(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월25일
(11) 등록번호 10-1961625
(24) 등록일자 2019년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/71 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/71 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0120220
(22) 출원일자 2017년09월19일
심사청구일자 2017년09월19일
(56) 선행기술조사문헌
'국산 Thalictrum 속 식물 지상부의 성분검색', 생약학회지, 1972, 제3권, 제1호, 23-25쪽
'한국산 Thalictrum속 식물 지하부의 성분검색', 생약학회지, 1971, 제2권, 제2호, 89-93쪽

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
권효정
대전광역시 유성구 지족로 343, 204동 1204호 (지족동, 반석마을아파트)
이규필
대전광역시 유성구 노은로 353, 307동 706호 (하기동, 송림마을아파트3단지)
(74) 대리인
최규환

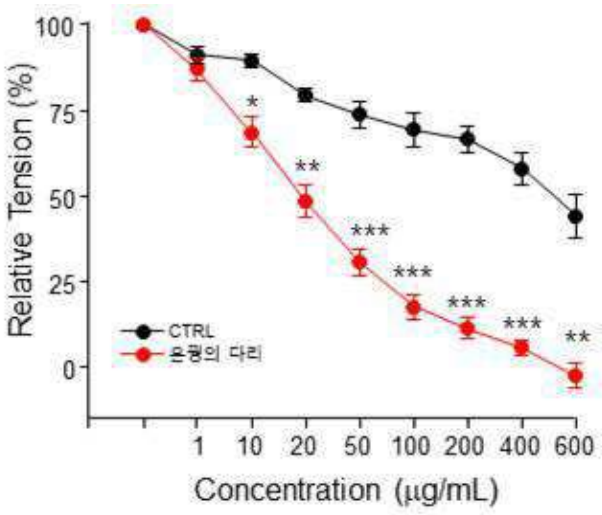
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 이정아

(54) 발명의 명칭 **은꿩의다리 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환 및 배뇨장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 은꿩의다리 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환 및 배뇨장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분인 은꿩의다리 추출물은 안드로겐 수용체(androgenic receptor) 또는 전립선 특이항원(prostate specific antigen) 단백질의 발현을 억제할 뿐만 아니라, 전립선 평활근을 이완시킬 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

은꿩의다리(Thalictrum actaefolium) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 은꿩의다리 추출물의 추출용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 전립선 질환은 전립선염, 전립선 비대증 또는 전립선 비대에 의한 하부요로증인 것을 특징으로 하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 은꿩의다리 추출물은 안드로겐 수용체(androgenic receptor) 또는 전립선 특이항원(prostate specific antigen) 단백질의 발현을 억제하며, 전립선 평활근을 이완시키는 것을 특징으로 하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증에 의한 배뇨장애 개선제.

청구항 6

은꿩의다리(Thalictrum actaefolium) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 은꿩의다리(Thalictrum actaefolium) 추출물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule) 및 산제 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 전립선 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 은꿩의다리 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환 및 배뇨장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전립선은 요도가 건조해지지 않도록 여러 가지 분비물을 만들어 내는 장기로, 남성 호르몬인 안드로겐과 밀접한 관련이 있다. 분비가 증가함에 따라 점점 커지는데, 20~30대의 전립선이 50대까지 유지되다 그 이후부터 비대해진다. 이것을 양성 전립선 비대증이라고 하며, 호르몬 치료로 크기를 정상으로 돌려놓았다 하더라도 부작용의 위험이 크고, 호르몬 치료를 멈추면 곧 원상 복귀되기 때문에 완치하기 어렵다.

[0003] 전립선에 발생하는 대표적인 질환은 전립선 비대증, 만성 전립선염 및 전립선암을 꼽을 수 있다. 전립선염은 다양한 원인이 있지만 주로 세균 감염, 원인 모를 염증, 만성통증의 일환으로 생기는 질환이고, 전립선암은 전립선 중 비교적 바깥쪽부분에 악성 종양이 생긴 것인데, 미국의 한 조사 결과에 따르면, 전립선암이 전체 남성 암

환자 중 약 35%를 차지하고 있으며, 매년 2~3%씩 증가하고 있다고 한다. 우리나라에서의 발생 빈도는 10만 명당 세 명으로 아직까지 걱정할 수위는 아니지만, 점차 서구적으로 변해가는 식생활이나 급격히 불어나는 노년층 인구로 그 비율이 점차 높아지고 있다.

