(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월12일
(11) 등록번호 10-1735242
(24) 등록일자 2017년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/31 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/31 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0074847
(22) 출원일자 2016년06월16일
심사청구일자 2016년06월16일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160058208 A

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
강세찬
경기도 성남시 분당구 정자로 143, 202동 1202호 (정자동, 한솔마을LG아파트)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 고일영

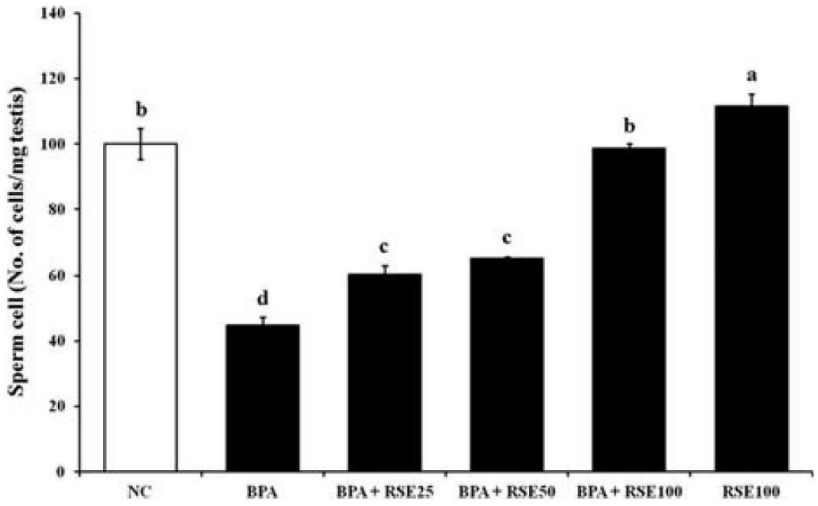
(54) 발명의 명칭 **남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 무순 추출물을 포함하는 남성 생식기 관련 질환의 예방 또는 치료를 위한 조성물을 제공한다.

본 발명의 무순 추출물은 테스테로스테론 감소 억제, 고환 크기 감소 억제, 정자 감소 억제, 항안드로겐 작용 및 전립선 특이항원 억제 효과 등을 통해서 남성 생식기 관련 질환의 개선, 예방 및 치료에 현저한 효과를 가진다.

대 표 도 - 도2



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

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

무순 추출물을 포함하는 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 치료용 약학 조성물로서,

상기 남성 생식 기관 관련 질환은 정자감소증, 정자운동성 약화증, 불임, 전립선 비대증, 전립선 비대로 인한 야뇨증 및 전립선 암으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 무순 추출물은 80 내지 95 % 에탄올 수용액 추출물인 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 무순 추출물은 무순 추출물의 부탄올 분획물인 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

무순 추출물을 포함하는 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 개선용 건강기능식품으로서,

상기 남성 생식 기관 관련 질환은 정자감소증, 정자운동성 약화증, 불임, 전립선 비대증, 전립선 비대로 인한 야뇨증 및 전립선 암으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 6

삭제

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 무순 추출물은 80 내지 95 % 에탄올 수용액 추출물인 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 무순 추출물은 무순 추출물의 부탄올 분획물인 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 여러 환경호르몬이 고환에서 정자 세포의 세포자살을 유도할 수 있음이 증명되었고, 이처럼 환경호르몬에 의한 정자수 감소는 이미 밝혀진 사실이나 이를 회복하거나 방지할 수 있는 물질은 거의 연구되지 못하고 있는 실정

이다. 여러 환경호르몬 중 하나인 비스페놀 에이(Bisphenol A)는 플라스틱류에 사용된 물질에서 환경속으로 대량 유출되는데, 비스페놀 에이(Bisphenol A)는 강력한 에스트로젠 물질인 Diethystilbesterol과 구조적으로 유사하며 설치류에서 고환 독성을 자극하므로 Estradiol의 유사작용을 보인다. 이러한 문제 때문에, 정자 감소증, 불임과 같은 문제 등이 발생하고 있으며 남성 생식기 관련 질환의 문제들을 유발하고 있다.

[0004] 또한 남성 생식기 관련 질환에 있어서는 전립선 관련 질환들 또한 큰 문제로 대두되고 있다. 예컨대, 전립선 비대증은 전립선이 커지면서, 빈뇨, 야간빈뇨, 배뇨 시작의 지연 및 방뇨력의 감퇴 현상을 보인다. 가끔 회음부의 불쾌감이나 중압감, 하복부의 긴장감을 느끼기는 것들이 시간 경과하면서, 자극 증상 및 배뇨 증상이 심해지고 갑자기 소변을 보지 못하는 경우도 생기게 된다. 이후, 배뇨량은 더욱 감소하고 잔뇨량은 늘어나게 되며 신장에 무리한 영향을 주는 경우에 이르게 된다. 또한, 전립선암은 호르몬 수용체 매개 성인 암 중 미국에서 발생률 1위의 암이며, 우리나라에서도 최근 발생이 급격히 증가하여 현재 성인 암 중 발생 증가율 1위이다. 안드로겐(Androgen, 남성 호르몬)은 생식계의 발달과 유지 및 전립선의 성장에 필수적이고 스테로이드계 호르몬 수용체 상과(steroid hormone receptor superfamily)에 속하는 리간드 의존 호르몬 수용체의 활성을 조절할 뿐만 아니라 이러한 호르몬 수용체들은 전립선 암의 발달과 진행에 깊은 관련이 있다.

