(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0036500
(43) 공개일자 2012년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/488 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0098224
(22) 출원일자 2010년10월08일
심사청구일자 2010년10월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이동호
서울특별시 성북구 정릉1동 1020번지 우성아파트 105-802
전태훈
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수촌아파트 236동 1802호 (방이동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 5 항

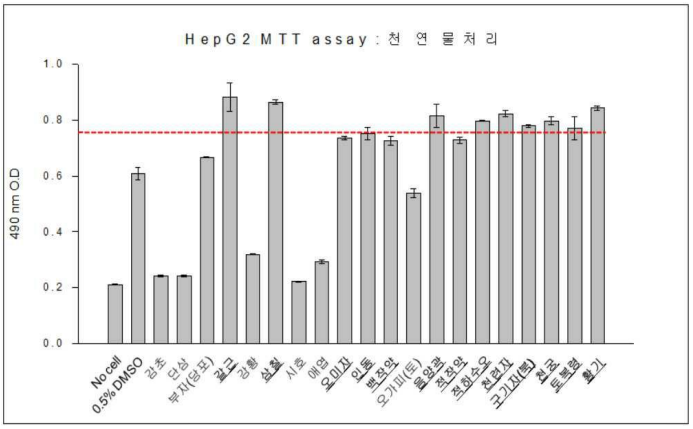
(54) 발명의 명칭 **갈근 추출물을 함유하는 안드로스테논 분해 촉진용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 안드로스테논 분해 촉진용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 간세포 내 3β-HSD(3β-hydroxysteroid dehydrogenase)에 의한 안드로스테논 분해 촉진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 천연물 추출물인 갈근 추출물을 이용하여 안드로스테논의 분해 효소인 3β-HSD의 발현을 증진시켜 안드로스테논을 효율적으로 분해할 수 있다. 따라서 본 발명의 조성물은 기존의 물리적, 화학적 거세방법을 통한 웅취 제거 기술과는 달리, 안전하고 경제적인 새로운 비거세 수퇘지 웅취 제거 기술로서 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

홍기창

경기도 남양주시 별내면 청학로68번길 23, 주공@ 304-303

김세헌

서울특별시 강남구 학동로 609, 삼익@ 14동 1002호 (청담동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	108172032SB010
부처명	농림수산식품부
연구사업명	농림기술개발연구
연구과제명	산육능력향상, 식품안정성 확보 및 수정능력유지가 가능한 웅취제거기법 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2009.12.20 ~ 2010.12.28

특허청구의 범위

청구항 1

갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 간세포 내 3β-HSD(3β-hydroxysteroid dehydrogenase)에 의한 안드로스테논 분해 촉진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 안드로스테논 분해 촉진은 간세포 증식 촉진, 및 간세포 내 3β-HSD 발현 증가로 인한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 갈근 추출물은 물, 에탄올, 메탄올, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 함수에탄올, 함수프로필렌글리콜, 함수부틸렌글리콜, 글리세린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 하여 추출된 것을 특징으로 하는 안드로스테논 분해용 조성물.

청구항 4

갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 돼지의 안드로스테논에 의한 웅취 제거용 사료첨가제.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 웅취 제거는 안드로스테논의 분해에 의해 나타나는 것을 특징으로 하는 사료첨가제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 안드로스테논 분해 촉진용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 간세포 내 3β-HSD(3β-hydroxysteroid dehydrogenase)에 의한 안드로스테논 분해 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 웅취(boar taint)는 수퇘지의 성성숙시 분비되는 스테로이드 호르몬 종류인 안드로스테논(androstenone)과 스케이톨(skatole)에 의해서 발생하는 것으로 알려져 있으며, 식육으로써 치명적인 풍미를 유발한다. 웅취를 제거하기 위해서, 수퇘지의 성성숙이 진행되기 이전에 외과적 시술을 통해서 고환을 제거하는 방법인 거세(castration)가 일반적으로 시행되어져 왔다. 이러한 외과적 거세방법은 시술이 비교적 간단하고 비용이 저렴하면서도 웅취를 효과적으로 제거할 수 있어서, 우리나라의 경우 비육돈에 대해서 대부분 이루어지고 있다.

