

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0099875 (43) 공개일자 2016년08월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 36/185</i> (2006.01) <i>A23L 1/30</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>A61K 36/185</i> (2013.01) <i>A23L 1/3002</i> (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0022110 (22) 출원일자 2015년02월13일 심사청구일자 없음	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교) (72) 발명자 고광석 서울특별시 마포구 양화로 45, 103동 2704호 (서교동, 메세나폴리스) 송영선 경상북도 포항시 남구 대이로 100, 103동 1003호 (대잠동, 이동현대홈타운아파트) (뒷면에 계속) (74) 대리인 안소영

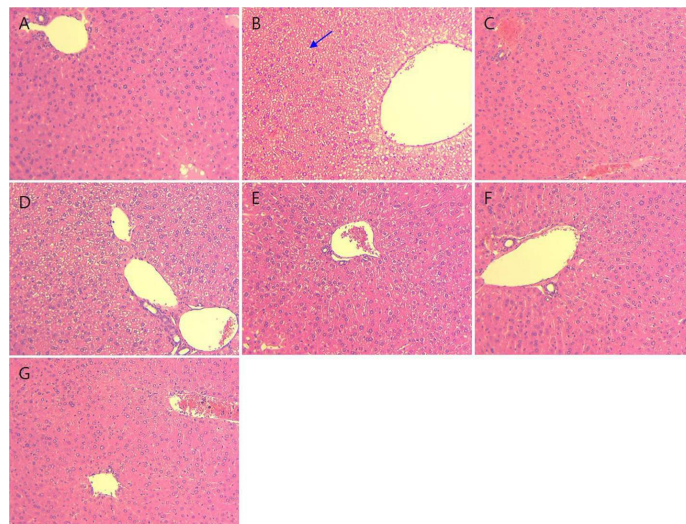
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 간 보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 으름 열매 추출물을 유효성분으로서 포함하는 간 보호용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 알코올로 유발된 급성 간독성 상태에서 간 조직내 지방의 축적을 완화 하고, 혈청 AST, ALT 수치를 개선하며, 간조직내 항산화 물질인 GSH의 농도를 증가시키며 활성산소기를 생성하는 NOX4의 mRNA 발현을 억제하고 염증 반응 지표인 TNF- α 의 mRNA도 억제함으로써 알코올로 유발된 산화 스트레스, 염증 반응에 대한 간 보호 효과를 나타낸다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이서연

서울특별시 관악구 남현6길 31, 5층 (남현동)

김소영

강원도 춘천시 효자로 85, 3동 202호 (효자동, 신
동아아파트)

이상훈

경기도 과천시 별양로 164, 731동 406호 (부림동,
주공아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545007671

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 으름의 간 보호 기능 메커니즘 구명

기 여 율 1/1

주관기관 (주)우리술

연구기간 2012.12.18 ~ 2015.12.17

명세서

청구범위

청구항 1

으름 열매 추출물을 유효성분으로서 포함하는 간 보호용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 간 질환을 예방 또는 개선하는 것인, 간 보호용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 간 질환은 알코올성 간 손상 질환인, 간 보호용 조성물.

청구항 4

으름 열매 추출물을 유효성분으로서 포함하는 간 보호용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간 보호용 조성물에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 으름 열매 추출물을 유효성분으로서 포함하는 간 보호용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알코올은 현대인의 스트레스 해소를 위해 소비가 급증하고 있는 추세에 있다. 하지만, 다량의 알코올을 섭취하면서 알코올성 간손상, 예컨대 숙취로 인한 메스꺼움, 구토, 현기증, 갈증, 무기력, 두통, 근육통 등의 증상이 야기되고 이는 업무 능률 저하로 인한 사회 경제적 손해를 초래하고 있다(Swift R, Davidson D, Alcohol hangover: mechanisms and mediators. Alcohol Health Res World, 22(1):54-60, 1998).

[0003] 따라서, 간 보호, 특히 알코올로 유발된 급성 간독성 상태에서 간 보호에 효과적인 조성물의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Swift R, Davidson D, Alcohol hangover: mechanisms and mediators. Alcohol Health Res World, 22(1):54-60, 1998

