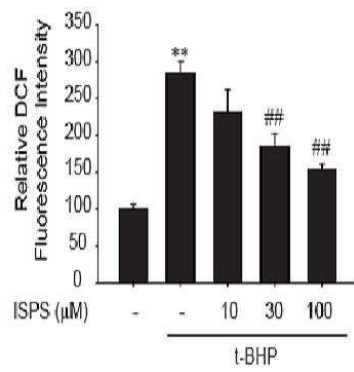
도면6a



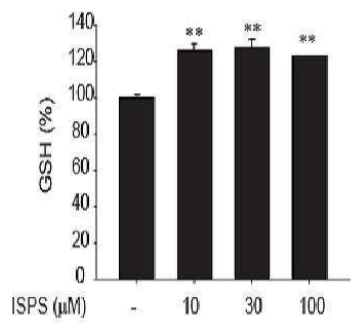
도면6b



도면7a



도면7b



도면8