[0003] 그러나, 이러한 외과적인 거세는 다음과 같은 다양한 측면에서 심각한 문제점을 드러내고 있다. 먼저, 경제적 측면에서 보면, 무엇보다 외과적 시술로 발생되는 생산력 감소와 질병에 대한 저항성 약화로 인한 손실을 들 수 있다. 수퇘지의 거세로 인한 생산력감소 효과 연구 중 하나에서는 적육생산량을 높이는 안드로겐(androgen)의 자연적 동화작용을 막으며, 그 결과 실제로 거세돈은 비거세돈에 비해 사료효율이 약 12% 떨어지고, 적육생산량이 6.5% 저하된다고 보고한 바 있다(Jensen, M.T. et al. 1995. Animal Science 61, 293-304). 또한, 어린시기의 과도한 스트레스로 인해 체내의 면역력 감소와 그에 따른 질병저항성 약화를 일으켜, 실제로 폐사율을 높이는 원인을 제공하기도 한다. 이러한 결과는 비외과적 거세의 활용이 돈육생산의 수익성을 30% 정도 향상시킬 것

으로 판단한 연구 결과와 연결지을 수 있다 (McGlone, J. J. et al. 1993. Journal of Animal Science 71, 1441-1446). 현재 양돈농장에서는 바로 이러한 점을 가장 심각한 문제로 인식하고 있으며, 따라서 외과적 거세를 대체할 수 있는 기법의 개발은 시급하다.

[0004] 일반적으로 수퇘지는 암퇘지에 비해 도체중 및 적육생산능력등 성장관련 능력이 우수하지만, 웅취로 인해 육질 및 식감이 저하되는 문제점이 있다. 최근 들어, 돈육의 육질과 식감은 소비자의 중요한 품질판단 척도로 인식됨으로써, 성장관련 능력이 저하되는 것을 감수하면서 거세는 비육돈의 경우 거의 전수적으로 이루어지고 있다. 따라서, 산업적으로도 수퇘지의 우수한 적육생산능력을 활용하고, 웅취로 인한 식감저하 문제점을 극복한다는 측면에서, 수퇘지의 웅성능력을 유지할 수 있는 새로운 웅취 제거방법의 개발은 시급하다.

[0005] 더욱이 비육돈과는 별도로, 종돈개량의 경우에도 외과적인 거세로 인한 수퇘지의 능력검정두수 저하가 심각하다. 이는 검정 후 종돈으로 선발되지 않고 도축장으로 출하될 경우 도체등급하락 및 경락가격의 차이에 따른 경제적인 손실을 줄이기 위해 어릴 때 거세를 함으로써 수정 능력을 상실하기 때문이다. 실제로 거세돈과 비거세돈의 경락가 차이는 올해평균 1100원/kg의 단가차이를 보였다. 이러한 능력검정두수 제한의 결과 종돈의 선발강도가 낮아져 유전적 개량량이 상대적으로 감소되며, 능력이 우수한 종돈의 선발이 어렵게 되어, 국산 종돈의 능력이 저하되고, 종돈개량을 수입종돈에 의존하게 되는 악순환이 발생하게 되었다.

[0006] 경제산업적인 측면과는 별도로 동물의 거세와 관련된 동물복지(animal welfare)는 선진국을 위주로 그 중요성이 높아지고 있으며, 우리나라도 이점에 대한 인식이 점차 높아지고 있어 관련 법규 신설이 이루어지고 있다. 우리나라는 현재 거의 모든 비육 수퇘지들에 대해서 아무런 마취도 없이 해마다 수백만 마리씩 외과적인 시술로서 고환을 제거하는 거세가 시행되고 있다. 그러나 노르웨이나 스위스 등에서는 동물복지를 고려하여 거세를 이미 금지하고 있으며, 세계의 여러 선진국들도 이와 유사한 방법을 고려하고 있다. 우리나라도 축산의 선진화를 위해서는 시간이 문제일 뿐 예외일 수 없으며, 따라서, 경제산업사회적인 다양한 측면에서 고려해 볼 때, 새로운 비거세 수퇘지 웅취제거기법 개발은 반드시 이루어져야 한다.

[0007] 기존의 외과적 거세의 문제점을 극복하기 위해서 이미 외국은 오래전부터 연구를 진행해 왔고, 호주의 화이자社는 임프로박(Improvac)이라는 획기적인 제품을 개발한 바 있다. 외과적인 시술을 통해 고환을 제거하는 대신에 돼지의 면역체계를 이용한 백신을 통해서 고환의 기능을 저하시켜 거세효과를 내는 방식으로서, 이미 그 효과를 검증받고 여러 나라에서 상용화 되었으며, 우리나라에서도 최근 시판되고 있을 정도로 인지도가 높다. 소위 거세백신(immuno castration)이라 불리는 이 제품은 거세의 효과를 통해서 웅취를 제거시킬 수 있을 뿐만 아니라, 일당증체량과 사료섭취율, 등지방층 두께 등 성장능력이 일반거세돈에 비해 증가시킬 수 있는 장점이 있는 것으로 알려져 있다 (Dunshea, F.R. et al. 2001. Journal of Animal Science 79, 2524-2535).

