(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0092401
(43) 공개일자 2022년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A23L 5/20* (2022.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 5/23 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0183652
(22) 출원일자 2021년12월21일
심사청구일자 2021년12월21일
(30) 우선권주장
1020200183233 2020년12월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김현수
서울특별시 노원구 덕릉로86길 29-25(중계동)
한정순
서울특별시 강남구 압구정로61길 37, 72동 307호 (압구정동,한양아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 19 항

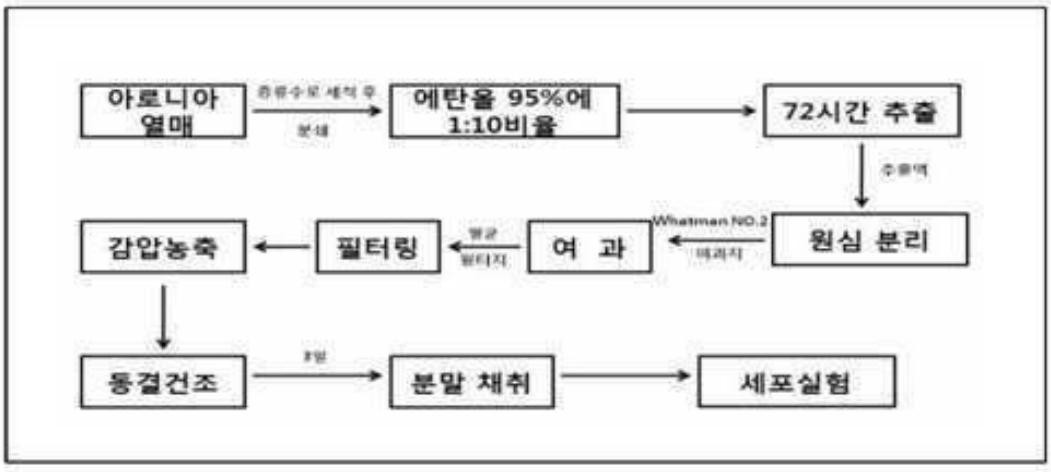
(54) 발명의 명칭 **아로니아 추출물을 유효성분으로 함유하는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 아로니아 추출물을 유효성분으로 함유하는 근감소 억제용 식품 조성물에 관한 것으로, 시아니딘 배당체 또는 그 약학적으로 유효한 염을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공한다.

본 발명에 따를 때, 시아니딘이 마이오스타틴의 발현양을 억제하여 근육 손실을 방지하며, 천연물 추출 공정에 의해 안전성이 우수한 약리 효과를 기대할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/316 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
(72) 발명자
김시현
서울특별시 도봉구 도당로31길 20, 202호(방학동, 세광빌라)
김수진
서울특별시 성북구 안암로 145(안암동5가,고려대학교안암캠퍼스)

명 세 서

청구범위

청구항 1

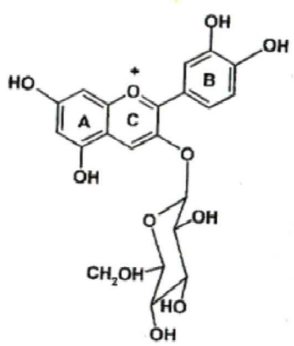
아로니아 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아로니아 추출물은 하기 화학식 1의 시아니딘 배당체 또는 이의 약학적으로 유효한 염을 유효성분으로 함유하는, 약학적 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아로니아 추출물의 농도는 0.1 mg/ml 내지 1000 mg/ml 인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 아로니아 추출물은 젖산탈수소효소(LDH), 크레아틴키나제(CK) 또는 이 둘 모두의 혈중 농도를 감소시키는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 아로니아 추출물은 근육 단백질을 파괴하는 마이오스타틴(Myostatin)의 발현을 억제하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 아로니아 추출물은 mTOR를 포함하는 세포 내 단백질 합성 기전을 활성화시키는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 경직성 척추 증후군(rigid spinsesyndrome), 샤르코-마리-투스병 (Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근육 감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학적 조성물..

청구항 9

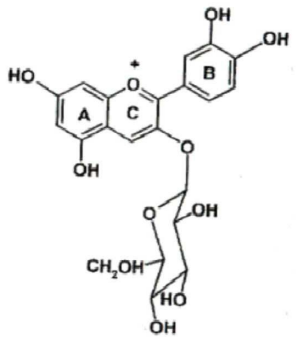
제1항에 있어서,

상기 아로니아 추출물은 물, C_1내지 C_4의 저급알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

하기 화학식 1의 시아니딘 배당체 또는 이의 약학적으로 유효한 염을 유효성분으로 함유하는, 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 시아니딘 배당체는 또는 이의 염은 아로니아 유래의 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 시아니딘 배당체 또는 이의 염은 근육 단백질을 파괴하는 마이오스타틴(Myostatin)의 발현을 억제하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 시아니딘 배당체 또는 이의 염은 mTOR를 포함하는 세포 내 단백질 합성 기전을 활성화시키는, 약학적 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것인,

약학적 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 경직성 척추 증후군(rigid spinsesyndrome), 샤르코-마리-투스병 (Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근육 감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

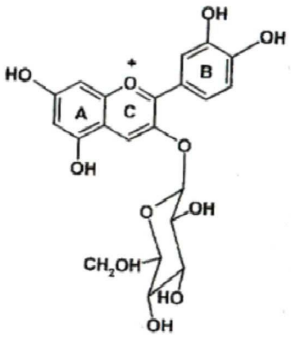
청구항 16

아로니아 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근 기능 개선용 식품 조성물.

청구항 17

하기 화학식 1의 시아니딘 배당체 또는 이의 약학적으로 유효한 염을 유효성분으로 함유하는, 근 기능 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]



.

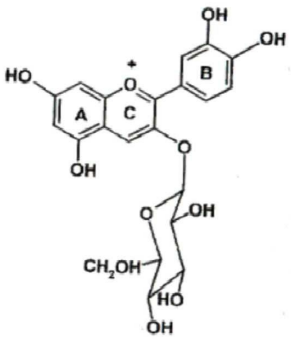
청구항 18

아로니아 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근육 양(muscle mass) 증가 또는 근육 감소 억제 식품 조성물.

청구항 19

하기 화학식 1의 시아니딘 배당체 또는 이의 약학적으로 유효한 염을 유효성분으로 함유하는, 근육 양(muscle mass) 증가 또는 근육 감소 억제용 식품 조성물:

[화학식 1]



.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아로니아 추출물을 유효성분으로 함유하는 근력강화, 근육증강, 근육재생, 또는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 최근 고령인구가 전세계적으로 급증하는 추세에 있는 가운데, UN에 따르면 2050년에는 60세 이상 인구가 20억명이 넘을 것으로 예측되고 있다. 근육 감소와 근력 약화는 노화로 인해 일어나는 주요 신체 변화증상 중 하나로, 40세 이상부터 단계적으로 진행되는 것으로 알려져 있다. 골격근은 전체 몸무게의 50%에 달하는 가장 큰 기관이며, 근감소증(sarcopenia)은 신체능력을 저하시키고 낙상과 골절의 위험을 높이는 등 삶의 질에 큰 영향을 미치기 때문에 근감소증에 대한 연구는 앞으로 더 활발해질 것으로 예상된다.

[0004] 근감소의 치료법으로는 미토콘드리아 생성 증가, 근육 단백질 분해억제, 항염제 등이 제시되고 있으나 뚜렷한 치료약이 없는 실정이다. 근감소 치료의 일환으로, 호르몬 치료가 대표적으로 행해지고 있으나 그다지 효과적이지 않고 부작용들이 속속들이 보고되고 있으며, 끼니마다 25 내지 30 g에 해당하는 양질의 단백질을 섭취하는 식이요법도 제안되었으나, 이는 달걀 4 내지 5개 또는 닭가슴살 약 120 g을 매 끼니마다 섭취해야만 도달할 수 있는 양으로서 현실적으로 일반인이 실천하기는 매우 어렵다.

[0005] 따라서 최근 많은 사람들이 단백질 보충제를 대안으로 선택하고 있으나, 단백질 보충제의 섭취는 단백질 과다 섭취의 원인이 될 수 있어 부작용이 발생할 가능성이 높다. 더욱이 신장 질환이 있는 경우에는 고단백질 식이를 수행할 수 없고, 노화가 진행됨에 따라 신장의 기능 또한 감소하므로 근감소증의 예방을 위해서 고단백질 섭취 이외의 다른 대안이 필요하다.

[0006] 등록특허공보 10-1617590호 '아로니아, 아사이베리 및 스테비아 추출물을 포함하는 항비만 식품 조성물'에는 아사이베리 추출물 100 중량부, 아로니아 추출물 50~100 중량부 및 스테비아 추출물 10~20 중량부를 포함하는 것이 기재되어 있다. 근감소는 지방세포의 활성과도 연관이 있어, 비만 예방 조성물과 함께 많이 연구되고 있고, 이에 착안하여 아로니아의 유효 성분을 추출하여 근감소 억제를 위한 마이오스타틴 활성 억제 용도를 연구하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-1617590

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 아로니아 추출물의 근육 질환 예방 및 치료, 근육 재생 및 근육 강화, 및 근육 양 증가의 용도를 제공하는 것이다.

