



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0061620
(43) 공개일자 2008년07월03일

(51) Int. Cl.

A61K 36/07 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0136550

(22) 출원일자 2006년12월28일

심사청구일자 2006년12월28일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기
획팀

(72) 발명자

차월석

광주 북구 우산동 6312-1 현대아파트 108동 702
호

정길록

중국 길림성 화룡시 문화가 3주민위원회 16조 64
호 홍집 1-10호

(74) 대리인

황이남

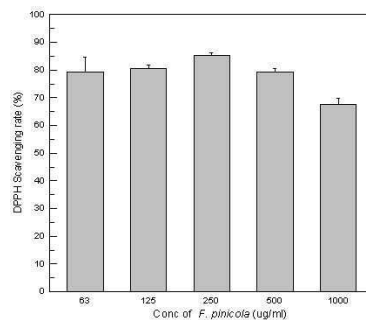
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 소나무잔나비버섯 추출물을 함유하는 항암 약제조성물

(57) 요약

본 발명은 소나무잔나비버섯 추출물을 함유하는 항암, 항산화 약제조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 소나무잔나비버섯 자실체로부터 추출한 유효성분을 함유하는 항암, 항산화 약제조성물에 관한 것이다. 본 발명의 소나무잔나비버섯 자실체 추출물은 강한 항산화 활성 및 암세포 성장저해 활성을 나타낸다. 따라서 본 발명은 소나무잔나비버섯 자실체 추출물을 함유하는 항암, 항산화 약제조성물을 제공함으로써 병증을 감소시키는데 효과적인 치료제 개발에 유용한 물질이 될 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

암을 예방 및 치료하기 위한 유효성분으로서 소나무잔나비버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 항암, 항산화 약제조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 약제조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 시럽제, 액제, 현탁제, 에멀션 또는 캡슐제인 경구용 제제인 항암, 항산화 약제조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 약제조성물은 주사제, 경직장용제제 또는 경피용제제인 비경구용 제제인 항암, 항산화 약제조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <16> 본 발명은 소나무잔나비버섯 추출물을 함유하는 항암, 항산화 약제조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 소나무잔나비버섯 자실체로부터 추출한 유효성분을 함유하는 항암, 항산화 약제조성물에 관한 것이다.
- <17> 소나무잔나비버섯은 소나무과의 각종 침엽수의 고목 또는 생목의 줄기에 발생한다. 자루가 없이 갓이 나무줄기에 선반 모양으로 붙어서 반원형을 이룬다. 갓은 지름이 최대 50cm, 두께 15cm 정도 되는 큰 버섯이다. 윗면은 두꺼운 각피(殼皮)로 덮여 있어 단단하고, 표면은 밋밋하며 흑색 또는 적갈색이고 동심상(同心狀)으로 이랑 모양의 윤기가 있다. 흔히 갓 둘레 부분에 적갈색의 띠가 둘러져 있다. 밑면은 황백색이며 미세한 관공이 밀포되어 있다. 살은 얇은 황백색이며 단단한 목질이다. 분포는 한국, 일본, 북반구 온대 이북으로 우리나라는 해발 300m이상 고산지대로 죽은 소나무조직에 많이 자라고 있다. 소나무잔나비버섯은 위암, 심장병, 항종양, 간암, 콜레스테롤 배출 등에 약효가 있는 것으로 알려져 있으며, 췌장, 당뇨병에 탁월한 효능을 보인다고 알려져 있다. 민간요법으로는 폐렴, 폐암, 감기의 해열제 등의 치료에 사용되고 있다.
- <18> 암의 치료는 수술요법, 화학요법 및 방사선 요법이 시행되고 있는데, 수술요법이 가장 좋은 완치법이라고 할 수 있으나, 암의 시기와 종류 및 발생위치에 따라서 치료법의 적용에 한계가 있기 때문에 화학요법이나 방사선 요법과 같은 보조요법이 동원된다. 1940년대부터 암치료에 도입된 화학요법은 암의 시기나 종류에 관계없이, 비교적 쉽게 적용할 수 있다는 장점이 있어서 현재 많은 관심이 집중되고 있으며, 여러 가지 항암화학요법제가 개발되어 있다. 그러나 현재까지 개발된 많은 화학요법제들은 암세포의 저항성과 부작용 때문에 투여에 있어서 제한을 받고 있다.
- <19> 최근 화학요법제의 이러한 문제점을 해결하기 위하여 항암제 병행요법, 고단위 화학요법 및 방사선요법과 병행하는 방법이 시행되고 있다. 그러나 이러한 방법은 화학요법제의 효과는 증가시킬 수 있으나 부작용이 증가하기 때문에 시행에 있어서 어려운 점이 있다.
- <20> 시스플라틴은 현재 사용되고 있는 광범위한 항암제 중에서 가장 우선순위로 사용되는 항암제이나, 여러 가지 암의 치료에 이용되고 있는 여러 종류의 암세포에서 시스플라틴에 대한 내성이 나타나서 이의 사용은 그 용량을 증가시켜야 하는 문제점이 있다. 따라서 화학요법제의 항암작용을 증가시키는 제제의 개발은 항암제의 개발과 함께 매우 중요한 연구과제이다.
- <21> 버섯은 항균작용, 항암작용 및 면역계 조절작용 등 생리적으로 중요한 여러 가지 작용을 한다고 알려져 있다. 버섯류에서 항암작용을 나타내는 물질이 여러 가지가 알려져 있는데, 이들은 대부분 베타글루칸(β -glucan)이나 렌티난(lentinan) 등의 다당체류이다. 구름버섯(Coriolus versicolor), 표고버섯(Lentinus edodes), 느타리버섯(Pleurotus ostreatus), 영지버섯 등의 자실체의 열수추출물이 암세포에 대한 독성작용을 한다는 것이 이미