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 알코올로 인한 급성 간독성 상태에서 우수한 간보호 효과를 가지는 조성물을 찾고자 노력한 결과 으름 열매 추출물이 알코올로 유발된 급성 간독성 상태에서 간 조직내 지방의 축적을 완화 하고, 혈청 AST, ALT 수치를 개선하며, 간조직 내 항산화 물질인 GSH의 농도를 증가시키며 활성산소기를 생성하는 NOX4의 mRNA 발현을 억제하고 염증 반응 지표인 TNF- α 의 mRNA도 억제함으로써 알코올로 유발된 산화 스트레스, 염증 반응에 대한 간 보호 효과를 나타냄을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 간 보호, 특히 알코올로 유발된 급성 간독성 상태에서 간 보호에 효과적인 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 으름 열매 추출물을 유효성분으로서 포함하는 간 보호용 조성물을 제공한다.
- [0008] 본 발명에서 으름(*Akebia quinata* Decne)은 으름덩굴과(Lardizabalaceae) 으름속(Akebia)에 속하는 식물이다. 으름은 긴 타원형으로 조금 구부러졌고 길이 3-5 cm, 지름 25-35mm이다. 바깥면은 회갈색-어두운 갈색으로 과피는 쭉그러져 불규칙한 망상의 융기가 있고 끝에는 주두(주두)의 흔적이, 기부에는 과병이 떨어진 둥근 자국이 있다. 질은 단단하고 자른 면은 옅은 황색으로 많은 종자가 들어 있다.
- [0009] 본 발명에서 으름 열매는 자연상태, 반건조, 건조 등의 가공된 마름도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0010] 본 발명에서 으름 열매 추출물은 으름 열매 자체를 그대로 또는 세절 또는 분말 형태로 하여, 통상적인 추출 방법, 예를 들면 열수 추출 또는 유기용매로 추출하여 제조할 수 있다. 또한 본 발명의 으름 열매 추출물은 상기 추출물을 건조시켜 얻어진 건조분말 또는 시판되는 으름 열매 추출물 분말일 수도 있다. 추출물 제조 시에 으름 열매는 건조한 것, 건조하지 않은 것 또는 이들을 서로 혼합한 상태의 것을 사용할 수 있다. 으름 열매 추출물은, 예를 들어, 건조시킨 생약을 세절한 후, 약 3배 내지 1000배 중량의 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매로 실온 내지 60~130℃의 추출온도(예컨대 25℃)에서 약 1시간 내지 10일(예컨대 24 시간) 동안 열수추출, 냉침추출, 초고압 추출 또는 환류냉각 추출 등의 추출방법에 의하여 1회 내지 5회 반복하여 추출한 후, 추출물을 여과, 감압농축 또는 동결건조하여 제조될 수 있다. 상기 실온은 15 내지 25℃를 의미한다. 상기 유기용매로는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산, 디클로로메탄 등을 예시할 수 있다.
- [0011] 본 발명에서 으름 열매 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합용매로 추출된 것일 수 있다.
- [0012] 본 발명에서 간 보호는 예컨대 알코올로 인한 급성 간독성 상태, 예컨대 산화 스트레스, 염증 반응에 대한 간 보호를 의미한다.
- [0013] 본 발명에서 상기 조성물은 간 질환을 예방 또는 개선하는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명에서 예방은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 간독성, 예컨대 알코올로 인한 급성 간 독성을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0015] 본 발명에서 개선은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 간독성, 예컨대 알코올로 인한 급성 간 독성을 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0016] 본 발명에서 상기 간 질환은 알코올성 간 손상 질환일 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 간 보호용 조성물은 으름 열매 추출물 이외에도 간 보호에 효과가 알려져 있는 공지의 천연물 또는 이의 추출물, 또는 활성 기능 물질 등이 더 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0018] 상기 간 보호에 효과가 알려져 있는 공지의 천연물 또는 이의 추출물은 강황(울금), 헛개나무열매, 검은콩, 황금, 구기자, 효모, 냉이, 질경이, 신선초, 쑥, 미나리, 콩나물, 감잎, 갈근, 죽력, 오리나무, 감귤피, 황기, 자리, 가시오가피 또는 이들의 추출물 등일 수 있다.
- [0019] 상기 간 보호에 효과가 알려져 있는 활성 기능 물질은 타우린, L-아스파라긴산, 글루타티온, 니코틴산아미드, 푸마루산, 프로폴리스, 메타오닌, 베타인 등일 수 있다.
- [0020] 상기 간 보호에 효과가 알려져 있는 공지의 천연물 또는 이의 추출물 및 활성 기능 물질의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 1 내지 약 90 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0021] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 으름 열매 추출물을 유효성분으로서 포함하는 간 보호용 건강기능식품을 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 건강기능식품은 2002년 건강기능식품에 관한 법률을 통하여 새롭게 정의된 인체에 대한 기능성 및 안전성이 충분히 확보되어 식품의약품 안전청 식약청 고시 2004-12호에 규정된 건강기능 식품원료 또는 성분 인정에 관한 규정 목록집에 기재된 건강식품임을 특징으로 한다.
- [0023] 상기 간 보호용 건강기능식품은 식품학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함할 수 있다.

- [0024] 본 발명의 으름 열매 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0025] 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 으름 열매 추출물의 양은, 일반적으로 본 발명의 건강식품식품의 경우 전체 식품 중량의 0.01 내지 95 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 80중량%으로 포함될 수 있으며, 건강 음료 조성물의 경우 100ml를 기준으로 0.1 내지 100g의 비율로 포함될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 으름 열매 추출물을 함유하는 것 이외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0027] 상술한 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등 디사카라이드, 올리고당, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0028] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 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, 구연산과 같은 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육, 농축액을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 1 내지 약 90 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에 따른 조성물은 알코올로 유발된 급성 간독성 상태에서 간 조직내 지방의 축적을 완화 하고, 혈청 AST, ALT 수치를 개선하며, 간조직 내 항산화 물질인 GSH의 농도를 증가시키며 활성산소기를 생성하는 NOX4의 mRNA 발현을 억제하고 염증 반응 지표인 TNF- α 의 mRNA도 억제함으로써 알코올로 유발된 산화 스트레스, 염증 반응에 대한 간 보호 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 으름(Akebia quinata; AQ) 열매 추출물 및 에탄올(EtOH) 처리된 마우스 간의 조직학적인 변화를 나타내는 현미경 사진이다. A-G (X 200)는 마우스 간의 H&E 염색을 보여주며 각 군 내에서 임의로 선택된 대피 현미경 사진이다. (A) 대조군, (B) EtOH만 단독 처리한 군(6 mg/kg 체중(B.W)), (C) 으름 열매 추출물만 처리한 군(30 mg/kg B.W), (D) 으름 열매 추출물 (30 mg/kg B.W) 및 EtOH (6 mg/kg B.W) 처리군, (E) 으름 열매 추출물 (100 mg/kg B.W) 및 EtOH (6 mg/kg B.W) 처리군, (F) 으름 열매 추출물 (400 mg/kg B.W) 및 EtOH (6 mg/kg B.W) 처리군, (G) 으름 열매 추출물 (1,000 mg/kg B.W) 및 EtOH (6 mg/kg B.W) 처리군. 파란색 화살표는 지방구(fat drop)를 가리킨다.

