



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0071879
(43) 공개일자 2018년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/07 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 31/702 (2006.01)
A61K 36/8962 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/07 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0174995

(22) 출원일자 2016년12월20일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

청운바이오 주식회사

광주광역시 서구 상무민주로32번길 19, 1층(쌍촌동)

(72) 발명자

손정선

광주광역시 남구 봉선중앙로 8, 106동 802호(봉선동, 쌍용스윗닷홈)

김승평

광주광역시 동구 밤실로30번길 11, 101동 201호(지산동, 삼성아파트)

조병욱

전라남도 장흥군 장평면 용강길 51

(74) 대리인

특허법인충정

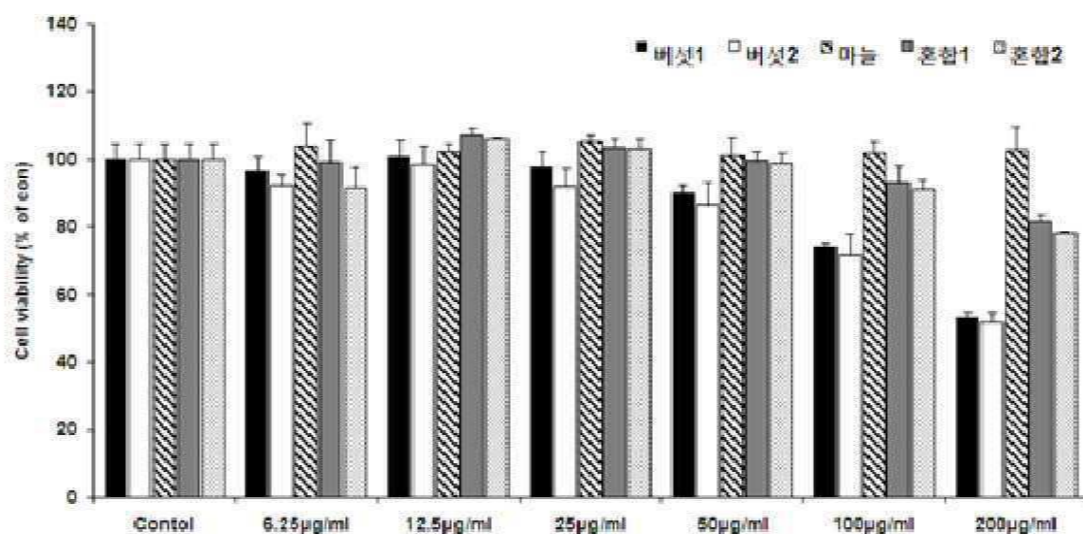
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 조혈기능 증진 및 방사선 방호용 버섯-마늘 추출물

(57) 요약

본 발명은 마늘-버섯에서 얻어진 추출물중 체내의 유해활성산소 감소, 제거 및 방사선에 의한 생체의 방호효과와 면역활성 증진효과를 갖는 성분을 주성분으로 하는 복합조성물 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 치마버섯의 배양액에서 추출한 시조필란 (치마버섯 배양액에서 추출한 다당류) 과 마늘의 열수 추출물인 알리인, 알리신을 적정 농도로 배합하여 제조된 복합조성물, 그의 제조방법 및 그의 용도에 관한 것이다. 상기 복합조성물은 무독성의 식물소재에서 선택된 천연물로 이루어져 있어 종래의 생물화학적 면역증강 제제 또는 생체보호 화학물질보다 부작용과 독성이 적고 안전성이 우수하며, 화학물질 및 방사선 등에 의한 산화적 생체 손상을 억제할 뿐만 아니라 면역활성을 증진시켜 방사선 방호식품 또는 항암 치료보조제 또는 건강 보조식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 31/702 (2013.01)

A61K 36/8962 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2250/208 (2013.01)

A23V 2250/212 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0349849

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 산학협력 기술개발사업

연구과제명 국내 농산물 버섯류 (표고, 영지, 동충하초, 백목이)와 마늘을 이용한 노인 건강성 식품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교산학협력단

연구기간 2015.11.12 ~ 2016.11.11

명세서

청구범위

청구항 1

버섯 추출물 및 마늘 추출물을 포함하는 조혈기능 증진 및 방사선 방호용 조성물.

