(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0026705
(43) 공개일자 2025년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/61 (2006.01) *A23K 10/30* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/61 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0107950
(22) 출원일자 2023년08월17일
심사청구일자 2023년08월17일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
가천대학교 산학협력단
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)
(72) 발명자
임윤숙
서울특별시 동대문구 제기로 131, 105동 2004호
어윤주
경기도 부천시 소향로 197, 1115호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

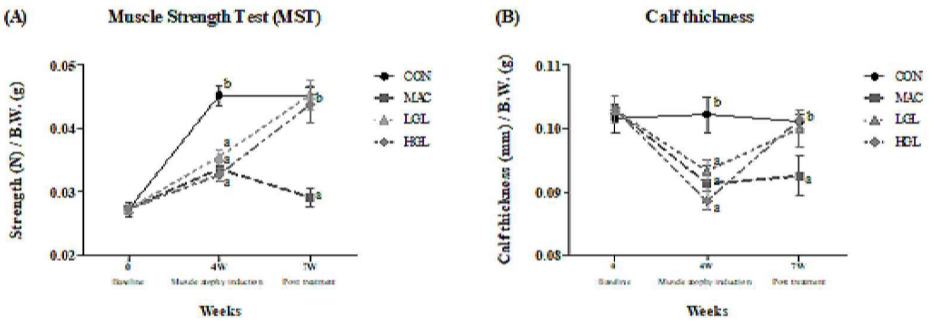
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **구아바 잎 추출물을 함유하는 근육질환 예방 및 완화 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 항산화 소재인 구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 우수한 근육 손상 완화의 효과를 나타내어 근육 위축 예방 또는 완화에 탁월한 효과를 가진다. 나아가 이는 근 위축증 개선뿐만 아니라 이를 유발하는 다양한 요인을 조절하는 유용한 식품으로서 다양한 산업 분야에서 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61P 21/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/316 (2013.01)
(72) 발명자
이혜지
서울특별시 성북구 종암로25길 30, 108동 1704호
김선여
서울특별시 강남구 삼성로51길 37, 110동 2202호
김선혁
경기도 남양주시 불암로 337, 5103동 1402호
홍성민
인천광역시 남동구 에코중앙로 163, 704동 3202호
이은유
울산광역시 북구 제내1길 7-12, 303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711191333
과제번호 2021R1A2C2007708
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 항당뇨 소재의 미생물 발효 대사체를 이용한 당뇨병성근감소증 및 인지기능 저하 완화 효과 관련 기전 규명: 근육-간-뇌 상호작용 관련 기전 중심으로
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2026.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육질환 예방 또는 치료 및 개선용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 구아바 잎 추출물은, 에탄올 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 근육질환 예방 또는 치료 및 개선용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 근육질환은 근감소증(sarcopenia), 근위축증(muscular atrophy), 근무력증(myasthenia), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육긴장증(myotonia), 근긴장 저하(hypotonia), 근력 약화(muscular weakness), 근육퇴행위축(muscular dystrophy), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 및 염증성 근육병(inflammatory myopathy)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 근육질환은 근력, 종아리 두께 및 제지방량 감소로 인한 것을 특징으로 하는 근육질환 예방 또는 치료 및 개선용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 근육의 근세포 면적 감소 억제를 통한 근육 손상 예방 및 완화 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 근육질환 예방 또는 치료 및 개선용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 근육의 유비퀴틴 단백질 분해 관련 기전 저하를 통한 근육 손상 예방 및 완화 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 근육질환 예방 또는 치료 및 개선용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 근육질환 예방 또는 치료 방법.

청구항 8

구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는, 근육질환 예방 또는 치료 및 개선용 건강기능 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 근육질환은 근감소증(sarcopenia), 근위축증(muscular atrophy), 근무력증(myasthenia), 근이영양증

(muscular dystrophy), 근육긴장증(myotonia), 근긴장 저하(hypotonia), 근력 약화(muscular weakness), 근육퇴행위축(muscular dystrophy), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 및 염증성 근육병(inflammatory myopathy)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료 및 개선용 건강기능 식품 조성물.

청구항 10

구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육질환 예방 또는 치료 및 개선용 사료 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 근육질환은 근감소증(sarcopenia), 근위축증(muscular atrophy), 근무력증(myasthenia), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육긴장증(myotonia), 근긴장 저하(hypotonia), 근력 약화(muscular weakness), 근육퇴행위축(muscular dystrophy), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 및 염증성 근육병(inflammatory myopathy)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료 및 개선용 사료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 구아바 잎 추출물을 함유하는 근육질환 예방 및 완화용 조성물에 관한 것으로, 근력 및 종아리 두께의 증가와 근육 조직의 단백질 분해 기전을 저해시킴으로써 근육 위축 완화 효과가 있는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인간의 근육은 심장 근육, 골격근 및 평활근으로 구성된다. 그 중 골격근은 인체 전체 체중의 40%를 차지하는 가장 큰 기관으로 전체 단백질의 50~75%를 함유하고 있다. 골격근은 뼈의 움직임을 조절하고 관절을 보호하며 신체 자세를 유지하는 등 다양한 역할을 한다. 또한 에너지 소비, 호흡, 운동, 포도당, 지질 및 아미노산 대사의 조절에 관여한다.

