(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0151410
(43) 공개일자 2021년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/25 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 36/40 (2006.01) *A61K 36/804* (2006.01)
A61K 36/815 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/25 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0068193
(22) 출원일자 2020년06월05일
심사청구일자 2020년06월05일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
양선아
경상북도 칠곡군 왜관읍 아곡5길 79
박세호
대구광역시 달서구 장산남로 33, 103동 1003호(용산동, 용산롯데캐슬그랜드)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

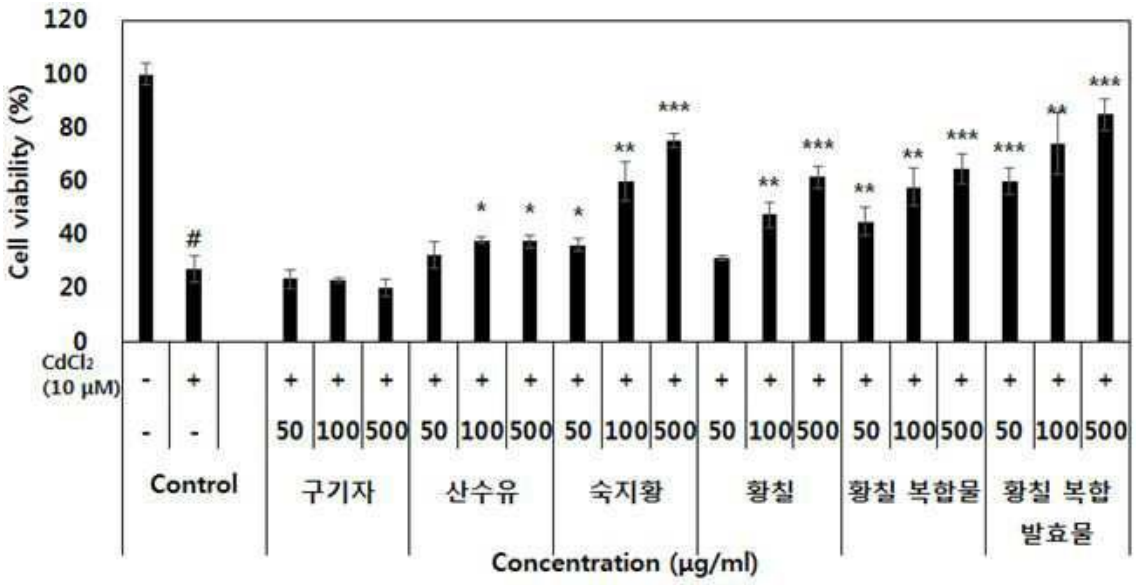
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **황칠 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 황칠 추출물, 황칠 복합 추출물 또는 황칠 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 황칠 추출물, 황칠 복합물 또는 황칠 복합 발효물을 선처리한 LLC-PK1 신장세포에 카드뮴을 처리하여 독성을 유도한 결과, 처리되지 않은 신장 세포에 비해 세포독성과 세포 내 활성산소 발생이 감소되는 것을 확인함에 따라, 상기 황칠 추출물, 황칠 복합물 또는 황칠 복합 발효물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 카드뮴에 의한 신장 손상 완화 가능성을 나타내어 중금속에 의한 신장 손상 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강식품으로 제공될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 36/40 (2013.01)
A61K 36/804 (2013.01)
A61K 36/815 (2013.01)
A61P 13/12 (2018.01)
A61P 39/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자
이재열
대구광역시 남구 자유5길 72(대명동)
정종강
대구광역시 수성구 청호로85길 42, 태형주택 가동 201호
강하린
대구광역시 달서구 용산로 174, 103동 1703호(용산동, 용산우방타운)
김현지
경상북도 경산시 진량읍 영청길 22, 101동 1210호(경산선화청구타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019DG055010115
과제번호	20190605
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	산학공동기술개발과제
연구과제명	간, 신장 기능 개선을 위한 황칠 복합발효물의 중금속 해독 효능평가 및 상품화
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교
연구기간	2019.10.01 ~ 2020.01.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

황칠 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 황칠 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 중금속은 카드뮴인 것을 특징으로 하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

황칠 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 개선용 건강식품.

