



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0024159
(43) 공개일자 2012년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/39 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0086886

(22) 출원일자 2010년09월06일

심사청구일자 2010년09월06일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

정혜광

대전광역시 유성구 반석서로 98, 609동 1102호 (반석동, 반석마을6단지아파트)

정영철

경상남도 진주시 초장로14번길 27, 초전푸르지오아파트 101동 1702호 (초전동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

백경업

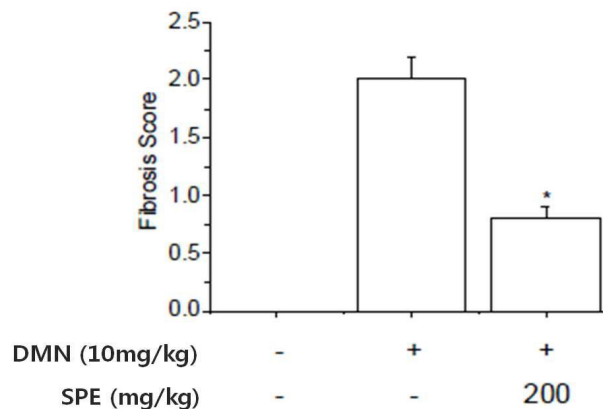
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 자색고구마 추출물을 함유하는 간섬유증 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 자색고구마 추출물을 함유하는 간섬유증의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로 본 발명의 자색고구마 추출물은 간성상세포와 렛드 간세포의 섬유화 반응을 억제하여 간섬유증을 예방, 개선 및 치료하는 조성물 또는 건강기능식품으로 사용할 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

황용필

전라남도 보성군 노동면 감정리 36번지

최재호

광주광역시 북구 하서로241번길 16, 금광 아파트
101동 909호 (양산동)

특허청구의 범위

청구항 1

자색고구마를 50~100% 에탄올 수용액으로 추출한 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 간섬유증 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 자색고구마는 자미(목포 29호), 보라미(목포 35호), 신자미(목포 38호)를 포함하는 그룹 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 간섬유증 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

자색고구마를 50~100% 에탄올 수용액으로 추출한 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 간섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 자색고구마는 자미(목포 29호), 보라미(목포 35호), 신자미(목포 38호)를 포함하는 그룹 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 간섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 건강기능식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료 등을 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 자색고구마 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유증의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 본 발명은 자색고구마 추출물을 함유하는 간섬유증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0003] 간섬유증의 원인은 알코올의 섭취, 약물 남용, 자가면역질환, 대사질환장애, 담즙분비 정체증, 간염 등으로 알려져 있다(Friedman, 2000). 간섬유증은 상기 원인들로 인한 간세포의 지속적인 파괴와 반복적인 간손상에 따라 나타나는 섬유화 현상(liver fibrogenesis)으로, ECM(extracellular matrix, 세포외 기질)의 생성은 증가되지 만 이에 대한 분해는 상대적으로 줄어드는 현상이 발생하고 심해지면 간경변이나 간암으로 진행된다(Hsiang et al., 2005). 간섬유증은 일단 섬유화가 진행되면 정상간으로 복원되기가 어려우며, 간경변이나 간암으로 진행되 어 이에 대한 사망률이 계속적으로 증가되는 추세이다.

[0004] 상기 ECM의 과다생성은 간내 대식세포인 쿠퍼세포(Kupffer cell)가 활성화됨으로써 분비되는 활성산소종(reactive oxygen species), 성장인자(growth factors), 전섬유화 사이토카인(profibrogenic cytokines) 등에 의해 간성상세포(hepatic stellate cell, HSC)의 활성화가 촉진되어 상기 활성화된 간성상세포에서 결합조직의 생성이 증가됨으로써 야기되는 것으로 알려져 있다(Kisseleva and Brenner, 2007).

[0005] 간성상세포는 1876년 쿠퍼(Kupffer)에 의해 발견되었고, 이토(Ito)에 의해 기술되었으며, 1971년 웨이크(Wake)에 의해 정립되었다. 간성상세포는 동모양혈관 내피세포와 간세포사이의 디스강(space of Disse)에 위치한 세포로서 별 모양을 하고 있고, 이토 세포(Ito cell)라고도 하였다. 또한 비타민 A를 함유하고 있는 지방소적(lipid

droplet)을 갖고 있어서 비타민 A 저장세포(vitamin A storing cell), 지방 저장세포(fat storing cell) 또는 동양구조유사 간 지질세포(perisinusoidal hepatic lipocyte) 등으로 여러 가지로 명명되었으나 1990년대 말에 공식용어로 간성상세포(hepatic stellate cell, HSC)라 결정되어 현재까지 사용되고 있다.

