



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0007897
(43) 공개일자 2024년01월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/804 (2006.01) A61K 36/076 (2006.01)
A61K 36/21 (2006.01) A61K 36/40 (2006.01)
A61K 36/54 (2006.01) A61K 36/68 (2006.01)
A61K 36/71 (2006.01) A61K 36/884 (2006.01)
A61K 36/8945 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/804 (2013.01)
A61K 36/076 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0196922(분할)
(22) 출원일자 2023년12월29일
심사청구일자 2023년12월29일
(62) 원출원 특허 10-2020-0166572
원출원일자 2020년12월02일
심사청구일자 2020년12월02일
- (71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- (72) 발명자
엄재영
서울특별시 성북구 한천로 713, 505동 1902호 (장위동, 래미안장위퍼스트하이)
- 안광석
서울특별시 성북구 길음로 33, 809동 1802호 (길음동, 길음뉴타운)
- 이준희
서울특별시 양천구 목동동로 130, 1403동 1205호 (신정동, 목동신시가자아파트14단지)
- (74) 대리인
위병갑

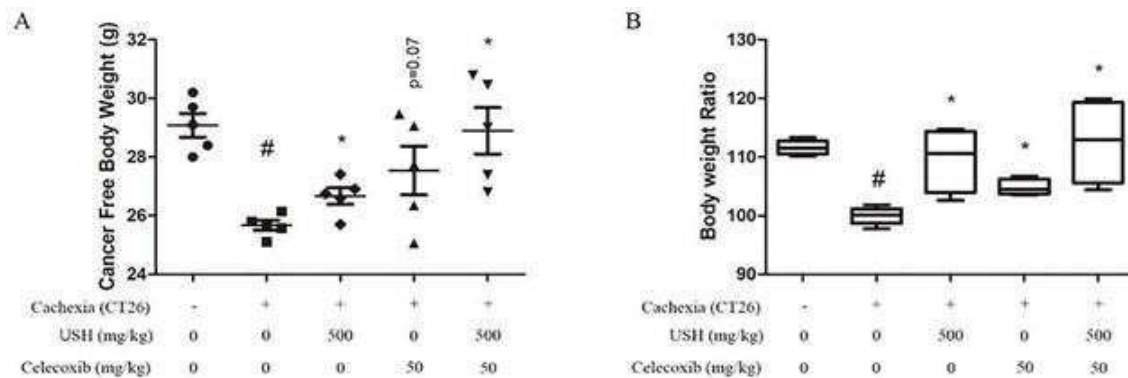
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물을 함유하는 암성 약액질 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 지황(Rehmanniae Radix), 우슬(Achyranthis Radix), 산수유(Corni Fructus), 산약(Dioscoreae Rhizoma), 차전자(Plantaginis Semen), 택사(Alismatis Rhizoma), 복령(Poria Sclerotium), 모란피(Moutan Radicis Cortex) 및 계피(Cinnamomi Cortex) 복합추출물을 함유하는 암성 약액질 또는 근손실 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 복합추출물은 암성 약액질이 유발된 마우스 모델에서 체중 감소 개선 효과를 보였으며, IL6, CRP 및 TNF- α 의 발현을 억제하였고, 근육 조직에서 MURF1 및 MAFbx의 발현 증가를 억제 및 근육 조직의 크기 감소를 억제하는 효과를 나타내므로, 암성 약액질 또는 근손실의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/21 (2013.01)
A61K 36/40 (2013.01)
A61K 36/54 (2013.01)
A61K 36/68 (2013.01)
A61K 36/71 (2013.01)
A61K 36/884 (2013.01)
A61K 36/8945 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105861
과제번호	2017M3A9E4065333
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	차세대바이오사회밀착형지원
연구과제명	암성 악액질에서 근·지방세포 소실 완화를 위한 한방 치료기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

지황(Rehmanniae Radix), 우슬(Achyranthis Radix), 산수유(Corni Fructus), 산약(Dioscoreae Rhizoma), 차전자(Plantaginis Semen), 택사(Alismatis Rhizoma), 복령(Poria Sclerotium), 모란피(Moutan Radicis Cortex) 및 계피(Cinnamomi Cortex) 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 암성 악액질(cancer cachexia) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 식욕 감소, 체중 감소, 피로도 증가, 염증 증가, 근육 손실, 지방 손실 및 조혈 독성으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 증상을 개선하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 시상하부, 혈액 또는 골수에서의 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 염증성 사이토카인은 CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, 및 IL-17로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 근육 내의 MAFbx, MuRF1 및 Bnip3로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 암성 악액질(cancer cachexia) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태의 식품인 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 8

지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 암성 악액질(cancer cachexia) 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 건강식품은 각종 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림, 유제품, 스프, 이온음

료, 음료수, 알코올 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 건강식품 조성물.

