(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0126711
(43) 공개일자 2018년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/899 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/899 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0061451
(22) 출원일자 2017년05월18일
심사청구일자 2017년05월18일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
권효정
대전광역시 유성구 지족로 343, 204동 1204호 (지족동, 반석마을아파트)
(74) 대리인
최규환

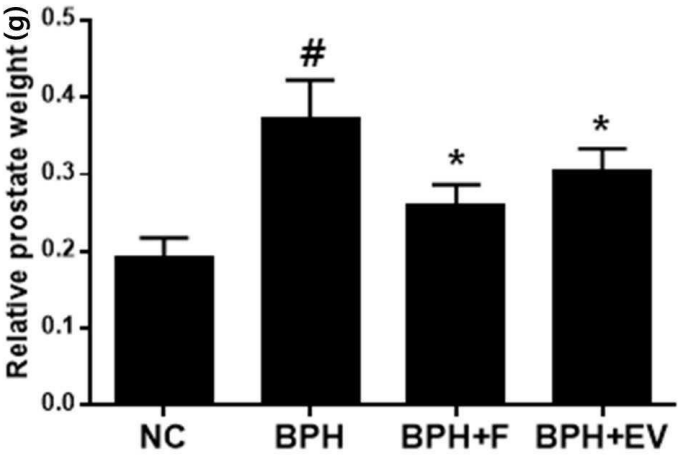
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **나도개피 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 나도개피 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분인 나도개피 추출물은 전립선 비대(BPH)에 의해 비후화된 전립선의 무게를 감소시키며, 안드로겐 수용체(androgenic receptor) 또는 전립선 특이항원(prostate specific antigen) 단백질의 발현을 억제할 뿐만 아니라, 혈청 및 전립선 내 테스토스테론 및 DHT의 함량을 현저하게 감소시킬 수 있다.

대 표 도 - 도4



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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016190262
부처명 농림수산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 농생명산업기술개발사업
연구과제명 사군자 추출물을 이용한 남성비뇨생식기 건강 개선용 기능성 식품소재 개발
기 여 율 1/1
주관기관 주식회사 휴온스
연구기간 2016.09.05 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

나도개피(*Eriochloa villosa*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전립선 질환은 전립선 비대증, 전립선암 또는 전립선염인 것을 특징으로 하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 나도개피 추출물의 추출용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 나도개피 추출물은 안드로겐 수용체(androgenic receptor) 또는 전립선 특이항원(prostate specific antigen) 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 나도개피 추출물은 혈청 내 DHT(dihydrotestosterone) 또는 테스토스테론(testosterone)의 함량을 억제하는 것을 특징으로 하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증에 의한 배뇨장애 개선제.

청구항 7

나도개피(*Eriochloa villosa*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 나도개피(*Eriochloa villosa*) 추출물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule) 및 산제 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 전립선 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 나도개피 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전립선은 요도가 건조해지지 않도록 여러 가지 분비물을 만들어 내는 장기로, 남성 호르몬인 안드로겐과 밀접한 관련이 있다. 분비가 증가함에 따라 점점 커지는데, 20~30대의 전립선이 50대까지 유지되다 그 이후부터 비대해진다. 이것을 양성 전립선 비대증이라고 하며, 호르몬 치료로 크기를 정상으로 돌려놓았다 하더라도 부작용의 위험이 높고, 호르몬 치료를 멈추면 곧 원상 복귀되기 때문에 완치하기 어렵다.

[0003] 전립선에 발생하는 대표적인 질환은 전립선 비대증, 만성 전립선염 및 전립선암을 꼽을 수 있다. 전립선염은 다양한 원인이 있지만 주로 세균 감염, 원인 모를 염증, 만성통증의 일환으로 생기는 질환이고, 전립선암은 전립선 중 비교적 바깥쪽부분에 악성 종양이 생긴 것인데, 미국의 한 조사 결과에 따르면, 전립선암이 전체 남성 암 환자 중 약 35%를 차지하고 있으며, 매년 2~3%씩 증가하고 있다고 한다. 우리나라에서의 발생 빈도는 10만 명당 세 명으로 아직까지 걱정할 수위는 아니지만, 점차 서구적으로 변해가는 식생활이나 급격히 불어나는 노년층 인구로 그 비율이 점차 높아지고 있다.

