(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월01일
(11) 등록번호 10-1742888
(24) 등록일자 2017년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/48 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/48 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0179138
(22) 출원일자 2015년12월15일
심사청구일자 2015년12월15일
(56) 선행기술조사문헌
JP2001500546 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
이승욱
대구광역시 달성군 다사읍 대실역북로 26, 207동 102호 (대실역청아람2단지아파트)
유미희
대구광역시 달성군 다사읍 죽곡1길 42, 103동 1810호 (대실역e편한세상아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

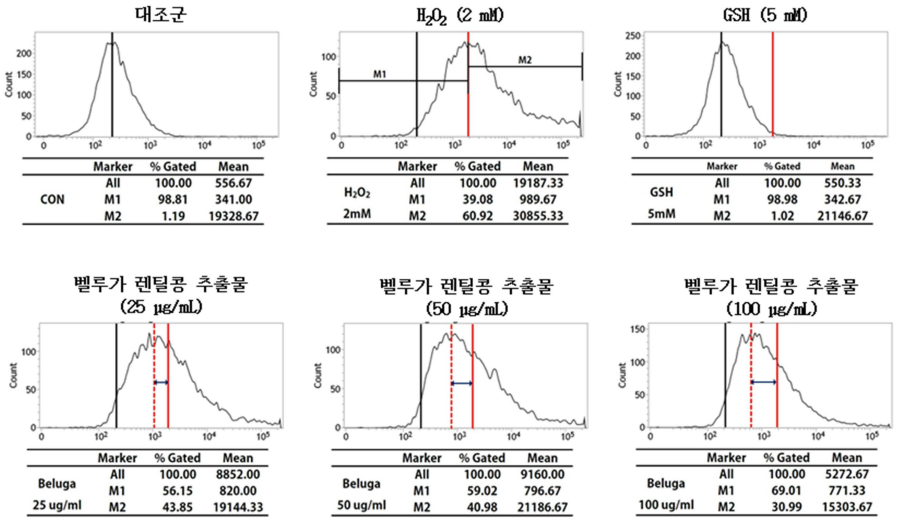
전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 **벨루가 렌틸콩 추출물을 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 벨루가 렌틸콩 추출물을 산화적으로 손상을 준 간세포에 처리하였을 때 세포 보호 효과를 확인한 것으로, 보다 상세하게는 상기 벨루가 렌틸콩 추출물은 산화적으로 손상을 받은 간세포의 ROS 생성을 저해하고, GSH 생성량과 카탈라아제 및 GSH 환원효소 활성을 증가시키는 효과가 있다. 따라서 상기 벨루가 렌틸콩 추출물은 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물, 예방 또는 개선용 건강식품으로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자
황은영
대구광역시 수성구 동대구로 376, 103동 401호
정연섭
대구광역시 달성군 다사읍 다사로109길 39-9 (박곡리)
이소희
대구광역시 북구 서변로 50, 206동 1202호 (서변동, 화성리버파크2단지)
이효선
경상북도 포항시 남구 송림로56번길 17-7 (송도동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A1A2059385
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (구)기본연구자지원사업
연구과제명 핵수용체 NR4A1을 표적하는 췌장암 치료용 천연 식의약 소재 발굴
기 여 율 1/1
주관기관 계명대학교 산학협력단
연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

0.2% HCl을 함유한 메탄올 수용액으로 추출된 벨루가 렌틸콩 추출물을 유효성분으로 포함하는, 과산화수소(hydrogen peroxide)로 유발된 간의 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

0.2% HCl을 함유한 메탄올 수용액으로 추출된 벨루가 렌틸콩 추출물을 유효성분으로 포함하는, 과산화수소(hydrogen peroxide)로 유발된 간의 염증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 렌틸콩, 특히 벨루가 렌틸콩 추출물을 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간은 인간의 신체 장기 중 생체 내 대사가 가장 활발하게 일어나는 장기로, 인체 내 소화기계와 전신순환계 사이에 위치하면서, 단백질 합성 및 내부 물질의 대사뿐만 아니라, 외부의 물질을 대사시킴으로써, 전신을 방어하는 기능을 수행하는 매우 중요한 장기이다. 특히, 생체 내로 들어온 약물 및 독소 등의 물질은 먼저 간에 의해 대사되기 때문에, 간은 다른 장기보다 독성물질에 노출될 가능성이 높아 손상될 확률도 매우 높다. 그러나 간은 재생능력이 우수한 장기로서 급성 간손상의 경우는 무증상이거나 간효소 수치가 약간 증가할 뿐이고, 대부분 자가 치료과정을 거친다. 그러나 지속적으로 독성물질에 노출되어 손상이 만성화될 경우에는 비가역적인 간 조직의 괴사 등으로 인해 간기능 부전 및 간경변을 초래하게 되어 정상적인 간으로 회복되기 어려운 상태가 된다.

[0003] 임상적으로 산업화에 따른 공해물질, 유독물질, 다양한 약물과 독소, 곰팡이, 바이러스와 같은 화학적, 생물학적 요인 외에도, 현대인이 받는 정신적 스트레스는 간 손상을 가중시켜 인체의 면역체계에 이상을 가져와 다른 질병의 원인이 되기도 한다. 간질환은 초기에 자각증상이 없어 손상이 상당히 진행되어서야 임상증상이 발견되기 때문에, 우리나라뿐만 아니라 세계적으로도 사망원인의 높은 순위를 차지하고 있으나, 효과적인 치료방법이 없는 실정이다. 따라서, 간 조직의 구조 및 기능을 유지하면서 간 손상을 예방 또는 치료할 수 있는 약물의 개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

[0004] 현재까지 천연물질에서 추출되어 실제 임상에서 응용되고 있는 간 기능 보호제로는 실리범 마리아넘(Silybum marianum)이라는 식물에서 추출된 실리빈(silybin), 실리디아민(silydiamine), 실리크리스틴(silycristine) 등의 이성질체로 구성된 실리마린(silymarin) 제제가 있으나, 천연물로부터 간손상 치료제를 개발하려는 수많은 노력에도 불구하고 실제로 치료제로 현재 사용 중이거나 임상시험이 진행되고 있는 예는 소수에 불과하며, 단일

물질 천연추출물을 통한 연구보다는 복합추출물을 통해 이루어지는 실험이 대부분이어서 정확한 성분 및 함량의 분석이 미비한 상태이다.