청구항 10

제1항의 약학적 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물을 함유하는 암성 악액질의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 악액질(cachexia)은 암, 심부전증, 만성 폐쇄성 폐 질환, 만성 신장 질환, 에이즈 등의 다양한 질병에 의해 지속적인 근육 손실을 일으키는 복잡한 증후군을 가리킨다. 암성 악액질(cancer cachexia)은 악성 종양에서 비롯되는 복합 대사 장애로서, 병리적인 근육 및 지방조직의 손실을 주 증상으로 하며, 암이 발생하고 6개월 내에 근육과 지방의 손실에 의해 체중의 5% 이상 감소하는 것으로 정의된다. 악액질은 다양한 의학적 상태에서 일어날 수 있으나, 암성 악액질은 말기 암과 밀접한 관계를 가지고 있다. 전체 암 환자의 약 50%, 특히 암 말기 환자의 약 80%가 암성 악액질의 영향을 받으며 근육과 지방의 손실로 인한 삶의 저하 및 사망률 증가로 인해 고통받고 있다. 암성 악액질은 근육량 및 지방조직의 현저한 손실에 의한 체중 감소가 특징이며, 식욕 억제를 통한 근육 및 지방 손실과는 다른 특징을 지니고 있다.

[0003] 암성 악액질 진단기준은 체중 감소가 5%이상 감소, 혈청 레벨에서 높은 수준의 염증성 마커 발현 (IL6, CRP1, TNFr), 운동 능력 저하, 식욕 부진 등이 있다. 암성 악액질의 정확한 메커니즘은 밝혀져 있지 않지만, IL-6, TNF- α , CRP1(C-reactive protein 1)과 같은 염증성 사이토카인이 근육 및 지방 감소에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져있다.

[0004] 염증반응에 기인된 골격근 중량 감소 및 근육소모는 유비퀴틴-프로테아좀(ubiquitin-proteasome) 단백질 분해 경로 및 오토파지/리소좀(autophagic/lysosomal) 단백질 분해 경로를 활성화하며 근육의 단백질이 분해된다. 특히 MAFbx/Atrogin-1(muscle atrophy F-Box)와 MuRF1(muscle RING finger-1)등의 유비퀴틴 리가아제(ubiquitin ligases) 증가, 그리고 Bnip3등의 오토파지(autophagy) 연관 유전자의 발현증가가 근육의 단백질분해에 직접 연관이 있다.

[0005] 암성악액질의 치료제에는 NSAIDs(non-steroidal anti-inflammatory drugs), β 2-adrenergic agonists, corticosteroid, ghrelin 등이 있으며, 현재까지 시판되고 있는 암성 악액질 치료에 가장 많이 사용되는 약물은 COX-2 억제제와 TNF- α 억제제가 있다.

[0006] COX-2 억제제는 암 조직에서 다량 발생하는 염증 물질인 프로스타글란딘(prostaglandins)의 생성에 관여하는 COX-2를 억제하여 골격근의 손실을 감소시키는 약물이다. COX-2 억제제로서 시중에는 셀레콕시브(celecoxib)가 판매되고 있다. 그러나 셀레콕시브(celecoxib)는 빈혈, 위궤양, 알레르기, 심장 마비 및 뇌졸중 등의 부작용이 보고되어 있다.

[0007] TNF- α 억제제는 암성 악액질 환자의 혈청에서 많이 발현되는 TNF- α 의 발현을 감소시켜 암세포를 사멸시키는 약물이다. TNF- α 억제제로서 시중에는 탈리도마이드(Thalidomide)가 판매되고 있다. 그러나 이들 약물은 암성 악액질 치료제로서의 효과가 적으며, 우울증, 심부전, 호흡 곤란, 구토, 발진, 고혈압 및 임신 시 기형아를 낳게 되는 부작용이 있다.

[0008] 이와 같이 현재까지 개발 중이거나 시판되고 있는 약물은 대부분 부작용이 많이 나타나며, 치료 효과에 대한 근거가 부족하다. 따라서 새로운 기전의 암성 악액질 치료제 개발이 절실한 상황이다.

[0009] 본 발명자들은 천연물을 이용한 암성 악액질 치료제를 개발하기 위하여 연구한 결과, 지황(Rehmanniae Radix), 우슬(Achyranthis Radix), 산수유(Corni Fructus), 산약(Dioscoreae Rhizoma), 차전자(Plantaginis Semen), 택사(Alismatis Rhizoma), 복령(Poria Sclerotium), 모란피(Moutan Radicis Cortex) 및 계피(Cinnamomi Cortex) 복합추출물이 CT26 세포 주입으로 암성 악액질을 유도한 마우스 모델에서 유의성 있는 암성 악액질 개선 효과가

있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2019-0103985호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 지황(Rehmanniae Radix), 우슬(Achyranthis Radix), 산수유(Corni Fructus), 산약(Dioscoreae Rhizoma), 차전자(Plantaginis Semen), 택사(Alismatis Rhizoma), 복령(Poria Sclerotium), 모란피(Moutan Radicis Cortex) 및 계피(Cinnamomi Cortex) 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 암성 악액질(cancer cachexia) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 암성 악액질(cancer cachexia) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물을 포함하는 암성 악액질(cancer cachexia) 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0016] 본 발명은 지황(Rehmanniae Radix), 우슬(Achyranthis Radix), 산수유(Corni Fructus), 산약(Dioscoreae Rhizoma), 차전자(Plantaginis Semen), 택사(Alismatis Rhizoma), 복령(Poria Sclerotium), 모란피(Moutan Radicis Cortex) 및 계피(Cinnamomi Cortex) 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 암성 악액질(cancer cachexia) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 암성 악액질(cancer cachexia) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물을 포함하는 암성 악액질(cancer cachexia) 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물은 대장암 세포주인 CT26 주입에 의해 암성 악액질이 유발된 마우스 모델에서 유의성 있는 체중 감소 개선 효과를 보였으며, 혈청내에서 암성 악액질의 주요 지표 인자로서 작용하는 IL6, CRP 및 TNF- α 의 발현을 억제하였고, 암성 악액질에 의한 근육 조직에서 근육단백질 분해인자인 MURF1 및 MAFbx의 발현 증가를 감소시키고, 근육 조직의 크기 감소를 억제하는 효과를 나타내므로, 암성 악액질 또는 근손실의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물의 암성 악액질에 의한 체중 감소에 대한 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물의 암성 악액질에 의한 혈청 내 염증성 사이토카인(IL-6, CRP 및 TNF- α) 발현에 대한 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물의 암성 악액질에 의한 근육