[0004] 인간은 나이가 들면서 근육 손실이 가속화되는데, 골격근은 우리 몸에서 30세 이후 매년 약 1%씩 감소하는 경향이 있으며, 65세 이후에는 급격히 감소하게 된다. 또한, 허벅지 근육은 20세에서 80세 사이에 근육량의 40% 이상이 손실된다. 특히 60, 70세 이후에 감소가 최대에 달한다. 이는 근육 관련 질환의 유병률 증가와 관련이 있다. 근감소증에 따른 생존율의 차이를 비교했을 때, 근감소증군이 일반군보다 낮은 생존율을 보인다는 연구결과가 있습니다. 또한 당뇨병, 비만, 심부전, 간 질환 또는 만성 폐 질환과 같은 만성 질환이 있는 경우 근육 손실이 가속화된다. 따라서 근육을 건강하게 유지하는 것은 삶의 질을 향상시키고 생존율을 높이는 것과 밀접한 관련이 있다. 의학의 발달에 증가됨에 따라 인간의 기대수명이 연장되었고, 그에 따라 발생하는 근육질환의 발병률이 높아지고 있어 근위축증의 감소 및 치료에 대한 관심이 점차 높아지고 있다.

[0005] 최근 다양한, 그리고 다량의 폴리페놀을 함유하고 있는 물질에 대한 연구들이 많이 진행되고 있다. 특히, 구아바 잎은 항당뇨, 체내 지질 감소(항비만), 간보호, 항산화, 항염증, 그리고 항암에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나 근육위축에 대한 구아바 잎의 생리활성 기전 관련 연구들은 부족한 실정이다. 따라서 구아바잎 추출물의 대사조절 효능을 규명하여 인체에 유익한 기능을 기대할 수 있다면, 이를 근위축증 완화물질로 사용할 수 있을 것이다.

[0006] 근위축증(근육위축)은 근육의 낭비 및 소실을 의미한다. 인간은 단백질 대사의 합성과 분해가 균형을 이루고 있는데, 단백질 합성보다 단백질 분해가 많이 발생하면서 단백질 항상성이 깨지면서 나타나는 질병이다. 근위축증은 생리적, 병리학적, 신경학적 요인을 포함한 다양한 요인에 의해 발생하며, 대표적인 원인으로는 나이, 유전, 신경 손상, 영양 공급 불균형, 신체 활동 감소, 글루코코르티코이드 부작용 등이 있다. 또한, 코로나-19 대유행의 지속으로 인한 실내 활동의 증가는 신체 활동의 급격한 감소로 이어져 근위축증의 발병이 증가하고 있다.

[0007] 전사인자 FoxO3a의 활성화는 근육 단백질 degradation 과정 중 ubiquitin proteasome system(UPS)에 기여하는 E3 ligase인 MAFbx (Atrogin-1)과 Murf1의 발현을 증가시켜 근육 조직의 단백질 분해를 촉진한다. 또한 myostatin의 발현의 증가는 FoxO3a의 활성을 유도하여 단백질 분해 대사를 촉진하고, Akt를 비활성화시켜 단백질 합성 대사를 억제하면서 근위축증을 유발한다고 알려져 있다.

[0008] 이에 본 기술의 발명자는 다량의 폴리페놀을 함유하는 소재를 이용하여 근위축증을 완화시킬 수 있는 소재를 찾아내었다. 본 발명의 건강기능식품으로의 활용은 이를 음료 또는 캡슐로 만들어 섭취가 용이하게 할 수 있다. 또한 구아바 잎 추출물의 단백질 분해 대사 저해 효과로 인한 근육위축 개선 효과를 기대할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 구아바 잎 추출물을 포함하는 조성물의 근육위축 예방 및 완화에 관한 것으로, 보다 자세하게는 근육수축 예방 및 완화 효과를 나타내면서도 항산화 소재인 구아바 잎 추출물을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0013] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0017] 본 발명은 구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육질환 예방 또는 치료 및 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 바람직하게는, 상기 근육질환은 근력, 종아리 두께 및 제지방량 감소로 인한 것을 특징으로 하는 근육질환 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 바람직하게는, 상기 근육질환은 근감소증(sarcopenia), 근위축증(muscular atrophy), 근무력증(myasthenia), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육긴장증(myotonia), 근긴장 저하(hypotonia), 근력 약화(muscular weakness), 근육퇴행위축(muscular dystrophy), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 및 염증성 근육병(inflammatory myopathy)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 근육의 근세포 면적 감소 억제를 통한 근육 손상 예방 및 완화시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 근육의 유비퀴틴 단백질 분해 관련 기전 저하를 통한 근육 손상 예방 및 완화시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 상기 구아바 추출물은 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출될 수 있고, 예를 들어, 열수 추출, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등이 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용

하여 수행될 수 있다.