[0005] 한편, 렌틸콩(lentil, *Lens esculenta*)은 렌즈콩이라고도 불리며 볼록렌즈와 같은 형태를 하고 있는 콩과 식물로, 보통 키가 15 내지 45㎝에 이르고 식물체의 크기, 털의 유무, 잎과 꽃, 씨의 색깔에 따라서 여러 재배 품종으로 나뉜다.

[0006] 렌틸콩은 단백질, 비타민 B, 철, 인의 좋은 공급원으로 고대 이집트와, 그리스 시대 등 아주 오래전부터 식량으로 재배되었다고 하며, 현재도 유럽과 아시아, 북아프리카에서 널리 심고 있는데, 씨는 주로 수프와 샐러드에 많이 이용되고, 식물체는 사료용으로 쓰인다.

[0007] 현재 중동, 북아메리카, 지중해 연안의 유럽, 북쪽으로는 독일, 네덜란드, 프랑스 등에서 여러 변종(變種)을 재배하고 있다.

[0008] 렌틸콩은 100g당 353 칼로리(calories)이고, 필수 영양소를 많이 함유하고 있으며, 특히 식이섬유과 단백질은 일일 기준치(Daily Value, DV)의 각각 122%, 52%를 제공하고, 엽산(folate) 120% DV, 티아민(thiamin) 76% DV, 인(phosphorus) 64% DV 및 철(iron) 58% DV를 제공한다.

[0009] 더불어 색을 기반으로 그린 렌틸콩(Green lentil), 마수르 렌틸콩(Masoor lentil), 프렌치 렌틸콩(French lentil) 또는 벨루가 렌틸콩(Beluga lentil) 등으로 나뉘는데, 각 종류마다 함유하고 있는 영양 물질이 다르다고 알려져 있다.

[0010] 그린 렌틸콩은 껍질과 속이 모두 녹색인 렌틸콩이며, 마수르 렌틸콩은 껍질은 갈색이고 속은 오렌지색인 렌틸콩이며, 프렌치 렌틸콩은 껍질은 갈색이고 속은 노란색인 렌틸콩이며, 벨루가 렌틸콩은 껍질은 검은색이고 속은 노란색인 렌틸콩이다.

[0011] 그 중 벨루가 렌틸콩의 간 손상 치료 효과에 대해서 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 10-1024040호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 따라서 본 발명은 벨루가 렌틸콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0014] 또한 본 발명은 벨루가 렌틸콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벨루가 렌틸콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벨루가 렌틸콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0017] 상기 추출물은 메탄올, 물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용매로 추출된다.

[0018] 상기 간 손상은 과산화수소(hydrogen peroxide), 알코올, 지질, 사염화탄소(CCl_4), 아세트아미노펜(acetaminophen), 티오아세트아마이드(thioacetamide), 타크린(tacrine), 터셔리-부틸하이드로퍼옥사이드 (t-butyl hydroperoxide) 및 루브라톡신 B(rubratoxin B)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 간독성 물질에 의한 간의 염증이다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 벨루가 렌틸콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 예방 또는 개선용 건강식품에 관한 것으로, 상기 벨루가 렌틸콩 추출물은 항산화 성분이 풍부하며, 과산화수소와 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 및 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbemzthiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼 소거능이 뛰어나고, 산화적으로 손상을 준 간세포에 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리하였을 때 세포 보호 효과를 보이며, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 저해하고, 손상된 간세포의 글루타티온(glutathione, GSH) 생성량 및 카탈라아제(catalase)와 글루타티온 환원효소(glutathione reductase, GR)의 활성을 증가시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 벨루가 렌틸콩 추출물의 세포 독성을 확인한 결과이며,

도 2는 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2) 처리에 의한 산화적 손상에 대한 벨루가 렌틸콩 추출물의 보호 효과를 확인한 결과이며,

도 3은 H_2O_2 처리에 의한 활성산소종 생성에 대한 벨루가 렌틸콩 추출물의 보호 효과를 확인한 결과이며,

도 4는 항산화 관련 유전자 발현에 대한 벨루가 렌틸콩 추출물의 영향을 확인한 결과이며,

도 5는 산화적으로 손상을 준 간세포에 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리하였을 때 총 글루타티온(glutathione, GSH) 함량을 확인한 결과이며,

도 6은 산화적으로 손상을 준 간세포에 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리하였을 때 카탈라아제(catalase) 활성을 확인한 결과이며,

도 7은 산화적으로 손상을 준 간세포에 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리하였을 때 GSH 환원효소(glutathione reductase) 활성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0022] 본 발명의 발명자는 여러 종류의 렌틸콩 추출물의 효능에 대하여 연구하던 중, 벨루가 렌틸콩 추출물이 다른 렌틸콩 추출물과 비교하였을 때 폴리페놀(Polyphenol)이 풍부하며 과산화수소와 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능이 뛰어나다는 것을 발견하였다. 이를 기반으로 산화적으로 손상을 준 간세포에 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리하였을 때 글루타티온 생성 증가와 카탈라아제 및 GSH 환원효소의 활성 증가를 통해 세포 내 ROS 생성을 효과적으로 저해함으로써 간세포 보호 효과를 보이는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0023] 따라서 본 발명은 벨루가 렌틸콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 추출물은 메탄올, 물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용매로 추출되며, 메탄올을 용매로 사용하는 것이 바람직하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 상기 간 손상은 과산화수소(hydrogen peroxide), 알코올, 지질, 사염화탄소(CCl_4), 아세트아미노펜(acetaminophen), 티오아세트아마이드(thioacetamide), 타크린(tacrine), 터셔리-부틸하이드로퍼옥사이드(t-butyl hydroperoxide) 및 루브라톡신 B(rubratoxin B)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 간독성 물질에 의한 간의 염증이며, 상기 간독성 물질은 과산화수소인 것이 바람직하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 상기 지질은 중성지질, 유리지방산 또는 과산화지질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 상기 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 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, 프로필히드록시벤

조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0030] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.

[0031] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0032] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 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, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 약학조성물의 유효성분인 벨루가 렌틸콩 추출물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중, 질환에 따라 달라질 수 있으나, 0.001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10 mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0035] 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0036] 더불어 본 발명은 벨루가 렌틸콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0037] 상기 추출물은 메탄올, 물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용매로 추출되며, 메탄올을 용매로 사용하는 것이 바람직하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 상기 간 손상은 과산화수소(hydrogen peroxide), 알코올, 지질, 사염화탄소(CCl_4), 아세트아미노펜(acetaminophen), 티오아세트아마이드(thioacetamide), 타크린(tacrine), 터셔리-부틸하이드로퍼옥사이드(t-butyl hydroperoxide) 및 루브라톡신 B(rubratoxin B)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 간독성 물질에 의한 간의 염증이며, 상기 간독성 물질은 과산화수소인 것이 바람직하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 상기 지질은 중성지질, 유리지방산 또는 과산화지질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품은 유효성분인 벨루가 렌틸콩 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.

