



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0112265
(43) 공개일자 2014년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/9064 (2006.01) A61P 1/08 (2006.01)
A61P 1/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0026792
(22) 출원일자 2013년03월13일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
진영호
서울특별시 광진구 아차산로 69길 19, 903동 1902호(광장동, 현대아파트)
(74) 대리인
안소영

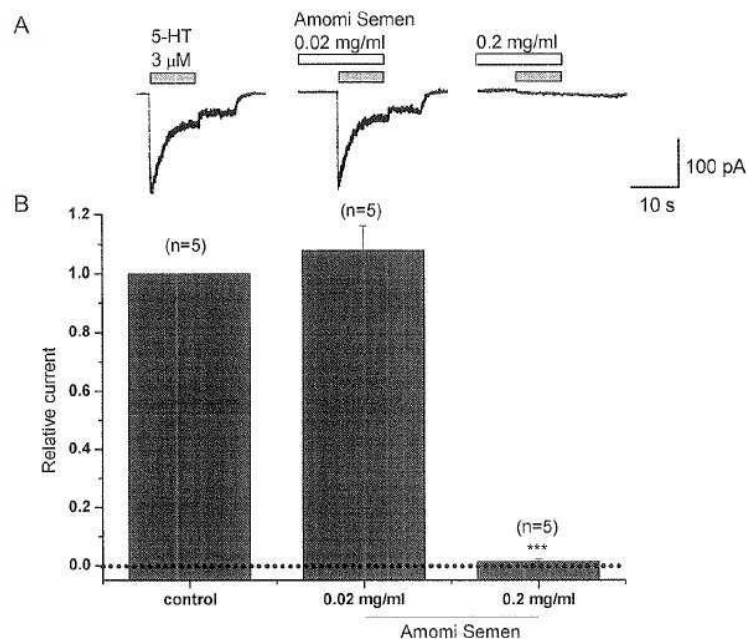
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 5-HT₃ 수용체 길항제인 사인 추출물을 포함하는 구토 또는 설사의 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 사인 추출물을 포함하는 구토 또는 설사의 예방, 개선 및/또는 치료용 조성물에 대한 것이다. 본 발명의 조성물은 5-HT₃ 수용체 길항제로 억제되는 구토 또는 설사, 특히 화학요법제 투여, 방사선 조사 치료, 또는 마취제 투여 후 각성으로 인한 구토 또는 설사의 예방, 개선, 및/또는 치료 효과를 나타내며, 5-HT₃ 수용체에 선택적으로 길항작용을 하고 도파민 수용체에는 작용하지 않아 부작용을 유발하지 않는다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

사인(*Amomum villosum*) 추출물을 포함하는 5-HT₃ 수용체의 선택적 길항제.

청구항 2

제 1항의 길항제를 유효성분으로 포함하는 구토 또는 설사의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 구토 또는 설사는 화학요법제 투여, 방사선 조사 치료, 또는 마취제 투여에 의해 유발된 조성물.

청구항 4

제 1항의 길항제를 유효성분으로 포함하는 구토 또는 설사의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 구토 또는 설사는 화학요법제 투여, 방사선 조사 치료, 또는 마취제 투여에 의해 유발된 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 사인 추출물을 포함하는 구토 또는 설사의 예방, 개선 및/또는 치료용 조성물에 대한 것으로서, 보다 상세하게는 5-HT₃ 수용체 길항제에 의해 억제되는 구토 또는 설사를 예방, 개선 및/또는 치료하기 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 2011년 통계청의 사망원인조사 통계자료에 의하면, 대한민국 사망률 1위는 암으로 2010년 10만명 당 144.4명에 이어 2011년에는 10만명 당 142.8명인 것으로 나타났다. 또한 암 발생자수는 매년 증가추세를 보였으며 2010년에는 10만명 당 202.05명으로 전년대비 3.7% 증가하였다(국가암정보센터).

[0003] 화학요법제(Chemotherapeutics) 투여, 방사선 조사 치료 등 항암치료의 발전으로 암으로 인한 사망률은 감소하는 추세이나, 항암치료로 인해 발생하는 부작용인 오심, 구토, 및 설사는 여전히 환자들에게 큰 고통을 주고 있다. 모든 구토과정은 연수의 망상체에 있는 구토중추에 의하여 조정된다. 제 4 뇌실의 맨 아래 구역에 위치하고 있는 화학수용체유발대(chemoreceptor trigger zone; CTZ)와 고립핵(NTS)은 주변부에서 발생하는 구심성 자극의 가장 중요한 relay centre 이다. 또한 CTZ는 뇌혈관 장벽의 보호를 받지 않아 혈액과 뇌척수액에 있는 독소를 직접적으로 감지함으로써 신경전달물질을 분비하기도 한다(Mahesh, Perumal et al. 2005).