[0005] 위와 같은 남성 생식 기관 관련 질환들, 특히 전립선 관련 질환들은 안드로겐 호르몬에 영향을 받아 성장 분화하기 때문에 그 수용체인 안드로겐 수용체와 전립선 염, 비대증, 암 등 전립선 질환에서 혈액에 다량으로 분출되는 전립선 특이 항원(prostate specific antigen) 조절이 중요하다. 실제 임상에서 혈액 내 전립선 특이 항원 농도를 전립선 암 등의 질환에 1차적 검사 방법으로 사용하고 있다. 안드로겐 수용체의 경우 그 발현이 줄게 되면 전립선 암의 성장 및 분화에 악영향을 미치게 된다.

[0006] 또한, 환경 호르몬 등에 의한 생식 기능 저하 등의 문제에 있어서는 정자의 운동 기능 회복, 고환의 적절한 크기 유지 등이 중요한 인자로 여겨지고 있다.

[0007] 현재까지 남성 생식 기관 관련 질환을 치료하기 위한 약물은 많이 개발되어 있으나, 기존의 의약품들은 부작용을 내포하고 있고, 그 치료의 대상이 되는 질환이 제한적이어서 남성 생식 기관의 전반적 건강을 위해 사용 가능한 약물의 종류는 거의 없었다. 따라서 부작용이 비교적 적은 천연 물질을 이용하여 남성 생식 기관 관련 질환을 개선, 치료 또는 예방하고자 하는 연구들이 다양하게 수행될 필요성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-2015-0090657, 2015. 8. 6

(특허문헌 0002) KR 10-2015-0094038, 2015. 8. 19

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 무순 추출물을 포함하는 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 무순 추출물을 포함하는 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 남성 생식 기관 관련 질환의 개선, 예방 및 치료를 위한 천연물 소재의 약물 또는 건강기능식품을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 무순 추출물이 남성 생식 기관 관련 질환 개선에 현저한 효과를 보임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0012] 본 발명의 추출물은 부작용이 없으며 안전한 천연 제재인 무순 추출물을 이용한 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 치료제이다.

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유효성분으로 무순 추출물을 포함하는 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에 있어서, 무순 (Radish Sprout, *Raphanus sativus* L.)은 무의 종자를 뿌리고 암조건 등에서 발아 및 생육시켜, 배축 (종자와 자엽 사이의 신장 부분)을 5~10cm 정도가 될 때까지 늘린 쌍떡잎이 열린 상태의 어린 무싹을 말한다. 무의 씨앗이 있으면 일반적으로 가정에서도 쉽게 배양할 수 있는 것이며 국내외에서 손쉽게 구입할 수도 있다. 무는 비타민A, 비타민C, 리그닌, 마그네슘 등이 풍부한 것으로 알려져 있으나, 무순은 무에 존재하는 위 영양소들 뿐 아니라 anthocyanin, glucosinolates 등의 생리 활성 물질을 다량으로 포함하고 있다. 따라서 무순은 무와 대비하여 본원 발명에서 목적하는 바에 따른 남성 생식 기관 관련 질환에 대한 약제 내지 기능성 식품의 원료로 우수한 작용 효과를 나타낼 수 있다.

[0015] 본 발명의 무순 추출물은 테스테로스테론 감소 억제, 고환 크기 감소 억제, 정자 감소 억제, 항안드로겐 작용 및 전립선 특이항원 억제 효과 등을 통해서 남성 생식기 관련 질환의 개선, 예방 및 치료에 현저한 효과를 가진다.

[0016] 본 발명에 있어서, 남성 생식 기관 관련 질환은 고환, 부고환, 정관, 정낭, 전립선, 음경으로 구성되어 생식과 관련된 남성의 신체 기관에서 발생하는 질환을 총칭한다. 본 발명에 따른 남성 생식 기관 관련 질환은 주로 고환, 부고환, 전립선에서 발생하는 질환을 의미하며, 바람직하게 정자감소증, 정자운동성 약화증, 불임, 전립선 비대증, 전립선 비대로 인한 야뇨증 및 전립선 암으로부터 선택되는 어느 하나 이상이다.

[0017] 본 발명에 있어서, 무순 추출물의 추출 방법은 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출 방법 등을 사용하여 제조할 수 있으며, 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하다. 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이의 혼합물, 바람직하게는 물, 에탄올, 에탄올 수용액을 사용하는 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 바람직하게, 상기 용매는 80 내지 95 % 에탄올 수용액이다. 상기 추출 용매의 양은 무순의 총중량의 0.5 내지 15 배로 한다. 또한, 필요에 따라 차광 및/또는 가온(예를 들어, 온침) 조건 하에서 수행될 수도 있다. 바람직하게, 상온에서 2~48시간 동안 바람직하게는 2~36시간 동안 추출하는 것을 1 내지 4회 반복할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명에 따른 무순 추출물은 무순 추출물을 추가로 분리하여 얻어진 무순 추출물의 분획물을 포함한다. 분획 분리는 당해 분야에 알려진 분리법에 의해 수행된다. 바람직하게는 무순 추출물을 물, n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 등의 용매를 이용하여 추출 및 분획하여 무순 추출물로부터 분획물을 수득할 수 있으며, 수득된 무순 분획물은 남성 생식 기관 관련 질환의 개선, 치료 및 예방에 보다 더 현저한 효과를 보일 수 있다. 상기 무순 분획물은 바람직하게 무순 부탄올 분획물이며, 상기 무순 부탄올 분획물은 통상의 크로마토그래피 등에 의해 보다 더 분획화되어 남성 생식 기관 관련 질환의 개선, 치료 및 예방에 더 효과가 좋은 분획물을 획득할 수도 있다.