보고되어 있으나, 본 발명과 같이 소나무잔나비버섯 추출물이 항암, 항산화효과가 있다는 연구보고는 아직까지 보고되어 있지 않다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<22> 본 발명은 상기한 바와 같은 종래 기술의 문제를 해결하기 위해 제안된 것으로, 본 발명의 목적은 소나무잔나비버섯 자실체 추출물을 함유하는 항암, 항산화 약제조성물을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<23> 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 암을 예방 및 치료하기 위한 유효성분으로서 소나무잔나비버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 항암, 항산화 약제조성물을 포함한다.

<24> 본 발명은 상기 약제조성물의 경구용 제제로서, 정제, 환제, 산제, 과립제, 시럽제, 액제, 현탁제, 에멀션 또는 캡슐제를 포함한다.

<25> 본 발명은 상기 약제조성물의 비경구용 제제로서, 주사제, 경직장용제제, 경피용제제를 포함한다.

<26> 이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

<27> 본 발명은 암을 예방 및 치료하기 위한 유효성분으로서 소나무잔나비버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 항암, 항산화 약제조성물을 제공한다.

<28> 소나무잔나비버섯 추출물은 소나무잔나비버섯 또는 소나무잔나비버섯 자실체를 열수 추출하거나 메탄올 추출하는 것이 바람직하다.

<29> 소나무잔나비버섯의 열수 추출은 소나무잔나비버섯을 증류수를 가해 95~100℃에서 1~2시간 동안 추출하거나, 소나무잔나비버섯 자실체를 증류수를 가해 95~100℃에서 3~4시간 동안 추출하는 것이 바람직하다.

<30> 소나무잔나비버섯의 메탄올 추출은 소나무잔나비버섯 또는 소나무잔나비버섯 자실체를 75~85%의 메탄올을 가해 상온에서 3~4시간 동안 진탕 추출하는 것이 바람직하다.

<31> 상기에서 각각의 추출물은 여과지를 이용하여 여과하여 사용하는 것이 바람직하다.

<32> 본 발명의 소나무잔나비버섯 추출물은 항산화 효과가 있으며, 암세포의 증식을 억제할 수 있다.

<33> 본 발명의 소나무잔나비버섯 추출물을 함유하는 약제조성물은 경구 또는 비경구 어느 수단으로라도 투여할 수 있다. 투여 제형에는 특별한 제한은 없지만, 환자의 연령, 성별 또는 질환의 경증뿐만 아니라 제형에 따라 결정될 것이다.

<34> 경구용의 제제로는 예를 들면, 정제, 환제, 산제, 과립제, 시럽제, 액제, 현탁제, 에멀션, 또는 캡슐제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구용의 제제로는, 주사제, 경직장용제제, 경피용제제 등을 들 수 있고, 정맥내, 피하근육내, 복강내 등의 투여 경로로 투여될 수 있다. 경구투여가 일반적으로 바람직하다.

<35> 또한, 본 발명의 약제조성물은 상기 유효성분에 통상적으로 사용되는 약학적으로 허용되는 부형제, 붕해제, 결합제, 윤활제, 용해제, 보존제, 안정제, 완충제, 코팅제 등과 혼합함으로써 원하는 투여형태로 만들 수 있다.

<36> 상기에서 정제 제형을 위해서 당 업계에서 공지된 다양한 담체를 사용할 수 있다. 전형적인 담체의 예로는: 락토오스, 사카로오스, 염화 나트륨, 글루코오스, 우레아, 스타치, 칼슘 카르보네이트, 카올린, 결정 셀룰로오스 및 규산과 같은 부형제; 물, 에탄올, 프로판올, 단미시럽, 글루코오스 용액, 스타치 용액, 젤라틴 용액, 카르복시메틸셀룰로오스, 셀락, 메틸 셀룰로오스, 포타슘 포스페이트 및 폴리비닐 피롤리돈 슈거 등과 같은 결합제; 드라이 스타치, 소듐 알기네이트, 아거 파우더, 나미나란 파우더, 소듐 바이카르보네이트, 칼슘 카르보네이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 소듐 라우릴 술페이트, 스테아르산 모노글리세라이드, 스타치 및 락토오스와 같은 붕해제; 사카로오스, 스테아린, 카카오 버터 및 수소화 오일과 같은 붕해보조제; 4 급 암모늄 염 및 소듐 라우릴 술페이트와 같은 흡수 촉진제; 글리세린 및 전분과 같은 습윤제; 전분, 락토오스, 카올린, 벤토나이트 및 콜로이드 규산과 같은 흡수제; 정제 탈크, 스테아레이트, 붕산 파우더 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제를 포함한다. 필요하다면, 정제를 코팅(예컨대, 슈거코팅, 젤라틴코팅, 장용코팅 또는 필름코팅)할 수 있고, 정제를 이중정 또는 다중정으로 형성할 수 있다.

