



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 31/341 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2007-0027770

(43) 공개일자

2007년03월09일

(21) 출원번호 10-2007-7003673(분할)

(22) 출원일자 2007년02월15일

심사청구일자 2007년02월15일

번역문 제출일자 2007년02월15일

(62) 원출원 특허10-2001-7012487

원출원일자 : 2001년09월28일

심사청구일자

2005년02월16일

(86) 국제출원번호 PCT/FI2000/000181

(87) 국제공개번호

WO 2000/59946

국제출원일자 2000년03월09일

국제공개일자

2000년10월12일

(30) 우선권주장

09/281,094

1999년03월03일

미국(US)

(71) 출원인

호르모스 뉴트라세티컬 오와이 리미티드

핀란드, 투르쿠 에프아이엔-20520, 티키스토카투 6에이

(72) 발명자

아호투파, 마르쿠

핀란드, 에프아이엔-20540 투르쿠, 가르자쿠자 82

에커만, 크리스터

핀란드, 에프아이엔-20540 투르쿠, 이티하르준카투 12

칸가스, 라우리

핀란드, 에프아이엔-21280 라이스요, 파산티 3 비

마케라, 사리

핀란드, 에프아이엔-20740 투르쿠, 멧쉐피르틴카투 4

싸리넨, 니나

핀란드, 에프아이엔-20540 투르쿠, 뢰이러넨카투 2

산티, 리스트

핀란드, 에프아이엔-21100 난타리, 만네르헤이민카투 23

웨리, 안니

핀란드, 에프아이엔-21420 리에토, 주하닌카투 2 아스 2

(74) 대리인

박경재

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 암 예방을 위한 하이드록시마타이레지놀

(57) 요약

본 발명은 인간에게 하이드록시마타이레지놀(hydroxymatairesinol)을 투여하는 것에 기초하여, 암, 비암성 호르몬 의존성 질환 및/또는 심혈관질환을 예방하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 인간에게 하이드록시마타이레지놀을 투여하

는 것에 기초하여, 인간의 혈청 내의 엔테로락톤(enterolactone) 또는 하이드록시마타이레지놀의 다른 대사산물의 수준을 증가시켜 인간의 암 또는 비암성 호르몬 의존성 질환을 예방하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 하이드록시마타이레지놀을 포함하는 제약 조제품, 식품첨가제 및 식품에 관한 것이다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

암, 비암성 호르몬 의존성 질환 또는 심혈관질환 예방용 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 암이 유방암, 전립선암 및 결장암으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 비암성 호르몬 의존성 질환이 하행요로증상, 요도근실조, 방광불안정증, 방광출구장애, 양성 전립선 비대증 및 남성의 여성유방증으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 심혈관질환이 혈청 내의 산화된 저밀도지단백질(LDL)로 인한 것을 특징으로 하는 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체.

청구항 5.

하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체의 유효량을 투여하는 것을 포함하여, 혈청 내에서 엔테로락톤 또는 하이드록시마타이레지놀의 다른 대사산물의 수준을 증가시켜, 암 또는 비암성 호르몬 의존성 질환을 예방하는데 사용되는 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체.

청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 암이 유방암, 전립선암 및 결장암으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체.

청구항 7.

제5항에 있어서, 상기 비암성 호르몬 의존성 질환이 하행요로증상, 요도근실조, 방광불안정증, 방광출구장애, 양성 전립선 비대증 및 남성의 여성유방증으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체.

청구항 8.

약학적으로 수용 가능한 캐리어와 조합된 유효량의 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체를 포함하는, 암, 하행요로증상, 요도근실조, 방광불안정증, 방광출구장애, 양성 전립선비대증, 남성의 여성유방증, 또는 동맥경화증 예방용 약학 조제품.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

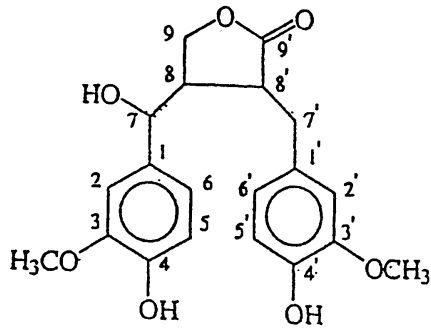
본 발명은 인간에게 하이드록시마타이레지놀(hydroxymatairesinol)을 투여하는 것에 기초하여, 암(cancer), 비암성 호르몬 의존성 질환(non-cancer, hormone dependent diseases) 및/또는 심혈관질환(cardiovascular diseases)을 예방하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 인간에게 하이드록시마타이레지놀을 투여하는 것에 기초하여, 인간의 혈청 내 엔테로락톤(enterolactone) 또는 하이드록시마타이레지놀의 다른 대사산물의 수준을 증가시켜 인간의 암 또는 비암성 호르몬 의존성질환을 예방하는 방법과 관련이 있다. 또한, 본 발명은 하이드록시마타이레지놀을 포함하는 제약 조제품, 식품첨가제 및 식품에 관한 것이다.

본 발명의 배경기술을 설명하기 위해 여기에 사용된 간행물 및 다른 자료들, 특히 실험에 관한 추가적 세부사항을 제공하는 사례들이 참고로 도입되었다.

리그난(lignan)은 2,3-디벤질부탄(dibenzylbutane) 골격을 가진 페놀 화합물류로 정의된다. 이들은 신남산(cinnamic acid), 커피산(coffeic acid), 쿠마르산(coumaric acid) 및 갈릭산(gallic acid) 같은 전구체라 불리는 단위체의 결합에 의해 형성된다(Ayres 및 Loike, 1990). 리그난은 식물 내에 광범위하게 분포되어 있다. 이들을 여러 부분(뿌리, 잎, 줄기, 씨, 과일)에서 찾을 수 있지만 주로 소량으로 발견된다. 많은 공급원(씨, 과일)에서 리그난은 식물의 섬유성분들과 결합된 배당체 성 복합체(glycosidic conjugates)로 발견된다. 포유류의 리그난 전구체의 가장 일반적인 음식을 통한 공급원은 정제되지 않은 곡물이다. 식용식물에서 가장 높은 농도는 아마씨, 다음으로 정제되지 않은 곡물, 특히 호밀에서 발견되었다. 여러 식물성 식품으로부터의 포유동물 리그난 생성을 표 1에 제공하였다.

또한, 상당량의 리그난이 침엽수에서 발견된다. 리그난의 타입은 종에 따라 다르고, 리그난의 양은 나무의 부위에 따라 달라진다. 가문비나무(Picea abies)의 심재(heartwood) 내의 전형적인 리그난들은 하이드록시마타이레지놀(HMR), α -코니덴드린(conidendrin), 코니덴드린산(conidendrinic acid), 마타이레지놀(matairesinol), 아소라리시레지놀(isolariciresinol), 세코이소라리시레지놀(secoisolariciresinol), 리오비레(liovile), 피키레지놀(picearesinol), 라리시레지놀(lariciresinol) 및 피노레지놀(pinoresinol)이다(Ekman, 1979). 가문비나무에서 리그난의 가장 풍부한 단일 성분은 전체 리그난의 60%인 HMR인데, 이는 주로 콘쥬게이트되지 않은 유리형태(free form)로 존재한다. 굵은 뿌리에서의 리그난 농도는 2~3%이다. 많은 양의 리그난은 가지(5~10%) 및 비틀린 부분(twists), 특히 리그난의 양이 10% 이상일 수 있는 마디의 심재 내에 존재한다(Ekman, 1976 및 1979). 이 농도들은 리그난-풍부 물질로 알려진 분쇄된 아마가루와 비교해서 약 100배가 된다.

하이드록시마타이레지놀의 화학구조식은 다음과 같다.



리그난은 예를 들어, 압축목(compression-wood)의 섬유로부터 분리될 수 있다. 줄기 및 마디(큰 조각 부분)의 압축목으로부터의 이들 섬유들은 종이의 질을 나쁘게 한다(Ekman, 1976).

