

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0098884
(43) 공개일자 2020년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/48 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/48 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0016547

(22) 출원일자 2019년02월13일

심사청구일자 2019년02월13일

(71) 출원인

(주)바이오레스베

강원도 춘천시 신북읍 맥국길 173 ()

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

김은지

강원도 춘천시 춘주로 176-22, 105동 1203호 (퇴계동, 쌍용스윗닷홈아파트)

정재인

강원도 춘천시 남산면 햇골길 35

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤진구

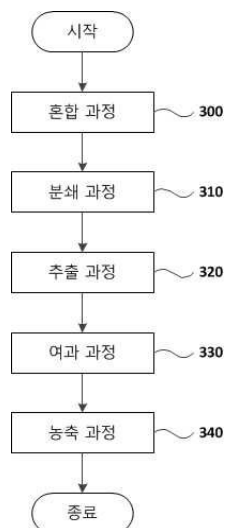
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 항암 및 항전이 효능을 갖는 새싹 땅콩의 추출물 및 그 추출 방법

(57) 요약

본 발명은 항암 및 항전이 효능을 갖는 새싹 땅콩의 추출물 및 그 추출 방법에 관한 것으로, 소정 크기의 새싹 땅콩과 용매를 소정의 비율로 혼합하는 과정과; 혼합물을 분쇄하는 과정과; 추출 온도 45~80℃에서 60~120분간 환류 추출 방법을 통해 분쇄된 혼합물로부터 추출물을 추출하는 과정과; 추출물로부터 여액을 모으기 위해 여과지를 이용하여 여과하는 과정과; 여액을 농축하는 과정을 포함하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자

류원석

강원도 춘천시 서면 영서로 3854-5

안성찬

강원도 춘천시 방송길 70 롯데캐슬 106-3804

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A6A3A01075809

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야학문 후속세대양성 박사후 국내연수

연구과제명 다양한 생리활성 성분을 함유한 새싹땅콩추출물의 항암기전 연구: 항염증과 항전이 작용을
중심으로

기 여 율 1/5

주관기관 한림대학교

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

새싹 땅콩 추출방법에 있어서,

소정 크기의 새싹 땅콩과 용매를 소정의 비율로 혼합하는 과정과;

상기 혼합물을 분쇄하는 과정과;

추출 온도 45~80℃에서 60~120분간 환류 추출 방법을 통해 상기 분쇄된 혼합물로부터 추출물을 추출하는 과정과;

상기 추출물로부터 여액을 모으기 위해 여과지를 이용하여 여과하는 과정과;

상기 여액을 농축하는 과정을 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 혼합하는 과정은 상기 새싹 땅콩과 상기 유기 용매를 1:5, 1:10 또는 1:15(w/v)의 비율 중 어느 하나로 혼합하는 과정을 포함하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 여과하는 과정은 여과지를 이용하여 감압 여과를 진행하며,

