

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0082013

(43) 공개일자 2021년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/07 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)

A61P 21/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/07 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0174526

(22) 출원일자 2019년12월24일

심사청구일자 2019년12월24일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김기영

경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호(죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)

김민호

충청남도 천안시 동남구 서부대로 252, 202동 905호(신방동, 신방동두레현대아파트2단지)

김재구

경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46, 211동 904호(식사동, 위시티일산자이2단지아파트)

(74) 대리인

특허법인 하나

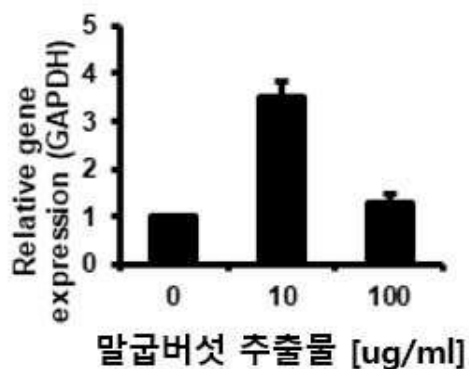
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 말굽버섯 추출물을 포함하는 근기능 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 말굽버섯(*Fomes fomentarius*) 추출물을 포함하는 운동 수행 능력 향상 및 근육 질환, 근육 손상의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 21/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/316 (2013.01)

A23V 2250/208 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	GRRC 경희 2018-B4 (20192227)
부처명	경기도
과제관리(전문)기관명	경기도
연구사업명	글로벌의약품소재개발연구센터
연구과제명	미토콘드리아 특이 질환 치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.07.01 ~ 2020.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

말굽버섯(*Fomes fomentarius*) 추출물을 포함하는, 운동수행능력 향상용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 운동수행능력 향상은 근육세포의 성장 및 분화, 근육량 증가 또는 근육 에너지 합성 증가를 통해 나타나는 것인, 운동수행능력 향상용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 것인, 운동수행능력 향상용 조성물.

청구항 4

말굽버섯 추출물을 포함하는,

근 기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환; 또는 근육 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증(myasthenia), 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 근육 질환 또는 근육 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 근육 손상은 근육 좌상(muscle strain), 근육 파열(muscle rupture), 근육 열상(muscle tearing), 타박상(contusion), 염좌(distortion), 회전근개 증후군(rotator cuff syndrome) 및 근육염(myositis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 근육 질환 또는 근육 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

말굽버섯 추출물을 포함하는, 근 기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환; 또는 근육 손상의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증(myasthenia), 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 근육 질환 또는 근육 손상의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 근육 손상은 근육 좌상(muscle strain), 근육 파열(muscle rupture), 근육 열상(muscle tearing), 타박상(contusion), 염좌(distortion), 회전근개 증후군(roator cuff syndrome) 및 근육염(myositis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 근육 질환 또는 근육 손상의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제4항의 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 근육 질환 또는 근육 손상의 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 말굽버섯(*Fomes fomentarius*) 추출물을 포함하는 운동 수행 능력 향상 및 근육 질환, 근육 손상의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대인들은 미용과 건강에 엄청난 관심을 기울이는데도 비만, 고혈압 및 기타 각종 성인병에 시달리고 있으며, 노화방지를 위한 많은 노력에도 불구하고 대기오염 및 과중한 스트레스 등으로 인해 이를 막지 못하고 있는 실정이다. 이러한 각종 성인병 및 노화를 예방하기 위해서는 운동을 꾸준히 하는 것이 가장 효과적이고 경제적이지만, 운동할 시간이 제한되어 있으므로, 운동 효과를 높일 수 있도록 하는 각종 제제가 시판되고 있다. 또한 운동선수들은 새로운 기록을 세우기 위하여 운동 종목에 따른 과학적인 훈련, 식이요법 및 운동능력 향상 보조제(ergogenic aids) 등을 병행하고 있다. 이 중 운동능력 향상 보조제는 운동수행능력을 향상시킬 뿐만 아니라 신체 활동 시 체내에 축적되어 피로를 발생시키는 피로요소의 제거에도 효과가 있기 때문에, 일반인들에게도 흔히 이용하고 있다.

[0003] 운동능력 향상을 위한 기능성 보조제와 관련된 연구는 동서양을 막론하고 활발하게 수행되고 있다. 현재 시판되는 제품들은 대부분 스테로이드, 카페인, 탄산수소나트륨 및 구연산나트륨 등을 포함하고 있다. 그러나 이러한 성분의 효과는 이는 일시적인 현상에 불과하고 내성이 생겨 점점 더 많은 함량의 성분이 포함된 제품을 찾게 만들며, 건강에 치명적인 부작용을 초래할 수도 있다. 따라서 최근에는 식물 추출물 등 안전성이 보장된 천연물을 이용하여 기능성 보조제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 또한, 근육은 뼈, 내장 기관을 지탱 및 보호하는 동시에 심장의 박동과 같은 근육 외의 다른 조직의 운동성을 갖도록 하며, 신체활동뿐만 아니라 영양소 대사(metabolism)에도 큰 영향을 주기 때문에 제 2형 당뇨, 비만, 심혈관 질환 등과 같은 대사성 질환의 발병과도 밀접하게 연관되어 있다.

[0005] 치료되지 않은 근육 질환은 심각한 건강상의 문제를 초래할 수 있으며, 근육 손실 시에 일어나는 변화는 약화된 신체 상태를 유발하여 무능한 신체 수행력 및 유해한 건강 상태를 야기할 수 있다.

[0006] 또한 근육의 감소는 관절염, 허리통증, 만성통증을 더 증가시키는 원인이 되며, 복부비만에 의한 요실금 증세도 악화시킬 수 있고, 골절에 의한 부상은 노년의 우울증을 증가시켜 사망에 이를 수 있기 때문에 노년의 근감소증은 다양한 질환과 연계되어 삶의 질을 떨어뜨리는 주요 원인이 된다. 근감소증은 골다공증, 인슐린저항성 및 관절염과 같은 노인성 만성질환과도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져, 근감소증의 예방 또는 개선을 통해서 노화로 인한 신체 활동력의 감소를 억제할 수 있다.