마타이레지놀 및 세코이소라리시레지놀과 같은 식물 리그난들은 장내 미생물총에 의해 포유류의 리그난인 엔테로락톤 및 엔테로디올로 변환한다(Axelsson 등, 1982). 이들은 간장 내 순환을 하고 글루크로나이드(glucuronide) 복합체 형태로 소변을 통하여 배출된다(Axelsson 및 Setchell, 1981). 리그난의 화학예방적(chemopreventive) 작용에 대한 실험적 증거에서, 리그난이 풍부한 아마씨 분말(5% 또는 10%) 또는 아마씨 리그난(세코이소라리시레지놀-디글리코시드, SDG)으로 지방이 풍부한 음식을 보충하면 랫트(rat)에서 항에스트로젠에 감수성 있는 DMBA으로 유도된 유방암의 진전을 예방했다(Serraino 및 Thompson, 1991 및 1992; Thompson 등, 1996a 및 1996b). 이들은 상피세포의 증식, 핵 변형, 종양(tumor)의 성장 및 새로운 종양의 발달을 감소시켰다. 또한, 많은 양의 리그난의 섭취는 실험적인 전립선 및 결장암을 막을 수 있다. 음식으로 하는 호밀(리그난 함유)은 랫트에서, 이식된 던닝(Dunning) R3327 전립선 선종(adenocarcinoma)의 초기 성장단계를 예방했다(Zhang 등, 1997; Landstrom 등, 1998). 촉진할 수 있는 종양을 가진 동물의 비율, 종양의 크기 및 성장율이 현저하게 줄었다. 더욱이, 아마씨 또는 SDG 보충물은 랫트 결장에서 화학적으로 유도된 이상선화(aberrant crypt)의 형성을 억제했다(Serraino 및 Thompson, 1992; Jenab 및 Thompson, 1996). 따라서 항종양 작용은 약한 에스트로젠성-항에스트로젠성 특징 및/또는 다른 메커니즘에 의할 수 있는데, 이것이 명확히 밝혀진 것은 아니다.

유방암으로 진단된 여성에서 엔테로락톤의 소변 배출 및 혈청농도가 낮게 나타났는데, 이는 리그난이 화학예방책이라는 것을 제시한다(Ingram 등, 1997; Hulten 등, 1998). 포유동물의 리그난(엔테로락톤 및 엔테로디올)은 구조가 에스트로젠과 비슷하기 때문에 유방암과 같은 호르몬과 관련된 암을 조절한다는 가설이 세워져 왔다. 엔테로락톤은 MCF-7 세포에서 약한 에스트로젠성 효능을 보였다(Mousavi 및 Adlercreutz, 1992). 그러나 마우스의 자궁 무게에서 에스트로젠성 반응은 없었다(Setchell 등, 1981). 에스트로젠성 활성의 표시로, 임신 동안의 SDG의 급여 및 랫트에의 수유는 이유기에 자궁무게를 증가시켰다. 하지만 그 효과는 나중 단계에서 뚜렷하지는 않았다(Tou 등, 1998). 또한, 가능한 항종양 효과는 그들의 항에스트로젠성 작용과 관계되었다(Waters 및 Knowler, 1982). 포유동물의 리그난인 엔테로락톤에 의한 아로마테이즈(aromatase)의 억제는, 리그난이 풍부한 식물의 소비가 유방암과 같은 에스트로젠-의존성 질병의 감소에 기여하는 메커니즘을 제시한다(Adlercreutz 등, 1993; Wang 등, 1994). 또한, 리그난의 잠재적인 산화방지 활성은 암의 발전단계에서 리그난의 예방 작용과 관련된 메커니즘을 제시할 수 있었다. 더욱이, 포유동물의 리그난은 인간에서 달성할 수 있는 농도에서, 테스토스테론이 잠재적 세포 내 안드로젠인 5 α -디하이드로테스토스테론(DHT)로의 전환을 억제하는 것으로 나타났다(Evans 등, 1995). DHT 농도의 감소는 전립선 암(PC) 및 양성 전립선 비대증(BPH)의 위험을 줄일 것이다.

또한, 엔테로락톤의 전구체로서의 리그난은 하행요로증상(LUTS) 및 남성의 여성유방증(gynecomastia)을 완화시킬 수 있다. 동물 모델에서 얻어진 결과를 토대로 하여, 우리는 에스트로젠이 방광목근실조 또는 외측 괄약근 가근실조에서 나타난 것과 같은 요도근실조에 관련된 근육의 근실조의 발달에 중요한 역할을 한다는 것을 제안했다(Strang 등, 미발간 결과). 이런 신경근 변화는 에스트로젠의 역할을 나타내는 아로마테이즈 억제인자(MPV-2213ad)에 의해 적어도 부분적으로 역전된다. 더욱이, 여성화유방증은 에스트로젠에 노출 또는 안드로젠에 대한 에스트로젠의 비율이 증가한 경우에 유발된다. 여성화유방증은 아로마테이즈 억제인자를 사용하여 성공적으로 치료될 수 있다. 5 α -환원효소 및/또는 잠재적 산화방지제와 결합된 아로마테이즈를 억제하는 리그난의 능력은 남성의 호르몬과 관련된 질병의 발달에 있어서의 리그난의 예방 작용 및 관련 메커니즘을 나타낸다.

인간에 있어서, 리그난의 가능한 효과에 대하여 이용할 수 있는 자료가 없다. 인간에 있어서의 리그난의 작용에 대한 현재의 이론들은 아마씨 제품(리그난)으로 보충된 식품의 효과에 대한 연구로부터 추론되어 왔다. 여성의 식품에 있는 아마씨는 생리주기의 변화를 야기했다(Phipps 등, 1993). 모두 정상적인 주기를 가진 여성들로 된 피검자들은 그들의 일상적인

음식에 아마씨 분말 10g/1일 추가했을 때, 평균 황체기의 연장 및 황체기 동안 혈장 내 프로게스테론/17 β -에스트라디올(estradiol)의 비가 증가하는 것을 보여주었다(Phipps 등, 1993). 아마와 주기 조절 또는 에스트론 또는 17 β -에스트라디올 농도 사이의 중요한 차이점은 발견되지 않았다. 아마 및 폐경이 지난 여성에서의 혈청 에스트로겐의 농도를 위한 그룹들의 조절 사이에 어떤 중요한 차이점은 없었다(Brzezinski 등, 1997). 아마씨 보충물은 혈청 내 SHBG(에스트라디올을 고용적으로 결합하는 단백질) 농도를 증가시켰다. 이것은 간 조직에서의 전형적인 에스트로젠성 효과이다. 다른 한편으로는, 증가된 SHBG 농도는 내생 에스트로겐의 생체이용율을 감소시킨다. 건강한 젊은 남자의 경우, 단기간(6주) 동안의 음식물에의 아마씨 첨가는 남성에서 발정원성(estrogenicity)의 부족을 지시하는 혈장 테스토스테론 농도에 현저한 효과를 나타내지 않았다(Shultz 등, 1991). 모두를 종합하면, 이들 연구들은, 리그난은 약한 호르몬적(에스트로젠성 및 항에스트로젠성) 효과를 가지지만, 호르몬적 효과에 대한 이들의 작용 메커니즘을 자세하게 설명할 수 없다는 것을 나타낸다.

결론적으로, 분리된 포유동물 리그난은 예전에는 동물실험이나 임상실험에 사용하기에 충분한 양으로 이용되지 못했고, 리그난 섭취를 증가시키는 유일한 가능성은 아마씨 같은 섬유가 풍부한 식품의 소비를 증가시키는 것이었다. 엔테로락톤으로 유효하게 전환되며 대량으로 생산/분리될 수 있는 HMR 또는 다른 리그난은 암 그리고 다른 호르몬 관련 질환 및 심혈관질환의 화학적 예방을 위한 제약 조제품 및 기능성 식품 같은 식품의 개발에 있어서 가치가 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

하나의 양태에 따라서, 본 발명은 유효량의 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체(geometric isomer) 또는 입체이성질체(stereoisomer)를 투여하는 것을 포함하는, 인간의 암, 비암성 호르몬 의존성 질환 및/또는 심혈관질환의 예방방법에 관한 것이다.

또 다른 양태에 따라서, 본 발명은 유효량의 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체를 투여하는 것을 포함하여, 인간의 혈청 내 엔테로락톤 또는 하이드록시마타이레지놀의 다른 대사산물의 수준을 증가시켜 인간의 암, 비암성 호르몬 의존성 질환을 예방하는 방법에 관한 것이다.

제3양태에 따라서, 본 발명은 약학적으로 수용가능한 캐리어와 조합된 유효량의 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하학적 이성질체 또는 입체이성질체를 포함하는 약제에 관한 것이다.