<37> 환제 제형을 위해서, 당 업계에서 공지된 다양한 담체를 사용할 수 있다. 그 예로는, 글루코오스, 락토오스, 스

타치, 카카오 오일, 수소화 식물유, 카올린 및 탈크와 같은 부형제 ; 아라비아 검 분말, 트라가칸트 파우더, 젤라틴 및 에탄올과 같은 결합제 ; 및 라미나란 아거와 같은 봉해제를 포함한다.

<38> 주사제로 제형화할 경우에는, 혈액과 등장인 멸균액 또는 현탁액이 바람직하다. 액제, 에멀션 또는 현탁액 제형을 위해서, 당 업계에서 통상적으로 사용되는 임의의 희석제를 사용할 수 있다. 그 예로는, 물, 에틸 알콜, 프로필렌 글리콜, 에톡실화 이소스테아릴 알콜, 프로폭실화 이소스테아릴 알콜 및 폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스테르를 포함한다. 이러한 경우에, 염화 나트륨, 글루코오스 또는 글리세린을 등장액으로 제조하기에 충분한 양 또는 통상의 용해 보조제, 완충제, 스무딩제 등을 가하기에 충분한 양으로 포함할 수 있다. 또한, 발색제, 보존제, 아로마 화합제, 향미제, 감미제 또는 그 외의 약제를 필요하다면 가할 수 있다.

<39> 본 발명의 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 체중 kg당 100 내지 250mg의 양, 바람직하게는 150내지 200mg의 양을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1회 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 방법으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<40> 또한, 본 발명의 조성물은 건강 기능성 음료의 형태로 제조되어질 수 있다. 본 발명에 따른 건강 기능성 음료는 소나무잔나비버섯 추출물 이외에 통상의 음료에 첨가되는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 크실리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 있다. 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기한 추가 성분 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 또한, 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

<41> 이하 본 발명의 내용을 실시예를 통해 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 다만 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

<42> [실시예 1] 실험재료 및 방법

<43> 1) 실험동물:

<44> *in vivo* 실험용 동물로는 Sprague/Dawley 계의 수컷 흰쥐를 구매하여 2 주일 이상 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공조명설비에 의하여 조명시간을 오전 7:00부터 오후 7:00까지 12시간으로 조절하며, 실내온도는 22℃, 습도는 60%로 유지하였고, 급수는 일반 상수도를 사용하였고 사료와 급수는 제한하지 않았다. 정상사료를 먹이하면서 사육한 후에 체중이 210-240g인 개체를 실험에 사용하였다.

<45> 2) 소나무잔나비버섯 추출물

<46> 진탕액(decoction): 소나무잔나비버섯 100g에 증류수 200ml를 가해 100℃에서 1시간 동안 열수 추출하였다. 실온에서 냉각시킨 후 필터지(filter paper, Whatman No.2)로 여과하였다.

<47> 열수추출물(Hot-water extraction): 소나무잔나비버섯 자실체를 증류수와 함께 리비히 냉각기(Liebig condenser)에 넣어 100℃에서 3시간 동안 열수 추출하였다. 추출물을 거어즈 필터로 여과하고 여액을 농축시켜 시료로 사용하였다.

<48> 메탄올 추출물(Methanol extraction): 소나무잔나비버섯 자실체를 80%의 methanol과 함께 상온에서 3시간 동안 진탕 추출하였다. 추출물을 거어즈 필터로 여과하고 여액을 농축시켜 시료로 사용하였다.

<49> 3) 통계처리:

<50> *in vivo* 실험으로부터 얻은 결과들의 실험군별 상호비교를 위한 평균치는 평균±표준오차(Mean±S.E.)로써 산출하였다. 실험군들간의 유의성 검증은 student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였으며 p-value가 0.05 미만인 경우에 그 유의성을 인정하였다. *in vitro* 실험으로부터 얻은 결과들의 평균치는 평균±표준편차(Mean±SD)로 산출하였다.

<51> [실시예 2] 약제의 항산화 활성 측정

1) DPPH 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 Lee 등의 방법에 따라 실시하였다. 1.5×10^{-4} M의 농도로 에탄올에 녹여 조제한 DPPH 반응액과 일정농도의 시료를 $30\mu\text{l}$ 를 첨가해 최종 부피가 3ml 가 되게 혼합하고 3분 후에 517nm에서 흡광도를 측정하여 소거능(%)을 산출하였다(도 1, 표 1).

[표 1] DPPH

Contents Samples	DPPH Scavenging Rates (Mean $\pm$ SD; %, n=3)				
	62.5ppm	125ppm	250ppm	500ppm	1000ppm
<i>F. pinicola</i>	79.3 ± 5.3	80.5 ± 1.4	85.2 ± 1.0	79.3 ± 1.2	67.5 ± 2.4

2) 수퍼옥사이드 음이온 라디칼(Superoxide anion radical) 소거능

수퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능은 Nishikimi 등의 방법에 따라 실시하였다. 시료 $500\mu\text{l}$, 0.1M Tris-HCl 완충액 (pH 8.5) $100\mu\text{l}$, $100\mu\text{M}$ PMS $200\mu\text{l}$, $500\mu\text{M}$ NBT $200\mu\text{l}$ 및 $500\mu\text{M}$ NADH $400\mu\text{l}$ 를 가해 540nm에서 흡광도 측정하고 시료를 함유하지 않은 용매에 대한 소거율(%)로 결과를 나타내었다(도 2).