[0006] 쿠퍼세포는 여러 독성물질에 의해 손상된 간세포를 식작용(phagocytosis)함으로써 활성화되거나 또는 독성물질에 의해 직접 활성화되어 TGF- β (transforming growth factor- β), PDGF(platelet-derived growth factor) 등의 사이토카인을 분비하며, 이들 사이토카인에 의해 쿠퍼세포 자기자신이 다시 활성화(autocrine)된다. 또한, 쿠퍼세포가 분비한 사이토카인들에 의해 간조직내 동모양혈관 내피세포(sinusoidal endothelial cell) 및 간성상세포가 활성화된다. 활성화된 간성상세포에 의해 분비되는 4형 콜라겐나아제(collagenase type IV)와 증가된 콜라겐 생산에 의해 ECM(extracellular matrix)의 정상구성비율이 깨지면서 기저막 ECM(basement membrane-like matrix, 예를 들어 4형 콜라겐)은 분해되고, 세포간 ECM(interstitial type matrix, 예를 들어 1형 및 3형 콜라겐)은 서로 꼬여 소섬유상 콜라겐(fibril-forming collagen)을 형성한 후 디트세강(space of Disse)에 축적되며, 분해된 기저막 ECM 및 축적된 세포간 ECM에 의해서 간성상세포가 활성화된다. 활성화된 간성상세포는 콜라겐분해효소(Metalloproteinase; MMP)의 활성 억제물질인 마크로글로불린(macroglobulin) 및 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinases) 등의 생성을 촉진시켜, 과도하게 생성되는 세포간 ECM의 분해도 억제한다. 디트세강에 축적된 세포간 ECM에 의해 혈액과 간세포간의 물질교환이 저해됨으로써, 간세포는 영양물질의 공급 및 독성물질의 배출이 어렵게 되고, 간세포 역시 지속적으로 손상된다. 이러한 일련의 반응이 반복되면서 간조직중에 결합조직이 축적되면서, 간섬유화 내지 간경화가 유발된다.

[0007] 간성상세포의 성장과 증식 및 콜라겐 생성과 α -SMA의 발현을 활성화시키는 사이토카인(cytokine)으로는 상기에 언급된 PDGF(platelet-derived growth factor)가 대표적이다(Pinzani and Marra, 2001; Pinzani, 2002; Lotersztajn et al., 2005; Kisseleva and Brenner, 2008; Henderson and Iredale, 2007; Wallace et al., 2008). PDGF는 PDGF 수용체(platelet-derived growth factor receptors, PDGFR)를 인산화시켜 간세포의 섬유화 과정과 콜라겐 합성 등을 촉진하는 것으로 알려져 있으며 간섬유화가 진행될 때 PDGFR의 발현도 증가하는 것으로 알려져 있다(Pinzani et al., 1998). 상기 PDGF와 PDGFR은 오토크라인(autocrine) 및 파라크라인(paracrine) 반응으로 간성상세포의 증식을 자극하게 된다(Lotersztajn et al., 2005; Pinzani and Marra, 2001). PDGF는 A 또는 B 체인(chain)으로 구성되며 AA, AB, BB의 이형체로 존재하며, PDGFR은 알파 타입(PDGFR- α)과 베타 타입(PDGFR- β)으로 구성되어 있으며 PDGF의 A 및 B 체인은 PDGFR- α 와 모두 반응하지만, PDGF의 B 체인은 오직 PDGFR- β 에만 반응하는 것으로 알려져 있다.

[0008] 현재 간섬유증에 대한 연구는 ECM에 대한 연구, 이에 관여하는 세포와 각종 세포간의 관계, 세포의 활성화 기전, 각종 사이토카인 및 항섬유화제(antifibrogenic agents)에 대한 연구 등 여러가지 방면으로 활발히 진행되고 있으며, 간섬유증의 조기 진단방법 및 치료제 개발을 목표로 하고 있다. 특히, 과다축적된 결합조직의 생산을 수반하는 간섬유화 및 간경화의 가장 큰 유발원인이 간성상세포의 활성화라는 것이 밝혀지면서, 현재 간성상세포(hepatic stellate cell)의 활성 및 활성화를 억제할 수 있는 약물 개발에 대한 연구가 지속되고 있다.