[0004] 한편, 전립선 비대증(Benign prostatic hyperplasia, BPH)은 노화와 성호르몬의 불균형의 영향으로 요도 주위 전립선 '샘조직'이 커져 요도를 압박하여 배뇨증상이 나타나는 질환으로, 남성의 50세 이후 발병이 급격히 일어나는 남성질환이다. 최근 우리나라에서 전립선 비대증 질환자의 증가율이 매년 20%를 상회할 정도로 가파른 증가 추세이며, 전립선이행대 부분의 평활근(smooth cell)과 상피세포(epithelial)의 과도한 증식으로 야기되고, 전립선 비대증은 하부요로증상을 동반하는데, 이는 비대해진 전립선에 의한 해부학적 폐색과 전립선 평활근을 수축시키는 α1-수용체에 의한 기능적 폐색에 기인하는 것으로 알려져 있다. 폐색에 의한 주요 증상으로는 소변 줄기가 가늘고 약해지는 세뇨 또는 약뇨, 소변을 시작할 때 한참 기다려야 하는 지연뇨, 소변 중 의지와 관계없이 중단되는 배뇨중단, 소변 후 물방울처럼 떨어지는 배뇨 말기 적하, 및 잔뇨감 등이 대표적이다. 전립선 비대의 다양한 기전 중에서 대표적인 기전은 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone,T)과 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)이 관련되어 있다고 알려져 있다.

[0005] 한편, 은꿩의다리(*Thalictrum actaefolium*)는 쌍떡잎식물 미나리아재비목 미나리아재비과의 여러해살이 풀이다. 산지에서 자라며, 높이 30~60cm이고, 줄기는 곧게 서고 단단하며 포기 전체에 털이 없다. 잎은 어긋나며 2~3회 3장의 작은 잎이 나온 겹잎이며, 작은 잎은 막질(膜質:얇은 종이처럼 반투명한 것)이고, 넓은 달걀 모양이거나 네모난 타원 모양이다. 길이 1~4cm, 나비 1~3cm로서 가장자리는 깊이 패인 모양의 톱니가 있고 뒷면은 흰빛이다. 턱잎이 있다. 꽃은 양성화로서 7~8월에 붉은빛을 띤 흰색으로 피는데, 원추꽃차례로 달리며 꽃받침은 4갈래로 갈라지고 갈래조각은 길이 3~4mm에 타원 모양이다. 수술은 자줏빛이고 여러 개가 가락지 모양으로 늘어서며 암술은 3~5개이다. 열매는 수과로서 좁은 달걀 모양이고 능선이 있다. 참꿩의다리에 비해 암술머리와 암술대가 조금 길다. 어린 잎과 줄기는 먹는다. 한국 특산식물로서 중부 이남 지방에 분포한다.

[0006] 중국등록특허 제103772366호에 *Thalictrum foliolosum*로부터 분리한 항암제에 대한 기술이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1653492호에 염증 또는 전립선비대증 치료용 조성물에 관한 것이 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2015-00742270호에 흰말채나무 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 신규 화합물을 포함하는 전립선 질환 치료용 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 은꿩의다리 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대하여 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 은꿩의다리 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환 및 배뇨장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 본 발명의 유효성분인 은꿩의다리 추출물은 안드로겐 수용체(androgenic receptor) 및 전립선 특이항원(prostate specific antigen) 단백질의 발현을 억제할 뿐만 아니라, 전립선 평활근을 이완시고, 은꿩의다리 추출물이 soluble guanylyl cyclase 및 α_1-안드로겐 수용체를 통해 전립선 평활근을 이완시킨다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 은꿩의다리(*Thalictrum actaefolium*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 약학 조성물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증에 의한 배뇨장애 개선제를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 은꿩의다리(*Thalictrum actaefolium*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 은꿩의다리 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환 및 배뇨장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 유효성분인 은꿩의다리 추출물은 세포 독성이 없으며, 안드로겐 수용체(androgenic receptor) 및 전립선 특이항원(prostate specific antigen) 단백질의 발현을 억제할 뿐만 아니라,