[0007] 이에 따라, 운동수행능력 향상 뿐 아니라, 근육 질환 및 근육 손상에 효과가 우수한 물질에 대한 연구 및 개발이 지속적으로 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2017-0035107호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 말굽버섯(*Fomes fomentarius*) 추출물을 포함하는 운동수행능력 향상용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 근 기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환; 또는 근육 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 말굽버섯 추출물을 포함하는, 근 기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환; 또는 근육 손상의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 말굽버섯 추출물을 투여하는 단계를 포함하는, 근육 질환 또는 근육 손상의 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은, 말굽버섯(*Fomes fomentarius*)의 추출물을 포함하는, 운동수행능력 향상용 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명에서, "말굽버섯(*Fomes fomentarius*)"은 구멍장이버섯과(Polyporaceae)의 버섯으로, 유럽, 아시아, 아프리카 및 북미에 고루 분포하며 나무의 여러 측면에 붙어서 자라고, 생김새가 말의 발굽을 닮았다 하여 이러한 이름이 붙여졌다. 말굽버섯은 다른 식용 버섯처럼 음식에 넣어 먹는 식재료로 사용되지는 않지만, 의학적으로 달여 먹는 등 약용효과로 사용되고 있는 약용버섯이다.
- [0015] 상기 말굽버섯은 베타글루칸이 다량으로 함유되어 있다고 알려져 있고, 당뇨, 항산화 효과, 지혈 염증 치료에 효과적이며 특히 항암효과가 강력하다고 알려져 있으나, 근육 기능과 관련된 근 기능 개선 및 이를 통한 운동수행능력 향상에 관한 연구는 이루어지지 않았을 뿐만 아니라 보고된 바 없다.
- [0016] 상기 "말굽버섯 추출물"은 말굽버섯의 추출처리에 의하여 얻어진 추출액, 상기 추출액의 회석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.
- [0017] 또한, 본 발명의 상기 추출물은, 상기 각각의 해당 식물의 천연, 잡종 또는 변종 식물로부터 추출될 수 있고, 식물 조직 배양물로부터도 추출이 가능하다.
- [0018] 본 발명의 추출물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2 종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 사용되는 추출용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물, C₁ 내지 C₄의 무수 또는 저급 알코올, 상기 물과 저급 알코올의 혼합 용매, 아세톤, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸아세테이트, 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상으로, 단독으로 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 추출 용매로 더욱 구체적으로는 물(또는 증류수, 정제수)을 사용할 수 있다. 상기 용매를 사용하여 말굽버섯을 1회 이상 추출하여 용매 추출물을 제조할 수 있으며, 상기 용매 추출물을 감압 증류한 후 동결건조 또는 분무 건조하여 얻은 건조 추출물을 제조할 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 물(또는 증류수, 정제수)를 사용하여 말굽버섯 추출물을 제조하였다.
- [0021] 본 발명에서 "운동수행능력"은 일상생활이나 스포츠에서 볼 수 있는 신체동작을 외형적으로 달리기, 뛰기, 던지기, 헤엄치기 등으로 구분할 때, 상기 동작을 빠르게, 강하게, 정확하게, 오래, 능숙하게 할 수 있는 정도를 나타내는 것으로, 운동수행능력은 근력, 민첩성 및 지구력 등의 인자를 통해 판단될 수 있으며, "운동수행능력 향상"은 운동수행능력을 개선하거나 향상시키는 것을 말한다.
- [0022] 구체적으로, 상기 운동수행능력 향상은 근육세포의 성장 및 분화, 근육량 증가 또는 근육 에너지 합성 증가를 통해 나타나는 것일 수 있다.

- [0023] 본 발명 일 실시예에서는 말굽버섯 추출물을 처리한 경우, 근육 분화 조절인자인 *myoD* 및 *myogenin*의 발현량이 증가함으로써 근육 세포의 분화를 유도하여 근 섬유의 형성이 유도될 수 있음을 확인하였다(도 1 및 도 2). 또한, 산화적 인산화 관련 유전자인 *NRF-1* 및 미토콘드리아 유전자인 *Tfam*의 발현량을 증가시킴으로써 근육 내 에너지 대사에 관여하는 유전자의 발현이 증가함을 확인하였다(도 3 및 도 4).
- [0024] 나아가, ATP를 합성하는 미토콘드리아의 내막에 존재하는 전자 전달계의 주요 단백질 인자 중 하나인 Cox4를 발현시키는 유전자인 *Cox4*의 발현이 증가됨을 확인하였다(도 7). Cox4는 미토콘드리아의 대사 기능에 관여함으로써, Cox4의 발현 및 활성이 증가할수록 근력, 균형감각 및 근육 세포의 생존이 증가하게 된다.
- [0025] 또한, 미토콘드리아 ATP 합성효소의 막 서브유닛 c를 암호화하는 *ATG5g1* 유전자의 발현량이 증가(도 8), 미토콘드리아 내막에서 일어나는 TCA 사이클에서의 이화작용 중 숙신산의 산화 작용을 하며 FAD를 FADH₂로 환원시키는 효소를 암호화하는 유전자인 *SDHb*의 발현 증가(도 9)를 확인하였는 바, 본 발명의 말굽버섯 추출물을 처리한 경우 미토콘드리아를 통한 근육 세포의 에너지 대사 및 세포 활성이 증가될 수 있음을 확인하였다.
- [0026] 또한, 세포 내 대사 조절에 관여하는 유전자인 *SIRT1*, *PGC1-α* 및 *ERR-α*의 발현이 증가하였으며(도 11 내지 도 13), 미토콘드리아 생합성, 포도당신생합성, 산화적 인산화, 지방산 대사가 증가됨으로써 근육 세포 대사 활성이 나타날 수 있으며, 이를 통해 근육 기능이 향상될 수 있음을 확인하였다.
- [0027] 또한, 근육, 간 등에서 에너지 대사에 관여하는 *PPAR-α* 유전자의 발현 증가(도 14) 및 세포 분화, 에너지 항상성에 영향을 주는 *PPAR-β* 유전자의 발현 증가(도 15)를 확인함으로써 근육 내 에너지 대사 활성 증가 및 에너지 항상성 유지 기능이 향상될 수 있음을 확인하였다.
- [0028] 나아가, TSC 복합체의 구성 요소인 TSC1 및 TSC2의 유전자 발현이 감소됨으로써 mTOR에 의한 신호전달을 활성화시키는 것을 확인하였다(도 16 및 도 17). mTOR 신호 활성화는 근육 세포 활성 및 근육량 증대에 중요한 바, 이를 통해 본 발명의 말굽버섯 추출물이 근육 세포 활성 및 근육량 증대 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [0029] 운동수행능력 향상은 근육 세포의 활성화, 근육량 증대, 근육 세포 내의 원활한 에너지 대사 등을 기초로 나타나는 바, 본 발명의 말굽버섯 추출물은 상기와 같은 효과를 통해 운동수행능력을 향상시킬 수 있다.
- [0030] 이에 따라 본 발명의 다른 측면은, 말굽버섯 추출물을 포함하는, 근 기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환; 또는 근육 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 상기와 같이 우수한 근육 세포의 활성화, 근육량 증대, 근육 세포 내의 원활한 에너지 대사 효과를 나타내는 바, 근 기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환; 또는 근육 손상에 대한 예방 및/또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0032] 구체적으로 상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증(myasthenia), 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 상기 "긴장감퇴증(atony)"는 이완증(弛緩症), 무긴장증, 긴장감퇴증이라고도 부르는 질환으로서, 근긴장의 감퇴 또는 소실한 상태를 말한다.
- [0034] 상기 "근위축증(muscular atrophy)"은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실 또는 근육 자체의 병 또는 근육을 지배하는 신경의 손상을 말하며, 점진적인 근위축과 근쇠약을 모두 포함한다. 일반적으로는 근육을 사용하지 않음으로써 심각한 근육 강도 손실이 발생해 점차 근위축으로 진행하게 되는 경우가 있으며, 이에 더해 중력이 없는 곳에서 생활하는 사람의 경우 또는 칼슘과 근육 강도의 감소에 의해 근력이 저하되는 증상을 보이는 경우가 있다.
- [0035] 또한, 근육 자체의 병으로 인한 근위축으로 중증 근무력증(myasthenia gravis), 듀센형, 베커형, 지대형, 안면견갑상완형과 근육 자체에 발생하는 염증 등을 포함할 수 있으며, 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축으로 척수성 근위축(spinal muscular amyotrophy)인 베라드니히-호프만형, 쿠겔베르그-벨란더병, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)인 루게릭병, 척수구 근위축(spino-bulbar muscular atrophy)인 케네디병을 모두 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 "근이영양증(muscular dystrophy)"은 퇴행성 근육병증의 일종으로, 근육섬유의 괴사를 나타내며 근세포막의 손상으로 근육섬유의 괴사와 퇴화과정을 거쳐 근력저하 및 위축이 발생된다. 뒤시엔느 근이영양증(Duchenne

muscular dystrophy), 베커 근이영양증(Becker muscular dystrophy), 사지골반 근이영양증(Limb-girdle muscular dystrophy), 에머리-드라이푸스 근이영양증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 안면 견갑상완 근이영양증(Facioscapulohumeral muscular dystrophy), 근긴장성 근이영양증(Myotonic muscular dystrophy), 안구 인두 근이영양증(Oculopharyngeal muscular dystrophy), 말단 근육 근이영양증, 선천성 근이영양증(Congenital muscular dystrophy) 등을 포함하며, 부위에 따라 다양한 형태로 나타날 수 있다.