청구항 5

황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 복합 추출물은 황칠 추출물, 구기자 추출물, 산수유 추출물 및 숙지황 추출물을 1:1:1:2의 중량비로 혼합한 복합 추출물인 것을 특징으로 하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 복합 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 중금속은 카드뮴인 것을 특징으로 하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 개선용 건강식품.

청구항 10

황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 복합 발효 추출물은 황칠, 구기자, 산수유 및 숙지황을 혼합하여, 30 내지 50℃에서 10 내지 20시간 동안 발효시킨 후, 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 복합 발효 추출물은 황칠 추출물, 구기자 추출물, 산수유 추출물 및 숙지황 추출물을 1:1:1:2의 중량비로 혼합하여 발효시킨 복합 발효 추출물인 것을 특징으로 하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 상기 중금속은 카드뮴인 것을 특징으로 하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 14

황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 개선용 건강식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 황칠 추출물, 황칠 복합 추출물 또는 황칠 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 카드뮴(Cadmium, Cd)은 1급 발암물질이자 독성이 큰 금속으로 인체에 아주 유해하며 호흡 곤란이나 간 기능 장애 등의 증상을 일으킨다. 4대 공해병 중 하나인 '이타이이타이병(itai-itai disease)'을 일으킨 원인으로, 인체에 필요한 아연과 성질이 비슷하기 때문에 체내에 섭취되어 신장 장애를 일으키거나 칼슘 흡수를방해하여 골연화증을 일으킨다. 주기율표상의 같은 족에 있는 아연(Zn)이 생체 내 여러 과정에서 중요한 역할을 하는 필수 미량 원소인 것과는 대조적으로, 카드뮴은아주 독성이 강하고 생체 내에 축적되어 여러 중독 증상을 일으킨다.

[0003] 카드뮴은 일부 식품(예로, 어패류, 동물의 신장이나 간 등)이나 오염된 물을통해 인체 내로 들어오고, 간과 신장(콩팥)에 축적되어 이들 기관의 손상을 초래한다. 특히 신장 손상은 인체 기능에 필수적인 여러 단백질과 당을 체외로 배출시켜여러 질병을 일으키는 원인이 된다. 카드뮴 중독은 설사, 복통, 심한 구토를 수반하고, 생식기능의 저해와 불임, 간장 및 신장 장애, 중추 신경계와 면역계의 손상, 정신 질환, 고혈압, 암 발병 등을 초래할 수 있다. 미량으로도 장기간 섭취하면 중독 증상이 나타날 수 있다.

[0004] 황칠나무(Dendropanax morbifera Lev.)는 두릅나무과 나무로, 만병통치 나무라는 뜻의 학명 덴드로파낙스(Dendropanax)를 가지고 있을 정도로 그 약리학적 효능이 매우 뛰어난 약용식물이다. 세계에서 한국 남부해안지역과 일본의 난대, 아열대 및 타이완에 분포하고 있다. 황칠나무의 수피에서 채취되는 수액인 황칠은 안식향을 함유하여 과거에는 천연도료로 쓰였지만, 최근의 연구 결과에 따르면 황칠나무 추출물은 피부 미백 활성, 항암 활성, 항염증 활성, 항산화 활성, 진해 활성, 경조직 재생 촉진 효과, 고혈압, 중풍, 치매예방 등에 효과적인 것으로 밝혀졌으나, 중금속에 의한 황칠 추출물의 신장 보호 효과에 대해서는 아직 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2019-0120880호 (2019.10.08. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 황칠 추출물, 황칠 복합 추출물 또는 황칠 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 보호용 조성물을 제공하는 데에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 황칠 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명은 황칠 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[0009] 본 발명은 황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[0011] 본 발명은 황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 황칠 추출물, 황칠 복합물 또는 황칠 복합 발효물을 선처리한 LLC-PK1 신장세포에 카드뮴을 처리하여 독성을 유도한 결과, 황칠 추출물, 황칠 복합물 또는 황칠 복합 발효물이 처리되지 않은 신장 세포에 비해 세포독성과 세포 내 활성산소 발생이 감소되는 것을 확인함에 따라, 상기 황칠 추출물, 황칠 복합물 또는 황칠 복합 발효물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 카드뮴에 의한 신장 손상 완화 가능성을 나타내어 중금속에 의한 신장 손상 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강식품으로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 LLC-PK1 세포에 대한 구기자 추출물, 산수유 추출물, 숙지황 추출물, 황칠 추출물, 황칠 복합 추출물 및 황칠 복합 발효 추출물을 50, 100 및 500 ㎍/㎖농도로 처리하여 세포독성을 확인한 결과이다.