[0010] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

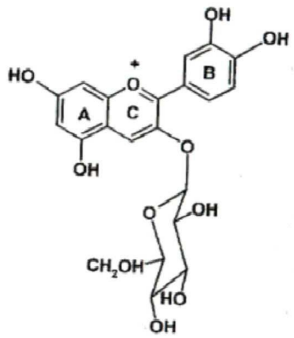
과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 측면은, 아로니아 추출물을 유효성분으로 함유하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 일 실시형태에 따를 때, 상기 아로니아 추출물은 하기 화학식 1의 시아니딘 배당체 또는 그 약학적으로 유효한

염을 유효성분으로 함유하는 것일 수 있다.

[0014] [화학식1]



[0015]

[0016] 일 실시형태에 따를 때, 상기 아로니아 추출물의 농도는 0.1 mg/ml 내지 1000 mg/ml일 수 있다.

[0017] 일 실시형태에 따를 때, 상기 아로니아 추출물은 젖산탈수소효소(LDH), 크레아틴키나제(CK) 또는 이 둘 모두의 혈중 농도를 감소시키는 것일 수 있다.

[0018] 일 실시형태에 따를 때, 상기 아로니아 추출물은 물, C_1내지 C_4의 저급알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 시아니딘 배당체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 일 실시형태에 따를 때, 상기 시아니딘 배당체는 아로이나 유래의 것일 수 있으며, 특히 아로니아의 알코올 추출물로부터 획득되는 것일 수 있다.

[0020] 일 실시형태에 따를 때, 본 발명의 조성물은 농도에 비례하여 마이오스타틴의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0021] 일 실시형태에 따를 때, 본 발명의 조성물은 mTOR를 포함하는 세포 내 단백질 합성 기전을 활성화시키는 것일 수 있다.

[0022]

[0023] 일 실시형태에 따를 때, 상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환일 수 있으며, 상술한 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 및 근육 퇴화는 항암제(특히 독소루비신), 덱사메타손, 및/또는 영양결핍에 의한 것일 수 있다.

[0024] 일 실시형태에 따를 때, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 경직성 척추 증후군(rigid spinsesyndrome), 샤르코-마리-투스병 (Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근육 감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 아로니아 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근 기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 시아니딘 배당체 또는 이의 약학적으로 유효한 염을 유효성분으로 함유하는, 근 기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0027] 일 실시형태에 따를 때, 근 기능의 개선이란 골격근 기능의 개선을 의미하며, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근 기능 약화를 예방하거나 이를 지연시키는 것을 포함하는 의미이다.

[0028] 또한, 본 발명은 아로니아 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육 양(muscle mass) 증가 또는 근육 감소 억제 식품 조성물을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 시아니딘 배당체 또는 이의 약학적으로 유효한 염을 유효성분으로 함유하는 근육 양(muscle mass) 증가 또는 근육 감소 억제 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 근육 질환 예방 및 치료 효과를 갖는 아로니아 추출물과 이의 유래의 시아니딘 배당체는 골격근의 기능을 향상시키고 근 손실을 유도하는 단백질의 발현을 감소시키며 근육의 발생 및 성장을 증진하는 신호전달 경로를 활성화시키는바, 근육 질환의 개선, 예방, 및 치료 효과를 갖는다. 또한, 본 발명의 아로니아 추출물은 오랫동안 높은 안전성이 검증된 천연물 유래의 것으로서 사용에 따른 부작용이 매우 적거나 없다는 장점을 가진다. 이에, 본 발명의 조성물은 근육 질환의 치료 등의 용도 외에도 근 손실을 억제하고 근량을 증가시키며 근육의 기능을 향상시키기 위한 의약용, 의약부외용, 향장소재용, 신체 활력 증진, 기능성 바이오 소재용 및 기능성 식품소재용 등 다양한 방면으로 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1 은 아로니아의 주정 추출 공정에 관한 공정도이다.

도 2는 아로니아 추출물을 3시간 전처리한 후, 실험예2에 따른 근육 세포 생존률을 테스트하기 위한 MTT 분석 그래프이다.

도 3은 아로니아 추출물을 24시간 전처리한 후, 실험예2에 따른 근육 세포 생존률을 테스트하기 위한 MTT 분석 그래프이다.

도 4는 본 발명의 실험예3에 따른 마이오스타틴 발현 정도를 비교한 그래프이다.

도 5는 본 발명의 실험예1에 따른 동물실험의 Grip strength 결과 그래프이다.

도 6은 본 발명의 실험예1에 따른 동물실험의 Hanging time 과 Holding impulse에 대한 결과 그래프이다.

도 7은 본 발명의 실험예1에 따른 동물실험의 근육 조직 무게 측정과 골격근 근육량의 사진 비교이다.

도 8은 본 발명의 실험예1에 따른 동물실험의 Lean mass 및 fat mass 측정 결과이다.

도 9는 본 발명의 실험예1에 따른 동물실험의 체중변화 및 섭식량 관찰 그래프이다.

도 10은 본 발명의 실험예 1에 따른 동물실험의 마이오스타틴 혈중 농도 그래프이다.

도 11은 본 발명의 실험예1에 따른 동물실험의 마이크로 CT 사진과 CT 검사결과 그래프이다.

도 12는 본 발명의 실험예2에 따른 세포실험에서 세포 손상 없이 처리한 MTT 결과 그래프이다.

도 13은 본 발명의 실험예2에 따른 마이오스타틴 발현 분석 그래프이다.

도 14는 본 발명의 실험예3에 따른 시아니딘의 MTT 결과에 따른 결과 그래프이다.

도 15는 본 발명의 실험예3에 따른 시아니딘의 마이오스타틴 프로모터 활성 그래프이다.

도 16은 본 발명의 실험예3에 따른 웨스턴 블롯 사진이다.

도 17은 본 발명의 실험예3에 따른 마이오스타틴과 베타 액틴 웨스턴블롯 사진이다(독소루비신 처리).

도 18은 본 발명의 실험예3에 따른 마이오스타틴과 베타 액틴 웨스턴블롯 사진이다(덱사메타손 처리).

도 19는 아로니아 추출물과 블루베리 추출물의 마이오스타틴 발현 억제 효능을 비교확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0035] 실시예에서 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.

[0036] 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.

[0038] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0039] 어느 하나의 실시예에 포함된 구성요소와, 공통적인 기능을 포함하는 구성요소는, 다른 실시예에서 동일한 명칭을 사용하여 설명하기로 한다. 반대되는 기재가 없는 이상, 어느 하나의 실시예에 기재한 설명은 다른 실시예에도 적용될 수 있으며, 중복되는 범위에서 구체적인 설명은 생략하기로 한다.

[0041] 이하, 본 발명의 조성물에 대하여 실시예 및 도면을 참조하여 구체적으로 설명하도록 한다. 그러나, 본 발명이 이러한 실시예 및 도면에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 일 측면은, 아로니아 추출물을 유효성분으로 함유하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0044] 상기 식품 조성물은 아로니아 열매의 활성성분을 추출하여 근육 질환 예방 또는 치료용으로 투여할 수 있는 것을 의미할 수 있으며, 활성성분의 농축함량 때문에 블루베리 추출물과는 구분된다.

[0045] 상기 아로니아 추출물은 생 아로니아 열매를 동결 건조한 후 알코올 추출한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 상기 아로니아 추출물은, 액체 형태 또는 분말 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

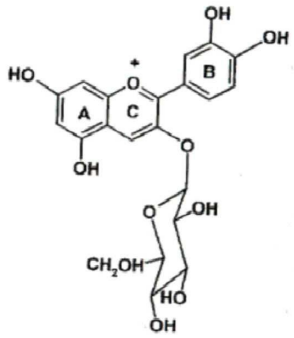
[0047] 상기 추출물은 조추출물(crude extract)로 통용되는 의미를 가질 수 있으며, 광의적으로는 추출물을 추가적으로 분획 (fractionation)한 분획물도 포함될 수 있다. 즉 상기 아로니아 추출물 또는 이의 분획물은, 추출 용매를 이용하여 얻은 것뿐만 아니라, 정제과정을 추가적으로 진행하여 수득한 분획물도 포함한다. 상기 분획은, 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획을 의미할 수 있다.