[0004] 한편, 전립선 비대증(Benign prostatic hyperplasia, BPH)은 노화와 성호르몬의 불균형의 영향으로 요도 주위 전립선 '샘조직'이 커져 요도를 압박하여 배뇨증상이 나타나는 질환으로, 남성의 50세 이후 발병이 급격히 일어나는 남성질환이다. 최근 우리나라에서 전립선 비대증 질환자의 증가율이 매년 20%를 상회할 정도로 가파른 증가 추세이며, 전립선이행대 부분의 평활근(smooth cell)과 상피세포(epithelial)의 과도한 증식으로 야기되고, 전립선 비대증은 하부요로증상을 동반하는데, 이는 비대해진 전립선에 의한 해부학적 폐색과 전립선 평활근을 수축시키는 α1-수용체에 의한 기능적 폐색에 기인하는 것으로 알려져 있다. 폐색에 의한 주요 증상으로는 소변 줄기가 가늘고 약해지는 세뇨 또는 약뇨, 소변을 시작할 때 한참 기다려야 하는 지연뇨, 소변 중 의지와 관계없이 중단되는 배뇨중단, 소변 후 물방울처럼 떨어지는 배뇨 말기 적하, 및 잔뇨감 등이 대표적이다. 전립선 비대의 다양한 기전 중에서 대표적인 기전은 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone,T)과 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)이 관련되어 있다고 알려져 있다.

[0005] 한편, 나도개피(*Eriochloa villosa*)는 여러해살이로 식물체 전체에 부드러운 털이 밀생하고, 다발을 만들어 산다. 잎은 뿌리에서 나며, 약간 짙은 녹색이고, 꽃차례와 더불어 긴털이 많다. 짧은 잎혀에도 털이 있으며, 마르면 약간 흑색으로 변한다. 7~8월에 한쪽 방향으로 나며 전체에 백색 털이 밀생하고 작은 꽃이삭 기부에 둥근 받침이 있다.

[0006] 전립선 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 알려진 천연 추출물에는 한국등록특허 제1653492호에 염증 또는 전립선 비대증 치료용 조성물로, 구슬꽃나무 잎 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 것이 알려져 있으며, 일본등록특허 제5191525호에는 오람, 황 우산풍, 천심 연꽃 중에서 선택된 하나 이상의 천연물이 테스토스테론 5α-환원효소 저해제 및 안드로겐 수용체 결합 저해제로 알려져 있으나, 본 발명의 나도개피 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해서는 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 나도개피 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 본 발명의 유효성분인 나도개피 추출물이 전립선 비대(BPH)에 의해 비후화된 전립선의 무게를 감소시키며, 안드로겐 수용체(androgenic receptor) 또는 전립선 특이항원(prostate specific antigen) 단백질의 발현을 억제할 뿐만 아니라, 혈청 및 전립선 내 테스토스테론 및 DHT의 함량을 현저하게 감소시킬 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 나도개피(*Eriochloa villosa*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 약학 조성물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증에 의한 배뇨장애 개선제를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 나도개피(*Eriochloa villosa*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 나도개피 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 유효성분인 나도개피 추출물은 전립선 비대(BPH)에 의해 비후화된 전립선의 무게를 감소시키며, 안드로겐 수용체(androgenic receptor) 또는 전립선 특이항원(prostate specific antigen) 단백질의 발현을 억제할 뿐만 아니라, 혈청 및 전립선 내 테스토스테론 및 DHT의 함량을 현저하게 감소시키므로, 전립

선 비대증, 전립선염 또는 전립선암의 전립선 질환에 효과적으로 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 나도개피 추출물의 처리에 따른 세포생존률(%)을 확인한 결과이다. NC는 아무것도 처리하지 않은 음성대조군이다.