도 2는 마우스 간에 있어서의 글루타티온 합성 효소 및 글루타티온(GSH) 농도에 대한 으름(Akebia quinata; AQ) 열매 추출물 및 에탄올의 효과를 나타내는 그래프이다. (A)는 GCML (glutamate-cysteine ligase modifier subunit)의 상대적인 mRNA 발현; (B)는 GCLC (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit)의 상대적인 mRNA 발현; (C)는 GSS (glutathione synthase)의 상대적인 mRNA 발현; 및 (D)는 마우스 간에 있어서의 GSH 수준을 나타내는 그래프이다. 약어: EtOH는 6 mg의 EtOH/kg B.W; AQ는 30 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE1은 EtOH와 함께 30 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE2는 EtOH와 함께 100 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE3은 EtOH와 함께 400 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE4는 EtOH와 함께 1,000 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W를 나타낸다. 서로 다른 윗 첨자(superscript)를 가지는 ^{a-c}평균은 유의하게 다르다 (p<0.05).

도 3은 마우스 간에 있어서의 NOX4(NADPH oxidase 4) 및 TNF- α (tumor necrosis factor-alpha)의 상대적인 mRNA 발현에 대한 으름 열매 추출물의 효과를 보여주는 그래프이다. 약어: EtOH는 6 mg of EtOH/kg B.W; AQ는 30 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE1은 EtOH와 함께 30 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE2는 EtOH와 함께 100 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE3는 EtOH와 함께 400 mg의 으름 추출물/kg B.W; AQE4는 EtOH와 함께

1,000 mg의 으름 추출물/kg B.W을 나타낸다. 서로 다른 윗 첨자(superscript)를 가지는 ^{a-c}평균은 유의하게 다르다($p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

제조예. 으름 열매 추출물의 제조

으름 열매는 2013년 3월-4월 전라남도 지리산 지역에서 채취하여 추출에 이용되었다. 건조된 으름의 열매 1,000 g를 증류수 4 L와 혼합하여 섞어 shaking incubator (SI-600, Lab Companion, Daejeon, Korea)에 25℃, 24시간 진탕한 후 여과지로 여과하여 증류수에 대한 분획물을 얻었다. 이를 rotary vacuum evaporator (R-114, Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland)로 감압 농축 하였다. 농축된 시료를 -70℃ 초저온냉동고(DF8715, Ilshin Co., Seoul, Korea)에 1시간 냉동시킨 후 동결건조기(FDS8508, Ilshin Co., Seoul, Korea)에 동결건조 하여 최종 으름 열매 추출물 110 g을 얻어 11%(w/w)의 수율을 나타내었다.

실시예. 으름 열매 추출물의 간 보호 효과 확인

1. 실험방법

실험동물 및 시료채취

5주령 C57BL/6 수컷 생쥐 (중양실험동물, Korea)를 1주일간 일정한 조건(기온 25±3℃, 습도 50%, 명암주기 12시간)에 적응시킨 후 체중이 22-25 g 범위의 동물을 본 실험에 사용하였으며 상품화된 실험용 생쥐 사료(22GJ30060, Cargill Agri Purina, Inc., Seongnam, Korea)와 음용수 (1차 증류수)를 자유급여 하였다. 생쥐 5마리를 1군으로 표 1 같이 무작위 배치 하였다. 동일한 위관 강제투여의 스트레스를 부여하기 위해 대조군과 알코올 처리군은 증류수 0.1 mL/일(day)를 투여하고 으름 열매 추출물은 30-1,000 mg/kg 체중(body weight; BW) 용량으로 매일 일정한 시간에 1주일간 위관강제투여를 하였다. 급성 알코올성 간독성을 유발하기 위해 으름 추출물처리 마지막 날의 으름 최종 투여 6시간 후 6 mg/kg 체중(BW) 용량의 에탄올을 상응하는 군들에 위관강제투여 하였다. 모든 실험동물은 에탄올 처리 시점부터 18시간 후 희생하여 생체시료를 취하였다. 시료의 채취는 2% 아이소플루레인(isoflurane, Piramal Inc., PA, USA)을 이용하여 1분간 마취 후 개복하여 헤파린(heparin)(H3393, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 처리한 주사기를 이용하여 대정맥에서 혈액을 채취하였으며 간 또한 적출하였다. 채취한 혈액은 상온에서 1,200×g, 20분간 원심분리 후 혈장을 분리하여 분석에 이용하였으며, 간 조직은 생리식염수로 수세 후 중량 측정 및 분석에 사용 되었다. 모든 실험동물의 취급 및 사후처리는 이화여자대학교 동물실험윤리위원회의 기준을 준수하여 시행되었다.