[0037] 상기 "근무력증(myasthenia)"은 근육의 신경장애로 근육이 쇠약해지는 질환으로서, 처음에는 눈꺼풀처짐(안검하수)과 눈동자가 잘 안 돌아가는 등 가벼운 증상이 나타난다. 또 말을 할 때 발음이 정확하지 않거나 음식을 잘 못 삼키게 된다. 이밖에 얼굴 근육도 약해진다. 근무력증이 심해지면 증상은 전신으로 번져서 팔과 다리에 힘이 잘 들어가지 않아 물건을 잘 들지 못하고 쉽게 넘어지게 된다. 또 호흡근관과 호흡마비 같은 위험한 상태가 나타날 수도 있다.

[0038] 상기 "악액질(cachexia)"은 전신상태의 두드러진 쇠약을 가져오는 상태를 의미하는 것으로서, 원인으로서 악성 종양, 바세도우병, 하수체기능저하증, 말라리아, 부신피질 기능저하증, 흉선기능부전 등이 있다. 임상적으로는 전신의 쇠약, 빈혈, 부종이 주요 징후이다. 악성종양의 빈혈, 종양자체의 국소적인 영향으로 인해 영양장애를 가져오고 전신적으로는 숙주의 대사와 경합해 종양의 대사산물에 의해 숙주대사장애를 일으키고 악액질이 생기는 것으로 알려져 있다.

[0039] 또한, 상기 근육 소모 또는 근육 퇴화는 전적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 모두 포함하며, 이로 인한 근력 약화를 모두 포함할 수 있다.

[0040] 상기 "근력 약화"는 한 개 또는 그 이상의 근육의 힘이 감소된 상태를 의미한다. 상기 근력 약화는 어느 한 근육이나, 몸의 한쪽, 상지나 하지 등에 국한될 수도 있고, 전신에 걸쳐 나타날 수도 있다. 또한 근피로나 근육통을 포함하는 주관적인 근력 약화 증상은 의학적 검진을 통해 객관적인 방법으로 정량화될 수 있다. 근력 약화의 원인으로는 근손상, 근육 세포의 분화 감소 등으로 인한 근육량 감소, 근육 노화 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명에서, "근육 손상"은 상해에 따른 물리적 또는 화학적인 파괴에 의한 모든 손상을 의미할 수 있다.

[0042] 구체적으로, 상기 근육 손상은 근육 좌상(muscle strain), 근육 파열(muscle rupture), 근육 열상(muscle tearing), 타박상(contusion), 염좌(distortion), 회전근개 증후군(roator cuff syndrome) 및 근육염(myositis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 근육 세포의 기능 저하, 에너지 대사의 불균형 등이 나타나면 이로 인하여 근 기능이 저하, 무기력 등이 나타나면서 근육 손상으로 이어질 수 있다.

[0044] 이러한 근육 손상이 지속되면 근육 질환으로 발전되면서 근감소, 근위축, 근육 퇴화 등이 나타난다. 이러한 근육 질환이 적절히 치료되지 못할 경우 만성 질환으로 진행되어 심각한 건강상의 문제 뿐 아니라 대사성 질환까지 연계될 수 있다.

[0045] 본 발명 일 실시예에서는 말굽버섯 추출물에 의해 근육의 에너지 합성이 증가할 뿐 아니라, 근육 세포의 증식이 촉진되는 것을 확인하였는 바(도 20), 근육 세포가 증식, 성장을 통해 근육 질환 및 근육 손상에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0046] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여, 상기 본 발명의 말굽버섯 추출물 외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 구체적으로 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 적용될 수 있다. 경구용 제형으로 액제, 정제 형태를 적용할 수 있으며, 비경구용 제형으로는 주사용, 도포용, 에어로졸 등의 스프레이 형일 수 있다. 더욱 구체적으로는 주사제 형태일 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

- [0048] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 적용될 수 있으며, "약학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 성별, 연령, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비 율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0049] 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 또 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 다른 치료제와 순차적 으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요 소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업 자에 의해 필요에 따라 용이하게 결정될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 근육 질환 또는 근육 손상 의 치료방법에 관한 것이다.
- [0051] '근육 질환 또는 근육 손상'은 상기 설명한 바와 같다.
- [0052] 본 발명의 용어 "개체"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 근육 질환 또는 근육 손상을 가진 동물 또는 인간을 포함한다.
- [0053] 본 발명에 따른 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써, 근육 질환 또는 근육 손상을 효과적으로 예방 및 치료 할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 인간 또는 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 측면은 말굽버섯 추출물을 포함하는, 근육 질환 또는 근육 손상의 예방 또는 개선용 식품 조 성물에 관한 것이다.
- [0057] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품은 소세지, 육류, 빵, 초콜 릿류, 스낵류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음 료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 음료수로 제형화할 경우에 본 발명의 조성물 외 에 첨가되는 액체 성분으로는 이에 한정되지는 않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화 물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예, 포도당, 과당 등), 디사 카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올일 수 있다.
- [0058] 상기 식품의 종류는 구체적으로 건강기능식품일 수 있다. 상기 건강기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광 물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능 식품은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함 유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0059] 상기 건강기능식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적인 방법을 이용하 여 특정 목적에 작용 및 발현하도록 부가가치를 부여한 식품이다. 이러한 건강기능 식품의 성분은 생체 방어와 신체 리듬의 조절, 질환의 방지 및 회복에 관계하는 신체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하 여 가공하게 되며, 식품으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제, 감미료 또는 기능성 원료를 함유할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 조성물을 건강기능식품(또는 건강기능 음료 첨가물)으로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하 거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물 의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

발명의 효과

- [0061] 본 발명에 따르면, 본 발명의 말굽버섯 추출물은 운동 능력 향상을 위한 근육량 증가 및 근 기능 개선에 활용될 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 말굽버섯 추출물은 천연물에서 유래한 성분을 포함하므로 인체에 독성이 낮은 물질로 유용하게 활용될 수 있다.
- [0063] 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

