

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0032612 (43) 공개일자 2013년04월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/488 (2006.01) A61P 15/00 (2006.01)		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(21) 출원번호 10-2011-0096323		(72) 발명자 최정혜 서울시 성동구 옥수동 극동APT 8동 1111호 김지현 서울특별시 노원구 동일로195길 39, 대동2차APT 102동 1004호 (공릉동)
(22) 출원일자 2011년09월23일 심사청구일자 2011년09월23일		(74) 대리인 이원희

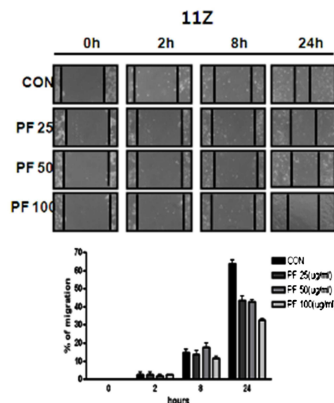
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **갈화 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증의 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 갈화(Puerariae Flos) 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 갈화(Puerariae Flos) 추출물은 자궁내막증 세포의 이동 및 부착을 억제하고, 이동 및 부착 관련 인자인 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 억제하고, 통증 관련 인자인 COX-2의 발현을 억제하고, 염증 관련 사이토카인인 MCP-1 및 RANTES의 발현을 억제하는 활성을 가짐으로써 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090911

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 천연물 유래 선택적 에스트로겐 수용체 조절제의 발굴

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2009.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 갈화 추출물은 물, C₁ 내지 C₅ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하여 추출되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 자궁내막증 및 이의 합병증은 MMP-2, MMP-9, COX-2, MCP-1 또는 RANTES의 과발현에서 기인하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 자궁내막증의 합병증은 골반염, 골반유착, 난소낭종, 자궁근종, 자궁 외 임신 및 불임으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 및 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 개선용 건강식품용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 자궁내막증 및 이의 합병증은 MMP-2, MMP-9, COX-2, MCP-1 또는 RANTES의 과발현에서 기인하는 것을 특징으로 하는 건강식품용 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 자궁내막증의 합병증은 골반염, 골반유착, 난소낭종, 자궁근종, 자궁 외 임신 및 불임으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 건강식품용 조성물.

명세서

기술 분야

본 발명은 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증의 예방 및 치료용 약학적 조성물,

[0001]

및 건강식품에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 자궁내막증(endometriosis)은 가임기 여성의 3 내지 10%, 불임 여성의 25 내지 35% 정도에서 나타나는 매우 흔한 부인과 질환으로 자궁내막조직이 자궁 이외의 장소(난소, 복강, 장관, 방광)에서 비정상적으로 증식하는 질환이며, 발병기전으로는 자궁내막조직이 난관을 통해 복강 내로 역류하여 난소나 복막에 착상되어 발병한다는 Sampson의 착상설(implantation theory)이 가장 많이 받아들여지고 있다. 자궁내막증은 월경통(dysmenorrhoea), 성교통(dyspareunia) 및 침범부위에 따른 다양한 통증(예를들면, 폐침범시: 기흉, 혈흉/ 요관 침범시: 요관폐쇄, 혈뇨)을 증상으로 하며, 30 내지 50%의 환자에게서 불임의 원인으로 확인되었다. 또한, 자궁내막증은 난소암, 신장암, 뇌종양 등의 다양한 암의 발병위험을 높이는 것으로 보고된바 있다.
- [0003] 자궁내막증 세포(endometrial cell)는 그 기원세포인 정상 자궁내막세포(endometrium)와 기능적으로 그리고 분자 기전(molecular mechanism)적으로 매우 다르다. 자궁내막증 세포는 에스트로겐에 대해 반응성(estrogen-responsive)이 있으며, 프로게스테론에 대해서는 비반응성(progesterone-unresponsive)이라고 알려져 있다. 최근, 자궁내막증 세포의 지속적 증식(uncontrolled proliferation), 세포사멸에 대한 저항성(anti-apoptosis), 신생혈관생성(angiogenesis), 이동과 침투(migration and invasion), 국소 면역계의 변화(change in local immune system) 등의 특징이 암세포와 매우 유사함을 밝힌 연구결과가 보고된바 있다(Farquhar, 2007; Fazleabas et al., 2004; Garai et al., 2006; Hastings and Fazleabas, 2003; Hastings and Fazleabas, 2006; Wu et al., 2007)(도 1 참조). 자궁내막증의 대표적인 분자생물학적 특징으로 알려진 것은, 에스트로겐(estrogen), 프로스타그란딘(prostaglandin), 사이토카인(cytokine), 및 단백질분해효소(metalloproteinase) 등의 과발현/과생성이 있다(Bulun, 2009)(도 2 참조).
- [0004] 자궁내막증에 대한 근본적인 치료는 현재까지 수술을 통한 자궁내막 제거수술 외에는 없는 실정이며, 이러한 수술요법은 차후 임신에 제약을 줄 수 있고, 재발률 또한 높은 편이다. 내과적 치료로는 통증완화를 위해 진통제, 소염제를 사용하는 보존적 요법, 및 다나졸(danazol), 프로게스테론(progesterone), 성선자극호르몬분비호르몬(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)을 사용하여 생리주기를 제어하는 호르몬치료 요법이 수행되고 있으나 이들은 근본적 치료법이 아닌 증상의 개선일 뿐인 한계점이 있으며, 이들 호르몬의 장기적 사용은 여러 가지 부작용(체중의 증가, 수분 축적, 피로, 여드름, 지성 피부, 조모증, 위축성 질염, 안면 홍조, 근육 경련, 불안정한 감정 상태, 간세포 독성)을 야기하고, 재발률도 매우 높다(-70%). 이와 같이, 자궁내막증은 극심한 통증으로 인해 일상생활에 불편함이 있으며, 심한 경우 불임에까지 이르는 질환으로써, 여성의 '삶의 질'과 '임신'의 문제에서 심각하게 인식되어야 하고 반드시 극복해야 할 질병임에도 불구하고 아직까지 이렇다할 예방 및 치료방법이 존재하지 않으며, 이에 대한 연구도 매우 부족한 실정이다. 따라서, 여성, 특히 가임기 여성들에게 외과적인 수술요법이나 단순한 진통요법, 인위적인 생리주기제어법 등이 아닌, 자연적이고, 부작용이 낮으며, 기존에 효과가 있다고 알려진 천연물을 이용한 자궁내막증 예방 및 치료제의 개발이 시급하다.
- [0005] 한편, 갈화(*Puerariae Flos*)는 쑥의 꽃이며, 전통의학을 바탕으로 주독(酒毒)이나 하혈(下血)을 푸는 데 쓰여왔으며(산림경제 치약 갈근), 쑥잎은 갈엽(葛葉)이라 하여 외상의 지혈에 쓰고 쑥줄기는 갈만(葛蔓)이라 하여 중기와 인후염에 태워서 가루를 내어 외용하거나 내복해 왔다. 이와 같이, 한약으로 사용되어온 천연추출물인 갈화 추출물에 대해, 2004년도 중독약물학회지에 항염증 대응 효과에 대한 연구(J Ethnopharmacol. 2004 Sep;94(1):165-73.)가 발표되었으며, 성장호르몬 분비에 미치는 영향에 대한 연구(Horm Metab Res. 2004 Feb;36(2):86-91.)가 발표되었다. 또한, 2005년 일본약학회지에 갈화를 비롯한 콩과(Leguminosae) 식물 유래의 물질들이 에스트로겐 활성에 미치는 영향이 보고되었다(Biol Pharm Bull. 2005 Mar;28(3):538-40.). 또한, Agriculture Food 화학회지에 갈화 추출물 유래의 물질이 베타-하이드록시-베타-메틸글루타릴 코엔자임 에이(beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A; HMG CoA)의 환원효과를 저해하는 것이 보고되었으며(J Agric Food Chem. 2005 Jul 27;53(15):5882-8.), 이 조효소의 억제제는 콜레스테롤의 생합성과정을 억제하여 간에서 콜레스테롤 생합성을 저해함이 보고되었다. 아울러, 2006년에는 갈화 추출물 유래의 다이진(Daidzin) 물질이 신경전달 물질인 아세틸콜린의 합성 효소인 콜린 아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase)를 활성화하여 약물 중독에 기인하는 건망증 개선에 도움을 줄 수 있다는 연구논문이 일본 농예화학회지에 발표되었다(Biosci

Biotechnol Biochem. 2006 Jan;70(1):107-11.). 또한, 갈화 추출물에 포함된 주성분으로서 카카라이드(kakkalide) 및 텍토리딘(tectoridin)이 확인되었으며(J Nat Med. 2010 Jul;64(3):313-20. Epub 2010 Mar 31.), 상기 카카라이드(kakkalide) 및 텍토리딘(tectoridin) 물질이 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER) 및 에스트로겐 관련 수용체(estrogen related receptor; ERR1/2)에 작용하여 에스트로겐 효과(estrogen effect)를 나타내는 것을 폐경기 이후의 여성들을 대상으로 한 연구 결과가 있었다(Biol Pharm Bull. 2006 Jun;29(6):1202-6.).