여과 과정에서 남은 잔사를 이용하여 상기 추출하는 과정 및 상기 여과하는 과정을 복수회 진행하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 혼합하는 과정은 굵기 0.4~0.5mm, 전체 길이 8~9cm의 새싹 땅콩을 소정의 크기로 절단하여 혼합하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 혼합하는 과정은 온도 24~30℃, 상대습도 85% 이상에서 110~130분 간격으로 3~4분 동안 안개 상태로 살수하여 재배되는 새싹 땅콩을 이용하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항의 방법에 의해 얻은 추출물을 250~1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함하는 식품학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 새싹 땅콩의 추출물 및 그 추출 방법에 관한 것으로, 폴리페놀 및 레스베라트롤 등과 같은 물질을 다량 함유하여 항암 및 항전이 효능을 갖는 새싹 땅콩의 추출물 그 추출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 암전이(metastasis)는 암환자의 예후를 결정하는 주요 요인으로 현재의 고도로 발달된 의술로도 전이된 암의 완치가 거의 불가능하여 암전이는 암환자 사망의 주요 원인으로 지목되고 있다. 종양이 성장하기 위해서는 신생혈관생성을 통한 산소와 영양소의 공급 및 대사물의 운반이 필요하며 신생혈관생성은 종양세포가 전이되는 루트를 제공하기 때문에 신생혈관생성을 억제하면 종양의 성장과 암전이를 억제할 수 있다.
- [0004] 역학조사에 의하면 채소, 과일, 향신료, 차 등을 섭취하면 대사증후군(metabolic syndrome), 제2형 당뇨병, 심혈관질환, 암에 걸릴 위험이 감소하는 것으로 나타났다. 일 예로, 베리에 포함된 레스베라트롤(resveratrol), 안토시아니딘(anthocyanidine), 녹차의 카테킨(catechin), 강황의 커큐민(curcumin), 콩의 게니스테인(genistein), 토마토의 라이코펜(lycopene), 양파의 퀘르세틴(queracetin) 등이 다양한 기전을 통하여 암의 발생 및 진행을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.
- [0005] 암화는 장기간에 걸쳐 진행되므로 장기간 투여할 암예방 물질은 독성이 없어야 하기 때문에 식품에 들어있는 피토케미칼(phytochemical)을 이용하여 정상세포의 암화과정을 억제, 지연 또는 역전시켜 암에 대한 위험을 줄이려는 화학적 암예방(chemoprevention)이 많은 관심을 갖고 활발한 연구가 진행 중이다. 따라서 암의 진행 또는 암전이를 억제하는 피토케미칼들의 탐색 및 그 기전에 대한 연구는 암을 예방하기 위해서 매우 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 항암 및 항전이 효능을 갖는 새싹 땅콩의 추출물 및 그 추출 방법에 관한 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명은 항암 및 항전이 효능을 갖는 새싹 땅콩의 추출물을 포함하는 식품학적 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 소정 크기의 새싹 땅콩과 용매를 소정의 비율로 혼합하는 과정과; 상기 혼합물을 분쇄하는 과정과; 추출 온도 45~80℃에서 60~120분간 환류 추출 방법을 통해 상기 분쇄된 혼합물로부터 추출물을 추출하는 과정과; 상기 추출물로부터 여액을 모으기 위해 여과지를 이용하여 여과하는 과정과; 상기 여액을 농축하는 과정을 포함하는 새싹 땅콩의 추출 방법에 관한 것이다.
- [0011] 여기서, 혼합하는 과정은 상기 새싹 땅콩과 상기 유기 용매를 1:5, 1:10 또는 1:15(w/v)의 비율 중 어느 하나로 혼합하는 과정을 포함할 수 있다.
- [0012] 또한, 여과하는 과정은 여과지를 이용하여 감압 여과를 진행하며, 여과 과정에서 남은 잔사를 이용하여 상기 추출하는 과정 및 상기 여과하는 과정을 복수회 진행할 수 있다.
- [0013] 또한, 혼합하는 과정은 굵기 0.4~0.5mm, 전체 길이 8~9cm의 새싹 땅콩을 소정의 크기로 절단하여 혼합할 수 있다.
- [0014] 또한, 혼합하는 과정은 온도 24~30℃, 상대습도 85% 이상에서 110~130분 간격으로 3~4분 동안 안개 상태로 살수하여 재배되는 새싹 땅콩을 이용할 수 있다.
- [0015] 한편, 본 발명은 앞서 살펴본 새싹 땅콩 추출 방법을 이용하여 얻은 추출물을 250~1000 µg/mL의 농도로 포함하는 식품학적 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명은 최적화된 새싹 땅콩의 재배 방법 및 그러한 방법으로 재배된 새싹 땅콩의 최적화된 추출 방법을 통해 향암 및 항전이 효능이 뛰어난 추출물을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명은 새싹 땅콩으로부터 추출된 추출물을 포함하는 식품학적 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 새싹 땅콩의 재배 방법을 설명하기 위한 순서도.
 도 2는 본 발명의 일 실시예에 의한 새싹 땅콩의 발아 과정을 설명하기 위한 도면.
 도 3은 본 발명의 일 실시예에 의한 새싹 땅콩의 추출 방법을 설명하기 위한 순서도.
 도 4 는 본 발명의 일 실시예에 의한 새싹 땅콩 추출물의 효능을 실험하기 위한 방법을 설명하기 위한 도면.
 도 5 내지 도 9는 본 발명의 일 실시예에 의한 새싹 땅콩 추출물의 효능을 설명하기 위한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명의 실시예를 도면과 함께 상세히 설명한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단된 경우 그 상세한 설명은 생략한다.
- [0022] 땅콩은 안전하게 섭취되는 식품 중의 하나로 땅콩을 발아하여 얻은 새싹땅콩은 땅콩에 비해 다량의 아미노산, 지방산 및 항산화 물질을 함유하고 있으며, 발아시 의 함량이 크게 증가한다. 일 예로, 새싹땅콩 추출물에는 레스베라트롤을 비롯하여 다양한 종류의 유리 아미노산과 카테킨 갈레이트(cathechin gallate), 에피카테킨 갈레이트(epicatechin gallate), 에피카테킨(epicatechin), 갈산(gallic acid), 프로토크테추산(protocatechuic acid), 페놀산(feulic acid), 카페익산(caffeic acid), 쿠마르산(Coumaric acid) 및 에피갈로카테킨(epigallocatechin) 등의 폴리페놀을 함유하고 있다. 이러한 물질은 향암 및 항전이 효과가 매우 뛰어난 것으로 나타나고 있다.
- [0023] 본 발명은 향암 및 항전이 물질을 새싹 땅콩으로부터 추출하여 이용하기 위한 것으로 새싹 땅콩의 재배 과정을 살펴본 후 추출 과정을 살펴보도록 한다.
- [0025] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 새싹 땅콩의 재배 방법을 설명하기 위한 순서도이다.
- [0026] 도 1을 참조하면, 본 발명의 새싹 땅콩의 재배 방법은 선별 과정(100), 보관 과정(110), 세척 과정(120), 건조 과정(130), 재배 과정(140) 및 출하 과정(150)을 포함한다.
- [0027] 선별 과정(100)은 발아시킬 땅콩 종자를 선별하는 과정으로 조건부 선별 공간에서 선별할 수 있다. 일 예로 조건부 선별 공간은 내부온도 20~25℃, 상대습도 40~50%를 유지하고 통풍과 음영이 확보된 공간일 수 있다.
- [0028] 보관 과정(110)은 선별된 땅콩 종자가 썩거나 부패 또는 초기 발아를 방지하기 위해 소정의 조건이 만족된 공간에서 보관한다. 일 예로 선별된 종자는 3~7℃로 보온·보냉이 유지되는 저온 창고에서 보관할 수 있다.
- [0029] 세척 과정(120)은 땅콩 종자에 묻어 있는 흙, 먼지, 땅콩씨앗피 또는 이물질을 세척하는 과정으로, 땅콩 종자를 세척통에 넣어 깨끗한 지하수로 세척할 수 있다.
- [0030] 건조 과정(130)은 세척된 땅콩 종자를 건조하는 과정으로, 일 예로 적정 건조 함수비를 종자의 수분량과 건조 중량 대비하여 5~15%가 되도록 건조한다.
- [0031] 재배 과정(140)은 땅콩 종자를 발아시키는 과정으로, 일 예로 땅콩 종자를 소정의 투수성 배지 위에 건조 상태로 얹어놓고 10 μ m의 안개상태로 하여 배지 위에 소정시간 고압 살수하는 과정으로 진행할 수 있다. 재배 과정에

