



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0004260
(43) 공개일자 2012년01월12일

(51) Int. Cl.

A61K 36/33 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0065026

(22) 출원일자 2010년07월06일

심사청구일자 2010년07월06일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 종암로 1 (안암동5가, 고려대역)

(72) 발명자

손용석

서울특별시 광진구 독성로34길 67, A동 1402호 (자양동, 광진트라펠리스)

함상욱

경기도 고양시 덕양구 벽제동 푸른마을1단지 동익미라벨 105-902

박지은

경기도 파주시 적성면 식현2리 삼광3길 6번지

(74) 대리인

김선애

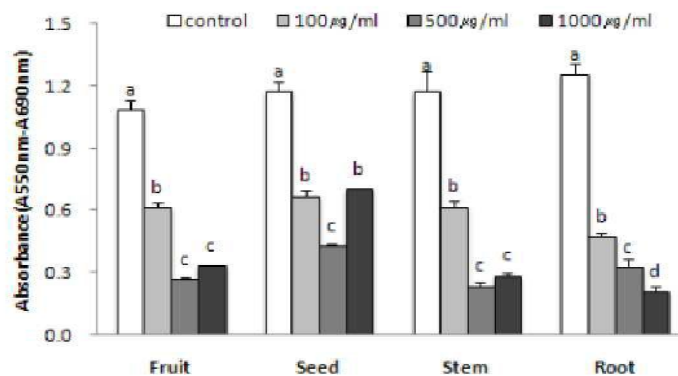
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물 및 건강기능성 식품 조성물에 관한 것이다. 상기 본 발명에 의한 천년초선인장 유기용매 추출물은 상대적으로 부작용 및 독성 발현율이 적고 생체 친화적이며 자궁경부암 세포의 성장억제, 세포주기의 지연 및 세포사멸의 유도 효과가 있어 자궁경부암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 200901010821020010200

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 농업기술센터연구개발지원사업

연구과제명 [협동] 천년초의 건강기능성 효과에 관한 연구

기여율

주관기관 고양시농업기술센터

연구기간 2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유기용매는 헥산 또는 에틸아세테이트인 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 자궁경부암 세포의 성장억제, 세포주기의 지연 및 세포사멸의 유도하는 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 4

천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 유기용매는 헥산 또는 에틸아세테이트인 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예방 또는 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 조성물은 자궁경부암 세포의 성장억제, 세포주기의 지연 및 세포사멸의 유도하는 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예방 또는 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 천년초선인장 (*Opuntia humifusa*) 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 자궁경부암 세포의 성장억제, 세포주기의 지연 및 세포사멸의 유도로 자궁경부암을 예방하거나 치료할 수 있는 천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물 및 건강기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 과학기술의 발전은 많은 질병의 치료를 가능하게 하였다. 그럼에도 불구하고 식습관 등의 환경적 요인에 의한 만성퇴행성 질환은 증가하고 있으며, 암은 그 대표적인 질병으로 현대사회에서 인류복지에 큰 위협이 되고 있다. 특히 자궁경부암의 경우에 있어 조기 진단으로 인하여 유병율이 감소되고는 있지만 여전히 여성에서 유방암 다음으로 높은 암 사망률의 원인이 되고 있다.

[0003] 현재 암 환자의 치료제 개발은 계속 연구되고 있으나 현재 임상에서 널리 사용되고 있는 항암제의 대부분은 합성물질들로 부작용이 매우 심하여 자주 그 문제점이 대두되고 있다. 최근에는 부작용이 적으면서 유효한 항암제를 개발하기 위해 천연 식물 자원으로부터 생리활성을 가진 물질 검색이 많이 이루어지고 있다. 따라서 암의 발생 후 치료뿐만 아니라, 암의 발생을 예방하기 위한 독성이 적고 효과적인 천연물 유래의 항암제 개발이 필요하다.