[0006] 이에, 본 발명자들은 한의학에서 사용되어온 천연물인 갈화(*Puerariae Flos*)의 추출물이 자궁내막증 세포에 미치는 효과를 연구한 결과, 갈화 추출물이 자궁내막증 세포의 이동을 억제하고, 복막 세포에의 부착을 억제함을 확인하였고, 자궁내막증의 특징적인 대표 인자들의 발현을 억제함을 확인하였으므로, 이를 통해 자궁내막증의 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 아울러, 본 발명의 목적은, 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 및 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 개선용 건강식품용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 아울러, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물은, 자궁내막증 세포에서 세포의 이동을 억제하고, 다른 세포로의 부착력을 억제하며, 세포의 이동 및 부착 인자로 알려진 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 억제하며, 염증관련 효소인 COX-2의 발현을 억제하고, 통증관련 사이토카인인 MCP-1 및 RANTES의 발현을 억제함을 확인함으로써, 갈화 추출물이 자궁내막증의 대표적인 특징인 이동, 부착, 염증 및 통증을 억제할 수 있어, 자궁내막증 및 이로 인한 합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 자궁내막증 세포의 특징을 보여주는 그림이다.

도 2는 정상 자궁내막, 자궁내막증 여성의 자궁내막, 자궁내막증 조직 세포의 분자수준에서의 차이를 보여주는 그림이다.

도 3은 자궁내막증 세포인 11Z 세포에서의 상처 회복 분석(wound healing assay)방법을 사용하여, 세포의 이동성을 확인한 결과이다;

CON: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군; 및

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군.

도 4는 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서의 상처 회복 분석(wound healing assay)방법을 사용하여, 세포의 이동성을 확인한 결과이다;

CON: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군; 및

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군.

도 5는 자궁내막증 세포인 11Z 세포에서 세포의 이동성을 확인한 결과이다;

CON: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군; 및

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군.

도 6은 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 세포의 이동성을 확인한 결과이다;

CON: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군; 및

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군.

도 7은 자궁내막증 세포인 11Z 세포의 복막내피세포에 대한 부착성을 확인한 결과이다;

CON: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군; 및

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군.

도 8는 자궁내막증 세포인 12Z 세포의 복막내피세포에 대한 부착성을 확인한 결과이다;

CON: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군; 및

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군.

도 9a는 자궁내막증 세포인 11Z 세포에서 MMP-2의 mRNA 발현량을 확인한 결과이다;

CON: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군; 및

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군.

도 9b는 자궁내막증 세포인 11Z 세포에서 MMP-9의 mRNA 발현량을 확인한 결과이다;

CON: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군; 및

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군.

도 10a는 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 MMP-2의 mRNA 발현량을 확인한 결과이다;

CON: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군; 및

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군.

도 10b는 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 MMP-9의 mRNA 발현량을 확인한 결과이다;

CON: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군; 및

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군.

도 11은 자궁내막증 세포인 11Z 세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 단백질 발현량을 확인한 결과이다;

PF 0: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군;

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군; 및

β -actin: 베타 액틴.

도 12는 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 단백질 발현량을 확인한 결과이다;

PF 0: 대조군;

PF 25: 갈화 추출물(PF)을 25 ug/ml 처리한 실험군;

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군;

PF 100: 갈화 추출물(PF)을 100 ug/ml 처리한 실험군; 및

β -actin: 베타 액틴.

도 13는 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포에서 COX-2의 mRNA 발현량을 확인한 결과이다;

CON: 대조군; 및

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군.

도 14는 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포에서 MCP-1의 mRNA 발현량을 확인한 결과이다;

CON: 대조군; 및

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군.

도 15는 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포에서 RANTES의 mRNA 발현량을 확인한 결과이다;

CON: 대조군; 및

PF 50: 갈화 추출물(PF)을 50 ug/ml 처리한 실험군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0014] 본 발명은 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 상기 자궁내막증 및 이의 합병증은 MMP-2, MMP-9, COX-2, MCP-1 또는 RANTES의 과발현에서 기인하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0016] 상기 자궁내막증의 합병증은 골반염, 골반유착, 난소낭종, 자궁근종, 자궁 외 임신 및 불임으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0017] 본 발명의 유효성분인 상기 갈화 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다:
- [0018] 1) 식물재료를 부위별로 구분하여 갈화를 선별하는 단계;
- [0019] 2) 선별한 갈화를 건조하는 단계;
- [0020] 3) 갈화를 분쇄하는 단계;
- [0021] 4) 갈화에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0022] 5) 단계 4)의 추출물을 여과하는 단계; 및
- [0023] 6) 단계 5)의 여과한 추출물을 동결 건조하는 단계.
- [0024] 상기 갈화는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0025] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 건조는 실온의 음지에서 1 내지 10일 동안 건조되는 것이 바람직하고, 5일 동안 건조하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 추출 용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물, 바람직하게는 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 용매의 양은 갈화 건조중량의 5 내지 15배로 하는 것이 바람직하고, 10배로 하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 상기 방법에 있어서, 추출 방법은 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출, 전통적 약탕기 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 방법에 있어서, 추출시 온도는 10℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며 상온인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 시간은 10분 내지 3시간이 바람직하고, 15분이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 횟수는 하루에 5 ~ 10회인 것이 바람직하고 10회인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 상기 추출방법을 3일간 반복하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 상기 방법에 있어서, 단계 6)의 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조 하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0029] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 갈화 추출물이 자궁내막증에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 자궁내막증 여성에게서부터 개발된 자궁내막증 세포주인 11Z 및 12Z에 갈화 추출물을 전처리 한 후, 자궁내막증 세포의 특성인 세포의 이동성을 상처 회복 분석 실험 및 트랜스웰-이동 분석 실험으로 확인한 결과, 갈화 추출물이 농도 의존적으로 자궁내막증 세포의 이동현상을 억제함을 확인 하였다(도 3 내지 6 참조).
- [0030] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 갈화 추출물의 자궁내막증의 대표적인 특징인 복막 및 복강 주위의 장기로의 부착 및 착상에 미치는 영향을 알아보기 위해, 복막 및 복강 주위의 장기를 감싸고 있는 세포인 Met5A 세포로의 부착 분석 실험으로 확인한 결과, 자궁내막증 세포가 갈화 추출물에 의해 부착력이 억제됨을 확인하였다(도 7 및 도 8 참조).
- [0031] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 세포의 이동 및 부착에 관련된 단백질이며, 자궁내막증에서 과발현되는 MMP-2 및 MMP-9의 발현이 갈화 추출물에 의해 억제되는지 알아보기 위하여, 자궁내막증

세포에 갈화 추출물을 처리하고 내인성 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 및 단백질 발현량을 확인한 결과, 갈화 추출물을 처리한 군이 대조군에 비해 세포의 이동 및 부착 관련 인자인 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 유의적으로 억제함을 확인하였다(도 9 내지 12 참조).

[0032] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 갈화 추출물이 자궁내막증의 특징인 통증 및 염증과 관련되어 있는 COX-2(cyclooxygenase-2)의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 자궁내막증 세포에 갈화 추출물을 처리하고 COX-2의 mRNA 발현량을 확인한 결과, 갈화 추출물을 처리한 실험군에서의 COX-2 발현이 대조군에 비해 감소되는 것을 확인하였다(도 13 참조).

[0033] 아울러, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 갈화 추출물이 자궁내막증 세포에서 과발현되는 것으로 알려진 사이토카인인 MCP-1 및 RANTES의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 자궁내막증 세포에 갈화 추출물을 처리한 후, MCP-1 및 RANTES의 mRNA 발현량을 확인한 결과, 갈화 추출물에 의해 MCP-1 및 RANTES 모두 mRNA 발현량이 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 14 및 도 15 참조).

[0034] 따라서, 본 발명의 갈화 추출물이 자궁내막증의 특징으로 알려진 세포의 이동 및 복막 또는 복강 주위의 장기로의 부착을 억제하고, 세포의 이동 및 부착 인자인 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 및 단백질의 발현을 억제하며, 통증과 관련된 COX-2의 발현을 억제하며, 염증관련 사이토카인인 MCP-1 및 RANTES의 발현을 억제하는 효과를 가지므로, 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0035] 본 발명의 갈화 추출물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 갈화 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 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, 동결 건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성 용제, 현탁 용제로는 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.

[0037] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0038] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 갈화 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 갈화 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [0040] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 /이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 /이며, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0041] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.
- [0042] 상기 투여 방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 갈화 추출물을 자궁내막증에 걸렸던 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자궁내막증의 재발 방지의 방법을 제공한다.
- [0044] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 /이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 /이며, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0045] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.
- [0046] 상기 투여 방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0047] 아울러, 본 발명은 상기 제조방법에 의하여 제조된 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.
- [0048] 상기 자궁내막증 및 이의 합병증은 MMP-2, MMP-9, COX-2, MCP-1 또는 RANTES의 과발현에서 기인하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 상기 자궁내막증의 합병증은 골반염, 골반유착, 난소낭종, 자궁근종, 자궁 외 임신 및 불임으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 갈화 추출물이 농도 의존적으로 자궁내막증 세포의 이동 및 부착을 억제함을 확인하였으며, 자궁내막증에서 과발현되는 세포의 이동에 관련된 MMP-2 및 MMP-9, 통증 및 염증과 관련되어 있는 COX-2(cyclooxygenase-2) 및 염증관련 사이토카인인 MCP-1 및 RANTES의 발현을 억제함을 확인함으로써, 본 발명의 갈화 추출물이 자궁내막증 및 이의 합병증의 예방 또는 개선용 건강식품용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0051] 본 발명의 건강식품은 갈화 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0052] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 갈화 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0053] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스화 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감

미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0054] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0055] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

[0056] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0057] <실시예 1> 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물 제조

[0058] 본 발명자들은 전통적 약탕기 추출법을 이용해서 제조된 갈화 추출물을 한국식물추출물은행으로부터 구입하였다.