[0023] 바람직하게는, 상기 추출물은 에탄올 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 바람직하게는, 상기 조성물은 상기 구아바 잎을 50 내지 70% 에탄올로 추출한 추출물일 수 있고, 보다 바람직하게는 구아바 잎을 50% 에탄올로 추출한 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0028] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0029] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제쉘락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에칠렌글리콜 4000, 폴리에칠렌글리콜 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스텔류(트윈에스텔), 폴리옥시에칠렌모노알킬에텔류, 라놀린에텔류, 라놀린에스텔류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용

될 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모니움), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO3), 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨(Na2S2O5), 아황산나트륨(Na2SO3), 질소가스(N2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텝솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아뎁스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M ,Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0036] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0037] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0042] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0043] 본 발명에서 "투여 "란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 본 발명에서 "예방" 이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료" 란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선" 이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0044] 본 발명은 구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는, 근육질환 예방 또는 치료 및 개선용 건강기능 식품 조성물을 제공한다.

[0045] 본 발명에 있어서, "식품" 이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제 등을 모두 포함하는 의미이다.

[0046] 본 발명에 있어서, 상기 "건강기능식품(functional food)"이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하며, 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 분말, 액제, 편상(flake), 페이스트, 시럽제, 겔, 젤리, 바(bar), 또는 필름 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "기능"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.

[0047] 본 발명의 구아바 잎 추출물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 구아바 잎은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0048] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0049] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 덱스트린 및 시클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 0.01-0.20g, 또는 약 0.04-0.10g이다.

[0050] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0051] 본 발명은 구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육질환 예방 또는 치료 및 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0052] 본 발명의 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다.

[0053] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있

다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 목적은 구아바 잎 추출물을 포함하는 조성물의 근육위축 예방 및 완화에 관한 것으로, 보다 자세하게는 근육수축 예방 및 완화 효과를 나타내면서도 항산화 소재인 구아바 잎 추출물을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다. 또한, 근위축증은 다양한 요인에 의해 유발되는 바, 항산화 소재인 구아바 잎 추출물을 포함하는 조성물을 이용하여 개선할 수 있다면, 근위축증 개선뿐만 아니라 이를 유발하는 다양한 요인을 조절하는 유용한 식품이 될 것이다.

발명의 효과

[0056] 본 발명에 따른 조성물은 우수한 근육 손상 완화의 효과를 나타내어 근육위축 예방 또는 완화에 탁월한 효과를 가진다.

[0057] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 덱사메타손으로 근육위축을 유도한 쥐에서의 근력 및 종아리 두께를 나타낸 도이다.

도 2는 근육위축을 유도한 쥐에서의 근육의 조직학적 변화를 나타낸 도이다.

도 3은 근육위축을 유도한 쥐에서의 근육의 조직학적 변화를 나타낸 도이다.

도 4는 근육위축을 유도한 쥐에서의 근육의 유비퀴틴 단백질 분해 관련인자 측정 결과를 나타낸 도이다

도 5는 당뇨병성 근육위축 모델 쥐에서 근력향상 효과 분석을 나타낸 도이다.

도 6은 당뇨병성 근육위축 모델 쥐에서 근육의 조직학적 변화 분석을 나타낸 도이다.

도 7은 당뇨병성 근육위축 모델 쥐에서 근육의 유비퀴틴 단백질 분해 관련인자 측정 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 달리 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖고 있다.

[0062] 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 갖는 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0063] 또한 본 발명에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0065] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 구체적으로 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0067] **실험 준비**

[0068] **구아바 잎 추출물 제조**

[0069] 구아바 잎 추출물 제조를 위해 통상적인 방법으로 상온에서 50% 에탄올 추출을 2회 반복 진행하였다. 여과시킨 추출액은 농축 후 동결 건조하여 냉동 보관하여 구아바 잎 추출물 시료로 사용하였다.