- [0064] 도 1은 말굽버섯 추출물에 의한 *myoD* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 말굽버섯 추출물에 의한 *myogenin* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 말굽버섯 추출물에 의한 *NRF-1* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 4는 말굽버섯 추출물에 의한 *Tfam* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 5는 말굽버섯 추출물에 의한 *CytC* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 6은 말굽버섯 추출물에 의한 *Cox2* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 7은 말굽버섯 추출물에 의한 *Cox4* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 8은 말굽버섯 추출물에 의한 *ATG5g1* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 9는 말굽버섯 추출물에 의한 *SDHb* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 10은 말굽버섯 추출물에 의한 *UCP1* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 11은 말굽버섯 추출물에 의한 *SIRT1* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 12는 말굽버섯 추출물에 의한 *PGC1- α* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 13은 말굽버섯 추출물에 의한 *ERR- α* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 14는 말굽버섯 추출물에 의한 *PPAR- α* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 15는 말굽버섯 추출물에 의한 *PPAR- β* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 16은 말굽버섯 추출물에 의한 *TSC1* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 17은 말굽버섯 추출물에 의한 *TSC2* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.
- 도 18은 말굽버섯 추출물에 의한 근 기능 관련 단백질 변화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 19는 말굽버섯 추출물에 의한 근육 세포 내 ATP의 함량 변화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 20은 말굽버섯 추출물에 의한 근육 세포 성장 변화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0065] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0066] 실시예 1. 말굽버섯 추출물의 제조

- [0067] 건조된 말굽버섯(원산지: 제주도) 0.5kg을 분쇄하여 추출 용기에 넣고, 말굽버섯 중량 대비 15배의 정제수를 넣은 후 60℃에서 3시간 동안 교반하여 추출하였다. 추출액은 여과지로 여과한 후 여액이 완전히 증발할 때까지 50℃에서 감압 농축하여 최종적으로 말굽버섯 추출물을 수득하였다.

[0068] 실험예 1. 말굽버섯 추출물에 의한 근 기능 개선 관련 유전자 발현 변화 실험

- [0069] 1-1. 근 기능 개선 관련 유전자 발현 변화 실험 방법

- [0070] C2C12는 불멸화된 마우스 근섬유 세포주(immortalized mouse myoblast cell line)로서, *in vitro* 상에서 근육

연구를 할 때 널리 사용되는 세포주(cell line)이다. 고 혈청 조건(High serum conditions)에서 세포분열 속도가 매우 빠르며, 저 혈청 조건(low serum condition) 또는 결핍(starvation) 조건에서 빠르게 분화하여 수축성 근관인 다핵성 근관(multi nucleated myotube)을 형성하고 특징적인 근육 단백질을 생산한다. 따라서 근섬유(myoblast)의 분화, 근관(myotube)에 관련된 기계론적 생화학적 경로(mechanistic biochemical pathway)의 분석을 위한 다양한 단백질 또는 유전자 발현 연구에 사용된다.

[0071] 근 기능 개선 및 근육 활성의 변화를 확인하기 위하여 C2C12 근섬유 세포를 7일 동안 근관(myotube)으로 분화시킨 후, 말굽버섯 추출물 10 ug/ml 또는 100 ug/ml을 24시간동안 처리하였다. 그 후 세포를 트리졸(Trizol)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 상기 RNA에 역전사 효소(Reverse transcriptase, Nanohelix)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 qRT-PCR (CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad)을 실시하였다.

표 1

[0072]

유전자	방향	서열(5' -3')	서열번호
<i>MyoD</i>	Forward	CCGTGTTTCGACTCACCAGA	1
	Reverse	GTAGTAGGCGGTGTCGTAGC	2
<i>Myogenin</i>	Forward	GAGGAAGTCTGTGTCGGTGG	3
	Reverse	CCACGATGGACGTAAGGGAG	4
<i>NRF-1</i>	Forward	CTTCATGGAGGAGCAGGAG	5
	Reverse	ATGAGGCCGTTTCCGTTTCT	6
<i>Tfam</i>	Forward	GAGCGTGCTAAAAGCACTGG	7
	Reverse	CCACAGGGCTGCAATTTTCC	8
<i>CytC</i>	Forward	GGGCCTCGTTAGTGCAGCAGG	9
	Reverse	GGGCTCCCAGAAAAGTTGCCT	10
<i>COX2</i>	Forward	ACGAAATCAACAACCCCGTA	11
	Reverse	GGCACAACGACTCGGTTATC	12
<i>COX4</i>	Forward	ACTACCCCTTGCCTGATGTG	13
	Reverse	GCCCACAAGTGTCTTCCATT	14
<i>ATP5g1</i>	Forward	TGGGGACCAGGGCAGCCATT	15
	Reverse	AGGGCTTGCTGCCCACACAT	16
<i>SIRT1</i>	Forward	TGCCATCATGAAGCCAGAGA	17
	Reverse	AACATCGCAGTCTCCAAGGA	18
<i>SDHb</i>	Forward	ACTGGTGGACGGAGACAAG	19
	Reverse	GTTAAGCCAATGCTCGCTTC	20
<i>PGC-1 α</i>	Forward	GTCCTTCCTCCATGCCTGAC	21
	Reverse	GACTGCGGTTGTGTATGGGA	22
<i>UCP1</i>	Forward	CGGAAACAAGATCTCAGCCG	23
	Reverse	CTGACCTTCACGACCTCTGT	24
<i>ERR α</i>	Forward	GAGGTGGACCCCTTGCCTTT	25
	Reverse	GGCTAACACCCTATGCTGGG	26
<i>PPAR α</i>	Forward	ATCCAGGGTTCAGTCCAGTG	27
	Reverse	GCTTAGGGACAGTGACAGGT	28
<i>PPAR δ</i>	Forward	GTTCTCTGACCCTGTCTC	29
	Reverse	CCAGCAAGTTTCAAGCCACT	30
<i>TSC1</i>	Forward	TTATCCATCCTCTCGCTGCT	31
	Reverse	AGGTGCTGCTTCCCTGACT	32
<i>TSC2</i>	Forward	ATGGATGTTGGCTTGTCTC	33
	Reverse	CAGGCAGTTGTAGCAGACCA	34
<i>GAPDH</i>	Forward	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	35
	Reverse	GGATGCAGGGATGATGTTCT	36

[0073] 1-2. *myoD* 및 *myogenin*의 발현량 변화 측정

[0074] 상기 말굽버섯 추출물의 처리 농도에 따른 *myoD* 발현량 변화는 도 1에, *myogenin*의 발현량 변화는 도 2에 나타내었다.