전립선 평활근을 이완시키므로, 전립선 비대증, 전립선염 또는 전립선암 등의 전립선 질환에 효과적으로 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 은꿩의다리 추출물의 처리에 따른 세포생존률(%)을 확인한 결과이다. Ctrl는 아무것도 처리하지 않은 음성대조군이다.

도 2는 은꿩의다리 추출물의 안드로겐 수용체(androgenic receptor; AR) 및 전립선 특이항원(prostate specific antigen; PSA) 단백질의 발현억제 효과를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다. Ctrl는 음성대조군; Testosterone(TP)는 테스토스테론 처리군; TP+Finasteride는 테스토스테론 및 피나스테리드(Finasteride) 처리군; TP+TA는 테스토스테론 및 은꿩의다리 추출물 처리군이다.

도 3은 도 2의 웨스턴 블랏 결과에서, 안드로겐 수용체(androgenic receptor; AR)의 발현량을 정량화한 그래프로, Ctrl는 음성대조군; Testosterone(TP)는 테스토스테론 처리군; TP+Finasteride는 테스토스테론 및 피나스테리드(Finasteride) 처리군; TP+TA는 테스토스테론 및 은꿩의다리 추출물 처리군이다.

도 4는 도 2의 웨스턴 블랏 결과에서, 전립선 특이항원(prostate specific antigen; PSA)의 발현량을 정량화한 그래프로, Ctrl는 음성대조군; Testosterone(TP)는 테스토스테론 처리군; TP+Finasteride는 테스토스테론 및 피나스테리드(Finasteride) 처리군; TP+TA는 테스토스테론 및 은꿩의다리 추출물 처리군이다.

도 5는 본 발명의 은꿩의다리 추출물에 의한 전립선 평활근의 이완효과를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 은꿩의다리 추출물에 의한 전립선 평활근의 이완효과가 soluble guanylyl cyclase(sGC)를 경유하여 나타난다는 것을 확인한 결과이다.

도 7은 본 발명의 은꿩의다리 추출물에 의한 전립선 이완효과가 α_1-안드로겐 수용체 차단에 의한 효과라는 것을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 은꿩의다리(*Thalictrum actaefolium*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0014] 상기 전립선 질환은 전립선염, 전립선 비대증 또는 전립선 비대에 의한 하부요로증인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않으며, 상기 하부요로증은 방광에 소변을 충분히 채우지 못하고 자주 보거나 급하게 보는 경우로 소변을 너무 자주 보는 빈뇨, 밤에 자다가 일어나서 소변을 보게 되는 야간뇨, 소변 욕구가 갑자기 생기고 이를 참지 못하는 요절박, 의지와 상관없이 소변이 나와 옷을 적시는 요실금의 저장장애; 또는 소변을 시원하게 보지 못하고 힘을 줘서 보거나 약하게 보는 경우로 소변줄기가 약하고 가늘어지는 약뇨, 소변줄기가 갈라지거나 흩뿌려지는 분산뇨, 소변줄기가 한 번 이상 멈춰지는 간헐뇨, 소변을 보기 위해 배에 힘을 주어 소변을 보게 되는 복압배뇨의 배뇨장애를 의미하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0015] 상기 은꿩의다리 추출물은 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:

[0016] (1) 은꿩의다리 전초에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0017] (2) 단계 (1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0018] (3) 단계 (2)의 여과한 추출물을 감압 농축하고 건조하여 추출물을 제조하는 단계.