도 2는 나도개피 추출물의 안드로겐 수용체(androgenic receptor; AR) 및 전립선 특이항원(prostate specific antigen; PSA) 단백질의 발현억제 효과를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다. NC는 음성대조군; BPH는 전립선 비대증 유발군; BPH+EV는 전립선 비대증 유발 및 나도개피 추출물 처리군; BPH+F는 전립선 비대증 유발 및 양성대조군인 피나스테리드(Finasteride) 처리군이다.

도 3은 도 2의 웨스턴 블랏 결과를 정량화한 그래프로, A는 안드로겐 수용체(androgenic receptor; AR)의 발현량을 나타낸 것이고, B는 전립선 특이항원(prostate specific antigen; PSA) 단백질의 발현량을 나타낸 것이다. NC는 음성대조군; BPH는 전립선 비대증 유발군; BPH+EV는 전립선 비대증 유발 및 나도개피 추출물 처리군; BPH+F는 전립선 비대증 유발 및 양성대조군인 피나스테리드(Finasteride) 처리군이다.

도 4는 본 발명의 나도개피 추출물의 투여에 따른 전립선의 무게변화를 확인한 결과이다. NC는 음성대조군; BPH는 전립선 비대증 유발군; BPH+EV는 전립선 비대증 유발 및 나도개피 추출물 처리군; BPH+F는 전립선 비대증 유발 및 양성대조군인 피나스테리드(Finasteride) 처리군이다.

도 5는 본 발명의 나도개피 추출물의 투여에 따른 혈청 내 DHT 함량 변화를 확인한 결과이다. NC는 음성대조군; BPH는 전립선 비대증 유발군; BPH+EV는 전립선 비대증 유발 및 나도개피 추출물 처리군; BPH+F는 전립선 비대증 유발 및 양성대조군인 피나스테리드(Finasteride) 처리군이다.

도 6은 본 발명의 나도개피 추출물의 투여에 따른 혈청 내 테스토스테론의 함량 변화를 확인한 결과이다. NC는 음성대조군; BPH는 전립선 비대증 유발군; BPH+EV는 전립선 비대증 유발 및 나도개피 추출물 처리군; BPH+F는 전립선 비대증 유발 및 양성대조군인 피나스테리드(Finasteride) 처리군이다.

도 7은 본 발명의 나도개피 추출물의 투여에 따른 전립선 조직의 H&E 염색결과이다. NC는 음성대조군; BPH는 전립선 비대증 유발군; BPH+EV는 전립선 비대증 유발 및 나도개피 추출물 처리군; BPH+F는 전립선 비대증 유발 및 양성대조군인 피나스테리드(Finasteride) 처리군이다.

도 8은 본 발명의 나도개피 추출물의 투여에 따른 간에서의 ALT 및 AST 함량 변화를 확인한 결과이다. NC는 음성대조군; BPH는 전립선 비대증 유발군; BPH+EV는 전립선 비대증 유발 및 나도개피 추출물 처리군; BPH+F는 전립선 비대증 유발 및 양성대조군인 피나스테리드(Finasteride) 처리군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 나도개피(*Eriochloa villosa*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0014] 상기 전립선 질환은 전립선 비대증, 전립선암 또는 전립선염인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않으며, 더 바람직하게는 전립선 비대증이고, 전립선 비대증에 의한 탈모 또는 배뇨장애를 포함할 수 있다.

[0015] 상기 나도개피 추출물은 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:

[0016] (1) 나도개피에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0017] (2) 단계 (1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0018] (3) 단계 (2)의 여과한 추출물을 감압 농축하고 건조하여 추출물을 제조하는 단계.

[0019] 상기 단계 (1)에서 추출용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물 중에서 선택하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 C_1~C_4의 저급 알코올이고, 더욱더 바람직하게는 99%(v/v) 메탄올이지만 이에 한정하지 않는다.