[0048] 상기 아로니아 추출물의 유효성분은, 근육질환을 예방 또는 치료하거나, 근기능을 개선시킬 수 있는 성분이라면 모두 포함될 수 있다. 유효성분은, 바람직하게는 폴리페놀, 안토시아닌, 카테킨을 포함할 수 있고, 상기 폴리페놀은 델피니딘, 시아니딘, 페튜니딘, 펠라고니딘, 피오니딘 또는 말비딘를 포함할 수 있으나, 가장 바람직하게는 시아니딘일 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명의 조성물은 근위축 억제, 근육량 증가, 근 비대 활성 등을 위하여 식품에 첨가될 수 있다.

[0050] 일 실시형태에 따를 때, 상기 아로니아 추출물은, 하기 화학식 1의 시아니딘 배당체 또는 그 약학적으로 유효한 염을 유효성분으로 함유하는 것일 수 있다.

[0051] [화학식1]



[0052]

[0053] 상기 아로니아는 베리류의 대표적 항산화 물질로 알려진 블루베리와 달리 시아니딘 성분이 대부분이며 그 외에 떫은 맛을 내는 탄닌을 다량 포함한다.

[0054] 아로니아의 탄닌은 단백질과의 결합에 의해 수렴, 정장작용을 가지며, 탄닌과 그 분해산물은 금속이온, 염기성 화합물과 결합하며 유해 중금속 제거와 변이원성물질의 제거한다. 단백질을 과도하게 섭취할 경우 질소성 노폐물을 다량 축적시켜 요독증을 유발하고 신장에 부담을 주는데, 탄닌의 중금속, 질소 흡착으로 인해 이와 같은 부작용을 예방할 수 있다.

[0055] 상기 화학식 1은 시아니딘-3배당체이며, 안토시아닌계 색소 성분으로 시아니딘이 포도당(glucose)과 결합된 형태이다.

[0056] 바람직하게는, 상기 화학식 1의 시아니딘 배당체는 동결 건조한 생 아로니아 열매를 알코올 추출한 추출물로부터 분리 정제된 성분일 수 있다.

[0057] 일 실시형태에 따를 때, 상기 아로니아 추출물은, 탄닌을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0058] 상기 탄닌은, 거대 분자량을 가지며, 수용성 탄닌이 다량 포함될 경우 떫은 맛을 느끼게 하지만, 알코올 처리시 조직내 알코올 탈수소 효소의 작용으로 일부 불용화과정을 거치며 떫은 맛을 중화한다. 또한 불용화에 의해 갈산 또는 에라그산을 생성하여 근세포 분화를 촉진할 수 있다.

[0059] 특히 식물성 탄닌은 단백질과 잘 결합하는 성질을 가지고, 단백질 분해 효소의 작용을 저해하여 시아니딘 배당체와 시너지를 낼 수 있다.

[0060] 일 실시형태에 따를 때, 상기 아로니아 추출물의 농도는, 0.1 mg/ml 내지 1000 mg/ml일 수 있다.

[0061] 아로니아 추출물의 농도는, 동결 건조 아로니아 열매를 알코올 추출한 스톡(stock)을 기준으로 증류수에 희석시킨 것을 측정한다.

[0062] 상기 스톡은 10 g/ml 내지 50 g/ml, 바람직하게는 30 g/ml 내지 40 g/ml 일 수 있다.

[0063] 상기 범위 미만의 스톡은 근감소 억제용도를 갖는 아로니아의 활성성분을 충분히 추출하지 못할 수 있고, 범위를 초과할 경우, 비용상 이점이 사라질 수 있다.

[0064] 상기 스톡의 1/100000 내지 1/10까지 아로니아 추출물로 사용해도 근감소 억제 효능을 나타낼 수 있다.

[0065] 일 실시형태에 따를 때, 상기 아로니아 추출물은, 젖산탈수소효소(LDH), 크레아틴키나제(CK) 또는 이 둘 모두의 혈중 농도를 감소시키는 것일 수 있다.

[0066] 상기 젖산탈수효소 및 크레아틴키나제는 근육 손상시 분비되는 것으로, 근감소의 지표가 될 수 있다.

[0067] 일 실시형태에 따를 때, 상기 아로니아 추출물은, 농도에 비례하여 마이오스타틴의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0068] 본 발명자들은 아로니아 추출물이 상기 마이오스타틴의 발현 수준을 감소시킴을 luciferase assay를 통해 확인하였다. 마이오스타틴은 발현량에 비례하게 근육 손실이 일어난다.

[0069] 본 발명의 다른 측면은, 아로니아의 활성성분을 알코올 추출하는 단계, 상기 아로니아 추출물을 희석시키는 단계 및 상기 희석 추출물을 손상 근육세포에 처리하는 단계를 포함하는, 근감소 억제 방법을 제공한다.

[0070] 상기 알코올 추출은 동결 건조된 아로니아 생 열매를 알코올에 담지하거나, 동결 건조 아로니아 분말을 용매에 넣어 상온 추출하는 것으로, 열수 추출과 상이하다.

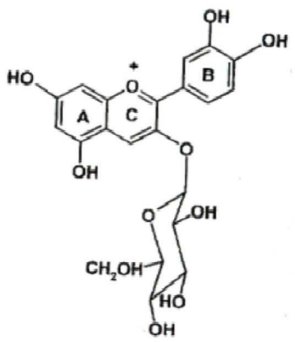
[0071] 열수 추출의 경우, 높은 온도로 끓이는 과정에서 아로니아의 주요 활성 성분이 일부 소실될 수 있으며, 특히 시아니딘과 시너지를 내는 탄닌 성분이 소실될 수 있다.

[0072] 상기 희석 추출물을 손상 근육세포에 처리하는 단계는, 근육세포의 손상 유도 전에 전처리 단계, 손상을 유도시킨 후의 후처리 단계 모두를 포함한다.

[0073] 상기 전처리는, 근육의 손상 전 3시간 내지 36시간 동안 희석 추출물 용액에 담지시키거나, 경구 투여하는 것을 의미하며, 후처리는, 근육의 손상이 발생한 이후, 처리하는 것을 의미한다.

[0074] 일 실시형태에 따를 때, 상기 활성성분은, 하기 화학식 1의 시아니딘 배당체 또는 그 약학적으로 유효한 염일 수 있다.

[0075] [화학식1]

[0076] 

[0078] 일 실시형태에 따를 때, 상기 추출은, 탄소수 1 내지 4 이하의 저급 알코올에서 수행될 수 있다.

[0079] 상기 탄소수 1 내지 4 이하의 저급 알코올은, 메탄올 또는 에탄올 일 수 있으며, 바람직하게는 에탄올일 수 있다.

[0080] 메탄올 또는 에탄올에서 알코올 추출할 경우, 주요 활성성분인 시아니딘-3 배당체와 탄닌의 함량뿐만 아니라, 플라보노이드 함량, DPPH 라디컬 소거활성, 슈퍼옥사이드 라디컬 소거활성, 티로시나제 저해활성 모두 열수 추출에 비해 우수하다.

[0081] 일 실시형태에 따를 때, 상기 근육세포의 손상은 덱사메타손, 독소루비신 또는 이 들의 조합에 의해 유도될 수 있다.

[0082] 상기 덱사메타손은 스테로이드 약물로 근감소증 모델 제조에 주로 사용된다. 덱사메타손은 본 발명에서는 C2C12 근육 세포에 처치하여, 근위축을 발생시키기 위한 스트레스 인자로 사용되었다. 근위축은 근세포의 크기가 저하된 것으로, 근육의 근원섬유 숫자가 감소하여 골격근 질량이 시간경과에 따라 지수함수적으로 줄어드는 것을 의미할 수 있다.

[0083] 상기 독소루비신은, 다양한 종류의 암환자들에게 범용적으로 사용되는 항암제이나, 과복용에 따른 부작용으로 근육 조직의 손상을 일으키며, 특히 세포내 주요기관 중 미토콘드리아 내 DNA 손상을 일으켜 근감소증 유도 모델의 세포 단위 실험에서 사용될 수 있다.

[0084] 일 실시형태에 따를 때, 상기 근육세포는, 세포주 c2c12를 포함할 수 있다.

[0085] 상기 근육세포의 근육은, 전방경골근(TA: tibialis anterior), 장지지신근(EDLL: extensor digitorum longus), 대퇴사두근(QC: quadriceps), 비복근(GC: gastrocnemius) 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 전방경골근일 수 있다.

[0086] 아로니아 추출물은 근육의 형태별로 미치는 효과가 상이할 수 있는데, 전방경골근에서 가장 좋은 효과를 가진다.

[0087] 세포주 c2c12는 마이오스타틴 발현 지표를 가장 효과적으로 관찰할 수 있다.

[0088] 마우스 근원세포주인 C2C12를 단핵의 근원세포 (myoblast)에서 다핵의 근관세포 (myotube)를 형성하도록 분화하여 덱사메타손과 함께 아로니아 추출물을 처리하여 효과를 탐색하였다.

[0089] 일 실시형태에 따를 때, 상기 아로니아 추출물은, 10 % 내지 99 %의 근육세포 증가율을 가질 수 있다.