[0019] 상기 단계 (1)에서 추출용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물 중에서 선택하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 C_1~C_4의 저급 알코올이고, 더욱더 바람직하게는 99%(v/v) 메탄올이지만 이에 한정하지 않는다.

[0020] 상기 제조방법에 있어서, 추출방법은 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 당업계에 공지된 모든 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 은꿩의다리 중량의 1~20배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 5~15배 첨가하는 것이다. 추출온도는 4 내지 50℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 0.5~10시간인 것이 바람직하며, 0.5~5시간이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 방법에 있어서, 단계 (3)의 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무 건조

또는 동결 건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0021] 상기 은꿩의다리 추출물은 안드로겐 수용체(androgenic receptor) 또는 전립선 특이항원(prostate specific antigen) 단백질의 발현을 억제할 수 있고, 전립선 평활근을 이완시킬 수 있다.

[0022] 본 발명의 약학 조성물은 상기 은꿩의다리 추출물 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물은 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하게 사용할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 약학 조성물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증에 의한 배뇨장애 개선제에 관한 것이다.

[0028] 또한, 본 발명은 은꿩의다리(*Thalictrum actaefolium*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0029] 상기 은꿩의다리 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나로 제조하거나, 식품의 성분으로 첨가하여 제조될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.

[0030] 본 발명의 은꿩의다리 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 일례로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 중에서 선택된 어느 하나의 형태일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0031] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0032] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는

타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0033] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0034] 전립선 암 세포주인 LN cap에 테스토스테론을 72시간 동안 처리해서 BPH (전립선 비대증)을 유발한 후, 은꿩의다리 추출물을 농도별로 처리해서 세포 독성이 있는지 여부와 안드로겐 수용체(AR: androgenic receptor)와 전립선 특이항원(PSA: prostate specific antigen) 발현의 감소 여부를 확인하였다. 이때, 양성 대조군으로 전립선 비대증 치료제로 사용중인 피나스테라이드를 10㎍/㎖ 농도로 사용하였다.

[0035] **[은꿩의다리(전초) 추출물의 준비]**

[0036] 추출 용매는 99.9% 메탄올(HPLC grade)을 추출용매로 사용하여 6.0% 추출 수율로 추출한 은꿩의다리 메탄올 추출물 20.68mg을 한국식물 추출물 은행(KOREA PLANT EXTRACT BANK)으로부터 분양받아, 206.8㎕의 DMSO에 용해시켜 100mg/㎖의 stock을 제조하였다.

[0037] **실시예 1. 세포독성 확인(MTT Assay)**

[0038] 은꿩의다리 추출물이 LN cap cell의 세포 생존률(%)에 영향을 미치는지 확인하기 위해, 96-웰 플레이트에 1×10^4 개의 세포를 도말하여 24시간 동안 37℃에서 배양한 후, 은꿩의다리 추출물을 농도별(0, 50, 100, 200㎍/㎖)로 세포에 처리하여 72시간 동안 더 배양하였다. 그 후 EZ Cytox Assay Kit 10㎕/well을 넣고 2시간 가량 더 반응시킨 후 ELISA 리더로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0039] 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 은꿩의다리 추출물은 전립선 세포주의 세포생존률(%)에는 크게 영향을 주지 않았다.

[0040] **실시예 2. 은꿩의다리 추출물(*Thalictrum actaefolium*; TA)의 안드로겐 수용체(androgenic receptor: AR)와 전립선 특이항원 단백질(prostate specific antigen; PSA)의 발현 억제 효과**

[0041] 5×10^5 개의 세포를 6웰 플레이트에 도말하고, 24시간 배양 후, 100nM의 테스토스테론을, 대조군을 제외한 모든 웰에 처리하고, 은꿩의다리 추출물을 농도별 (50, 100, 200㎍/㎖)로 넣어준 후, 72시간 동안 37℃, 5% CO_2 환경에서 배양하였다. 양성대조군으로 10㎍/㎖의 피나스테라이드를 사용하였다.