표 1. 으름 열매 추출물 및 에탄올의 처리

처리	대조군 (n=5)	EtOH (n=5)	AQ (n=5)	AQ1 (n=5)	AQ2 (n=5)	AQ3 (n=5)	AQ4 (n=5)
으름 열매 추출물 농도 ¹⁾	-	-	30	30	100	400	1000
EtOH 농도 ¹⁾	-	6.00	-	6.00	6.00	6.00	6.00

¹⁾ 용량(mg/kg 체중)

간 조직 형상 및 간 조직 내 지방구의 상대 정량

조직의 광학현미경적 변화를 관찰하기 위하여 실험에 사용된 모든 생쥐의 간 소엽을 절제하여 10% 포르말린에 고정시킨 후 통상적인 방법으로 탈수와 청명과정을 거쳐 파라핀 포매하였다. 포매한 조직은 5 μm 두께로 박절편을 만든 후 Hematoxylin-Eosin (H&E)으로 염색하여 광학현미경으로 간 조직의 손상 정도를 관찰하였다. 조직학적 검경은 각 군당 조직샘플 4개를 무작위로 선택하여 이중 맹검으로 평가하였다. 선택된 조직은 CCD color camera (MoticamPro, Motic, Hong Kong, China)와 광학현미경(AE31, Motic, Hong Kong, China)을 이용하여 디지털 image를 촬영하였으며 image 분석 system (image-Pro Plus, Media Cybernetics, MD, USA)을 이용하여 대조군의 지방구 면적을 기준으로 처리군의 지방구 면적을 상대적으로 분석 하였다.

알라닌 아미노트랜스퍼라제와 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 활성 측정

[0044] 간 손상 지표로 사용되는 alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST)의 활성은 ALT와 AST kit (AM101-L, Asan Pharm. Co. LTD., Hwaseong, Korea)를 사용하여 비색정량으로 계산하였다.

[0045] 글루타티온 농도 측정

[0046] GSH의 함량은 GSH reductase (G3664, Sigma-Aldrich, MO, USA)를 이용하여 산화된 모든 GSH를 환원하여 시료 내 총 GSH를 측정하였다(Ellman GL. Tissue sulphydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77 (1959), Tietze F. Disulfide reduction in rat liver. I. Evidence for the presence of nonspecific nucleotide-dependent disulfide reductase and GSH-disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. Arch. Biochem. Biophys. 138: 177-188 (1970) 참조}. 먼저 간조직 100 mg에 1 mL의 식염수를 가한 후 균질 및 원심 분리하여 회수한 상층액 0.4 mL은 단백질의 농도를 측정하였으며(Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)참조}, 나머지 0.4mL은 0.6M perchloric acid (7601-90-3, Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)로 단백질을 제거한 후 GSH 분석에 사용되었다. GSH의 함량은 검체 또는 GSH 표준액(G4251, Sigma-Aldrich) 0.1 mL을 2.5 mL의 반응 용액(0.15 mM NADPH (N6505, Sigma-Aldrich), 0.1 mM 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (D8130, Sigma-Aldrich), 50 mM NaPO₄ (7558-79-4, Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan), 1.5mM EDTA (E5124, Sigma-Aldrich)과 0.1 mL의 GSH reductase (10 units/mL)와 동시에 혼합 한 후 412 nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하여 구하고 표준 GSH 검량선으로부터 GSH의 농도를 간조직 단백질 mg당 μ mole로 나타내었다.

[0047] 글루타티온 합성 효소, 종양 괴사 인자-알파(TNF- α), NADPH 옥시다제 4(NOX4)의 mRNA 수준

[0048] 간조직에서 total RNA 분리는 Trizol 용액(Trizol, Life Technologies Inc., NY, USA)을 이용하였으며 mRNA의 발현 수준은 quantitative real-time PCR 방법으로 측정하였다. cDNA는 first strand cDNA synthesis kit (K1621, Thermo Scientific, MA, USA)로 합성하였고 Maxima SYBR Green qPCR Master Mixes (K0222, Thermo Scientific)를 사용하여 PCR (Rotor-Gene-Q, Qiagen, Hilde, German)을 실시하였다. PCR을 위한 primer는 다음과 같이 사용되었다.

[0049] GCLM (NM_008129, Glutamate-cysteine ligase modifier subunit):

[0050] 5'-TCCTGCTGTGTGATGCCACCAG-3'(서열번호 1, 정방향 프라이머), 5'-GCTTCCTGGAACTTGCCTCAG-3'(서열번호 2, 역방향 프라이머); GCLC (NM_010295, glutamate-cysteine ligase catalytic subunit): 5'-ACACCTGGATGATGCCAACGAG-3'(서열번호 3, 정방향 프라이머), 5'-CCTCCATTGGTCGGAAGCTTAC-3'(서열번호 4, 역방향 프라이머); GSS (NM_0008180, GSH synthase): 5'-GAAGAAGTGGCAAAGCAGGC-3'(서열번호 5, 정방향 프라이머), 5'-TGGGTACTGGTGAGGGGAAA-3'(서열번호 6, 역방향 프라이머); TNF- α (NM_001278601, tumor necrosis factor- α): 5'-GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT-3'(서열번호 7, 정방향 프라이머), 5'-GCCATAGAACTGATGAGAGGGAG-3'(서열번호 8, 역방향 프라이머); NOX4 (NM_015760, NADPH oxidase 4): 5'-CGGGATTGTCTACTGCCTCCAT-3'(서열번호 9, 정방향 프라이머), 5'-GTGACTCCTCAATGGGCTTCC-3'(서열번호 10, 역방향 프라이머). PCR 결과로부터 각각의 유전자의 상대적인 정량분석은 β -actin에 대한 조사하고자 하는 유전자의 PCR 생성물의 상대적인 비율로 계산하였다(Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Methods 25: 402-408 (2001) 참조}.