3) 리놀레익산(Linoleic acid)의 과산화저해

리놀레익산(Linoleic acid) 과산화저해율은 Haraguchi 등의 방법에 따라 실시하였다. 25mg/ml 농도의 시료용액 $30\mu\text{l}$, 리놀레익산 $400\mu\text{l}$, 포스페이트 버퍼(phosphate buffer) $800\mu\text{l}$, 증류수 $770\mu\text{l}$ 를 가해 반응 혼합물을 만들어 40°C 에서 자동산화를 유발하였다. 이 반응액 0.1ml 을 24시간 후 취해 0.1ml 의 30% NH_4SCN 및 75% 에탄올 2.7ml 와 혼합한 액에 2.45mg/ml 농도의 페러스 클로라이드(ferrous chloride) 0.1ml 을 가해 혼합하고 3분 후 500nm에서 흡광도 측정하여 용매를 사용한 대조군의 흡광도에 대한 저해율(%)로서 항산화 효과를 나타내었다(도 3).

4) 총페놀 함량

페놀 함량은 Kim 등의 방법에 따라 실시하였다. 시료액 $100\mu\text{l}$ 와 2% Na_2CO_3 2ml 및 50% Folin-Ciotalteau 시약 $100\mu\text{l}$ 를 혼합하고 30분 후 흡광도를 750nm에서 측정한 후 얻어진 흡광도를 탄닌산(tannic acid)을 표준물질로 사용한 검량선에 근거하여 산출하였다(표 2).

[표 2] 페놀성 성분의 함량

	<i>F. pinicola</i>	blank
Mean	0.464	0.005
SD	0.003	0.006

[실시에 3] 알콜성 스트레스 유발 흰쥐 간(liver)에서의 항산화작용 측정

1) 산화적 스트레스 유발 및 약제투여

Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(체중 180g)를 2 주일간 예비 사육한 후, 체중이 200g 일때 실험을 진행하였다. 알코올 단독투여군인 음성대조군(Negative Control), 강력한 항산화제인 실리마린(silymarin)(1g/kg body weight/day)투여군, 그리고 약제 투여군 투여군으로 실험군을 나누어, 모든 실험군에 2 주일 동안 매일 마리당 30 % 에탄올 3.0ml 을 경구투여 하여 산화적 스트레스를 유발하였다(표 3).

산화적 스트레스 유발과 동시에 실험군에는 시료전탕액을 2주일 동안 매일 1회에 걸쳐 개체 당 0.5ml 씩 경구투여 하였고, 대조군(Control)과 실리마린(silymarin) 투여군에는 전탕액(煎湯液) 대신에 생리식염수(0.85 % NaCl)를 투여하였다.

[표 3] Experimental Design for *in vivo* test for 2 weeks.

Exp. Groups	Ethanol	Administrations (with)
Control	Yes	No
Silymarin	Yes	Silymarin (1g/kg body weight/day)
Tests	Yes	Ext ($0.8325\text{ g mushroom/kg body wt/day}$)