[0008] 그러나, 이 백신은 그 '효능'에 있어서 여러 문제가 있다. 이 백신의 원리는 성선호르몬 분비인자(GnRH)에 대한 항체를 형성시켜 거세 효과를 유발하는 것으로서, GnRH의 중화를 통해 2차적으로 성선자극 호르몬(FSH)과 황체호르몬(LH) 및 테스토스테론의 생산을 감소시켜 고환의 성장과 기능을 차단시킨다. 이는 결과적으로 거세와 동일한 효과를 얻을 수 있어, 웅취를 제거시키는 효과는 얻을 수 있지만, 결과적으로 웅성호르몬의 분비를 막아 웅성 특이적인 우수한 성장능력을 저해시키고, GnRH 하위단계의 다른 호르몬 체계에 이상을 줄 수도 있다. 더욱이, 생물에 투여한 '호르몬 유사 억제제'라는 점은 혈액 내 잔류되었을 시 돈육식품으로써의 안전성에 있어서 심각한 문제를 초래할 수 있다. 뿐만 아니라, 화이자사가 2번에 걸쳐 등급판정소에 등급판정을 의뢰한 결과 각각 63%와 51%만이 거세판정을 받았다는 점은 우리나라 현행기준에서 백신의 성공 효율도 문제가 있음을 알 수 있다 (Einarsson, S. et al. 2009. Theriogenology 71, 302-310). 또한, 백신접종에 따른 스트레스 유발문제도 무시할 수 없다. 비육돈과는 별도로 종돈의 경우에도 웅성능력이 상실된다는 점에서 다수의 후보돈이 능력검정을 받지 못해 선발강도가 저하되는 문제가 존재한다.

[0009] 임프로박 백신은 '비용' 면에서도 적용에 제약을 갖는다. 국내시험 결과 임프로박 접종돈은 거세돈 판정으로 인한 돼지 경락가격 상승으로 일반거세돈보다 두당 약 2만 2천원 정도의 이익을 제시한 바 있지만, 마리당 2회에 걸친 접종과 한 건당 5천원에 육박하는 백신비용은 생산자 측면에서 볼 때, 앞서 언급한 거세판정비율과 합쳐져 다시 한 번 적용을 고려해 보게 한다. 또한, 향후 국내 양돈산업 전반에 걸친 확대적용을 고려해 보면, 외국계 제약회사의 제품사용에 대한 로열티 지불과 그에 따른 상대적 외화낭비는 사료수입비용과 함께 부담으로 다가온다.

[0010] 기존의 외과적 거세 방법의 문제점과 상용화 된 백신의 문제점을 극복하기 위해서는 웅취를 발생시키는 직접적인 요인을 찾아 이들만을 효과적으로 제거시키기 위한 연구개발이 필요하며, 세계적으로도 개발단계에 있다는 점에서 국내에서의 기술개발과 기술력 선점이 시급하다. 이에 본 발명자들은 천연물 추출물인 갈근 추출물을 처

리하여 안드로스테논의 분해 효소인 3β-HSD의 발현을 증진시켜 안드로스테논을 분해하여 웅취를 효율적으로 제거할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 수퇘지의 웅취원인물질인 안드로스테논을 효과적으로 제거시킬 수 있는, 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 간세포 내 3β-HSD에 의한 안드로스테논 분해 촉진용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 수퇘지에서 웅취를 효율적으로 제거시킬 수 있는, 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 돼지의 안드로스테논에 의한 웅취 제거용 사료첨가제를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 간세포 내 3β-HSD(3β-hydroxysteroid dehydrogenase)에 의한 안드로스테논 분해 촉진용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 돼지 등지방 내 존재하는 수퇘지 고기의 주요 웅취원인물질로서 2차 성성숙시 고환에서 발생하는 안드로스테논(androstenone)의 효과적인 제거를 위한 것이다. 상기 '3β-HSD(3β-hydroxysteroid dehydrogenase)'는 돼지에서 안드로스테논의 합성과 분해의 대사과정에 관여하는 효소로, 특히 정소에서 안드로스테논의 생성에, 간에서는 안드로스테논의 분해에 관여하여 등지방내 안드로스테논의 축적에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 실제로 간에서의 3β-HSD 발현량과 등지방에 축적되는 안드로스테논의 양과 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 간세포의 증식을 촉진시키고 간세포 내 3β-HSD의 발현량을 증가시킴으로써 안드로스테논 분해 활성을 증가시킬 수 있고 결국 돼지의 등지방에 축적되는 안드로스테논의 양을 감소시킬 수 있다.