[0071] **실험예 1. 덱사메타손으로 근육위축을 유도한 쥐에서의 근력 측정 및 종아리 두께 측정**

[0072] 7주령 수컷 ICR 쥐를 대조군으로 하여 7주령 수컷 ICR 쥐를 하루에 한 번 15 mg/kg B.W.의 dexamethasone (DEX; 덱사메타손)을 복강 투여하여 근육위축 대조군(muscle atrophy control, 이하 MAC)을 유도하였다. 정상군(CON)은 0.1% DMSO를 복강투여 하였다. DEX 투여 4주 이후 CON에 비해 근력의 감소, 종아리 두께 감소, 제지방량이 감소된 쥐를 근육위축으로 판정하였다. 근육위축이 유도된 쥐 중 일부에 200 mg/kg B.W.의 저농도 구아바 잎 추출물(low dosage of guava leaf, 이하 LGL) 및 500 mg/kg B.W.의 고농도 구아바 잎 추출물(high dosage of guava leaf, 이하 HGL)을 각각 살균된 3차 증류수에 녹여 3주간 경구 투여하였다. CON과 MAC에는 살균된 3차 증류수를 경구 투여하였다. 실험이 지속되는 동안은 계속 DEX를 복강 투여하였다. DEX 투여 이전, 근육위축 유도 후, 그리고 동물 희생 직전에 muscle strength meter을 이용한 근력의 측정과 electronic caliper을 이용한 종아리 두께를 측정하였다. 결과값은 각각의 체중으로 보정하였다.

[0073] 쥐의 근력과 종아리 두께 측정의 결과로, DEX 투여 이전인 base line에서는 모든 쥐에서 차이가 없었지만, 4주간의 DEX 투여 이후에 근육위축 대조군(MAC)에서 정상군(CON)에 비해 낮은 근력 및 종아리 두께의 결과를 보였다. 하지만 3주 동안 구아바잎 추출물을 경구투여한 이후에는 구아바 잎 추출물 투여군(LGL과 HGL 모두)에서 근육위축 대조군(MAC)에 비해 유의적으로 근력 및 종아리 두께가 증가하였다 [도 1-A,B].

[0074] 이러한 결과는 상기 구아바 잎 추출물이 덱사메타손으로 유도된 근육위축에 근력 및 종아리 두께의 증가에 우수한 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

[0076] **실험예 2. 근육위축을 유도한 쥐에서의 근육의 조직학적 변화 확인**

[0077] 쥐는 정상군(CON)과 근육위축군(MA)로 나누어, 정상군(CON)에는 0.1% DMSO, 근육위축군(MA)에는 15 mg/kg B.W.의 DEX를 매일 복강투여하였다. 근육위축 후에는, 정상군(CON)과 근육위축 대조군(MAC)에는 살균 3차 증류수를, 저농도와 고농도 각각 200 mg/kg, 500 mg/kg의 구아바 잎 추출물을 살균 3차 증류수에 녹여 3주 동안 경구투여한 후 쥐의 체성분을 분석하였다.

[0078] 쥐를 마취제(케타민)과 자일라진(근육이완제)의 투여하여 마취시킨 후, 스캐너 위에 고정시킨 후 Dual Energy X-ray Absorptiometry (이하 DEXA)를 촬영을 통해 체성분을 측정하였다. 결과값은 체중으로 보정하였다.

[0079] 체성분 분석 결과, 근육위축 후에는 근육위축군(MA)에서 정상군(CON)에 비해 유의적으로 감소한 제지방량 및 증가한 체지방량의 결과를 보이며, 근육위축이 유도되었음을 확인하였다. 구아바 잎 추출물 투여 이후에는 구아바 잎 추출물 투여군(LGL과 HGL 모두)에서 근육위축 대조군(MAC)에 비해 유의적으로 증가한 제지방량 및 감소한 체지방량을 확인하였다 [도 2].

[0080] 상기 결과는 구아바 잎 추출물이 근육위축으로 감소한 제지방량과 증가한 체지방량을 역전시킬 수 있는 효능을 가지고 있음을 시사한다.

[0082] **실험예 3. 근육위축을 유도한 쥐에서의 근육의 조직학적 변화 확인**

[0083] 모든 군은 7주 동안 DEX가 투여되었다. DEX 투여 4주 이후, 정상군(CON)과 근육위축 대조군(MAC)에는 살균 3차 증류수를, 저농도군과 고농도군에는 각각 200, 500 mg/kg B.W.의 구아바 잎 추출물을 살균 3차 증류수에 녹여 3주 동안 경구투여를 진행한 후, 쥐의 비복근 일부를 채취하였다. 이후 구아바 잎 추출물의 투여에 따른 근육섬유의 단면적을 측정하였다.

[0084] 채취한 비복근 조직을 10% 포르말린 용액에 고정시키고, 파라핀으로 포매시킨다. 이후 조직을 4 μm 두께로 박절하여 조직 절편을 제작하였다. 이후 hematoxylin&eosin (H&E) 염색을 실시하여 조직 절편을 광학현미경으로 관찰하였다.