[0051] 통계분석

[0052] 실험결과는 SAS software (ver. 9.3)의 one-way analysis of variance (ANOVA)을 이용하여 유의성 5% 이내에서 검증 하였으며, 평균간 검정은 Duncan' multiple range test로 유의적 차이를 검정 하였다.

[0053] 2. 실험결과

[0054] 체중 및 간 중량

[0055] 급성 및 만성 알코올에 의한 간손상에 대한 증상은 다양하게 나타나지만 대표적으로 지방간을 들 수 있다. 알코올에 의한 간손상은 지방간으로 간의 부피와 중량을 증가 시킬 수 있다. 알코올의 섭취로 인한 지방간 및 간손상 유발은 여러 생화학적 기작이 관련되어 있는데 그 중 알코올은 세포내 reactive oxygen specise(ROS)를 증가시키고 미토콘드리아의 손상과 지질의 과산화(lipid peroxidation)에 영향을 미치며 결과적으로 세포막에 손상을 준다고 알려져 있다. 이때 형성된 아세트알데하이드는 튜불린(tubulin)등에 결합함으로써 세포 내 물질을 세포 밖으로 배출시키는 작용을 억제시키며 세포 내 축적된 단백질, 지질, 수분 및 세포질 등은 간세포를 팽창시

키는 결과를 초래한다. 이는 전형적인 간 손상의 특징으로 보고되고 있다. 따라서 체중에 대한 간 중량의 비율은 간손상 여부의 간접적인 지표로 사용 될 수 있다. 본 실시예에서의 실험군의 체중과 간 중량 및 체중에 대한 간 중량의 비율을 표 2에 나타내었다. 체중의 경우 AQE3 처리군의 체중이 다른 그룹에 비해 유의적으로 높았다. 하지만 으름 열매 추출물을 급여하는 실험 기간 동안 비정상적인 체중의 증가와 감소는 관찰되지 않았다(데이터 나타내지 않음). 체중에 대한 상대적인 간 중량의 경우는 EtOH 처리군이 가장 높은 수치를 나타내어 알코올의 처리가 상대적인 간의 중량을 유의적으로 상승시키는 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과는 알코올 간독성을 유발한 생쥐에서 체중에 대한 상대적인 간 중량이 유의적으로 증가 하였다고 보고한 Letteron 등(Lettrion P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. J. Hepatol. 24: 200-208(1996)) 및 Yin 등(Yin M, Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI, Thurman RG. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. Gastroenterology 117: 942-952 (1999))의 결과와도 일치 하였다. 결과적으로 본 실시예에서도 경구 알코올 처리가 생쥐의 지방간 및 간 손상을 유도한 것으로 판단된다. 또한 으름 열매 추출물 처리군 및 알코올 처리군의 경우는 AQE3 처리군과 AQE4 처리군의 체중 대비 간 중량이 대조군에 비해 유의적으로 감소해 간 보호의 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0056] 표 2. 실험군에 있어서 체중, 간 중량, 체중 대비 간 중량에 대한 으름 열매 추출물의 효과

처리	대조군 (n=5)	EtOH (n=5)	AQ (n=5)	AQ1 (n=5)	AQ2 (n=5)	AQ3 (n=5)	AQ4 (n=5)
체중(g)	21.59± 1.23 ^b	22.00± 1.27 ^b	21.06± 0.88 ^b	20.98± 0.42 ^b	22.02± 0.90 ^b	23.39± 1.02 ^a	21.61± 1.11 ^b
간 중량(g)	0.83± 0.08 ^c	1.00± 0.08 ^{ab}	0.82± 0.02 ^c	0.91± 0.03 ^b	0.95± 0.04 ^{ab}	0.100± 0.06 ^{ab}	0.92± 0.08 ^b
L.W/B.W. ¹⁾	3.83± 0.30 ^c	4.57± 0.27 ^a	3.92± 0.13 ^c	04.36± 0.08 ^{ab}	4.31± 0.26 ^{ab}	4.26± 0.12 ^b	4.26± 0.24 ^b

[0057]

[0058] 결과는 평균±표준 편차로서 제시된다.

[0059] ¹⁾ 체중 대비 간 중량

[0060] 줄 내, 서로 다른 윗 첨자(superscript)를 가지는 ^{a-c}평균은 유의하게 다르다 (p<0.01).

[0061] 약어: EtOH는 6 mg of EtOH/kg B.W; AQ는 30 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE1은 EtOH와 함께 30 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE2는 EtOH와 함께 100 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE3는 EtOH와 함께 400 mg의 으름 추출물/kg B.W; AQE4는 EtOH와 함께 1,000 mg의 으름 추출물/kg B.W를 나타낸다.