[0019] 본 발명의 무순 추출물을 포함하는 약학 조성물은 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0020] 본 발명의 약학 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0021] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제도 사용될 수 있다.

[0022] 경구 투여를 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 및 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0023] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필레글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사를 통하여 투여될 수 있다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다

르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 무순 추출물을 포함하는 약학 조성물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량의 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0025] 본 발명은 또한 무순 추출물을 포함하는 남성 생식 기관 관련 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0026] 본 발명의 무순 추출물은 테스테로스테론 감소 억제, 고환 크기 감소 억제, 정자 감소 억제, 항안드로겐 작용 및 전립선 특이항원 억제 효과 등을 통해서 남성 생식기 관련 질환의 예방 및 개선에 현저한 효과를 가진다.

[0027] 상기 건강기능식품은 남성 생식 기관 질환 환자의 남성 생식 기관 상태를 정상에 가깝도록 조절하거나 정상인이 남성 생식 기관 관련 질환을 가지지 못하도록 예방하는 효과를 가진다.

[0028] 본 발명의 건강기능식품은 본 발명의 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0029] 상기 건강기능식품 내의 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 추출물은 식품의 총 중량에 대하여 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있다.

[0030] 본 발명의 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 건강기능식품의 예로는 음료, 껌, 비타민 복합제, 드링크제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0031] 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 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.

발명의 효과

[0032] 본 발명의 무순 추출물은 테스테로스테론 감소 억제, 고환 크기 감소 억제, 정자 감소 억제, 항안드로겐 작용 및 전립선 특이항원 억제 효과 등을 통해서 남성 생식기 관련 질환의 개선, 예방 및 치료에 현저한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 무순 추출물 및 이의 분획물의 제조 공정을 나타내는 모식도이다.

도 2는 비스페놀 A 투여 동물 모델에서 무순 추출물 처리에 따른 정자 수 회복 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 비스페놀 A 투여 동물 모델에서 무순 분획물 처리에 따른 정자 수 회복 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 비스페놀 A 투여 동물 모델에서 무순의 부탄올 분획물 처리에 따른 혈청 내 테스토스테론 회복 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 MCF-7 Bus 세포에서 무순 추출물 또는 이의 부탄올 분획물 처리에 따른 에스트로젠 활성 억제를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 비스페놀 A가 첨가된 BPH-1 세포에서 무순 추출물 처리에 따른 세포 사멸 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 비스페놀 A가 첨가된 BPH-1 세포에서 무순 추출물 처리에 따른 세포 항안드로겐 작용 및 전립선 특이 항원 억제 작용을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0035] **실시예 1. 무순 추출물 및 이의 분획물의 제조**

[0036] 무순 (Radish sprout, *Raphanus sativus*.L)을 동결건조하고 파우더화하였다. 무순 주정추출물을 제조하기 위하여 파우더화된 무순을 90%의 주정으로 실온에서 24시간동안 추출한 후 Whatman Qualitative No. 1 필터 페이퍼를 이용해 여과하였으며, 감압농축기로 40 ℃에서 농축하였다. 무순 주정추출물은 사용 전까지 -80 ℃에서 저장되었다.

[0037] 무순 분획물 제조를 위해 90% 주정추출물은 도 1에서와 같이 n-헥산, 디클로로메탄 (CH_2Cl_2), 에틸아세테이트 (EtOAc), n-부탄올(BuOH), 및 증류수(D.W.)를 이용하여 5 층으로 분리되었다.

[0038] 약리 활성 물질 확인을 위해 무순 추출물의 부탄올 분획층은 크로마토그래피를 이용하여 다시 6개의 분획(F.1 내지 F.6)으로 나뉘었다. 여기서 F.5 층은 다시 7개의 하위 분획(S.1 내지 S.7)으로 나뉘었고, 이중 S.5 분획을 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 두 개의 분획(RSE-1 및 RSE-2)으로 더 분리되었다. 분리된 RSE-2는 GC-MS에 의해 정량 분석되었다.

[0039] **실시예 2. 비스페놀 A로 유도된 생식 독성 동물 모델에서 무순 추출물의 치료 효과 확인**

[0040] 모든 실험 절차는 가천대학교 동물 실험 위원회의 승인 하에 수행되었다. 수컷 Sprague-Dawley 랫드 (SD rat, 150-180 g)는 Central Lab. Animal Inc.에서 구매하였고, 온도 25 ± 2 ℃, 습도 65 ± 5 %, 12시간 주야 주기 및 자유식이로 유지되었다. 랫드는 1 주일간 실험실 환경에서 순응된 후 실험에 사용되었다.