[0004] 한편, 손바닥 선인장은 전 세계적으로 알려진 약 4,000여 종의 선인장 가운데 한 종류이며, 대부분 열대 및 아

열대성으로 국내에는 도입종인 백년초(*Opuntia ficus-indica*)가 온난한 제주도 지방을 중심으로 재배 생산되고 있고, 이미 국내외적으로 많은 연구가 이루어지고 건강식품의 형태로 상품화되어 있다.

[0005] 이와 대조적으로 천년초선인장(*Opuntia humifusa*)은 손바닥 선인장류의 일종이지만 사계절이 뚜렷한 온대지역에 자생하며 월동이 가능한 다년생이고, 우리나라 토종 선인장으로, 한반도 전역에서 노지재배에 의한 생산이 가능하며, 현재 경기 및 충남 지역에서 주로 생산되고 있다(한승호, 김길수, 김복현 등, 천연초 선인장의 안전 생산 기술 개발 및 접촉성 피부염 치료제 개발, 2008).

[0006] 천년초선인장은 백년초에 비하여 덜 알려져 있을 뿐만 아니라, 연구를 통하여 밝혀진 정보가 적은 실정이다. 천년초선인장은 초기연구단계로서 토종선인장으로 주로 국내에서만 연구가 이루어지고 있으며, 골다공증 방지, 유방암 세포 성장 억제 효과에 대한 연구(Korean J. Food & Nutr. Vol.22. No. 4, 485-491. 2009) 및 발효액을 이용한 자궁경부암 세포주에 대한 항암작용에 대한 연구가 알려진 정도이다. 특히 대한민국 특허 제10-0698533호에는 월동선인장의 발효액을 이용한 항균 감염증 및 항암 작용에 대한 예방 및 치료용 조성물의 제조 방법이 공개되어 있으나, 물, 메탄올 및 에탄올 추출물은 항암활성이 없어, 효모균이나 유산균을 첨가하여 발효하는 단계를 거쳐야 한다고 기재되어 있다. 따라서 상기 특허의 경우 효모균이나 유산균을 첨가하여 발효하는 단계를 거쳐야 하므로 공정이 복잡한 단점이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 천년초선인장이 백년초에 비하여 페놀(phenol)과 플라보노이드(flavonoid) 성분 함량이 높다고 밝혀진 점 등으로 보아 인체건강에 미치는 기능성은 더욱 다양하고 뛰어날 수 있을 것으로 기대되는 바, 본 발명자들은 천년초 선인장(*Opuntia humifusa*)의 핵산 및 에틸아세테이트 추출물에 의한 자궁경부암 예방 또는 치료 효과에 대해서 지속적인 연구를 한 결과, 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에서 MTT assay를 통하여 세포 증식 억제를 확인하였을 뿐만 아니라, 유세포분석(flow cytometry)을 통해 세포분열의 지연 및 세포사멸 유도를 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기한 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 조성물은 자궁경부암 세포의 세포주기의 지연 및 세포사멸의 유도하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한, 상기 유기용매는 핵산 또는 에틸아세테이트인 것을 특징으로 한다.

[0015] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0016] 본 발명은 천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 조성물을 제공한다.