[0085] 그 결과, 근육위축 대조군(MAC)이 정상군(CON)에 비해 근육 섬유의 단면적(cross sectional area, 이하 CSA)이 현저히 감소하였지만, 구아바 잎 추출물 투여군(LGL과 HGL 모두)에서는 근육위축 대조군(MAC)에 비해 근육 섬유의 단면적(CSA)이 유의적으로 증가하였음을 확인하였다 [도 3]

[0086] 상기 결과를 통해 구아바 잎 추출물의 투여가 근육위축 상태에서 감소한 근육 섬유의 단면적을 증가시킴으로서 근육위축 예방 및 완화의 효능을 가지고 있음을 시사한다.

[0088] **실험예 4. 근육위축을 유도한 쥐에서 근육의 유비퀴틴 단백질 분해 관련인자 측정**

[0089] 정상군(CON)에는 0.1% DMSO를 근육위축군(MA)에는 15 mg/kg B.W.를 4주 동안 복강투여하여 쥐의 근육위축을 유도하였다. 이후, 정상군(CON)과 근육위축 대조군(MAC)에는 살균 3차 증류수를, 저농도와 고농도 각각 200, 500 mg/kg B.W.의 구아바 잎 추출물을 살균 3차 증류수에 녹여 3주 동안 경구 투여한 후 쥐의 근육(비복근) 조직 일부를 채취하였다. 이후 구아바 잎 추출물의 근육 손상 완화 기전을 확인하고자 근육 조직에서의 유비퀴틴 단백질 분해 대사 관련 인자의 발현량을 측정하였다.

[0090] 구아바 잎 추출물을 투여한 쥐의 근육을 단백질 fractionation을 진행하여 nuclear 및 cytosol 단백질을 추출하였다. 얻은 추출액을 이용하여 BCA(Bicinchoninic acid assay)를 통해 샘플 내 단백질을 정량 하였다. 추출액을 BCA kit에 37℃에서 30분 동안 반응시킨 후, 562 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선과 비교하여 시료 단백질 농도를 계산하였다. 개체 당 30㎍의 단백질이 포함되도록 하는 시료를 제작한 후 western blot assay를 실시하였다.

[0091] 구체적으로, 시료를 8 ~ 12% 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에서 전기영동 하여 크기별로 단백질을 분리한 후, 메탄올로 활성화시킨 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride, 이하 PVDF) 멤브레인으로 옮겼다. 멤브레인을 3% BSA(bovine serum albumin)에 담궈 다른 단백질이 붙지 않도록 blocking 한 후 원하는 단백질에 대한 1차 항체 nuclear FoxO3a, Atrogin-1, Murf1, Myostatin, nuclear PCNA 및 α-tubulin를 차례로 반응시켰다. PBS-T (Phosphate-buffered saline supplemented with tween 20)로 워싱 후 각 source에 맞는 2차 항체를 반응시킨 후 PBS-T로 워싱 하였다. 마지막으로 ECL 용액을 반응시킨 후 ChemiDoc XRS + imaging system을 통하여 단백질 정도에 따른 밴드의 밝기 및 굵기로 그 발현 정도를 확인하였다.

[0092] 그 결과, 정상군(CON)에 비해 근육위축 대조군(MAC)에서 유비퀴틴 단백질 분해의 E3 ligase인 Atrogin-1, Murf1이 유의적으로 증가하였다. 반면 근육위축 대조군(MAC)에 비해 고농도 구아바 잎 추출물 투여군(HGL)에서 Atrogin-1, Murf1 모두 현저하게 감소하였다 [도 4-A].

[0093] 또한 근육 단백질의 음성 조절자인 myostatin의 발현은 정상군(CON)에 비해 근육위축 대조군(MAC)에서 유의적으로 증가하였다. 하지만, 근육위축 대조군(MAC)에 비해 구아바 잎 추출물 투여군(LGL과 HGL 모두)에서 정상수준으로 감소시켰다 [도 4-B].

[0094] 상기 결과는 구아바 잎 추출물이 근육의 단백질 분해 대사에 관여하는 인자들의 활성을 억제시킴으로써, DEX로 유도한 근육 위축을 완화시키는 우수한 효과를 가짐을 시사한다.

[0096] **실험예 5. 당뇨병성 근육위축 모델 쥐에서 근력향상 효과 분석**

[0097] 4주령 수컷 C57BL/6 쥐를 대조군으로 하여 4주령 수컷 C57BL/6 쥐를 60mg/kg B.W.으로 2회 streptozotocin (STZ) 투여와 고지방식이를 통해 인슐린 저항성이 증가된 제2형 당뇨 모델을 유도하였다. 이후 지속적으로 혈당이 250mg/dl 이상인 쥐를 제2형 당뇨로 판정하여 실험군으로 설정하였다. 정상군 (CON)과 당뇨대조군 (DMC)에는 살균 3차 증류수를, 구아바잎 추출물 투여군에는 50mg/kg B.W을 살균 3차 증류수에 녹여 14주간 경구투여 하였다. 그리고 동물 희생 직전에 muscle strength meter을 이용한 근력을 측정하였다.

