(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0054273
(43) 공개일자 2010년05월25일

(51) Int. Cl.
A61K 35/60 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0113115
(22) 출원일자 2008년11월14일
심사청구일자 2009년11월13일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
손윤희
대구 수성구 수성동1가 613번지 신세계타운 2동 1202호
남경수
대구 남구 봉덕2동 1071번지 효성타운 106동 1107호
(74) 대리인
이덕록

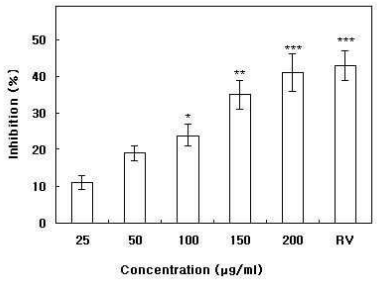
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 별불가사리 다당체 추출물을 유효성분으로 하는 간암예방 및 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 별불가사리 다당체 추출물을 유효성분으로 하는 간암예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로 상기 다당체 추출물은 β-NF에 의해 유도된 CYP1A1효소 활성을 저해 할 뿐 아니라, Phenobarbital에 의해 유도된 CYP2B1 효소 활성도 억제 하므로 간암예방 효과와 항돌연변이 효과가 있으며, 발암물질 대사에 관여하는 Cytochrome P450 2E1에 농도 의존적으로 저해율이 증가하는 사실에서 간암예방효과가 뛰어난 것으로 나타났다.

대 표 도 - 도3



(주) RV, 0.05 nM resveratrol. Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n=3). *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.005 compared with the control.

특허청구의 범위

청구항 1

별불가사리 다당체 추출물을 유효성분으로 하는 간염예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

별불가사리를 열수추출하여 원심분리한 다음 여과하고, 다시 에탄올을 첨가하고 24시간 4℃에 방치한 후 원심분리하고 남은 침전물에 다시 증류수로 녹여 원심분리하고 얻은 상등액을 동결건조하여서 되는 간염예방 또는 치료용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 간암예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로 별불가사리로부터 다당체를 추출하여 쥐의 간세포로부터 마이크로좀을 분리하여 간암예방 효과를 확인하는 생물의약 기술을 개시하고 있다.

배 경 기 술

[0002] 체내로 유입된 약물, 유해물질 등의 다양한 물질들은 주로 간에 존재하는 독물대사 및 약물대사에 중요한 효소인 phase I 효소에 의하여 대사되어지며, 이들은 phase I 효소를 억제 또는 유도함으로서 다른 약물이나 이물질들의 대사에도 영향을 미쳐 약효나 독성에 변화를 유발할 수 있다. phase I 효소인 cytochrome P450 (CYP)은 약물대사의 산화에 관여하는 효소로서 환원상태에서 일산화탄소와 결합하여 450 nm에서 최고의 흡광도를 나타내므로 색소 (pigment)의 의미로 P450으로 명명되어졌다. 이들 CYP 효소계 중에서 약물대사의 대부분은 CYP1, CYP2 및 CYP3의 isozymes에 의해 이루어진다.

[0003] CYP는 체내로 유입된 약물, 각종 유해물질, 여러 화학물질들을 화학적 반응성이나 발암성이 증가된 발암대사물질로 활성화시켜 암의 개시, 촉진과 진행을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 특히 CYP1A1/2, 2B1/2, 2E1 등은 체내로 유입된 각종 화학물질들을 돌연변이, 발암 등의 독성을 유발시키는 것으로 알려져 있다.