- [0075] 그 결과, 말굽버섯 추출물을 10 ug/ml 및 100 ug/ml 처리한 경우 *myoD*의 발현량은 각각 3.523배 및 1.276배(도 1) 증가하였으며, *myogenin*의 발현량은 각각 2.633 및 1.967배(도 2) 증가한 것을 확인하였다.
- [0076] 상기 결과에 나타난 바와 같이, 두 가지 유전자 모두 10ug/ml에서의 발현양이 더 높은 것으로 보아 10ug/ml 농도의 말굽버섯 추출물은 분화를 촉진한다는 것을 확인하였다.
- [0077] *myoD* 및 *myogenin*는 근육 분화 조절 인자(myogenic regulatory factor)에 속하는 전사 인자들로, *myoD*는 위성 세포(satellite cell)로부터 근육 세포가 분화하기 위해 중요한 인자이며, 운동 또는 근육 조직 손상에 반응하여 발현량이 증대된다. *myogenin* 또한 근육 세포의 분화에 중요하며 특히 기능성 골격 근육의 발달에 필수적인 인자로서, 근육 분화(Myogenesis) 과정에서 근육 분화 전구세포(myogenic precursor cell)들의 적절한 분화에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0078] 결론적으로 이 두 가지 전사 인자들의 유전자 발현 증가는, 근육 세포의 분화를 유도하여 근 섬유의 형성과 골격근 질량의 증가를 유도하여 근 기능 개선에 매우 중요한 역할을 수행하게 될 뿐만 아니라, 근육 세포 손상이 일어날 경우 손상 치유를 유도할 수 있어 근육 세포 보호에 영향을 줄 수 있음을 의미한다.
- [0079] 1-3. NRF-1 및 Tfam의 발현량 변화 측정
- [0080] 상기 말굽버섯 추출물의 처리 농도에 따른 *NRF-1* 발현량 변화는 도 3에, *Tfam*의 발현량 변화는 도 4에 나타내었다.
- [0081] 그 결과, 말굽버섯 추출물을 처리하지 않은 경우와 비교하여 말굽버섯 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우에 *NRF-1*의 발현량은 3.7배, *Tfam*의 발현량은 2.4배 증가한 것을 확인하였다.
- [0082] *NRF-1*(Nuclear respiratory factor 1)은 산화적 인산화(oxidative phosphorylation) 및 미토콘드리아 신생(mitochondrial biogenesis) 관련 유전자 발현을 조절하는 전사 인자이고, *Tfam*(Mitochondrial transcription factor A)은 미토콘드리아 유전자의 전사와 복제를 조절하는 전사 인자로서, 말굽버섯 추출물의 투여에 의한 두 가지 유전자의 발현량 증가는 미토콘드리아 생합성 증대의 결과를 나타낸 것을 확인하였다.
- [0083] 1-4. CytC, Cox2 및 Cox4의 발현량 변화 측정
- [0084] 상기 말굽버섯 추출물의 처리 농도에 따른 *CytC* 발현량 변화는 도 5에, *Cox2*의 발현량 변화는 도 6에, *Cox4*의 발현량 변화는 도 7에 나타내었다.
- [0085] *CytC*(Mitochondrial cytochrome C), *Cox2*(Cytochrome c oxidase subunit 2), *Cox4*(Cytochrome c oxidase subunit 4)는 ATP를 합성하는 미토콘드리아의 내막에 존재하는 전자 전달계의 주요 단백질을 발현시키는 유전자이다. 말굽버섯 추출물의 처리 결과 *CytC*(도 5, 0.191배) 및 *Cox2*(도 6, 0.69배)에서는 유전자 발현이 증가하지 않았으나, *Cox4*(도 7, 2.088배)의 유전자 발현은 증가하는 것을 확인하였다.
- [0086] 1-5. ATG5g1의 발현량 변화 측정
- [0087] 상기 말굽버섯 추출물의 처리 농도에 따른 *ATG5g1*의 발현량 변화는 도 8에 나타내었다.
- [0088] *ATG5g1*는 미토콘드리아 ATP 합성효소(Mitochondrial ATP Synthase)의 막 서브유닛 c(membrane subunit c)를 암호화하는 유전자로서, 막 서브유닛 c는 ATP의 합성에 관여하는 단백질이다.
- [0089] 도 8에 나타난 바와 같이, 말굽버섯 추출물을 처리하는 경우 *ATG5g1* 유전자의 발현량이 증가한 것을 확인하였으며, 이를 통해 ATP 합성량이 증가함에 따라 에너지 전달체가 증가하여 근육 세포의 에너지 대사 및 세포 활성이 증가할 수 있음을 확인하였다.
- [0090] 1-6. SDHb 및 UCP1의 발현량 변화 측정
- [0091] 상기 말굽버섯 추출물의 처리 농도에 따른 *SDHb* 발현량 변화는 도 9에, *UCP1*의 발현량 변화는 도 10에 나타내었다.
- [0092] 그 결과, 말굽버섯 추출물을 처리하지 않은 경우와 비교하여 말굽버섯 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우에 *SDHb*의 발현량은 1.11배 증가, *UCP1*의 발현량은 0.02배로 감소한 것을 확인하였다.
- [0093] *SDHb*(Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial)는 복합체II의 철-황 서브유닛(iron sulfur subunit of complex II)로도 알려져 있으며, 미토콘드리아 내막에서 일어나는 TCA 사이클에서의 이화작용 중 숙신산의 산화 작용을 하며 FAD를 FADH₂로 환원시키는 효소를 암호화하는 유전자이다.

- [0094] *UCP1*은 터모제닌(Thermogenin) 또는 짝풀림 단백질 1(uncoupling protein 1)을 암호화하는 유전자로서, *UCP1* 단백질은 미토콘드리아 내막에서 산화적 인산화를 통해 생성된 양성자 농도 차를 감소시키는 역할을 한다.
- [0095] 즉, 말굽버섯 추출물을 처리하는 경우 *SDHb*의 유전자 발현 증가와 *UCP1*의 유전자 발현 감소효과를 보이므로, 상기 결과로부터 말굽버섯 추출물이 ATP 생산량 증대에 영향을 주는 것을 확인하였다.
- [0096] 1-7. *SIRT1*, *PGC1-α* 및 *ERR-α*의 발현량 변화 측정
- [0097] 상기 말굽버섯 추출물의 처리 농도에 따른 *SIRT1*의 발현량 변화는 도 11에, *PGC1-α*의 발현량 변화는 도 12에, *ERR-α*의 발현량 변화는 도 13에 나타내었다.
- [0098] *SIRT1*은 노화나 대사 등 세포 내에서 여러 가지 조절 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 다음과 같은 두 단백질의 대사 조절 전사 인자(metabolic regulatory transcription factor) *PGC1-α* / *ERR-α* 복합체를 탈아세틸화(deacetylation) 시켜 활성을 조절하기도 한다.
- [0099] *PGC1-α* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)는 에너지 대사에 관여하는 전사 공활성인자(transcription coactivator)로서 외부자극에 반응하여 미토콘드리아의 생합성에 직접 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 지구력 운동을 하면 이 단백질의 발현이 골격근에서 증가하게 된다.
- [0100] *ERRα* (Estrogen-related receptor alpha)는 대사와 에스트로젠 신호전달에 관여하는 핵막 수용체로서, 대사적 관점에서 보면 미토콘드리아 생합성(mitochondrial biogenesis)이나 포도당신생합성(gluconeogenesis), 산화적 인산화, 지방산 대사(fatty acid metabolism)에 관련된 유전자의 발현을 증대시킨다.
- [0101] 즉, 말굽버섯 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우 *SIRT1*(도 11, 3.039배), *PGC1-α*(도 12, 3.634배) 및 *ERR-α*(도 13, 1.1배) 모두에서 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0102] 1-8. *PPAR-α* 및 *PPAR-β*의 발현량 변화 측정
- [0103] 상기 말굽버섯 추출물의 처리 농도에 따른 *PPAR-α* 발현량 변화는 도 14에, *PPAR-β*의 발현량 변화는 도 15에 나타내었다.
- [0104] *PPARs*(Peroxisome proliferator-activated receptors)는 α , β , γ 세종류가 있으며 대사과정과 세포 증식, 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이중 α , β 두 가지는 대부분 조직에서 발현하며, 근육에서도 지방산의 대사과정을 조절한다. *PPAR-α*는 지방산의 수송과 활성화에 관여하는 유전자 발현을 증가시키며, *PPAR-β*는 에너지대사에 포도당 대신 지방산을 사용을 증가시킨다.
- [0105] 말굽버섯 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우 *PPAR-α*(도 14, 3.43 배)의 유전자 발현 및 *PPAR-β/δ*(도 15, 1.18 배)의 유전자 발현을 모두 증가시켰으며 특히 *PPAR-α*의 발현량을 크게 증가시켰으므로, 본 발명의 말굽버섯 추출물이 근육으로의 지방산 수송을 촉진함으로써 에너지 항상성에 기여하는 것을 확인하였다.
- [0106] 즉, 상기 결과를 종합하여 고려할 때, 본 발명의 말굽버섯 추출물은 글루코스와 지방산의 흡수 및 산화를 증가시켜 에너지 항상성을 유지시켜 주는데 기여하고, 미토콘드리아 생합성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0107] 1-9. *TSC1* 및 *TSC2*의 발현량 변화 측정
- [0108] 상기 말굽버섯 추출물의 처리 농도에 따른 *TSC1* 발현량 변화는 도 16에, *TSC2*의 발현량 변화는 도 17에 나타내었다.
- [0109] *TSC1*(Tuberous sclerosis 1) 및 *TSC2*(Tuberous sclerosis 2)는 함께 TSC 복합체를 이루어 세포 크기를 조절한다. 또한, TSC 복합체는 GTP 가수분해효소-활성화 단백질(GTPase-activating protein, GAP)로 작용하여 mTOR 신호전달 경로를 음성적으로 조절한다.
- [0110] 상기 mTOR(Mammalian target of rapamycin)는 외부 신호에 의해 활성화되어 신호 전달(signal transduction)에 의해, 세포 성장(cell growth), 세포 증식(cell proliferation), 세포 운동성(cell motility), 세포 생존(cell survival), 단백질 합성(protein synthesis), 자가 포식(autophagy) 등의 관련 유전자 발현을 조절하는 단백질로서, 근육 세포에서는 세포 증식에 관여하여 근육량을 증대시키는 기능이 알려져 있다.
- [0111] 즉, 말굽버섯 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우의 *TSC1/2*의 발현 감소 정도가 각각 0.13배(도 16) 및 0.21배(도 17)이므로, 본 발명의 말굽버섯 추출물을 투여하면 mTOR 신호를 활성화하여 세포 활성화와 근육량을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0112] **실험예 2. 말굽버섯 추출물에 의한 근 기능 개선 관련 단백질 발현 변화 실험**