[0015] 본 발명의 안드로스테논 분해 촉진용 조성물에서, 상기 안드로스테논 분해 촉진은 간세포 증식 촉진, 및 간세포 내 3β-HSD 발현 증가로 인한 것을 특징으로 한다. 본 발명에서, 다양한 식물 추출물들이 상기 간세포 증식 촉진 및 간세포 내 3β-HSD의 발현을 증가시킬 수 있는지를 확인하였다. 그 결과, 갈근, 오미자, 천궁, 황기 추출물이 간세포 증식 촉진 및 간세포 내 3β-HSD 발현 증가 활성을 나타내는 천연물로 선별되었으며 (도 1 내지 3 참조), 이들 중 갈근은 안드로스테논의 직접적인 분해 효과가 확인되었다 (도 5 참조). 따라서 본 발명자들은 웅취를 발생시키는 원인물질인 안드로스테논을 분해시키는데 가장 적합한 천연물로서 갈근을 최종 선별하였다.

[0016] 본 발명의 조성물에서 유효 성분으로 사용되는 갈근(*Pueraria lobata*)은 칡의 뿌리이다. 칡은 콩과의 덩굴식물로 낙엽성 활엽을 가진 식물이다. 주로 100-1,200 m 이하의 산기슭의 양지바른 모든 지역에서 자라며, 가끔 들판이나 구릉지에서도 자란다. 열매는 협과이고, 길이 4-9 ㎝의 넓은 줄 모양이며, 굵은 털이 있고, 9-10월에 익는다. 한방에서는 뿌리를 갈근(葛根)이라는 약재로 쓰는데, 발한, 해열 등의 효과가 있다. 뿌리의 녹말은 갈분(葛粉)이라 하며 식용하고, 줄기의 껍질은 갈포(葛布)의 원료로 쓰며, 뿌리를 삶은 물은 음료로 이용한다.

[0017] 본 발명의 갈근 추출물은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도와 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 제조될 수 있다.

[0018] 본 발명의 조성물의 유효성분인 갈근 추출물을 제조하기 위한 추출 용매로는 물, 에탄올, 메탄올, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 함수에탄올, 함수프로필렌글리콜, 함수부틸렌글리콜, 글리세린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매를 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 갈근을 증류수에 넣고 냉각 콘덴서가 달린 추출기를 사용하여 50-100℃에서 2-20시간 가열하여 추출하거나, 5-37℃에서 1-15일간 추출한 후, 여과, 숙성 및 농축 과정을 거쳐 갈근 추출물을 제조할 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 돼지의 안드로스테논에 의한

웅취 제거용 사료첨가제를 제공한다. 본 발명의 갈근 추출물은 간세포 증식 촉진 및 간세포 내 3β-HSD 발현 증가 활성을 나타내므로, 갈근 추출물을 돼지 사료에 첨가하면 안드로스테논의 분해에 의한 웅취 제거 효과를 얻을 수 있게 된다. 따라서 본 발명의 갈근 추출물은 돼지의 웅취 제거를 위한 사료첨가제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 웅취 제거용 사료첨가제는, 갈근의 쓴맛으로 인해 돼지에게 급여되는 사료의 식이에 영향을 주지 않는 한 적정량을 선택하여 사료에 첨가할 수 있으며, 바람직하게는 양돈용 사료 전체 중량대비 0.1 내지 10 중량%를 첨가하여 양돈용 사료를 제조할 수 있다. 상기 사료첨가제를 첨가시킨 혼합 사료를 정해진 사육기간 동안 돼지에게 급여한 돼지는 일반 사료를 동일한 사육기간 동안 급여한 돼지와 비교하여 웅취가 제거된 특성을 가질 수 있다.

발명의 효과

[0022] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 천연물 추출물인 갈근 추출물을 이용하여 안드로스테논의 분해 효소인 3β-HSD의 발현을 증진시켜 안드로스테논을 효율적으로 분해할 수 있다. 따라서 본 발명의 조성물은 기존의 물리적, 화학적 거세방법을 통한 웅취 제거 기술과는 달리, 안전하고 경제적인 새로운 비거세 수퇘지 웅취 제거 기술로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 다양한 식물 추출물을 이용하여 간세포의 분열을 촉진시키는 물질을 스크리닝한 결과이다.

도 2는 다양한 식물 추출물을 이용하여 3β-HSD의 RNA 전사량을 측정한 RT-PCR 결과이다.

도 3은 다양한 식물 추출물은 이용하여 3β-HSD의 RNA 발현량을 측정한 웨스턴 블롯팅 결과이다.

도 4는 GC mass를 이용하여 세포배양배지 내 안드로스테논 측정 결과를 보여준다.