[0098] 그 결과, 당뇨대조군 (DMC)은 정상군 (CON)에 비해 근력이 저하되었고, 구아바 잎 추출물 투여는 당뇨대조군 (DMC)에 비해 근력을 향상시킴을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 구아바 잎 추출물이 고혈당으로 인해 저하된 근력을 향상시키는 효과를 가짐을 시사한다.

[0100] **실험예 6. 당뇨병성 근육위축 모델 쥐에서 근육의 조직학적 변화 분석**

[0101] 정상군 (CON)과 당뇨대조군 (DMC)에는 살균 3차 증류수를, 구아바잎 추출물 투여군에는 50mg/kg B.W을 살균 3차 증류수에 녹여 14주간 경구투여 하였다. 희생 후 근육(비복근) 조직 일부를 채취하여 구아바 잎 추출물의 투여에 따른 근육섬유의 단면적을 측정하였다.

[0102] 채취한 비복근 조직을 10% 포르말린 용액에 고정시키고, 파라핀으로 포매 시킨다. 이후 조직을 4㎛ 두께로 박절하여 조직 절편을 제작하였다. 이후 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하여 조직 절편을 광학현미경으로 관찰하였다.

[0103] 그 결과, 당뇨 대조군(DMC)이 정상군(CON)에 비해 근육 섬유의 단면적(cross sectional area, 이하 CSA)이 현저히 감소하였지만, 구아바 잎 추출물 투여는 당뇨 대조군 (DMC)에 비해 근육 섬유의 단면적(CSA)이 유의적으로 증가하였음을 확인하였다 [도 6]

[0104] 상기 결과를 통해 구아바 잎 추출물의 투여가 고혈당으로 인해 감소된 근육 섬유의 단면적을 증가시킴으로써 근육위축 예방 및 완화의 효능을 가지고 있음을 시사한다.

[0106] **실험예 7. 당뇨병성 근육위축 모델 쥐에서 근육의 유비퀴틴 단백질 분해 관련인자 측정**

[0107] 정상군 (CON)과 당뇨대조군 (DMC)에는 살균 3차 증류수를, 구아바잎 추출물 투여군에는 50mg/kg B.W을 살균 3차 증류수에 녹여 14주간 경구투여 하였다. 희생 후 근육(비복근) 조직 일부를 채취하여 유비퀴틴 단백질 분해 대사 관련 인자의 발현량을 측정하였다.

[0108] 구아바 잎 추출물을 투여한 쥐의 근육을 단백질 fractionation을 진행하여 nuclear 및 cytosol 단백질을 추출하였다. 얻은 추출액을 이용하여 BCA(Bicinchoninic acid assay)를 통해 샘플 내 단백질을 정량 하였다. 추출액을 BCA kit에 37℃에서 30분 동안 반응시킨 후, 562 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선과 비교하여 시료 단백질 농도를 계산하였다. 개체 당 30 ㎍의 단백질이 포함되도록 하는 시료를 제작한 후 western blot assay를 실시하였다.

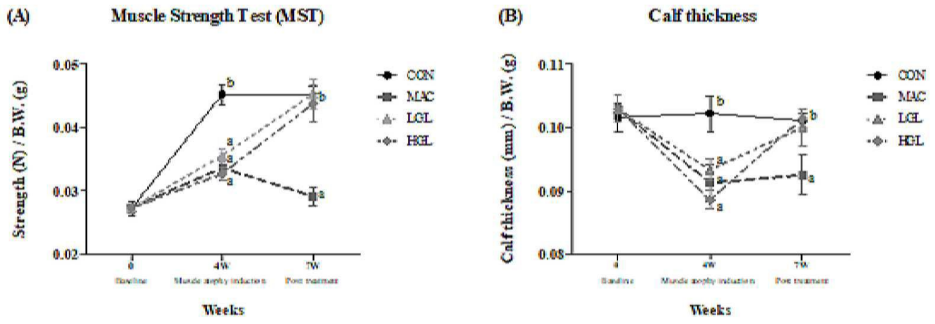
[0109] 구체적으로, 시료를 8 ~ 12% 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에서 전기영동하여 크기별로 단백질을 분리한 후, 메탄올로 활성화시킨 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride, 이하 PVDF) 멤브레인으로 옮겼다. 멤브레인을 3% BSA(bovine serum albumin)에 담궈 다른 단백질이 붙지 않도록 blocking 한 후 원하는 단백질에 대한 1차 항체 Atrogin-1, Murf1 및 α-tubulin를 차례로 반응시켰다. PBS-T (Phosphate-buffered saline supplemented with tween 20)로 워싱 후 각 source에 맞는 2차 항체를 반응시킨 후 PBS-T로 워싱 하였다. 마지막으로 ECL 용액을 반응시킨 후 ChemiDoc XRS + imaging system을 통하여 단백질 정도에 따른 밴드의 밝기 및 굵기로 그 발현 정도를 확인하였다.