제4양태에 따라서, 본 발명은 식품에 첨가제로서 사용하기 위한, 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하학적 이성질체 또는 입체이성질체가 풍부한 액체 또는 고체 물질을 포함하는 제품에 관한 것이다.

제5양태에 따라서, 본 발명은 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하학적 이성질체 또는 입체이성질체의 유효량을 포함하는 식품에 관한 것이다.

또 하나의 양태에 따라서, 본 발명은 유효량의 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체를 상기 식품에 첨가하는 것을 포함하는, 식품의 안정성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

발명의 구성

본 발명은 HMR을 식품에 첨가하거나 약제 조제에 사용하여 암, 비암성 호르몬 의존성 질환 및 심혈관질환을 예방하기 위한 리그난, 하이드록시마타이레지놀(HMR)의 용도에 관한 것이다. 놀랍게도, HMR은 생체 내에서 대사되어 엔테로락톤으로 전환되는데, 이것은 리그난의 항암 특징을 적어도 부분적으로 설명하는 것으로 여겨진다. 생체 내에서의 HMR의 산화 방지 활성은 강하고, 또한 이것은 HMR이 생체 내에서 유리산소종에 손상을 입히는 것에 대한 방어적인 효과를 통하여 심혈관질환을 예방할 수 있다는 것을 나타낸다. 또한, 본 발명은 식품안정성(즉, 식품에서 영양가 및 향을 상실하게 하는 지방 및 색소의 산화 및 비타민 소실을 방지함)을 향상시키기 위한 식품첨가제로서 HMR의 사용에 관한 것이다.

본 발명에 의한 방법은 유방암, 전립선암 및 결장암 같은 암, 하행요로증상, 요도근실조, 방광불안정증, 방광출구장애, 양성 전립선비대증 및 남성의 여성유방증 같은 비암성 호르몬 의존성 질환, 그리고 산화된 LDL로 인한 심혈관질환의 예방에 특히 효과적이다.

본 발명에 의한 약제의 제조는 경구용 제형이 바람직하다. 활성 화합물(HMR)의 필요되는 양은 예방되는 구체적인 상태에 따라 변할 것이다. 전형적인 용량은 성인의 경우 1일에 약 10mg에서 약 100mg의 범위이다.

본 발명의 식품첨가물에 있어서, 하이드록시마타이레지놀이 충분하도록 보충된 식품은 HMR의 특성에 영향을 미치지 않으면서 HMR과 혼합되기에 적당한, 어떤 먹을 수 있는, 비-독성의 고체 또는 액체물질이 될 수 있다. 이 물질의 역할은 주로 HMR의 정확한 용량을 쉽게 만드는 것이다. 적당한 농도는 예컨대 강화된 물질 100g당 HMR이 100mg~1g이다.

본 발명에 의한 식품은 특히 기능성 식품, 영양제, 영양물, 약제식품, 기능식품, 건강식품, 계획된 식품 또는 어떤 식품이다. 식품에서의 HMR의 적당한 농도는 예컨대 식품의 100g당 HMR이 1~20mg이다.

본 발명에 의한 기능성 식품은 예로, 버터, 마가린, 비스킷, 빵, 케이크, 캔디, 과자류, 요구르트 또는 다른 발효 유제품 또는 뮤즐리와 같은 곡류의 형태가 될 수 있다.

하이드록시마타이레지놀의 첨가는 식품에서 영양가 및 향을 소실케 하는 지방, 비타민 및 색소의 산화를 억제시켜 식품안정성을 증가시키는데 특히 유용하다. 이러한 목적을 위한 적당한 HMR의 농도는 예컨대 약 0.1%이다.

본 발명에서의 사용을 위한 HMR의 분리는 압축 목재의 큰 도막부분(가지, 비틀린 부분 및 마디를 포함)으로부터 만들어질 수 있고, 암 및 심혈관계 질병과 같은 질병의 예방에 HMR을 사용할 수 있다.

HMR의 특성들이 7가지의 다른 시험을 통해 연구되었다.

1. 생체 외에서 산화방지능력의 측정
2. JEG-3 세포에서 아로마테이즈 억제능력의 측정
3. MCF-7 세포 배양에서 에스트로젠성 및 항에스트로젠성 활성의 측정
4. 자궁성장 생물학적 정량에 의한 에스트로젠성 및 항에스트로젠성 활성의 평가
5. 성숙한 수컷 랫트에서 에스트로젠성 및 항에스트로젠성 활성의 측정
6. 랫트의 DMBA-도입 유선암 모델에서 항암활성의 조사
7. 다른 용량의 HMR의 투여 후 랫트의 소변으로부터 대사산물의 분석

생물학적 테스트를 위한 충분한 양의 HMR의 분리 및 정제는, 비교적 불충분하게 특징지어져 온 목재 리그난의 성분이기 때문에 종전에는 불가능해었다. 가문비나무의 다른 부분에서의 HMR의 분포를 이해하는 것은(Ekman, 1976 및 1979) 리그난 및 특히 HMR를 상세하게 연구하는 기회를 주었다.

HMR의 용량 및 소변 속의 엔테로락톤 양 사이에 선형 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 엔테로락톤은 소장 내 박테리아에 의해 마타이레지놀로부터 형성된 또는 엔테로디올의 산화에 의해 형성된 널리 공지된 포유동물의 리그난이다(Axelson 및 Setchell, 1981; Axelson 등, 1982). 단지 미소한 양의 대사되지 않은 HMR 및 다른 대사산물(엔테로디올 및 7-하이드록시엔테로락톤)이 소변에서 발견되었다. HMR의 1일 용량이 증가되었을 때도 그것들의 양은 변화되지 않았다. 이는 HMR이 대사되어 엔테로락톤으로 되고, 더욱이 탈메틸화(demethylation) 및 탈수산화(dehydroxylation) 과정을 거쳐 HMR로부터 유도된 엔테로락톤은 엔테로디올로 전환되지 않는다는 것을 제시한다. HMR의 구조에 기초하여, 7-하이드록시엔테로락톤은 HMR의 주요 대사산물었다는 것을 예상했으나, 그러나 반드시 그런 것은 아니었다. 이 수산기는 대사과정에서 제거된다. HMR의 대사는 SDG의 대사와는 다르다. DSG는 대사되어 엔테로락톤으로 부분적으로 산화되는 엔테로디올로 된다(Rickard 등, 1996; Lampe 등, 1994). 따라서 HMR은 엔테로락톤의 전구체로서 SDG보다 이점을 제공한다.

HMR은 랫트 자궁 또는 남성에서, 있다면 약한 에스트로젠성 작용을 가졌다. 이것은 MCF-7 세포에서, 약한 그러나 현저하지 않은 에스트로젠과 같은 활성을 나타내었다. HMR의 경우 항에스트로젠성 활성은 나타나지 않았다. 따라서 도 2에서 나타난 바와 같이, 랫트에서 DMBA-유도 종양 모델에서 아주 현저한 항암 활성을 가졌다는 것은 놀라운 것이다. HMR의 활성은 HMR 그 자체 또는 엔테로락톤에 의한 것일 수 있다. 하지만 DMBA-처리 후 2가지의 다른 용량(3 및 5mg/kg)을 랫트에 투여했을 때 HMR의 화학예방 작용에서 용량-의존성은 발견되지 않았다. 따라서 HMR은 항암 효과 또는 최대 화학예방 효과를 수행하기에 충분한 이들 리그난의 소량을 가지기 위해 엔테로락톤으로 전환될 필요가 없다.

표 2 및 3에 나타난 바와 같이 HMR은 매우 효과적인 항산화제이다. 이것은 지방 과산화의 가장 강력한 공지된 억제제 중 하나이고, LDL 산화의 우수한 억제제이다. 혈청 내 산화된 LDL의 농도가 동맥경화증 같은 심혈관질환의 최고 예보자 중의 하나로 여겨지기 때문에, LDL 산화의 억제는 인간에 있어서 특히 중요한 것으로 여겨진다. HMR은 식품안정성을 증가시키기 위해 일반적으로 사용되는 널리 알려진 항산화제인 부틸레이티드 하이드록시아니솔(BHA) 및 부틸레이티드 하이드록시톨루엔(BHT)보다 훨씬 나은 초산화 음이온 포착제(scavenging agent) 및 퍼옥실 라티칼 포착제이기 때문에, HMR은 식품의 안정성을 증가시키기 위해 (즉, 식품에서 영양가 손실과 향 손실을 일으키는 비타민, 지방 및 색소 산화를 억제하기 위해) 식품첨가제로서 사용될 수 있다.