도 2는 카드뮴 처리된 LLC-PK1 세포에 대한 구기자 추출물, 산수유 추출물, 숙지황 추출물, 황칠 추출물, 황칠 복합 추출물 및 황칠 복합 발효 추출물을 50, 100 및 500 ㎍/㎖농도로 처리하여 신장세포 보호 효과를 확인한 결과이다.

도 3은 카드뮴 처리되어 상화적 손상이 유도된 LLC-PK1 세포에 대한 구기자 추출물, 산수유 추출물, 숙지황 추출물, 황칠 추출물, 황칠 복합 추출물 및 황칠 복합 발효 추출물을 100 및 500 ㎍/㎖농도로 처리하여 활성 산소 억제 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0017] 본 발명은 황칠 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0018] 상기 황칠 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 열수 추출물 또는 95% 에탄올을 사용하여 추출할 수 있다.

[0019] 상기 중금속은 카드뮴인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명은 황칠 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0021] 본 발명은 황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0022] 보다 바람직하게는 상기 복합 추출물은 황칠 추출물, 구기자 추출물, 산수유 추출물 및 숙지황 추출물을 1:1:1:2의 중량비로 혼합한 복합 추출물인 것일 수 있다.

[0023] 상기 복합 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 열수 추출물 또는 95% 에탄올을 사용하여 추출할 수 있다.

[0024] 상기 중금속은 카드뮴인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명은 황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0026] 본 발명은 황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0027] 보다 바람직하게는 상기 복합 발효 추출물은 황칠, 구기자, 산수유 및 숙지황을 혼합하여, 30 내지 50℃에서 10 내지 20시간 동안 발효시킨 후, 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 열수 추출물 또는 95% 에탄올을 사용하여 상기 복합 발효 추출물을 추출할 수 있다.

[0028] 상기 복합 발효 추출물은 황칠 추출물, 구기자 추출물, 산수유 추출물 및 숙지황 추출물을 1:1:1:2의 중량비로 혼합하여 발효시킨 복합 발효 추출물인 것일 수 있다.

[0029] 상기 중금속은 카드뮴인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 또한, 본 발명은 황칠 추출물, 숙지황 추출물, 구기자 추출물 및 산수유 추출물로 이루어진 군에서 둘 이상 선택된 복합 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속에 의한 신장 손상 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0032] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0033] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0034] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0036] 상기 황칠 추출물, 복합 추출물 또는 복합 발효 추출물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있

고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 건강식품은 상기 황칠 추출물, 복합 추출물 또는 복합 발효 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0040] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0041] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0045] **<실시예 1> 추출물 및 복합물, 발효물 제조**

[0046] 1) 황칠 추출물 제조

[0047] 황칠을 정량한 뒤, 증류수를 6배 가수하여, 80℃에서 6시간동안 열수 추출하였다. 추출액을 여과하여 고형물을 제거하고 농축기를 이용하여 농축한 뒤, 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

[0049] 2) 황칠 복합물 제조

[0050] 황칠, 구기자, 산수유, 숙지황을 1:1:1:2 비율로 혼합하여, 증류수를 6배의 가수하여, 105℃에서 6시간동안 열수 추출하였다. 추출액을 여과하여 고형물을 제거하고 농축기를 이용하여 농축한 뒤, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

[0052] 3) 황칠 복합 발효물 제조

[0053] 황칠, 구기자, 산수유, 숙지황을 1:1:1:2 비율로 혼합하여, 증류수를 6배의 가수 한 뒤, 효모(Saccharomyces cereviae), 젖산균(Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei), 광합성 세균(Rhodopseudomonas palustris, Rhodobacter sphaeroides), 사상균(Aspergillus oryzae, Mucor hiemalis) 등이 혼합된 유용미생물(effective microorganisms, EM)을 첨가하여 39℃에서 15시간 동안 발효한 후 105℃에서 6시간동안 열수 추출 및 미생물을 멸균하고 추출액을 여과하여 고형물을 제거하였다. 농축기를 이용하여 농축한 뒤, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