조직(앞정강근; TA) 무게 감소에 대한 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물에 의한 암성 악액질 모델의 근육 조직(TA)에서의 조직학적 변화 및 MURF1 변화를 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색(상단) 및 면역조직화학 염색(하단)을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물에 의한 암성 악액질 모델의 근육 조직(TA)에서의 근육 조직 크기(좌측) 및 MURF1 발현량(우측)을 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색 및 면역조직화학 염색을 통해 정량화한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물 처리에 따른 근육 조직(TA)의 MURF1 및 MAFbx 발현을 웨스턴 블랏(western blot)을 통해 확인한 결과 및 이를 정량화한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 악액질(cachexia) 또는 근손실 예방 또는 치료용 약학적 조성물

본 발명은 지황(Rehmanniae Radix), 우슬(Achyranthis Radix), 산수유(Corni Fructus), 산약(Dioscoreae Rhizoma), 차전자(Plantaginis Semen), 택사(Alismatis Rhizoma), 복령(Poria Sclerotium), 모란피(Moutan Radicis Cortex) 및 계피(Cinnamomi Cortex) 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 암성 악액질(cancer cachexia) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 명세서에 사용된 용어, '악액질(cachexia)'은 암, 결핵, 당뇨병, 후천성면역결핍증(Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 등의 말기에서 볼 수 있는 고도의 전신쇠약증세를 말하며, 위암이나 식도암, 췌장암, 대장암 등 소화기암 환자와 폐암 환자에서 자주 나타난다. 식욕 감소, 근육 및 지방 감소에 따른 체중 및 체력의 감소, 빈혈, 무기력, 소화 불량 등의 증상 등을 나타내며, 특히 식욕이 감소하여 정상적인 음식 섭취가 어려운 상태를 보이거나 또는 정상적으로 음식을 섭취하더라도 체중이 감소하는 상태를 나타낸다. 악액질이 발생하면 항암 화학요법이나 방사선 치료에 대해 낮은 반응을 보이므로 환자의 삶의 질이 저하되고, 기대 여명의 단축을 초래하며, 전체 암환자의 10 내지 20%에서 체중 감소로 인한 사망을 유발한다.

본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 악액질은 암에 의해 유발되는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 암에 의해 유발되는 악액질을 '암성 악액질(cancer cachexia)'이라 표현하였다.

본 명세서에서 사용된 용어, '근손실(muscle loss)'은 체내 근육이 감소되는 것을 말하며, 예를 들어, 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 감소, 근육 자체의 병으로 인한 근육 조직의 감소 또는 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근육 조직의 감소일 수 있고, 이와 같은 근손실은 예를 들어, 악액질 또는 근위축증(muscular atrophy)에 의하여 발생하는 것일 수 있다.

본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 근손실은 암 또는 암성 악액질에 의해 유발되는 것일 수 있다.

본원에서 정의되는 암은 백혈병, 림프종, 골수종, 골수이형성증후군, 유방암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암(=결장암), 직장암, 항문암, 간세포간암, 담관암, 담낭암, 췌장암, 폐암(비소세포성 폐암, 소세포성 폐암), 흉선암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁경부암, 육종, 위장관 기질성 종양(GIST, 기스트), 원발 부위불명암, 중피종, 흑색종, 신경내분비 종양, 피부암, 혈액암 등을 포함하는 것일 수 있다.

본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 식욕 감소, 체중 감소, 피로도 증가, 염증 증가, 근육 손실, 지방 손실 및 조혈 독성으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 증상을 개선하는 것일 수 있고, 바람직하게는 체중 감소, 근육 손실 및 지방 손실로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 증상을 개선하는 것일 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 시상하부, 혈액 또는 골수에서의 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키는 것일 수 있다. 이때, 상기 염증성 사이토카인은 CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, 및 IL-17로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