[0020] 상기 제조방법에 있어서, 추출방법은 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 당업계에 공지된 모든 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 나도개피 중량의 1~20배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 5~15배 첨가하는 것이다. 추출온도는 4 내지 50℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 0.5~10시간인 것이 바람직하며, 0.5~5시간이 더욱 바람직하나

이에 한정하지 않는다. 상기 방법에 있어서, 단계 (3)의 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무 건조 또는 동결 건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0021] 상기 나도개피 추출물은 안드로겐 수용체(androgenic receptor) 또는 전립선 특이항원(prostate specific antigen) 단백질의 발현을 억제할 수 있으며, 혈청 내 DHT(dihydrotestosterone) 또는 테스토스테론(testosterone)의 함량을 감소시킬 수 있다.

[0022] 본 발명의 약학 조성물은 상기 나도개피 추출물 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물은 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 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, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하게 사용할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 약학 조성물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증에 의한 배뇨장애 개선제에 관한 것이다.

[0028] 또한, 본 발명은 나도개피(*Eriochloa villosa*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0029] 상기 나도개피 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나로 제조하거나, 식품의 성분으로 첨가하여 제조될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.

[0030] 본 발명의 나도개피 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 일례로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 중에서 선택된 어느 하나의 형태일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0031] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알킨산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0032] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0033] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0034] **실시예 1. 나도개피(전초, 037-022) 추출물의 제조**

[0035] 한국식물추출물은행(Korea Plant Extract Bank)으로부터 99.9%(v/v)의 메탄올(HPLC grade)을 추출용매로 사용하여 8.8%의 추출 수율로 획득한 21.44mg의 나도개피 추출물을 분양받아, 214.4㎕의 DMSO에 녹여 100mg/㎖의 농도로 제조하여 세포 실험(*in vitro*)에 사용하였다.

[0036] 또한, 한국식물추출물은행(Korea Plant Extract Bank)으로부터 99.9%(v/v)의 메탄올(HPLC grade)을 추출용매로 사용하여 10.11%의 추출 수율로 대량 추출한 7.60g의 나도개피 추출물을 분양받아, 동물 실험(*in vivo*)에 사용하였다.

[0037] **실시예 2. 나도개피 추출물의 처리에 따른 세포 생존률(cell viability)의 확인**

[0038] 나도개피 추출물이 LN cap 세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 96웰 플레이트에 1×10^4 개의 LN cap 세포를 도말하여 24시간 동안 37℃에서 배양한 후, 상기 배양한 세포에 농도별(0, 50, 100, 200㎍/㎖)로 나도개피 추출물을 처리하여 72시간 동안 더 배양하였다.

[0039] 이 후, 웰 당 10㎕의 EZ Cytox Assay Kit(DOGEN, Korea)를 넣고, 2시간 가량 더 반응시킨 후 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 리더로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0040] 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 나도개피 추출물을 처리하여도 세포 생존률(cell viability)에는 영향을 주지 않아 세포독성이 거의 없다는 것을 확인하였다.

[0041] **실시예 3. 나도개피 추출물의 안드로겐 수용체(androgenic receptor; AR) 및 전립선 특이항원(prostate specific antigen; PSA) 단백질의 발현억제 효과 확인**

[0042] 5×10^5 개의 세포를 6웰 플레이트에 도말하고 24시간 동안 배양한 후, 대조군(control)을 제외한 모든 웰에 100nM의 테스토스테론(testosterone)을 처리하고, 나도개피 추출물을 농도별(50, 100 및 200㎍/㎖)로 처리한 후, 72시간 동안 37℃, 5% CO_2 환경에서 배양하였다. 양성대조군으로 10μM의 피나스테리드(Finasteride)를 사용하였다.

[0043] 반응이 끝난 후 PBS로 2번 세척하고 단백질 추출용매인 RIPA 완충용액(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM Na_2EDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40, 1% 소듐 디옥시콜레이트(sodium deoxycholate), 2.5mM 피로인산나트륨(sodium pyrophosphate), 1mM b-글리세로포스페이트(b-glycerophosphate), 1mM Na_3VO_4, 1㎍/㎖ 루펩틴(leupeptin; Cell signaling, USA)를 처리하고, 초음파 처리한 후, 얼음에 30분 동안 담아두고 12,000rpm, 20분, 4℃에서 원심분리하였다. 이 후, 상층액만 취하여 단백질 분석키트(Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad , USA)로 단백질을 정량하고 안드로겐 수용체 단백질은 10㎍, 전립선 특이 항원 단백질은 30㎍을 사용하여 웨스턴 블랏을 실시하였다.