청구항 2

청구항 제1항에 있어서,

상기 버섯 추출물은 영지버섯, 표고버섯, 동충하초, 백목이버섯에서 선택되는 하나 이상의 버섯으로부터 추출된 것을 특징으로 하는, 조혈기능 증진 및 방사선 방호용 조성물.

청구항 3

청구항 제1항에 있어서,

상기 버섯 추출물의 추출 방법은 가압수 추출 방법, 열수 추출 방법, 초음파 추출 방법에서 선택되는 하나 이상의 추출 방법임을 특징으로 하는, 조혈기능 증진 및 방사선 방호용 조성물.

청구항 4

청구항 제3항에 있어서,

상기 버섯 추출물의 추출 방법을 통해, 버섯으로부터 시조필란을 분리하는 것을 특징으로 하는, 조혈기능 증진 및 방사선 방호용 조성물.

청구항 5

청구항 제4항에 있어서,

상기 가압수 추출 방법은 25 내지 35 °C의 온도, 8 내지 12 MPa의 압력, 60 내지 70분의 추출 시간 조건 하에서 버섯으로부터 시조필란을 분리하는 것을 특징으로 하는, 조혈기능 증진 및 방사선 방호용 조성물.

청구항 6

청구항 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 마늘 추출물은 알리인을 10 내지 20 mg/g 함량 포함하고 있는 것을 특징으로 하는, 조혈기능 증진 및 방사선 방호용 조성물.

청구항 7

버섯 추출물 및 마늘 추출물을 포함하는 조혈기능 증진 및 방사선 방호용 조성물을 제조하는 방법으로서,

버섯 추출물은 가압수 추출 방법으로 추출되며, 25 내지 35 °C의 온도, 8 내지 12 MPa의 압력, 60 내지 70분의 추출 시간 조건 하에서 버섯으로부터 시조필란을 분리하는 것을 특징으로 하는, 조혈기능 증진 및 방사선 방호용 조성물을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 조혈기능 증진 및 방사선 방호용 버섯-마늘 추출물에 관련된다.

배경 기술

[0002] 방사선은 여러 분야에서 사용이 증가하고 있으며, 이용에 따른 방사선 종사자들의 피폭에 의한 장애의 리스크를 극복할 수 있는 방사선 피폭방어제의 개발을 위한 연구는 사회적 중요한 과제가 되고 있다. 각종 전리방사선은 생체를 구성하는 물질을 투과, 흡수하는 과정에서 물질과 상호작용을 일으키며 그 물질을 구성하는 분자나 원자에 불안정한 활성을 일으켜 물리, 화학적 및 화합물의 조성변화로 인해 세포나 조직에 이상을 가져와 결국은 생물학적인 장애를 초래하게 된다.

[0003] 방사선을 이용한 진단과 치료시, 또는 방사선 관련 업종 종사자에게 생체 내에서 일어나는 생리적 변화에 의한 장애방어는 중요한 문제점으로 대두되고 있다. 일반적으로 방사선 방호제의 필수조건은 정상조직에 대한 작용은 없거나 무시할 정도로 미미하고 종양조직에 대한 방호효과는 강력하여 치료 또는 증진효과가 분명하여야 한다.

[0004] 실제 가장 주목을 받고 있는 방사선 방호제로는 amifostin이 있는데 이는 미 육군에서 개발 (Yuhas JM and storer JB(1969): differentiae chemoprotection of normal and malignet tissue J natl cancer Inst 42 : 331-335) 한 것으로 조성물의 주 성분은 S-2(3-aminoprophlamino)ethylphosphorothioic acid(이하: WR-2721)이다. WR-2721의 방사선 방어효과가 Mouse 정상조직에 대해서는 골수사를 지표로 했을 때 선량감효율(does reduction factor:DRF)이 2.7이고 종양조직에 대해서는 % transplantability를 지표로 했을 때 DRF가 1.15라고 보고한 이래 cysteamine의 thio인산염 유도체인 WR-2721이 방사선 방어제로서 독성이 적고 임상응용이 가능하다고 발표한 이래 많은 후속 연구가 있어 선택적 방호를 나타내는 방호제에 주목하게 되었다.