- [0017] 본 발명에 있어서 상기 조성물을 자궁경부암세포(HeLa)에 처리하여 천년초 선인장 핵산 및 에틸아세테이트 추출물이 자궁경부암세포 성장억제 및 세포주기에 미치는 영향을 평가하였다. 이를 통하여 천년초선인장 추출물의 자궁경부암 예방 또는 개선 내지 치료 가능성을 확인하고자 하였다.
- [0018] 그 결과, 본 발명에 의한 천년초선인장 유기용매 추출물을 함유하는 조성물은 자궁경부암세포 성장억제 및 세포주기 진행 지연에 효과가 있는 것으로 나타났다. 보다 구체적으로 본 발명에 의한 천년초선인장 유기용매 추출물의 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에 대한 암세포 증식 억제 효과는 다음과 같다. 핵산 추출물을 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 경우 모두 유의적으로 HeLa 세포의 증식을 억제하였고, 추출물의 농도를 500 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가했을 때 50% 이상의 높은 억제효과를 나타내었다(도 1). 그리고 HeLa 세포에 대한 에틸아세테이트 추출물의 암세포 성장억제 효과는 OHF-E와 OHR-E에서 40% 이상의 증식 억제효과를 보였다(도 2). 또한 핵산 또는 에틸아세테이트 추출물을 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하고 24, 72, 120 시간동안 배양하였을 경우 시간-의존적으로 자궁경부암 세포를 억제하는 것으로 나타났다(도 3 및 도 4).
- [0019] 한편, 조직의 항상성은 세포 증식과 아포토시스(apoptosis) 사이의 균형에 의해 조절되고, 세포증식, 세포주기의 진행과 아포토시스(apoptosis)의 균형이 비정상적으로 이루어지면 암이 유발된다. 그러므로 암세포의 세포증식을 억제하고 세포주기 진행을 지연하며 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 것은 암을 억제하는 효과적인 방법이다. 본 발명에서는 선행된 세포독성(cytotoxicity) 실험에서 효과 있는 천년초선인장의 부위 추출물을 선정하여 각 암세포의 세포주기 진행에 미치는 영향을 조사하였다. 세포 배양액에 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하여 24시간 배양한 후 세포 DNA (cellular DNA)를 프로피디움 요오드화물(propidium iodide)로 염색하여 유세포분석(flow cytometry) 방법으로 세포주기를 분석하였다.
- [0020] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 천년초선인장 OHF-E와 OHS-H, OHSt-H를 처리한 HeLa세포에서 G1기의 세포가 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다($P<.05$). 반면 S기와 G2/M기의 세포는 천년초추출물에 의해 유의적으로 감소하였는데($P<.05$), 이는 천년초추출물이 HeLa 세포의 G1 arrest를 유도함을 나타내는 것이다. OHF-E 와 OHR-E를 처리하였을 경우 sub-G1기의 세포가 증가함을 보여주고 있다. 이는 아포토시스(apoptosis)가 일어난 세포가 증가한 것으로 해석할 수 있다. HeLa 세포에 OHF-E, OHSt-E와 OHS-H를 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 후 24시간 배양한 결과, 처리한 추출물에서 non-apoptotic cell death가 일어난 세포수는 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며($P<.05$), 특히 줄기의 에틸아세테이트 추출물은 가장 높은 세포사멸 효과를 보여주었다(도 6).
- [0021] 따라서 본 발명에 의한 천년초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 천연추출물을 기반으로 한 자궁경부암의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 천년초선인장 추출물은 종래 천연물 추출에 널리 알려진 추출용매인 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출될 수 있으나, 바람직하게는 천년초선인장의 핵산(hexane) 또는 에틸아세테이트(ethyl acetate) 추출물로 상기 추출물이 항암효과가 우수한 것으로 나타났다. 핵산 추출은 미량성분들까지 폭 넓게 추출가능하며 주로 기름을 추출할 때 이용하는 방법이다. 상기 핵산 및 에틸아세테이트의 농도는 특별히 제한이 있는 것은 아니나, 80% 이상의 핵산 또는 에틸아세테이트인 경우 추출 효율을 높일 수 있다. 상기 핵산 추출물은 극성이 다른 유기용매를 이용하여 더욱 분획할 수 있으며, 각종 크로마토그래피를 이용하여 더욱 정제할 수도 있다.
- [0023] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 천년초선인장 추출물은 추출 부위에 특별히 제한이 있는 것은 아니며, 열매(열매에서 종자를 분리하고 남은 과육), 종자, 줄기 및 뿌리의 유기용매 추출물로서 발효액이 아닌 그 자체를 이용하여 추출한 것이다. 다만 천년초 종자의 핵산 추출물, 열매 또는 줄기의 에틸아세테이트 추출물이 세포주기의 지연 및 세포사멸 유도의 항암효과가 높아 바람직하다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 추출물에는, 추출, 분획 및 정제 처리의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그 희석액 또는 농축액, 또는 그 건조물 중 어느 하나라도 포함하는 것으로 한다.
- [0025] 본 발명의 조성물에서, 바람직하게는 조성물 총중량에 대하여 상기 천년초선인장 추출물은 0.0001 내지 90 중량

%로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에서, 당업계에 알려진 통상의 방법에 의해 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 주사제, 크림, 젤, 패취, 분무제 또는 연고제 등의 형태로 제제화될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 천연초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은, 약제학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 천연초선인장 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0027] 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 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 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.