[0110] 그 결과, 정상군(CON)에 비해 당뇨대조군 (DMC)에서 유비퀴틴 단백질 분해의 E3 ligase인 Atrogin-1, Murf1 이 유의적으로 증가하였다. 반면 당뇨대조군(DMC)에 비해 구아바 잎 추출물 투여군 (50mg/kg)에서 Atrogin-1, Murf1이 모두 현저하게 감소하였다 [도 7].

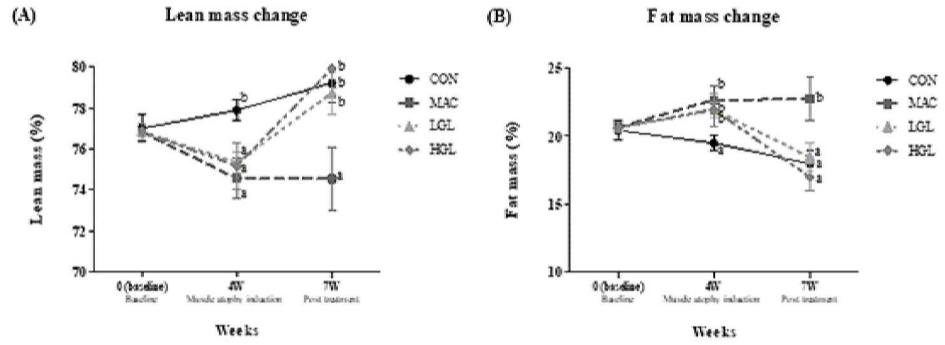
[0111] 상기 결과는 구아바 잎 추출물이 근육의 단백질 분해 대사에 관여하는 인자들의 활성을 억제시킴으로써, 고혈당으로 인한 근육 위축을 완화시키는 우수한 효과를 가짐을 시사한다.