도 5는 갈근 추출물이 안드로스테논의 분해를 촉진시키는지에 대한 시험관내 효능 평가 결과를 나타낸 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0025] **제조예 1. 식물 추출물의 제조**

[0026] 실험에 사용된 식물 추출물은 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 건조된 감초, 단삼, 부자(당포), 갈근, 강황, 삼칠, 시호, 애엽, 오미자, 인동, 백작약, 오가피, 음양곽, 적작약, 적하수오, 천련자, 구기자, 천궁, 토복령, 황기 500 g을 각각 증류수 5 kg에 넣고 냉각 콘덴서가 달린 추출기를 사용하여 70℃에서 3시간 가온하여 추출한 후 400 메쉬 여과포로 여과하고 상온으로 냉각한 후 5-15℃에서 7일간 방치하여 숙성시킨 후 0.45 필터로 여과하였다. 여액을 감압회전증발기에서 용매를 완전히 제거하여 식물 추출물들을 수득하여 하기 실험의 시료로 사용하였다.

[0027] **실시예 1. 식물 추출물에 의한 간세포의 분열 촉진 측정**

[0028] 안드로스테논(androstenone)은 스테로이드계 호르몬(steroid hormone)으로서 정소에서 생성되며, 간세포의 3β-HSD (3β-hydroxysteroid dehydrogenase)라는 효소에 의해서 분해된다. 따라서 본 발명자들은 먼저 간세포의 활성에 영향을 미치는 천연물 추출물을 1차적으로 선별하였다.

[0029] 우선 다양한 식물 추출물을 간세포인 HepG2에 처리한 후, 간세포의 세포 배양 시 MTT assay를 이용하여 간세포의 분열을 촉진할 수 있는 물질을 선별하였다. 이 때 사용되어진 HepG2 세포는 웰(well) 당 5×10^3 세포를 사용하였으며, 96웰 플레이트에서 0.5% FBS(Fetal Bovine Serum)를 포함한 RPMI 배지(welGENE, 한국) 200 μl에서

배양하였다. 이 때 각각의 천연물 추출물을 1 μl (1:200)을 첨가하고 CO_2 인큐베이터(incubator)에서 3일간 배양한 후 마지막 4시간에 MTT를 처리하여 상대적인 증식 속도(proliferation rate)를 측정하였다. 사용된 대조구는 0.5% DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 사용하였다. 이 때 MTT assay 과정은 MTS assay kit (promega)를 사용하여 공급업체의 프로토콜에 따라 진행하였다. 96well microplate에서 배양액을 100 μl남기고 MTS solution을 20 μl를 첨가하여 섞어주었다. 알루미늄 호일로 빛을 차단한 후, 세포배양기에서 2시간 배양한 뒤 microplate reader에서 O.D. 490 값을 얻어내어 세포의 수를 측정하였다.

[0030] 상기와 같이 간세포의 증식 속도를 측정한 결과, 갈근, 삼칠, 오미자, 인동, 백작약, 음양곽, 적작약, 적하수오, 천련자, 구기자, 천궁, 토복령, 황기 추출물들이 간세포의 활성에 영향을 미치는 천연물 추출물로 선별되었다 (도 1).

[0031] **실시예 2. 식물 추출물에 의한 3β-HSD의 mRNA 전사량의 증가 측정**

[0032] 실시예 1에서 선별된 갈근, 삼칠, 오미자, 인동, 백작약, 음양곽, 적작약, 적하수오, 천련자, 구기자, 천궁, 토복령, 황기 추출물들을, 3β-HSD 발현 MLTC-1 세포(ATCC No. CRL-2065)에 처리한 후 3β-HSD 발현 정도를 RT-PCR로 측정하였다.

[0033] 우선 다양한 추출물을 3β-HSD 발현 MLTC-1 세포에 처리한 후 간세포의 세포 배양 시 MTT assay를 이용하여 간세포의 분열을 촉진할 수 있는 물질을 선별하였다. 이 때 사용된 MLTC-1 세포는 웰 당 5×10^4 세포를 사용하였으며, 24웰 플레이트에서 10% FBS를 포함한 RPMI 배지 500 μl에서 배양하였다. 이 때 각각의 천연물 추출물 100 μg/ml를 첨가하고 CO_2 인큐베이터에서 5일간 배양한 후 RNA을 분리하여 semiquantitative RT-PCR을 진행하였다. 이 때 사용된 대조구는 0.5% DMSO를 사용하였다.