- <70> *Ext 0.8325 => 0.8325g 의 버섯으로부터 추출된 전탕액(extract; decoction)을 말함
- <71> 2) 간장 적출 및 효소액 조제
- <72> 간장(liver)은 적출하여 0.9 %의 식염수로 세척하여 여과지로 수분을 제거한 다음 -20 ℃의 냉동고에 보관하면서 사용하였으며, 조직 균질액 및 효소액 준비과정은 도 4과 같았다. 간장(liver) 1.0g에 10.0ml의 0.1M 포스페이트 버퍼(phosphate buffer)를 가한 다음 빙냉 상태에서 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 600xg로 15분간 원심분리하였으며, 상등액 1.0ml을 취하여 글루타치온(glutathion: GSH) 함량측정에 사용하였다. 나머지 9.0ml을 8,000xg로 10분 동안 재원심분리 하여 얻은 침전물에 1.0ml의 50mM PBS(phosphate beffered saline, pH7.0)을 가하여 카탈라아제(catalase) 및 아세트알데하이드 디하이드로게나아제(acetaaldehyde dehydrogenase: ALDH) 활성측정에 사용하였다. 상등액은 초원심분리(105,000xg, 60 min)하여 얻은 상등액을 글루타치온-퍼옥시다나제(GSH-peroxidase) 및 알코올 디하이드로게나아제(ADH: alcohol dehydrogenase) 측정용 시료로 사용하였다.
- <73> 3) 글루타치온(Glutathion) 측정
- <74> 글루타치온의 함량은 엘라만(Ellaman)의 방법에 따라 간(liver)조직의 분쇄액을 준비하여 측정하였다. 잘게 절개한 간에 5 배(w/v)의 50mM PBS(phosphate buffered saline, pH 7.0)을 가하고 균질기(homogenizer)를 이용하여 균질화시켰다. 균질화한 액을 20 분간 원심분리(1,000×g, 4℃)하여 상층액을 취하였다. 균질액(Homogenate 액)에 0.1 % 피크르산(picric acid)을 첨가한 다음, 3,000rpm에서 15 분간 원심분리하였다. 상층액을 취하여 0.2mM NADPH, 0.6mM DTNB, 5mM EDTA 및 1글루타치온 리덕타아제(Glutathione reductase)가 포함된 0.1M 버퍼(phosphate buffer, pH 7.5)를 첨가하여 412nm에서 30초 간격으로 3분간 흡광치 변화를 측정하였다(도 5).
- <75>
- <76> 4) 글루타치온 퍼옥시다아제(Glutathione peroxidase: GSH-px) 활성 측정
- <77> GSH-px 활성은 Flohe의 방법에 따라 측정하였다. 1×10^{-3} M 소듐 아자이드(Sodium azide)와 1mM 이디티에이(EDTA)를 함유하는 0.1 M 포타슘 포스페이트 버퍼(potassium phosphate buffer, pH 7.0) 500 μ l, 효소액 100 μ l, 글루타치온 리덕타아제(glutathione reductase: 2.768U/ml) 100 μ l, 1×10^{-2} M 글루타치온(glutathione) 100 μ l을 혼합, 37 ℃에서 10분 동안 예비 배양한 후 이 반응액에 0.1% NaHCO₃에 녹인 1.5×10^{-3} M NADPH 100 μ l를 가해 1분간 그리고 1.5×10^{-3} M H₂O₂ 100 μ l을 가한 후 다시 1분간 340nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 흡광도와 NADPH의 molecular extinction coefficient ($E=6.22 \times 10^6 \text{cm}^2$)로부터 효소액과 블랭크(blank)의 1분간의 NADPH 농도의 변화(Δ [NADPH]/min)를 산출하고 이 효소액의 수치에서 블랭크(blank)의 수치와 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase)와 관련 없는 인자에 의해 나타나는 Δ [NADPH]/min를 빼준 값을 다음의 식에 대입하여 글루타치온 퍼옥시다아제의 활성 (U/mg protein)을 산출하였다(도 6).
- <78>
$$U=0.868(\Delta[\text{NADPH}]/[\text{GSH}_0]) \times t \times (V_i/V_s)$$
- <79> Vi/Vs : 희석배수
- <80> Vi : 배양 볼륨(incubation volume)
- <81> Vs : 초기 샘플 볼륨(initial sample volume)
- <82> GSH₀ : 글루타치온(glutathione)의 초기 농도
- <83> 5) 간장(Liver)의 카탈라아제(catalase) 활성 측정
- <84> 카탈라아제(catalase) 활성은 Abei의 방법에 따라 측정하였다. 0.1ml의 원심분리한 상등액, 기질인 10.5mM H₂O₂ 그리고 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(potassium phosphate buffer, pH 7.0)를 합하여 3ml이 되게 한 후 25℃에서 30초 동안 반응시켰으며, 이 반응액을 240nm에서 H₂O₂의 흡광도 변화로 효소 활성을 측정하였고, 효소활성(k/mg protein)은 1분간 1 μ M H₂O₂를 분해시키는 데 요구되는 효소량으로 나타내었다(도 7).
- <85> 6) 간장 중 ADH 및 ALDH 활성 측정

<86> ADH(alcohol dehydrogenase)와 ALDH(acetaldehyde dehydrogenase) 활성은 Tottmar 등의 방법에 따라 측정하였고, ADH측정방법은 다음과 같았다. 0.2M 에탄올 0.1ml, 0.5 M 세미카르바지드(semicarbazide) 0.02ml, 0.1M NAD (in 0.01M HCl) 0.02ml 및 0.1M 트리스 버퍼(Tris buffer, pH 8.5) 2.0ml를 혼합한 다음, 30 ℃에서 온도를 조정하였다. 이 혼합액에 미리 준비된 효소액 0.1ml를 가하여 파장 340nm에서 1 분간의 흡광도변화를 측정하였으며, 생성된 NADH의 양을 활성으로 환산하였다(도 8a). ALDH활성은 다음 방법에 따라 측정하였다. 75mM 포스페이트버퍼(phosphate buffer, pH8.8) 0.4ml에 증류수 70 μ l, 12mM NAD 70 μ l, 12mM 마그네슘클로라이드(magnesium chloride) 70 μ l, 2.4mM 4-메틸피라졸(4-methyl pyrazole) 70 μ l, 8mM 로테논(rotenone in MeOH) 2 μ l를 혼합한 다음, 준비된 효소용액 0.1 ml을 첨가하였으며, 5mM 아세트알데히드(acetaldehyde) 0.1ml을 가하여 반응을 시작하였다. 반응은 30℃에서 시행하였고, 340nm에서 1분간 흡광도 측정하여 생성된 NADH의 양을 활성으로 환산하였다(도 8b). 단백질 함량은 브래드포드(Bradford)의 방법에 따라 실시하였고, 검량표준곡선 작성을 위한 표준단백질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다.

<87> ALDH활성 계산식은 다음과 같았다.

<88>
$$\text{units/ml} = \{(\Delta A_{340}/\text{min}) \times (\text{reaction vol}) \times (\text{dilution factor})\} \div$$

<89>
$$\{(\text{sample vol}) \times 6.22\}$$

<90>
$$\text{units/mg protein} = \{\text{Activity}(\text{units/ml})\} \div \{\text{protein}(\text{mg})/\text{sample}(\text{ml})\}$$

<91> ※ 6.22 : 340nm에서 NAD⁺ 흡광 계수(millimolar)

<92> 소나무잔나비버섯의 추출물인 전탄액을 투여한 경우 항산화 효과가 높게 나타나는 것을 알 수 있었다.