[0044] 그 결과, 웨스턴 블랏을 통해 단백질 발현 정도를 확인하고(도 2), 발현량을 정량하여 그래프로 나타내었다. 안드로겐 수용체 단백질(AR)의 경우, 나도개피 추출물을 100㎍/㎖ 농도로 처리했을 때부터 AR의 발현이 감소하였으며, 특히 200㎍/㎖의 농도에서는 양성대조군인 피나스테리드(Finasteride)를 처리한 것보다 더 많이 감소한

것을 확인하였다(도 3A).

[0045] 또한 도 3B에 개시한 바와 같이, 나도개피 추출물을 200㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 전립선 특이항원(PSA) 단백질의 발현이 감소한 것을 확인하였다.

[0046] **실시예 4. 동물 모델의 제작 및 통계 분석**

[0047] 10주령의 수컷 Wister 랫트(중앙실험동물)를 1주일 동안 순화시킨 후, 전립선 비대 유발군(BPH)은 3mg/kg의 프로피온산테스토스테론(testosterone propionate; TP)를 피하에 4주 동안 주입하여 모델을 확립하였다. 나도개피 추출물 투여군은 4주 동안 TP 주입 한 시간 전에 100mg/kg의 나도개피 추출물을 경구 투여하였으며, 양성대조군은 전립선 비대증 치료제로 사용되고 있는 5α-환원 효소 억제제인 피나스테리드(Finasteride)를 10 mg/kg의 양으로 투여하였다.

[0048] 통계학적 분석은 ANOVA로 수행하였으며, #는 정상군(NC)과 비교 시 통계적으로 유의미한 차이가 있는 경우로, $P<0.05$임을 의미하며; *는 전립선 비대증 유발군(BPH)과 비교 시 통계적으로 유의미한 차이가 있는 경우이고, $P<0.05$임을 의미한다.

[0049] **실시예 5. 전립선 무게 측정**

[0050] 흰쥐에 프로피온산테스토스테론(testosterone propionate; TP)를 피하로 4주동안 주사하여 전립선 비대증을 유발하고 나도개피 추출물과 전립선 비대증 치료제로 사용 중인 피나스테리드(Finasteride)를 4주 동안 함께 경구 투여하였다. 약물 투여 종료 후 희생시킨 쥐의 전립선을 채취하여 무게를 비교하였다.

[0051] 그 결과, 도 4에 개시한 바와 같이, 각 실험군(정상군: NC, 전립선 비대증 유발군: BPH, 전립선 비대증 유발군+나도개피 추출물 투여군: BPH+EV, 전립선 비대증 유발군+Finasteride 투여군: BPH+F)으로부터 측정한 전립선의 무게는 TP로 전립선 비대증을 유발한 군은 정상군에 비해 그 무게가 증가하였고, 전립선 비대증 유발군에 비해 나도개피 추출물을 투여한 군에서 전립선의 무게가 유의적으로 감소하였다는 것을 확인하였다.

[0052] **실시예 6. 전립선의 DHT 변화**

[0053] 전립선 비대증 동물 모델에서 혈청 내 DHT(dihydrotestosterone)의 함량을 확인하기 위해 실험 종료 후, 분리한 혈액을 4,000rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 상등액을 취해 혈청에서 ELISA 키트(ALPCO,Salem)를 이용하여 DHT(dihydrotestosterone)의 함량을 측정하였다.

[0054] 그 결과, 도 5에 개시한 바와 같이, 나도개피 추출물을 투여한 군에서 혈청 내 DHT(dihydrotestosterone)의 함량이 통계적으로 유의미하게 감소한 것을 확인하였다.