[0028] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 기준으로 0.0001 내지 1000 mg/kg으로, 보다 효과적이기 위해 0.01 내지 150 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 추출물은 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0030] 본 발명에 의한 다른 양태에 따르면, 본 발명은 천연초선인장 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁경부암의 예방 또는 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0031] 상기 조성물은 자궁경부암 세포의 생장억제, 세포주기의 지연 및 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 한다. 따라서 본 발명에 의한 천연초선인장 추출물을 함유하는 식품 조성물은, 자궁경부암의 예방 또는 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물로 이용될 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함한다. 본 명세서에서 건강기능성 식품이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0033] 본 발명의 식품 조성물에서, 바람직하게는 상기 추출물은 조성물 총중량에 대하여 0.0001 내지 90 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명의 식품은, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 더 포함할 수도 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료 형태로 제제화될 수 있다.

[0034] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능성 식품은 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 첨가제를 넣어 고르게 섞은 것을 적당한 방법으로 과립상으로 한 다음 활택제 등을 넣어 압축성형하여 조제하거나 정제 형태의 건강기능식품을 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 것을 직접

압축성형하여 만들거나 또는 미리 만든 과립에 건강기능식품을 그대로 혹은 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 다음 압축성형하여 조제하거나 건강기능식품에 부형제, 결합제 또는 다른 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 분말을 용매로 습윤시키고, 습윤된 분말을 저압으로 틀에 넣어서 성형한 후, 적당한 방법으로 건조하여 조제한다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품에 필요에 따라 교미제 등을 넣을 수 있으며, 적당한 제피제로 제피 가능하다.

[0035] 상기 캡셀 형태의 건강기능성 식품 중 경질캡셀제는 보통 캡셀에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 고르게 섞은 것 또는 적당한 방법으로 입상으로 한 것 또는 입상으로 한 것에 적당한 제피제로 제피한 것을 그대로 또는 가볍게 성형하여 충전하여 조제하며, 연질캡셀제는 보통 캡셀에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 넣은 것을 젤라틴 등 적당한 캡셀기체에 글리세린 또는 소르비톨 등을 넣어 소성을 높인 캡셀기체로 피포하여 일정한 형상으로 성형하여 조제하며, 필요에 따라 상기 캡셀기체에 착색료 보존료 등을 첨가할 수 있다.

[0036] 상기 환형태의 건강기능성 식품은 보통 건강기능식품에 부형제, 결합제, 붕해제 등을 고르게 섞은 다음 적당한 방법으로 구상으로 성형하여 조제하며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 조성물은, 관련 질환의 예방을 위한 건강보조식품의 식품보조첨가제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0038] 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은, 일반적으로 본 발명의 식품 조성물의 경우 전체식품 중량의 0.0001 내지 90 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물의 경우 100ml를 기준으로 0.0001 내지 20 중량%로 가할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 정의되는 추출물 이외의 식품보조첨가제는 당업계에 통상적인 식품첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함하며 하기에 예시한다.