[0041] 랫드는 임의적으로 6개의 그룹(n=5)으로 나누어지고 14일 동안 정상 대조군 그룹(NC), 비스페놀 A(BPA 100 mg/kg) 투여 그룹, 비스페놀 A(100 mg/kg) 및 무순 추출물(RSE 25, 50 또는 100 mg/kg) 투여 그룹, 및 무순 추출물 투여 그룹(100 mg/kg)으로 약물이 처리되었다. 위 비스페놀 A 및 무순 추출물은 경구로 0.5 % 카복시메틸셀룰로오즈에 녹여서 투여되었다.

[0042] **(1) 무순 추출물 처리에 따른 정자 수 회복 효과 확인**

[0043] 약물 투여일로부터 14일이 지난 후 부고환의 정자수를 측정하기 위해, 오른쪽 및 왼쪽 부고환을 잘라 37 ℃의 PBS 버퍼에서 균질화하였다. 희석된 시료는 교반 후 혜모사이토미터를 이용해 세포 및 정자의 수를 측정하였다.

[0044] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0045] 도 2에서 확인되는 바와 같이, 비스페놀 A(BPA)를 처리한 그룹에서 정상군 대비 55.3 % 정도까지 정자의 수가 급감하였지만, 무순 추출물 투여에 따라 농도 의존적으로 15.6 내지 54.0 %까지 정자의 수가 상당히 회복된 것이 확인되었다.

[0046] **(2) 무순 추출물 처리에 따른 고환 무게 유지 효과 확인**

[0047] 위 약물 투여 기간 동안 랫드의 무게는 매일 측정되었고, 고환 역시 수거되어 워싱 후 무게가 측정되었다.

[0048] 측정된 몸무게 및 고환 무게를 표 1에 나타내었다.

[0049] [표 1] 무순 추출물 처리에 따른 몸무게 및 고환 무게 변화

[0050]

	몸무게 (g)		고환 무게(g/kg 몸무게)	
	초기	종료	왼쪽	오른쪽
정상대조군	136.6±4.5	240.3±7.5	22.8±1.3	23.6±0.9
BPA(100 mg/kg)	134.0±1.0	225.1±1.1	20.7±0.9	20.1±1.1
BPA+ RSE(25 mg/kg)	138.4±2.7	246.5±7.4	23.6±0.7	22.3±0.9
BPA+ RSE(50 mg/kg)	132.4±3.9	243.7±4.2	23.3±0.5	23.0±0.6
BPA+ RSE(100 mg/kg)	136.4±4.1	244.2±3.4	22.5±0.7	22.1±0.3
RSE(100 mg/kg)	136.6±6.8	270.5±5.9	23.6±0.6	22.6±0.1

[0051] 표 1에서 확인되는 바와 같이, 실험 종료 후 랫드의 무게는 비스페놀 A만이 투여된 그룹에서 크게 감소되는 것이 확인되었다. 그러나, 무순 추출물이 함께 투여된 그룹에서는 몸무게가 정상군 수준으로 유지되는 것이 확인되었다.

[0052] 또한, 고환의 무게와 관련하여, 비스페놀 A만이 투여된 그룹에서 대조군과 대비하여 약 13 % 정도 그 무게가 감소된 것이 확인되었으나, 무순 추출물이 함께 투여된 그룹에서는 고환의 무게가 정상수준으로 회복되는 것이 확인되었다.

[0053] **실시예 3. 비스페놀 A로 유도된 생식 독성 동물 모델에서 무순 분획물의 치료 효과 확인**

[0054] 상기 실시예 1에서 제조된 분획물의 효과를 확인하기 위해서 14일 동안 정상 대조군 그룹(NC), 비스페놀 A 투여 그룹, 및 50 mg/kg의 n-헥산 분획물(Hexane), CH_2Cl_2 분획물(CH_2Cl_2), EtOAc 분획물(EtOAc), n-부탄올 분획물(BuOH) 또는 H_2O분획물(H_2O)을 투여하였다. 위 무순 분획물은 경구로 0.5 % 카복시메틸 셀룰로오즈에 녹여서 투여되었다.

[0055] 약물 투여일로부터 14일이 지난 후 부고환의 정자수를 측정하기 위해, 오른쪽 및 왼쪽 부고환을 잘라 37 ℃의 PBS 버퍼에서 균질화하였다. 희석된 시료는 교반 후 헤모사이토미터를 이용해 세포 및 정자의 수를 측정하였다.

[0056] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0057] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 무순 분획물 중 CH_2Cl_2, EtOAc 및 BuOH 분획에서 일정 수준 이상의 회복효과가 확인되었고, 특히 BuOH 분획물 투여군은 비스페놀 A 단독 투여군과 비교하여 약 2.9 배 이상의 현저한 정자 수 회복 효과가 확인되었다.

[0058] **실시예 4. 무순 분획물 처리에 따른 혈청 테스토스테론의 회복 확인**

[0059] 약물 투여일로부터 14일이 지난 후 생화학적 분석을 위해 동물의 혈액 시료를 수집하였다. 각 혈액 시료는 15분간 4 ℃에서 500g로 원심분리되어 혈청이 수집되었다. 무순 부탄올 분획 추출물 처리에 따른 혈청 테스토스테론 함량이 측정되었다. 혈청 테스토스테론 함량은 제조사의 프로토콜에 따라 각각 효소 면역법(Enzo Life Sciences Inc., Plymouth Meeting, PA)을 이용하여 측정되었다.