[0055] **실시예 7. 혈청 내 테스토스테론(testosterone)의 함량 변화 분석**

[0056] 전립선 비대증 동물 모델에서 테스토스테론(testosterone)의 함량 변화를 확인하기 위해 실험 종료 후 분리한 혈액을 4,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 취해 혈청에서 ELISA kit (Cayman, USA)을 이용하여 테스토스테론(testosterone)의 함량을 측정하였다. 그 결과, 도 6에 개시한 바와 같이 나도개피 추출물을 투여한 군에서 혈청 내 테스토스테론(testosterone)의 함량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다.

[0057] **실시예 8. 전립선의 조직병리학적 변화**

[0058] 실험 종료 후 적출한 전립선을 10%의 중성 완충 포르말린으로 24시간 동안 고정한 후 파라핀으로 포매(paraffin embedding)하였다. 포매한 조직은 4㎛의 두께로 박절하여 절편을 제작한 후, H&E[헤마톡실린(hematoxylin, Sigma-Aldrich, USA)과 에오신 와이 (eosin Y, Sigma-Aldrich)]로 염색하고, 봉입액으로 봉입하여 광학현미경으로 검경하였다.

[0059] 그 결과, 도 7에 개시한 바와 같이, 전립선 비대증 유발군에서는 상피세포의 높이와 수가 과증식되었으나, 나도

개피 추출물을 투여한 군에서는 이러한 상피세포의 과증식이 억제되었다는 것을 확인하였다.

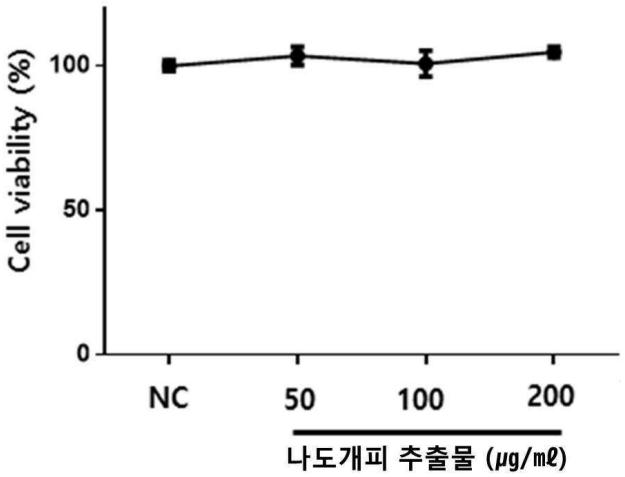
[0060] **실시예 9. 혈중 ALT 및 AST 측정**

[0061] 전립선 비대증 동물 모델에서 나도개피 추출물의 독성 여부를 확인하기 위해 실험 종료 후 분리한 혈액을 4,000rpm에서 20분 동안 원심분리한 후, 상등액을 취해 혈청에서 ALT와 AST의 함량 변화를 확인하였다.

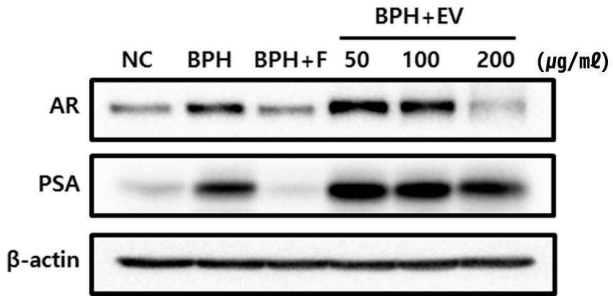
[0062] 그 결과, 도 8에 개시한 바와 같이, 일반적인 간 독성(손상) 지표로 사용되는 ALT 및 AST의 함량이 정상군과 비교하여 전립선 비대증 유발군 및 나도개피 추출물 투여군 모두에서 통계적으로 유의미한 변화는 관찰되지 않았다.