[0004] 암은 오늘날 인류의 주된 사망원인이므로 최근엔 암으로 인한 사망률을 감소시키기 위해 암예방물질의 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다. 현재 암예방물질에 대한 효과적인 연구를 위해 생화학적 표식자 (biochemical marker)를 사용하고 있다. 이 표식자들은 발암과정시 생성되는 발암물질의 대사물질과 그의 부산물과도 반응하여 다양한 발암기전을 저해할수록 효과적인 암예방물질로 간주된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 예의 연구한 결과 별불가사리 다당체 추출물이 체내외의 각종 유해물질, 발암 또는 돌연변이 유방물질의 체내 활성화를 유도하는 Phase I 약물대사효소의 활성억제효과를 확인하여 간암예방 및 치료효과를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

[0006] 본 발명의 상기 목적은 별불가사리 다당추출물을 제조하는 단계와;

[0007] 쥐의 간에서 마이크로좀을 분리하는 단계와;

[0008] Phase I 약물대사효소의 활성억제 효과를 확인하기 위하여 Cytochrome P450 1A1활성, CYP2B1 활성, CYP2E1 활

성을 측정하고 평가하는 단계를 통하여 달성하였다.

효 과

[0009] 별불가사리 다당체추출물을 25~200mg/mL 농도에서 CYP1A1효소 활성억제효과, CYP2B1의 활성 저해 효과 및 CYP2E1효소 활성 저해 효과 중 나타내므로 간암 예방 및 치료에 뛰어난 효과가 있다.

[0010] 이하, 본 발명의 실시를 위한 구체적인 내용을 실시예를 통하여 상세히 설명한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0011] **별불가사리 다당추출물 시료의 제조**

[0012] 별불가사리는 포항 앞바다에서 채집하여 물로 깨끗이 씻어 -20℃에 보관하였다. 별불가사리 다당추출물은 도 1과 같이 500g의 시료로 0.7g을 추출하여 얻었다.

[0013] **마이크로좀의 분리**

[0014] Sprague-Dawley계 흰쥐 (body weight 140 g)의 간조직으로부터 마이크로좀의 분리는 Phol과 Fouts의 방법을 참고하여 실시하였다.(도 2) 관류법으로 β-naphthoflavone (β-NF, 매일 3회, 80 mg/kg body weight), phenobarbital (PB, 매일 4회, 75 mg/kg body wight) 또는 pyrazole (매일 4회, 200 mg/kg body weight) 처리로 효소활성을 유도하였다. 그리고 24시간 뒤 흰쥐를 diethylether로 질식시킨 다음, 복피를 절개하여 0.15 M KCl buffer로 간을 perfusion시킨 후 적출하였다. 적출된 간은 여러 번 세척한 다음 흡습지로 수분을 제거하였다. 간 조직은 0.25 M sucrose 용액 (조직 g당 5.0 mL)으로 빙냉상태에서 조직균질기 (Teflon Plotter Elvehiem Homogenizer, USA)를 사용하여 마쇄하였다.

[0015] 이 마쇄 균질액을 원심분리 (15,000 rpm, 20분)시킨 후 침전물은 제거하였으며, 상층액은 1 mL 당 0.25 M sucrose 용액에 녹인 0.1 M CaCl2를 0.2 mL의 부피로 첨가하여 빙냉상태에서 30분간 방치하였다. 다시 2차 원심분리 (36,000 rpm, 1시간)시켜 형성된 침전물은 0.25 M sucrose에 재현탁하여 microsome 분획으로 실험에 사용하였다. 이상의 모든 과정은 4℃에서 실시하였다. 정량된 분획은 일정량씩 나누어 실험에 사용할 때까지 -70℃에서 냉동 보관하였다.

[0016] **Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) 활성 측정**

[0017] CYP1A1은 ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) 활성으로 측정하였다. 즉, 흰쥐로부터 분리한 microsomal protein (2 mg/mL) 200 μL에 640 μL의 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100 μL의 BSA (10 mg/mL in Tris-HCl buffer), 20 μL의 0.25 M MgCl2, 40 μL의 cofactor solution, 2.5 units의 glucose- 6-phosphate dehydrogenase, 10 μL의 기질 (1 mg of ethoxyresorufin in 10 mL of methanol), 10 μL의 별불가사리 다당추출물을 농도별 (0~200 μg/ml)로 첨가하였다.

[0018] 모든 시약들을 잘 섞은 후 37℃에서 4분간 반응시키고, 2 mL의 methanol로 반응을 종결시켰다. 2,000 ×g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고, 분광형광광도계 (RF-5301PC, Shimadzu, Japan)로 측정 (550 nm excitation and 585 nm emission)하였다. 양성대조군은 resveratrol을 사용하였고, 음성대조군으로는 증류수를 사용하였다. 이 실험은 3회 반복 실험으로 수행하였으며, 각각의 결과는 control에 대한 각 시료들의 저해도 정도를 %로 나타내었다.