[0041] 상기 건강기능식품에 함유된 벨루가 렌틸콩 추출물은 상기 약학조성물의 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.

[0042] 상기 건강기능식품의 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 복합제 등을 들 수 있다.

[0044] 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 당업

계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0046] **<실시예 1> 렌틸콩 추출물의 제조**

[0047] 렌틸콩의 유색별에 따른 기능성을 평가하기 위하여 바른 약초에서 그린 렌틸콩, 마수르 렌틸콩 및 프렌치 렌틸콩을 구매하였고, 벨루가 렌틸콩은 Zursun idaho heirloom beans (Idaho, USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

[0048] 각 렌틸콩 2g을 세척하고 물기를 제거하고 분쇄한 후, 0.2% HCl이 함유된 80% (w/v) 메탄올을 10 부피배 가하고 24시간 동안 진탕 배양하였고 이를 3회 반복하여 각 렌틸콩의 추출액을 얻었다. 추출액은 여과지(Whatman No. 3, England)를 사용하여 여과하여 55℃에서 회전진공농축기(rotary vacuum evaporator, UNI TRAP UT-1000, Eyela, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후에 -70℃에서 48시간 동결건조하였다. 추출물은 분말상태로 -20℃에서 보관하면서 사용하였다.

[0050] **<실시예 2> 벨루가 렌틸콩 추출물의 항산화 성분 함량 측정**

[0051] 상기 실시예 1에서 제조한 4종류의 렌틸콩 추출물의 폴리페놀(polyphenol) 및 플라보노이드(flavonoide)의 함량을 측정하여 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[0052] 총 폴리페놀 함량은 폴린-데니스(Folin-Denis) 방법을 응용하여 측정하였다.

[0053] 4종류의 렌틸콩 추출물을 증류수 1 mL에 녹이고 농도별로 희석 후, 희석한 샘플을 60 μL씩 96-웰 플레이트에 분주하였다. 2배 희석한 폴린-시오칼토 페놀 시약(Folin-Ciocalteu phenol reagent) 60 μL을 첨가하고 3분간 방치한 후 10% 탄산나트륨(sodium carbonate, Na_2CO_3) 60 μL을 넣고 1시간 반응시켰다. 이를 마이크로플레이트 분광 광도계(microplate spectrophotometer(Epoch, Biotek, USA))를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 타닌산(Tannic acid)과 갈산(gallic acid)을 10, 25, 50, 75 또는 100 μg/mL 농도로 녹여 표준 검량 곡선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 구하였으며 타닌산 등가물(tannic acid equivalents, mg TAE/g extract), 갈산 등가물(gallic acid equivalents, mg GAE/g extract)로 나타내었다.

[0054] 총 플라보노이드 함량을 측정하기 위하여, 먼저 4종류의 렌틸콩 추출물을 80% 에탄올을 이용하여 농도별로 희석한 후, 희석한 시료 100 μL를 1.5 mL 튜브에 분주하였다. 860 μL의 80% 에탄올을 시료가 담긴 튜브에 첨가하여 혼합한 후 10% 질산알루미늄(aluminium nitrate)과 1 M 아세트산칼륨(potassium acetate) 20 μL를 첨가하여 혼합하였다. 혼합한 시료를 실온에 40분 방치한 뒤 200 μL를 96-웰 플레이트에 분주 후, 마이크로플레이트 분광 광도계를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 퀘르세틴(Quercetin)을 10, 25, 50, 75 또는 100 μg/mL 농도로 녹여 표준 검량 곡선을 작성하여 총 플라보노이드의 함량을 구하였으며, 퀘르세틴 등가물(quercetin equivalents, QUE mg/g extract)으로 나타내었다.

표 1

[0055]

렌틸콩	mg TAE/g(탄닌산)	mg GAE/g(갈산)
그린 렌틸콩	27.30±0.10	28.39±1.50
마수르 렌틸콩	30.30±0.55	31.32±1.10
프렌치 렌틸콩	28.91±0.25	30.01±1.76
벨루가 렌틸콩	30.21±0.42	31.23±1.22

표 2

[0056]

렌틸콩	mg QUE/g(퀘르세틴)
그린 렌틸콩	16.29±0.71
마수르 렌틸콩	14.75±0.93
프렌치 렌틸콩	13.14±0.81
벨루가 렌틸콩	15.99±1.11

[0057] 그 결과, 4종류의 렌틸콩 추출물 중 벨루가 렌틸콩 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 평균 함량이 가장 높았다.

[0059] **<실시예 3> 렌틸콩 추출물의 H_2O_2 소거 능력(scavenging effect) 확인**

[0060] 더불어 상기 실시예 1에서 제조한 4종류의 렌틸콩 추출물의 H_2O_2 소거 능력을 확인하였고 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[0061] 이를 위해 먼저, 증류수(distill water, DW)에 농도별로 희석한 4 종류의 렌틸콩 추출물 20 μL, 인산완충식염수(Phosphate buffer saline, PBS) 100 μL, 1 mM H_2O_2 20 μL를 96 웰 플레이트에 분주한 후 37℃ 배양기(incubator)에서 5분 반응시켰다. 이후 1.25 mM ABTS 30 μL와 1 U/mL 과산화효소(peroxidase) 30 μL를 가하고 37℃에서 10분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 렌틸콩 추출물의 항산화 활성은 50%의 H_2O_2를 소거하는데 필요한 추출물의 농도를 나타내는 IC_{50}(the half maximal inhibitory concentration) 값으로 나타내었다.

[0062] 이때 대조군으로 10 μg/ml의 뷰틸하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA) 및 아스코르브산(ascorbic acid)을 사용하였다.

표 3

[0063]

렌틸콩	IC50 (μg/mL)
그린 렌틸콩	72.86±4.00
마수르 렌틸콩	61.65±4.58
프렌치 렌틸콩	68.51±2.40
벨루가 렌틸콩	59.72±3.08
BHA(10 μg/ml)	11.98±0.36
아스코르브산(10 μg/ml)	8.27±0.10

[0064] 그 결과, 벨루가, 마수르, 프렌치, 그린 렌틸콩 순으로 소거 활성이 높았으며, 그 중 벨루가 렌틸의 경우 59.72 μg/mL의 IC_{50} 값을 보여 통계 유의적으로 가장 높은 소거 활성을 보였다.