[0055] 4) 구기자, 산수유, 숙지황 추출물 제조

[0056] 구기자, 산수유, 숙지황을 정량하여 95% 에틸 알코올(ethyl alcohol)을 10배 가수하여, 상온에서 6시간동안 추출하였다. 추출액을 여과하여 고형물을 제거하고 농축기를 이용하여 농축한 뒤, 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

[0058] **<실시예 2> LLC-PK1 세포에 대한 추출물 및 복합물, 발효물의 세포독성 확인**

[0059] LLC-PK1 세포에 대한 시료의 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 수행하였다. LLC-PK1 cell을 24-웰 플레이트에 2 × 10^5 cell/well이 되게 분주하여 5% CO_2 배양기에서 20~24시간 동안 배양한 후, 각 추출물의 농도별로 처리 후 5% CO_2 배양기에서 20~24시간 동안 배양하였다. PBS에 녹인 MTT (5 mg/ml) 용액 50 μl를 각 웰(well)에 넣고 배양기에서 4시간 동안 반응시켰다. 그 후 상등액을 제거하고, 각 웰에 200 μl의 DMSO를 첨가하여 생성된 포르마잔 결정체(formazan crystal)를 용해시켜 550 nm 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 측정된 포르마잔 생성정도를 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

[0060] 그 결과, 도 1과 같이 LLC-PK1 cell에 대한 구기자, 산수유, 숙지황, 황칠 추출물 및 황칠 복합물, 황칠 복합 발효물의 세포독성은 모든 농도에서 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0062] **<실시예 3> LLC-PK1 세포에서 카드뮴에 대한 추출물 및 복합물, 발효물의 신장 보호효과 확인**

[0063] 카드뮴이 처리된 LLC-PK1 세포에 대한 시료의 세포 보호능을 측정하기 위해 MTT assay를 수행하였다. LLC-PK1 세포을 24-웰 플레이트에 2×10^5 cell/well이 되게 분주하여 5% CO_2 배양기에서 20~24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 농도별로 처리하여 5% CO_2 배양기에서 20~24시간 동안 예비 배양하였다.

[0064] $CdCl_2$의 최종농도가 10 μM이 되도록 처리 후 24시간동안 반응시키고, PBS에 녹인 MTT (5 mg/ml) 용액 50 μl를 각 웰에 넣고 배양기에서 4시간 동안 반응시켰다. 그 후 상등액을 제거하고, 각 웰에 200 μl의 DMSO를 첨가하여 생성된 포르마잔 결정체를 용해시켜 550 nm 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 확인된 포르마잔 생성정도를 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

[0065] 그 결과, 도 2와 같이 카드뮴이 처리된 LLC-PK1 세포는 처리되지 않은 LLC-PK1 세포에 비해 27.38%의 세포 생존율을 보인 반면, 구기자 추출물에서는 유의적인 세포 보호 효과를 보이지 않았다. 다만, 산수유 추출물에서는 100 μg/ml의 처리 농도부터 약한 세포 보호 효과를 나타내었다. 숙지황 추출물의 경우 농도 의존적으로 세포 보호 효과가 나타났으며(100 μg/ml의 처리 농도에서 60.02%의 세포 생존율), 황칠 추출물의 경우 100 μg/ml의 47.51%, 500 μg/ml의 농도에서 61.63%의 세포생존율이 나타나 보호효과를 확인할 수 있었다. 황칠 복합물의 경우 100 μg/ml에서 57.74%, 500 μg/ml에서는 64.63%의 세포생존율을 확인하였다. 또한, 황칠 복합 발효물에서는 100 μg/ml 농도에서 74.24%, 500 μg/ml에서 84.86%로 세포생존율을 나타내어 카드뮴에 대한 세포 보효효과가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0067] **<실시예 4> LLC-PK1 세포에서 카드뮴에 대한 추출물 및 복합물, 발효물의 활성산소 억제 확인**

[0068] 카드뮴을 처리하여 산화적 손상이 유도된 LLC-PK1 cell에서 구기자, 산수유, 숙지황, 황칠 추출물 및 황칠 복합물, 황칠 복합 발효물의 세포내 활성 산소 억제 효과를 확인하였다.