도면

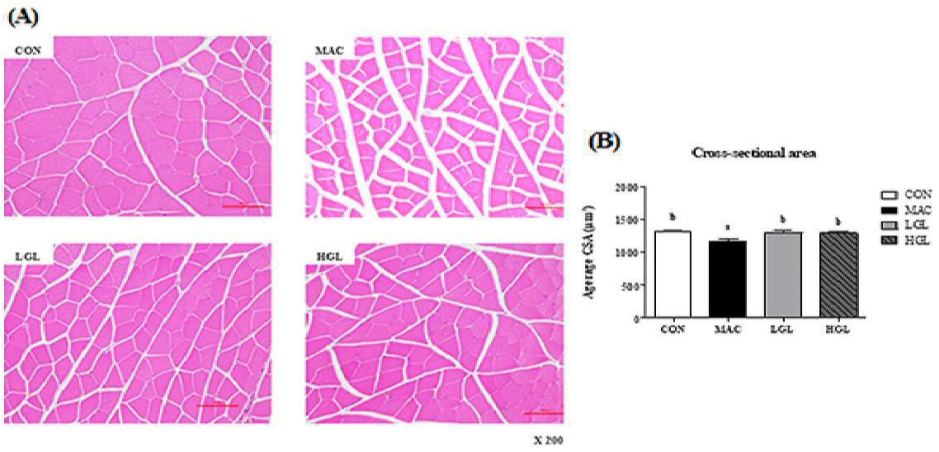
도면1



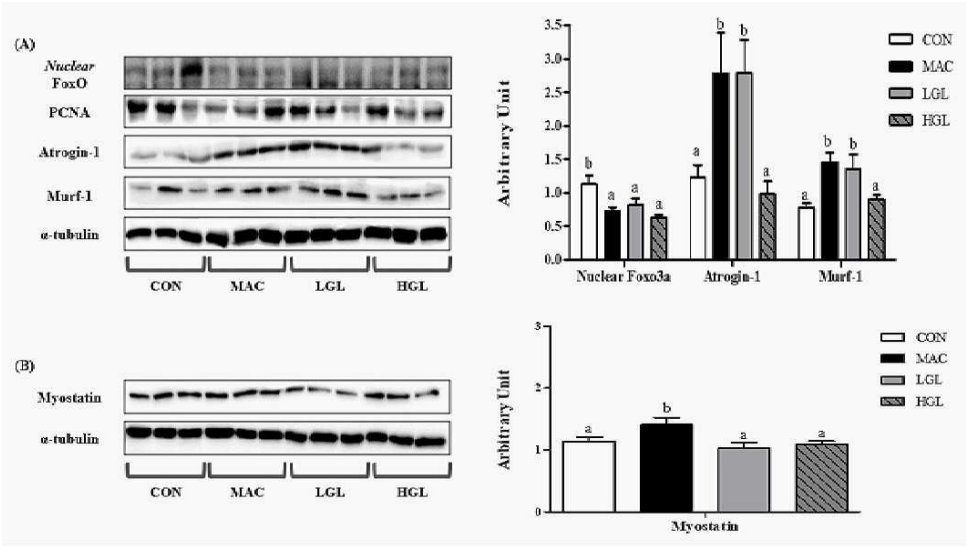
도면2



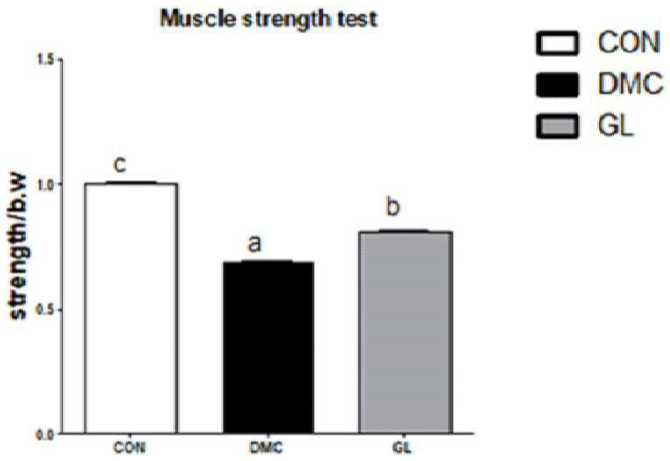
도면3



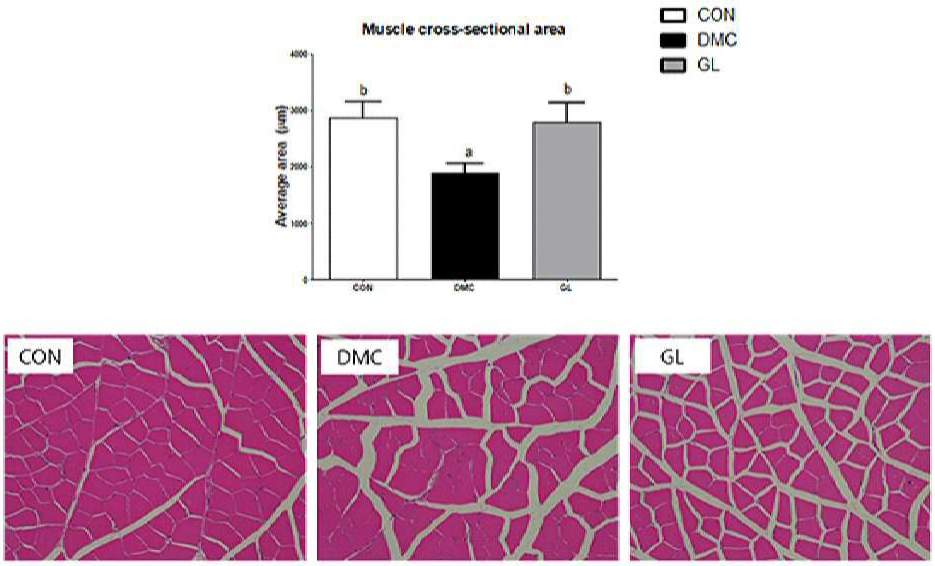
도면4


(A)
Nuclear FoxO
PCNA
Atrogin-1
Murf-1
α-tubulin
CON
MAC
LGL
HGL
Arbitrary Unit
Nuclear Foxo3a
Atrogin-1
Murf-1
(B)
Myostatin
α-tubulin
Myostatin

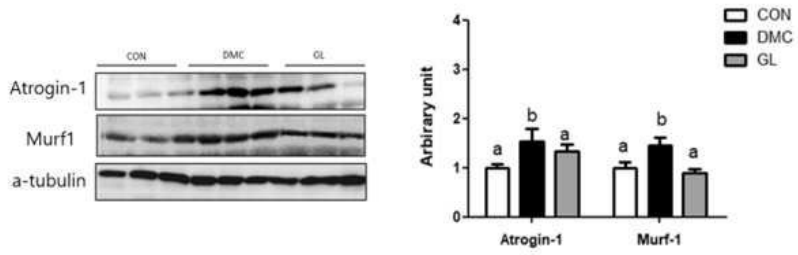
도면5


Muscle strength test
CON
DMC
GL
strength/b.w
CON
DMC
GL

도면6


Muscle cross-sectional area
CON
DMC
GL
Average area (μm)
b
a
b
CON
DMC
GL

도면7


CON
DMC
GL
Atrogin-1
Murf1
a-tubulin
Arbirary unit
Atrogin-1
Murf-1