[0066] **<실시예 4> 렌틸콩 추출물의 DPPH 라디칼 소거 능력 확인**

[0067] 더불어 상기 실시예 1에서 제조한 4종류의 렌틸콩 추출물의 DPPH 라디칼 소거 능력을 확인하여 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

[0068] 99% 메탄올에 각 렌틸콩 추출물을 녹여 농도별로 희석한 후, 이를 96웰 플레이트에 160 μL씩 분주하였다. 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 40 μL를 시료가 분주된 웰에 분주하여 실온에 30분간 방치 후 마이크로플레이트 분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 렌틸콩 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 IC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위하여 BHA를 대조군으로 사용하였다.

표 4

[0069]

렌틸콩	IC50 (μg/mL)
그린 렌틸콩	64.49±0.90
마수르 렌틸콩	61.11±1.71
프렌치 렌틸콩	62.60±1.49
벨루가 렌틸콩	57.42±0.81
BHA	5.53±0.02

[0070] 그 결과, 벨루가, 마수르, 프렌치, 그린 렌틸콩 순으로 DPPH 라디칼 소거 활성이 높았으며, 그 중 벨루가 렌틸콩의 경우 57.42 μg/mL의 IC_{50} 값을 보여 통계 유의적으로 가장 높은 소거 활성을 보였다.

[0072] **<실시예 5> 렌틸콩 추출물의 ABTS 라디칼 소거 능력 확인**

[0073] 더불어 상기 실시예 1에서 제조한 4종류의 렌틸콩 추출물의 ABTS 라디칼 소거 능력을 확인하여 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[0074] 먼저, 7 mM의 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbemzthiazoline-6-sulfonic acid))와 2.45 mM 과황산칼륨(potassium persulfate)을 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS 라디칼을 형성시켰다. 그런 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70(±0.02)이 되게끔 PBS(pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 180 μL에 시료 20 μL를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물과 단일 물질의 ABTS 라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 IC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 트롤록스(trolox)를 사용하였다.

표 5

[0076]

렌틸콩	IC_{50} (μg/mL)
그린 렌틸콩	75.69±2.71
마수르 렌틸콩	67.97±2.08
프렌치 렌틸콩	70.82±2.01
벨루가 렌틸콩	66.11±1.71
트롤록스	7.67±0.23

[0077] 그 결과, 벨루가, 마수르, 프렌치, 그린 렌틸콩 순으로 ABTS 라디칼 소거 활성이 높았으며, 그 중 벨루가 렌틸콩의 경우 66.11 μg/mL의 IC_{50} 값을 보여 통계 유의적으로 가장 높은 소거 활성을 보였다.

[0078] 따라서 본 발명에서는 산화적으로 손상을 준 간세포에 대하여, 4종류의 렌틸콩 추출물 중 벨루가 렌틸콩 추출물의 보호 효과를 확인하였다.

[0080] **<실시예 6> 벨루가 렌틸콩 추출물의 세포독성 측정**

[0081] ATCC (American Type Culture Collection)로부터 분양받은 AML12 마우스 간세포를 2×10^4 세포/웰의 밀도로 96 웰 플레이트에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포에 상기 실시예 1에서 제조한 벨루가 렌틸콩 추출물을 10, 50 또는 100 μg/ml 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 2.5 mg/ml 농도로 20 μl씩 각 웰에 처리하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 웰에 100 μl의 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 용해시켰다. 마이크로플레이트 분광광도계(Biotek microplate spectrophotometer)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하고, 시료 처리군의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 세포 독성을 산출하였다.

[0082] 그 결과 도 1과 같이, 100 μg/ml의 농도에서, 벨루가 렌틸콩 추출물은 94.47%로 세포 생존율을 보였으며, 25 내지 100 μg/ml 농도 범위에서는 세포독성이 나타나지 않았다.

[0084] **<실시예 7> H_2O_2 처리에 의한 산화적 손상에 대한 벨루가 렌틸콩 추출물의 간세포 보호 효과 확인**

[0085] H_2O_2는 활성 산소종의 하나로서 세포 내에서 대사과정 중에 발생하며 세포 내 지질, 단백질, 핵산 등을 변형시켜 세포 독성을 나타낼 뿐만 아니라 매우 독성이 강한 히드록시 라디칼(hydroxyl radical)의 공급처(source)이기도 하다. 따라서 H_2O_2에 의한 산화적 손상에 대한 렌틸콩 추출물의 영향을 알아보기 위하여 간세포인 AML12 세포에 H_2O_2를 처리하기 24시간 전에 벨루가 렌틸콩 추출물을 10, 50 또는 100 ㎍/㎖ 농도별로 처리한 다음 세포생존율을 대조군과 비교하여 확인하였다. 세포 생존율은 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 조사하였다.

[0086] 그 결과 도 2와 같이, 7 mM H_2O_2 4시간 처리에 의해 AML12 세포의 생존율은 49.2% 정도로 낮아졌으나, 100 μg/ml 농도로 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리한 경우, 세포 생존율이 74.66%로 증가하여 H2O2 처리에 의한 산화적 손상에 대한 벨루가 렌틸콩 추출물의 보호 효과가 관찰되었다.

[0088] **<실시예 8> H_2O_2가 처리된 간세포에서 벨루가 렌틸콩 추출물의 ROS 생성 저해 효과**

[0089] 산화적 스트레스로 인한 ROS 생성에 벨루가 렌티콩 추출물이 미치는 영향을 확인하였다.

[0090] 먼저, AML12 세포를 1.2×10^5 세포/웰의 밀도로 6 웰 플레이트에 분주하고 24 시간 배양한 후 벨루가 렌틸콩 추출물을 25, 50, 100 μg/ml 농도별로 처리하여 24 시간 배양하였다. 그 후 상층액 배지를 모두 제거하고 새로운

배지를 다시 분주해 준 상태에서 2 mM H_2O_2 를 1시간 동안 처리한 후 25 μmole/ml 농도의 DCF-DA(2′ ,7′ -Dichlorofluorescein diacetate, Sigma)을 분주하고 플레이트 전체를 호일로 감싼 다음 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 30분간 반응시켰다. 그 후 배지를 제거하고 인산완충식염수(phosphate buffer saline, PBS)로 한 차례 세척해준 후 트립신/에틸렌디아민사아세트산(trypsin/에틸렌디아민사아세트산(EDTA))을 처리하여 세포를 떼어내고 2000 rpm의 속도로 5분간 원심분리하여 세포를 모았다. 상층액을 모두 제거한 후, 5 ml 폴리스티렌-둥근 바닥 튜브(polystyrene round-bottom tube, BD Falcon)에 수득한 세포와 PBS 200 μl를 분주하고 유세포분석기(flow cytometry)를 사용하여 형광 강도(fluorescence intensity)를 측정하였다.