[0009] 종래에 간섬유증을 억제하는 물질로, 페니실라민, 16,16-디메틸 프로스티글라딘 E2, 비페닐 디메틸 디카르복실산, 콜키친, 글루코코티코이드, 말로틸산(malotilate), 감마-인터페론, 펜톡시필린(pentoxifylline), 피리딘-2,4-디카르복실릭-디에틸아미드, 피리딘-2,4-디카르복실릭-디(2-메톡시에틸)아미드 등이 개발되었지만, 임상에 적용시 작용이 미약하거나 부작용이 심하여, 현재로서는 임상에 사용되고 있는 간섬유증 치료제는 없다고 말할 수 있다(Boker et al., J. Hepatol., 13, s35, 1991; Tamayo et al., ibid, 3, 112, 1983; Jenkins et al., ibid, 1, 489, 1985; Kershenovich et al., ibid, 7, 1104, 1987; Svegliati et al., 18 209A, 1993; Guzelian et al., Gastro., 86, 897, 1984; Ala-Kokko et al., J. Lab. Clin. Med., 113, 177, 1989).

[0010] 간 섬유화를 유발하는 대표적인 물질 중에 DMN(Dimethylnitrosamine)이 있다. DMN은 동물실험 모델에서 염색체 P450 2E1 4(CYP2E1)에 강력한 간독성 대사반응을 일으키는 화합물로 알려져 있다(George et al., 2001). 또한 상기 DMN은 간 내 효소들의 의해서 디메틸(demethyl)화되어 모노메틸니트로사민(monomethylnitrosamine)으로 형성되고, 반응성이 강한 전자 친화성의 중간물질인 메칠카보늄 이온(methylcarbonium ion)으로 대사되어 상기 메칠카보늄 이온이 DNA를 비롯한 여러가지 세포의 거대분자를 메칠화시킴으로서 간섬유화를 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0011] 본 발명에 사용되는 자색고구마(자미고구마; purple-fleshed sweet potato)는 1993년 가공용 다수성 품종 건미를 모본으로 하고 자색 색소를 함유한 야마카와무라사끼를 부분으로 인공 교배하여 그 후대인 실생 개체선발 및 계통선발시험에서 색소용으로 선발된 계통이다(MI9308-11, 색소원료용 자색고구마의 평가방법과 육종 [1994.

Kinnosuke Odake 등 8인, 일본] 기술보고 41[4], 287~293). 이 후, 상기 자색고구마는 생산력검정시험과 지역 적응시험(목포29호)에서 다수성이 확인되어 품종교배를 통해 지난 1998년 자미, 2000년 보라미, 2001년에 신자미 등 3가지 신품종으로 육성되었다. 이들 신품종은 야생 고구마의 고유 성분은 모두 간직하고 있으면서도 크기는 일반 고구마와 비슷한 반면 수확량은 야생보다 2배 이상 많고, 고구마 고유의 당질과 섬유소를 가지고 있다는 장점을 지니고 있다.

[0012] 본 발명자는 간질환 치료제에 대한 연구를 하던 중, 자색고구마 추출물이 간성상세포주와 랫드 간세포에서 세포 증식억제 및 간섬유화 억제효과가 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0013] 한국등록특허 제792029호에는 자색고구마를 20% 에탄올로 추출하여 제조한 조추출물을 수지관 및 70% 에탄올 용매를 사용하여 정제한 색소 추출물을 포함하는 조성물이 개시되어 있으나 이는 아세트아미노펜에 의해 유도되는 급성간염 또는 만성간염의 예방 및 치료용 조성물에 대한 것으로 본 발명과 다르다. 상기 한국등록특허 제792029호에 개시된 조성물은 글루타티온 S-트랜스퍼라제의 효소활성을 증가시켜 유독성 화학물질 대사체의 체외 배출을 촉진함으로써 간독성을 억제하는 효과 및 항산화 효과가 있는 반면, 본 발명의 조성물은 간성상세포의 세포증식 및 간섬유화를 억제하는 효과가 있다. 비록 상기 한국등록특허 제792029호의 자색고구마 색소 추출물 함유 조성물이 간질환 개선제로 사용될 수 있고 상기 간질환으로 자가 면역성 간질환, 약물유인성 간질환, 알코올성 간질환, 감염성 간질환, 선천성대사성 간질환, 급성간염, 만성간염, 간경변증, 간경화, 지방간, 간암을 한정하는 설명이 발명의 상세한 설명에 개시되어 있지만, 간성상세포의 증식을 억제함으로써 간섬유화 작용을 억제한다는 것은 명세서 어디에도 기재되어 있지 않다.