[0040] 상기 음료 조성물의 경우, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물 이외 함유하는 액체 성분에는 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 예를 들어, 포도당, 과당 등의 모노사카라이드 예를 들어, 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드 예를 들어, 텍스트린, 사이클로 텍스트린 등의 폴리사카라이드 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0041] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.001 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0042] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 의한 천연조선인장 유기용매 추출물은 자궁경부암 세포의 성장억제, 세포주기의 지연 및 세포사멸의 유도 효과가 있으므로 자궁경부암의 예방 또는 치료 내지 개선에 효과적으로 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 의한 천연조선인장 추출물은 천연물 추출물로서 상대적으로 부작용 및 독성 발현율이 낮고 생체 친화적으로 자궁경부암을 예방, 치료 또는 개선할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

[0043] 나아가, 본 발명은 천연조선인장 추출물의 활용범위를 단순한 식품에서 예방용 혹은 치료용 약물로까지 확대시킴으로써 천연조선인장의 가치를 높이고 관련 업종 종사자의 수입증대로 까지 이어질 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 본 발명에 의한 천년초선인장 핵산 추출물의 자궁경부암세포 성장 억제 효과를 나타낸 도면이다. 평균±표준오차(n=3), 서로 다른 윗첨자는 통계적으로 유의차가 있음을 의미함(p<0.05).
- 도 2는 본 발명에 의한 천년초선인장 에틸아세테이트 추출물의 자궁경부암세포 성장 억제 효과를 나타낸 도면이다. 평균±표준오차(n=3), 서로 다른 윗첨자는 통계적으로 유의차가 있음을 의미함(p<0.05).
- 도 3은 본 발명에 의한 천년초선인장 핵산 추출물의 장시간 처리 시 자궁경부암세포의 성장 억제 효과를 나타낸 도면이다. 평균±표준오차(n=3), 서로 다른 윗첨자는 통계적으로 유의차가 있음을 의미함(p<0.05).
- 도 4는 본 발명에 의한 천년초선인장 에틸아세테이트 추출물의 장시간 처리 시 자궁경부암세포의 성장 억제 효과를 나타낸 도면이다. 평균±표준오차(n=3), 서로 다른 윗첨자는 통계적으로 유의차가 있음을 의미함(p<0.05).
- 도 5는 본 발명에 의한 천년초선인장 추출물 처리 시 자궁경부암세포의 세포주기 지연 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 6은 본 발명에 의한 천년초선인장 추출물 처리 시 자궁경부암세포의 세포사멸 효과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0046] 실시예 1. 천년초선인장 추출물 제조

[0047] 1-1. 천년초선인장 열매 추출물 제조

- [0048] 천년초선인장(*Opuntia humifusa*)의 열매(종자를 분리한 과육) 1.36kg을 동결건조 및 분쇄하여 메탄올 8L을 첨가하고 실온에서 48 내지 72시간씩 3회 상온추출한 후, 여과지(Whatman No.2, Maidstone, England)로 여과하고 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator; R-210 Rotavapor, BUCHI Co.)로 농축하여 천년초 선인장 열매 추출물 230g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “OHF-M”이라 명명함).

- [0049] 상기 천년초선인장 열매 추출물(OHF-M) 230g을 핵산 2L, 에틸아세테이트 2L 및 물 2L로 순차 분획한 후, 농축 및 동결 건조하여 천년초선인장 열매의 핵산가용성 분획물(OHF-H) 25g, 에틸아세테이트가용성 분획물(OHF-E) 4g 및 수가용성 분획물(OHF-W) 201g을 각각 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0050] 1-2. 천년초선인장 종자 추출물 제조

- [0051] 천년초선인장(*Opuntia humifusa*)의 종자 1.53kg을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-1과 동일한 공정을 수행하여 천년초선인장 종자 추출물 80g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “OHS-M”이라 명명함).

- [0052] 상기 천년초선인장 종자 추출물(OHS-M) 80g을 핵산 2L, 에틸아세테이트 2L 및 물 2L로 순차 분획한 후, 농축 및 동결 건조하여 천년초선인장 종자의 핵산가용성 분획물(OHS-H) 21g, 에틸아세테이트가용성 분획물(OHS-E) 3.1g 및 수가용성 분획물(OHS-W) 55.9g을 각각 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0053] 1-3. 천년초선인장 줄기 추출물 제조

- [0054] 천년초선인장(*Opuntia humifusa*)의 줄기 800g을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-1과 동일한 공정을 수행하여 천년초선인장 줄기 추출물 80g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “OHSt-M”이라 명명함).