[0059] 구체적으로, 한국식물추출물은행에서는 갈화 추출물을 제조하기 위하여 식물재료를 부위별로 구분하였고, 선별한 갈화를 실온의 음지에서 약 5일 동안 건조 분쇄한 갈화 시료와 3차 증류수를 1:10의 비율로 섞고, 약 3시간 동안 약탕기에서 열수 추출한 후 여과하였다. 그 후, 추출물을 동결건조기(Freeze dryer)로 물을 제거하여 제조하였다.

[0060] <실험예 1> 갈화 추출물의 자궁내막증 세포 이동 억제 효과 확인

[0061] <1-1> 갈화 추출물의 상처 치유 억제 효과 확인

[0062] 본 발명의 갈화 추출물이 자궁내막증 세포의 이동현상에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상처 치유 분석(wound healing assay)을 수행하였다.

[0063] 구체적으로, 세포의 이동성을 확인하기 위하여, 자궁내막증 여성의 활성화된 자궁내막증 병변(active endometriotic lesion)으로부터 개발된 인간 불멸화(immortalized) 자궁내막증 세포인 11Z(Johann-Wolfgang-Goethe-Universitaet, Germany) 및 12Z 세포(Johann-Wolfgang-Goethe-Universitaet, Germany)는 10 %의 FBS와 100 U/ml의 페니실린 G 및 100 g/ml의 스트렙토마이신(Life Technologies, Grand Island, NY)이 포함된 DMEM/F12 배지에서 37 °C의 5% CO₂ 인큐베이터로 배양되었다. 상기 11Z 및 12Z 세포 5×10⁵ 개/well를 12-well 플레이트에 각각 분주하였다. 분주한 세포를 80% 내지 90%가 되도록 DMEM/F12 배지로(Life Technologies, Grand Island, NY) 37 °C에서 배양한 후, 세포의 배지를 제거하고 세포의 단일층(monolayer)의 가운데 부분을 소독한 마이크로 파이펫(micro pipette)의 팁(tip)으로 긁어서 일정한 너비의 세포가 벗겨진 부분(denuded zone(gap))을 생성하고, 세포의 파편(debris)을 PBS로 씻어낸 후, 갈화 추출물에 노출시켰다(25 ug/ml, 50 ug/ml 및 100 ug/ml). 상처의 위치를 선으로 표시한 초기의 세포 단일층 사진을, 상처낸 후 0, 2, 8, 및 24시간 동안 배양한 세포 단일층 사진과 비교하여, 상처가 채워진 정도로 세포의 이동성을 확인하였고, 원래의 상처의 위치를 표시한 선을 넘은 세포의 수를 각 트리플리케이트(triplicate)의 6개의 랜덤한 필드에서 개수하고 그래프화 하였다.

[0064] 그 결과, 갈화 추출물을 전처리한 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포의 상처 회복이 농도 의존적으로 지연됨을 확인할 수 있었으며, 이를 통해, 갈화 추출물이 자궁내막증 세포의 이동현상을 억제할 수 있음을 확인하였다(도 3 및 도 4).

[0065] <1-2> 갈화 추출물의 자궁내막증 세포 이동 억제 효과 확인

- [0066] 본 발명의 갈화 추출물이 자궁내막증 세포의 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 트랜스웰-이동 분석(transwell-migration assay)을 3번 반복 수행하였다.
- [0067] 구체적으로, 24웰-트랜스웰 플레이트(8 um pore size)에 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포를 트랜스웰 플레이트의 윗 부분(upper part)에 각각 분주한 후, 25 ug/ml, 50 ug/ml, 및 100 ug/ml의 갈화 추출물을 처리하였다. 갈화 추출물 처리 8시간 또는 24시간 후, 트랜스웰 바깥쪽 면의 막으로 이동한 세포들을 메탄올로 고정하여, 0.5%의 크리스탈 바이올렛으로 10분 동안 염색하였다. 상기의 트랜스웰 바깥쪽면으로 이동한 세포들을 200 X 배율의 현미경으로 관찰하여 개수하여 그래프화 하였다.
- [0068] 그 결과, 갈화 추출물을 8시간 또는 24시간 처리한 자궁내막증 세포 11Z 및 12Z의 이동이 유의적으로 억제됨을 확인하였다(도 5 및 6).
- [0069] **<실험예 2> 갈화 추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인**
- [0070] 본 발명의 갈화 추출물이 자궁내막증 세포의 부착 및 착상에 미치는 영향을 확인하기 위하여 부착 분석(attachment assay)을 3번 반복 수행하였다.
- [0071] 구체적으로, 자궁내막증의 특징인 자궁내막증 세포가 복막 복강주위의 장기에 부착 및 착상하는 현상을 갈화 추출물이 억제하는지 확인하기 위해, 인간 복막 중피 세포(Human peritoneal methothelial cells)인 Met-5A 세포(American Type Culture Collection, ATCC)를 10%의 FBS, 100 U/ml의 페니실린 G 및 100 g/ml의 스트렙토마이신(Life Technologies, Grand Island, NY, U.S.A.), 및 400 nM의 hydrocortisone(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, U.S.A.)가 포함된 199 배지에서 5 % CO₂ 인큐베이터로 배양하였다. 상기 Met-5A 세포를 96-웰 플레이트에 분주하였다. Cell tracker green CMFDA로 표지한 자궁내막증 세포주인 11Z 및 12Z 세포(2×10^3 개/well)를 25 ug/ml, 50 ug/ml, 및 100 ug/ml의 갈화 추출물을 함유한DMEM/F12배지와 섞은 후, 미리 분주해놓은 Met-5A 세포에 첨가하였다. 섞인 상기의 세포들은 37 °C의 5% CO₂-인큐베이터에서 한 시간 동안 배양한 후, 플레이트를 뒤집고 칼슘 및 마그네슘이 들어있는 포스페이트-버퍼 용액(phosphate-buffered solution)으로 씻었다. 부착된 세포들을 490 nm의 파장으로 분석하여, 대조군을 100%로 놓고 부착된 세포들의 퍼센트를 계산하였다.
- [0072] 그 결과, 갈화 추출물이 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포가, 복막 및 복강 주위 장기의 외부를 둘러싼 Met-5A 세포에 부착하는 것을 유의성 있게 억제하는 것을 확인하였다(도 7 및 8).

[0073] **<실험예 3> 갈화 추출물의 자궁내막증 세포 이동 및 부착 억제 효과 확인**

[0074] **<3-1> 갈화 추출물의 MMP-2 및 MMP-9 mRNA 발현 억제 효과 확인**

- [0075] 본 발명의 갈화 추출물이 자궁내막증 세포의 이동 및 침투에 중요한 역할을 하는 단백질 분해효소인 MMP2 및 MMP-9의 mRNA 발현을 억제하는지 확인하기 위하여, 실시간 PCR(real-time PCR)을 수행하였다.
- [0076] 구체적으로, 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포에 갈화 추출물 25 ug/ml, 50 ug/ml, 또는 100 ug/ml을 24시간 동안 처리한 후, 11Z 및 12Z 세포에서 TRIzol(Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada)을 사용하여 당 업계에 알려진 방법으로 총 RNA를 추출하여, 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하여 first-strand cDNA로 역전사 하였다. PCR로 증폭한 상기 합성된 first-strand cDNA를 주형으로 하여, Thermal Cycler Dice Real Time PCR System(Takara, Japan)을 이용하여 95 °C에서 5초 동안 변성, 57 °C에서 10초 동안 어닐링(annealing), 72 °C에서 20초 동안 연장을 수행하는 조건으로 45회 반복하여 SYBR Green real-time PCR을 수행하였다. 상기 SYBR Green real-time PCR에 사용된 MMP-2 프라이머, MMP-9 프라이머 및 대조군인 GAPDH 프라이머들은 하기 [표 1]과 같으며, MMP-2 및 MMP-9의 Ct 값의 평균은 트리플리케이트(triplicate) 측정으로 구해지며, 대조군인 GAPDH의 Ct 값에 의해 보정되었다.

표 1

MMP-2	sense primer	5'- ACCGCGACAAGAAGTATGGC-3'	서열번호 1
	antisense primer	5'- CCACTTGCCTGTCATCATCGT-3'	서열번호 2
MMP-9	sense primer	5'- CGATGACGAGTTGTGGTCCC-3'	서열번호 3
	antisense primer	5'- TCGTAGTTGGCCGTGGTACT-3'	서열번호 4

GAPDH	sense primer	5'- GAGTCAACGGATTGGTCGT-3	서열번호 5
	antisense primer	5'- TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'	서열번호 6

[0078] 그 결과, 자궁내막증이 발현하는 대표적인 단백질이며, 세포의 이동과 침투에 중요한 역할을 하는 내인성 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현을 갈화 추출물이 유의적으로 억제함을 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포에서 확인하였다(도 9-a 및 도 9-b).