[0062] **간 조직 형상 및 간 조직 내 지방구의 상대 정량**

[0063] 적출한 간 조직으로부터 H&E 염색을 통해 간조직의 변화를 도 1에 나타내었다. 광학현미경 관찰 결과 지방구를 제외 한 부분이 붉게 염색되었으며, 핵은 보라색으로 나타났다. EtOH만 단독 처리한 군에서 간 조직내 지방 축적이 유발된 것을 관찰 할 수 있었는데 이는 EtOH 처리군에서 알코올성 간독성이 유발되었음을 알 수 있었다. 한편 으름열매 추출물 처리군에서는 EtOH만 단독 처리한 군에 비해 농도 의존적으로 간조직 내 지방의 축적이 감소하는 것을 광학현미경 관찰로 확인 하였다. 대조군에 대한 상대적인 지방구의 면적은 EtOH만 단독처리한 군은 953±78%, AQ 처리군은 110±5%를 나타내었으며 EtOH와 AQ 처리군의 경우 AQE1 처리군은 987±188%, AQE2 처리군은 724±111%, AQE3 처리군은 434±55%, AQE4 처리군은 132±30%의 수치를 나타내었다(표 3 참조). 특히, 으름 추출물 처리 최고농도인 1,000 mg/kg B.W 의 농도에서는 간세포의 괴사 및 지방 축적이 알코올로 인한 간 독성이 크게 완화 되는 것으로 관찰되었다.

[0064] 표 3. 실험군에 있어서의 마우스 간의 지방 축적에 대한 으름 열매 추출물의 효과

처리	대조군 (n=5)	EtOH (n=5)	AQ (n=5)	AQ1 (n=5)	AQ2 (n=5)	AQ3 (n=5)	AQ4 (n=5)
상대적인 지방구 면적 %	100±	953±	110±	987±	724±	434±	132±
	0.21% ^a	78% ^d	5% ^a	188% ^d	111% ^c	55% ^b	30% ^a

[0065]

[0066] 결과는 평균±표준 편차로서 제시된다.

[0067] 줄 내, 서로 다른 윗 첨자(superscript)를 가지는 ^{a-d}평균은 유의하게 다르다 (p<0.001).

[0068] 약어: EtOH는 6 mg of EtOH/kg B.W; AQ는 30 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE1은 EtOH와 함께 30 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE2는 EtOH와 함께 100 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE3는 EtOH와 함께 400 mg의 으름 추출물/kg B.W; AQE4는 EtOH와 함께 1,000 mg의 으름 추출물/kg B.W를 나타낸다.

[0069] **알라닌 아미노트랜스퍼라제와 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 활성도**

[0070] 알코올성 간손상을 입은 실험 동물의 간 기능 회복에 대한 으름 열매 추출물의 효과는 혈중 ALT(알라닌 아미노트랜스퍼라제), AST(아스파테이트 아미노트랜스퍼라제) 활성을 통해 조사 하였다(표 4 참조). 알코올만 처리한 EtOH 그룹의 경우 ALT, AST가 각각 37.42 ± 12.48 IU/L, 38.24 ± 16.08 의 수치를 보여 실험군내에서 유의적으로 가장 높은 수치를 나타내었다($p < 0.001$). 일반적으로 알코올로 유발된 급성 간독성을 보이는 간에서는 ALT와 AST의 활성이 증가된다. 본 실시예에서도 EtOH 처리군은 알코올로 인한 간독성이 발생한 것으로 판단된다. 반면 AQ 처리군의 ALT, AST 수치의 경우는 대조군과 유의적 차이를 보이지 않았다. AQE2, AQE4 처리군의 ALT의 경우 대조군과 유의적 차이를 보이지 않아 알코올 처리를 통해 유발된 간독성이 완화되는 것으로 확인되었다. AST 수치의 경우도 으름 열매 처리군이 알코올만 처리한 실험군에 비해 수치가 낮아지는 경향을 나타내어 으름 열매 추출물의 간 보호 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0071] 표 4. 실험군에 있어서 알라닌 아미노트랜스퍼라제 및 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제에 대한 으름 열매 추출물의 효과

처리	대조군 (n=5)	EtOH (n=5)	AQ (n=5)	AQ1 (n=5)	AQ2 (n=5)	AQ3 (n=5)	AQ4 (n=5)
ALT (IU/L)	24.32 ± 3.91^{cd}	37.42 ± 12.48^a	22.62 ± 3.36^d	32.47 ± 5.43^{ab}	29.24 ± 5.15^{bc}	31.61 ± 5.24^{ab}	30.14 ± 3.75^{bc}
AST (IU/L)	24.35 ± 3.52^b	38.24 ± 16.08^a	24.25 ± 2.62^b	32.74 ± 7.53^{ab}	30.83 ± 10.43^{ab}	30.86 ± 6.40^{ab}	31.88 ± 7.09^{ab}

[0072]

[0073] 결과는 평균±표준 편차로서 제시된다.

[0074] 줄 내, 서로 다른 윗 첨자(superscript)를 가지는 ^{a-d}평균은 유의하게 다르다 ($p < 0.01$).

[0075] 약어: EtOH는 6 mg of EtOH/kg B.W; AQ는 30 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE1은 EtOH와 함께 30 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE2는 EtOH와 함께 100 mg의 으름 열매 추출물/kg B.W; AQE3는 EtOH와 함께 400 mg의 으름 추출물/kg B.W; AQE4는 EtOH와 함께 1,000 mg의 으름 추출물/kg B.W를 나타낸다.