[0019] 별불가사리 다당추출물이 β-NF에 의해 유도된 CYP1A1 효소 활성에 미치는 영향을 각 농도별로 측정한 결과 별불가사리 다당추출물은 25~200 μg/ml 농도에서 11~41%의 저해율을 나타내었으며 (도 3), 100 ($p<0.05$), 150 ($p<0.01$)과 200 μg/mL ($p<0.005$) 농도에서는 통계적으로 유의성 있는 억제효과를 측정할 수 있었다. 따라서 CYP1A1은 간에서 해독과정에 관여하는 효소로서 전발암물질 (procarcinogen)을 발암대사물 (carcinogenic metabolites)로 전환시키기 때문에 별불가사리 다당추출물에 의한 CYP1A1 효소의 활성 저해는 간암예방 효과의 기작으로 간주할 수 있다.

[0020] **Cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) 활성 측정**

[0021] CYP2B1 활성은 pentoxyresorufin *O*-dealkylase 활성 측정으로 산출하였으며 pentoxyresorufin으로부터 resorufin의 형성 측정을 위하여 substrate로 pentoxyresorufin을 사용하여 위의 CYP1A1 활성 측정과 같은 방법으로 실시하였다.

[0022] 별불가사리 다당추출물을 농도별로 처리하여 phenobarbital에 의해 유도된 CYP2B1 활성 억제효과를 살펴본 결과 농도의존적으로 26~57%의 저해율이 나타났다 (도 4). 그리고 별불가사리 다당추출물 100, 150과 200 μg/mL 농도에서는 양성대조군인 ethynylestradiol (10 nmole)의 저해율 (42%)보다 높은 45, 51과 57%의 억제효과를 나타내었다.

[0023] CYP2B1은 외부에서 유입된 화학물질의 독성화에 관여하는 효소로서 polyaromatic hydrocarvons, bensoapurene, aflatoxin, N-demethyl- aminoazobenzen 등의 물질을 체내에서 활성화시켜 돌연변이, 발암 등의 독성을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 별불가사리 다당추출물이 CYP2B1의 활성을 저해하므로 유해물질의 활성화를 저해하여 돌연변이와 발암형성을 억제시킬 것으로 사료된다.

[0024] **Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) 활성 측정**

[0025] CYP2E1의 활성 측정을 위한 aniline hydroxylase 활성은 Brodie와 Axelrod의 방법을 이용하여 p-aminophenol 형성 측정으로 실험하였다. Microsome 1 mg protein/ mL을 0.1 M potassium phosphate buffer에 부유시킨 후 NADPH- generating system (1 mM NADP+, 9 mM glucose-6-phosphate dehydrogenase)과 함께 37℃에서 20분간 shaking 하면서 반응시키고, 0.5 mL의 0.6 N perchloric acid를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그리고 0.1 mL의 5% phenol in 2.5 M NaOH와 2.5 M sodium carbonate를 첨가하여 30분간 발색시킨 후 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0026] CYP2E1은 CYP계의 효소 중에 8~11% 정도를 차지하며 nitrosoamines와 같은 발암물질의 대사에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있는바 본 실험에서 cytochrome P450 2E1은 별불가사리 다당추출물에 의해 농도의존적으로 저해율이 증가함을 보였으며, 그 증가율은 9~34% 정도를 나타내었다.(도 5) 그러므로 별불가사리 다당추출물에 의한 발암물질 대사가 억제되어 암발생이 억제될 것으로 기대된다.

[0027] **통계학적 처리**

[0028] 실험결과는 평균±표준편차 (standard deviation, SD)로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 student's *t*-test를 수행하여 결과치는 p 값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

산업이용 가능성

[0029] 본 발명은 간암예방 및 치료효과가 뛰어나므로 기능성식품 및 생물의약 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명 별불가사리 다당체 추출물의 제조공정을 보인 그림이다.