[0090] 상기 근육세포 증가율은 손상을 유도하지 않은 근육세포에 아로니아 추출물을 처리한 후 MTT 테스트를 진행하여 세포 생동성을 실험하였다. 그 결과 최초 근육세포 대비 10 % 내지 99 % 증가한 것을 의미한다.

[0091] 일 실시형태에 따를 때, 상기 희석 추출물의 처리에 의해, 손상되지 않은 근육세포 전체 대비 90 % 내지 120 % 의 세포 생존율을 가질 수 있다.

[0092] 상기 세포 생존율은 손상이 유도된 근육세포에 아로니아 추출물을 처리한 후 MTT 테스트를 진행한 후, 세포 생존율을 실험하였다. 그 결과 손상되지 않은 최초 근육세포 100 % 기준 90 % 내지 120 %까지 세포가 회복된 것을 확인할 수 있었다.

[0093] 상기 세포 생존율은 덱사메타손 투여에 의한 c2c12세포의 지름(diameter)감소를 리커버리 시키는 정도를 의미할 수 있다. c2c12세포의 지름(diameter)감소는 곧 골격근세포 두께의 감소를 의미하며, 리커버리가 잘 되어 생존률이 90% 이상이 되는 경우, 골격근세포 두께의 감소가 0% 이상 10% 미만일 수 있다.

[0094] 일 실시형태에 따를 때, 상기 희석 추출물의 처리는, 손상 근육세포에 희석 추출물을 12시간 내지 48시간 담지하는 것일 수 있다.

[0095] 상기 희석 추출물의 처리는 바람직하게는 손상 유도 전 근육세포에 희석 추출물을 전처리한 후, 손상 이후 근육세포에 다시 12시간 내지 48시간동안 담지하는 것일 수 있다.

[0096] 희석 추출물의 전처리 및 후처리를 통해서 근육의 보호 또는 예방과 치료를 동시에 진행할 수 있으며, 천연물 특성상 부작용 없이 진행이 가능하다.

[0097] 천연물을 이용한 근감소 억제용 의약 조성물 또는 식품 조성물은, 체내 반감기를 증대시키며, 투여횟수가 자유롭게 조절 가능하고 비용을 절감시킬 수 있어서 단백질의 직접 섭취나 천연 아미노산 대비 장점을 갖는다.

[0099] 일 실시형태에 따를 때, 상기 근감소 억제 방법은, 바람직하게는, 동결 건조 및 분말화한 아로니아의 활성성분을 80% 이상 저급 알코올에서 48시간 내지 96시간 추출하는 단계; 상기 알코올 추출물을 증류수에 1/100,000 내지 1/1,000 로 희석하는 단계; 및 상기 희석된 알코올 추출물을 근육세포주 c2c12에 24시간 이상 전처리하는 단계; 를 포함할 수 있다.

[0101] 본 발명의 다른 측면은, 본 발명의 일 실시형태에 의한 근감소 억제용 식품 조성물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0102] 상기 약학 조성물은, 시아니딘 배당체를 유효성분으로 포함할 수 있다. 상기 약학 조성물의 시아니딘 배당체는, 바람직하게는 아로니아로부터 추출된 배당체일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 시아니딘 배당체를 고농도로 수득할 수 있는 천연물이라면 모두 포함될 수 있다.

[0104] 일 실시형태에 따를 때, 상기 약학 조성물은, 쿠싱 증후군, 스테로이드 근병증, 다발성 근염, 말초 신경 병증, 악액질 및 염증성 근염으로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 용도일 수 있다.

[0105] 상기 약학 조성물은 바람직하게는 쿠싱 증후군, 스테로이드 근병증, 다발성 근염, 염증성 근염 치료용일 수 있고, 악액질 환자의 식욕 증진제로 사용될 수 있다.

[0107] 이하, 하기 실시예 및 비교예를 참조하여 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명의 기술적 사상이 그에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다.

[0109] **<제조예1. 아로니아 스톡 제조>**

[0110] 아로니아(Aronia melanocarpa, 2020년산)는 전북 덕유산에서 재배, 수확된 것을 구입하였다.

[0111] 도 1을 참조할 때, 아로니아 258.188 g을 동결 건조한 39 g에 95% 에탄올 390 ml을 넣은 후 실온에 72시간 두었다가 원심 분리기에서 9,000 rpm으로 4℃, 15분간 원심 분리하였다.

[0112] 이후 상층액을 여과한 후 감압농축기 80℃에서 5분간 농축하여 액체형태의 추출물 6.5 mL을 얻어 시료로 사용하였다. 아로니아 추출물 스톡(stock)농도는 38.952 g/ml이다.

[0114] **<실시예1>**

[0115] 상기 제조예의 스톡을 증류수에 1/10,000 비율로 희석하여 3.895 mg/ml 농도로 희석하였다.

[0117] **<실시예2>**

[0118] 상기 제조예의 스톡을 증류수에 1/1000 비율로 희석하여 38.950 mg/ml 농도로 희석하였다.

[0120] **<실시예3>**

[0121] 상기 제조예의 스톡을 증류수에 1/00 비율로 희석하여 389.50 mg/ml 농도로 희석하였다.

[0123] **<실시예4>**

[0124] 상기 제조예의 스톡을 증류수에 1/1,000,000 비율로 희석하여 0.038 mg/ml 농도로 희석하였다.

[0126] **<실시예5>**

[0127] 상기 제조예의 스톡을 증류수에 1/100,000 비율로 희석하여 0.389 mg/ml 농도로 희석하였다.

[0129] **<실험예1. 동물 실험>**

[0130] 실험 마우스의 좌골신경(sciatic nerve)를 절단한 후, 종아리 부위 근감소증을 유발시켰다. 비임상 실험으로 근감소증 유도 랫트에 직접 실시예 1의 아로니아 추출물을 투여하여 다양한 실험을 진행하였다.

[0131] 진행한 실험은 근육의 힘 변화를 관찰하기 위한 grip strength과 Hanging time & Holding impulse 테스트, 근육손상 지표를 관찰하기 위한 혈액 분석, 근육을 분리하여 무게 측정 및 micro CT로 근육 크기 변화 관찰, 체중 및 섭식량 관찰, ELIZA TEST를 진행하였다.

[0133] 1. 근육의 힘 변화 관찰

[0134] 근육의 힘변화를 직접적으로 관찰하기 위하여 grip strength과 Hanging time & Holding impulse 테스트를 진행하였다.

[0135] 하기의 도 5를 참조할 때, 대조군(sham)에 비해 신경절단 동물(NTX)에서 Grip strength가 감소하였고, 아로니아 추출물 투여 동물에서 Grip strength 가 증가함을 나타내어, 아로니아 추출물이 근육의 기능(power) 증가에 기여했음을 확인하였다.

[0136] 하기의 도 6을 참조할 때, 대조군(sham)에 비해 신경절단 동물에서 hanging time 및 holding impulse 가 감소하였고, 아로니아 추출물 투여 동물에서는 통계적으로 유의하지는 않았지만 두 지표 모두 증가하였다. 이를 통해, 아로니아 추출물이 근육의 기능 증가에 관여할 수 있음을 알 수 있다.

[0138] 2. 근육량 시각 관찰

[0139] 근육량을 시각적으로 관찰하기 위해, 종아리의 다양한 근육 분리하였다. 분리한 근육은, 전방경골근(TA: tibialis anterior), 장지지신근(EDLL: extensor digitorum longus), 대퇴사두근(QC: quadriceps), 비복근(GC: gastrocnemius) 이다. 분리한 각 근육의 무게를 측정하고, Lean / fat mass (n=3)측정하였으며, micro CT로 근육의 크기 변화를 관찰하였다. 그리고 식욕 증진제로의 효능을 관찰하기 위하여, 체중과 섭식량을 관찰하였다.

[0140] 하기의 도 7을 참조할 때, 대조군(sham)에 비해 신경절단 동물에서 TA 근육무게가 감소하였고, 아로니아 투여 동물에서는 TA의 무게가 통계적으로 유의하게 증가함을 확인하였다. 이는 아로니아 추출물이 TA 근육의 크기(size) 증가에 관여했음을 의미하는 것이다.

[0141] 도 7의 TA 근육 사진을 참조할 때, 아로니아 추출물이 근육의 형태학적 크기(size) 증가에 관여함을 보여준다. 즉, TA 근육에서 효과가 크게 나타나는 걸로 보아 아로니아가 근육 형태별로 미치는 효과가 다를 수 있음을 의미한다.

[0142] 하기의 도 8을 참조할 때, 신경절단 동물에서 감소한 lean mass가 아로니아 추출물 투여 동물에서는 증가하였고, 증가한 fat mass는 아로니아 추출물 투여 동물에서는 감소하였다. 유의할만한 큰 변화는 아니지만, 아로니아 추출물이 근육 및 지방 관련 기능 개선에 관여할 수 있음을 확인하였다.