[0060] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0061] 도 4에서 확인되는 바와 같이, 비스페놀 A 처리에 따라 혈청 내 테스토스테론의 함량이 정상군과 대비하여 약 41.3 % 정도 감소하는 결과를 보였으나, 무순의 BuOH 분획물 투여군은 비스페놀 A 단독 투여군과 대비하여 혈청 테스토스테론 함량이 약 2.5 배의 증가된 것을 확인되었다.

[0062] **실시예 5. 무순 추출물 또는 분획물 처리에 따른 에스트로젠 활성 감소 확인**

[0063] 무순 추출물 또는 분획물 처리에 따른 에스트로젠 활성을 측정하기 위하여 MCF-7 Bus 세포를 웰 당 4×10^3 개씩 96 웰 플레이트에 분주하였다. 24시간 후, 비스페놀 A 및 무순 추출물 또는 분획물 시료가 포함된 배지(DMEM)를 처리하였으며 시료처리는 4일 동안 지속되었다. 용량반응곡선은 17β-estradiol(E_2)의 농도가 10^{-12} 에서 10^{-24} M 사이에서 준비되었다. 시료처리 후, MTT 용액(5 mg/ml, 10 μl)을 첨가하고 3시간 동안 37 ℃, 5 % CO_2 조건에서 배양하였다. MTT 용액을 제거하고 세포 용해를 위해 DMSO를 첨가하였으며 540 nm에서 Infinite M200 Pro multi-plate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 이용해 흡광도를 측정되었다. 세포의 증식은 처리되지 않은 세포의 흡광도에 대한 비율로 측정되었고, 대조군(E_2, 10^{-9} M)은 모든 실험에 포함되었다.

[0064] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0065] 도 5에서 확인되는 바와 같이, 비스페놀 A 처리된 실험군에서 에스트로젠 활성이 정상 대조군(NC)와 대비하여 현저히 증가하였으나, 이러한 작용은 무순 추출물 또는 무순의 BuOH 분획물 처리에 의해 정상군 수준과 유사하게 감소되는 것이 확인되었다.

[0066] **실시예 6. 무순 추출물 처리에 따른 세포 사멸 억제 활성 확인**

[0067] 무순 추출물 처리에 따른 세포 사멸 억제 효과를 확인하기 위하여 Image-based cytometric 검정(Tali)를 수행하였다.

[0068] DSMZ (Germany)에서 구매된 BPH-1 세포는 20 % FBS, 1 % 페니실린/스트렙토마이신 및 인슐린을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양되었다.

[0069] 96웰 플레이트에 웰당 1×10^4 세포를 분주하고 24시간 배양한 후 무순 추출물(RSE) 100 μg/mL, 또는 무순 추출물 50, 25, 12.5, 0 μg/mL의 농도 및 비스페놀 A(BPA) 5×10^{-4} M 농도로 첨가된 배지를 처리하였다.

[0070] 4시간 배양 후 세포 용액(100 μl, 1×10^5 내지 10^7 세포/ml)을 원심분리하여 상층액을 제거하고, 죽은 세포를 염색하기 위해 PI-based Tali Dead Cell Red reagent (100 μl)가 첨가하였다. 혼합 용액은 빛이 차단된 상온

에서 1 내지 5분간 배양되고, Tali image-based cytometer로 분석되었다.

[0071] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0072] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 비스페놀 A가 투여된 실험군에서 세포 사멸에 따라 죽은 세포들이 다수 확인되었지만, 무순 추출물 처리에 따라 농도 의존적으로 세포 사멸이 감소되는 것이 확인되었다.

[0073] **실시예 7. 무순 추출물 처리에 따른 안드로겐 수용체(AR) 및 전립선 특이 항원(PSA) 발현 억제 확인**

[0074] 무순 추출물 처리에 따른 안드로겐 수용체(AR) 및 전립선 특이 항원(PSA)의 발현 억제를 RT-PCR을 통해 확인하였다.

[0075] 위 실시예 6과 유사하게 BPH-1 세포에 무순 추출물(RSE) 100 μg/mL, 또는 무순 추출물이 50, 25, 12.5, 0 μg/mL의 농도 및 비스페놀 A(BPA) 5×10^{-4} M 농도로 첨가되어 배양되었고, 하기 표 2 서열을 이용하여 RT-PCR이 수행되었다.

[0076] [표 2]

[0077]

	서열
AR Forward primer	5`-ATGTCCTGGAAGCCATTGAGCCA-3`(서열번호 1)
AR Reverse primer	5`-CAGAAAGGATCTTGGGCACTTGC-3`(서열번호 2)
PSA Forward primer	5`-TACCCACTGCATCAGGAACA-3`(서열번호 3)
PSA Reverse primer	5`-CCTTGAAGCACACCATTACA-3`(서열번호 4)
β-Actin Forward primer	5`-GATGAGATTGGCATGGCTT-3`(서열번호 5)
β-Actin Reverse primer	5`-CACCTTCACCGTTCCAGTTT-3`(서열번호 6)

[0078] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0079] 도 7에서 확인되는 바와 같이, 비스페놀 A 처리에 따라 증가된 안드로겐 수용체 및 전립선 특이 항원의 발현이 무순 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 현저하게 감소되는 것이 확인되었다.