[0042] 반응이 끝난 후 PBS로 2번 세척하고, 단백질 추출용매인 RIPA buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM Na_2EDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40, 1% 소듐 디옥시콜레이트(sodium deoxycholate), 2.5mM 피로인산나트륨(sodium pyrophosphate), 1mM β-glycerophosphate, 1mM Na_3VO_4, 1㎍/㎖ 류펩틴(leupeptin); Cell signaling, USA)를 처리하고, 초음파 처리한 후 얼음에 30분 동안 두고, 4℃에서 12,000rpm으로 20분 동안 원심분리 하였다.

[0043] 이후, 상층액만 덜어내어 단백질 분석키트(Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad , USA)로 단백질을 정량하고, 10㎍의 안드로겐 수용체 단백질, 30㎍의 전립선 특이 항원 단백질 각각에 대하여, 웨스턴 블랏으로 안드로겐 수용체(AR) 및 전립선 특이항원 단백질(PSA)의 발현 정도를 확인하였다(도 2).

[0044] 그 결과, 안드로겐 수용체 단백질(AR)의 경우, 정상군(Ctrl)에 비해 테스토스테론(TP)만 처리한 군에서의 안드로겐 수용체 단백질(AR)의 발현이 현저하게 증가하였으며, 은꿩의다리 추출물(TA)의 처리에 의해 AR의 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 특히, 200㎍/㎖의 은꿩의다리 추출물을 처리한 경우는 양성대조군인 피나스테라이드를 처리한 것보다도 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0045] 전립선 특이항원 단백질(PSA)의 경우도, 테스토스테론 처리에 의해 PSA 발현이 증가하였으나, 본 발명의 은꿩의

다리 추출물을 병용처리한 경우, PSA 발현이 농도 의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[0046] **실시예 3. 전립선 배측엽 절편을 이용한 전립선 이완효과 검증**

[0047] 체중 300~350gm인 8주령 수컷 또는 암컷 Sprague Dawley(SD) 랫트를 CO_2 가스가 들어있는 데시케이터에서 1~2분간 마취시키고, 경추탈구법(Cervical dislocation) 이후 신속하게 방광과 근위부 요도 부위를 적출하여 전립선 주변부의 capsular muscle 층을 깨끗이 제거하였다. 주변 지방조직 및 결합조직도 제거하였다.

[0048] 본 실시예 3에서 사용한 생리학적 용액은 변형된 크렙 용액(modified Kreb's solution)을 사용하였으며, 그 조성은 표 1에 개시하였다.

표 1

[0049] 변형된 크렙 용액의 조성

Compounds relaxant	mM
NaCl	120
$CaCl_2 \cdot H_2O$	2.5
$MgCl_2$	2
Glucose	11
$NaHCO_3$	25
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1.2
KCl	5.9

[0050] 인체 조직과 다르게, 흰쥐에서 적출된 전립선 조직은 교감신경계 (Noradrenaline)과 부교감신경계(Acetylcholine)에 의해서 평활근 수축을 유발하는 것으로 알려져 있으므로, 조직의 적출에 유의하였으며, 배측엽(Noradrenaline sensitive muscle)을 적출하여 실험에 사용하였다.

[0051] 조직은 silicon coated petri dish에서 빙-냉 용액 안에서 실체현미경 (Nikon SMZ-2T)을 이용하여 지방조직과 결합조직을 제거하였다. 이후 3~5mm 길이의 절편으로 잘라 근수축실험에 사용하였다. 근육 절편은 텅스텐 와이어로 제작한 고리에 단일 실크 섬유로 매듭을 지어 장착하였다. 두 개의 텅스텐 고리 중 한쪽은 organ bath 하단에, 다른 한쪽은 Isometric transducer(havard bioscience 52-9503)에 연결하였다. 전립선조직은 실험기간 동안 95% O_2와 5% CO_2 혼합가스를 지속적으로 공급하여 생리학적 pH 조성을 유지하였다. 등장성 수축은 디지털/아날로그 변환기(Powerlab PL3504/P, ADInstruments)를 통해 컴퓨터에 저장하였으며, 이후 LabChart Pro(ADInsturments)를 이용하여 기록, 분석하였다. 시료의 효과를 검증하기 위하여, 1μM 페닐레프린(phenylephrine)에 의한 수축반응이 최고점에 도달하고 지속적인 상태가 되면 준비된 시료들을 각각 1, 5, 10, 20, 100, 200, 400, 600 ㎍/㎖의 용량으로 organ bath에 축적되도록 첨가하여 각 시료에 대한 혈관의 수축력의 변화를 관찰하고 농도 의존적 그래프를 기록하였다.