서는 땅콩이 새싹으로 변하면서 피를 제거하며 살수 반경의 중복으로 사각이 없게함으로써 생육환경의 살수량을 조절하며 발아율을 높일 수 있다. 재배 환경은 온도 24~30℃, 상대습도 85% 이상 유지하여 배축을 성장시키며, 안개 상태로 살수하는 과정은 3~4분 정도로, 약 110~130분 간격으로 진행할 수 있다.

[0032] 미세한 안개 형태를 고압살수로 투수성 배지 위에 소정시간 간격으로 살수하여 배지 위의 땅콩에 수분 및 양분을 공급할 수 있으며, 생육상황에 따른 주위 온도 및 습도를 확보하여 땅콩을 과잉수분에 접한 상태가 되지 않고 적당한 수분 및 온도와 습도를 적당히 유지하도록 할 수 있다. 이로 인해 호기성 잡균이 발생하기 어려운 환경을 만들고 온도관리를 통해 생육을 빠르게 하면서 부패와 곰팡이 세균류의 발생과 번식을 억제할 수 있으며 과중부터 출하하기까지의 기간을 단축할 수 있다.

[0033] 출하 과정(150)은 소정의 크기로 성장한 새싹 땅콩을 출하하는 과정으로 일 예로, 몸체 굵기 0.4 ~ 0.5mm, 전체 길이 8~9cm가 되면 출하할 수 있다.

[0035] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 의한 새싹 땅콩의 발아 과정을 설명하기 위한 도면이다.

[0036] 도 2를 참조하면, 땅콩 종자의 발아를 시작하면 5일차 정도되면 출하 가능하며, 1일차, 2일차, 3~4일차 및 5일차 등 시간이 지날수록 땅콩 종자로부터 발아된 새싹 땅콩의 길이 및 굵기가 출하 상태로 성장함을 알 수 있다.

[0038] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 의한 새싹 땅콩의 추출 방법을 설명하기 위한 순서도이다.