[0014] 또한 한국등록특허 제760263호에 자미고구마를 주요성분으로 함유하는 음료 조성물이 간 기능 개선 기능이 있다고 개시되어 있지만 이 역시 간섬유증에 대해서는 개시되어 있지 않아 본 발명과 다르다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 자색고구마 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유증의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 자색고구마 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유증의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 자색고구마는 자미(목포 29호), 보라미(목포 35호), 신자미(목포 38호)의 품종인 것을 포함한다.

[0018] 상기 자색고구마의 추출물은 상기 자색고구마를 물, 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올 수용액, 에틸아세테이트, 에테르, 아세톤, 클로로포름 등과 같은 극성용매 및 이들의 혼합용매로 추출한 후, 이를 헥산과 물의 분배, 디아이온 HP-20 레진과 같은 흡착수지 사용방법, 칼럼 크로마토그래피에 의한 방법 등 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합하여 용이하게 얻을 수가 있다. 조추출물은 필요에 따라서 상법에 따라서 더욱 정제할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 사용하는 크로마토그래피에는 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘레이취-20 칼럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등이 이용될 수 있다.

[0020] 예를 들어, 생 자색고구마를 세절하여 무게(kg)의 약 1배 내지 20배, 바람직하게는 약 3배 내지 10배의 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 에탄올, 가장 바람직하게는 50~100% 에탄올 수용액으로, -30℃ 내지 100℃ 추출온도에서 약 1시간 내지 10일, 바람직하게는 약 2시간 내지 5시간 동안 냉침, 열수추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출방법을 이용하여 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 건조하여 자색 고구마 추출물을 수득할 수 있다. 이 후, 상기 추출물을 희석하여 C-18 Sep-Pak 카트리지(C-18 Sep-Pak cartridges)를 이용하여 활성물질이 C-18 Sep-Pak에 결합할 수 있도록 하여, C-18 Sep-Pak에 결합한 활성물질을 다시 C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물, 에탄올, 메탄올을 이용하여 재추출한 후 감압, 농축 및 건조를 통해 자색고구마 추출물을 수득할 수 있다.

[0021] 본 발명에 따른 추출물은 자색고구마로부터 쉽게 분리할 수 있을 뿐만 아니라 안정도도 높으므로 식품, 의약품

의 첨가제로 이용할 수 있다.

[0022] 본 발명에 따른 자색고구마 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 자색고구마 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 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 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0023] 상기 자색고구마 추출물의 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 자색고구마 추출물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 자색고구마 추출물은 천연물 유래의 물질이기 때문에 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0024] 또한, 본 발명은 자색고구마 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 간섭유증 예방 및 치료용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 건강기능식품으로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료 등을 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품 등이 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 자색고구마 추출물은 간성상세포와 랫드 간세포의 섬유화 반응을 억제하여 간섭유증을 예방 및 치료하는 조성물 또는 간섭유증을 예방할 수 있는 건강기능식품으로 사용할 수 있는 것으로 확인되었다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 HSC-T6 세포에서 자색고구마 추출물(SPE)의 세포독성을 MTT 어세이로 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 PDGF-BB의 처리로 인해 증가된 HSC-T6의 세포증식이 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 인해 억제되는 것을 WST-1 어세이로 확인하는 그래프이다.

도 3은 PDGF-BB의 처리로 인해 증가된 α -SMA의 단백질 발현이 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 인해 억제되는 웨스턴 블롯 결과를 수치상으로 나타낸 그래프이다.

도 4는 PDGF-BB의 처리로 인해 증가된 PDGFR- β 단백질의 인산화 비율이 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 인해 억제되는 웨스턴 블롯 결과를 수치상으로 나타낸 그래프이다.

도 5는 DMN(dimethylnitrosamine)의 투여로 발생한 랫드 간세포의 섬유화 현상이 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 인해 억제되는 것을 헤마톡실린-에오신 및 마센 트리크롬 염색법(hematoxylin and eosin 및 masson's

trichrome)으로 확인한 결과를 수치상으로 나타내는 그래프이다.

도 6은 랫드 간세포에서 DMN의 투여로 인해 콜라겐의 활성이 증가되었던 것이 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 인해 억제되는 것을 나타내는 콜라겐 어세이 결과이다.