[0052] **(1) 은꿩의다리 추출물에 의한 전립선의 이완효과**

[0053] 적출된 흰쥐의 전립선 배측 절편에 1μM 페닐레프린(phenylephrine)을 가하여 수축을 유발한 후 은꿩의다리 추출물 1, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600㎍/㎖의 용량으로 organ bath에 축적되도록 첨가하여 평활근의 이완을 관찰하였다. 그 결과, 도 5에 개시한 바와 같이 10㎍/㎖의 농도에서부터 전립선 평활근의 유의적 이완을 관찰할 수 있었다.

[0054] **(2) 은꿩의다리 추출물에 의한 전립선 이완효과에 있어서 ODQ-sensitive pathway의 부분적 작용**

[0055] 은꿩의다리 추출물에 의한 전립선 이완이 ODQ(H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one)에 의해 억제되는 soluble gunaylyl cyclase(sGC)에 의하는지 알아보기 위하여, 10μM ODQ(H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one)를 전처리하였다. 그 결과, 은꿩의다리 추출물에 의한 이완효과가 완화되어 50㎍/㎖ 농도에

서 유의적인 이완 감소 효과를 나타냈으나, 완전히 이완효과가 사라지지 않았다. 이러한 결과로 미루어 은꿩의다리 추출물에 의한 전립선 이완은 부분적으로 Nitric Oxide에 의해 활성화되는 soluble guanylyl cyclase를 경유하여 일어나는 것을 알 수 있었다(도 6).

[0056] **(3) 은꿩의다리 추출물에 의한 전립선 이완효과에 있어서의 α_1-안드로겐 수용체 차단 효과**

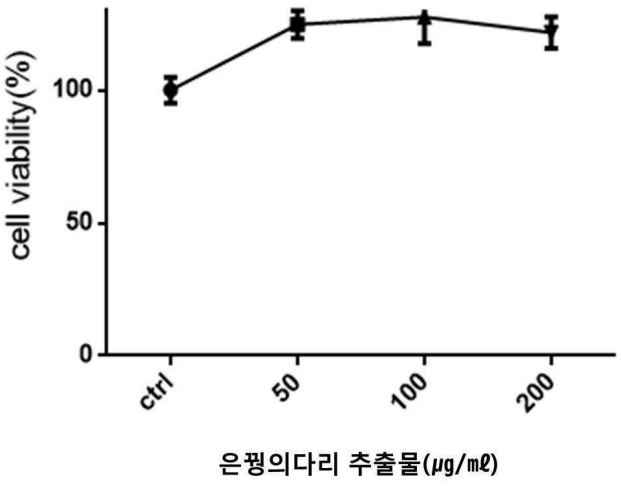
[0057] 페닐레프린은 민감한 α_1-안드로겐 수용체 작용제(α_1-adrenergic receptor agonist)로 알려져 있어, 페닐레프린을 이용하여 α_1-안드로겐 수용체를 활성화 시킴으로써 혈관이완 효과가 감소하는지를 확인하고자 하였다.

[0058] 적출된 흰쥐의 전립선 배측 절편에 5㎍/㎖의 은꿩의다리 추출물 및 대조군으로, 동량의 vehicle(DMSO)를 처리하고 15분 후에, 10^{-10}~10^{-4} M의 페닐레프닌(phenylephrine)을 가하여 농도반응 곡선을 구하였다.