[0039] 도 3을 참조하면, 본 발명의 새싹 땅콩의 추출 방법은 혼합 과정(300), 분쇄 과정(310), 추출 과정(320), 여과 과정(330) 및 농축 과정(340)을 포함한다.

[0040] 혼합 과정(300)은 새싹 땅콩과 용매를 소정의 비율로 혼합하는 과정이다. 이때, 용매는 증류수 또는 유기 용매를 이용할 수 있으며, 유기 용매는 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol) 등을 이용할 수 있다. 일 예로, 새싹 땅콩을 소정의 크기로 절단한 후 새싹 땅콩과 유기용매를 1:5, 1:10, 또는 1:15 (w/v)의 비율로 혼합한다.

[0041] 분쇄 과정(310)은 혼합물을 분쇄하는 과정으로, 일 예로 분쇄기(blender)를 이용하여 2분간 분쇄할 수 있다.

[0042] 추출 과정(320)은 분쇄된 혼합물로부터 추출물을 추출하는 과정으로, 일 예로 워터 배스(water bath)를 이용하여 추출 온도 45 ~ 80℃ 온도에서 60 ~ 120분간 환류 추출을 진행한다.

[0043] 여과 과정(330)은 추출물을 여과하여 여액을 모으는 과정으로, 일 예로 추출물을 여과지를 이용하여 감압 여과 후 여액을 모을 수 있으며, 여과지는 Whatman No. 1을 이용할 수 있다. 여과 과정에서 남은 잔사는 다시 추출 과정을 거칠 수 있으며, 이러한 과정은 3~4회 정도 진행하는 것이 바람직하다.

[0044] 농축 과정(340)은 감압 여과기를 이용하여 여액을 농축하는 과정으로, 일 예로 40~45℃ 정도의 온도에서 진행한다.

[0046] 도 4 는 본 발명의 일 실시예에 의한 새싹 땅콩 추출물의 효능을 실험하기 위한 방법을 설명하기 위한 도면이다.

[0047] 본 발명의 새싹 땅콩 추출물은 항암 및 항전이 효능을 제공하며, 이러한 효능을 살펴보기 위해 다음과 같은 실험을 진행하였다.

[0049] [4T1 세포에서 새싹 땅콩 추출물의 항전이 효능 조사 (in vitro study)]

[0050] 1. 세포 배양

[0051] 마우스(mouse)의 유선에서 유래한 암세포인 4T1 세포는 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene)에 10% FBS, 1% p/s를 첨가한 세포배양액을 사용하여 37℃ 습윤한 CO₂ 배양기 (5% CO₂/ 95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양 접시의 80% 정도 차면 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어내고 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA를 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