[0079] <3-2> 갈화 추출물의 MMP-2 및 MMP-9 단백질 발현 억제 효과 확인

[0080] 본 발명의 갈화 추출물이 자궁내막증 세포의 이동 및 침투에 중요한 역할을 하는 단백질 분해효소인 MMP2 및 MMP-9의 단백질 발현을 억제하는지 확인하기 위하여, 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0081] 구체적으로, 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포에 갈화 추출물을 25 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml 24시간 동안 처리한 후, 단백질 용해 버퍼(lysis buffer)(Intron, 서울)로 용해시켜 브래드포드 분석(bradford assay) 방법으로 단백질의 농도를 정량하여 보정하였다. 세포 용해물의 단백질 샘플을 동량의 5XSDS 샘플 버퍼와 섞어서 4분 동안 가열하여, 10% 내지 12%의 SDS-PAGE 겔에 전기영동하였다. 전기 영동한 겔의 단백질을 PVDF(polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane)에 옮기고, 단백질이 붙은 멤브레인을 2.5% 탈지분유로 30분 동안 블락킹(blocking)하고, 씻은 후, 일차 항체 항-MMP-2(Cell Signaling Technology, USA), 항-MMP-9(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), 및 대조군인 항-베타-액틴(anti-beta-actin)(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 항체를 포함하는 TBS-T 용액(Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20)에 4 ℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 후, 일차 항체를 TBS-T 용액으로 3회 씻어서 제거하고, HRP(horseradish peroxidase)-결합 이차 항체(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 1:1000 내지 1:2000으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 이차 항체와 반응시킨 멤브레인을 TBS-T 용액으로 3회 씻은 후, 화학발광시켜 ImageQuant Las-4000(Tokyo, Japan)으로 분석하였다.

[0082] 그 결과, 갈화 추출물이 자궁내막증 세포의 이동 및 침투에 관련된 내인성 MMP-2 및 MMP-9 단백질의 발현을 억제함을 확인하였다(도 11 및 도 12)

[0083] <실험예 4> 갈화 추출물의 염증 및 통증 관련 효소 COX-2 발현 억제 효과 확인

[0084] 본 발명의 갈화 추출물이 자궁내막증의 통증과 관련되어 있다고 알려진 COX-2의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실시간 PCR(real-time PCR)을 수행하였다.

[0085] 구체적으로, 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포에 갈화 추출물을 50 ug/ml 24시간 동안 처리한 후, TRIzol(Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada)을 사용하여 당업계에 알려진 방법으로 총 RNA를 추출하여, 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하여 first-strand cDNA로 역전사 하였다. PCR로 증폭한 상기 합성된 first-strand cDNA를 주형으로 하여, Thermal Cycler Dice Real Time PCR System(Takara, Japan)을 이용하여 95 ℃에서 5초 동안 변성, 57 ℃에서 10초 동안 어닐링(annealing), 72 ℃에서 20초 동안 연장을 수행하는 조건으로 45회 반복하여 SYBR Green real-time PCR을 수행하였다. 상기 SYBR Green real-time PCR에 사용된 COX-2 프라이머 및 대조군인 GAPDH 프라이머들은 하기 [표 2]과 같으며, COX-2의 Ct값의 평균은 트리플리케이트(triplicate) 측정으로 구해지며, 대조군인 GAPDH의 Ct값에 의해 보정되었다.

표 2

COX-2	sense primer	5'- CTCCTTGGGTGTCAAAGGT-3 '	서열번호 7
	antisense primer	5'- GTGAAGTGCTGGGCAAAGAA-3 '	서열번호 8
GAPDH	sense primer	5'- GAGTCAACGGATTGGTCGT-3	서열번호 5
	antisense primer	5'- TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'	서열번호 6

[0087] 그 결과, 자궁내막증 세포의 통증관련 특징적 효소인 COX-2의 mRNA 발현을 갈화 추출물이 유의적으로 억제함을 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포에서 확인하였다(도 13).

[0088] <실험예 5> 갈화 추출물의 염증성 사이토카인(cytokine) 발현 억제 효과 확인

[0089] 본 발명의 갈화 추출물이 자궁내막증 세포에서 과발현되는 것으로 알려져 있는 염증성 사이토카인의 mRNA 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, real-time PCR을 수행하였다.

[0090] 구체적으로, 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포에 갈화 추출물을 50 ug/ml 24시간 동안 처리한 후, TRIzol(Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada)을 사용하여 당업계에 알려진 방법으로 총 RNA를 추출하여, 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하여 first-strand cDNA로 역전사 하였다. PCR로 증폭한 상기 합성된 first-strand cDNA를 주형으로 하여, Thermal Cycler Dice Real Time PCR System(Takara, Japan)을 이용하여 95 ℃에서 5초 동안 변성, 57 ℃에서 10초 동안 어닐링(annealing), 72 ℃에서 20초 동안 연장을 수행하는 조건으로 45회 반복하여 SYBR Green real-time PCR을 수행하였다. 상기 SYBR Green real-time PCR에 사용된 MCP-1 프라이머, RANTES 프라이머, 및 대조군인 GAPDH 프라이머들은 하기 [표 3]과 같으며, MCP-1 및 RANTES의 Ct값의 평균은 트리플리케이트(triplicate) 측정으로 구해지며, 대조군인 GAPDH의 Ct값에 의해 보정되었다.

표 3

MCP-1	sense primer	5'- GCTCATAGCAGCCACCTTCA-3'	서열번호 9
	antisense primer	5'- GGACACTTGCTGCTGGTGAT-3'	서열번호 10
RANTES	sense primer	5'- TCATTGCTACTGCCCTCTGC-3'	서열번호 11
	antisense primer	5'- CTTTCGGGTGACAAAGACGA-3'	서열번호 12
GAPDH	sense primer	5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	서열번호 5
	antisense primer	5'- TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'	서열번호 6

[0092] 그 결과, 자궁내막증 세포의 염증과 관련된 사이토카인인 MCP-1 및 RANTES의 mRNA 발현을 갈화 추출물이 유의적으로 억제함을 자궁내막증 세포인 11Z 및 12Z 세포에서 확인하였다(도 14 및 도 15).

[0093] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0094] <1-1> 산제의 제조

[0095] 실시예 1의 추출물 2 g

[0096] 유당 1 g

[0097] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0098] <1-2> 정제의 제조

[0099] 실시예 1의 추출물 100 mg

[0100] 옥수수전분 100 mg

[0101] 유당 100 mg

[0102] 스테아린산 마그네 2 mg

[0103] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0104] <1-3> 캡슐제의 제조

[0105] 실시예 1의 추출물 100 mg

[0106] 옥수수전분 100 mg

[0107]	유 당	100 mg
[0108]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0109]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.	
[0110]	<1-4> 환의 제조	
[0111]	실시에 1의 추출물	1 g
[0112]	유당	1.5 g
[0113]	글리세린	1 g
[0114]	자일리톨	0.5 g
[0115]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.	
[0116]	<1-5> 과립의 제조	
[0117]	실시에 1의 추출물	150 mg
[0118]	대두추출물	50 mg
[0119]	포도당	200 mg
[0120]	전분	600 mg
[0121]	상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.	
[0122]	<제조예 2> 식품의 제조	
[0123]	<2-1> 밀가루 식품의 제조	
[0124]	본 발명의 실시에 1의 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.	
[0125]	<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조	
[0126]	본 발명의 실시에 1의 추출물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.	
[0127]	<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조	
[0128]	본 발명의 실시에 1의 추출물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.	
[0129]	<2-4> 유제품(dairy products)의 제조	
[0130]	본 발명의 실시에 1의 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.	
[0131]	<2-5> 전식의 제조	
[0132]	현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말	

로 제조하였다.

- [0133] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0134] 본 발명의 실시예 1의 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.
- [0135] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 실시예 실시예 1의 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.
- [0136] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),
- [0137] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
- [0138] 실시예 1의 추출물(3 중량부),
- [0139] 영지(0.5 중량부),
- [0140] 지황(0.5 중량부)

[0141] <제조예 3> 음료의 제조

[0142] <3-1> 건강음료의 제조

[0143] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 실시예 1의 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0144] <3-2> 야채 주스의 제조