[0143] 하기의 도 9를 참조할 때, 신경절단 동물 및 아로니아 추출물 투여 동물에서 체중 변화가 뚜렷하지 않았으나, 식욕은 대조군에 비해 증가하였음을 확인하였다. 이는, 아로니아 추출물이 식욕을 촉진하였을 가능성이 있고, 현재 근감소가 극심한 cachexia(악액질) 등의 치료에 식욕 촉진제가 사용되고 있는 상황에서 아로니아가 활용될 수 있음을 의미한다.

[0144] 하기의 도 11을 참조할 때, micro CT 검사에서는 신경절단 동물에서 감소한 hindlimb 면적(붉은 선)이 아로니아 투여에 의해 유의한 수준으로 회복됨을 관찰하였다. 이는, 아로니아의 근감소 억제 효능이 micro CT 소견에서도 확인됨을 의미한다.

[0146] 3. 혈액 테스트

[0147] 근감소량 억제 효능에 관한 지표를 관찰하기 위해, 혈액 테스트를 진행하였고, 그 결과는 하기의 표 1과 같다.

[0148] [표 1]

Name	단위	Sham+DW	NTX+DW	NTX+아로니아
TP	g/dL	4.6±0.130	4.20±0.070	4.12±0.093
ALB	g/dL	3.02±0.117	2.8±0.1177	2.7±0.084
Glu	mg/dL	306.14±21.93	351.8±21.93	454.8±20.694*
BUN	mg/dL	24.3±0.83	24.5±0.83	20.78±0.365***
Creatinine	mg/dL	0.073±0.004	0.0745±0.004	0.0718±0.003
AST	U/L	76±3.33	98±3.33	62.8±8.11
ALP	U/L	70.4±2.43	67.7±2.4362	73.4±3.26
LDH	U/L	757.3±63.33	827.5±63.34	434.2±33.28***
CK	U/L	304.5±16.37	411.8±16.38#	216.6±43.65*
TC	mg/dL	104.14±3.3	90.7±3.3	89.2±3.65
TG	mg/dL	63.1±6.36	49.2±6.36	50.4±2.956
HDL-C	mg/dL	81.4±1.90	69.5±1.9	68±2.58
LDL-C	mg/dL	11.1±0.47	9.7±0.47	8.2±0.50

[0149]

[0150] 표 1을 분석할 때, 신경절단 동물에서 증가한 LDH 및 CK가 아로니아 투여에 의해 유의한 수준으로 감소하였다. 또한 Glucose 와 BUN도 아로니아 추출물 투여 동물에서 감소함을 확인하였다.

[0151] 상기 혈액 테스트를 통해, 아로니아가 근육 손상 지표인 LDH와 CK를 감소시킴을 확인하여 근감소 억제 효능에 대한 동물 혈액 수준에서 확인한 의의가 있다. 추가적으로 Glucose 와 BUN 억제 효능도 확인하였는데, 이는 아로니아가 혈당 감소 및 신장 보호 효능도 있음을 확인하였다.

[0153] 4. ELISA TEST

[0154] 마이오스타틴 혈중 농도를 관찰하여 지표 분석을 하기위해 엘리자 테스트를 진행하였다.

[0155] 하기의 도 10을 참조할 때, 신경절단 동물에서 증가한 마이오스타틴 혈중 농도가 아로니아 투여에 의해 유의한 수준으로 감소함을 확인하였다. 이는, 아로니아의 근감소 억제 효능이 근육량 조절 표적 단백질인 마이오스타틴을 조절하였음을 의미한다.

[0158] **<실험예2. 아로니아 추출물을 이용한 세포실험>**

[0159] 아로니아 추출물을 골격근 세포주 C2C12에 처리 후 분석 및 관찰하였다.

[0161] 1. 아로니아 추출물의 세포 독성 확인

[0162] 세포 생존율, 회복율을 분석하기 위하여 MTT 테스트를 진행하였다.

[0163] 실시예 1 내지 5의 아로니아 추출물을 손상 유도하지 않은 세포주 C2C12에 처리하였으며, 그 결과는 도 12 그래프와 같다.

[0164] 도 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, 모든 농도의 아로니아 추출물은 C2C12 세포에 대해거의 세포 독성을 나타내지 아니하였다. 나아가 1/10,000 이상의 희석물을 처리하는 경우 오히려 생존한 세포의 수가 증가함을 확인할 수 있었다. 구체적으로 1/1,000 희석물을 처리하는 경우 16% 세포생존율이 증가하였으며, 1/100 희석물을 처리하는 경우 세포생존율이 80% 증가하였다.

[0166] 2. 아로니아 추출물의 근육 세포 보호 효과 확인

[0167] C2C12 세포주에 실시예 1의 희석 추출물을 3시간 동안전처리한 후, 덱사메타손을 처리하여 손상을 유도하고 24시간 후 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과는 도 2 그래프와 같다.

[0168] C2C12 세포주에 실시예 1의 희석 추출물을 24시간 동안전처리한 후, 덱사메타손을 처리하여 손상을 유도하고 24시간 후 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과는 도 3 그래프와 같다.

[0169] 도 2 및 3을 참조할 때, 아로니아 추출물의 전처리는 근육 세포를 덱사메타손으로부터 보호함을 확인할 수 있었으며, 특히, 전처리 시간이 길수록 근손실 예방이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0171] 3. 아로니아 추출물의 마이오스타틴 발현 억제 효과 확인

[0172] 실시예 1, 실시예 4 및 5의 희석 추출물을 처리하여 근감소 억제 지표로 마이오스타틴의 발현 수준을 분석하기 위하여 Luciferase assay를 진행하였다. 구체적으로 Myostatin luciferase vector (pMSTN_Luc)가 과발현 되어 있는 C2C12 세포주를 사용하였으며, MSTN_Luc-C2C12 세포를 seeding한 후 다음날 실시예 1, 실시예 4 및 5의 희석 추출물을 12시간 동안 처리하였다. 이어서, 1X PLB (1X passive lysis buffer)를 배양 배지에 첨가하여 세포를 용해시킨 후 luciferase assay전용 96well plate(white plate)에 세포용해물을 넣고, LAR Ⅱ시약을 넣은 후 플레이트를 기계(Multiplate enspire)에 넣어 활성을 측정하고 Bradford 시약을 이용하여 정량하였다.

[0173] 하기의 도 13을 참조할 때, 아로니아 추출물을 농도별로 처리하면 1/10,000 희석 후 처리하면 62%까지 마이오스타틴 프로모터 활성 억제함을 확인하였다. 이는 아로니아의 근감소 억제가 마이오스타틴 프로모터 활성 억제에 의함을 의미한다.

[0175] 4. 아로니아 추출물과 블루베리 추출물의 마이오스타틴 발현 억제 효능 비교

[0176] 상기 아로니아 추출물의 마이오스타틴 발현 억제 효과를 다른 베리류와 비교하고자 하였으며, 상술한 실험과 동일한 실험을 블루베리 추출물을 이용하여 수행하였다. 블루베리 추출물은 제조예 1의 아로니아 스톡 제조와 동일하게 블루베리 스톡을 제조하고 상기 스톡을 증류수에 1/100,000 비율로 희석하여 획득하였다. MSTN_Luc-C2C12 세포를 seeding한 후 다음날 실시예 5의 아로니아 추출물 또는 블루베리 추출물을 12 시간 동안 처리하고, 세포를 용해시킨 후 용해물을 96-well plate에 넣어 LARⅡ 시약을 넣고 루시퍼라아제의 활성을 측정

하고 Bradford 시약을 이용하여 이를 정량하였다. 각 추출물의 처리량은 동일하다.

[0177] 그 결과, 블루베리 추출물도 골격근 세포에서 마이오스타틴의 발현을 억제하였으나, 아로니아 추출물이 블루베리보다 높은 수준으로 마이오스타틴의 발현을 억제함을 확인하였다(* p-value ≤ 0.05, ** p-value ≤ 0.01).

[0179] **<실험예3. 시아니딘 성분의 세포 실험>**

[0180] 아로니아 추출물의 주요 활성성분인 시아니딘을 골격근 세포주 C2C12에 처리 후 분석 및 관찰하였다.

[0182] 1. 세포 생존율 분석

[0183] 세포 생존율, 회복율을 분석하기 위하여, MTT 테스트를 진행하였다.

[0184] 첫번째로 시아니딘 2 ug/ml, 0.1 mg/ml, 0.03 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.003 mg/ml를 준비하여 손상 유도한 세포주에 처리 후, 세포 생존율을 분석하였다.

[0185] 그리고, 마이오스타틴 발현 정도를 관찰하기 위하여 시아니딘 2 ug/ml, 0.2 mg/ml, 0.02 mg/ml을 손상 유도한 세포주에 처리 후, 루시페라제 발현을 분석하였다.