[0080] **<제제예 1> 정제의 제조**

[0081] 실시예 1의 무순 추출물 또는 무순의 부탄올 분획물 200mg

[0082] 유당.....100mg

[0083] 전분.....100mg

[0084] 스테아린산 마그네슘.....적량

[0085] 상기의 성분을 복합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0086] **<제제예 2> 캡슐제의 제조**

[0087] 실시예 1의 무순 추출물 또는 무순의 부탄올 분획물 200mg

[0088] 유당.....50mg

[0089] 전분.....50mg

[0090] 탈크.....2mg

[0091] 스테아린산 마그네슘.....적량

[0092] 상기의 성분을 복합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0093] **<제제예 3> 액제의 제조**

[0094] 실시예 1의 무순 추출물 또는 무순의 부탄올 분획물 1000mg

[0095] 설탕.....20g

[0096] 이성화당.....20g

[0097] 레몬향.....적량

[0098] 정제수를 가하여 전체 1000 ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 복합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0099] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 복합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0100] **<제제예 4> 건강기능식품의 제조**

[0101] 실시예 1의 무순 추출물 또는 무순의 부탄올 분획물 .....1000 mg

[0102] 비타민 복합물.....적량

[0103] 비타민 A 아세테이트.....70 ㎍

[0104] 비타민 E.....1.0 mg

[0105] 비타민 B1.....0.13 mg

[0106] 비타민 B2.....0.15 mg

[0107] 비타민 B6.....0.5 mg

[0108] 비타민 B12.....0.2 ㎍

[0109] 비타민 C.....10 mg

[0110] 비오틴.....10 ㎍

[0111] 니코틴산아미드.....1.7 mg

[0112] 엽산.....50 ㎍

[0113] 판토텐산 칼슘.....0.5 mg

[0114] 무기질 복합물.....적량

[0115] 황산제1철.....1.75 mg

[0116] 산화아연.....0.82 mg

[0117] 탄산마그네슘.....25.3 mg

[0118] 제1인산칼륨.....15 mg

[0119] 제2인산칼슘.....55 mg

[0120] 구연산칼륨.....90 mg

[0121] 탄산칼슘.....100 mg

[0122] 염화마그네슘.....24.8 mg

[0123] 상기의 비타민 및 미네랄 복합물의 조성비는 비교적 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 복합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 복합한 다음, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조(예, 영양캔디 등)에 사용할 수 있다.

[0124] **<제제예 5> 건강기능성 음료의 제조**

[0125] 실시예 1의 무순 추출물 또는 무순의 부탄올 분획물 .....1000 mg

[0126] 구연산.....1000 mg

[0127] 올리고당.....100 g

[0128] 매실농축액.....2 g

[0129] 타우린.....1 g

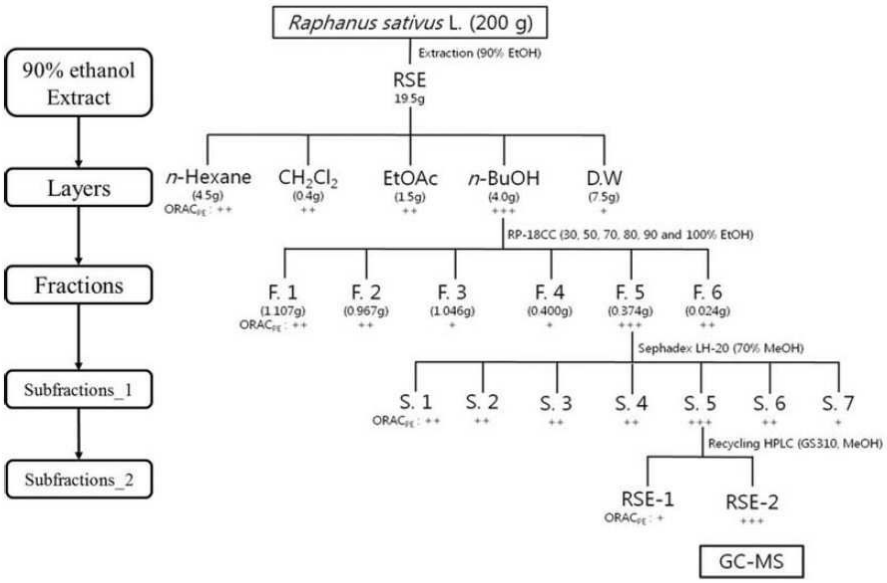
[0130] 정제수를 가하여 전체.....900 ㎖

[0131] 통상의 건강기능성 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 복합한 다음, 약 1시간동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.

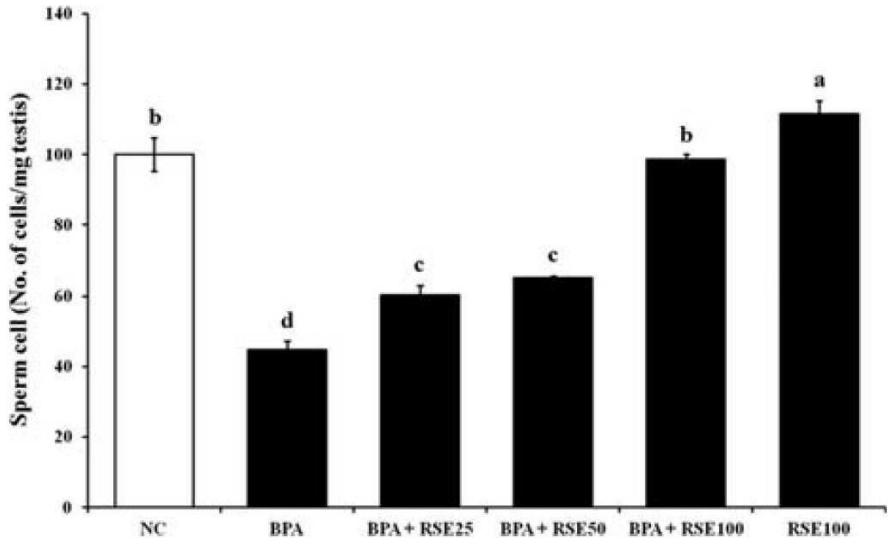
[0132] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 복합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