[0076] **간 조직내 글루타티온 합성 효소의 mRNA 발현과 글루타티온 수준**

[0077] 항산화 및 제독 기능을 가지고 있는 GSH는 만성 간질환에 의해 그 농도가 감소 할 뿐만 아니라 노화, 담즙분비 이상, 내독소혈증, 알코올성 간질환 등의 다양한 병변에서 GSH의 세포내 항상성의 심각한 이상을 초래한다(34-38). 본 연구에서는 으름 열매 추출물이 알코올로 유발된 간독성에 대한 간보호 효과를 알아보기로 간 조직내 글루타티온 합성 효소(GSH synthetic enzyme)의 mRNA 발현 정도와 GSH 농도를 분석 하였으며 그 발현 정도를 도 2에 나타내었다.

[0078] 으름 열매 추출물 처리군(AQ 그룹)의 경우의 경우 대조군의 비해 GCLM mRNA의 발현을 증가 시키는 것으로 확인 되었다(도 2의 A). 에탄올 처리군(EtOH group)에서도 GCML의 mRNA 발현은 대조군보다 높게 발현되는 경향을 보 였지만 통계적 유의차는 없었다. 으름 열매 추출물의 농도가 100 mg/kg BW 이상일 때 대조군과 EtOH 처리군보다 GCLM mRNA 발현량이 증가하는 경향을 나타내었다. GSS mRNA 발현의 경우는 AQE1과 AQE2 처리군에서 높게 발현되는 경향을 보였다. 하지만 EtOH 처리군도 AQE1과 AQE2 처리군과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. GSH 합성에서 속도결정 단계를 촉매하는 gamma-glutamate cysteine ligase는 heterodimer 단백질로 catalytic subunit과 modifier subunit으로 구성된다. 본 실시예에서 GCLC mRNA 발현은 대조군 및 모든 처리군에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 GSH의 항상성은 GSH의 신생합성 외에 소모 반응 및 시간적 차이에 의해서도 조절된다는 점을 고려해야 할 것으로 판단된다. 도 2의 D는 으름 열매 추출물의 처리가 급성 알코올 간독성을 유발한 마우스의 간 조직내 GSH 농도에 미치는 영향을 나타내었다. 대조군과 비교하여 EtOH 처리군과 AQE1, AQE4 처리군에서 GSH 농도가 증가 하는 것으로 확인되었다. 하지만 으름 열매 추출물만 처리한 AQ 처리군에서는 GSH의 농도가 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 본 실시예에서 알코올만 처리한 경우에는 GSH 농도를 증가 시키는 결과를 보였는데 이는 알코올로 인한 산화적 스트레스에 대한 GSH 고갈 및 회복 작용으로 GSH의 수준을 증가시키는 것으로 판단된다. 본 실시예에서 급성 알코올 독성 유발 후 18시간이 지난 후 간 조직내 GSH 농도라는 점은 간조직에서의 GSH 농도가 외부 스트레스에 대한 방어적인 기전을 통해 어느 정도 회복 되는 시점

이라고 보인다. 특히 본 실시예에서 으름 열매 추출물의 처리는 농도 의존적인 경향을 보이진 않지만 급성 알코올 간독성에서 GSH 농도를 증가시킨다고 판단된다. 만성 간질환의 경우 대부분 산화적 스트레스의 증가가 수반되며 바이러스성 간 질환, 자가면역적 간질환, 만성적인 알코올의 섭취, 비 알코올성 지방간 등 다양한 병증의 원인이 존재 하지만 공통적으로 손상된 간 조직에서는 항산화기능을 가진 GSH의 고갈이 관찰된다. 이와 같이 간 조직의 손상을 줄 수 있는 산화적 스트레스에 대한 보호 기작은 잘 알려진 바와 같이 항산화능력이 주요하다고 할 수 있다. 다시 말해 알코올로 인한 만성 또는 급성 간질환의 경우 간 조직내 산화스트레스를 효과적으로 제거 할 수 있는 항산화능력의 향상으로 손상된 간 조직을 보호할 수 있다. 본 연구에서는 생쥐에 대한 으름 열매 추출물의 경구 투여는 알코올로 유발된 급성 간독성에서 항산화 기능을 향상 시킬 수 있는 가능성을 보여주었지만 만성적인 알코올 섭취로 인한 간 손상 경우도 GSH의 농도를 회복시키는 것이 간 보호에 있어 중요한 역할을 하기 때문에 으름의 추출물의 경구 투여는 만성적이 알코올 섭취로 인한 간 조직에서 항산화 능력을 향상 시킬 수 있다.

[0079] **NADPH 옥시다제 4 mRNA 발현 측정**

[0080] NADPH 옥시다제(NADPH oxidase; NOX)는 다양한 자극에 반응하여 활성산소기(reactive oxygen species; ROS)를 발생시키는 효소로서 NOX1, NOX2, NOX3, NOX4가 존재하며 간 내에서 NOX system에 의해 발생하는 산화스트레스는 알코올성 간질환, 만성 C형 간염, 철분 및 담즙 정체 간손상 등 여러 가지 간질환과 간섬유화 진행에 중요한 역할을 한다. 특히 NOX4의 억제와 간섬유화와 간세포의 apoptosis 억제와 관련이 있다. 본 실시예에서의 급성 알코올 간독성시 생쥐 간조직에서의 NOX4 mRNA 발현 정도를 분석한 결과를 도 3의 A에 나타내었다. EtOH 처리군과 AQE1 처리군에서 NOX4의 mRNA 발현이 유의적인 증가를 나타내었다. 반면, AQE2, AQE3, AQE4 처리군에서는 대조군 보다 유의적으로 낮은 수준의 NOX4 mRNA 발현 수준을 보여 으름 열매 추출물 농도 100 mg/kg B.W 이상의 농도에서 산화 스트레스 감소 효과를 나타내었다.