실험

화학제품

다양한 리그난들이 생체 외에서 그들의 에스트로젠성, 항에스트로젠성, 방향화를 억제하는 능력 및 그들의 산화방지 특징들에 대하여 테스트되었다. 테스트 화합물은 다음의 공급원에서 되었다: 엔테로디올 및 엔테로락톤은 Plantech, London, UK, 그리고 2개의 7-OH 거울상 이성질체를 포함하는 7-하이드록시엔테로락톤은 Dr. Kristina Wahala, Department of Applied Chemistry, University of Helsinki, Finland로부터이었다.

목재로부터 HMR의 추출

HMR 추출물은 Ekman, 1976 및 Ekman, 1979에서 설명한 바와 같이 노르웨이 가문비나무(Picea abies)로부터 분리되었다. 간단히 말해서, 동결-건조된 분쇄 심재는 비-극성 지방친화성 추출물을 제거하기 위해 헥산과 함께 속슬렛 추출되었다(S Soxhlet-extracted). 목재 샘플은 천연 그대로의 리그난을 제공하기 위해 같은 장치에서 아세톤/물(9:1 v/v)과 함께 재추출되었다. 하이드록시마타이레지놀(HMR) 및 이것의 이성체는 분리되고, 더 정제하기 위해 XAD-레신으로 다시 크로마토그래프로 분석되었다.

생체 외에서 산화방지 능력의 측정

리그난의 산화방지 능력은 4가지의 다른 방법으로 평가되었다: 1) 지방 과산화의 억제, 2) 저밀도 지단백질(LDL) 산화의 억제, 3) 초산화 음이온 포착, 및 4) 퍼옥실 라티칼 포착 시험.

지방 과산화의 억제는 생체 외에서 랫트의 간 마이크로솜에서 제3-부틸하이드로퍼옥사이드-유발 지방 과산화(t -BuOOH-LP)를 억제하는 능력에 기초하여 측정되었다(Ahotupa 등, 1997). t -BuOOH-LP에 대한 테스트는 아래와 같이 수행되었다: 완충액(50mM 탄산나트륨, pH 10.2, 0.1mM EDTA)를 루미노미터 큐벳에 0.8ml의 부피가 되게 적정하였다. 20 μ l의 희석된 간 마이크로솜, 최종 1.5mg 단백질/ml 농도를 첨가하고, 6ml의 루미놀(luminol)(0.5 mg/ml) 및 테스트 화합물질을 첨가했다. 테스트 화합물은 에탄올 또는 디메틸설폭사이드(dimethylsulphoxide)(2%의 배양량)로 희석된 소량의 배양 혼합물에 첨가되었고, 지방 과산화 능력은 비히클(에탄올 또는 디메틸설폭사이드)의 그것과 비교되었다. 반응은 33°C, 0.05ml의 0.9mM t -BuOOH에서 시작되었다. 화학발광은 1분 사이클에서 약 45분간 측정되었고, 곡선 아래영역(적분)이 계산되었다. 화학발광 측정은 분석을 위한 전용 소프트웨어를 사용하는 개인용 컴퓨터와 연결된 Bio-Orbit 1251 루미노미터(Bio-Orbit, Turku, 핀란드)를 사용하여 수행되었다.

LDL 산화 억제는 Ahotupa 등, 1996에 의해 설명된 바와 같이 측정되었다. 간단히 설명하면: LDL은 완충된 헤파린을 사용한 침전에 의해 분리되었다. 인산염 완충액에서 재부유(resuspension) 후에, 20mM CuCl_2 가 첨가되고, 혼합물은 37°C에서 3시간 동안 배양되었다. 이 후에, LDL지방은 클로로포름메탄올로 추출되고, 질소 하에 건조되고, 사이클로헥산에서 재용해되고, 234nm에서 분광광도계로 분석되었다. 흡광도는 LDL 산화의 지표가 된다. 다른 화합물의 LDL 산화를 방지하는 능력을 시험하기 위해, 화합물은 CuCl_2 의 첨가 전에 배양 혼합물에 첨가되었다. 분석과정에 있어서 테스트 화합물의 가능한 간섭은 배양기 전후에 234nm에서 흡광도를 측정함으로써 배제되었다. 시작농도(0.1mM)에서 산화방지 능력을 나타낸 화합물의 경우 IC-50 값(즉, 테스트 화합물이 LDL 산화를 50% 억제하는 농도)을 측정하였다.

초산화 음이온 포착 방법은 크산틴-크산틴 산화효소 시스템에 의해 조절된 조건에서 생성된 과산화 음이온에 기초하였고, 루미노미터(luminometer)에 의한 생성된 활성 산소 종(species)을 탐지하는 것이다(Ahotupa 등, 1997). 테스트 화합물의 화학발광을 감소시키는 능력이 측정되었다. IC-50 농도(화학발광을 50%로 억제하는 농도)가 측정되었다.

과산화 라디칼 포착 분석은 2,2'-아조비스(azobis)(2-아미디노프로판)HCl의 열변성에 의한 과산화 라디칼의 생성에 기초하였고, 화학발광에 의한 이것의 탐지다. 결과는 화학양론 요소로 계산되었다. 즉, 1몰의 테스트 화합물에 의해 얼마나 많은 몰의 과산화 라디칼이 포착될 수 있는지로 나타내었다.

JEG-3 세포에서의 아로마테이즈 억제 능력의 측정

HMR의 효과 및 구조적으로 관련된 리그난(엔테로락톤, 엔테로디올 및 7-하이드록시엔테로락톤)은 JEG-3 세포 내에서 ^3H -안도스테네디온(andostenedione)으로부터 ^3H -17 β -에스트라디올의 형성에 관하여 연구되었다. JEG-3 용모암 세포는 생체 외에서 아로마테이즈 억제에 대한 연구를 가능케 하는 유용한 아로마테이즈 모델이다(Krekels 등, 1991). 세포들은 10%의 송아지 태아 혈청(FCS)을 포함하는 DMEM에서 유지되었다. 배양 혼합물은 50 μl ^3H -안드로스트-4-엔,3,17-디온(0.5nM), 50 μl 표식을 붙이지 않은 안드로스테네디온(0.5nM), 100 μl 테스트 화합물 및 800 μl 세포 현탁액(1백만 개의 세포)을 포함하였다. 4시간 동안의 배양 후에, 표식을 붙이지 않은 운반체들(안드로스테네디온, 테스토스테론, 17 β -에스트라디올 및 에스트론)이 첨가되었다. 스테로이드가 3.0ml 디클로로메탄으로 2번 추출되었다. HPLC는 앞서 설명한 바와 같이, 방사성표식을 단 ^3H -17 β -에스트라디올의 분리 및 정량을 위해 사용되었다(Makela 등, 1995). 칼럼 시스템은 가드(guard) 칼럼에 이어 C18 150 $\times$ 3.9mm ID 분석칼럼으로 구성되었다(Technopak 10C18 HPLC Technology; Wellington House, Cheshire, 영국). 이동상은 아세트니트릴/물(35/65)이었고 이동율은 1.2ml/min이었다. 방사성의 대사산물의 인라인 탐지를 위해, HPCL 칼럼의 용리제는 연속적으로 액체 발광물질과 혼합되고, 그 후 인라인 방사선 탐지기로 모니터링되었다.