- [0052] 2. MTT assay
- [0053] 24-well plate에 4T1 세포를 5×10^4 cells/well로 분주한 후 24시간 배양하였다. 세포를 24시간 배양한 후 다양한 농도의 새싹땅콩 추출물을 함유한 배양액으로 세포 배양액을 교환하여 24시간 또는 48시간 배양한 후 MTT assay 방법을 실시하여 살아있는 세포수를 측정하였다.
- [0054] 3. Migration assay
- [0055] $8 \mu\text{m}$ pore size의 polyvinylpyrrolidone (PVP)-free polycarbonate filter를 가진 trans-well cell culture chamber를 이용하여 4T1 세포의 이동을 조사하였다. 먼저 filter의 아래쪽을 type I collagen $10 \mu\text{g}$ 으로 미리 코팅하여 준비하였으며, 4T1 세포와 새싹땅콩 추출물을 trans-well cell culture chamber의 윗부분에 첨가하고 세포의 이동을 유도하기 위해서 10% hormone-free, gelatinase-free FBS를 포함한 DMEM을 아랫부분에 첨가한 후, 37°C 에서 16시간 배양하였다. 세포를 배양한 후 이동하지 않은 세포는 면봉으로 제거하고 polycarbonate membrane을 통해 이동한 세포는 ① hematoxylin-eosin으로 염색 후 광학현미경 (Carl Zeiss)을 사용하여 이동된 세포를 관찰하거나, ② cell stain solution 으로 염색 후 extraction solution으로 염색약을 용출하여 560 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 암세포의 이동을 정량화하였다.
- [0056] 4. Invasion assay
- [0057] Basement membrane matrix solution으로 코팅된 $8 \mu\text{m}$ pore size의 polycarbonate membrane insert를 가진 CytoSelect™ 24-well cell invasion assay kit (Cell Biolabs, Inc.)을 사용하여 위의 migration assay와 같은 방법으로 invasion assay를 수행하였다.
- [0059] **[4T1 orthotopic tumor model에서 새싹 땅콩 추출물의 항종양 및 항전이 효능 조사 (in vivo study)]**
- [0060] 1. 세포 배양
- [0061] 마우스의 유선에서 유래한 암세포인 4T1 세포는 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene)에 10% FBS, 1% p/s를 첨가한 세포배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO_2 배양기 (5% CO_2 / 95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양 접시의 80% 정도 차면 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어내고 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA를 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.
- [0062] 2. 동물 사육
- [0063] 5주령의 암컷 BALB/c 마우스는 1주 적응 후 실험에 사용하였다. 실험 동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기회수 10-15 회/시간, 조명시간 12시간 (08:00 - 20:00), 조도 150-300 Lux로 설정된 사육환경에서 사육하였다. 시험 전 기간 실험 동물은 실험 동물용 고형사료((주) 카길애그리퓨리나)와 음수를 자유 섭취하도록 하였다.
- [0064] 3. 4T1 orthotopic model
- [0065] 4T1 세포(1×10^5 cells/ $100 \mu\text{L}$ PBS)를 마우스 유방의 지방 패드 (mammary fat pad)에 주사하여 고형암을 유도한 후, 종양 크기가 약 30 mm^3 되었을 때 난피법에 의거하여 3개의 시험군으로 분류하였음. 도 4에 도시된 바와 같이 (G1) 대조군; (G2) 새싹 땅콩 추출물 30 mg/kg body weight (BW); (G3) 새싹 땅콩 추출물 60 mg/kg BW 투여군으로 분류하였고, 시험 군은 각 10마리의 실험 동물을 사용하였다.
- [0066] 새싹 땅콩 추출물은 시험군 분리 시점을 1일로 하여 시험 종료 시점까지 증류수에 녹여 3주 (21일) 동안 일정 시간에 경구 투여하였다. 실험 동물의 체중은 새싹 땅콩 추출물 투여일부터 1주에 1회 일정한 시간에 체중을 측정하였고, 종양의 부피는 3일 간격으로 디지털 캘리퍼스(caliper)를 사용하여 종양의 장축(length)과 단축(width)을 측정한 후 계산식 $[\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = (\text{width}^2 \times \text{length})/2]$ 에 대입하여 종양의 부피를 계산하였다. 마우스를 희생하여 혈액을 취한 후, 종양, 간, 폐, 비장의 장기를 적출하여 무게를 측정하였는데, 간과 폐는 Bouin's solution으로 고정한 후, 간과 폐로 전이된 tumor nodule을 관찰하여 전이를 조사하였다.
- [0068] 도 5 내지 도 9는 본 발명의 일 실시예에 의한 새싹 땅콩 추출물의 효능을 설명하기 위한 도면이다. 앞서 설명

한 본 발명의 새싹 땅콩 추출물은 항암 및 항전이 효능을 살펴보기 위한 실험 결과는 도 5 내지 도9에서 나타내었다.