[0113] 근 기능 개선 및 근육 활성을 확인하기 위하여 C2C12 세포를 7일 동안 분화시킨 후, 말굽버섯 추출물을 각각 10 ug/ml 또는 100 ug/ml 농도로 24시간 처리하였다. 그 후 세포를 변형된 RIPA 버퍼를 이용하여 파쇄한 다음 각 조건별로 20 ug의 단백질을 채취하여 분석에 사용하였다.

[0114] 1차 항체는 ERK(sc-135900: santa cruz) p-ERK(9101S, Cell Signaling), mTOR(sc-8319, santa cruz) p-mTOR(2971, Cell signaling), p70S6k(sc-230, santa cruz), p-p70S6k(sc-11759, santa cruz), p38(sc-535, santa cruz), p-p38(sc-17852-R, santa cruz), p-AMPK(4186, Cell signaling), GAPDH(sc-25778, santa cruz)를 사용하였으며, 2차 항체는 mouse anti-rabbit IgG-HRP(sc-2357, santa cruz) 및 m-IgGk BP-HRP(sc-516102, santa cruz)를 사용하여 분석하였고, 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[0115] 도 18에 나타난 바와 같이, 말굽버섯 추출물에 의해 C2C12 세포의 ERK1/2의 인산화가 촉진되었음을 확인하였다. ERKs(Extracellular signal-regulated kinases)는 사람에서 여러 조직의 세포 증식에 관여한다고 알려진 MAP(Mitogen-activated protein) 경로의 주요 키나아제 단백질로서, 이를 통해 본 발명의 말굽버섯 추출물이 근육 세포의 성장을 증대시키는 것을 확인하였다.

[0116] mTOR(Mammalian target of rapamycin)는 특정 아미노산 또는 아미노산 유도체의 물리적 운동 및 섭취로 의해 반응하여 인간의 근섬유 및 근육 단백질 합성을 통한 골격 근육 비대에 필수적이다. 따라서 mTOR의 활성화 즉 인산화의 증가는 세포 활성 및 근육량 증대에 매우 중요한 요소에 해당하며, 본 발명의 말굽버섯 추출물은 TSC1/2의 발현 감소와 함께 mTOR 신호 전달 경로를 활성화시켜 세포 활성과 근육량의 증가에 기여할 수 있음을 확인하였다.

[0117] S6K1(Ribosomal protein S6 kinase beta-1)는 p70S6 kinase(p70S6K, p70-S6K)로도 알려져 있으며, 상기 mTOR에 의해 조절되는 키나아제 중 하나이다. p70S6K는 세포 내 신호전달에 관여하여 mTOR 신호 전달 경로에 의해 인산화되면 단백질 합성을 활성화하는 역할을 수행한다. 본 발명의 말굽버섯 추출물에 의한 mTOR의 인산화는 p70S6K의 인산화로 이어져 근육 증대에 영향을 준 것을 확인하였다(도 18).

[0118] p38은 ERK1/2와 함께 MAP 경로의 주요 키나아제 단백질 중 하나로, 마찬가지로 여러 가지 조직에서 세포 증식에 관여해 있다고 알려져 있으며, 근육에서도 또한 p38의 인산화가 세포의 증식을 촉진한다고 알려져 있다. 따라서 p38의 인산화 증가(도 18)로부터 본 발명의 말굽버섯 추출물이 근육 세포의 분화에 영향을 주어 근육량 증가에 기여할 수 있음을 확인하였다.

[0119] AMPK(5' AMP-activated protein kinase)는 세포 에너지 항상성에 역할을 하는 효소이며, 본 발명의 말굽버섯 추출물에 의한 AMPK의 인산화 증가(도 18)로부터 본 발명의 말굽버섯 추출물이 미토콘드리아 생합성 및 전자 전달계 효소 유전자 발현량 증대와 함께, 미토콘드리아 생합성(mitochondrial biogenesis)을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0120] **실험예 3. 말굽버섯 추출물에 의한 C2C12 세포 내의 ATP양 변화**

[0121] 본 발명의 말굽버섯 추출물에 의한 근육의 에너지 합성 증대 효과를 확인하기 위해 C2C12 세포 내 ATP양을 측정하였다.

[0122] 구체적으로, C2C12 세포를 7일 동안 분화시킨 후, 말굽버섯 추출물을 각각 10 ug/ml 또는 100 ug/ml 농도로 24시간 처리하였다. 분화된 세포는 상온에서 2X ATP 검출시약(detection reagent)을 넣어준 다음, Mitochondrial ToxGlo™ Assay kit(Promega)를 사용하여 형광(Luminescence)을 측정하였고, 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[0123] 그 결과, 도 19에 나타난 바와 같이 말굽버섯 추출물은 농도에 의존적으로 세포 내의 ATP양을 증가시킴을 확인하였으며, 10 ug/ml의 저농도에서도 약 20% 이상의 증가 효과가 나타나, 근육 내 에너지 합성 효과가 뛰어난 것을 확인하였다.