[0005] 실제로 이들 방사선방호제는 대개 방사선조사 의해 인체 내에 생긴 불안정한 산소유도체(ROS)가 세포(주로 DNA)에 손상을 유발하기 전에 제거하는 유리기 제거제(free radical scavenger), 또는 항산화제(antioxidant)등의 형태로 연구가 있어왔고, 동물실험들에서 고용량 WR-2721이 현재까지 가장 뛰어난 방호효과를 지닌 방호제로 알려져 있으나 약물 자체의 부작용들(오심, 구토, 졸음, 저혈압, 저칼슘혈증, 활동도 저하 등)로 안전성의 문제에서 실용상의 일반화에는 많은 문제점이 노출되어 왔다. 다만 임상적으로 두경부암 환자나 폐암 환자의 국소 방사선치료 시 방사선으로 인한 구강건조증, 식도염, 폐렴 등의 빈도를 줄이기 위해 저용량으로 사용되고 있다. 피폭 후 사용가능한 후처치제 형태의 방어제들은 주로 골수세포 증식 및 면역강화 작용 등의 기전을 이용하였으나 아직까지 효과적인 방어제는 개발되지 못하고 있으며, 최근에 방어효과는 향상시키며 부작용들을 줄이고자 전처치제와 후처치제를 복합 사용한 연구들이 있었다. 방사선 방호물질의 개발 초기에는 아미포스틴(amifostin) 같은 티올기 함유 물질의 합성에 초점이 맞추어졌었다. 이 물질은 사망률을 줄일 수 있는 이점이 있는 반면 약물독성 등의 부정적 부분도 만만치 않다. 따라서 독성이 없으면서 항산화효과 및 면역증진효과를 보일 수 있는 천연물의 활용은 대단히 큰 관심을 불러 왔다 (Drug Discovery Today.Volume 12, Numbers 19/20.October 2007). 특히 전통 조혈작용이 있는 것으로 알려진 한약재의 추출조성물 (KR 10-0519720, KR 10-0449655, KR 10-0440863) 및 레드비트 추출물 (출원번호 10-2014-0068468) 등이 있다. 이외에 식물유래 추출물 중 면역증강 및 항암치료에 사용하기 위해 상업화되어 있는 것으로는 schizophyllan(치마버섯 배양액)과 lentinan(표고버섯 추출물), grifolan, krestin (polysaccharide-peptide complex, 구름버섯 배양액), mesima(상항버섯 균사체), β -Immunan(영지버섯)이 상업화되어 있다.

[0006] 본 발명자들은 더 효과적인 새로운 면역증강 및 방사선 방호기능을 갖는 마늘 버섯 추출 조성물을 분리 정제하여 다양한 무게 비율로 혼합하여 기존의 생물화학적 면역 및 방사선 방호제들 보다 안전성이 높고, 현저한 면역 및 방호기능 증진 효과를 보이며, 또한 뛰어난 방사선 방호효과를 나타내는 것을 확인하여 방사선에 의한 조혈계 및 재생조직의 원줄기세포 등의 장애를 종합적으로 방호할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 조혈기능 및 면역기능 증진에 광범위하게 활용될 수 있으며 방사선 장애의 예방 및 극복에 유용하게 이용될 수 있는 무독성 식품추출물을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0008]

도 1은 본 발명의 일 구현 예에 따른, Raw264.7에서 MTT assay를 통한 버섯, 마늘, 혼합 추출물의 독성시험 결과를 도시한다.

도 2는 본 발명의 일 구현 예에 따른, Raw264.7에서 각 추출물에 의한 NO 생성량 측정 결과를 도시한다.

도 3은 본 발명의 일 구현 예에 따른, PEC(복강침출세포)의 B cell 활성 확인 결과를 도시한다.

도 4는 본 발명의 일 구현 예에 따른, 실험 계획표를 도시한다.

도 5는 본 발명의 일 구현 예에 따른, γ -irradiation 마우스 모델에서 SF-051의 면역증강효능 실험 스케줄 및 실험군을 도시한다.

도 6은 본 발명의 일 구현 예에 따른, γ -irradiation 마우스 모델에서 SF-051에 의한 WBC의 수 및 immunoglobulin들의 level 변화 확인 결과를 도시한다.