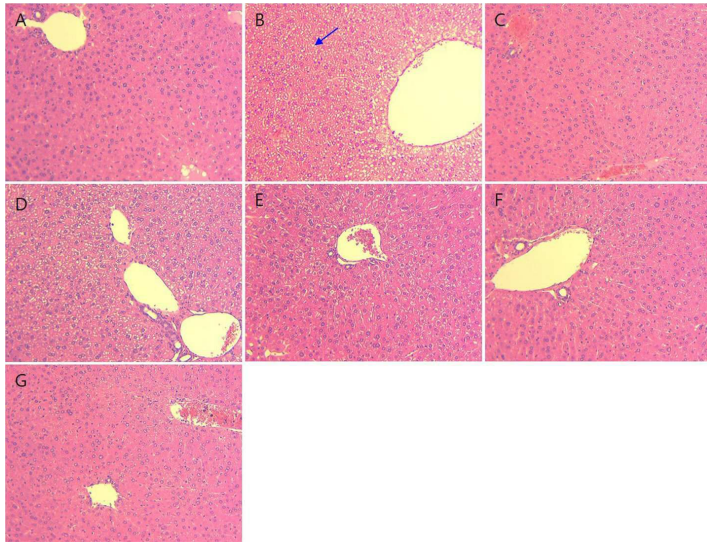
[0081] **Tumor necrosis factor-alpha mRNA 발현 측정**

[0082] 만성적 또는 급성의 알코올의 섭취는 장벽의 손상을 통해 장내독소 침투를 촉진 시킬 수 있고 이는 Kupffer cell을 활성화 시켜 ROS의 생성과 여러 염증유발 사이토카인(cytokine)의 생성을 증가 시킨다. 특히 급성 및 만성적 알코올의 섭취가 간조직에서 대표적 proinflammatory인 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)의 발현을 유의적으로 증가 시킨다. 따라서 본 실시예에서 으름 열매 추출물의 처리가 알코올 처리로 인한 간 조직의 염증 반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 대표적인 염증 반응 지표인 TNF- α 의 mRNA 발현 수준을 분석하였다(도 3의 B 참조). 본 실시예에서도 EtOH 처리군의 TNF- α mRNA의 발현 정도는 대조군에 대비해 약 335% 증가해 알코올로 인한 간독성 및 염증 반응이 진행되었음을 확인할 수 있었다. 반면 모든 으름 열매 추출물-EtOH 처리군에서 TNF- α mRNA의 발현 정도는 EtOH 처리군에 비해 유의적으로 큰 폭으로 감소(대조군 대비 75.1-141.3%)해 으름 열매 추출물 처리가 알코올로 유발된 급성 염증 반응을 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

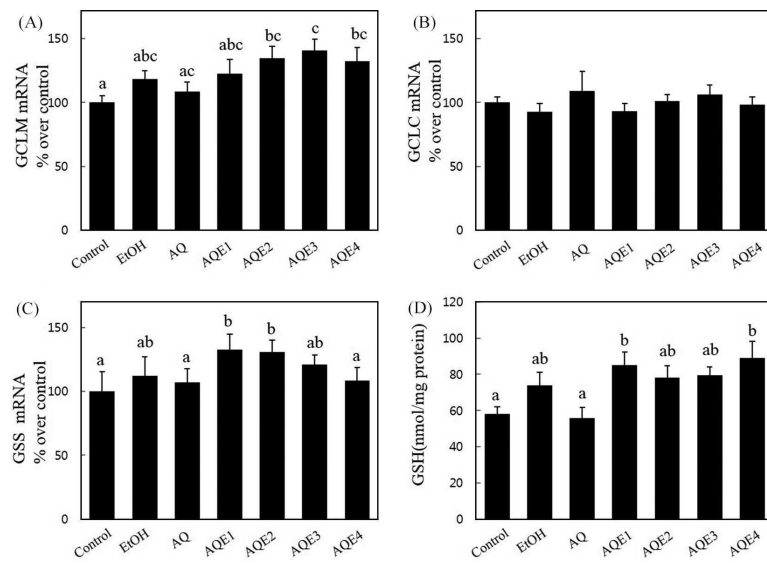
[0083] 따라서, 본 실시예를 통해 으름 열매 추출물이 알코올로 유발된 급성 간독성 상태에서 간 조직내 지방의 축적을 완화 하고, 혈청 AST, ALT 수치를 개선하며, 간조직 내 항산화 물질인 GSH의 농도를 증가시키며 활성산소기를 생성하는 NOX4의 mRNA 발현을 억제하고 염증 반응 지표인 TNF- α 의 mRNA도 억제함으로써 알코올로 유발된 산화 스트레스, 염증 반응에 대한 간 보호 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

도면

도면1



도면2



도면3