- [0055] 상기 천년초선인장 줄기 추출물(OHSt-M) 80g을 핵산 2L, 에틸아세테이트 2L 및 물 2L로 순차 분획한 후, 농축 및 동결 건조하여 천년초선인장 줄기의 핵산가용성 분획물(OHSt-H) 20g, 에틸아세테이트가용성 분획물(OHSt-E)

1.7g 및 수가용성 분획물(OHSt-W) 58.3g을 각각 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0056] 1-4. 천년초선인장 뿌리 추출물 제조

[0057] 천년초선인장(*Opuntia humifusa*)의 뿌리 16g을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-1과 동일한 공정을 수행하여 천년초선인장 뿌리 추출물 2g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “OHR-M”이라 명명함).

[0058] 상기 천년초선인장 뿌리 추출물(OHR-M) 2g을 헥산 2L, 에틸아세테이트 2L 및 물 2L로 순차 분획한 후, 농축 및 동결 건조하여 천년초선인장 뿌리의 헥산가용성 분획물(OHR-H) 0.35g, 에틸아세테이트가용성 분획물(OHR-E) 0.24g 및 수가용성 분획물(OHR-W) 1.41g을 각각 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 천년초선인장의 각 부위별 추출물의 수득율을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

용매	천년초선인장 (<i>Opuntia humifusa</i>)			
	열매(%)	종자(%)	줄기(%)	뿌리(%)
메탄올	16.91	5.23	10	12.50
헥산	1.83	1.37	2.50	2.18
에틸아세테이트	0.29	0.20	0.21	1.50
물	14.78	3.65	7.29	8.81

[0060] 실시예 2. 세포 배양

[0061] 본 발명에 사용한 암세포주는 자궁 경부암 세포인 HeLa(human cervix adenocarcinoma)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하였다. HeLa 세포주는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Caisson, USA)에 10% 우태혈청(fetal bovine serum, Gemcell, Gemini, USA)과 1% L-글루타민(Caisson, USA)과 1% 페니실린 및 스트렙토마이신(Caisson, USA)이 함유된 배지를 사용하여, 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0062] 실시예 3. 자궁경부암세포 증식 억제효과 측정(Cytotoxicity)

[0063] 천년초선인장 추출물의 암세포 증식억제 효과는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,3 diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay(Roche, Germany)를 사용하여 행하였다. 세포주를 1 x 10⁴ cells/well의 밀도로 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 배양시킨 후 천년초선인장 부위별 추출물을 0, 100, 500, 1000 µg/ml의 농도로 첨가하여 24시간 배양하였다. 각 웰(well)에 MTT labeling reagent(Roche, Germany)를 10 µL씩 첨가하고 4시간 동안 배양(37℃, 5% CO₂)한 후 solubilization solution(Roche, Germany)을 100 µL씩 첨가하여 인큐베이터(incubator)에 10시간 유지시키고, 550 nm에서 ELISA reader(PowerWaveXS, Bio-tek, Winooski, USA)로 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 1 내지 도 4에 나타내었다.

[0064] 실시예 4. 자궁경부암세포 주기 분석

[0065] HeLa 세포를 3 x 10⁵ cells/well의 밀도로 6 well-plate에 분주하여 24시간 동안 배양(37℃, 5% CO₂)시킨 후 천년초선인장 추출물을 100 µg/mL 씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. PBS로 세포 단층을 씻어낸 후 트립신-EDTA를 첨가하여 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 차가운 70% 에탄올을 넣어 -20℃에서 1시간 보관한 다음 고정한 후 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, Sigma)을 첨가하고 30분간 염색하여 FACSCalibur (Becton Dickinson, USA)를 사용해서 유세포분석(flow cytometry) 방법으로 세포주기를 분석하였다.