- [0034] 또한, 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 근육 내의 MAFbx, MuRF1 및 Bnip3로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자 발현을 억제시키는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일실시예에 따르면, 지황(*Rehmanniae Radix*), 우슬(*Achyranthis Radix*), 산수유(*Corni Fructus*), 산약(*Dioscoreae Rhizoma*), 차전자(*Plantaginis Semen*), 택사(*Alismatis Rhizoma*), 복령(*Poria Sclerotium*), 모란피(*Moutan Radicis Cortex*) 및 계피(*Cinnamomi Cortex*) 복합추출물이 대장암 세포주인 CT26을 허벅지 부근에 주입하여 유발한 암성 악액질 마우스 모델에서 체중 감소 개선 효과를 보였고, 혈청 내에서 암성 악액질의 주요 지표 인자로서 작용하는 IL6, CRP 및 TNF- α 의 발현을 억제하는 효과를 나타내었으며, 근육 조직에서 근육단백질 분해인자인 MURF1 및 MAFbx의 발현을 감소시키고, 근육 조직의 크기 감소를 억제하는 효과를 나타냄을 확인하였다(실시예 1 내지 6 참조).
- [0037] 본 발명에서 상기 복합추출물은 지황(*Rehmanniae Radix*), 우슬(*Achyranthis Radix*), 산수유(*Corni Fructus*), 산약(*Dioscoreae Rhizoma*), 차전자(*Plantaginis Semen*), 택사(*Alismatis Rhizoma*), 복령(*Poria Sclerotium*), 모란피(*Moutan Radicis Cortex*) 및 계피(*Cinnamomi Cortex*) 6개의 약재로부터 추출한 혼합 추출물을 의미하는 것일 수 있고, 상기 복합추출물은 부자(*Aconiti Lateralis Radix Preparata*)를 추가로 더 혼합한 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 지황(*Rehmanniae Radix*)은, 현삼과(*Scrophulariaceae*)에 속하는 지황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel)의 뿌리인 것일 수 있고, 생지황 또는 숙지황을 포함하는 것일 수 있다. 상기 우슬(*Achyranthis Radix*)은 비름과(*Amaranthaceae*)에 속하는 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai) 또는 우슬(*Achyranthes bidentata* Blume)의 뿌리인 것일 수 있다. 상기 산수유(*Corni Fructus*)는 층층나무과(*Cornaceae*)에 속하는 산수유나무(*Cornus officinalis* Siebold et Zuccarini)의 잘 익은 열매로서 씨를 제거한 것일 수 있다. 상기 산약(*Dioscoreae Rhizoma*)은 마과(*Dioscoreaceae*)에 속하는 마(*Dioscorea batatas* Decaisne) 또는 참마(*Dioscorea japonica* Thunberg)의 주피를 제거한 뿌리줄기(담근제)로서 그대로 또는 찌서 말린 것일 수 있다. 상기 차전자(*Plantaginis Semen*)는 질경이과(*Plantaginaceae*)에 속하는 질경이(*Plantago asiatica* Linne) 또는 털질경이(*Plantago depressa* Willdenow)의 잘 익은 씨일 수 있다. 상기 택사(*Alismatis Rhizoma*)는 택사과(*Alismataceae*) 식물인 질경이택사(*Alisma orientale* Juzepzuk)의 덩이줄기로서 잔뿌리 및 주피를 제거한 것일 수 있다. 상기 복령(*Poria Sclerotium*)은 구멍장이버섯과(*Polyporaceae*)에 속하는 복령(茯苓, *Poria cocos* Wolf)의 균핵인 것일 수 있다. 상기 모란피(*Moutan Radicis Cortex*)는 목단피라고도 불리는 작약과 식물인 목단(*Paeonia suffruticosa* Andrews)의 뿌리껍질인 것일 수 있다. 상기 계피(*Cinnamomi Cortex*)는 육계(肉桂)라고도 불리며, 녹나무과(*Lauraceae*) 식물인 육계(*Cinnamomum cassia* Presl)의 줄기껍질로서 그대로 또는 주피를 약간 제거한 것을 사용하는 것일 수 있다. 상기 부자(附子, *Aconiti Lateralis Radix Preparata*)는 미나리아재비과(*Ranunculaceae*)에 속하는 오두(烏頭, *Aconitum carmichaeli* Debeaux)의 자근(子根)을 가공하여 만든 염부자(鹽附子), 부자편(附子片) 및 포부자(砲附子)인 것일 수 있고, 바람직하게는, 수치(修治)부자말(末)인 것일 수 있다. 상기 수치부자말은 부자의 독성을 감소시키기 위해 부자를 수치해서 분말화 시킨것으로서, 예를 들어, 수부자, 당포부자, 경포부자, 염썬부자, 대구포부자 등을 의미하는 것일 수 있으나 이에 제한되지는 않으며, 부자의 독성을 감소시키기 위해 가공 방법을 거친 부자라면 모두 사용할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 복합 추출물은 상기 약제들을 혼합한 혼합물을 추출하여 제조되는 것일 수 있고, 상기 약제 각각의 추출물을 제조한 다음 추출물들을 혼합하여 제조되는 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피를 0.5~6:1~4:1~4:1~4:1~4:1~4:1~4:1의 중량비로 혼합하여 제조되는 혼합 추출물인 것 수 있으며, 상기 부자를 계피 중량 기준 1~3배 중량의 양으로 더 혼합하여 제조되는 것일 수 있다.
- [0041] 상기 "추출물(extract)"은 추출 대상을 적절한 침출액으로 짜내고 침출액을 증발시켜 농축한 제제를 의미하는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 정제제물 또는 정제물일 수 있다. 상기 복합추출물은 통상의 기술분야에 공지된 일반적인 추출방법, 분리 및 정제방법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 추출방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게 열탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법을 사용할 수 있다.