<93> [실시예 4] 암세포증식에 대한 영향 측정

<94> 1) 암세포주

<95> 암세포주로는 간암세포(human hepatocellular carcinoma)인 SNU-354, Hep3B, PLC/RF/5, SK-HEP-1, 자궁경부암 세포(human cervix carcinoma)인 HeLa, 상피색소세포(human melanoma cells)인 HO-1을 사용하였다.

<96> 2) MTT 분석

<97> MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석은 살아있는 세포내 미토콘드리아의 디하이드로게나아제(dehydrogenase)에 의해 생성되는 파란색 포마잔(formazan) 측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로, Monks 등의 방법에 준하여 실시하였다. 실험대상 세포의 농도를 $4 \sim 5 \times 10^4$ cells/mL의 농도로 조절하여 24 웰 플레이트(well plate)에 900 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37℃, 5% CO₂)시킨 후, 시료를 100 μ l씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 소나무잔나비버섯 자실체의 열수 추출물과 메탄올 추출물은 각각의 세포에 0, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml 농도로 각각 처리하였다. 배양한 후 100 μ l의 MTT(50 mg/mL)용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 포마잔(formazan)을 형성시킨 후, DMSO 900 μ l를 첨가하여 포마잔을 녹였으며, 각 웰(well)에서 100 μ l씩 취하여 96 웰 플레이트에 옮긴 다음 540nm에서 엘라이자 리더(ELISA reader)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(도 9a-도 9f).

<98> 도 9a-도 9f에 나타난 바와 같이 소나무잔나비버섯 자실체의 열수 추출물 및 메탄올 추출물은 암세포의 증식을 억제하였으며, 전반적으로 소나무잔나비버섯 자실체 메탄올 추출물의 암세포 억제 효과가 더 높게 나타났다.

발명의 효과

<99> 이상에서 살펴본 바와 같이 본 발명의 소나무잔나비버섯 자실체 추출물은 강한 항산화 활성 및 암세포 성장저해 활성을 나타낸다. 따라서 본 발명은 소나무잔나비버섯 자실체 추출물을 함유하는 항암, 항산화 약제조성물을 제 공함으로써 병증을 감소시키는데 효과적인 치료제 개발에 유용한 물질이 될 것이다.

도면의 간단한 설명

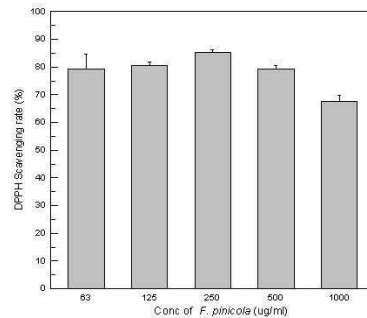
<1> 도 1은 소나무잔나비버섯 추출물의 DPPH 라디칼(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical) 소거능을 나타낸 것이다.

<2> 도 2는 수퍼옥사이드 음이온 라디칼(Superoxide anion radical) 소거능을 나타낸 것이다.

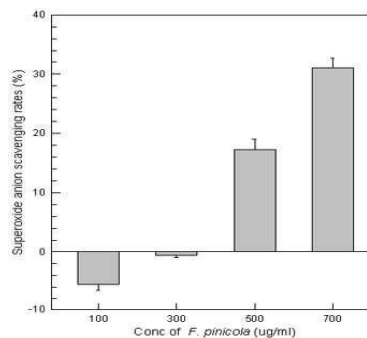
- <3> 도 3은 리놀레익산(Linoleic acid) 소거능을 나타낸 것이다.
- <4> 도 4는 알코올성 스트레스 유발한 흰쥐의 간장(liver)을 적출하여 조직 균질액 및 효소액 준비과정을 나타낸 것이다.
- <5> 도 5는 알코올성 스트레스 유발 흰쥐 간의 GSH(glutathion) 함량 측정을 나타낸 것이다.
- <6> 도 6은 알코올성 스트레스 유발 흰쥐 간의 Glutathione peroxidase (GSH-px) 활성 측정을 나타낸 것이다.
- <7> 도 7은 알코올성 스트레스 유발 흰쥐 간의 카탈라아제(catalase) 활성 측정을 나타낸 것이다.
- <8> 도 8a는 알코올성 스트레스 유발 흰쥐 간장 중 ADH 활성 측정을 나타낸 것이다.
- <9> 도 8b는 알코올성 스트레스 유발 흰쥐 간장 중 ALDH 활성 측정을 나타낸 것이다.
- <10> 도 9a는 간암세포주인 SNU354의 세포의 생존율을 나타낸 것이다.
- <11> 도 9b는 간암세포주인 Hep3B의 세포의 생존율을 나타낸 것이다.
- <12> 도 9c는 간암세포주인 PLC/RF/5의 세포의 생존율을 나타낸 것이다.
- <13> 도 9d는 간암세포주인 SK-HEP-1의 세포의 생존율을 나타낸 것이다.
- <14> 도 9e는 자궁경부암세포주인 HeLa의 세포의 생존율을 나타낸 것이다.
- <15> 도 9f는 상피색소세포인 HO-1의 세포의 생존율을 나타낸 것이다.