- [0069] 도 5는 새싹 땅콩 추출물이 4T1 세포의 증식에 미치는 영향을 설명하기 위한 도면이다.
- [0070] 새싹 땅콩 추출물이 유방암 유래 4T1 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 배양액에 다양한 농도(0~1000 $\mu\text{g/mL}$)의 새싹 땅콩 추출물을 처리하여 24시간, 48시간 배양한 후 MTT assay를 실시하여 살아있는 세포수를 측정하였다. 새싹 땅콩 추출물을 처리하지 않은 경우, 시간이 경과에 따라 살아있는 세포수가 증가하는 정상적인 세포증식을 나타내었으며, 24시간에서는 새싹 땅콩 추출물 처리시 세포의 생존능력이 약간 증가하였으나, 48시간에는 새싹 땅콩 추출물의 농도가 증가할수록 세포증식이 유의적으로 감소하였다. 도 5에서 각각의 바(bar)는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (n=4)를 나타내며, a 내지 d 등 문자가 없는 부분은 다를 수 있다($P<0.05$)
- [0072] 도 6은 새싹 땅콩 추출물이 4T1 세포의 이동 및 침윤에 미치는 영향을 설명하기 위한 도면이다.
- [0073] 새싹 땅콩 추출물이 암세포의 전이 과정 중 암세포의 이동 (migration)에 미치는 영향을 조사하였다. 4T1 세포의 이동시간을 고려한 24시간 이내에 새싹 땅콩 추출물을 처리는 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 세포에 독성을 나타내지 않았으므로, trans-well cell culture chamber의 윗부분에 4T1 세포와 0, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 새싹 땅콩 추출물을 첨가하여 16시간 동안 배양한 후 이동한 세포를 염색하여 조사하였다. (A)에 도시된 바와같이 4T1 세포에 새싹 땅콩 추출물의 처리는 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서부터 유의적으로 세포이동이 억제되었고, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 처리에 의해 세포 이동이 약 60% 억제되었다.
- [0074] 암세포가 전이하기 위해서는 많은 과정을 거쳐야 하며, 그 중 이동된 암세포가 새로운 조직에 부착하고 침윤하는 과정이 필수적으로 포함된다. 따라서 새싹땅콩추출물이 암세포의 침윤에 미치는 영향을 조사하였다. Basement membrane matrix가 코팅되어 있는 trans-well cell culture chamber를 사용하여 세포 이동 평가 (migration assay)와 동일한 방법으로 세포의 침윤을 조사하였다. (B)에 도시된 바와같이 Invasion assay 결과 새싹 땅콩 추출물의 농도가 증가할수록 침윤을 유의적으로 억제하였다. 이는 새싹 땅콩 추출물이 4T1 세포의 이동과 침윤을 효과적으로 억제한다는 것을 나타낸다. 도 6에서 EPS(extract of the peanut sprout
- [0075])는 새싹 땅콩 추출물을 의미하며, 각각의 바(bar)는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (n=3)를 나타내며, a 내지 c 등 문자가 없는 부분은 다를 수 있다($P<0.05$)
- [0077] 도 7은 4T1 orthotopic tumor model에서 새싹 땅콩 추출물의 항종양 및 항전이 효능을 설명하기 위한 도면이다.
- [0078] In vitro 실험으로 관찰한 새싹 땅콩 추출물의 전이 억제 효과를 in vivo 실험에서 확인하고자 하였다. 유방암 (4T1)의 증식 및 전이에 미치는 영향을 조사하기 위해 6주령된 암컷 BALB/c mouse의 mammary fat pad에 4T1 세포 (1×10^5 cells/mouse)를 주사하여 고형암을 유도한 후, 종양 크기가 약 30 mm^3 되었을 때 3개의 시험군 ((G1) 대조군; (G2) 새싹 땅콩 추출물 30 mg/kg body weight (BW); (G3) 새싹 땅콩 추출물 60 mg/kg BW)으로 분류하여 21일간 경구 투여하였다. 실험 동물의 체중을 주1회 측정하였고, 그 결과 새싹 땅콩 추출물의 투여는 마우스의 체중에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 도 7에서 마우스의 체역의 각 포인트는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (n=10)를 나타낸다.
- [0080] 도 8은 새싹 땅콩 추출물의 종양의 성장에 미치는 영향을 설명하기 위한 도면이다.
- [0081] 새싹 땅콩 추출물이 유방암의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 종양의 부피 및 무게를 측정하였다. 종양의 크기가 약 30 mm^3 일 때 시험군을 분류하여 시험물질 투여를 시작하였고, 시험물질 투여 시작일부터 3일 간격으로 종양의 부피를 측정하였다. (A) 및 (B)에 도시된 바와같이 0 mg/kg EPS를 투여한 그룹과 비교하여 60 mg/kg EPS를 투여한 그룹의 tumor volume이 감소함을 알 수 있으며, 마우스 희생시 측정된 종양 무게는 새싹 땅콩 추출물 투여에 의해 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있다. 도 8에서 각각의 바(bar)는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (n=10)를 나타내며, a , b 등 문자가 없는 부분은 다를 수 있다($P<0.05$)

[0083] 도 9는 새싹 땅콩 추출물의 암의 전이에 미치는 영향을 설명하기 위한 도면이다.

[0084] 4T1 세포를 주사한 BALB/c mouse에서 새싹 땅콩 추출물이 암의 전이에 미치는 영향을 조사하기 위해 폐를 적출하여 Bouin's 용액에 담가 고정한 후, 폐로 전이된 tumor nodule의 수를 측정하고 부피를 계산하였으며 그 결과를 도 9에 나타내었다. 0 mg/kg 새싹 땅콩 추출물을 투여한 군에서 폐로 전이된 tumor nodules 수는 45.7 ± 5.4 였고, 30 mg/kg, 60 mg/kg의 새싹 땅콩 추출물을 투여한 군에서는 각각 32.6 ± 3.0 , 27.5 ± 2.1 로 새싹 땅콩 추출물 투여에 폐로 전이된 tumor nodules 수가 유의적으로 감소하였다. 도 9에서 각각의 바(bar)는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (n=10)를 나타내며, a, b 등 문자가 없는 부분은 다를 수 있다(P<0.05)

[0086] 지금까지 살펴본 실험을 위해 실험동물을 희생하여 측정한 장기 무게를 [표 1]에 나타내었다. 간, 폐, 비장의 무게가 새싹 땅콩 추출물의 투여 농도가 높아짐에 따라 감소하였지만 유의적인 차이는 없는 것을 알 수 있다. 표 1에서 값은 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (n=10)을 나타낸다.