[0066] 실시예 5. 자궁경부암세포 사멸 분석

[0067] 세포를 6 well-plate에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 천년초선인장 추출물을 100 µg/mL씩 분주하여 24시간

동안 배양하였으며, PBS로 세포 단층을 씻어낸 후 트립신-EDTA를 첨가하여 세포를 수집하였다. Annexin V-FITC(BD Pharmingen, USA)를 50 µg/mL 프로피디움 요오드(propidium iodide)와 1:100 비율로 혼합하여 세포를 암실에서 15분 염색한 후 FACSCalibur(Becton Dickinson)를 사용하여 유세포분석(flow cytometry) 방법으로 아포토틱 셀(apoptotic cell) 수를 측정하였다.

[0068] 본 발명에서는 100% 헥산(hexane)을 이용하여 천년초선인장의 유효성분을 추출하였다. 천년초선인장을 믹서기에 갈아서 균질화 시킨 후 헥산(hexane)을 첨가하여 24시간 동안 교반시켰다. 그리고 약 5시간을 기다려 상층액을 분리한 후, 유기용매 전용 필터에 거른 후 여과된 액체를 증기 추출기에 넣고 헥산(hexane) 성분을 분리하여 천년초선인장의 유효성분만을 추출 하였다.

[0069] 제제예 1. 건강기능성 식품의 제조

[0070]	천년초선인장 추출물	1000 mg
[0071]	(OHSt-E)	
[0072]	비타민 혼합물	적량
[0073]	비타민 A 아세테이트	70 µg
[0074]	비타민 E	1.0 mg
[0075]	비타민 B1	0.13 mg
[0076]	비타민 B2	0.15 mg
[0077]	비타민 B6	0.5 mg
[0078]	비타민 B12	0.2 µg
[0079]	비타민 C	10 mg
[0080]	비오틴	10 µg
[0081]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0082]	엽산	50 µg
[0083]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0084]	무기질 혼합물	적량
[0085]	황산제1철	1.75 mg
[0086]	산화아연	0.82 mg
[0087]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0088]	제1인산칼륨	15 mg
[0089]	제2인산칼슘	55 mg
[0090]	구연산칼륨	90 mg
[0091]	탄산칼슘	100 mg
[0092]	염화마그네슘	24.8 mg
[0093]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능성 식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능성 식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	

[0094] 제제예 2. 건강기능성 음료의 제조

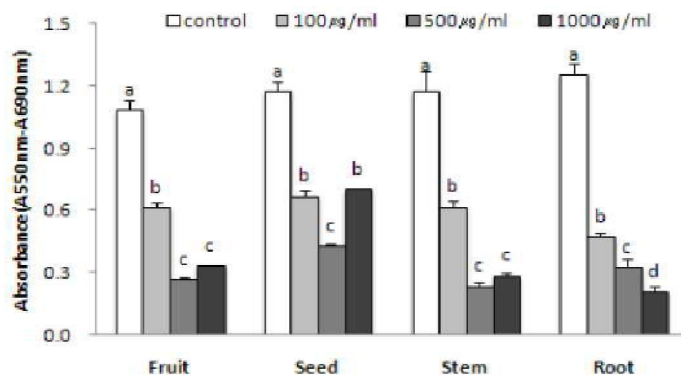
- [0095] 천년초선인장 추출물 1000 mg
- [0096] (OHSt-E)
- [0097] 구연산 1000 mg
- [0098] 올리고당 100 g
- [0099] 매실농축액 2 g
- [0100] 타우린 1 g
- [0101] 정제수를 가하여 전체 900 ml

[0102] 통상의 건강기능성 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강기능성 음료 조성물 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

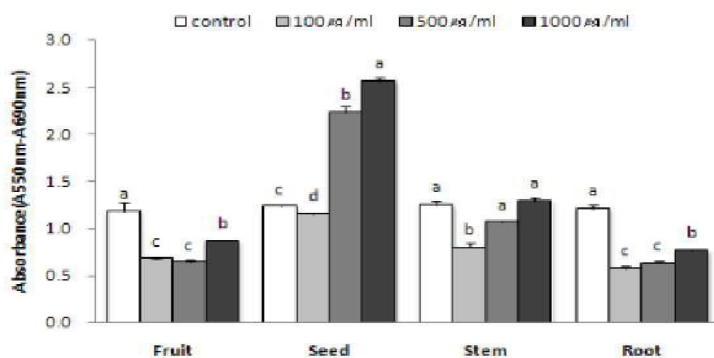
[0103] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