[0145] 본 발명의 실시예 1의 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

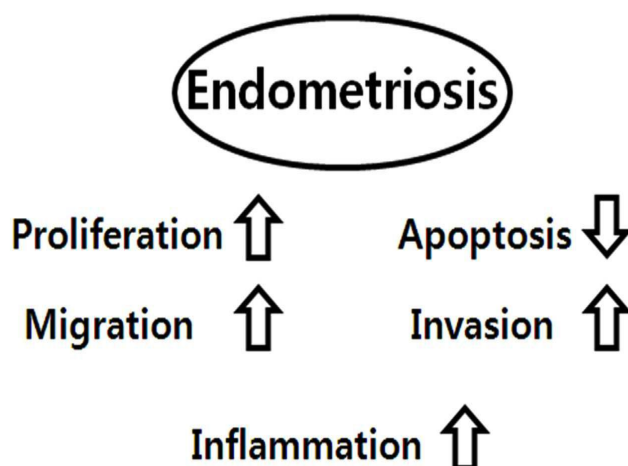
[0146] <3-3> 과일 주스의 제조

[0147] 본 발명의 실시예 1의 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

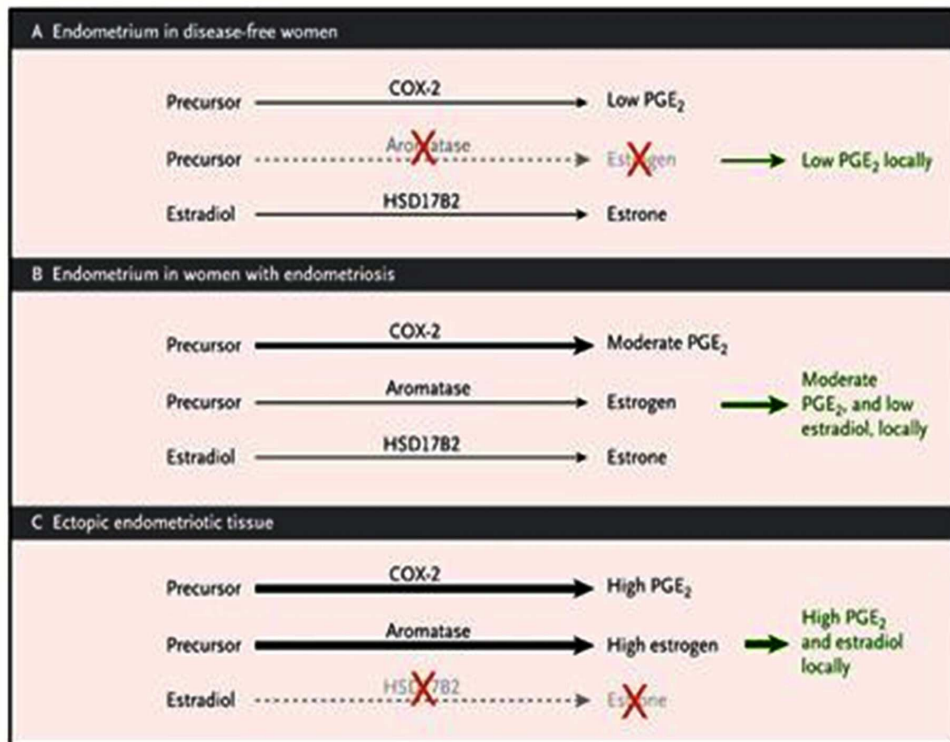
도면

도면1

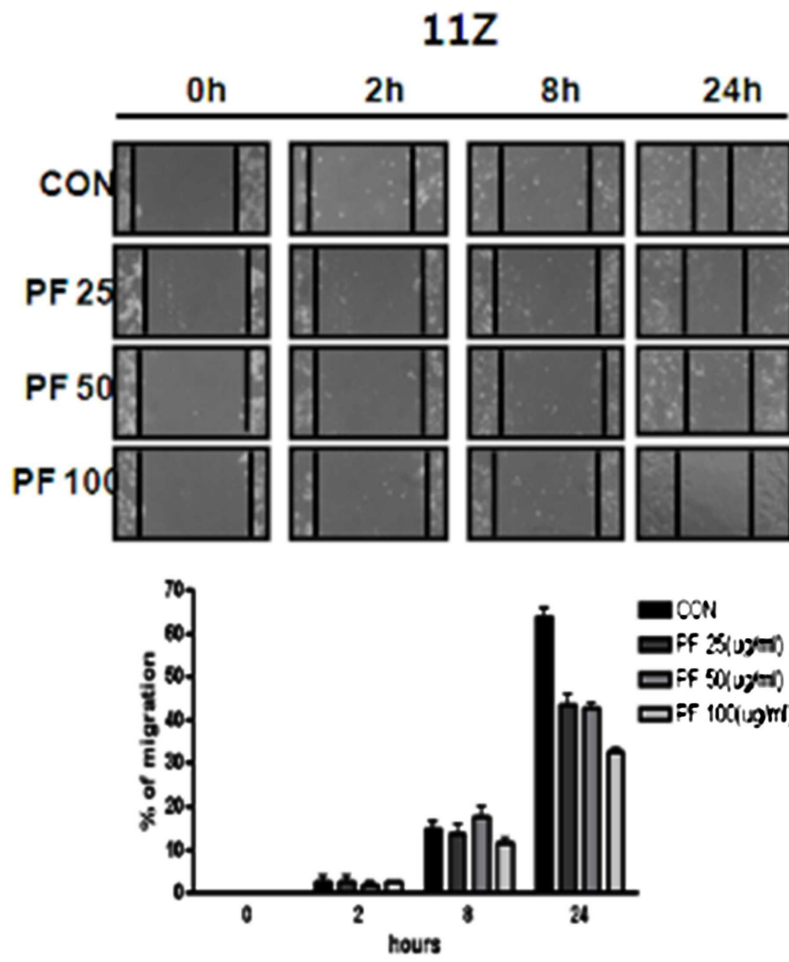
Estrogen-responsive/progesterone-unresponsive