[0186] 하기의 도 14를 참조할 때, 아로니아 주요 성분인 시아니딘으로 골격근 세포주 C2C12의 생존율을 분석에서 2 ug/ml까지 세포독성 나타나지 않으며(왼쪽 그래프), 농도별로 6시간 처리 후 마이오스타틴 프로모터 활성이 0.02~2 ug/ml 범위에서 50% 감소함을 확인하였다(오른쪽 그래프).

[0188] 2. PCR 및 마이오스타틴 mRNA관찰

[0189] 시아니딘을 0.2 ug/ml, 2 ug/ml 처리하여 PCR 돌린 후, 마이오스타틴 mRNA를 관찰하였다.

[0190] 하기의 도15를 참조할 때, 아로니아 주요 성분인 시아니딘 처리후 골격근 세포주 C2C12에서 myostatin mRNA의 발현이 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다. 이는, 시아니딘이 마이오스타틴의 전사를 억제해서 근감소 억제함을 의미한다.

[0192] 3. 웨스턴 블롯

[0193] 시아니딘을 골격근 세포주 C2C12에 24시간 처리 후 웨스턴 블롯을 실시하였다.

[0194] 하기의 도 16을 참조할 때, 시아니딘 0.2 mg/ml를 투여했을 때, 세포성장 및 단백질 합성에 관여하는 mTOR 하위 물질인 P70s6 kinase 와 akt/erk 인산화가 증가함을 확인하였다. 이는 아로니아의 근감소 억제 효과가 세포 내부 및 외부적 요인에 의한 근육세포 보호와 나아가 mTOR 신경전달 경로 활성화를 통한 근육섬유 형성에 관여하는 단백질의 합성을 유도하여 나타나는 것을 의미한다. 또한, 시아니딘은 Akt의 활성화를 통해 근육 분해를 촉진하는 Foxo1을 저해함으로써 근육 분해를 간접적으로 억제할 수 있음을 암시한다.

[0195] 하기의 도 17을 참조할 때, 항암제 독소루비신 처리 후 근감소 유도된 모델에서, 시아니딘을 처리했을 때, 독소루비신에 의한 마이오스타틴 발현 증가가 억제됨을 확인하였다. 이는, 시아니딘이 항암제에 의해 발생하는 악액질(cachexia) 등을 억제하는 용도로 활용가능성이 있음을 암시한다.

[0196] 하기의 도 18을 참조할 때, 덱사메타손으로 근감소 유도된 모델에서, 시아니딘을 처리하였을 때, 마이오스타틴 발현 증가가 억제됨을 확인하였다. 이는 시아니딘이 만성적인 스테로이드 치료에 의해 발생하는 쿠싱 증후군을 억제하는 용도로 활용가능성이 있음을 암시한다.

[0198] 상기의 실시예1 내지 5와 비교예, 실험예 1 내지 3을 통한 실험에서 아로니아 추출물의 근육 무게 증가, 파워 증가 효과를 확인하였으며, 혈액에서 마이오스타틴 농도가 억제됨을 확인하였다. 또한 덱사메타손에 의한 세포독성을 억제함을 확인하였으며, 마이오스타틴 프로모터 활성을 억제하고 마이오스타틴 mRNA발현이 억제됨을 확인하였다. 웨스턴 블롯을 통해 아로니아 추출물의 주요 활성성분이 세포성장/단백질 합성 관련 단백질 인산화를

증가시키며, 항암제/스테로이드에 의한 근감소를 억제함을 확인할 수 있었다.

[0199] 즉, 아로니아의 근감소 억제 효능은 주성분인 시아니딘의 마이오스타틴 발현 억제, 세포성장 및 단백질 합성 기전 촉진에 의하며, 덱사메타손 및 독소루비신에 의한 마이오스타틴 발현증가를 억제함을 확인함으로써 스테로이드에 의한 쿠싱 증후군(cushing syndrom) 및 항암제 사용에 의한 암 악액질(cancer cachexia) 억제용으로 활용될 수 있다.

[0200] 본 발명은 아로니아 추출물을 유효성분으로 함유하는 근감소 억제 효능 조성물에 관한 것으로, 상기 아로니아 추출물은 분화를 유도한 근육세포 c2c12 세포주에 덱사메타손과 함께 투여시 근육세포 생존률이 90% 이상인 기능성 식품 조성물을 제공한다(실험예2의 세포 생존율 분석 실험).

[0201] 동물실험 결과, 아로니아 추출물은 좌골 신경손상에 의한 근감소 유도 마우스의 근력회복은 물론 TA(tibialis anterior) 근육의 무게 감소 또한 억제하였음을 확인하였다(실험예1의 근육 힘 관찰 및 시각 관찰).

[0202] 또한, 신경 손상 모델에서 증가한 혈중 마이오스타틴 농도가 아로니아 투여군에서 감소함을 확인하여 아로니아의 근감소 억제효과가 마이오스타틴 조절에 의함을 밝혔다(실험예1의 ELIZA TEST).

[0203] 아로니아 주성분인 시아니딘이 근육양 조절 표적 단백질인 마이오스타틴의 발현양을 억제함을 확인하였다. 덱사메타존 및 항암제 독소루비신에 의한 마이오스타틴 단백질 발현 증가를 시아니딘이 억제함을 확인하였다(실험예3의 웨스턴 블롯).

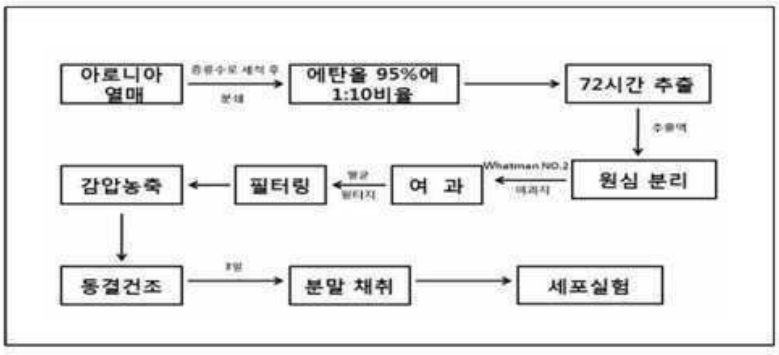
[0205] 본 발명에 따를 때, 상온의 에탄올에서 장시간 추출한 주정 추출 공정을 이용하여, 체내 반감기를 증대시키면서, 투여횟수 조절이 가능하고 약리학적 부작용이 적은 근감소 억제 효과를 기대할 수 있다. 또한 덱사메타존 장기간 사용에 의해 발생하는 쿠싱 증후군, 그리고 독소루비신 등 항암제에 의해 발생하는 악액질의 예방 및 치료에 활용될 수 있다.

[0207] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

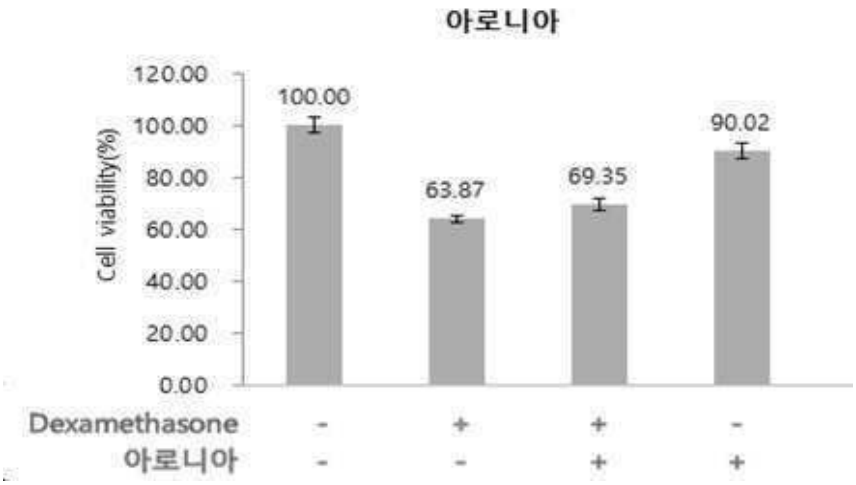
[0208] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

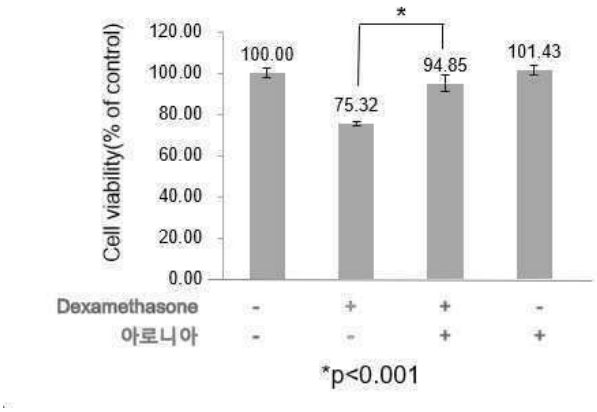
도면1



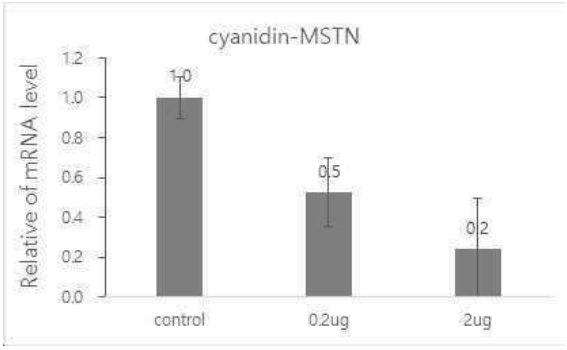
도면2


아로니아
Cell viability(%)
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
100.00
63.87
69.35
90.02
Dexamethasone - + + -
아로니아 - - + +