[0124] 이는 상기 결과와 같이 미토콘드리아의 생합성 및 ATP 합성 관련 유전자들의 발현을 증가시켜 결론적으로 에너지 합성을 증가시킨 것으로서, 말굽버섯 추출물이 근 기능 개선 및 근육 세포의 활성을 증가시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

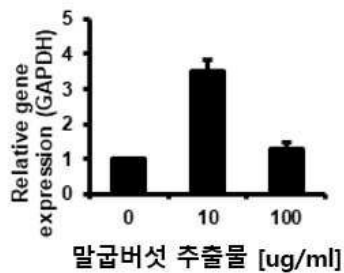
[0125] **실험예 4. 말굽버섯 추출물에 의한 세포 성장 변화 확인**

[0126] 본 발명의 말굽버섯 추출물에 의한 세포 증식능력 개선 효과를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다.

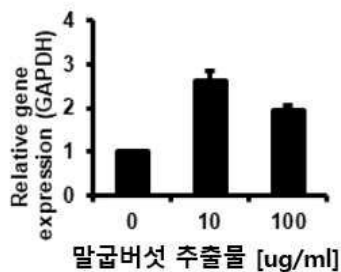
- [0127] 구체적으로, 10^3 cells의 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트(SPL)의 각 웰에 넣은 후 DMSO에 용해된 말굽버섯 추출물을 각각 10ug/ml 및 100ug/ml로 배양 플레이트에 추가하고 48시간 배양하였다. 대조군 DMSO는 최대 농도가 0.2%를 초과하지 않도록 각 플레이트에 투입하였다.
- [0128] 48시간 배양 후 $100\mu\text{l}$ 의 5mg/ml MTT(sigma Cat. M2128)를 투입한 후, 2시간 동안 37°C 에서 반응시켰다. 배지를 제거 후 0.1ml의 DMSO를 투입하고 10분 동안 상온에서 반응시킨 후 마이크로 플레이트 리더(micro plate reader; BioTek Instruments, 한국)를 이용하여 540nm 흡광도에서 활성을 측정하였고, 그 결과를 도 20에 나타내었다.
- [0129] 그 결과, 도 20에 나타난 바와 같이 말굽버섯 추출물을 처리한 세포군에서 대조군보다 세포의 생존률이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였으며, 세포 독성 또한 없는 것으로 나타났다. 따라서 상기한 결과로부터 말굽버섯 추출물은 인체에 해롭지 않으며, 근육 세포의 증식을 촉진시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0130] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0131] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