도 7은 랫드 간세포에서 DMN의 투여로 인해 콜라겐 타입 III, 콜라겐 타입 I 및 α -SMA의 RNA 발현이 증가되었던 것이 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 인해 억제되는 것을 나타내는 RT-PCR 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0028] <실시예 1 : 자색고구마 추출물(SPE)의 제조>

[0029] 자색고구마는 세척 후, 껍질을 제거하고 사방 0.5cm 이내로 세절하여 동결건조하였다. 동결건조한 고구마(0.5 g)는 85% 에탄올 수용액 15ml를 넣어 균질화하였고(Ultra Turrax [Divtech Equipment Co., Cincinnati, OH] 및 Tissumizer[30,000rpm] 이용), -20℃에 12시간 동안 두었다. 이 후, 원심분리하여 얻어진 상등액을 농축하고, 0.01% HCl 수용액을 이용하여 5ml로 희석하여 활성물질을 흡수할 수 있도록 0.01%의 산을 포함한 메탄올로 전처리된 C-18 Sep-Pak 카트리지를(C-18 Sep-Pak cartridges)를 이용하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 최종적으로 상기 컬럼에서 자색고구마 추출물을 0.01%의 HCl을 포함한 메탄올로 용출하였고 이를 질소 하에서 농축하여 1.25mg의 자색고구마 추출물을 획득하였다.

[0030] <실시예 2 : 간성상세포에서의 간섬유증 억제 효과>

[0031] 2-1 : 세포독성 및 세포증식 활성 확인

[0032] 세포독성 및 세포증식 활성 확인을 MTT 어세이 및 WST-1 어세이를 수행하였으며 각각 Roche에서 제조된 키트를 이용하였다. 이를 위해, 랫드 간성상세포인 HSC-T6(rat hepatic stellate cell line)를 24웰 세포배양 플레이트에 각 웰당 5×10^5 개/ml의 세포를 넣어 10% FBS(fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 세포배양배지에 24시간 동안 배양한 후 자색고구마 추출물을 처리하였다. WST-1 어세이에서는 세포증식을 확인하기 위해서 10ng/ml의 PDGF-BB 존재 유무 하에서 자색고구마 추출물(SPE)을 처리하였으며, 각 어세이의 결과는 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0033] 도 1의 결과를 참고하면, 본 발명의 자색고구마 추출물(SPE)에서 세포독성은 나타나지 않는 것으로 확인되며, 도 2의 결과로 PDGF-BB로 인해 증가된 세포증식 활성이 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 억제되는 것을 확인할 수 있다.

[0034] * PDGF-BB : 인체 혈소판 유래 성장인자(PDGF, Human Platelet-Derived Growth Factor)의 한 형태임

[0035] 2-2 : α -SMA 발현 및 PDGFR- β 인산화 확인

[0036] 본 발명의 자색고구마 추출물이 간세포의 섬유화 반응을 억제하는 것을 확인하기 위해 간섬유증에서 과발현되는 것으로 알려진 α -SMA(α -smooth muscle actin)의 발현과 PDGFR- β (platelet-derived growth factors- β)의 인산화 반응을 웨스턴 블롯으로 확인하였다(PDGF 발현량이 증가되어 PDGFR- β 에 많이 반응할수록 PDGFR- β 의 인산화 반응이 증가함).

[0037] 이를 위해 10ng/ml의 PDGF-BB 존재 유무하에서 본 발명의 자색고구마 추출물이 처리된 HSC-T6 세포를 수거하여 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하고, 100 μ l의 세포용해버퍼(120mM NaCl, 40mM Tris, pH 8.0, 1% NP40)로 세포를 파쇄하여 단백질을 수득하였다. 상기 단백질은 40 μ g씩 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하였고, PVDF 멤브레인으로 단백질을 전이시켰다. 이후, 1% BSA(bovine serum albumin) 용액으로 멤브레인을 블로킹(blocking)한 후, 3시간 동안 1차 항체를 반응하고 1시간 동안 2차 항체를 반응시켰다. 단백질 발현의 확인은 웨스턴 블로팅 디텍션 키트(western blotting detection kit, Pierce)를 이용하여 확인하였고, 이에 대한 α -SMA의 발현과 PDGFR- β 의 인산화 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0038] 도 3 및 도 4의 결과를 참고하면, PDGF-BB로 인해 증가된 α -SMA의 발현과 PDGFR- β 의 인산화 반응이 본 발명의 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 인해 감소하는 것을 확인할 수 있다.