[0004] 구토와 설사의 발생 기전은 매우 다양한데, 연구에 따르면 화학요법제와 같은 세포독성 약물로 인한 구토는 장과 혈액, 뇌간중의 5-HT(5-hydroxytryptamine, 또는 세로토닌) 농도 증가와 연관되어 있다고 한다(Minami, Endo et al. 2003). 세포독성이 있는 화학요법제는 장점막에 있는 장크롬친화성세포(enterochromaffin cells)의 5-HT 방출을 증가시키고 증가된 5-HT는 구심성 미주신경 말단의 5-HT₃ 수용체와 결합하여 자극을 뇌간 또는 구토중추로 보내어 구토반사를 일으킨다(Matsuki 1996).

[0005] 방사선 조사 치료의 경우 및 마취제 투여 후에도 구토 및 설사가 발생한다. 이에 대한 원인은 불분명하나, 5-HT₃ 수용체 선택적 길항제 투여로 치료되는 것으로 미루어 보아 5-HT₃ 수용체를 통해 5-HT 유도전류가 발생하여 일어나는 현상으로 생각되고 있다.

[0006] 이러한 구토 또는 설사는 세균 감염 등으로 인한 구토 또는 설사를 치료하기 위해 사용하는 항생제 등으로 치료할 수 없고, 멀미 등 전정기관 자극으로 발생하는 구토의 치료에 사용하는 디멘히드리네이트 등으로도 치료

할 수 없다. 따라서 5-HT₃ 수용체 길항제를 사용하여 치료하는데, 세로토닌과 도파민의 구조적 유사성으로 인해 도파민 수용체에도 약물이 작용하여 각종 부작용이 발생한다.

[0007] 임상에서 화학요법제 투여, 방사선 조사 치료, 및 마취제 투여로 유발되는 구토 또는 설사, 과민성 장 증후군으로 인한 설사의 예방 또는 치료에 흔히 이용하는 5-HT₃ 수용체 선택적인 길항제에는 온단세트론(Ondansetron)이 있다. 온단세트론은 내장구심신경에서 5-HT₃ 수용체를 억제함으로써 구토억제작용을 일으킨다(Andrews, Davis et al. 1990). 그러나 온단세트론에도 일부 부작용이 수반되고 있으며 부작용이 적은 항구토제는 경제적인 측면에서 환자에게 큰 부담을 주어 치료를 포기하는 환자가 적지 않다. 항구토제의 시장과 암 화학요법시장은 상호의존적이어서, 부작용이 적은 항구토제는 가격이 비쌀 뿐만 아니라 보험으로 인정되는 양도 제한되어 있는 것이 지금의 실정이다. 따라서 부작용이 적고 경제적인 항구토제제의 연구개발이 각광받고 있다.

[0008] 본 발명자들은 온단세트론을 대체할 항구토제가 될 수 있는 천연물 의약을 개발하고자 하던 중, 전통의학에서 독성이 없는 것으로 알려져 있고 복합 처방의 일 구성성분으로 사용되어 온 생약들에 대해 연구한 결과, 그중 사인 추출물이 5-HT₃ 수용체의 선택적 길항 효과가 뛰어난 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 5-HT₃ 수용체의 선택적 길항제로 작용하는 사인 추출물을 포함하는 구토 또는 설사를 치료하기 위한 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 발명의 배경이 되는 기술에서 상술한 바와 같이, 구토 또는 설사의 종류에 따라 그 작용기전이 상이하기 때문에 특정 기전에 작용하는 치료제의 개발이 요구되어 왔다. 본 발명자들은 미주신경 세포를 분리하여 다양한 생약 추출물을 처리하여 5-HT 유도전류 억제 여부를 확인하던 중 사인 추출물이 특히 우수한 5-HT 유도전류 억제 효과가 있음을 발견함으로써, 사인 추출물이 5-HT₃ 수용체를 통한 5-HT 유도전류 발생에 기인한 구토 또는 설사, 즉 화학요법제 투여, 방사선 조사 치료, 또는 마취제 투여 후 각성으로 인해 발생하는 구토 또는 설사의 예방, 개선 및/또는 치료에 효과적임을 최초로 확인한 것이다.