[0034] RNA를 분리하기 위해 세포를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml당 200 μl의 클로로포름(chloroform, Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고 추출한 0.5 μg, 1 μg, 2μg의 RNA를 주형으로 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 복제한 후, 이들 cDNA를 주형으로 하고, 유전자 데이터베이스에서 얻은 유사한 유전자 염기서열에 따라 아래와 같이 프라이머를 제작한 다음 연쇄중합반응을 통해 577 bp에 달하는 3β-HSD 유전자를 획득하였다. 이 때 사용한 역전사 효소는 SuperscriptIII(Invitrogen)이며, 사용한 중합효소는 Taq polymerase(Gene craft)이다.

[0035] 정방향 프라이머: 5'-CCAACTCGTACAAGAAGATCGTCC-3'

[0036] 역방향 프라이머: 5'-GACAGTGTGATCAAGTGGCGGTTA-3'

[0037] 이상과 같이 연쇄중합반응으로 얻은 3β-HSD 유전자는 아가로즈 겔(agarose gel)에 로딩(loading)하였다. 그 결과, 대조구(0.5% DMSO)보다 갈근, 오미자, 천궁, 황기 추출물이 3β-HSD의 RNA level을 증가시키는 것으로 나타났다 (도 2).

[0038] **실시예 3. 식물 추출물에 의한 3β-HSD의 단백질 발현 증가 측정**

[0039] RT-PCR 결과를 검증하기 위해 천연물 처리 세포에서 단백질을 분리하여 웨스턴 블롯을 진행하였다. 우선 세포를 트립신 처리하여 원심분리한 후, 세포 펠렛을 PBS(phosphate buffered saline)로 씻고, 세포용해용액 (50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin, 2 mg/ml aprotinin, 200 mg/ml PMSF)으로 잘 풀었다. 용해물은 Braford assay를 통해 정량하였고 SDS 젤 전기영동으로 분석하였다. 그 후 임모빌론 P 멤브레인 (Millipore corporation, Billerica, MA, USA)에 옮겨, 항-3β-HSD 항체 (토끼 IgG, Santa Cruz)와 2차 항체인 항-토끼 IgG 항체 (Santa Cruz)로 ECL 시스템 (GE healthcare)을 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, 대조구(0.5% DMSO)보다 갈근이 3β-HSD의 단백질 양을 가장 높게 증가시키는 것으로 나타났다 (도 3).

[0040] **실시예 4. 갈근 추출물에 의한 3β-HSD의 안드로스테논의 효과적인 분해 측정**

[0041] 천연물 스크리닝 결과, 간세포의 분열을 촉진하고 3β-HSD의 발현을 촉진하는 것으로 확인된 갈근 추출물이 안드로스테논 분해를 촉진시키는 지에 대하여 시험관 내 효능 평가를 실시하였다.

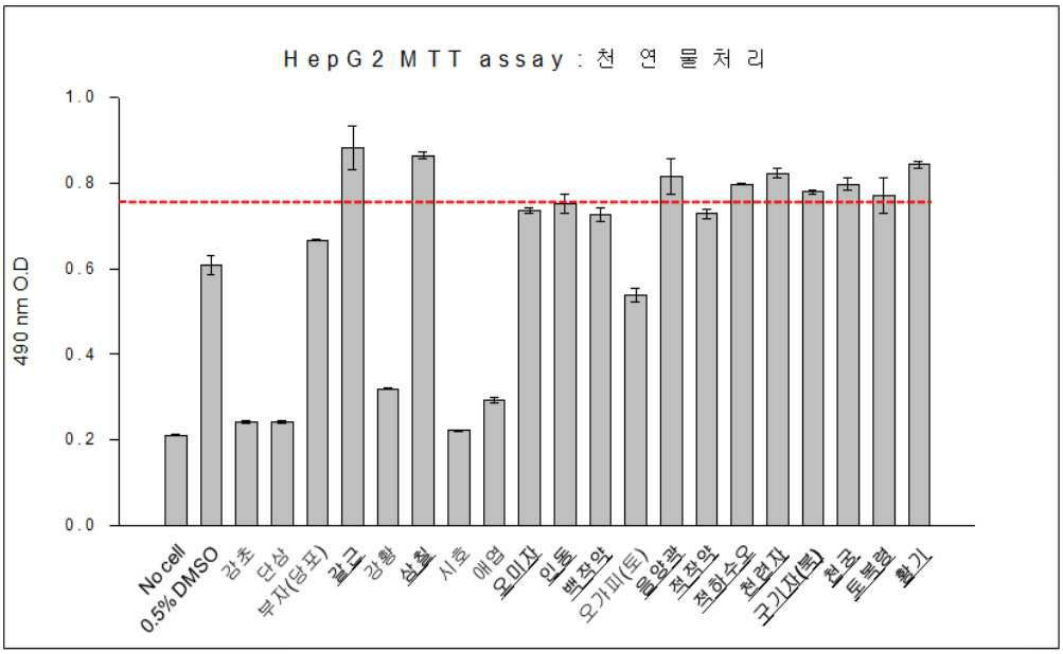
[0042] 우선 GC mass를 이용한 분석 방법으로, 세포 배양배지 내 안드로스테논을 측정하는 실험을 수행하였다. 효과적인 분리 및 검정을 위해서 Agilent 7890(영인과학)의 GC mass를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 DB-1MS(30m×0.25m×0.25㎛) Column을 사용하였고, 기체의 Flow rate는 1.0 ml/min로 하였다. 온도조건은 detector 280℃, 주입구온도는 250℃였으며, 오븐의 초기온도는 120℃에서 2분간 지체한 후 15℃/min의 속도로 250℃까지 상승한 후 다시 5℃/min의 속도로 300℃까지 상승한 후 5분간 온도를 지속하였다. 안드로스테논을 측정하기 위해 실험구로는 배지 999 μl과 1000 ppm의 안드로스테논 1 μl을 넣었고 대조구로는 배지 1 ml만 넣고 GC mass로 분석하였다. 그 결과, 실험구에서는 안드로세테논의 피크가 분석되었지만 (도 4의 가), 대조구에서는 검출되지 않았다 (도 4의 나).