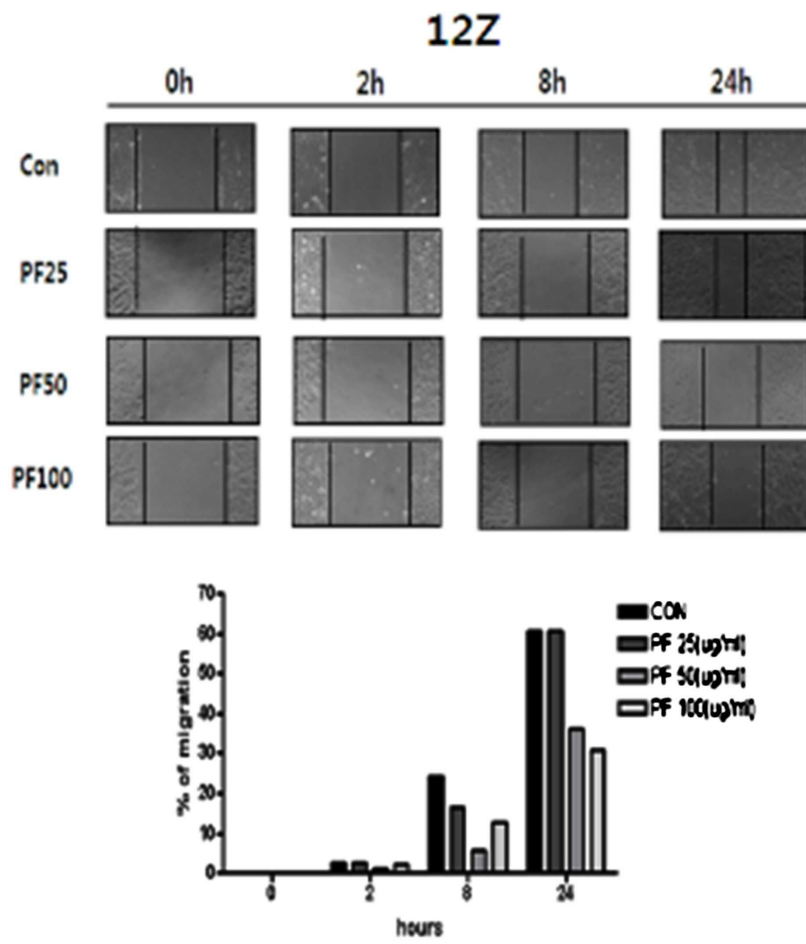
도면2



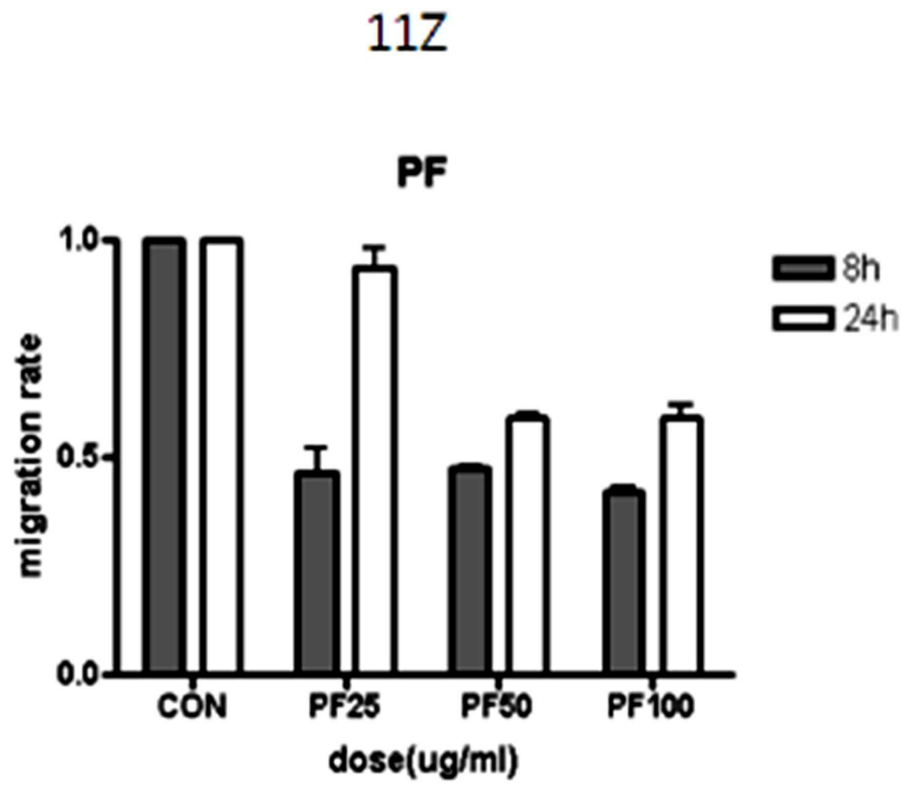
도면3



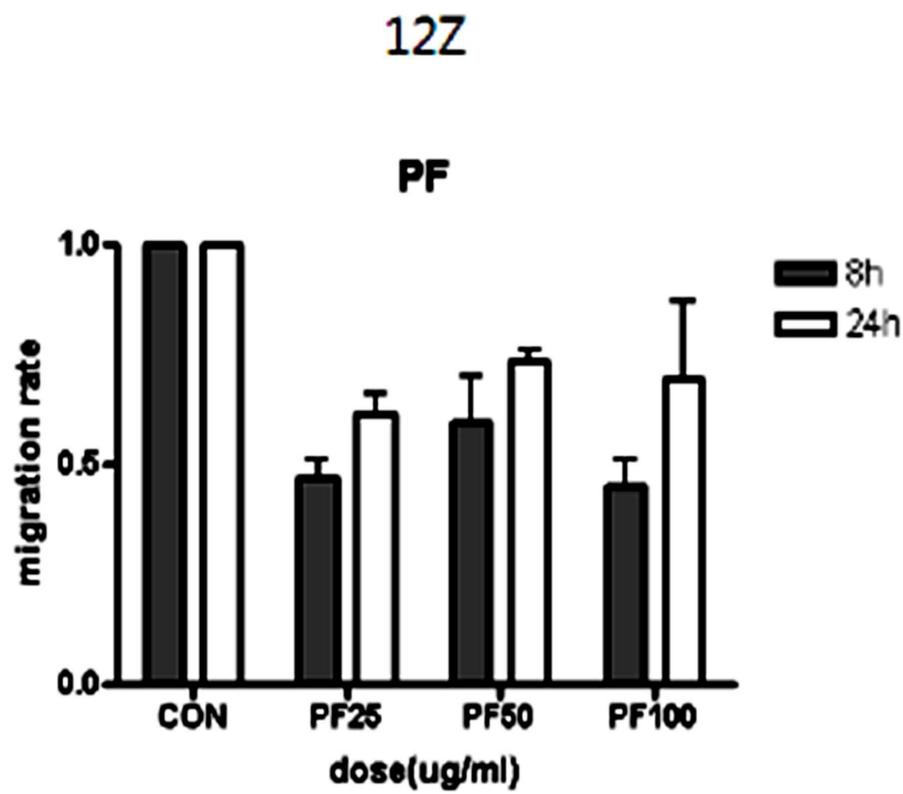
도면4



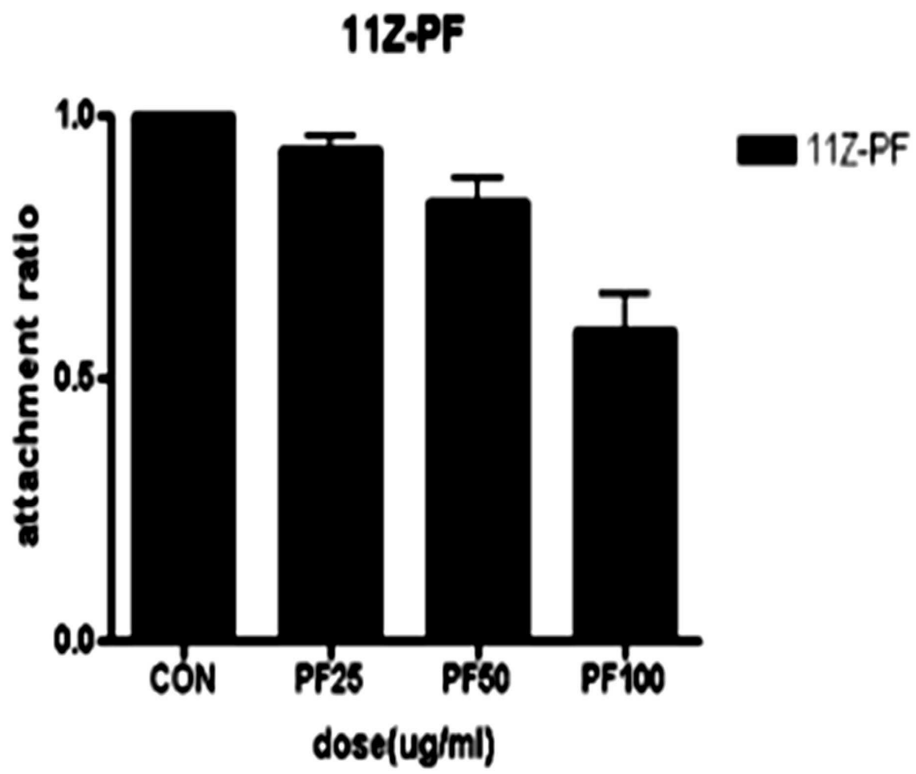
도면5



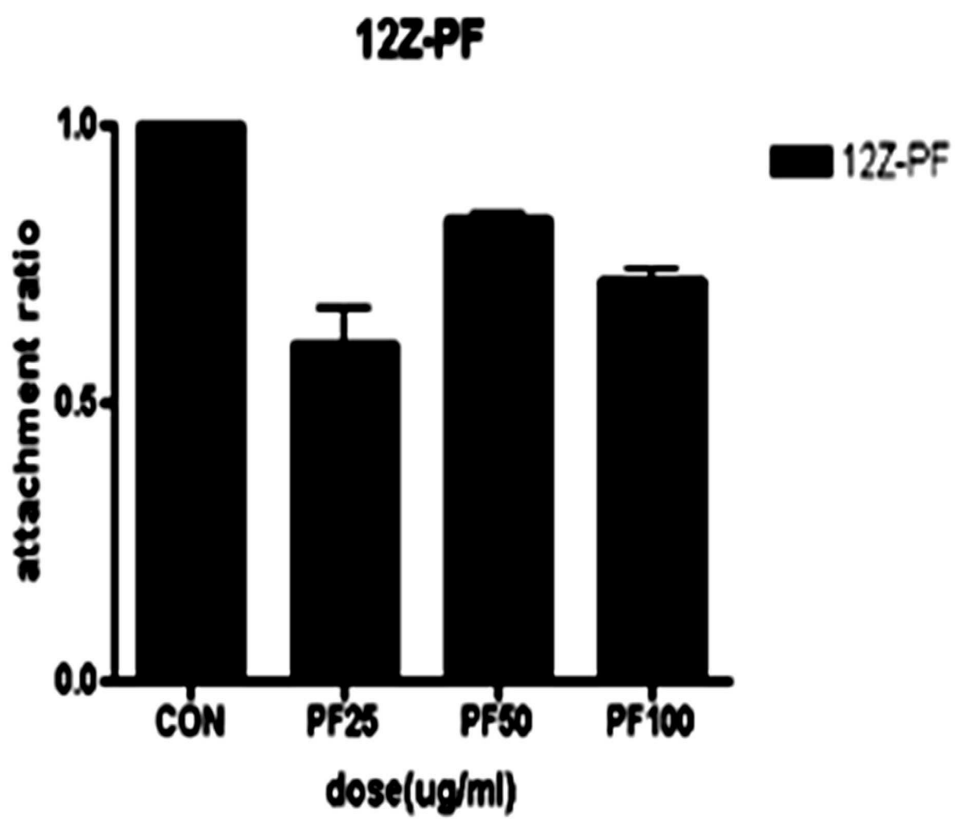
도면6



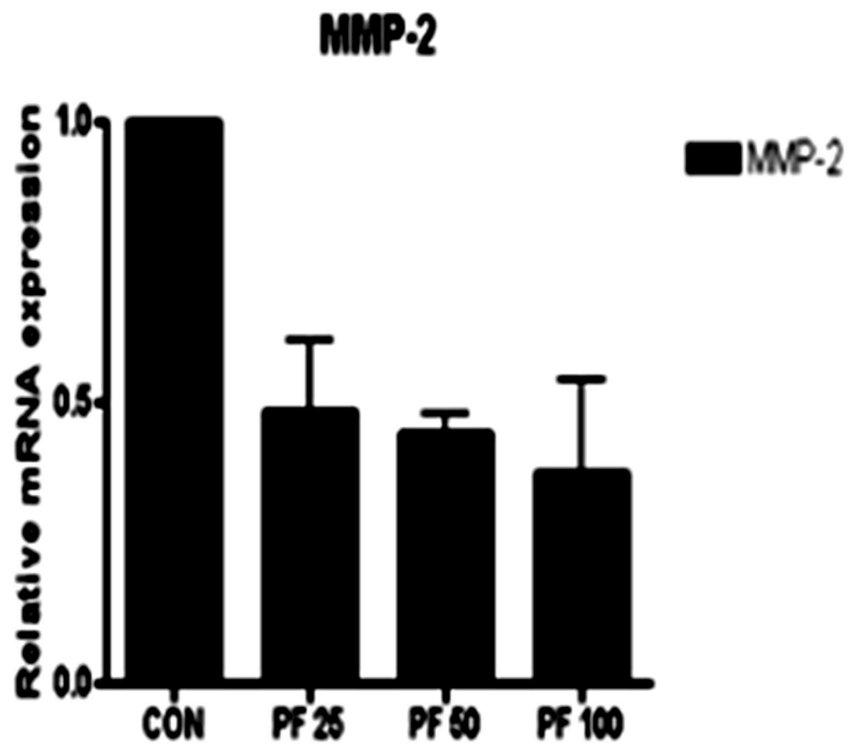
도면7



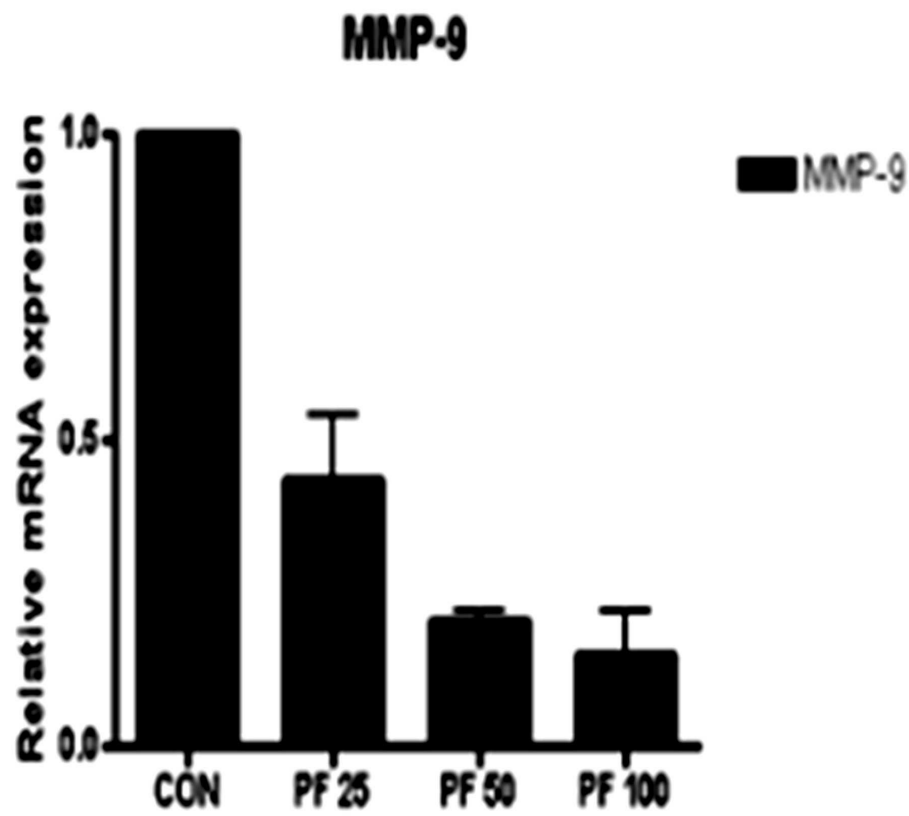
도면8



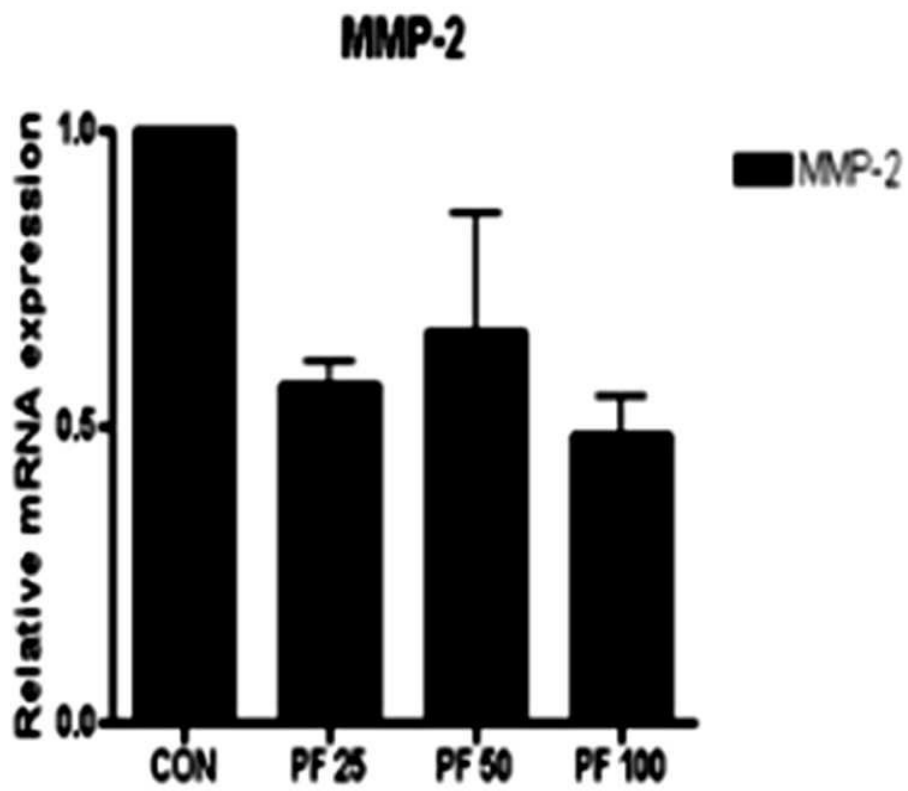
도면9a



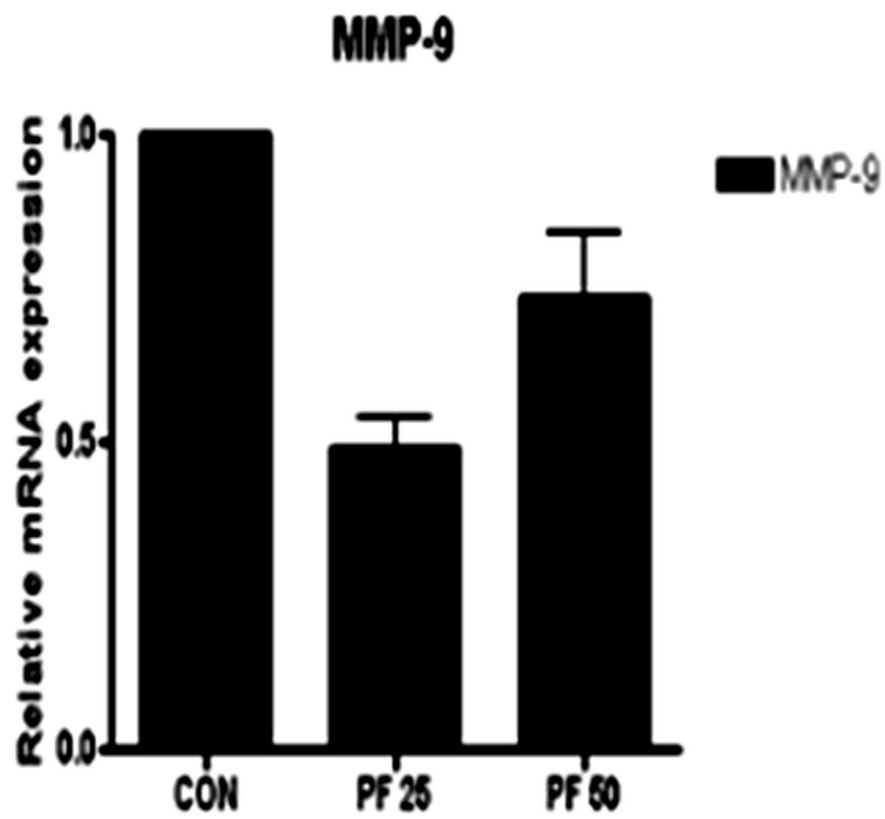
도면9b



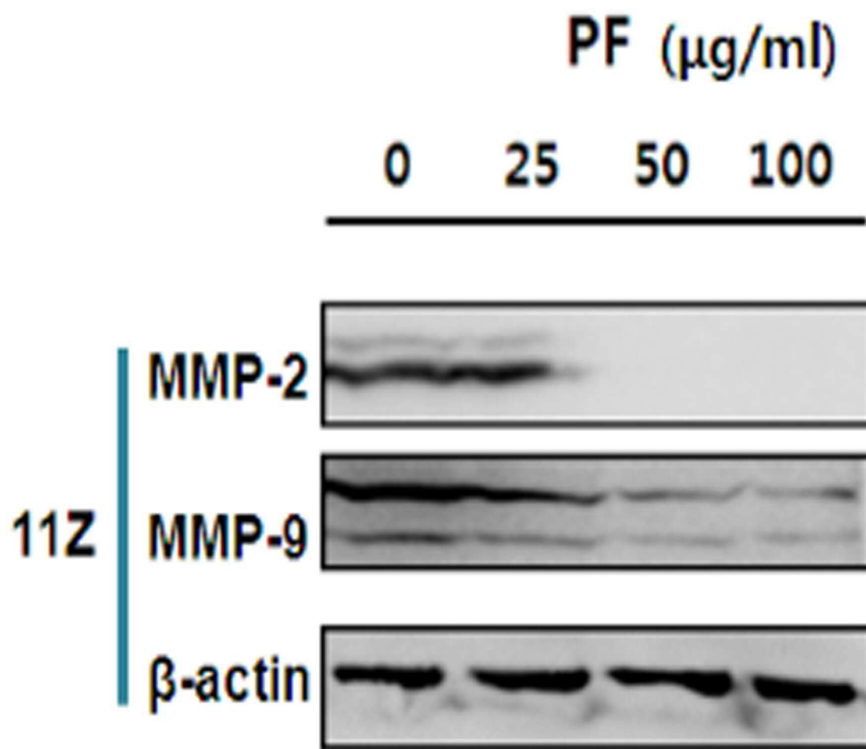
도면10a



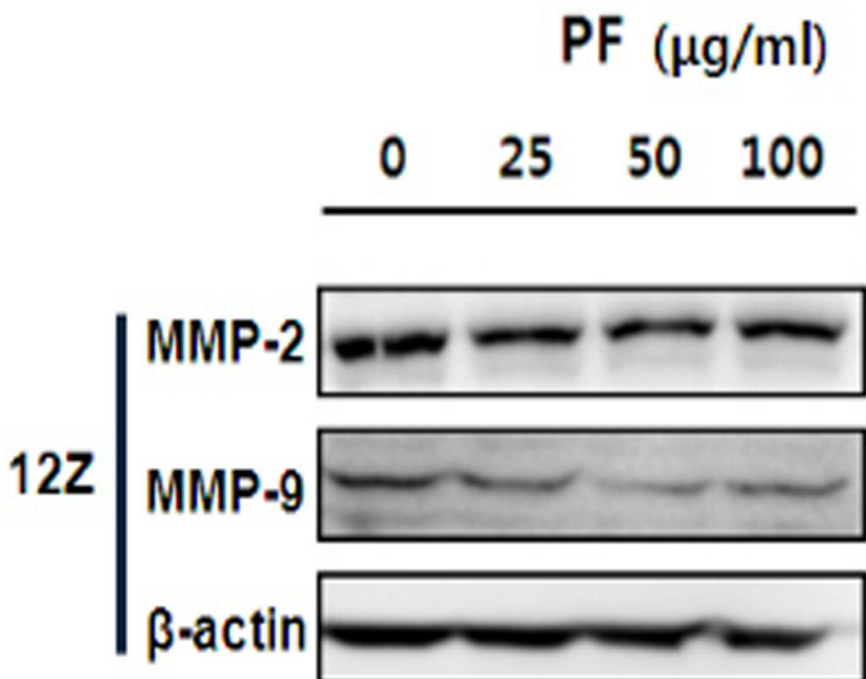
도면10b



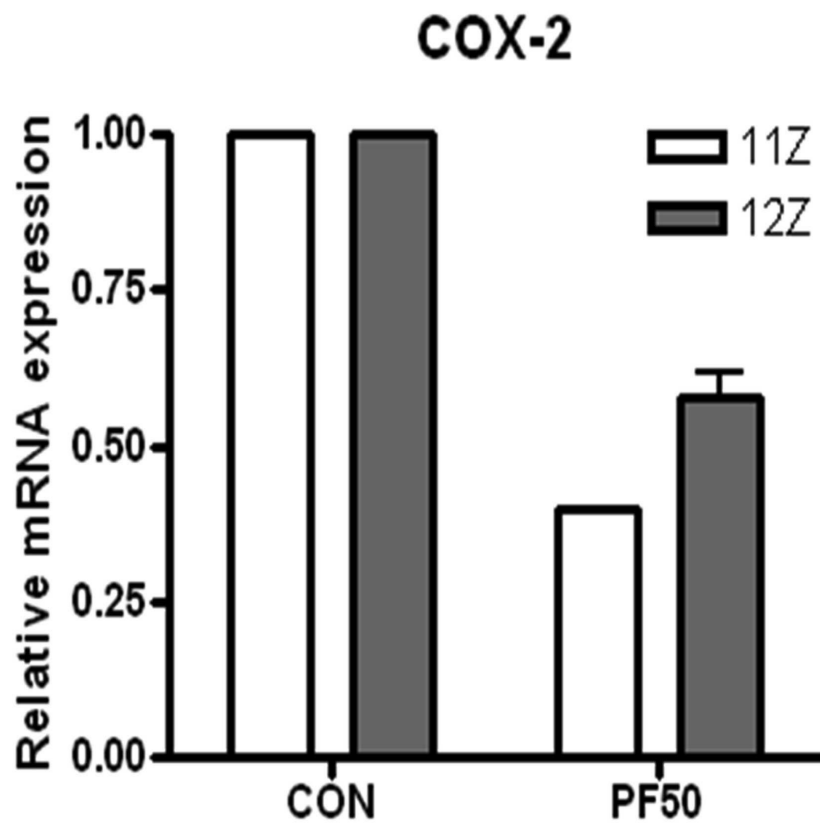
도면11



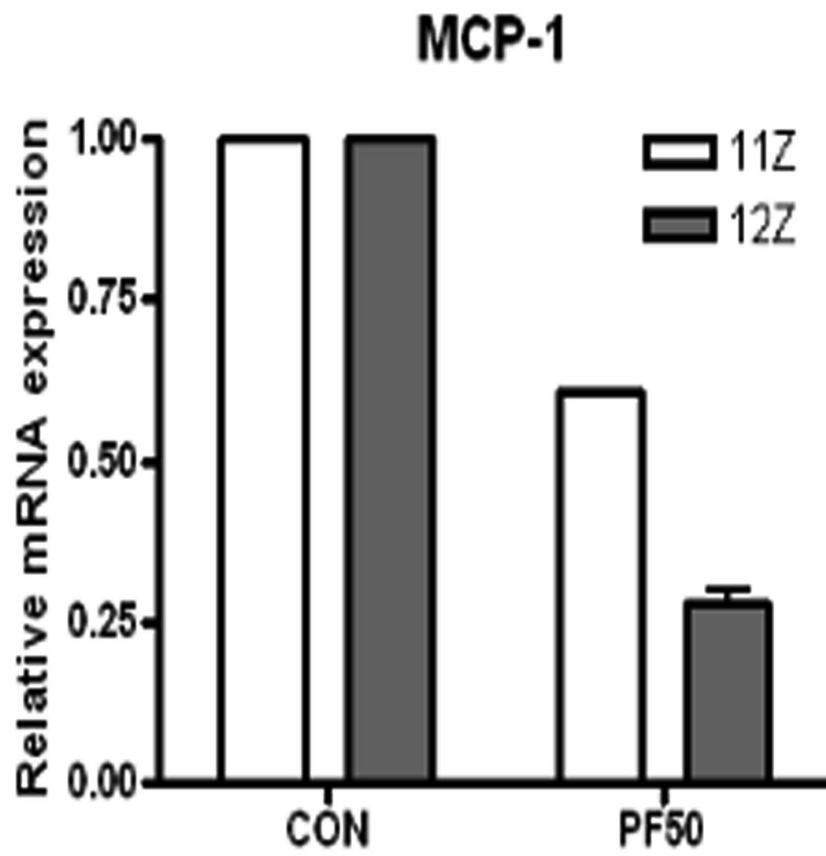
도면12



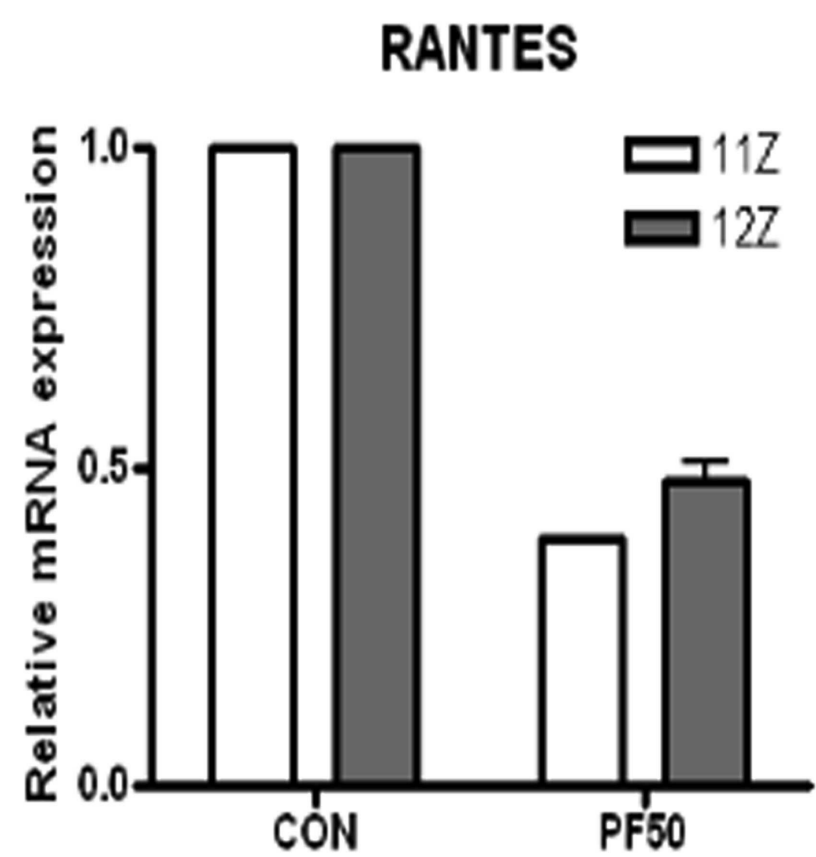
도면13



도면14



도면15