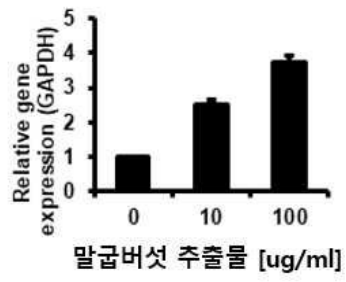
도면1



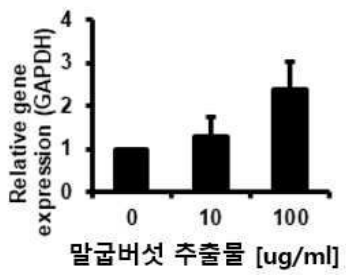
도면2



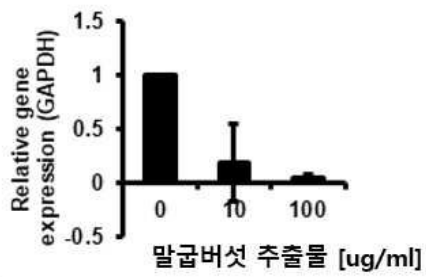
도면3



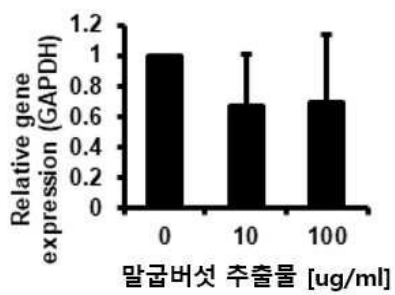
도면4



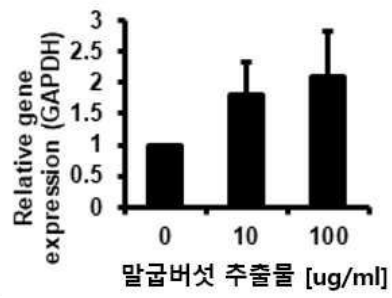
도면5



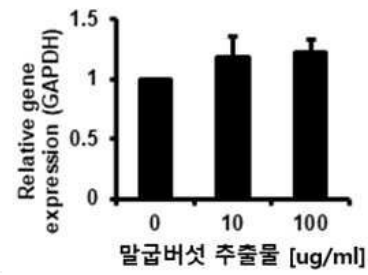
도면6



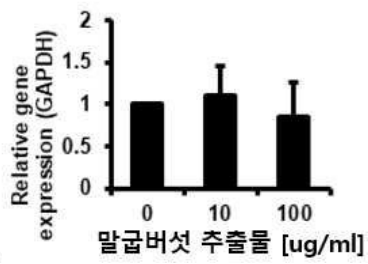
도면7



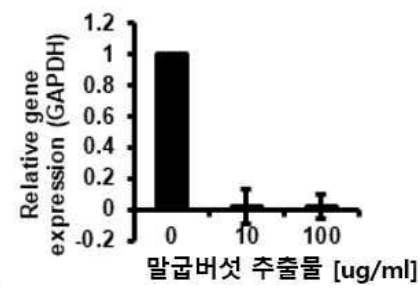
도면8



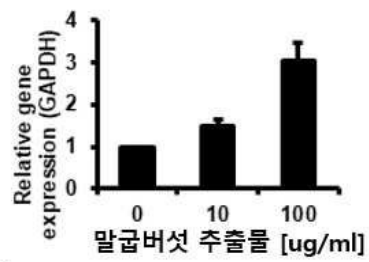
도면9



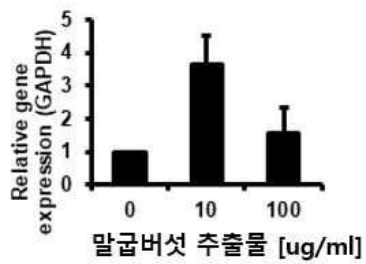
도면10



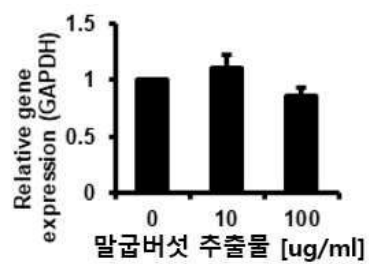
도면11



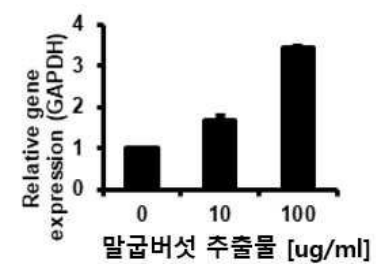
도면12



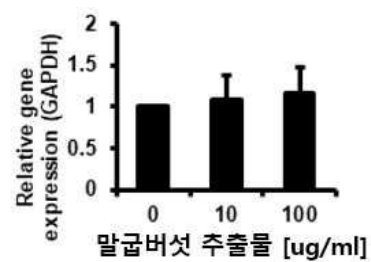
도면13



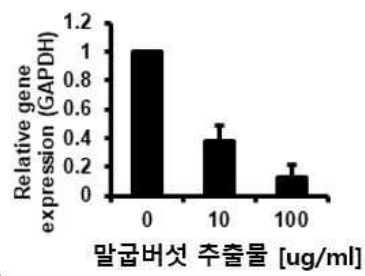
도면14



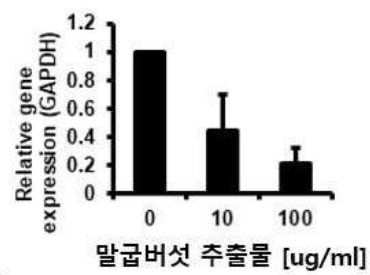
도면15



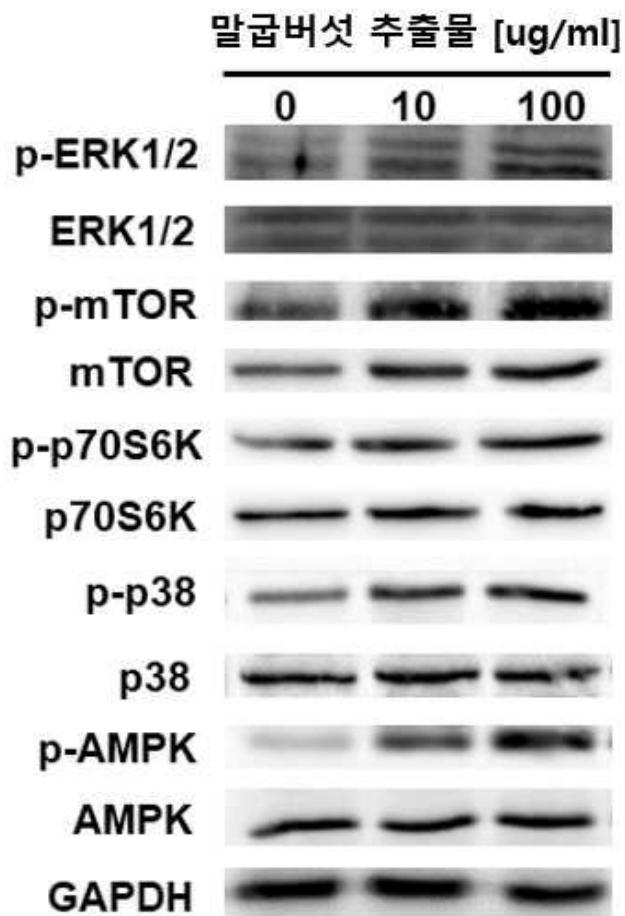
도면16



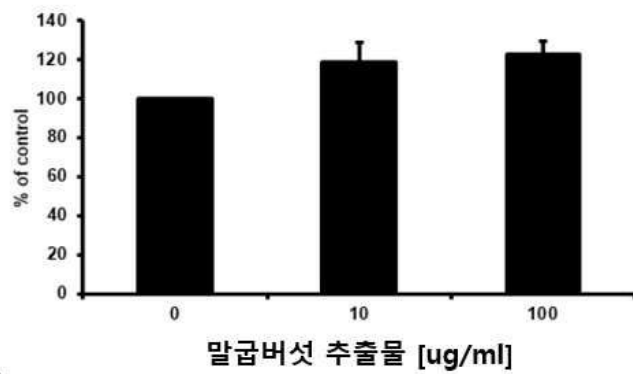
도면17



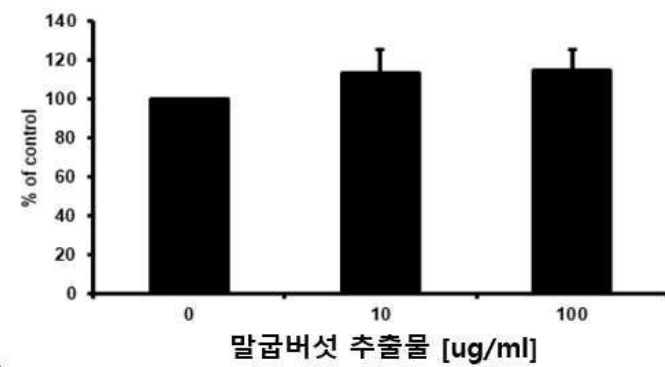
도면18



도면19



도면20



서 열 목 록

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

<120> COMPOSITION FOR IMPROVING MUSCLE FUNCTION, COMPRISING FOMES
FOMENTARIUS EXTRACT

<130> 19PP31199

<160> 36

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MyoD_F

<400> 1

ccgtgtttcg actcaccaga

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MyoD_R

<400> 2

gtagtaggcg gtgtcgtagc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Myogenin_F

<400> 3

gaggaagtct gtgtcggtagg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Myogenin_R

<400> 4

ccacgatgga cgtaaggag 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRF-1_F

<400> 5

cttcatggag gagcacggag 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRF-1_R

<400> 6

atgaggccgt ttccgtttct 20

<210> 7

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tfam_F
 <400> 7
 gagcgtgcta aaagcactgg 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tfam_R
 <400> 8
 ccacagggct gcaattttcc 20

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CytC_F
 <400> 9
 gggcctcggt agtcagcag g 21

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CytC_R
 <400> 10
 gggctcccag aaaaggttgc ct 22

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> COX2_F
 <400> 11

acgaaatcaa caaccccgta	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> COX2_R	
<400> 12	
ggcacaacga ctcggttatc	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> COX4_F	
<400> 13	
actaccctt gcctgatgtg	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> COX4_R	
<400> 14	
gcccacaact gtcttcatt	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ATP5g1_F	
<400> 15	
tggggaccag ggcagccatt	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ATP5g1_R	

<400>	16	
agggttgct gccacacat		20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SIRT1_F	
<400>	17	
tgccatcatg aagccagaga		20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SIRT1_R	
<400>	18	
aacatcgag tctccaagga		20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SDHb_F	
<400>	19	
actggtggaa cggagacaag		20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SDHb_R	
<400>	20	
gttaagccaa tgctcgttc		20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> PGC-1a_F

<400> 21

gtccttcctc catgcctgac 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PGC-1a_R

<400> 22

gactgcggtt gtgtatggga 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UCP1_F

<400> 23

cggaacaag atctcagccg 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UCP1_R

<400> 24

ctgacattca cgacctctgt 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERRa_F

<400> 25

gaggtggacc cttgccttt 20

<210> 26

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ERRa_R
 <400> 26
 gaggtggacc cttgccttt 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPARa_F
 <400> 27
 atccagggtt cagtccagtg 20
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPARa_R
 <400> 28
 gcttagggac agtgacaggt 20

 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPAR_delta_F
 <400> 29
 gttcctctga ccctgtcctc 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPAR_delta_R
 <400> 30
 ccagcaagtt tcaagccact 20

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TSC1_F
 <400> 31
 ttatccatcc tctcgctgct 20

<210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TSC1_R
 <400> 32
 aggtgctgct tccctgact 19

<210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TSC2_F
 <400> 33
 atggatgttg gcttgcctc 20

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TSC2_R
 <400> 34
 caggcagttg tagcagacca 20

<210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH_F

<400>	35	
aactttggca ttgtggaagg		20
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH_R	
<400>	36	
ggatgcaggg atgatgttct		20