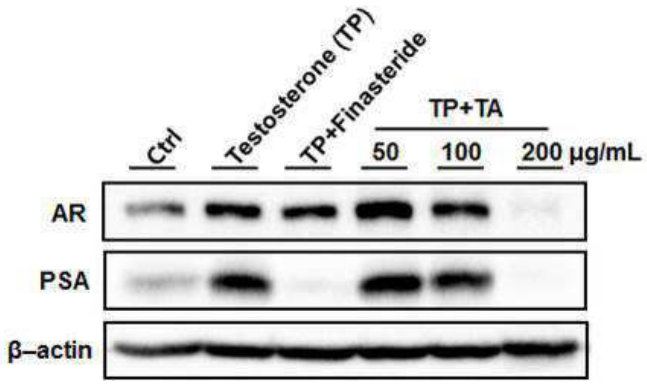
[0059] 그 결과, Vehicle을 처리한 대조군에서의 페닐레프닌에 의한 농도반응 곡선으로부터 구한 EC_{50}은 0.64㎛M이었으나, 은꿩의다리 추출물을 전처리한 전립선에서의 페닐레프린에 대한 농도반응 곡선의 EC_{50}은 3.4㎛M으로 나타났다. 따라서 은꿩의다리 추출물은 페닐레프린에 의한 전립선 수축을 길항하는 효과가 있다는 것을 알수 있었다(도 7).

도면

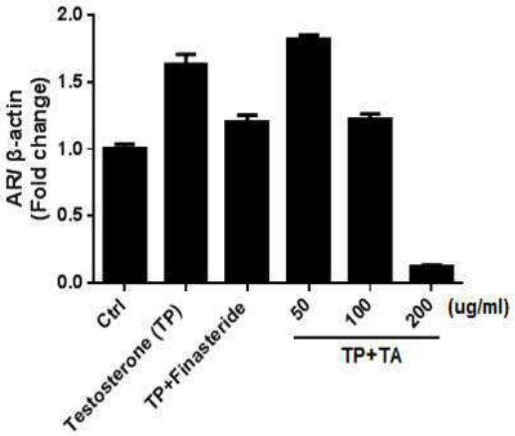
도면1



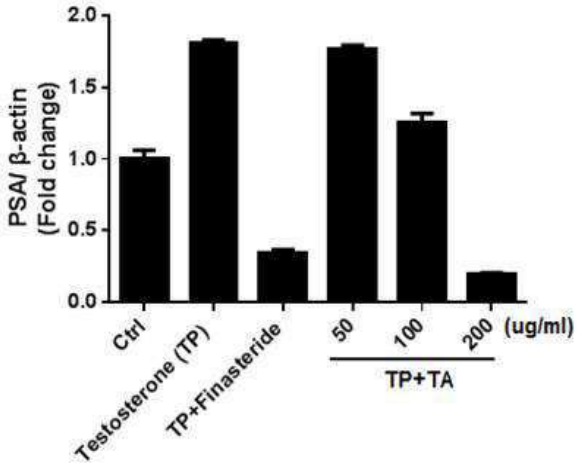
도면2


Ctrl
Testosterone (TP)
TP+Finasteride
TP+TA
50
100
200 μg/mL
AR
PSA
β–actin

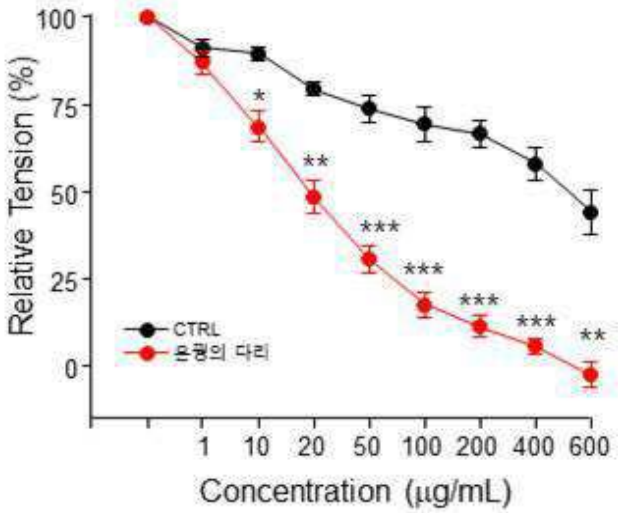
도면3


AR/ β-actin
(Fold change)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Ctrl
Testosterone (TP)
TP+Finasteride
50
100
200
(ug/ml)
TP+TA