MCF-7 세포 배양에서의 에스트로젠성 및 항에스트로젠성의 측정

MCF-7 세포주(인간 유방암 세포) 보존 배양은 T-75 세포 배양용기 내에 5% FCS, 100U/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린 및 1nM 17 β -에스트라디올로 보충된 RPMI가 없는 페놀레드에서 성장되었다. 배지는 1주일에 3번 새로운 것으로 교체하였다. 보존 배양은 트립신처리(trypsinization)하여 회수하였고 10ml의 벌신(versene)이 없는 페놀레드 용액에서 현탁화되었고 800rpm에서 5분간 원심분리되었다. 세포 펠렛은 5%의 텍스트란 차콜이 스트립된 FCS(dcFCS)로 보충된 RPMI배지에서 조심스럽게 재현탁화되었고, 50,000세포/3.0ml 배지/웰의 세포를 6개의 웰 플레이트에 심었다. 배양 이틀째에 배지는 교환되었고 테스트 화합물이 첨가되었다. 리그난 화합물의 에스트로젠성을 테스트하기 위해, 에탄올에서 희석화되었고 최종 농도가 1.0M인 세포 배양에 첨가되었다. 각 증식 분석에서, 에탄올 내 1.0nM 17 β -에스트라디올 용액은 에스트로젠성 반응에 대한 양성 대조군으로 사용되었다. 같은 양의 에탄올이 대조 웰에 첨가되었다. 항에스트로젠성을 측정하기 위해 17 β -에스트라디올 및 리그난 용액 모두가 세포 배양에 첨가되었다. 세포들은 테스트 화합물의 존재 하에 5~7일간 배양되었고, 배지는 이틀마다 교환하였다. 세포 증식은 쿨터 계수기를 사용하여 방출된 핵을 세어서 정량하였다.

미성숙 랫트에서 자궁향성 테스트에 의한 에스트로젠성 및 항에스트로젠성 활성의 측정

발정원성 HMR은 앞에서 설명된 바와 같이 미성숙 랫트에서 자궁향성 분석에 의해 측정되었는데(Jordan 등, 1997), 이는 참고연구에서의 3일 대신에 7일간의 처리시간의 예외를 가진다. 처리시간은 테스트 화합물의 예상된 약한 발정원성 때문에 길어졌다. 에스트라디올의 생합성을 억제하는 아로마테이즈 억제제(MPV-2213ad)로 미성숙 랫트의 처리는 에스트로젠에 자극되지 않은 자궁을 위한 방법론적인 대조로 사용되었다.

성숙 수컷 랫트에서 에스트로젠성 및 항에스트로젠성 활성의 측정

HMR의 에스트로젠성(항남성성징의) 및 항에스트로젠성 효과는 각각에 대응하는 온전한 수컷 랫트 및 저남성성징의 수컷 랫트(6~9월령)의 노블레(Noble) 계통에서 연구되었다. 수컷 생식 도관에서의 구조 및 작용 상의 변화를 가진 만성 저남성성징 상태는 신생아를 에스트로젠처리(estrogenization)함으로써 유도되었다(생후 1~5일에 평지기를 속의 디에틸스틸베스트롤, 10.0 $\mu\text{g}/\text{체중kg}$). 이들 변화는 MPV-2213ad의 1일 용량 10~30mg/체중kg을 포함하는 아로마테이즈 억제제 처리에 의해 부분적으로 역전될 수 있는 것으로 알려져 있다(Streng 등, 미발간 결과).

동물들은 굶이 없는 기초 사료가 제공되었고(SDS, Whitham Essex, 잉글랜드) 자유롭게 물에 접근할 수 있게 하였다. 12마리의 온전한 동물 및 저남성성징의 동물들은 평지기를 내에 HMR 1일용량 50mg/체중kg으로 캐비지(cavage)되었다. 양 동물모델로부터의 다른 12마리의 동물들은 단지 플라시보 효과를 위한 처치로서 평지기로 캐비지되었다. 4주간의 처

리 후에 동물들을 희생시켰다. 고환 및 부성선(복측 전립선, 정낭 및 응고선(coagulating gland))의 질량을 측정하였다. 혈청 및 고환 테스토스테론 및 뇌하수체 밀 혈청 황체형성호르몬(LH)의 수준을 면역분석법으로 측정하였다(Haavisto 등, 1993).

랫트의 DMBA-유도 유방암 모델에서 항암 활성의 조사

랫트의 유방암에서 HMR의 항암활성은 앞서 기술한 바와 같이 연구되었다(Kangas 등, 1986). 50일령의 암컷 스프라규-도리(Sprague-Dawley) 랫트에 12.0mg DMBA(디메틸벤즈[아]안트라세네)를 주었다. 약 6주 후에 측정할 수 있는 종양을 찾을 수 있었는데, 그 후 식 $V=(\pi w^2 l)/12$ 에 따라 종양의 부피를 측정하기 위해 종양의 폭(w) 및 길이(l)를 1주일에 1번 측정하였다. 또한 랫트는 1주일에 1번 체중을 측정되었다. 랫트는 3개의 다른 그룹에 배치되어 실험의 시작 시에 전체 종양의 수가 각 그룹에서 비슷하게 하였다: (1) 대조 그룹 8마리, (2) HMR 3.0mg/kg 7마리, (3) HMR 15.0mg/kg 7마리, 각 그룹의 1마리는 실험이 끝나기 전에 희생되어야 했다.

HMR는 DMBA-유도된 후 처음 9주 즉, 측정할 수 있는 종양이 나타난 후 3주에 경구를 통하여 투여되었고, 7.5주 동안 매일 투여되었다. 실험이 끝났을 때 종양은 그들의 성장 패턴에 따라 그룹으로 분류되었다: 1. 성장하는 종양(PD=진행성 질병); 2. 성장하지 않는, 안정화된 종양(SD=안정화된 질병, 종양의 부피변화가 없거나, 퇴행이 75% 이하임); 3. 퇴행 종양(PR=부분적인 반응, 종양부피의 75% 이상이 퇴행함); 4. 소실된 종양(CR=완전한 반응, 측정할 수 있는 종양이 없음).

다른 용량의 HMR을 받은 랫트 소변으로부터의 대사산물의 분석

10마리의 수컷 스프라규-도리(Sprague-Dawley) 랫트가 생체 외에서 HMR의 대사를 연구하기 위해 사용되었다. 대사연구 중에 동물들은 짝을 지어 12시간의 명:암 주기로 수용되고, 자유롭게 물을 먹을 수 있게 하고 콩이 없는 기초 사료가 제공되었다(SDS, Whitham Essex, 잉글랜드).

랫트는 3, 15, 25 및 50mg/체중kg의 용량으로 10% 에탄올에 용해된 HMR로 이틀 동안 캐비지되었다. 두 번째 24시간의 캐비징 후, 소변은 보존제인 120 μ l의 0.56M 아스코르브산 및 120 μ l의 0.15M Na-아지드를 포함하는 수집병의 대사 케이지에 수집되었다. 원심분리된 소변의 부피가 측정되고 영하 20°C에 저장되었다. 전처리를 위해서 750 μ l의 0.2M 아세테이트 완충액(pH 4.0 $\pm$ 0.1)이 3.0ml의 해동된 소변 일부분에 첨가되었다. Sep-Pak C18 컬럼(100mg 실리카게레신/칼럼)이 소변 추출을 위해 사용되었다. 컬럼은 3.0ml의 H₂O, 3.0ml의 메탄올 및 3.0ml의 아세테이트 완충액으로 미리조건이 설정되었다. 소변이 컬럼을 통하여 여과되고 3.0ml의 아세테이트 완충액으로 세척된 후에, 폴리페놀산이 3.0ml의 메탄올로 추출되었다. 추출물은 +45°C의 물 배쓰(bath)에서 질소 하에 건조되도록 증발되었고 건조된 잔여물들은 0.2M의 아세테이트 완충액 0.3ml에서 재용해되었다. 30 μ l의 헬릭스 포마티움(Helix pomatia) 효소혼합물이 첨가되었고 용액은 글루코시드 및 황산염 모두를 가수분해하기 위해 +37°C에서 배양되었다. 300 μ l의 플라분류 용액(EtOH 내 10 μ g/ml)이 가수분해된 샘플에 첨가되었다. 샘플은 C-18 컬럼에서 추출되었고 상기에서와 같이 건조를 위해 증발되었고 GC-MS로 분석되기까지 -20°C에서 저장되었다.

증발된 소변 샘플은 리피딘에서 용해되었고, BSTFA:TMCS(10:1) 실리레이션(silylation) 시약을 첨가함으로써 실리레이트되었다. 실리레이트된 샘플의 GC-MS 분석은 HP 6890-5973 GC-MS 장치로 행해졌다. GC 칼럼은 HP-1 가교 메틸 폴리실록산 칼럼이었다(15m $\times$ 0.25mm, 0.25 μ m 막 두께). 헬륨은 1ml/min이 흐름에서 캐리어 개스로 사용되었다. GC-오븐은 60°C에서 290°C까지, 8°C/min 가열속도로 가열되도록 프로그램되었다. GC-주입기는 1:15의 스플릿(split) 비율로 스플릿-모드에서 시작되었다. 화합물의 확인은 질량분석기에 기초하였다. 양적인 계산은 내부표준에 비례하여 목표성분의 보정되지 않은 최고치 영역에 기초되었다.