도면

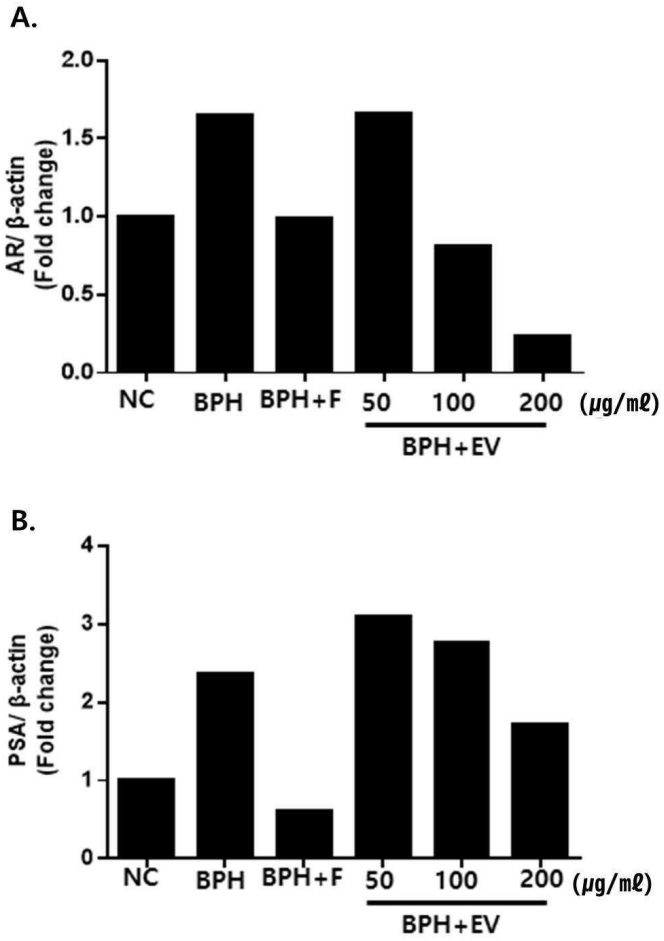
도면1



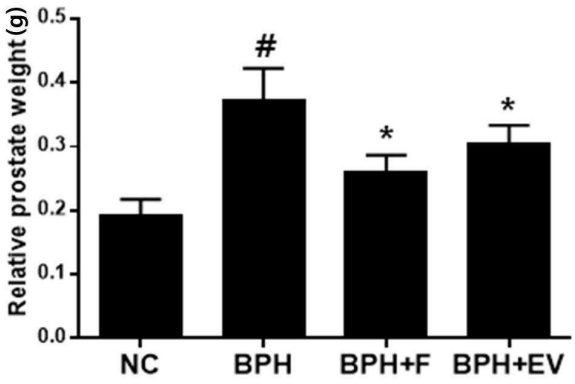
도면2



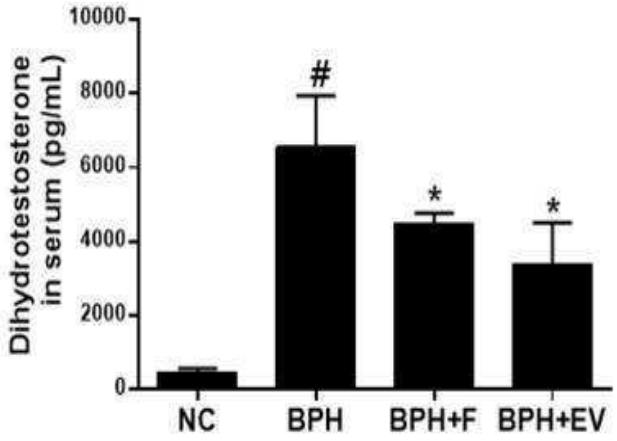
도면3


A.
AR/ β-actin (Fold change)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NC
BPH
BPH+F
50
100
200
(μg/mℓ)
BPH+EV
B.
PSA/ β-actin (Fold change)
4
3
2
1
0
NC
BPH
BPH+F
50
100
200
(μg/mℓ)
BPH+EV