[0091] 그 결과 도 3과 같이, H_2O_2를 처리한 AML12 세포의 경우 ROS의 생성이 대조군에 비해 크게 증가한 반면, 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리한 AML12 세포의 ROS 생성량은 처리된 벨루가 렌틸콩 추출물의 농도에 따라 감소하였다. 특히, 100 μg/ml 농도의 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리하였을 때 가장 효과적으로 감소하였다.

[0093] **<실시예 9> 항산화 관련 유전자 발현에 미치는 영향 확인**

[0094] ROS 생성 억제에 관여하는 기전을 연구하기 위해 대표적인 세포내 항산화 시스템을 구성하는 유전자들의 발현에 벨루가 렌틸콩 추출물이 미치는 영향을 조사하였다.

[0095] 이를 위해 정량 실시간 PCR (quantitative real-time PCR, q-PCR) 분석법을 이용하였으며, 항산화 물질인 GSH의 합성에 관여하는 글루타티온 합성 효소(glutathione synthetase, GSS), 글루탐산염-시스테인 연결효소(glutamate-cysteine ligase, GCLC), 글루탐산-시스테인 연결효소 변경유전자 서브유닛(glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM)과 세포내 ROS 대사에 관여하는 대표적인 항산화 효소로 알려진 과산화물제거효소1(superoxide dismutase 1, SOD1), SOD2, 글루타티온 과산화효소 2(glutathione peroxidase 2, GPx2), 카탈라아제(catalase, CAT) 그리고 글루타티온 환원효소(glutathione reductase, GR) 등 총 8종의 유전자를 분석 대상으로 하였다.

[0096] 먼저 배양한 AML12 세포에서 배지를 제거하고 PBS로 두 번 세척한 후 TRI 시약(Mrolecular Research Center, Inc.)을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 이를 1.5 mL 튜브에 150 μL씩 담고 클로로포름(chloroform)을 100 μL 첨가하여 30초간 볼텍스(vortex)하여 실온에서 15분 방치한 후 원심분리 (12,000 rpm, 15분, 4℃)하고 상등액을 취해 새로운 튜브에 옮겼다. 여기에 동량의 2-프로판올(2-propanol, isopropyl alcohol)을 첨가하여 30초간 볼텍스하여 실온에서 4분 방치한 후 원심분리 (12,000 rpm, 15분, 4℃)하고 상등액을 제거한 다음 침전물에 75% 에탄올(ethanol)을 첨가하였다. 이를 원심분리(12,000 rpm, 5분, 4℃)한 후 상층액을 제거하고 RNA 펠렛(pellet)을 공기 중에 정치시킨 다음, 건조된 RNA 펠렛에 DEPC(diethylpyrocarbonate)가 처리된 DW를 첨가하여 65℃ 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 용해시켰다. 용해 후 마이크로플레이트 분광광도계를 이용하여 260/280nm에서 농도 및 순도를 측정하였다. 분리된 총 RNA 1 μg/μL와 올리고(dt)프라이머(oligo(dt) primer) 1 μL을 넣고 총 부피가 12 μL가 되게끔 DEPC를 가하고 65℃에서 5분간 반응시켰다. 이에 DEPC 1 μL, 5X 반응 버퍼(reaction buffer) 4 μL, 10 mM dNTP mix 2 μL, RNAse 억제제 (20 U/μL) 0.5 μL, 역전사효소(reverse transcriptase) 0.5 μL을 더해 42℃에서 60분간 반응시킨 후 70℃에서 5분 동안 가열하여 cDNA를 합성하였다. 총 RNA를 역전사시켜 생성된 cDNA는 하기 표 6의 프라이머를 이용하여 real-time PCR 방법으로 증폭하였다. Real-time PCR의 반응은 cDNA 2 μL, SYBR Green I dye 5 μL, DEPC 2.5 μL를 첨가하여 각각의 프라이머 0.5 μL를 가하고 초기변성 95℃ 30초, 변성은 95℃ 5초, 어닐링(annealing)은 60℃ 30초로 하여 40 싸이클(cycle)을 두 번 진행했다.

표 6

[0097]

타겟 유전자	프라이머 서열	서열번호
Gapdh	5’ -GTATGACTCCACTCACGGCA-3’	1
	5’ -GGTCTCGCTCCTGGAAGATG-3’	2
Tbp	5’ -GTGAAGGGTACAAGGGGGTG-3’	3
	5’ -ACATCTCAGCAACCCACACA-3’	4
Gss	5’ -GAAGCAGCTCGAAGAACTGG-3’	5
	5’ -AGCACTGGGTACTGGTGAGG-3’	6
Gclc	5’ -CTGCACATCTACCACGCAGT-3’	7
	5’ -GTCTCAAGAACATCGCCTCC-3’	8
Gclm	5’ -CCAAAACATCTGGAAACTCCC-3’	9
	5’ -CGGGAACCTGCTCAACTG-3’	10

Sod1	5’-ACCATCCACTTCGAGCAGAA-3’	11
	5’-AAAATGAGGTCCTGCACTGG-3’	12
Sod2	5’-AACTCAGGTCGCTCTTCAGC-3’	13
	5’-GCTTGATAGCCTCCAGCAAC-3’	14
Gpx2	5’-AGGTCGGACATACTTGAGGC-3’	15
	5’-GGTAGTTCTCGGCTTCCCTT-3’	16
Cat	5’-CCCGCGGTCATGATATTAAGT-3’	17
	5’-GATGAAGCAGTGGAAGGAGC-3’	18
Gr	5’-ATCGTGCATGAATTCCGAGT-3’	19
	5’-GGTGGTGGAGAGTCACAAGC-3’	20

[0098] * Gapdh: 글리세르알데히드-3-인산 수소 이탈 효소(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

[0099] * Tbp: 타타상자결합단백질(TATA Box Binding Protein)