<실시예 3 : DMN 투여된 랫드에서의 간섬유증 억제 효과>

3-1 : 랫드에 DMN 및 자색고구마 추출물 투여

자색고구마 추출물이 간섬유화 반응을 억제한다는 것을 HSC-T6 세포주 이외에 DMN(dimethylnitrosamine, 간섬유화 반응 유도)을 투여한 랫드(5주령, 웅성, sprague-Dawley rat, 각 군 별로 5마리 사용)를 이용하여 확인하였다.

DMN과 자색고구마 추출물의 투여농도는 하기 표 1의 조건과 같고, DMN이나 자색고구마가 처리되지 않는 조건(용량 0mg/kg)인 경우에는 멸균식염수를 투여하였다.

표 1

조건	DMN(mg/kg)	자색고구마 추출물(mg/kg)
1. 대조군	0	0
2. DMN 처리군	10	0
3. DMN 및 자색고구마 추출물 처리군	10	100
4. DMN 및 자색고구마 추출물 처리군	10	200

DMN은 4주 동안 1주일에 3회 복강투여하였고, 자색고구마 추출물은 4주 동안 1주일에 6회 위내투여하였다.

3-2 : 간 조직검사

간섬유화 반응의 진행 정도를 확인하기 위해 헤마톡실린-에오신 및 마센 트리크롬 염색법(hematoxylin and eosin 및 masson's trichrome, Vyberg et al., 1987)으로 실시예 3-1의 랫드의 간 좌엽에 대한 조직검사를 수행하였고, 간섬유화 반응의 진행단계를 0~4(0 : no increase, 1 : slight increase, 2 : moderate increase, 3 : distinct increase, 4 : severe increase)의 점수를 매겨 이에 대한 결과를 도 5에 나타내었다.

도 5의 결과를 참고하면, DMN의 투여로 인해 진행된 간섬유화 반응이 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 인해 현저하게 감소되어 있는 것을 확인할 수 있다.

3-3 : 콜라겐 어세이

실시예 3-1의 랫드의 간 우엽 0.2g을 1mg의 펩신(pepsin)이 포함된 0.5M의 아세트산에서 균질화하고, 24시간 동안 4℃에서 교반하며 반응시켰다. 이 후, 시르콜 콜라겐 어세이 키트(Sircol collagen assay kit, Biocolor)를 이용하여, 상기 간세포 균질액에 포함된 콜라겐의 활성을 확인하였고 그 결과는 도 6에 나타내었다.

도 6의 결과를 참고하면, DMN의 투여로 인해 증가되어 있는 콜라겐 활성이 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 인해 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다.

3-4 : 간세포의 섬유화 반응 발현 억제

콜라겐 타입 III, 콜라겐 타입 I 및 α -SMA의 발현 정도를 확인하기 위해서, RT-PCR을 수행하였다. 실시예 3-1의 랫드의 간세포에서 RNAiso 용액(Takara)을 이용하여 RNA를 추출하여 이를 이용해 cDNA(complementary DNA)를 합성하여 RT-PCR을 수행하였다. 상기 RP-PCR은 0.5 μ g의 RNA를 cDNA로 합성하여 [94℃-30초, 56℃-30초, 72℃-45초] 30 사이클(cycle) 및 72℃-7분의 조건으로 수행하였으며, 프라이머(primer) 조건은 하기와 같고, 상기 결과물로 2% 아가로오스 겔 전기영동(2% agarose gel electrophoresis)을 수행한 EtBr(ethidium bromide) 염색 결과는 도 7에 나타내었다.