[0043] 그 후, 갈근 추출물이 안드로스테논의 분해를 촉진시키는 지에 대한 시험관 내 효능 평가를 실시하기 위하여, 다음과 같은 설계로 실험을 진행하였다. 모든 처리구에는 DMSO(분리된 천연물을 DMSO로 용해)를 함유하였다. 블랭크(Blank) 처리구, 갈근을 처리한 MLTC-1 세포를 실험구, 그리고 갈근을 처리하지 않은 MLTC-1 세포를 대조구로 구성하여, 안드로스테논의 함량을 측정하고 비교하였다. 이 때 사용된 MLTC-1 세포는 웰 당 1×10^5 세포를 사용하였으며, 24웰 플레이트에서 10% FBS를 포함한 RPMI 배지 1 ml에서 배양하였다. 이 때 갈근 추출물 100 μg/ml를 세포가 포함된 24웰 플레이트에 첨가하고 CO_2 인큐베이터에서 72시간을 배양하였다.

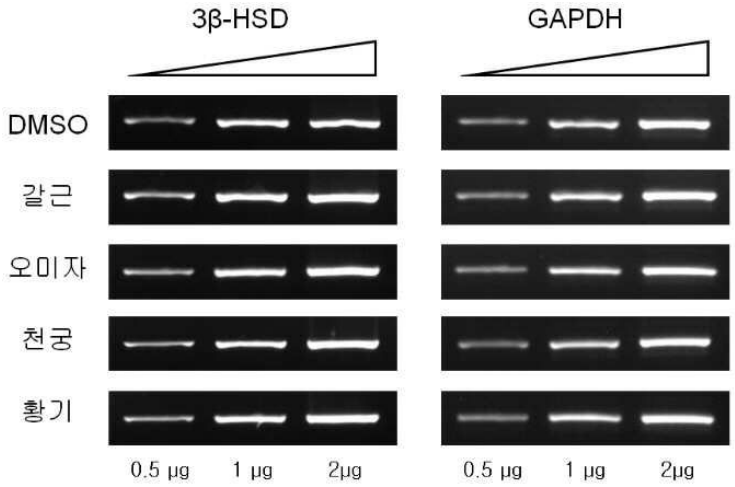
[0044] 그 후 GC mass를 이용한 분석 방법으로 안드로스테논을 측정한 결과, 대조구인 갈근을 첨가하지 않은 배지에 비해서 갈근을 첨가한 실험구 배지가 안드로스테논 수준의 감소가 유의하게 나타나는 것으로 분석되었다. 따라서 갈근 추출물 처리에 의해 안드로스테논의 수준이 감소되는 것으로 나타났다 (도 5).