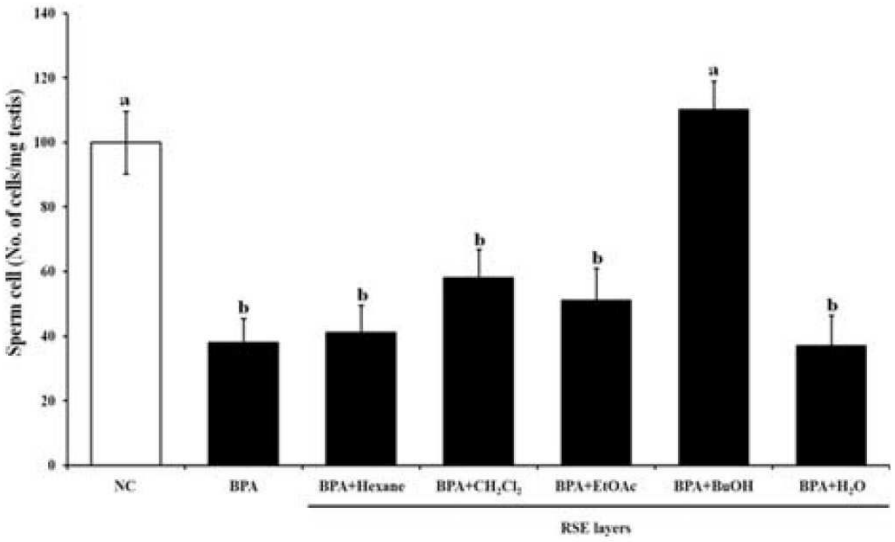
도면1



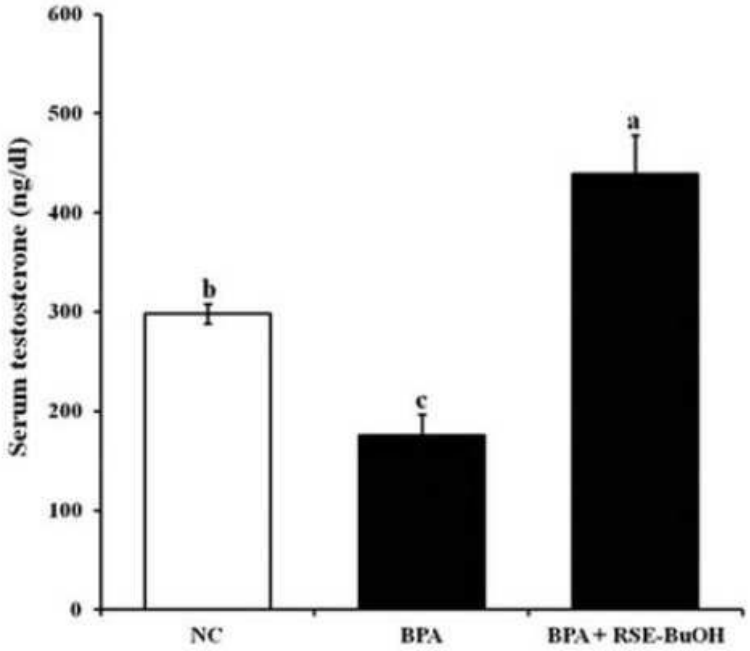
도면2



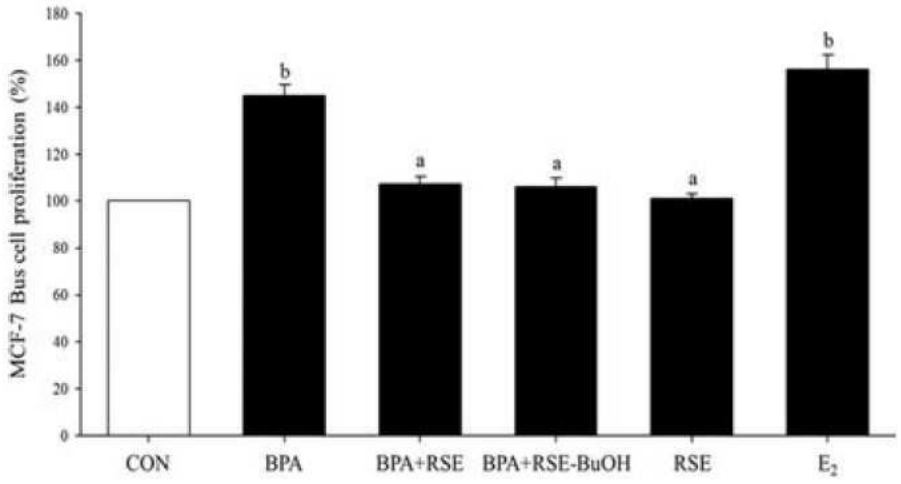
도면3


Sperm cell (No. of cells/mg testis)
140
120
100
80
60
40
20
0
a
b
b
b
b
a
b
NC
BPA
BPA+Hexane
BPA+CH2Cl2
BPA+EtOAc
BPA+BuOH
BPA+H2O
RSE layers