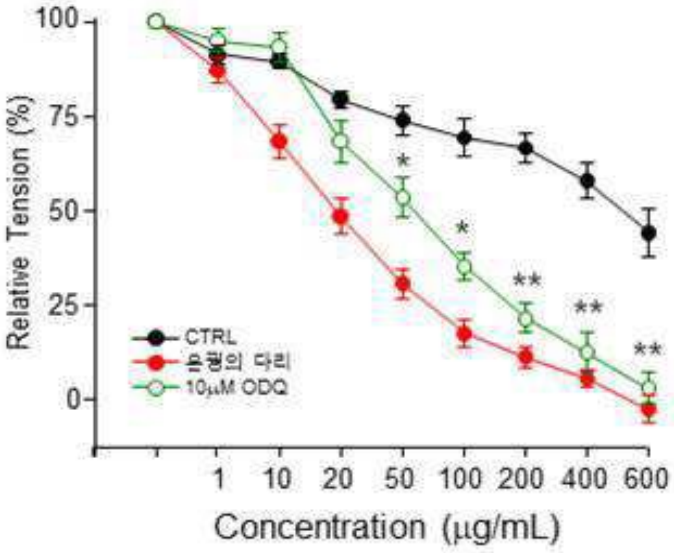
도면4


PSA/ β-actin
(Fold change)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Ctrl
Testosterone (TP)
TP+Finasteride
50
100
200
(ug/ml)
TP+TA

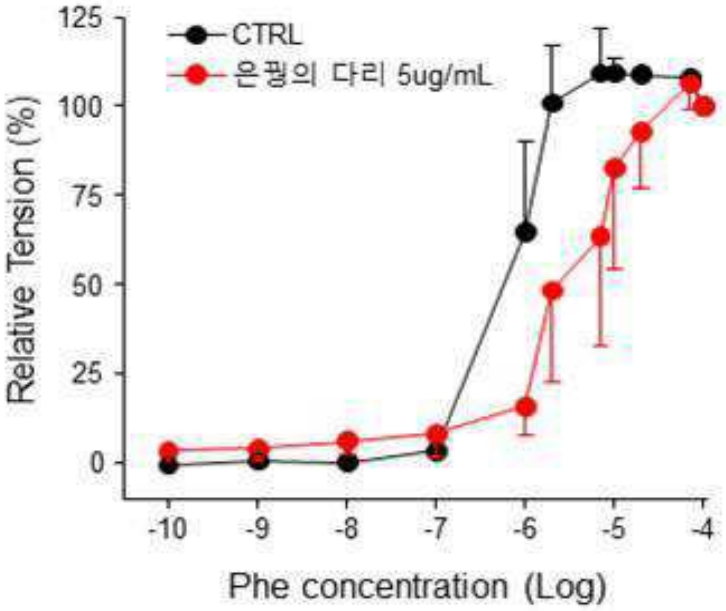
도면5


Relative Tension (%)
100
75
50
25
0
CTRL
은행의 다리
*
**
***
***
***
***
**
1
10
20
50
100
200
400
600
Concentration (μg/mL)

도면6


Relative Tension (%)
100
75
50
25
0
CTRL
은행의 다리
10μM ODQ
*
*
**
**
**
1
10
20
50
100
200
400
600
Concentration (μg/mL)

도면7


CTRL
은꿩의 다리 5ug/mL
Relative Tension (%)
125
100
75
50
25
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
Phe concentration (Log)