[0069] 카드뮴이 처리된 LLC-PK1 세포에 대한 시료의 세포 보호능을 측정하기 위해 MTT assay를 수행하였다. LLC-PK1 세포를 24-웰 플레이트에 2×10^5 cell/well이 되게 분주하여 5% CO_2 배양기에서 20~24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 농도별로 처리하고 5% CO_2 배양기에서 20~24시간 동안 예비 배양하였다. $CdCl_2$의 최종농도가 10 μM이 되도록 처리한 후 24시간 동안 반응시키고, PBS로 세척한 후 DCF-DA (5 μM)과 DAPI (10 μM)로 염색하였다. 20분 반응 이후, 세포 내 활성 산소를 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0070] 그 결과, 도 3과 같이 카드뮴이 처리되지 세포에서는 활성 산소가 관찰되지 않았으나, 카드뮴이 처리되면 활성 산소의 과생성이 확인되으며, 구기자와 산수유 추출물을 처리된 세포군에서는 카드뮴에 의해 과생성된 활성 산소가 억제되지 않았다.

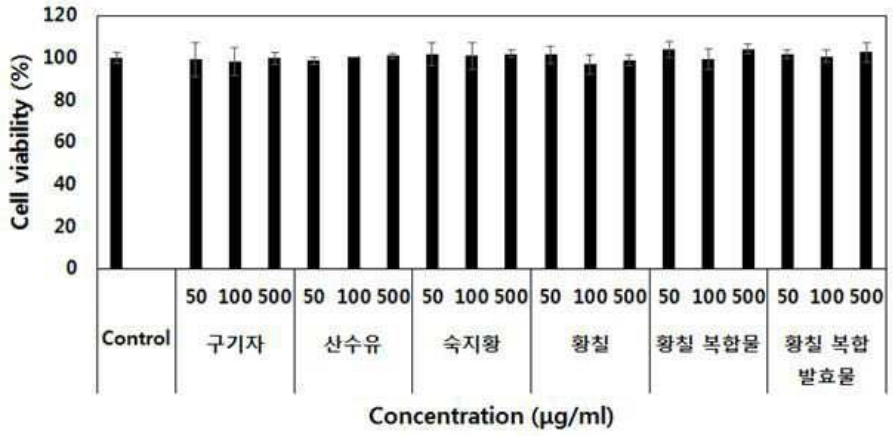
[0071] 반면, 숙지황과 황칠 추출물, 황칠 복합추출물 또는 황칠 복합 발효물이 처리된 세포에서는 100 μg/ml의 농도에서부터 효과적으로 세포 내 활성 산소가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0072] 상기 결과로부터 숙지황, 황칠 추출물이 카드뮴에 의한 산화적 손상에 대한 신장 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었으며, 특히 황칠 복합 발효물의 경우 황칠 복합 추출물과 비교하면 상대적으로 신장 세포의 보호 효과가 우수하게 나타나는 것이 확인됨에 따라, 발효에 의한 시너지 효과가 입증되었다.

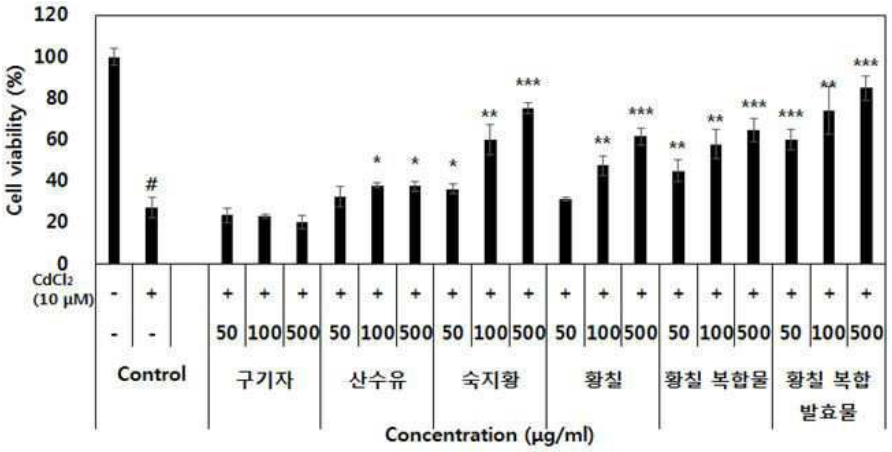
[0074] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