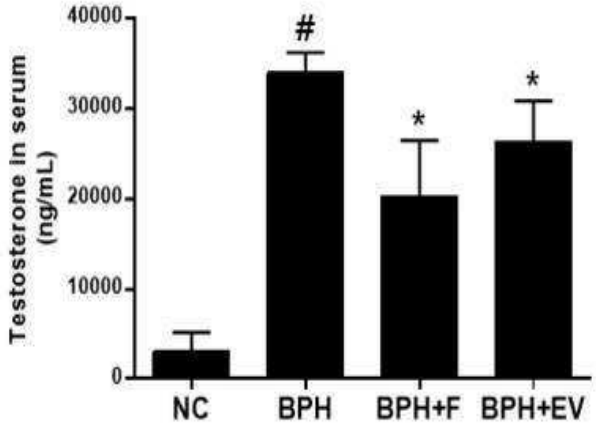
도면4


Relative prostate weight(g)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
#
*
*
NC
BPH
BPH+F
BPH+EV

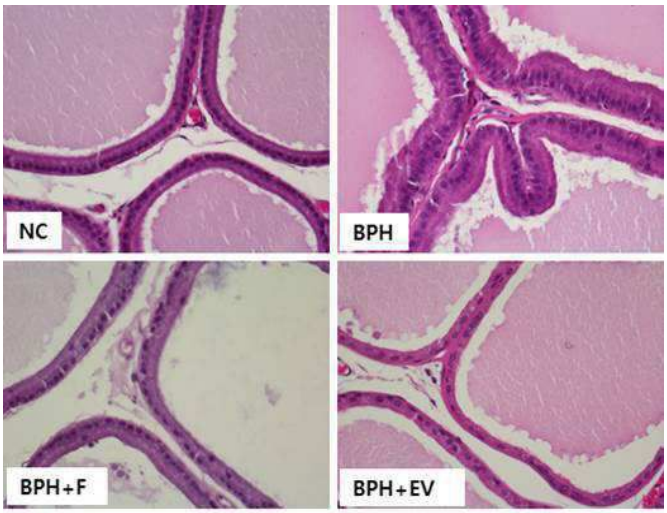
도면5


Dihydrotestosterone in serum (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
#
*
*
NC
BPH
BPH+F
BPH+EV

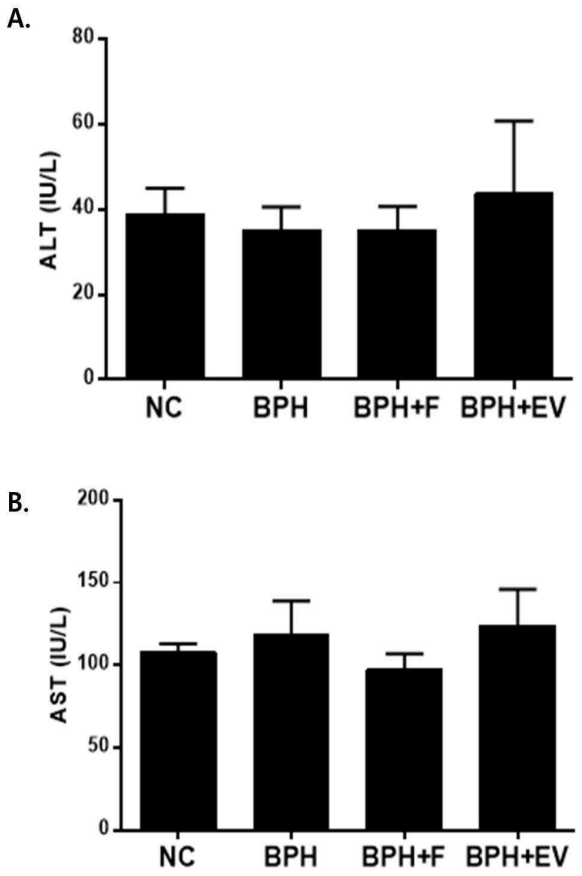
도면6


Testosterone in serum (ng/mL)
40000
30000
20000
10000
0
#
*
*
NC
BPH
BPH+F
BPH+EV

도면7


NC
BPH
BPH+F
BPH+EV

도면8


A.
ALT (IU/L)
80
60
40
20
0
NC
BPH
BPH+F
BPH+EV
B.
AST (IU/L)
200
150
100
50
0
NC
BPH
BPH+F
BPH+EV