- [0042] 상기 방법은 추출물을 물, C1 내지 C4 알코올, 또는 이들의 조합으로 분획하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 추출물은 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올, 에틸아세테이트, 헥산 또는 이들의 조합으로 분획될 수 있다.
- [0043] 상기 방법은 추출물을 농축, 분말화, 과립화, 원심분리, 여과, 흡착, 또는 크로마토그래피를 수행하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0044] 예를 들어, 본 발명의 상기 복합추출물은 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피(목단피), 계피(육계) 및 수치부자말의 혼합물 물, C1 내지 C4의 알코올, 에틸아세테이트, 또는 이들의 혼합 용매로 침지하여 추출물을 수득하는 단계; 및 상기 추출물을 분말화 또는 과립화 하는 단계;를 포함하는 방법으로 제조되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이때, 상기 C1 내지 C4의 알코올은 에탄올, 메탄올, 부탄올, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 경구 투여용, 근육내 투여용, 정맥내 투여용, 복강내 투여용, 피하 투여용, 피내 투여용, 또는 국소 투여용으로 제제화되는 것일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 복합추출물은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0048] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 복합추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0049] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 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, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0050] 상기 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 담체, 부형제, 또는 희석제는 예를 들어, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유를 포함할 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 약학적 조성물은 암성 약액질 또는 근손실 예방 또는 치료 활성을 갖는 공지의 유효성분을 더 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.001~100 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.01~35 mg/kg/일이다. 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.07~7000 mg/일이며, 바람직하게는 0.7~2500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.
- [0054] **약액질(cachexia) 또는 근손실 예방 또는 개선용 건강기능식품 및 건강식품 조성물**
- [0055] 또한, 본 발명은 지황(Rehmanniae Radix), 우슬(Achyranthis Radix), 산수유(Corni Fructus), 산약(Dioscoreae Rhizoma), 차전자(Plantaginis Semen), 택사(Alismatis Rhizoma), 복령(Poria Sclerotium), 모란피(Moutan Radicis Cortex) 및 계피(Cinnamomi Cortex) 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 암성 약액질(cancer cachexia) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

- [0057] 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐제, 환제, 액제, 분말 및 과립 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 암성 악액질 치료제 또는 항암제의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0059] 나아가, 본 발명은 지황(*Rehmanniae Radix*), 우슬(*Achyranthis Radix*), 산수유(*Corni Fructus*), 산약(*Dioscoreae Rhizoma*), 차전자(*Plantaginis Semen*), 택사(*Alismatis Rhizoma*), 복령(*Poria Sclerotium*), 모란피(*Moutan Radicis Cortex*) 및 계피(*Cinnamomi Cortex*) 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 암성 악액질(*cancer cachexia*) 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.
- [0061] 본 발명에 따른 상기 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물은 암성 악액질 또는 근손실을 예방 또는 개선시키기 위한 목적으로 상기 복합추출물을 식품, 음료 등의 건강기능식품 또는 건강식품에 첨가할 수 있다.
- [0062] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명에 따른 복합추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품 및 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0063] 본 발명에 따른 상기 건강기능식품 및 건강식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 복합추출물의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 및 건강기능식품 중의 상기 복합추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강유지를 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.
- [0064] 본 발명의 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명에 따른 복합추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능성 식품 조성물 100 g당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0065] 상기 외에 본 발명에 따른 복합추출물을 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0066] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 이에 제한되지는 않으나, 본 발명의 유효물질을 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0068] **항암 보조제 조성물**