[0100] 그 결과 도 4와 같이, 이 중 GSH 합성에 관여하는 효소들인 GCLC, GCLM과 GSH의 환원을 촉매하는 효소인 GR 그리고 H_2O_2 대사에 관여하는 CAT의 유전자 발현이 벨루가 렌틸콩 추출물(100 μg/mL)처리에 의해 대조군 대비 2배 이상 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0102] **<실시예 10> 글루타티온(GSH) 함량 측정**

[0103] 간세포에서 GSH는 항산화, 시스테인(cysteine) 저장, 세포 내 산화·환원 상태의 유지 보수 및 세포 성장 등에 중요한 기능을 수행한다. 간에 독성물질 유입 또는 질병에 의한 손상 시 생체 방어 작용에 의해 그 농도가 증가한다. 따라서 벨루가 렌틸콩 추출물 처리에 의한 GCLC와 GCLM의 유전자 발현 증가가 실제로 GSH 합성에 관여하는지를 확인하고, 또한 H_2O_2처리에 의해 유도된 산화적 스트레스로부터 세포내 GSH 함량을 유지하는 효과가 있는지를 조사하였다.

[0104] 먼저, AML12 세포를 1.2×10^5 세포/웰의 밀도로 6 웰 플레이트에 분주하고 24 시간 배양한 후 벨루가 렌틸콩 추출물을 25, 50, 100 μg/ml 농도별로 처리하여 24 시간 배양하였다. 그 후 상층액 배지를 모두 제거하고 새로운 배지를 다시 분주해 준 상태에서 2 mM H_2O_2를 1시간 처리하였다. 그 후 배지를 모두 제거하고 용해 버퍼를 각 웰마다 50 μl씩 분주하여 세포를 떼어내고 12000 rpm의 속도로 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 따로 분리하여 단백질 정량을 하였다. 단백질 농도는 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)를 표준화한 SIGMA 단백질 분석 키트(SIGMA protein assay kit, Sigma Chem, Co., st. Louis. Mo., USA)를 사용하여 정량하였다. 4% 술포살리실산(sulfosalicylic acid)과 상층액을 1:1 비율로 섞은 후 8000 rpm의 속도로 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 취하여 신선하게 만들어 놓은 이황화물 시약(disulfide reagent, DTNB)와 1:4 비율로 96 웰 플레이트에 분주하였고 이를 실온에서 20분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산화형 GSH의 표준검량선에 준하여 그 양을 산출하였고 GSH 함량은 단백질 1mg당 n 몰로 나타내었다.

[0105] 그 결과 도 5와 같이, 아무런 처리를 가하지 않은 대조군의 GSH 함량은 54.03 nM/mg 단백질이며, H_2O_2를 처리하였을 때 GSH 함량은 38.28 nM/mg 단백질이었다. 하지만 100 μg/ml의 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리한 세포의 GSH 함량은 50.63 nM/mg 단백질로 유의적으로 증가를 보였다.

[0107] **<실시예 11> 카탈라아제 활성도 측정**

[0108] 간에 다량 함유되어 있는 효소인 카탈라아제는 활성산소의 생성을 억제하는 역할을 한다. 앞서 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리한 AML12 세포에서 카탈라아제 mRNA 발현 증가가 확인된 바, 이것이 실제로 산화스트레스 유발의 유무에 따라 카탈라아제 효소 활성에 영향을 주는지를 확인하였다.

[0109] 카탈라아제 활성도의 측정은 H_2O_2를 기질로 사용하여 1분간 반응시키는 동안 H_2O_2가 환원되어 감소하는 흡광도로써 측정하였다.

[0110] AML12 세포를 1.2×10^5 세포/웰의 밀도로 6 웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후 벨루가 렌틸콩 추출물을 25, 50, 100 μg/ml 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 상층액 배지를 모두 제거하고 새로운 배지를 다시 분주해준 상태에서 2 mM H_2O_2를 1시간 처리한 후 배지를 모두 제거하였다. 이에 용해 버퍼를 각 웰마다 50

μl씩 분주하여 세포를 떼어내고 12000 rpm의 속도로 10분간 원심분리하여 상층액을 따로 취한 후 단백질 정량을 하였다. 단백질 농도는 BSA를 표준화한 SIGMA 단백질 분석 키트를 사용하여 정량하였다. 50 mM 인산 칼륨 버퍼(potassium phosphate buffer, pH 7.0) 650 μl에 300 μl의 10 mM H_2O_2와 상층액 50 μl를 첨가하여 25℃에서 1분간 반응시켰다. 250 nm에서 반응 전과 종료 후 각각 흡광도를 측정하고 H_2O_2의 몰 흡광계수인 0.041/mM/cm를 이용하여 활성을 산출하였으며, 활성 단위는 1분간 1 mg의 단백질이 분해하는 H_2O_2의 양을 mM로 나타내었다.

[0111] 그 결과 도 6과 같이, H2O2를 처리한 세포의 카탈라아제 활성도에 비해 25~100 μg/ml의 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리하였을 때 카탈라아제 활성도는 농도 의존적으로 유의적인 증가를 보였다. 특히 100 μg/mL의 농도에서는 양성대조군 (positive control)으로 사용된 GSH (5 mM)와 대등한 카탈라아제 활성 증가를 나타냈다.

[0113] **<실시예 12> 글루타티온 환원효소 활성도 측정**

[0114] 글루타티온은 환원형과 산화형으로 존재하는데 환원형태인 GSH에서 티올 그룹(thiol group)은 시스테인에 전자를 받아 산화 형태인 GSSG(Glutathione disulfide)를 형성하며 이는 다시 글루타티온 환원효소에 의해 환원형 GSH로 재생된다. 건강한 정상세포에서는 전체 GSH의 분포 중 90%가 환원형의 GSH이고 나머지는 GSSG로 존재한다. 세포내 GSSG의 분포가 많아지게 되면 산화적 스트레스가 증가하여 세포 손상이 야기되며, 이때 특히 환원형 GSH의 재생에 관여하는 글루타티온 환원효소의 역할이 중요해진다.

[0115] 앞서 벨루가 렌틸콩 추출물을 처리한 AML12 세포에서 글루타티온 환원효소 mRNA 발현 증가가 확인된 바, 이것이 실제로 산화스트레스 유발의 유무에 따라 글루타티온 환원효소 효소 활성에 영향을 주는지를 확인하였다.