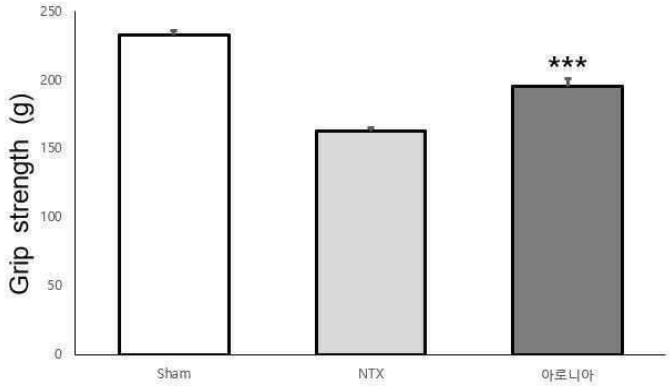
도면3


Cell viability(% of control)
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
100.00
75.32
94.85
101.43
*
Dexamethasone - + + -
아로니아 - - + +
*p<0.001

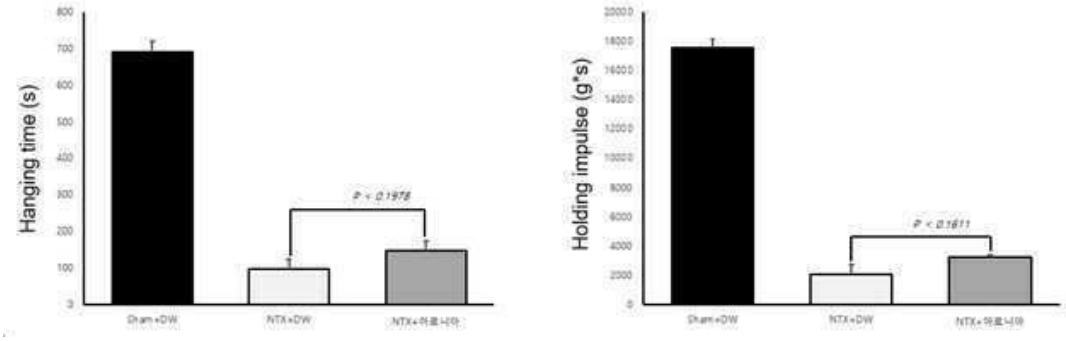
도면4


cyanidin-MSTN
Relative of mRNA level
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1.0
0.5
0.2
control
0.2ug
2ug

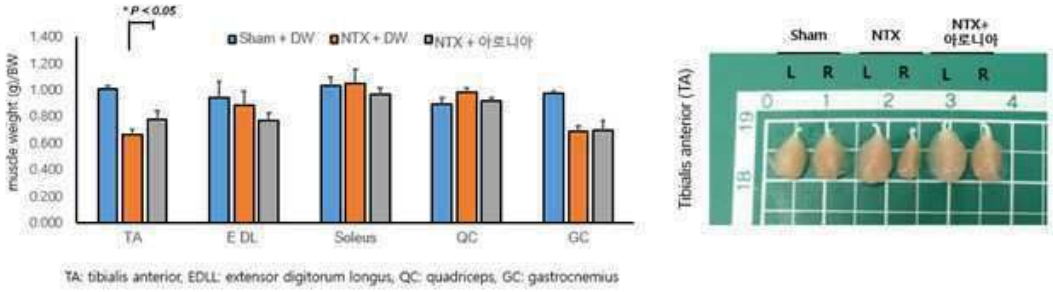
도면5



도면6

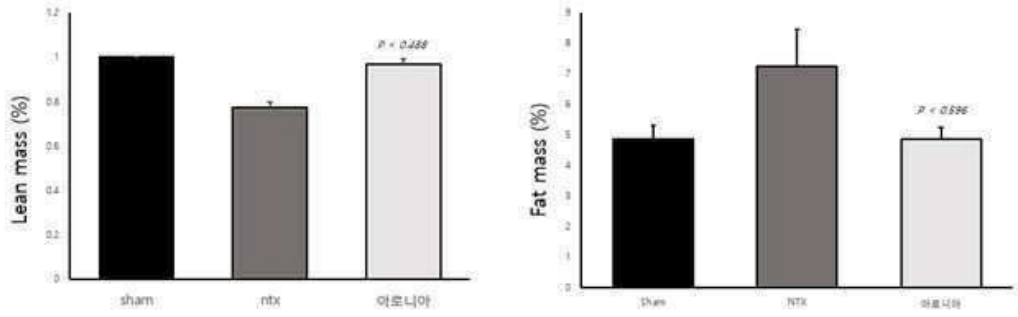


도면7

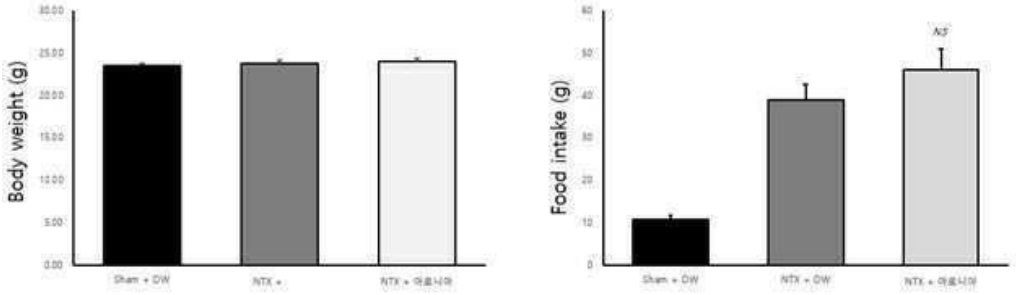


TA: tibialis anterior, EDLL: extensor digitorum longus, QC: quadriceps, GC: gastrocnemius