[0011] 본 발명은 사인 추출물을 유효성분으로 함유하는, 위장관 또는 연수의 구토중추에 존재하는 5-HT₃ 수용체의 선택적 길항제를 제공하며, 상기 길항제를 유효성분으로 포함하는 구토 또는 설사의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 상기 5-HT₃ 수용체의 선택적 길항제로 예방 또는 치료될 수 있는 구토 또는 설사는 화학요법제 투여, 방사선 조사 치료, 또는 마취제 투여 후 각성으로 인한 구토 또는 설사가 대표적이다. 원인을 알 수 없는 설사를 유발하는 질병인 과민성 대장 증후군도 5-HT₃ 수용체의 선택적 길항제에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 것으로 보고되고 있고, 실제 임상에서도 온단세트론 처방이 이루어지고 있다.

[0013] 5-HT가 미주신경 말단의 5-HT₃ 수용체에 결합하면 뇌간 또는 구토중추로 신호가 전달되어 구토 또는 설사가 유발된다. 본 발명의 조성물은 5-HT₃ 수용체에 결합하여 5-HT의 결합으로 막음으로써 구토 또는 설사가 발생하는 것을 억제한다. 그러나 본 발명의 조성물은 5-HT₃ 수용체와 유사한 도파민 수용체에는 결합하지 않아서, 도파민 유도전류 발생으로 인한 각종 부작용을 일으키지 않는다는 장점이 있다.

[0014] 사인(砂仁)은 생강과 식물인 양춘사(陽春妙)(*Amomum villosum* Loureiro), 녹각사(級頻沙)(*Amomum villosum* Loureiro var. *xanthioides* T. L. Wu et Senjen)의 잘 익은 열매이다. 맛은 맵고 성질은 온(溫)한 것으로 알려져 있다. 사인은 정유성분을 함유하고 있으며 주로 bornyl acetate, camphor, limonene, camphene, α -pinene, β -pinene, borneol, β -elemene, β -caryophyllene, β -bergamotene, α -thujene, myrcene, α -phellandrene, linalool 등이 있고 또한 여러 가지 미량원소도 함유하고 있다. 동물실험에서 사인은 혈소판의 응집을 억제할 수 있으며 흰쥐의 위궤양을 억제하고 장 평활근의 수축을 증강시킬 수 있다는 연구보도가 있다(ZhongHuaBenCao. 1998).

- [0015] 본 발명의 사인 추출물은 물, C1~C4 알코올 또는 이들의 혼합물로부터 선택되는 추출용매로 추출되며, 그 외 당업계에서 통상 사용되는 용매들을 이용하여 추출할 수 있다. 추출방법은 당업계에서 통상 사용되는 방법, 예컨대 에탄올 추출, 물 추출이 가능하며, 열 추출 또는 냉침추출을 모두 이용할 수 있다. 상기 용매로 사용되는 물은, 물 종류에는 구애받지 않으나, 증류수를 용매로 하여 추출하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 일례로, 물에 의한 열 추출은 다음과 같이 이루어진다. 사인을 30 내지 70℃, 바람직하게는 40 내지 60℃에서 열풍건조하여 분말화한 후, 상기 분말의 무게 100g 당 0.1L 내지 10L의 증류수, 바람직하게는 3L 내지 5L의 증류수에 넣은 후 환류냉각기를 이용하여 80 내지 120℃, 바람직하게는 90 내지 110℃에서 70 내지 120분간, 바람직하게는 80 내지 100분간 추출하는 과정을 통해 사인의 물 추출물을 제조할 수 있다. 추가로, 상기 추출 후 상온에서 방냉한 뒤, Whatman Grade No. 1 여과지를 이용하여 감압여과할 수 있으며, 이때 얻어진 잔사를 0.1L 내지 3L의 증류수, 바람직하게는 0.5 내지 2L의 증류수와 섞은 후 80 내지 120℃, 바람직하게는 90 내지 110℃에서 70 내지 120분간, 바람직하게는 80 내지 100분간 추출한 후 상온에서 방냉한 뒤, Whatman Grade No. 1 여과지를 이용하여 감압여과하는 방법으로 추출할 수도 있다. 본 발명에서는 물에 의한 냉침 추출을 사용할 수 있으며, 본 발명의 일례로, 사인을 30 내지 70℃, 바람직하게는 40 내지 60℃에서 열풍건조하여 분말화한 후, 상기 분말의 무게 100g 당 0.1L 내지 10L의 증류수, 바람직하게는 3L 내지 5L의 증류수에 넣은 후 0 내지 10℃, 바람직하게는 2 내지 6℃, 더욱 바람직하게는 4 ℃에서 12시간 내지 48시간, 바람직하게는 18시간 내지 30시간, 더욱 바람직하게는 24시간 추출하고, 추출 후 상온에서 방냉한 뒤, Whatman Grade No.1 여과지를 이용하여 감압 여과할 수 있으며, 이때 얻어진 잔사를 0.1L 내지 3L의 증류수, 바람직하게는 0.5 내지 2L의 증류수와 섞은 후 0 내지 10℃, 바람직하게는 2 내지 6℃, 더욱 바람직하게는 4 ℃에서 12시간 내지 48시간, 바람직하게는 18시간 내지 30시간, 더욱 바람직하게는 24시간 추출한 후 Whatman Grade No.1 여과지를 이용 감압 여과하는 방법으로 추출할 수 있다. 본 발명의 추출방법은 상기 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명의 약학적 조성물은, 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 봉해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 의한 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 제제화할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 약학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.
- [0019] 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 율활제, 봉해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 봉해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토나이트, 잔탄 검 등을 포함한다.
- [0020] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 조성물 또는 유효성분은 목적에 따라 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로 등을 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 정맥내로 투여될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 조성물에 있어서, 유효성분의 투여량은 체중 60 kg 성인기준으로 0.5 mg/kg~50 mg/kg의 범위 내에서 조절할 수 있다. 다만, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강