[0031] 도 2는 흰쥐(체중 140g)의 간조직으로부터 마이크로좀을 분리하는 공정을 보인 그림이다.

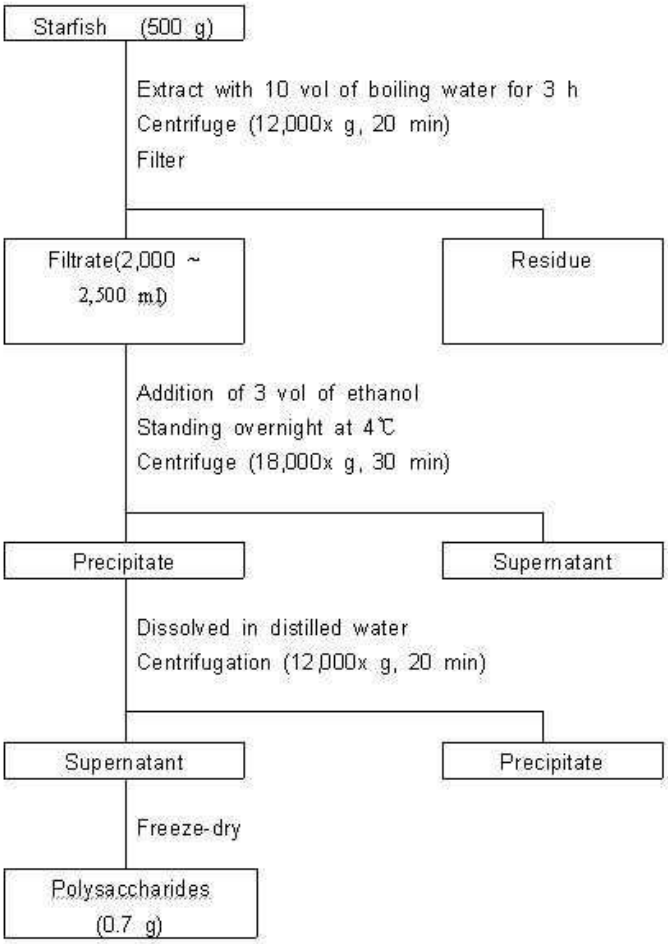
[0032] 도 3은 본 발명 별불가사리 다당체 추출물의 농도별 β-naphthoflavone-induced Cytochrome P450 1A1 활성저해를 보인 그림이다.

[0033] 도 4는 본 발명 별불가사리 다당체 추출물의 농도별 Phemobarbital-induced Cytochrome P450 2B1 활성저해를 보인 그림이다.

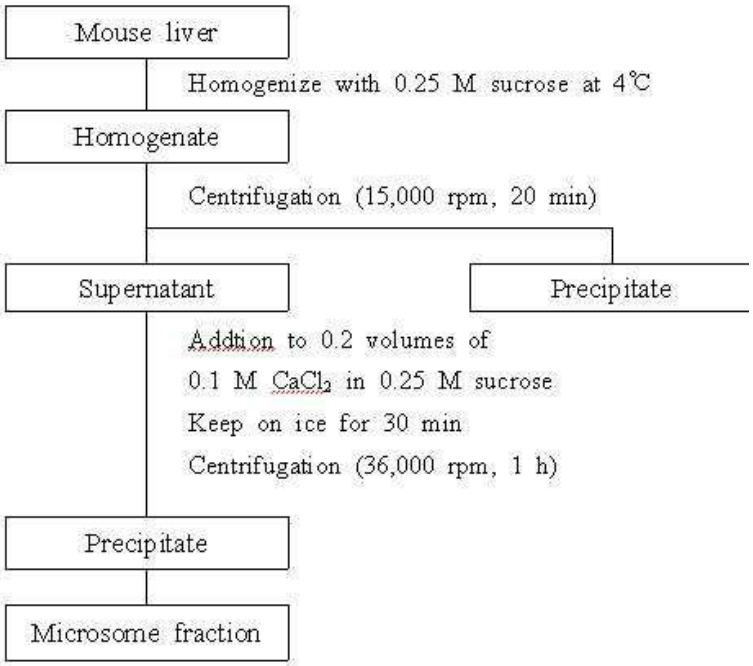
[0034] 도 5는 본 발명 별불가사리 다당체 추출물의 농도별 Pyrazole-induced Cytochrome P450 2E1 활성저해를 보인 그림이다.