표 1

	0 mg/kg EPS	30 mg/kg EPS	60 mg/kg EPS
Liver weight (g)	1.029 ± 0.020	1.006 ± 0.025	0.996 ± 0.018
Lung weight (g)	0.187 ± 0.006	0.185 ± 0.005	0.175 ± 0.004
Spleen weight (g)	0.542 ± 0.014	0.530 ± 0.026	0.506 ± 0.025

[0089] 한편, 본 발명의 상세한 설명에서는 구체적인 실시 예에 관해 설명하였으나, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않는 한도 내에서 여러 가지 변형이 가능함은 물론이다.

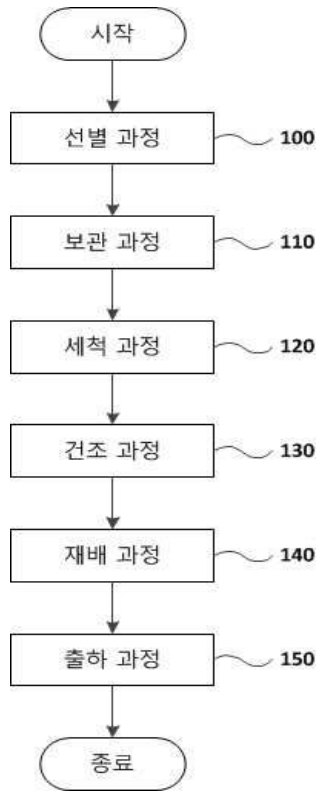
[0090] 그러므로 본 발명의 범위는 설명된 실시 예에 국한되지 않으며, 후술되는 특허청구의 범위뿐만 아니라 이 특허청구의 범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