결과

생체 외에서의 산화방지능력의 평가

HMR은 어떤 다른 리그난 또는 우리의 테스트의 플라보노이드보다 강한 지방 과산화 능력을 나타내었다(표 2). HMR은 잘 알려진 산화방지제인 수용성의 비타민 E 유도체인 TROLOX 및 BHA 및 BHT와, 지방 과산화억제능력, LDL 산화억제능력 및 초산화 및 퍼록실 라리칼의 포착능력의 관점에서 비교되었다. HMR은 전체적으로 가장 강력한 산화방지제였고, 모든 시험에 있어서 BHA 및 BHT보다 효과적이었고, 지방 산화억제 시험을 제외한 모든 시험에서 TROLOX보다 강하였는데, 여기서 화합물은 거의 동등하게 활성적이었다.

JEG-3 세포에서 아로마테이즈 억제 능력

JEG-3 세포 내에서 ^3H -안드로스테네디온으로부터 ^3H -17 β -에스트라디올 형성의 억제가 상이한 HMR 농도에서 시험되었다. HMR의 억제능력은 엔테로락톤, 7-하이드록시엔테로락톤 및 엔테로디올과 비교되었다. 엔테로락톤은 1.0~10.0 μM 의 범위 내에서 용량-의존성 방향족화(aromatization)의 억제를 나타내었다. 또한, 엔테로디올은 억제를 나타내지 않았는데 이는 락톤링이 억제에 결정적이라는 것을 의미한다. 7-하이드록시엔테로락톤 및 하이드록시마타이레지놀은 억제 효과를 나타내지 않았는데(도 1), 이는 아로마테이즈 억제효과를 위해서는 리그난 분자 내의 수산기의 수 및 위치가 중요하다는 것을 의미한다.

MCF-7 세포 배양에서의 에스트로젠성 및 항에스트로젠성 활성

HMR은 도 2에서 나타난 바와 같이 MCF-7 세포 증식 시험에서 아주 약한, 통계적으로 현저하지 않는 에스트로젠성 또는 항에스트로젠성 활성을 가졌다.

미성숙 랫트의 자궁향성 테스트에서 에스트로젠성 및 항에스트로젠성 활성의 평가

도 3은 미성숙 랫트의 자궁 성장에 대한 HMR의 효과에 대하여 설명하고 있다. HMR은 미성숙 랫트의 자궁 무게의 증가에 대한 현저한 에스트로젠성 효과를 보이지 않았다. 또한 HMR은 자궁 무게를 감소시키지 않았는데, 이는 항에스트로젠성 효과를 나타내지 않는 것을 나타낸다. 예상대로, 아로마테이즈 억제제는 자궁 무게의 증가를 막았는데, 이는 아로마테이즈 억제제의 측정 방법이 적절했다는 것을 의미한다.

성숙 수컷 랫트에서 에스트로젠성 및 항에스트로젠성 활성의 평가

4주간의 HMR 처리 후에, 대조 및 저남성성징 동물에서 발견된 부성선 및 고환의 무게에 있어서 현저한 변화가 없었다(표 4). 또한, 테스토스테론 또는 LH 농도에 있어서 현저한 변화가 없었다(표 5). 이 결과들은, HMR이 시상하부-뇌하수체-생식선 축에 대한 전형적인 에스트로젠성 활성에 영향(LH 및 안드로젠의 분비)을 미치지 않기 때문에 HMR이 수컷에 있어서 완전한 에스트로젠 아고니스트(agonist)가 아니라는 것을 나타낸다. HMR은 수컷 랫트에서 신생아 에스트로젠성화에 의해 유도된 변화를 역전시키지 않기 때문에 항에스트로젠성을 가지지 않는다.

랫트의 DMBA 유도된 유방암 모델에서 항암 활성의 조사

성장하는 종양(PD) 대 안정된 종양(SD), 퇴행하는 종양(PR) 및 소실된 종양(CR)의 수가 도 4에 나타나 있다. HMR의 항암 효과는 통계적으로 아주 현저한 것으로 나타났다. 이 모델에서는 명확한 용량-의존성 항암작용은 없었다. 따라서 HMR의 산화방지 및 종양성장 퇴행 특성은 생체 내 항암활성과 연결될 수 있다. 생체 내에서의 HMR의 항암활성의 메커니즘은 아직까지 알려져 있지 않다.

다른 양의 HMR 투여 후 랫트 소변으로부터의 대사산물의 분석

도 5는 랫트에서 주로 배설하는 HMR의 대사산물은 생물학적으로 활성인 화합물인 엔테로락톤이라는 것을 보여준다. 이것은 HMR의 화학적 구조를 고려하는 놀라운 것이다. 왜냐하면, 대부분의 사람들은 주요 대사산물로 하이드록시엔테로락톤을 예상하기 때문이다. HMR의 엔테로락톤으로의 대사는 랫트 간보다는 장내 박테리아층에 의해 촉매화된다.

결론

하이드록시마타이레지놀(HMR)은 DMBA 유도된 유방암모델에서 변화되지 않는 화합물로 및/또는 엔테로락톤으로 전환 후 항암활성을 가진다. 따라서 HMR은 발전하는 유방암(BC), 전립선암(PC), 결장암 또는 양성 전립선 비대증(BPH)의 위험에 처한 사람에게 유익한 효과를 보유하고 있는 잠재력을 가진다. HMR은 생체 외에서 방향족화를 억제하는 엔테로락톤으로 대사된다. 또한, HMR은 아로마테이즈 억제제의 전구체로서 하행뇨관증후(LUTS), 방광출구장애, 자궁근질조 및 여성화유방증의 발달을 억제할 수 있다. 또한, HMR은 강화 산화방지활성이 있어, 식품첨가물(산화방지제)로 사용될 수 있다. 약제품 또는 식품 보충물로서 HMR은 인간에서 유리한 심혈관 효과를 가질 수 있다. 혁신적인 새로운 기능성 식품, 기능, 건강식품, 약제식품, 계획된 식품 또는 새로운 식품을 만들기 위해 식품에 HMR을 첨가하는 것이 가능하다.

본 발명의 방법은 여기에 설명된 것의 단지 몇 가지인, 다양한 실시예의 형태로 통합될 수 있다고 인정될 것이다. 본 발명의 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 다른 실시예가 존재하고 본 발명의 정신으로부터 벗어나지 않는 것이 명백할 것이다. 따라서, 설명된 실시예는 예시적인 것이고 제한적인 것으로 구성되어서는 안 된다.

【표 1】

인간 분변 세균총에 의한 생체 외에서의 발효로 다른 종류의 식물 식품으로부터 포유동물 리그난의 생산
μg/100g
아마씨 분말 68000
콩 170
곡물 왕겨:
밀 570
귀리 650
곡물 전체:
호밀 160
토마토 80
당근 350
양파 110

Thompson 등, 영양 및 암(Nutrition and Cancer) 16:43-52, 1991

【표 2】

지방산화억제 테스트에 의한 생체 외에서의 리그난 및 관련 플라보노이드의 산화방지 특징
화합물 산화방지 능력 (t-BuOOH-LP) IC ₅₀ (μM)
플라보노이드
캄프레롤(3,4',5,7-테트라하이드록시-플라본) 0.9
케르세틴(3,3',4',5,7-펜타하이드록시-플라본) 0.4
캄프레라이드(3,5,7-트리하이드록시-4'-메톡시-플라본) 0.5
니그란
엔테로락톤
2,3-비스-(3'-하이드록시벤질)-부티로락톤 15.9
엔테로디올
2,3-비스-(3'-하이드록시벤질)-부탄-1,4-디올 12.7
하이드록시마타이레지놀 0.08

【표 3】

생체 외에서 HMR 및 잘 알려진 산화방지제의 산화방지 효과의 비교
화학양론적 요소로 표시한(즉, 1몰의 테스트 화합물이 포착할 수 있는 퍼록실 라디칼의 몰수) 퍼록실 라디칼 포착 시험을 제외하고 IC-50 농도로 나타내었다.
HMR ¹ TROLOX ² BHA ³ BHT ⁴
지방 과산화의 억제 0.06 μM 0.02 μM 1.1 μM 15.3 μM
LDL 산화의 억제 2.0 μM 2.7 μM 확정되지 않음
초산화 음이온 포착 5.6 μM 25 μM 15 μM > 1mM
퍼록실 라디칼 포착 1:4 1:2 확정되지 않음

¹ 하이드록시마타이레지놀

² 수용성 E-비타민 유도체

³ 부틸레이티드 하이드록시아니솔(합성 산화방지제)

⁴ 부틸레이티드 하이드록시톨루엔(합성 산화방지제)

결정방법은 명세서에 설명되어 있다.