도면

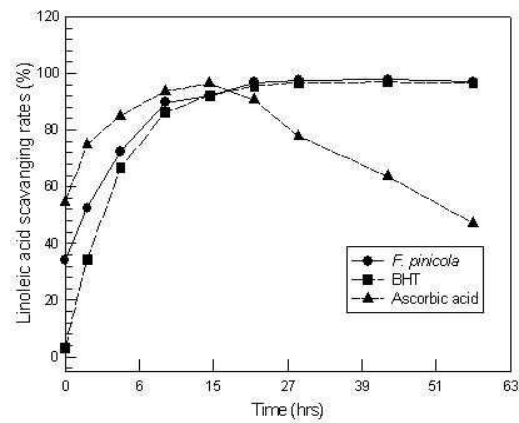
도면1



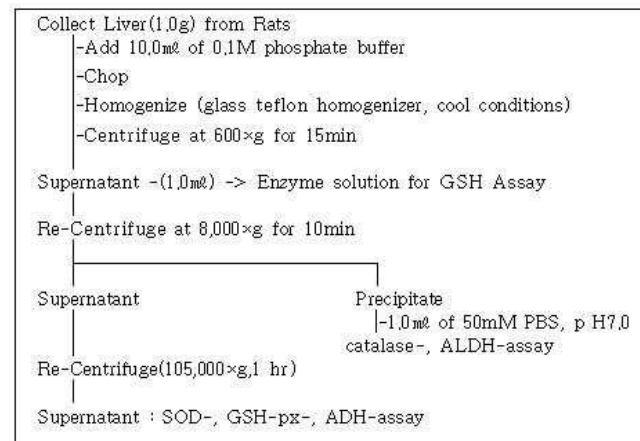
도면2



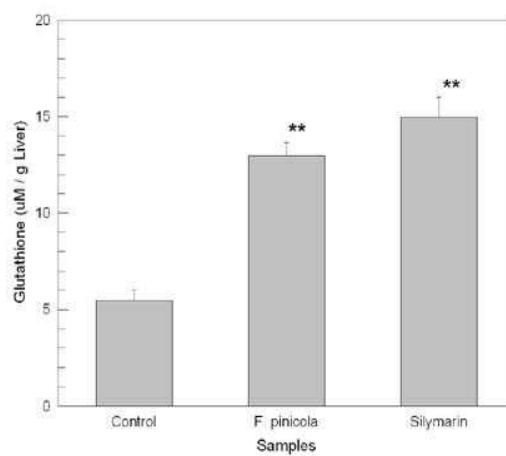
도면3



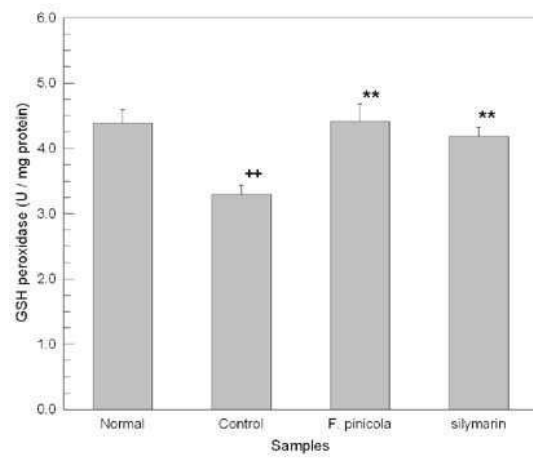
도면4



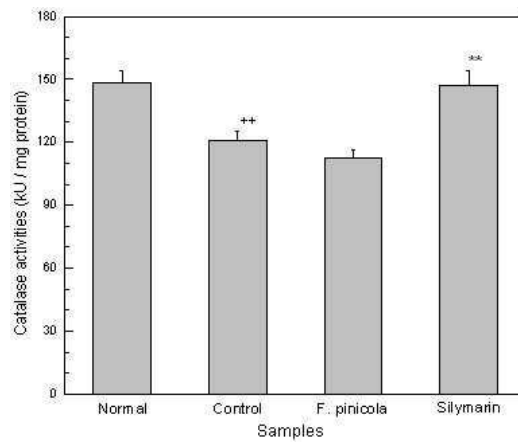
도면5



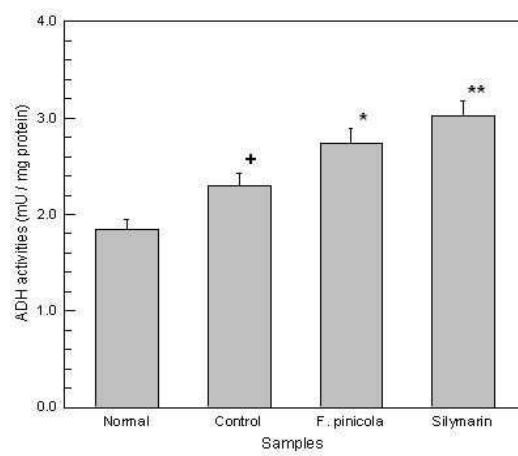
도면6