상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0023] 본 발명은 또한 포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 사인 추출물을 투여하는 것을 포함하는 5-HT₃ 수용체의 선택적 길항제에 의해 억제되는 설사 또는 구토, 바람직하게는 화학요법제 투여, 방사선 조사 치료, 또는 마취제 투여에 의해 유발된 구토 또는 설사의 예방, 개선, 또는 치료방법을 제공한다.

[0024] 여기에서 사용된 "치료학적으로 유효한 양"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상외에 의해 생각되는 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분은 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.

[0025] 본 발명은 사인 추출물을 유효성분으로 함유하는, 위장관 또는 연수의 구토중추에 존재하는 5-HT₃ 수용체의 선택적 길항제를 유효성분으로 포함하는 구토 또는 설사 예방 또는 치료용 식품 조성물을 제공한다. 5-HT₃ 수용체의 선택적 길항제로 예방 또는 치료될 수 있는 구토 또는 설사는 화학요법제 투여, 방사선 조사 치료, 또는 마취제 투여 후 각성으로 인한 구토 또는 설사가 대표적이며, 과민성 대장 증후군에 의한 설사도 이에 해당한다.

[0026] 본 발명의 식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화 할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 건강기능식품을 포함한 식품 형태로 제조 가능하다.

[0027] 본 발명의 조성물 내에서 유효성분의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.01 ~ 20 %의 양으로 함유될 수 있다.

[0028] 본 발명의 식품 조성물은 또한 구토 또는 설사의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0029] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 사인 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.

[0030] 본 발명의 용도, 조성물, 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 사인 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 도파민 수용체에 작용하여 발생하는 부작용 없이 5-HT₃ 수용체 선택적 길항제로 억제되는 구토 또는 설사, 특히 화학요법제 투여, 방사선 조사 치료, 또는 마취제 투여로 인한 구토 또는 설사의 예방, 개선, 및/또는 치료 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 NG(결절신경절) 뉴런에서 온단세트론에 대한 농도-반응 관계를 나타낸다.

도 2는 사인 추출물(Amomi Semen (ASE))이 NG 뉴런에서 5-HT 유도전류에 미치는 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 사인 추출물의 제조