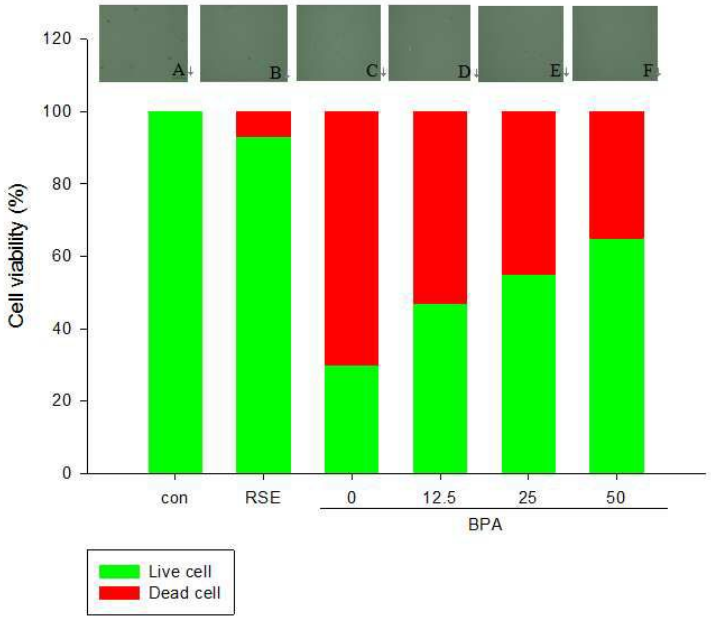
도면4


Serum testosterone (ng/dl)
600
500
400
300
200
100
0
b
c
a
NC
BPA
BPA + RSE-BuOH

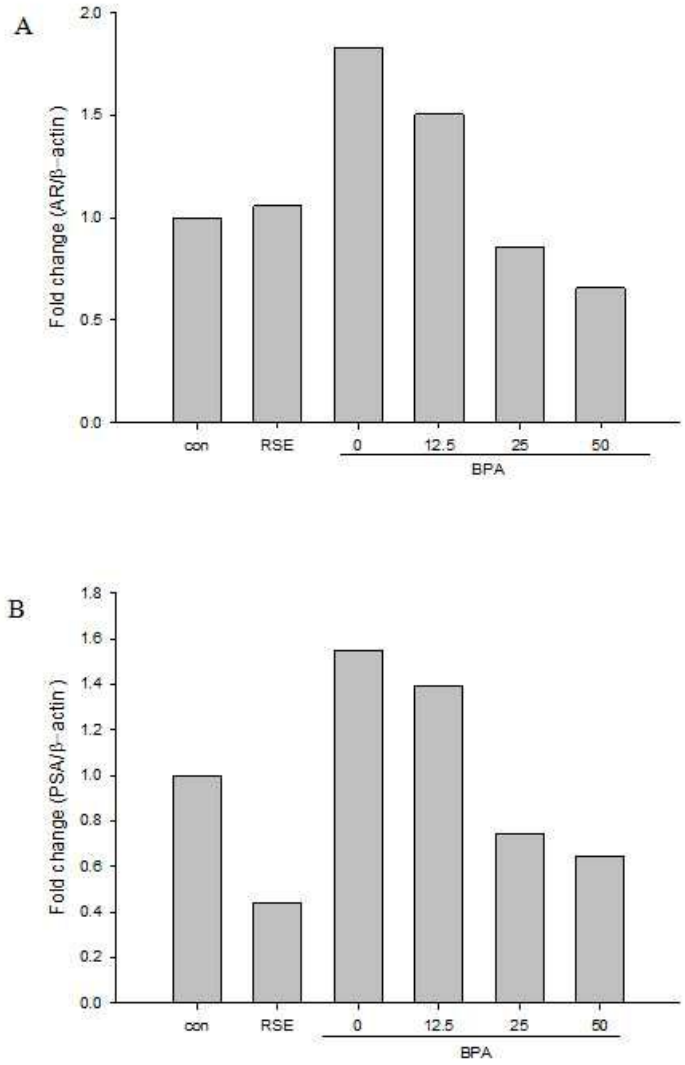
도면5


MCF-7 Bus cell proliferation (%)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
b
a
a
a
b
CON
BPA
BPA+RSE
BPA+RSE-BuOH
RSE
E2

도면6


A
B
C
D
E
F
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
con
RSE
0
12.5
25
50
BPA
Live cell
Dead cell

도면7



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING MALE REPRODUCTIVE ORGAN RELATED DISEASES

<130> P16-049-KHU

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR Forward primer

<400> 1

atgtcctgga agccattgag cca 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> AR Reverse primer

<400> 2

cagaaaggat cttgggcact tgc 23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PSA Forward primer

<400> 3

tacccactgc atcaggaaca 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PSA Reverse primer

<400> 4

ccttgaagca caccattaca 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta Actin Forward primer

<400> 5

gatgagattg gcatggctt 19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta Actin Reverse primer

<400> 6

caccttcacc gttccagttt 20