도면

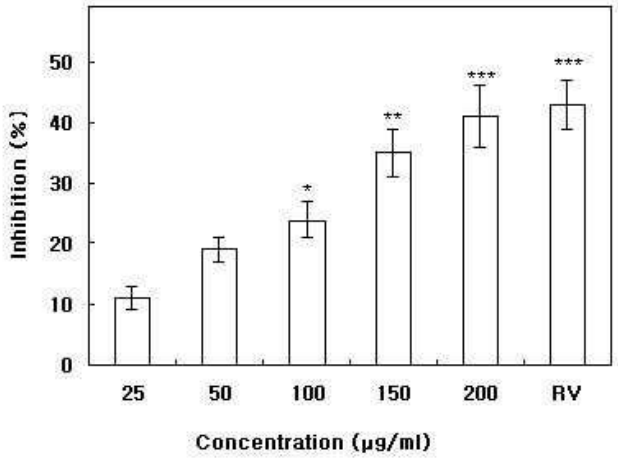
도면1


Starfish (500 g)
Extract with 10 vol of boiling water for 3 h
Centrifuge (12,000x g, 20 min)
Filter
Filtrate(2,000 ~ 2,500 ml)
Residue
Addition of 3 vol of ethanol
Standing overnight at 4℃
Centrifuge (18,000x g, 30 min)
Precipitate
Supernatant
Dissolved in distilled water
Centrifugation (12,000x g, 20 min)
Supernatant
Precipitate
Freeze-dry
Polysaccharides (0.7 g)

도면2

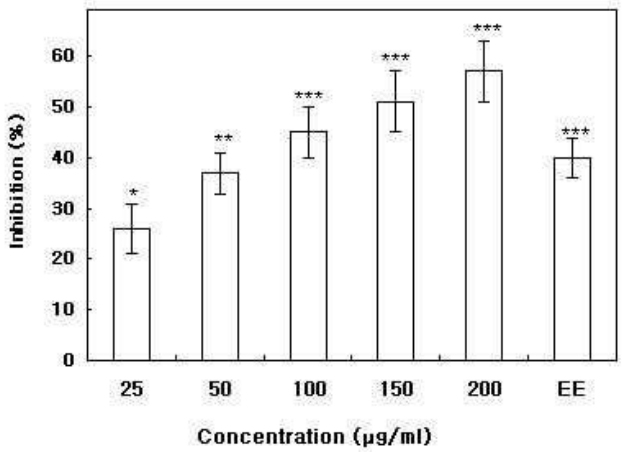


도면3



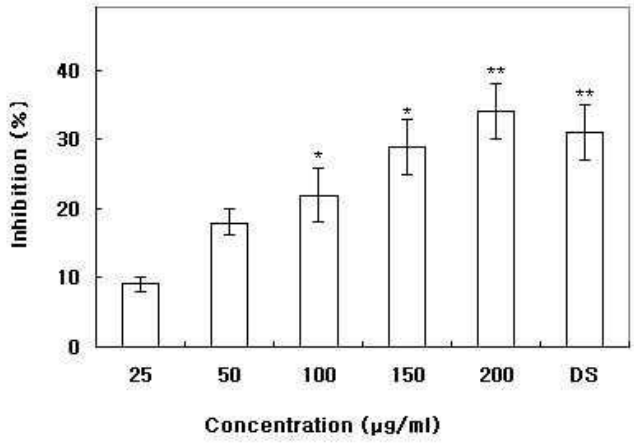
(주) RV, 0.05 nM resveratrol. Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n=3). *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.005 compared with the control.

도면4



(주) EE, 10 nmole ethynylestradiol. Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n=3). *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.005 compared with the control.

도면5



(주) DS, 0.1 μM diallyl sulfide. Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n=3).