α -SMA Forward : GCTCTGTAAGGCGGGCTTTG

α -SMA Reverse : ACGAAGGAATAGCCACGCTCA

collagen type I Forward : GGTAACGATGGTGCTGTCGG

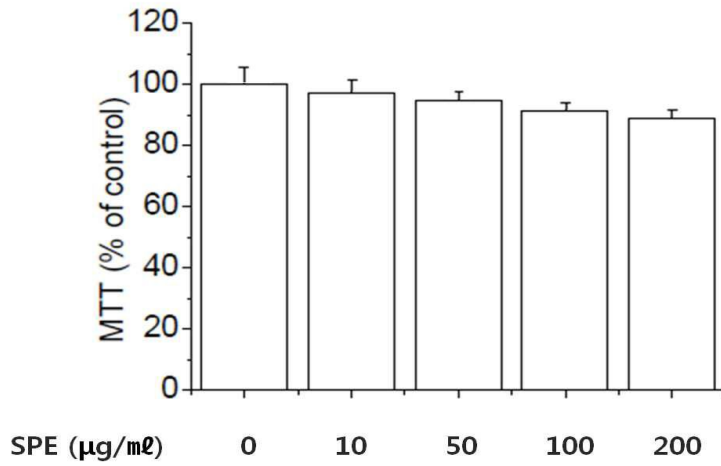
- [0056] collagen type I Reverse : GGGACCTTGAAGCTCCAGCAG
- [0057] collagen type III Forward : AGATCATGTCTTCACTCAAGTC
- [0058] collagen type III Reverse : TTTACATTGCCATTGGCCTGA
- [0059] β -actin Forward : GCCATGTACGTAGCCATCCA
- [0060] β -actin Reverse : GAACCGCTCATTGCCGATAG
- [0061] 도 7을 참조하면, DMN 투여로 인해 증가되어 있는 콜라겐 타입 III, 콜라겐 타입 I 및 α -SMA의 RNA 발현이 자색고구마 추출물(SPE)의 처리로 인해 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다.
- [0062] <실시예 4 : 독성시험>
- [0063] 4-1 : 경구투여
- [0064] ICR계 마우스(25g)를 10마리씩 5개의 군으로 나누어 본 발명에 따른 자색고구마 추출물을 각각 0, 2, 10, 20 및 50 μ g/kg의 용량으로 경구 투여한 후 2주간 독성여부를 관찰한 결과, 5개의 군에서 모두 생존하였다.
- [0065] 4-2 : 복강투여
- [0066] ICR계 마우스(25g)를 10마리씩 5개의 군으로 나누어 본 발명에 따른 자색고구마 추출물을 각각 0, 2, 10, 20 및 50 μ g/kg의 용량으로 복강 투여한 후 24시간 동안 독성여부를 관찰한 결과 5개의 군 모두 생존하였다.
- [0067] 이상의 결과에서 본 발명의 자색고구마 추출물(SPE)은 급성독성이 거의 없음을 확인하였다.
- [0068] <사용예 1 : 약학적 제제예>
- [0069] 1-1 : 정제의 제조
- [0070] 본 발명의 자색고구마 추출물 20g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.
- [0071] 1-2 : 주사액제의 제조
- [0072] 본 발명의 자색고구마 추출물 2g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.
- [0073] <사용예 2 : 식품 제제예>
- [0074] 2-1 : 조리용 양념의 제조
- [0075] 본 발명의 자색고구마 추출물을 0.2~10 중량%로 하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.
- [0076] 2-2 : 밀가루 식품의 제조
- [0077] 본 발명의 자색고구마 추출물을 0.1~5.0 중량%로 하여 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.
- [0078] 2-3 : 스프 및 육즙(gravies)의 제조
- [0079] 본 발명의 자색고구마 추출물을 0.1~1.0 중량%로 하여 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.
- [0080] 2-4 : 유제품(dairy products)의 제조
- [0081] 본 발명의 자색고구마 추출물을 0.1~1.0 중량%로 하여 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0082] <사용예 3 : 음료 제제예>
- [0083] 3-1 : 야채주스 제조
- [0084] 본 발명의 자색고구마 추출물 0.5g을 토마토 또는 당근 주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0085] 3-2 : 과일주스 제조

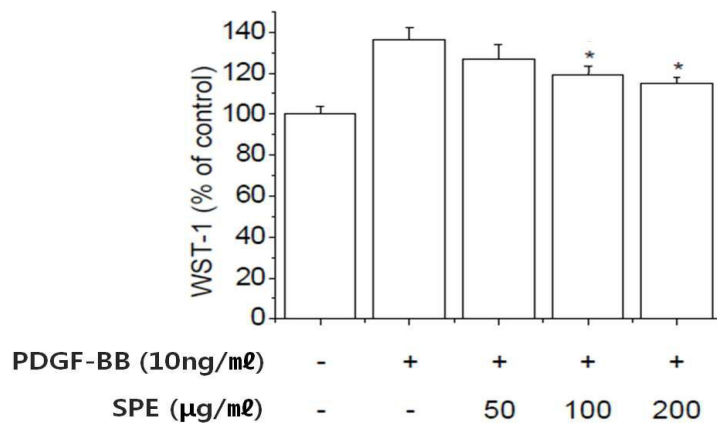
[0086] 본 발명의 자색고구마 추출물 0.1g을 사과 또는 포도 주스 1,000mℓ에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