[표 4]

HMR에의 4주간 노출이 수컷 랫트의 생식기관의 상대 무게*에 미치는 효과							
	처리	n	체중	고환	복측전립선	정낭	응고선
			g	mg/체중kg			
온전한 동물	플라시보 HMR 50mg/kg	12	426±28	4362±170	909±146	412±43	223±49
		12	447±38	4223±304	938±148	419±59	204±48
저남성성징 동물	플라시보 HMR 50mg/kg	12	481±29	3340±509	333±188	249±63	69±49
		12	455±36	3276±327	378±198	266±49	70±30

* 데이터는 평균±SD(mg/체중kg)으로 표현되었다. HMR 처리 후 상대 무게는 각 그룹에서 플라시보의 경우와 비교하여 현저한 차이는 없다.

[표 5]

HMR에 의 4주간 노출이 수컷 랫트의 테스토스테론 및 LH 농도*에 미치는 영향						
	처리	n	고환 테스토스테론 (ng/testis)	혈청 테스토스테론 (ng/ml)	뇌하수체 LH (μg/pit)	혈청 LH (ng/ml)
온전한 동물	플라시보 HMR 50mg/kg	12	97.6±46.3	2.405±1.122	6.747±2.479	1.804±1.294
		12	112.9±58.5	2.770±1.421	6.838±2.061	1.088±0.352
저남성성징 동물	플라시보 HMR 50mg/kg	12	63.5±25.9	1.197±0.663	8.673±2.224	0.712±0.371
		12	48.0±15.2	0.939±0.431	7.530±2.286	0.854±0.333

* 데이터는 평균±SD로 표현되었다. HMR 처리 후의 호르몬 농도는 각 그룹에서 플라시보의 경우와 비교하여 현저한 차이는 없다.

발명의 효과

본 발명에 따라 유효량의 하이드록시마타이레지놀 또는 이것의 기하이성질체 또는 입체이성질체를 투여하여 인간의 암, 비암성 호르몬 의존성 질환 및/또는 심혈관질환의 예방할 수 있다. 또한, 유효량의 상기 화합물을 식품에 첨가하여 식품의 안정성을 증가시킬 수 있다.

참고문헌

Adlercreutz H, Bannwart C, Wähälä K, Mäkelä T, Brunow G, Hase T, Arosemena PJ, Kellis JT, and Vickery LE: Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 44: 147-153, 1993.

Ahotupa M, Ruutu M, and Mäntylä E: Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem*, 29: 139-144, 1996.

Ahotupa M, Mäntylä E, and Kangas L: Antioxidant properties of the triphenylethylene antiestrogen drug toremifene. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 356: 297-302, 1997.

Axelson M and Setchell KDR: The excretion of lignans in rats - evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. *FEBS lett*, 123: 337-342, 1981.

Axelson M, Sjövall J, Gustafsson BE and Setchell KDR: Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature*, 298: 659-660, 1982.

Ayres D, and Loike, J. Lignans: Chemical, biological and clinical properties. Cambridge university press, 1990.

Brzezinski A, Adlercreutz H, Shaoul R, Rösler A, Shmueli A, Tanos V and Schenker JG: Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. *Menopause (The Journal of the North American Menopause Society)*, 4: 89-94, 1997.

Ekman R: Analysis of lignans in Norway spruce by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Holzforschung*, 30:79-85, 1976.

Ekman R: Distribution of lignans in Norway spruce. Acta Academiae Aboensis, Ser B, 39:1-6, 1979.

Evans BA, Griffiths K and Morton MS. Inhibition of 5 α -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. J Endocrinol, 147: 295-302, 1995.

Haavisto A-M, Petterson K, Bergendahl M, Perheentupa A, Roser JF, and Huhtaniemi I A. Supersensitive immunofluorometric assay for rat luteinizing hormone. Endocrinology, 132: 1687-1691, 1993.

Hultén K, Adlercreutz H, Winkvist A, Lenner P, Hallmans G and Ågren Å. Low levels of phyto-estrogens in blood as risk factor for breast cancer. In: COST 916 Workshop 'Phyto-oestrogens: exposure, bioavailability, health benefits and safety concerns', 1998

Ingram D, Sanders K. Kolybaba M and Lopez D. Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. Lancet, Oct 4;350(9083): 990-994, 1997.

Jenab M and Thompson LU. The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and beta-glucuronidase activity. Carcinogenesis, Jun;17(6):1343-1348, 1996

Jordan VC, Collins MM, Rowsby L, Prestwich G: A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antiestrogenic activity. J Endocrinol, 75: 305-316, 1977.

Kangas L, Nieminen A-L, Blanco G, Grönroos M, Kallio S, Karjalainen A, Perilä M, Södervall M and Toivola R: A new triphenylethylene compound, Fc-1157a. II Antitumor effects. Cancer Chemother Pharmacol, 17:109-113, 1986.

Lampe JW, Martini MC, Kurzer MS, Adlercreutz H and Slavin JL: Urinary lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder. *Am J Clin Nutr*, 60:122-8, 1994.

Landstrom M, Zhang JX, Hallmans G, Aman P, Bergh A, Damber JE, Mazur W, Wähälä K and Adlercreutz H. Inhibitory effects of soy and rye diets on the development of Dunning R3327 prostateadenocarcinoma in rats. *Prostate*, Aug 1; 36(3): 151-161, 1998

Mousavi Y and Adlercreutz H: Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 41: 615-619, 1992.

Mattinen J, Sjöholm R and Ekman R. NMR-spectroscopic study of hydroxymatairesinol, the major lignan in Norway spruce (*Picea abies*) heartwood. *ACH models in chemistry*, 135(4):583-590, 1998.

Mäkelä S, Poutanen M, Lehtimäki J, Kostian M-L, Santti R and Vihko R. Estrogen-specific 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C.1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens. *P.S.E.B.M.*, 208:51-59, 1995.

Phipps WR, Martini MC, Lampe JW, Slavin JL and Kurzer MS. Effect of flax seed ingestion on the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 77(5):1215-1219, 1993.

Rickard SE, Orcheson LJ, Seidl MM, Luyengi L, Fong HHS and Thompson LU: Dose-dependent production of mammalian lignans in rats and in vitro from the purified precursor secoisolariciresinol diglycoside in flaxseed. *J Nutr*, 126: 2012-2019, 1996.

Shultz TD, Bonorden WR and Seaman WR. Effect of short-time flaxseed consumption on lignan and sex hormone metabolism in men. *Nutrition Research*, 11:1089-110, 1991.

Serraino M and Thompson LU: The effect of flaxseed supplementation on early risk markers for mammary carcinogenesis. *Cancer Letters*, 60: 135-142, 1991.

Serraino M and Thompson LU: The effect of flaxseed supplementation on the initiation and promotional stages of mammary tumorigenesis. *Nutr Cancer*, 17:153-159, 1992.

Setchell KDR, Borriello SP, Gordon H, Lawson AM, Harkness R and Morgan DML. Lignan formation in man – microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet*, 4:4-7, 1981

Streng T, Talo A and Santti R. Unpublished observations.

Thompson LU, Robb P, Serraino M and Cheung F. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr Cancer*, 16: 43-52, 1991

Thompson LU, Seidl, MM, Rickard SE, Orcheson, LJ, and Fong HHS: Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursors from flaxseed. *Nutr Cancer*, 26: 159-165, 1996a.

Thompson LU, Rickard SE, Orcheson LJ and Seidl MM: Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 17: 1373-1376, 1996b.

Tou JCL, Chen J and Thompson U. Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol diglycoside, affect pregnancy outcome and reproductive

development in rats. J Nutr, 128: 1861-1868, 1998.

Wang C, Mäkelä T, Hase T, Adlercreutz H and Kurzer MS: Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human adipocytes. J Steroid Biochem Molec Biol, 50: 205-212, 1994.