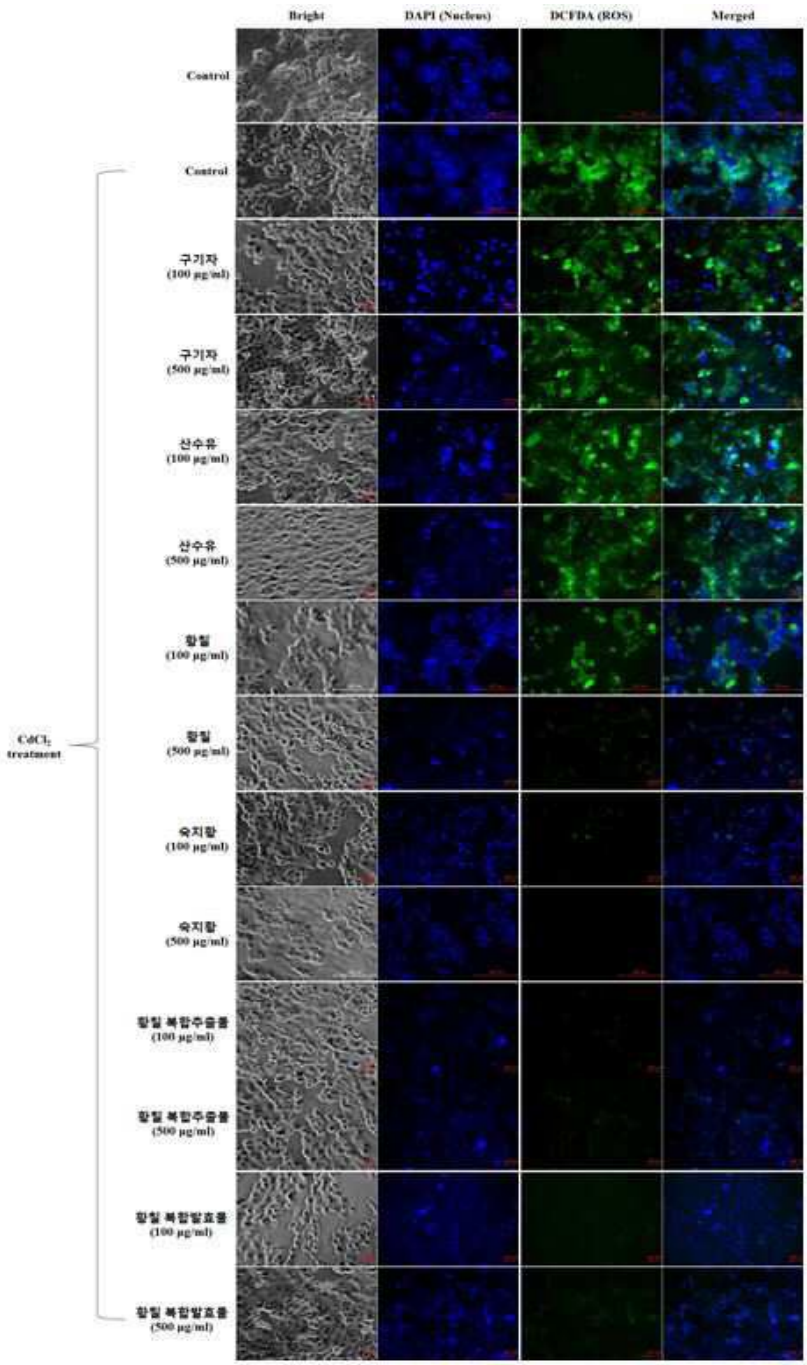
도면1



도면2



도면3


Bright
DAPI (Nucleus)
DCFDA (ROS)
Merged
Control
Control
구기자 (100 μg/ml)
구기자 (500 μg/ml)
산수유 (100 μg/ml)
산수유 (500 μg/ml)
황칠 (100 μg/ml)
황칠 (500 μg/ml)
숙지황 (100 μg/ml)
숙지황 (500 μg/ml)
황칠 복합추출물 (100 μg/ml)
황칠 복합추출물 (500 μg/ml)
황칠 복합발효물 (100 μg/ml)
황칠 복합발효물 (500 μg/ml)
CdCl2 treatment