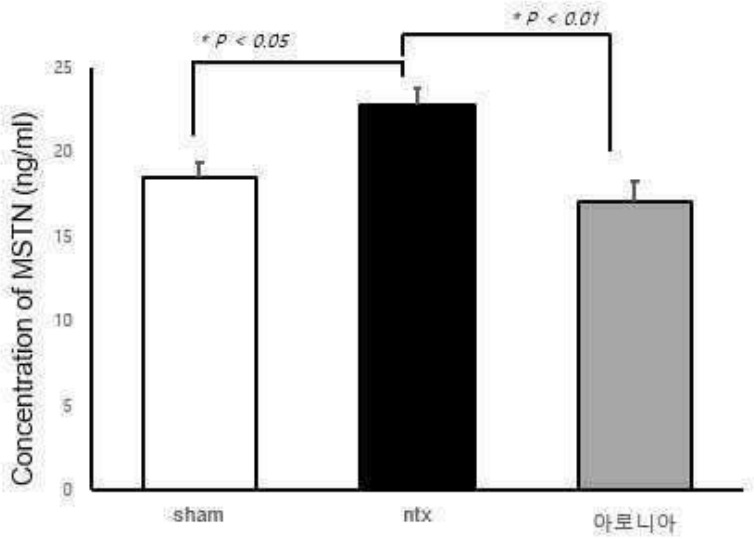
도면8



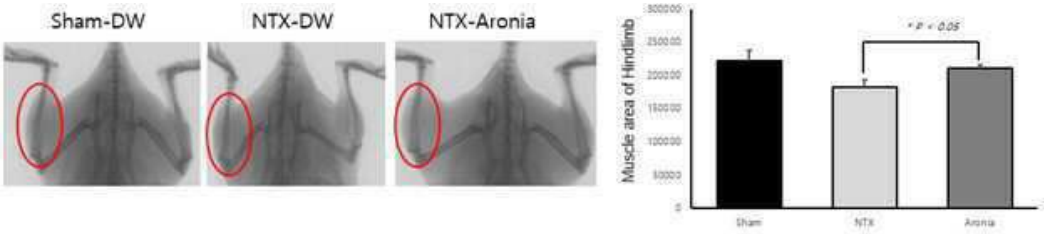
도면9



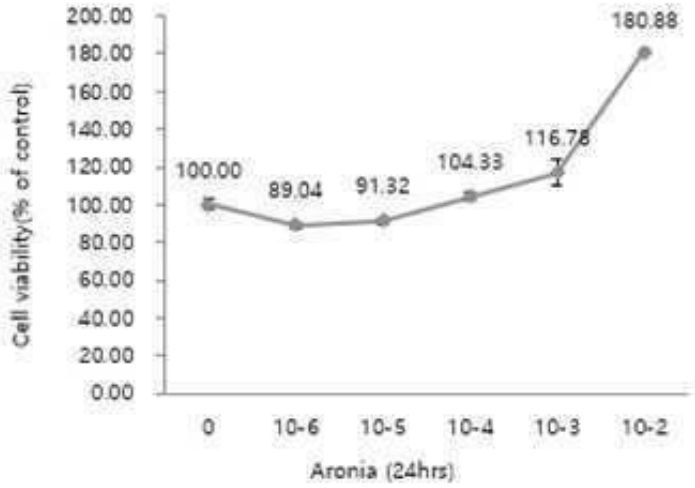
도면10



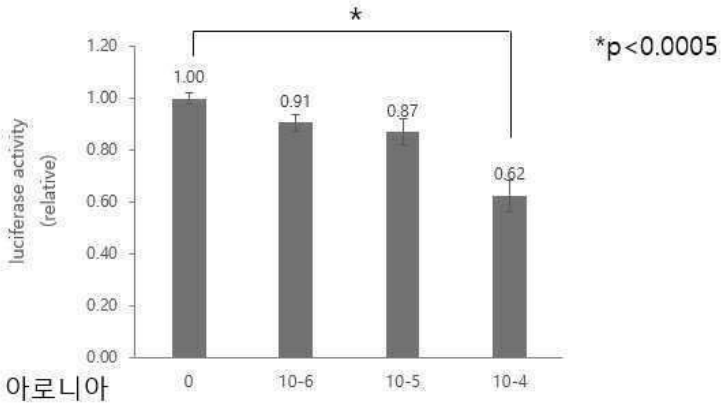
도면11



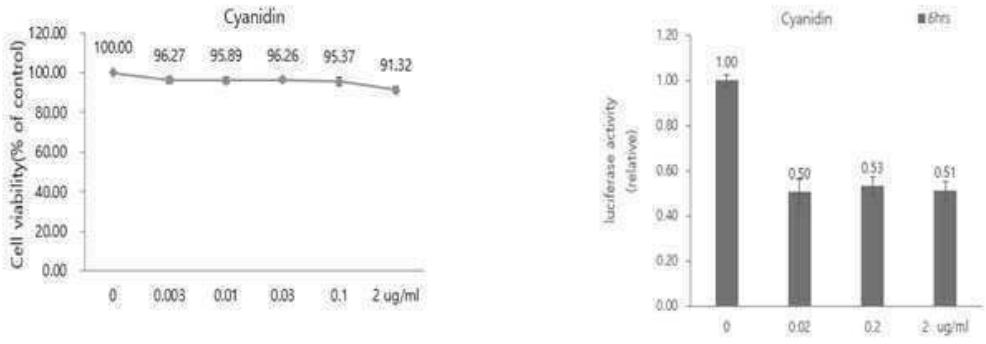
도면12



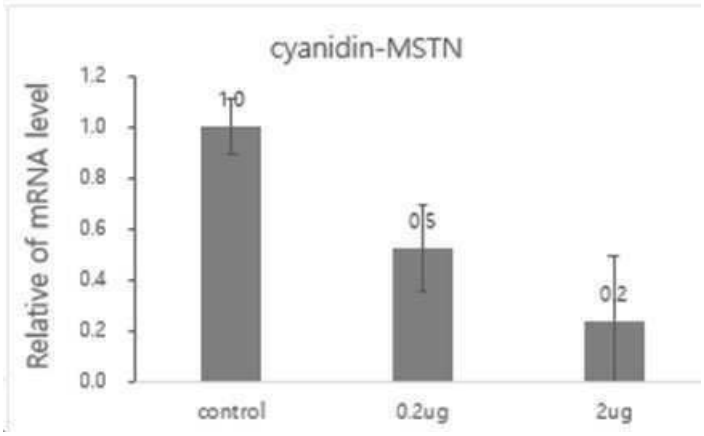
도면13



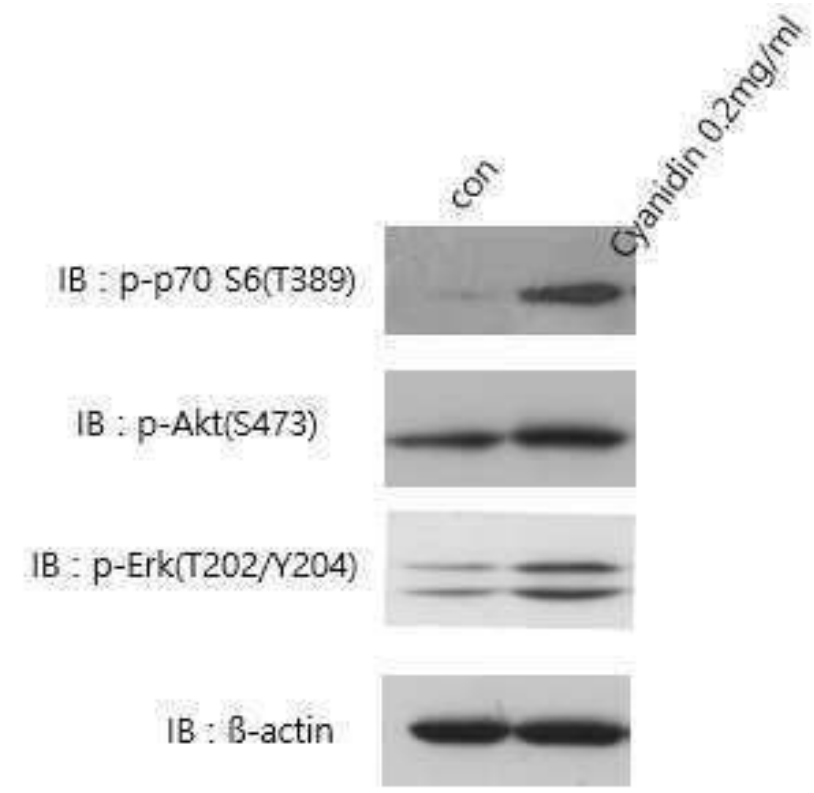
도면14



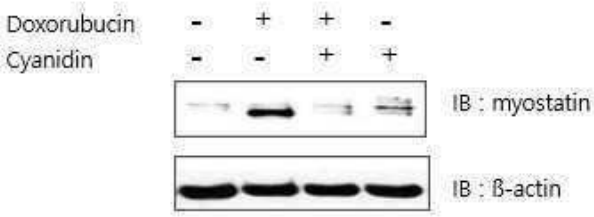
도면15



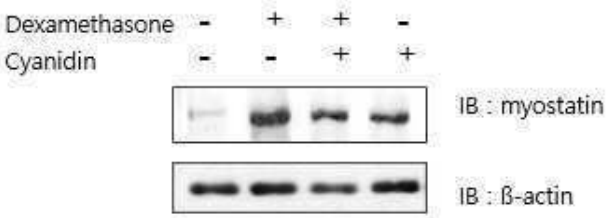
도면16



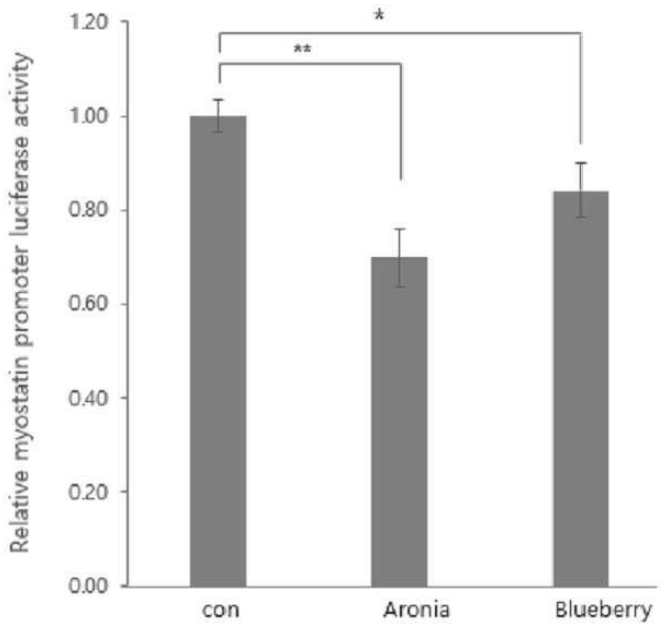
도면17



도면18


Dexamethasone - + + -
Cyanidin - - + +
IB : myostatin
IB : ß-actin

도면19


Relative myostatin promoter luciferase activity
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
*
**
con
Aronia
Blueberry