- [0069] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물을 제공한다.
- [0070] 본 발명에서 사용되는 용어 "항암보조제"는 항암 치료 효과를 증대시키고, 항암제의 부작용을 억제하거나 개선시키기 위하여 사용될 수 있으며, 항암제와 병용하여 환자에게 투여될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 상기 항암 보조제 조성물은, 암에 의해 유발되는 근 손실, 체중 감소, 지방 감소, 조혈 도성, 식욕 감소 등의 악액질 증상을 억제하거나 개선시키는 효과를 나타내어 항암제의 항암효과를 증대시키는 것일 수 있다.
- [0072] 본원에서 정의되는 기존 항암제는 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 메토틱렉세이트(methotrexate), 5-플루오로우라실(flourouracil), 독소루비신(Doxorubicin), 무스틴(Mustine), 비크리스틴(vincristine), 프로카바진(procarbazine), 프레드니솔론(prednisolone), 블레오마이신(bleomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 다카르바진(dacarbazine), 에토포시드(etoposide), 시스플라틴(cisplatin), 에피루비신(Epirubicin), 시스플라틴(cisplatin), 카페시타빈(capecitabine), 옥살리플라틴(oxaliplatin) 등을 포함하는 것일 수 있다.
- [0073] 상기 항암 보조제 조성물은 유효성분으로 복합추출물을 포함하는 이외에 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 추가로 1종 이상 포함할 수 있다. 상기 항암 보조제는 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 비경구 투여 시 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사, 자궁 내 경막주사, 뇌혈관 내 주사 또는 흉부 내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0074] 상기 항암 보조제는 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다. 상기 항암 보조제의 일일 투여량은 약 0.0001 내지 1000 mg/kg이고, 바람직하게는 1 내지 100 mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하나 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여 방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 항암 보조제는 실제 임상 투여 시에 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0076] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0078] <실시예 1> 암성 악액질 유발 마우스 모델의 준비
- [0079] 암성 악액질을 유발하기 위해 BALB/c 마우스를 3군(각 군당 7마리)으로 나누어 그 중 2군은 CT26 대장암 세포주를 5×10^5 cell을 PBS와 matrigel을 1:1로 혼합하여 총 부피 200 μ l을 오른쪽 허벅지 부근에 피하주사로 주입하여 암성 악액질을 유발하였다(Cachexia "+"). 정상대조군에는 아무것도 주입하지 않았다(Cachexia "-").
- [0080] 1주간의 암성 악액질 유발 이후 (가) 추가적인 4주간 PBS를 주입한 정상대조군, (나) 추가적인 4주간 PBS를 주입한 질병대조군 (다) 추가적인 4주간 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물(USH, 0.5g/kg/day)을 주입한 실험군, (라) 추가적인 4주간 셀레코시브(celecoxib, 0.05g/kg/day)을 주입한 실험군 및 (마) 추가적인 4주간 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물(USH, 0.5g/kg/day) 및 셀레코시브(celecoxib, 0.05g/kg/day)를 함께 주입한 실험군으로 처치를 달리하여 실험을 진행하였다. 이때 지황, 우슬, 산수유, 산약, 차전자, 택사, 복령, 모란피 및 계피 복합추출물은 쓰무라(Tsumura, Japan; 카탈로그 넘버: 005301-002)에서 구입하여 사용하였다.
- [0082] <실시예 2> 복합추출물의 암성 악액질에 의한 체중 감소 개선 효과
- [0083] 암성 악액질의 유발 및 복합추출물의 개선 효과를 확인하기 위해 상기 실시예 1과 같은 방법으로 총 5주간의 처치 후 마우스들의 체중을 측정하였다. 이때 암조직에 따른 체중의 차이를 보정하기 위해 전체 쥐의 체중(body

weight)에서 암조직의 무게를 제외한 체중(cancer free body weight)을 비교하였다. 또한, 체중의 감소율을 나타내기 위해 체중 변화값에 대한 비율값(body weight ratio)을 계산하였다.

[0084] 암성 악액질에 의한 체중 감소 억제에 대한 복합추출물의 효과를 실험한 결과는 도 1에 나타난 바와 같다.

[0085] 그 결과, CT 26 대장암 세포주를 주입한 질병 대조군에서 암조직을 제외한 체중(도 1A, cancer free body weight)이 정상 대조군 대비 현저하게 감소되어, 암성 악액질이 유발된 것을 확인하였으며, 복합추출물 처리시 상기 암성 악액질에 의한 체중 감소에 대한 개선 효과를 나타냄을 확인하였다. 또한, 복합추출물을 처리한 실험군에서는 질병대조군에 비해 체중 감소율이 유의적으로 개선되었다(도 1B). 체중의 무게와 체중 감소 변화에 따른 비율값 모두에 대한 개선 효과를 보임에 따라, 복합추출물은 질병대조군(CC)에 비해 암성 악액질에 의해 유발된 체중 감소를 현저히 억제함을 확인하였다.

[0087] <실시예 3> 복합추출물의 암성 악액질 지표 인자에 대한 발현 개선 효과

[0088] 암성 악액질에서 중요한 지표인자로 사용되는 혈청 내 염증성 사이토카인 인터루킨 6(interleukin-6, IL-6), 종양괴사인자 알파(tumor necrosis factor alpha, TNF α), C 반응성 단백 1(C-reactive protein 1, CRP1)의 수준을 측정하였다.

[0089] 상기 실시예 1과 같은 방법으로 총 5주간의 처치 후 마우스들의 혈액을 채취하여 4000 RPM, 4℃, 20분 동안 원심분리기를 이용하여 혈청(serum)을 분리해낸 뒤 IL-6, CRP1, TNF α 가 코팅된 Plate에 혈청을 넣고 반응시킨 뒤 2차 항체를 붙여 반응 시킨 후 그 발현량에 따른 색의 차이를 ELISER 분석기(VERSAmix microplate reader, Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0090] 암성 악액질이 발생하는 과정에서 일어나는 염증성 사이토카인의 변화에 대한 복합추출물의 효과를 실험한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0091] 그 결과, 복합추출물은 혈청 내 IL-6, TNF α 및 CRP1에 대해 모두 암성 악액질로 유발되는 염증성 사이토카인의 발현 증가를 감소시키는 효과를 보임을 확인하였다. 특히, 암성 악액질 치료제로 사용되는 celecosib보다 복합추출물이 더 높은 감소율을 보였다.

[0093] <실시예 4> 복합추출물의 암성 악액질에 의한 근육조직 감소 억제 효과

[0094] 암성 악액질의 유발 및 복합추출물의 개선 효과를 확인하기 위해 암성 악액질에서 중요한 지표로 사용되는 근육의 무게를 측정하였다. 상기 실시예 1과 같은 방법으로 총 5주간의 처치 후 마우스들의 앞정강근(tibialis anterior, TA) 근육조직의 무게를 측정하였다.

[0095] 근육조직의 감소 억제에 대한 복합추출물의 효과를 실험한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0096] 그 결과, 복합추출물은 근육 조직인 앞정강근(TA)의 암성 악액질에 의한 감소를 유의미하게 억제하였다.