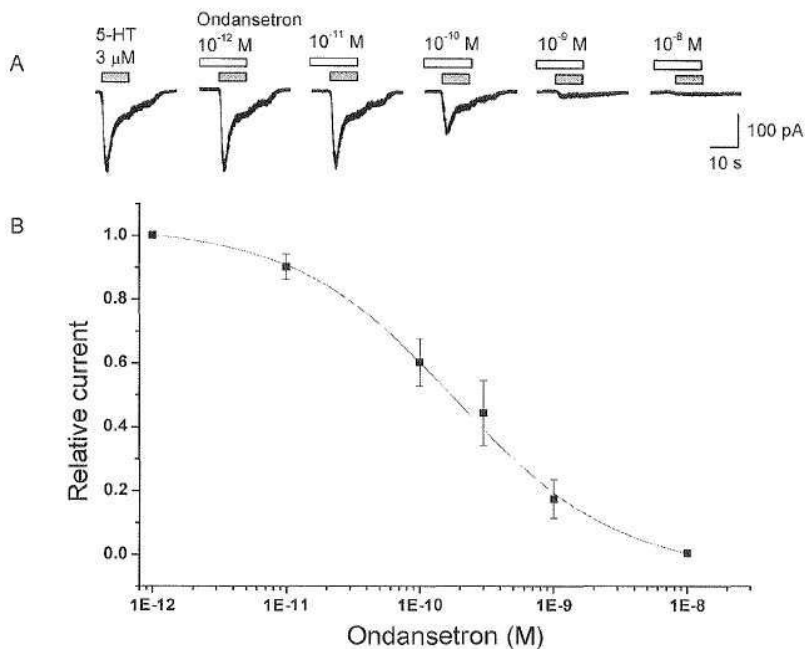
[0035] 사인의 에탄올 추출물은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 사인 100g 에 사인 부피 대비 130%의 95% Ethyl alcohol을 넣어 실온에서 2시간 간격으로 15 분씩 하루에 10회씩 3일 동안 sonication 추출하였다. 추출된 용매를 rotay evaporator로 감압 농축 후 동결건조 하여 2.92 g의 추출물을 얻었다. 실험에 사용된 추출물은 0.2 mg/ml 농도로 DMSO(최종농도 < 0.3%)에 녹여 사용하였다.

- [0036] 실험예 1. 사인 추출물에 의한 5-HT 유도전류 억제 효과 확인
- [0037] 1-1. 시료의 준비
- [0038] 실시예 1에서 제조한 사인 추출물을 실험에 사용하였다.
- [0039] 5-HT(serotonin)(Sigma-Aldrich)는 증류수(DW)에 녹여 10 mM 저장 용액(stock solution)을 만든 후 실험 시 3×10^{-6} M 로 희석하여 내향성 전류(inward current)를 유발하는데 사용하였다.
- [0040] 5-HT₃ 수용체 길항제인 온단세트론은 Tocris Cookson 제품을 사용하였다.
- [0041] 1-2. 미주신경 세포의 분리
- [0042] 실험동물은 오리엔트바이오(주)에서 주문한 10~14일령 Sprague-Dawley rat 흰쥐 암컷을 사용하였다. 흰쥐는 온도, 습도, 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 사료와 물을 충분히 공급하며 어미 쥐와 함께 관리하였다.
- [0043] 흰쥐를 마취시킨 후 (Zolazepam 0.3mg/kg) 목 중앙부위를 절개하고 미주신경을 노출시킨 후 결절신경절 (nodose ganglion, NG) 포함하여 일정부분을 적출하여 4°C ACSF solution (구성 mM: 125 NaCl, 3 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, 10 glucose, 2 CaCl₂) 에 넣었다. ACSF 용액은 사용 전 저온에서 20분 동안 95% O₂ - 5% CO₂ 가스로 기포화하였다. 적출한 결절신경절 부위의 막을 제거한 후 type II trypsin (5 mg/ml at 1310 units/mg; Sigma-Aldrich., St. Louis, MO)이 함유되어 있는 ACSF 용액에 넣어 31°C 에서 55~60분 동안 효소 처리하였다. 그 다음 다시 ACSF 에 넣어 실온에 1~3시간 동안 보관하면서 세포를 분리하여 기록에 사용하였다. ACSF 에 보관된 조직을 standard external recording solution(구성 mM: 150 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose. Trisbase로 pH를 7.4로 조절)으로 재운 chamber에 넣고 직경이 다른 유리피펫으로 pipetting 하여 신경세포를 분리한 후 전기생리학적 기록에 사용하였다.
- [0044] 1-3. 미주신경세포의 온단세트론 또는 사인 추출물 처리
- [0045] (1) 온단세트론 처리
- [0046] 5-HT₃ 수용체의 선택적인 길항제인 온단세트론이 미주신경세포에서 5-HT 유도전류에 미치는 영향을 확인하기 위하여 온단세트론을 상기 1-2에서 준비된 미주신경세포에 농도별로(10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} M) 30초 전 처리한 후 3×10^{-6} M 의 5-HT와 함께 사용하였다.
- [0047] (2) 사인 추출물 처리
- [0048] 미주신경세포에서 사인이 5-HT 유도 전류에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 사인 에탄올 추출물을 상기 1-2에서 준비된 미주신경세포에 각각 0.02 mg/ml, 0.2 mg/ml 농도로 30초 동안 전처리한 후 3×10^{-6} M 5-HT와 함께 세포에 처리하였다.
- [0049] 1-4. 미주신경세포에서 5-HT 유도전류 측정: 전기생리학적 기록
- [0050] 본 실험에서는 voltage-clamp 법으로 Multiclamp 700B(Molecular Devices, Sunnyvale, California)와 pClamp 9 software(Molecular Devices)를 이용하여 5-HT 반응을 기록하였다. 전기기록은 450 ug/ml 농도의 nystatin 을 이용한 천공법으로 실시하였다. 기록에 사용된 유리전극은 50 mM KCl, 100 mM K-gluconate, 10 mM HEPES로 구성된 internal solution(pH 7.2)으로 충진하였다. 단일 세포의 고정막전압을 -50 mV로 하였고 전류는 3 KHz 에서 필터링하고 10 KHz에서 샘플링하여 컴퓨터에 저장하였다. 모든 실험은 실온 (21-22 °C)에서 진행하였다.
- [0051] 모든 data 는 pClamp 9 프로그램을 이용하여 분석하였으며 mean±SE로 나타내었다. 비교분석은 one-way ANOVA 의 사후 다중 비교 (post-hoc multiple comparisons)(Bonferroni/Dunn's correction, StatView, SAS Institute Inc., Cary, NC) 방법을 이용하였으며 p 값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.
- [0052] 1-5. 실험결과
- [0053] (1) 미주신경세포에서 온단세트론(ondansetron)이 5-HT 유도전류에 미치는 영향