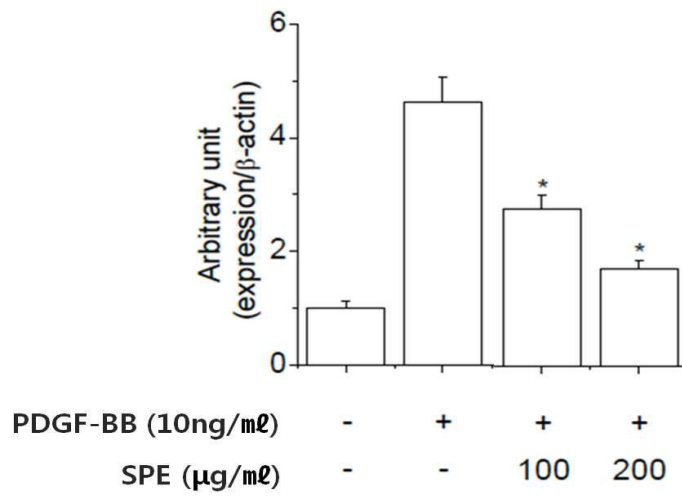
도면1



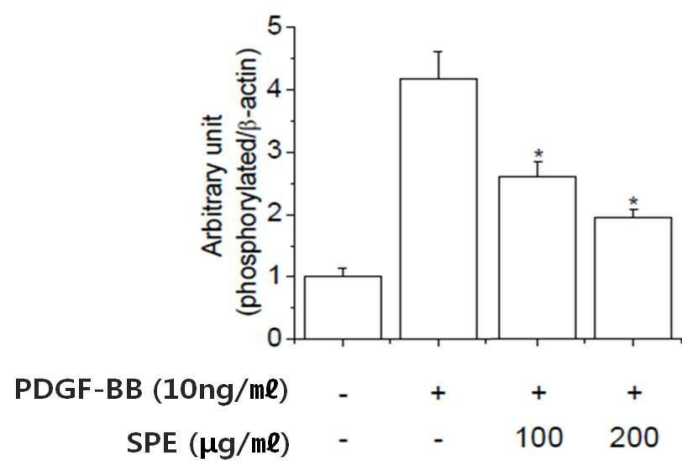
도면2



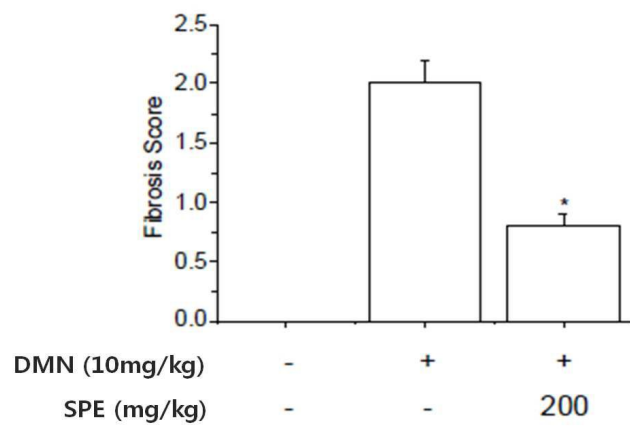
도면3



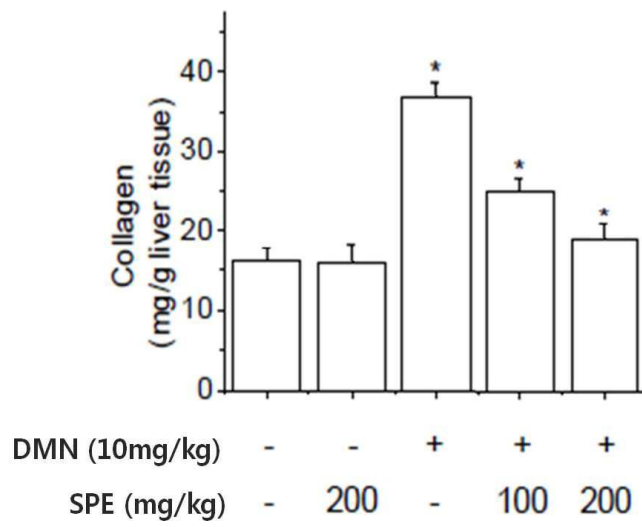
도면4



도면5



도면6



도면7