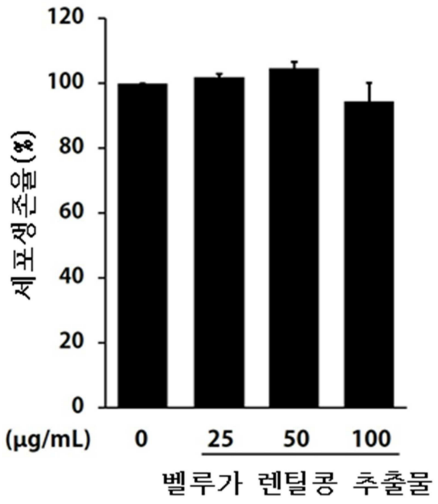
[0116] 그 결과 도 7과 같이, H_2O_2를 처리한 세포의 경우 글루타티온 환원효소의 효소 활성이 54.45 nmol NADH/min/mg 단백질로 대조군에 비해 크게 감소하였지만, 벨루가 렌틸콩 추출물 (25~100 μg/mL) 처리에 의해 글루타티온 환원효소 활성도는 농도 의존적으로 유의적인 증가를 보였다.

[0117] 이상의 연구 결과들을 종합해 볼 때, 산화적 스트레스에 대한 벨루가 렌틸콩 추출물의 간세포 보호효과는 GCLC와 GCLM의 발현 유도를 통한 GSH 합성 증가와 카탈라아제 및 글루타티온 환원효소의 활성 증가를 통한 세포내 ROS의 효과적인 감소에 부분적으로나마 기인하는 것임을 알 수 있었다.

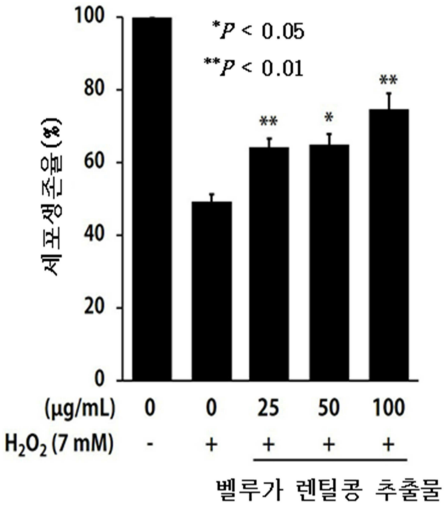
[0119] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

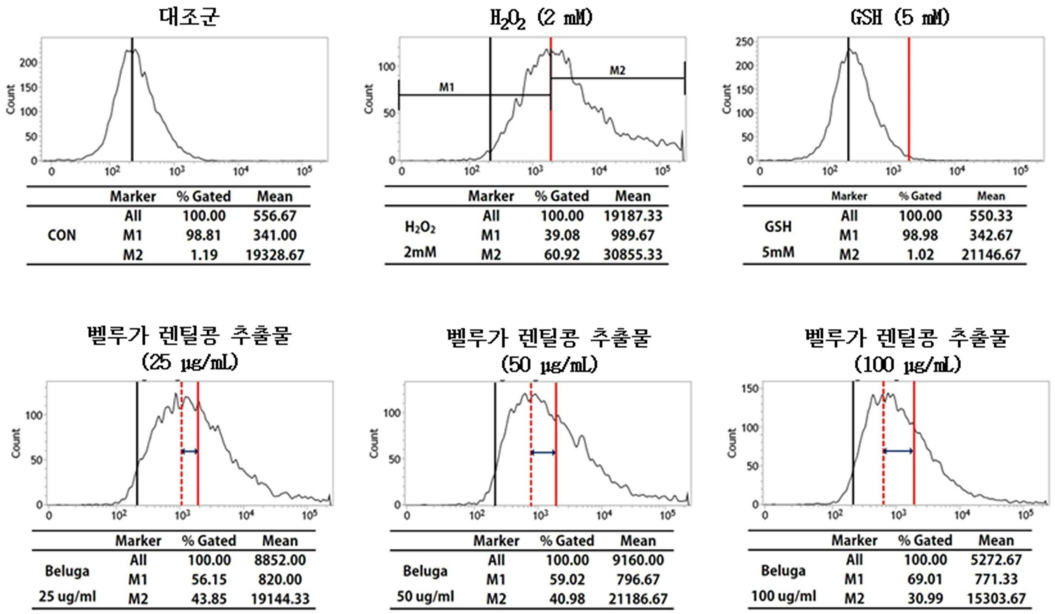
도면1



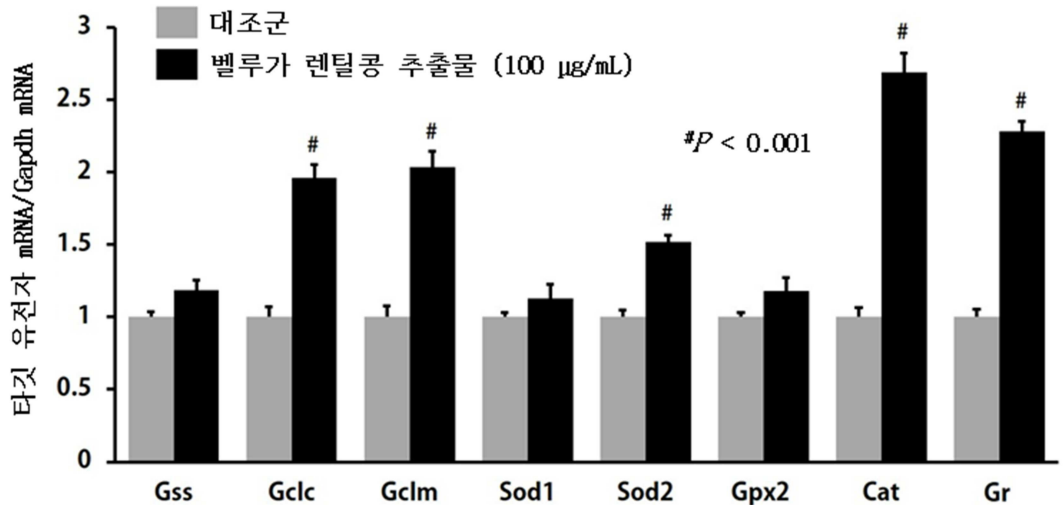
도면2


100
80
60
40
20
0
세포생존율(%)
*P < 0.05
**P < 0.01
**
*
**
(μg/mL) 0 0 25 50 100
H2O2 (7 mM) - + + + +
벨루가 렌틸콩 추출물