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A pharmaceutical composition comprising extract of Puerariae Flos for prevention and treatment of endometriosis
- <130> 11P-07-48
- <160> 12
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> MMP-2 sense primer
- <400> 1
- accgcgacaa gaagtatggc
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA

<213
 > Artificial Sequence
 <220><223> MMP-2 anti-sense primer
 <400> 2
 ccacttgccg tcatcatcgt 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-9 sense primer
 <400> 3
 cgatgacgag ttgtgggtccc 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-9 anti-sense primer
 <400> 4
 tcgtagttgg ccgtggtact 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH sense primer
 <400> 5
 gagtcaacgg atttggtcgt 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH anti-sense primer
 <400> 6
 ttgattttgg agggatctcg 20
 <210> 7

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> COX-2 sense primer

<400> 7
 ctcccttggg tgtcaaaggt 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> COX-2 anti-sense primer

<400> 8
 gtgaagtgct gggcaaagaa 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCP-1 sense primer

<400> 9
 gctcatagca gccaccttca 20

<210> 10
 <211>

> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCP-1 anti-sense primer

<400> 10
 ggacacttgc tgcgtgat 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RANTES sense primer

<400> 11

tcattgctac tgcctctgc

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RANTES anti-sense primer

<400> 12

ctttcgggtg acaaagacga

20