도면

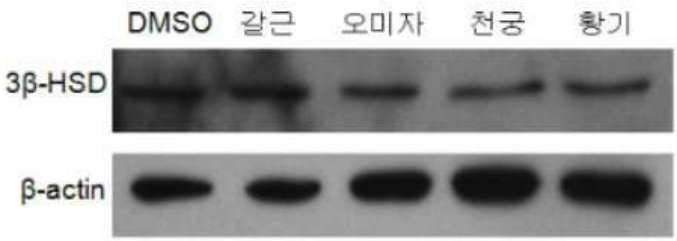
도면1

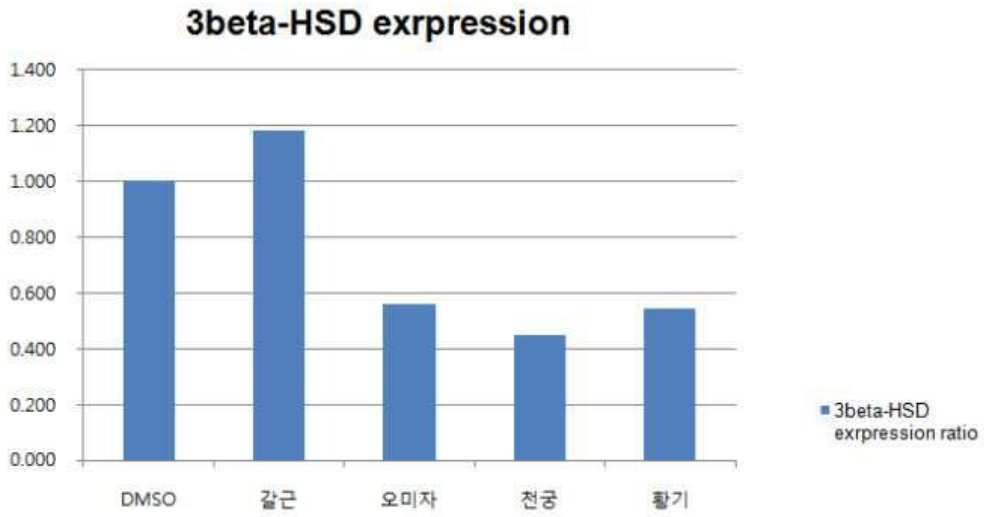


도면2

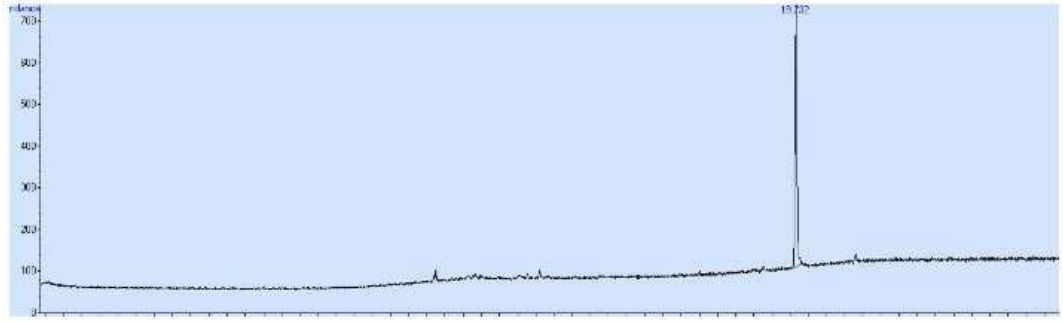

3β-HSD
GAPDH
DMSO
갈근
오미자
천궁
황기
0.5 μg
1 μg
2μg
0.5 μg
1 μg
2μg

도면3

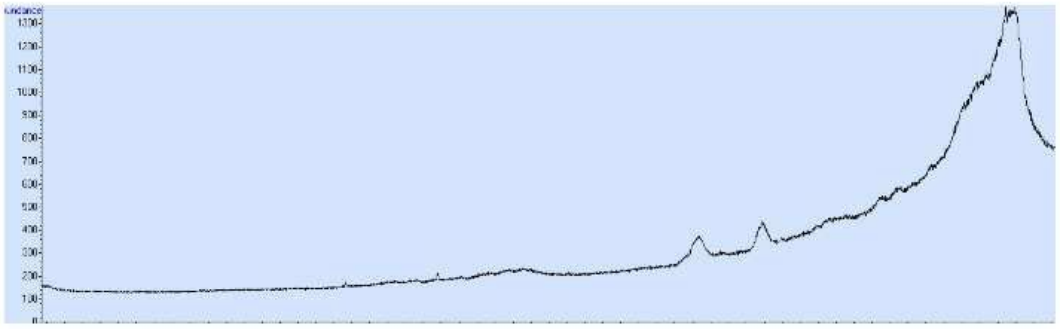

DMSO
갈근
오미자
천궁
황기
3β-HSD
β-actin


3beta-HSD exrpression
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
DMSO
갈근
오미자
천궁
황기
3beta-HSD exrpression ratio

도면4



(가) 실험구



(나) 대조구

도면5

Treatment	DMSO	DMSO + MLTC-1	DMSO + MLTC-1 + 갈근
Androstenone	$0.182^{a} \pm 0.005$	$0.035^{b} \pm 0.005$	$0.012^{c} \pm 0.005$

^{a,b,c} 유의수준 ($P < 0.05$)