[0098] <실시예 5> 복합추출물의 암성 악액질 모델의 근육 조직에서 조직학적 변화에 대한 개선효과

[0099] 암성악액질이 발병하는 과정에서 일어나는 조직학적 변화에 대한 복합추출물의 효과를 확인하기 위하여, 헤마톡실린(hematoxylin)&에오신(eosin) 염색(H&E 염색) 및 면역조직화학(immunohistochemistry) 염색을 실시하였다.

[0100] H&E 염색은 먼저, 색이 없는 조직을 표본으로 만든 뒤, 광학현미경으로 관찰하기 위해 염색을 하는데, 산성 또는 염기성 화합물인 염료는 조직의 이온기와 정전기적 결합(electrostatic or salt linkage)을 이루므로, 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)을 이용하여 염색한다. 헤마톡실린은 세포의 핵, 기타 산성구조(세포질에 있는 RNA가 풍부한 구조와 연결기질)등의 산성과 만나서 청색으로 염색하고, 에오신은 염기성과 만나서 다른 세포질 성분과 아교질(collagen)을 붉은색으로 염색한다. 염색순서는 헤마톡실린으로 염색한 다음, 알콜로 씻고 다음 에오신으로 염색하고 마지막으로 자일렌으로 처리하였다. H&E 염색을 통해 상기 암성 악액질이 유도된 마우스 앞정강근 근육 조직의 조직학적 변화를 확인한 결과 및 이를 정량화한 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0101] 다음으로 면역조직화학 염색을 위해, 상기 실시예 1과 같은 방법으로 총 5주간의 처치 후 마우스들의 근육 조직(TA) 표본은 포르말린(formalin) 고정 후 파라핀(paraffin) 조직을 5 μ m 두께로 섹션하여 제조되었다. 분석을

위해 마우스 당 5개의 슬라이드를 준비 하였다. 상기 표본 섹션을 자일렌(xylene)으로 paraffin을 제거하고 일련의 알코올로 함수시켰다. 0.1 % 트립신(trypsin) 작업 용액(trypsin 0.4ml, calcium 0.01g 및 chloride 0.01g D.W. 7ml로 구성)을 15분 동안 처리 한 후, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 사용하여 절편을 block하였다. 면역조직화학(IHC) 분석을 위해, 섹션을 MURF1의 1차 항체의 1:50 희석과 함께 4℃에서 o/n(overnight) 배양 한 다음, 실온에서 DAB (3,3' -Diaminobenzidine) 염색을 10 분 동안 진행하였다. 그 후, 섹션은 일상적인 방법으로 탈수 및 장착되었다. 각 그룹에 대해 5개의 슬라이드를 무작위로 선택하여 분석하였다. 슬라이드는 Olympus IX71 Research Inverted Phase 현미경(Olympus Co., Tokyo, Japan)을 사용하여 검사하였고, 밀도는 ImageJ 1.47v 소프트웨어(National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)로 측정 하였다. 근육단백질을 분해하는 인자인 MURF1의 변화를 면역조직화학 염색을 통해 확인한 결과 및 MURF1의 발현량을 정량화한 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0102] 그 결과, 양성 악액질이 유도된 질병대조군에서 근육 조직 내 근관의 크기가 감소하였으며, 복합추출물 투여시 이러한 근육이 소실되는 병리적인 감소가 억제되어 근육 및 근관 면적 크기를 증가시키는 효과가 있음을 확인하였다(도 4 상단 및 도 5 좌측 그래프). 또한, 근육 분해 효소인 MURF1의 변화를 확인한 결과, 양성 악액질이 유도되었을때 크게 증가하였으나, 복합추출물을 처리하였을 경우 MURF1 발현 증가가 유의하게 감소되는 것을 확인하였다(도 4 하단 및 도 5 우측 그래프).

[0104] <실시예 6> 복합추출물의 양성 악액질에 의한 근육 내 단백질 분해 관련 인자 발현 변화에 대한 개선효과

[0105] 양성 악액질이 유도된 마우스 앞정강근에서 근육 내 단백질 분해의 핵심적 인자인 MAFbx 및 MURF1의 발현 변화를 확인하기 위하여, 웨스턴 블랏(western blot) 분석을 수행하였다.

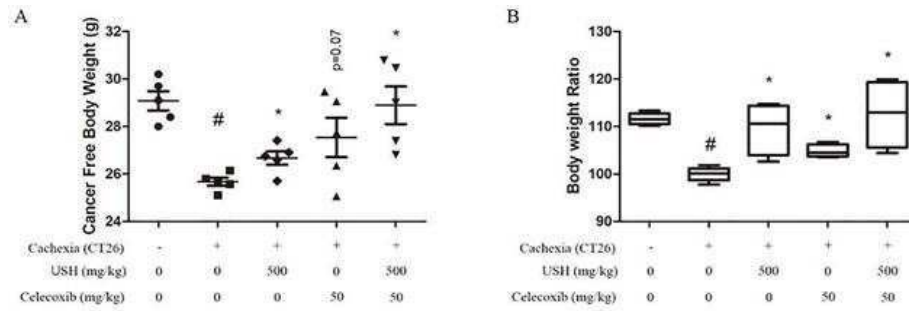
[0106] 상기 실시예 1과 같은 방법으로 총 5주간의 처치 후 마우스들의 근육 조직(TA)을 RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 0.1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride]로 용해시킨 후 8% SDS-polyacrylamide gel 전기 영동한 다음 nitrocellulose membrane에 transfer 하였다. 5% skim milk로 blocking한 후 여러 가지 1차 항체 및 horseradish peroxidase (Jackson Lab.) 가 부착된 2차 항체로 반응시키고 ECL 용액(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)을 사용하여 목적 단백질을 확인하였다. 웨스턴 블랏을 통해 목적 단백질인 MAFbx 및 MURF1의 발현 변화를 확인한 결과 및 상대적 단백질 발현량을 정량화 한 결과를 도 6에 나타내었다.