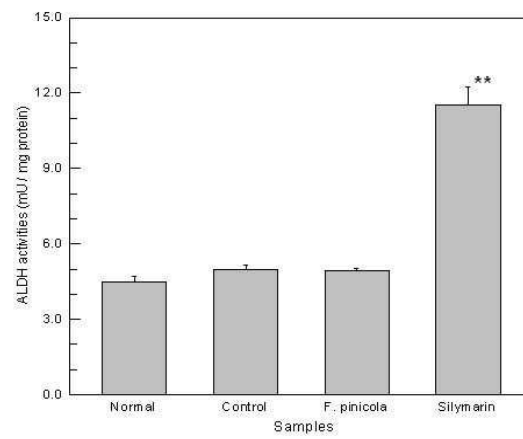
도면7



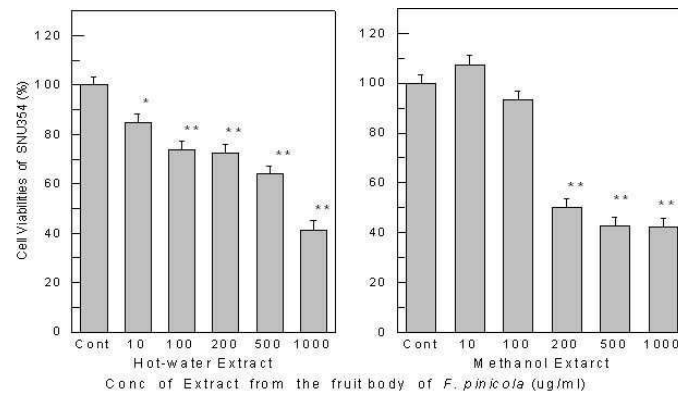
도면8a



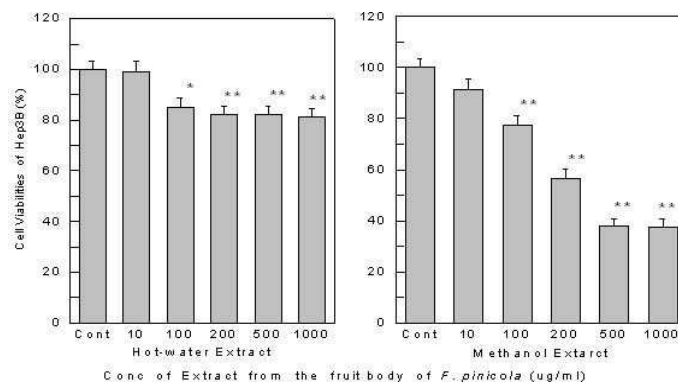
도면8b



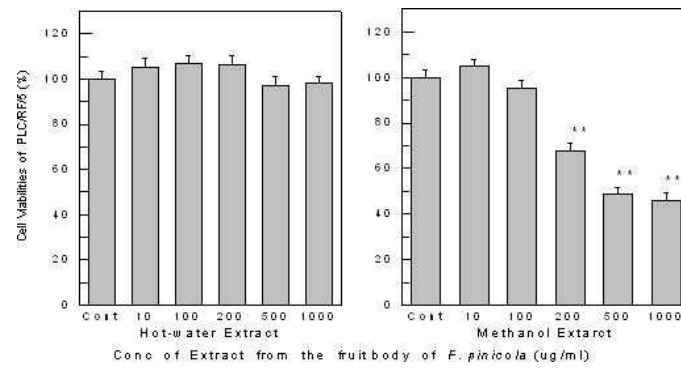
도면9a



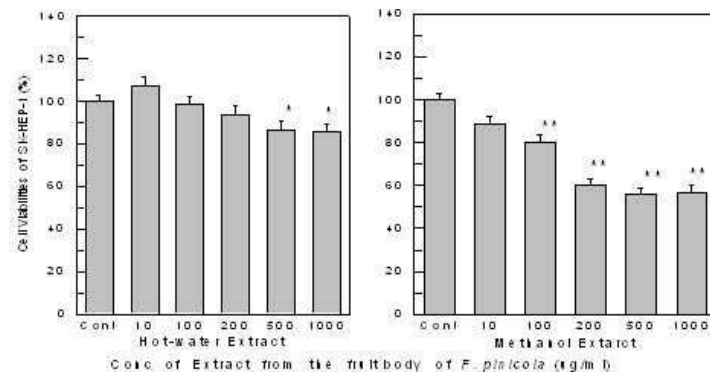
도면9b



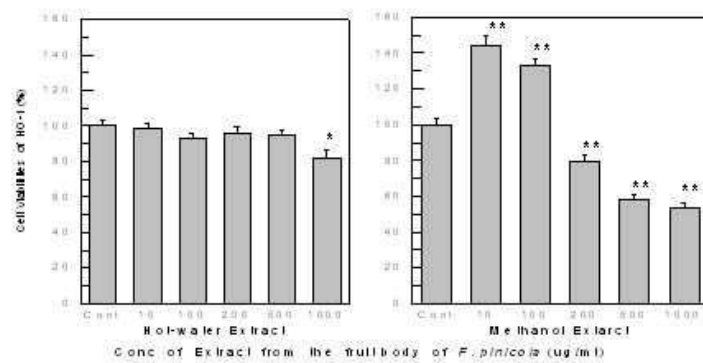
도면9c



도면9d



도면9e



도면9f