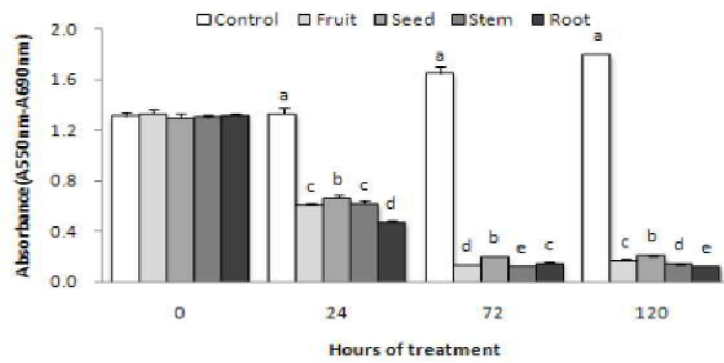
도면1



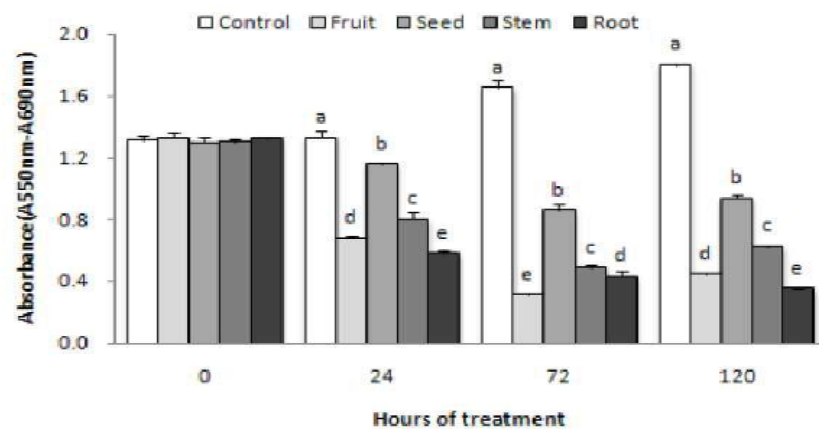
도면2



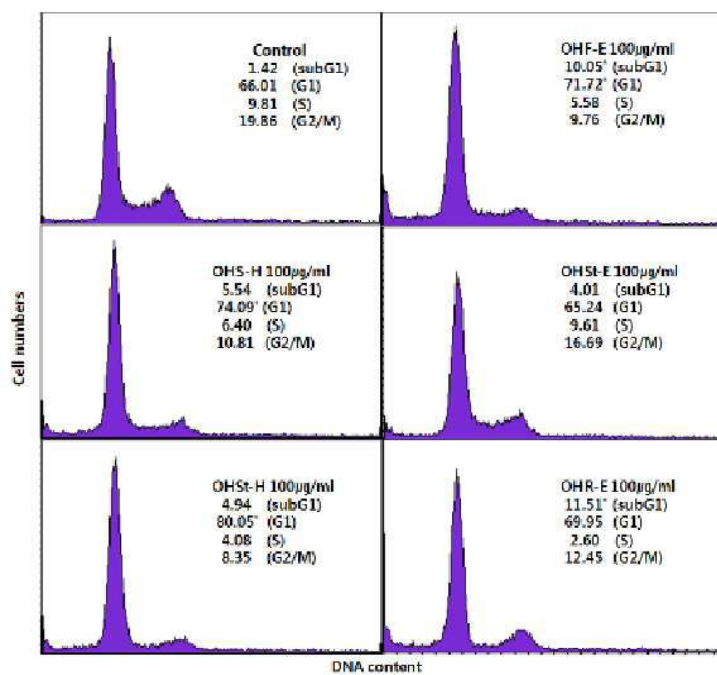
도면3



도면4



도면5



도면6