[0107] 그 결과, 양성 악액질이 유도된 마우스의 앞정강근 조직에서 MAFbx 및 MURF1의 단백질 발현이 증가하였으며, 복합추출물 투여시 상기 두 인자의 발현의 모두 유의미하게 감소되었다. 따라서 본 발명의 복합추출물은 암에 의해 유발된 근육 조직 내 단백질 분해를 억제함으로써 양성 악액질을 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

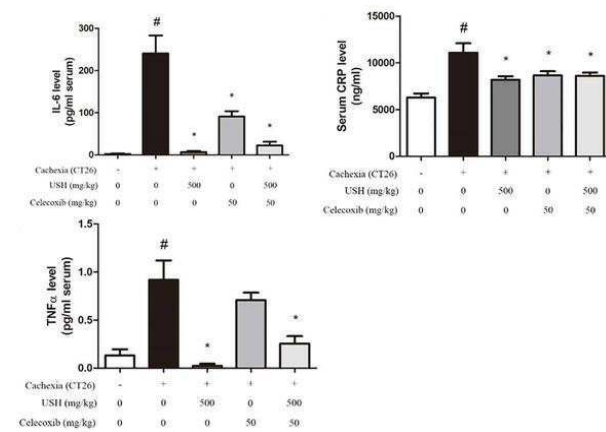
[0109] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

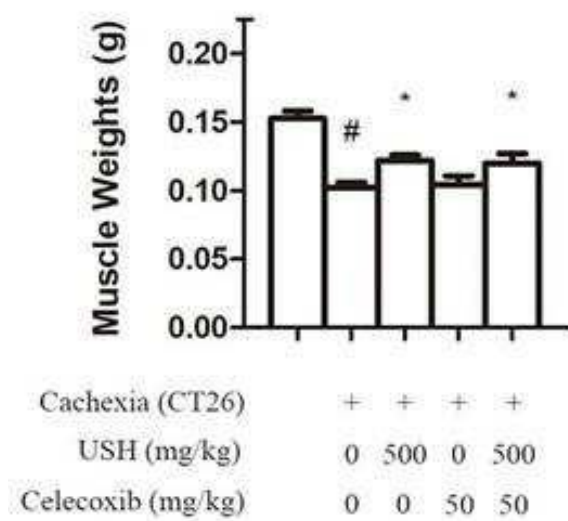
도면1



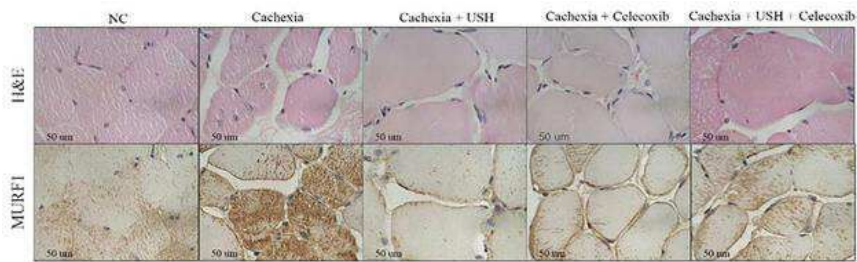
도면2



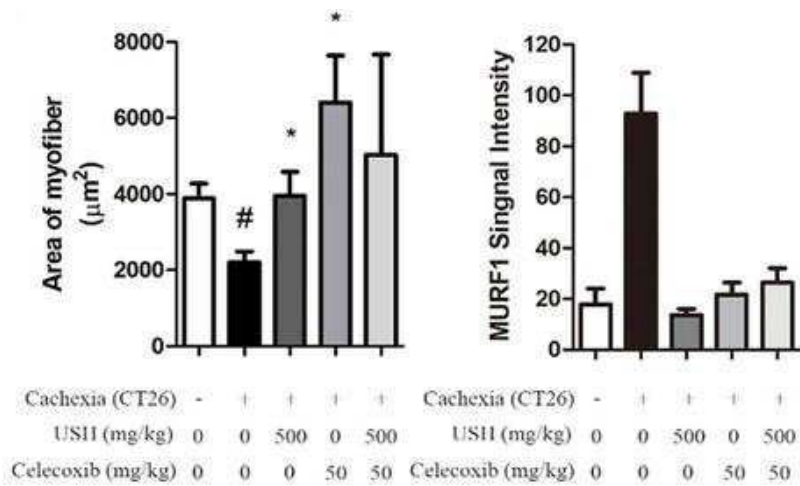
도면3



도면4



도면5



도면6