부호의 설명

[0092] 300: 혼합 공정 310: 분쇄 공정
320: 추출 공정 330: 여과 공정
340: 농축 공정

도면

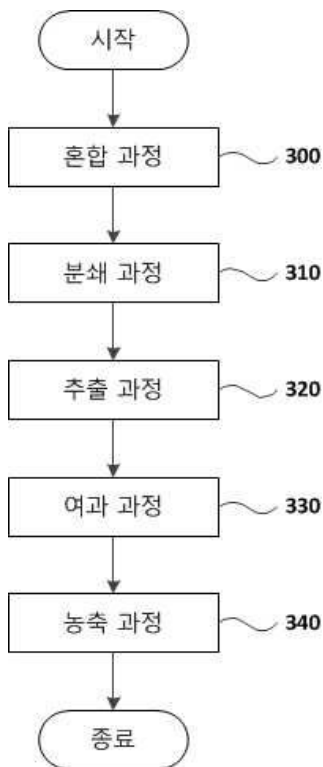
도면1



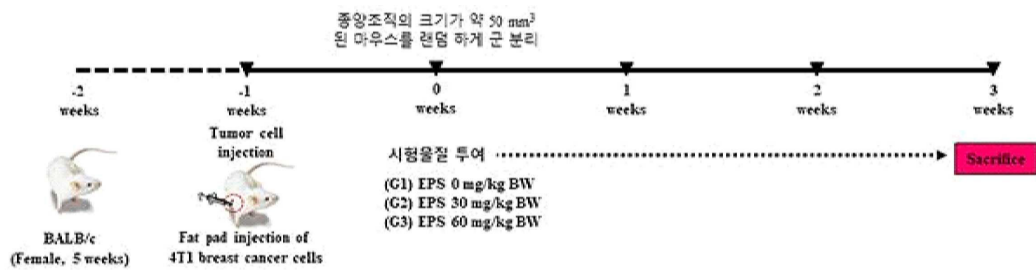
도면2



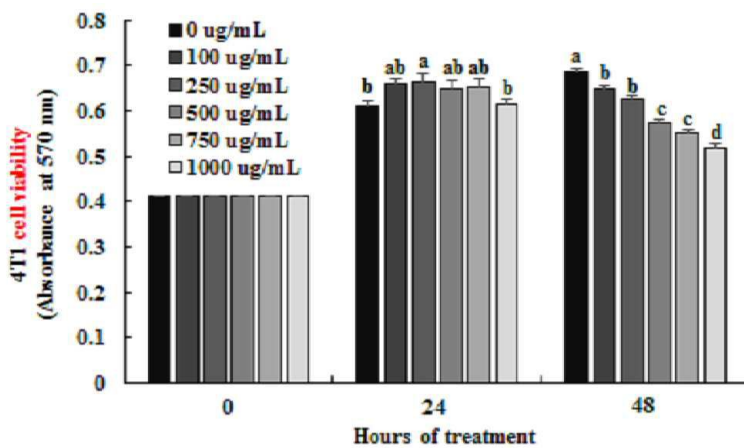
도면3



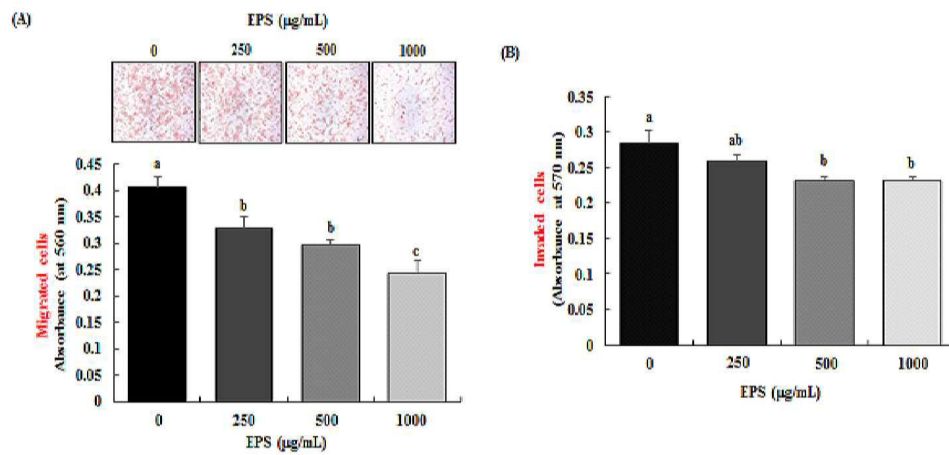
도면4



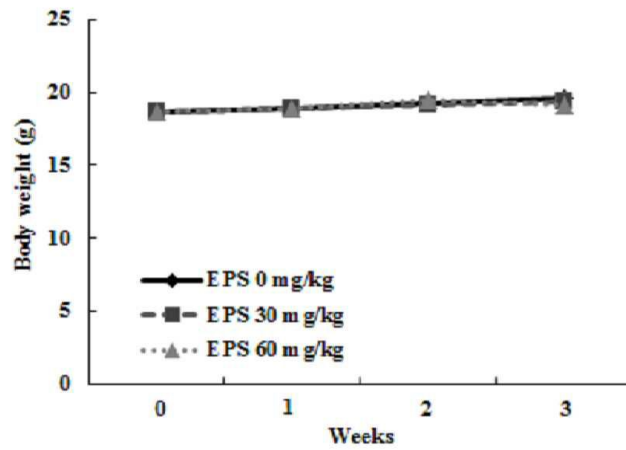
도면5



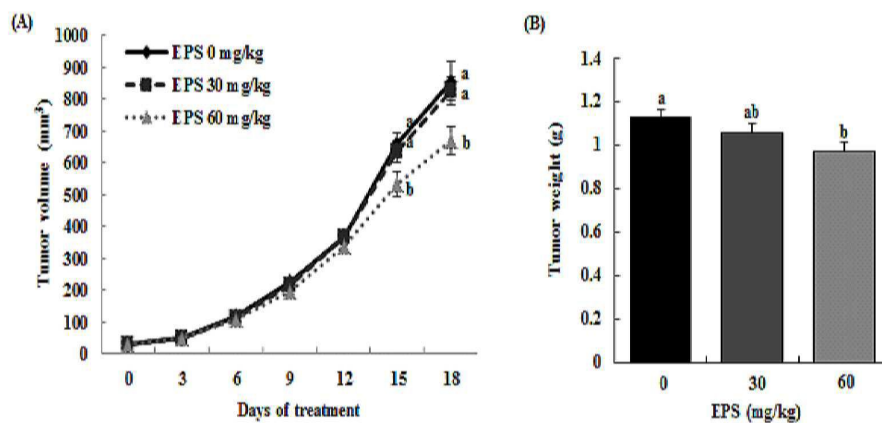
도면6



도면7



도면8



도면9