Waters AP and Knowler JT. Effect of a lignan (HPMF) on RNA synthesis in the rat uterus. J Reprod. Fert, 66:379-381, 1982.

Zhang J-X, Hallmans G, Landström M, Bergh A, Damber J-E, Åman P and Adlercreutz H. soy and rye diets inhibit the development of Dunning R3327 prostatic adenocarcinoma in rats. Cancer Letters, 114: 313-314, 1997.

도면의 간단한 설명

도 1은 JEG-3 세포에서 리그난에 의한 농도에 비례한 아로마테이즈의 억제를 도시한 것이다.

도 2는 HMR의 존재 및 부존재 시의 MCF-7 세포의 증식을 도시한 것이다.

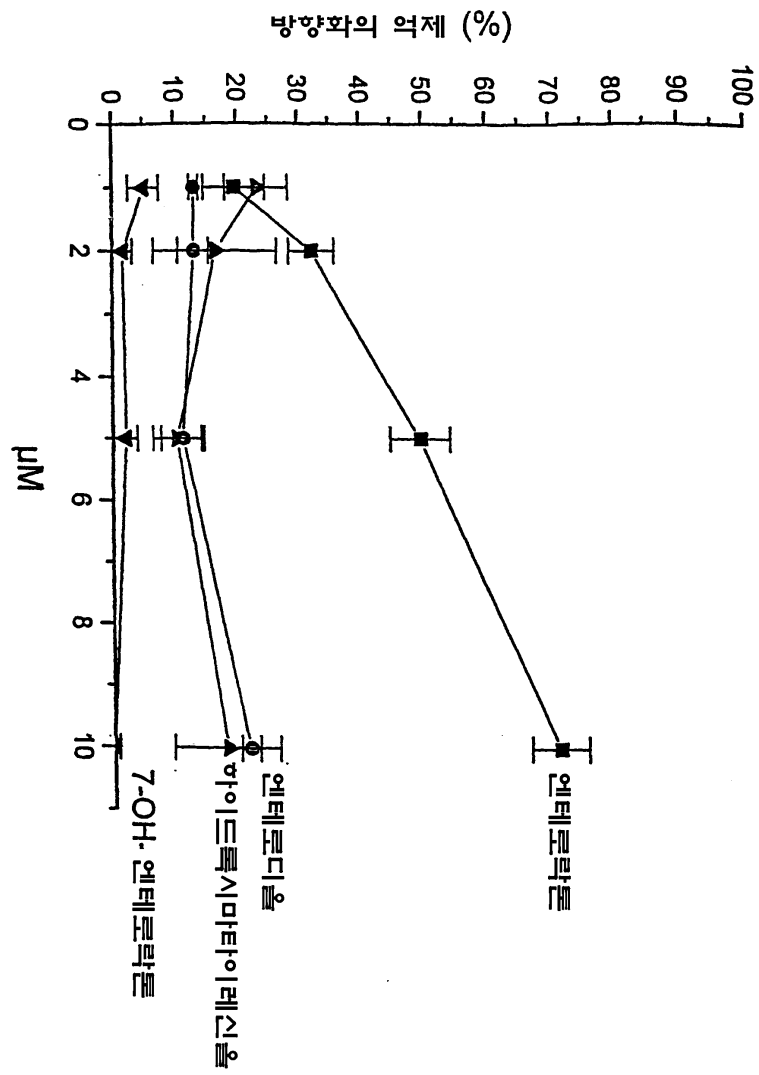
도 3은 HMR 또는 아로마테이즈 억제제로 처리된 미성숙 랫트의 자궁 생 질량(wet weight)을 도시한 것이다.

도 4는 암컷 랫트에서 DMBA로 유도된 유선종양에 대한 HMR의 항종양 활성을 도시한 것이다.

도 5는 다른 양의 HMR로 처리된 랫트의 소변에서 엔테로락톤의 배설을 도시한 것이다.

도면

도면1



도면2

MCF-7 세포에서 HMR의 발정성 및 항발정성 활성.
대조의 세포증식은 100%가 되도록 조절된다.

실험수, n=3-4.

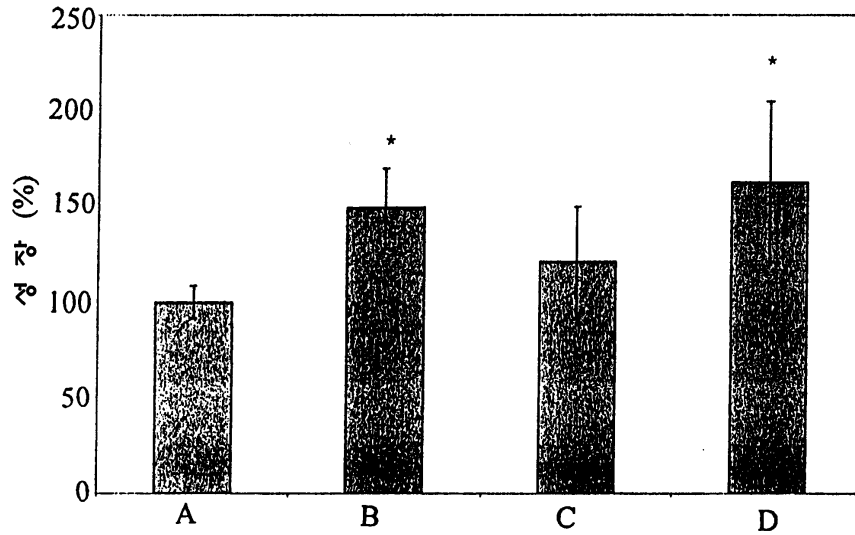
* 대조와 현저한 차이가 있음

A = 대조(호르몬이 없는 비히클)

B = 비히클 + 에스트라디올 10^{-9} M

C = 비히클 + HMR 10^{-6} M

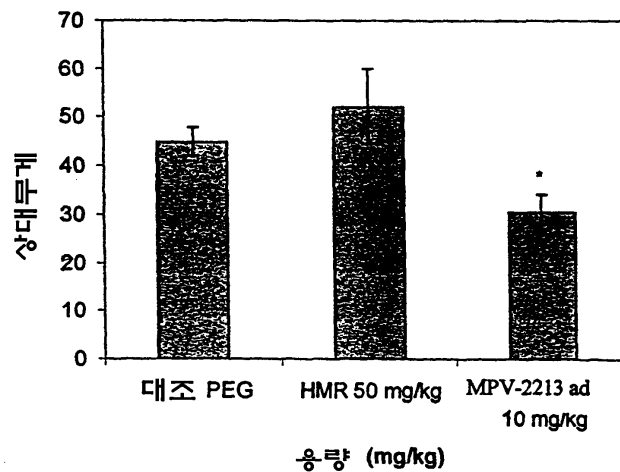
D = 비히클 + HMR 10^{-6} M + 에스트라디올 10^{-9} M



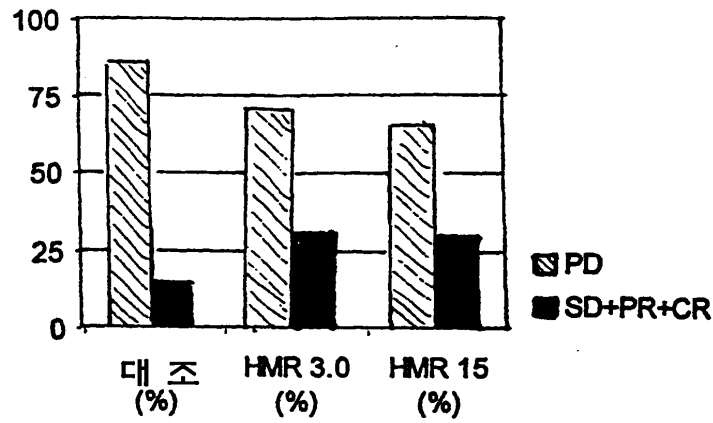
도면3

HMR 또는 MPV-2213ad로 처리된
미성숙 래트 자궁의 상대무게 (mg/체중kg)

* 대조와 현저한 차이가 있음



도면4



도면5

다른 용량의 HMR¹ 투여 후의 뇨중의 리그난
값은 SD바를 이용하여 평균값으로 표현된다.
대조, n=1 을 제외하고 각 처리 그룹당 동물수는 n=2임.