- [0054] 온단세트론 처리시 미주신경세포에서의 5-HT 유도전류 측정결과를 도 1에 나타내었다. 도 1은 NG(결절신경절) 뉴런에서 온단세트론에 대한 농도-반응 관계를 나타낸다. 도 1의 A에서, 트레이스(trace)들은 온단세트론에 의한 3×10^{-6} M 5-HT 유도전류를 나타낸다. 모든 트레이스들은 동일한 뉴런에서 획득되었다. 도 1의 B는 온단세트론의 농도-억제 관계를 나타낸다. 각 포인트는 7개 뉴런의 평균이다.
- [0055] 도 1에 나타난 바와 같이, 10^{-12} M~ 10^{-8} M 농도의 온단세트론은 농도의존적으로 5-HT 유도전류를 억제하였고 10^{-8} M에서는 완전히 억제시키는 것을 알 수 있다($p < 0.0001$). 따라서 미주신경세포에서 형성된 5-HT 유도전류는 5-HT₃ 수용체를 통하여 발생한 것으로 추정할 수 있었다.
- [0056] 5분 동안 washing한 후 5-HT 유도전류는 다시 control 수준으로 회복되었다.
- [0057] (2) 미주신경세포에서 사인 추출물이 5-HT 유도전류에 미치는 영향
- [0058] 사인 추출물 처리시 미주신경세포에서의 5-HT 유도전류 측정결과를 도 2에 나타내었다. 도 2는 사인 추출물 (Amomi Semen (ASE))이 NG 뉴런에서 5-HT 유도전류에 미치는 효과를 나타낸다. 도 2의 A에서 트레이스들은 ASE(0.2 mg/ml)에 의한 5-HT 유도전류의 억제를 보여준다. 도 2의 B에서 각 칼럼은 4개 뉴런으로부터의 평균 $\pm$ SE 값을 나타낸다. *** $p < 0.0001$, 대조군과 비교하여 유의성(significant as compared to the control group).
- [0059] 도 2에 나타난 바와 같이, 0.02 mg/ml에서는 대조군에 비해 $107.77 \pm 8.322\%$ 로 나타나 5-HT 유도전류에 영향을 미치지 않은 반면, 0.2 mg/ml 에서는 5-HT 유도전류를 $98.61 \pm 0.815\%$ 유의적으로 억제하는 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.0001$). 따라서 사인은 5-HT₃ 수용체와 5-HT의 결합을 억제함으로써 구토 억제 작용을 일으키는 것으로 생각된다.

도면

도면1



도면2