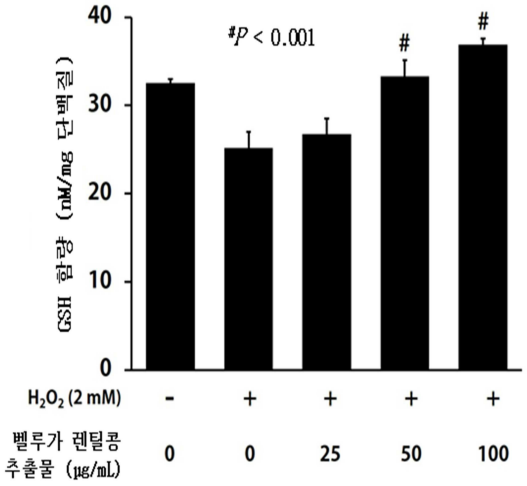
도면3


대조군
Count
Marker % Gated Mean
CON All 100.00 556.67
M1 98.81 341.00
M2 1.19 19328.67
H2O2 (2 mM)
M1
M2
Marker % Gated Mean
H2O2 2mM All 100.00 19187.33
M1 39.08 989.67
M2 60.92 30855.33
GSH (5 mM)
Marker % Gated Mean
GSH 5mM All 100.00 550.33
M1 98.98 342.67
M2 1.02 21146.67
벨루가 렌틸콩 추출물 (25 μg/mL)
Marker % Gated Mean
Beluga 25 ug/ml All 100.00 8852.00
M1 56.15 820.00
M2 43.85 19144.33
벨루가 렌틸콩 추출물 (50 μg/mL)
Marker % Gated Mean
Beluga 50 ug/ml All 100.00 9160.00
M1 59.02 796.67
M2 40.98 21186.67
벨루가 렌틸콩 추출물 (100 μg/mL)
Marker % Gated Mean
Beluga 100 ug/ml All 100.00 5272.67
M1 69.01 771.33
M2 30.99 15303.67

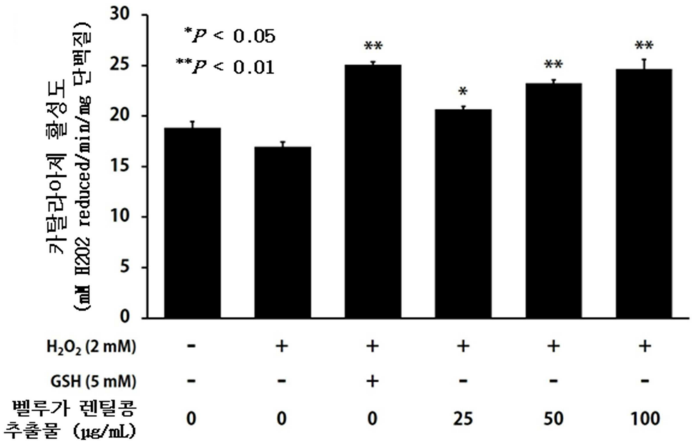
도면4


대조군
벨루가 렌틸콩 추출물 (100 μg/mL)
#P < 0.001
타깃 유전자 mRNA/Gapdh mRNA
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Gss
Gclc
Gclm
Sod1
Sod2
Gpx2
Cat
Gr

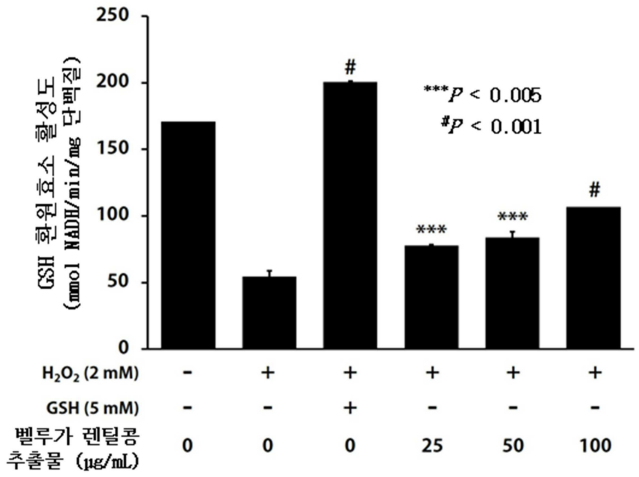
도면5


#P < 0.001
GSH 함량 (nM/mg 단백질)
40
30
20
10
0
H2O2 (2 mM) - + + + +
벨루가 렌틸콩 추출물 (μg/mL) 0 0 25 50 100

도면6


*P < 0.05
**P < 0.01
카탈라아제 활성도
(mM H2O2 reduced/min/mg 단백질)
30
25
20
15
10
5
0
H2O2 (2 mM) - + + + + +
GSH (5 mM) - - + - - -
벨루가 렌틸콩 추출물 (μg/mL) 0 0 0 25 50 100

도면7



서 열 목 록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY

<120> Composition for preventing or treating hepatic injury comprising beluga lentil extract

<130> ADP-2015-0484

<160> 20

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gapdh forward primer

<400> 1

gtatgactcc actcacggca 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gapdh reverse primer

<400> 2

ggtctcgctc ctggaagatg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tbp forward primer

<400> 3

gtgaagggta caaggggtg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tbp reverse primer

<400> 4

acatctcagc aacccacaca 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gss forward primer

<400> 5

gaagcagctc gaagaactgg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gss reverse primer

<400> 6

agcactgggt actggtgagg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gclc forward primer

<400

> 7

ctgcacatct accacgcagt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gclc reverse primer

<400> 8

gtctcaagaa catcgcctcc 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gclm forward primer

<400> 9

ccaaaacatc tggaaactcc c 21

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gclm reverse primer

<400> 10

cgggaacctg ctcaactg 18

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sod1 forward primer

<400> 11

accatccact tcgagcagaa 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sod1 reverse primer

<400> 12

aaaatgaggt cctgcactgg 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sod2 forward primer

<400> 13

aactcaggtc gctcttcagc 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sod2 reverse primer

<400> 14

gcttgatagc ctccagcaac 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gpx2 forward primer

<400> 15

aggtcggaca tacttgaggc 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gpx2 reverse primer

<400> 16

ggtagttctc ggcttccctt 20

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cat forward primer

<400> 17

cccgcggtca tgatattaag t 21

<210> 18

<

211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cat reverse primer

<400> 18

gatgaagcag tggaaggagc 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gr forward primer

<400> 19

atcgtgcatg aattccgagt 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gr reverse primer

<400> 20

ggtggtggag agtcacaagc 20