도 7은 본 발명의 일 구현 예에 따른, γ -irradiation 마우스 모델의 Thymus와 PEC에서 면역세포들의 활성 및 population 변화 확인 결과를 도시한다.

도 8은 본 발명의 일 구현 예에 따른, γ -irradiation 마우스 모델의 Spleen에서 면역세포들의 활성 및 population 변화 확인 결과를 도시한다.

도 9는 본 발명의 일 구현 예에 따른, γ -irradiation 마우스 모델의 LN에서 면역세포들의 활성 및 population 변화 확인 결과를 도시한다.

도 10은 본 발명의 일 구현 예에 따른, γ -irradiation 마우스 모델의 MLN에서 면역세포들의 활성 및 population 변화 확인 결과를 도시한다.

도 11은 본 발명의 일 구현 예에 따른, γ -irradiation 마우스 모델의 Spleen에서 면역세포들의 세포사멸 및 세포주기 변화 확인 결과를 도시한다.

도 12는 본 발명의 일 구현 예에 따른, γ -irradiation 마우스 모델의 Spleen에서 다양한 사이토카인들의 유전자 발현변화 확인 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009]

시료는 동결건조 후 분쇄하여 용매에 의한 가압수 추출을 하였다. 추출시간 10분과 70분에서 회수율은 각각 80.5%에서 88.8%로 변화하였고 70분 이상에서는 회수율의 변화는 없었다. 추출압력은 15.2 MPa 까지는 압력이 높을수록 회수율은 높아졌다. 시조필란 분리의 최적조건은 30℃에서 10.1 MPa, 70 min 이었다. 95~100℃에서 적외선 추출기를 사용한 열수 추출도 진행하였다. 추출시간은 버섯마다 달리하였다. 또 다른 방법으로 초음파출력 350W에서 시료량의 5배의 증류수를 넣고 90℃에서 30분 추출하는 초음파추출도 병행하는 등 다양한 방법으로 시도하였다. 추출물은 메탄올을 추출과정을 거쳤다. 프로틴은 20% w/v TFA로 침전시켜 제거하였고 프로틴 제거 후 메탄올을 2:1 (v/v) 비율로 가하여 침전을 얻고 농축된 NaCl 용액을 추가로 가해주면서 더 용이하게 침전을 얻을 수 있었다. 침전물은 아세톤 등으로 세척하였다. 버섯원물과 처리된 추출물의 사진을 아래에 나타내었다.

[0010]

베타-글루칸 함량 조사는 total glucan을 구한 후 α -glucan 량을 빼서 β -glucan 정량하였다. 먼저 total glucan은 100 메시 체로 거른 분쇄 시료 100 mg 을 tube에 넣어 37% HCl 1.5 mL을 가한 후 45분간 30℃ 수조에 넣어 분해하였다. 그 후 증류수 10 mL을 넣어 vortex하고, 100℃에서 2시간 incubation 시켰다. 그 후 실온에서 식히면서 2 N KOH를 10 mL씩 가하고 200 mM sodium acetate buffer로 100 mL 정용 후 충분히 mixing 하였다. 상등액 0.1 mL 에 200 mM sodium acetate buffer에 녹인 exo-1,3- β -glucanase plus β -glucosidase 0.1 mL을 넣고, reagent blank로는 acetate buffer 0.2 mL을, D-glucose standard로는 D-glucose standard 0.1 mL과 acetate buffer 0.1 mL을 사용하여 mixing 후 40℃에서 60분 동안 incubation 한다. Glucose oxidase/peroxidase mixture(GOPOD) 3 mL을 첨가하여 40℃에서 20분 동안 incubation 한 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. α -Glucan은 100 메시 체로 거른 분쇄 시료 100 mg 을 tube에 넣고 2 M KOH 2 mL씩 가한 후 20분간 mixing 하였다. 1.2 M sodium acetate buffer 8 mL을 첨가하여 섞은 후 amyloglucosidase plus invertase 0.2 mL을 넣고, 잘 섞어서 40℃ water bath에서 30분간 incubation 하였다. 상등액 0.1 mL에 200 mM sodium acetate buffer 0.1 mL, GOPOD 3 mL을 넣고 40℃에서 20분간 incubation 한 후, 510nm 흡광도에서 측정

하였다.

- [0011] 버섯에 대한 시조필란은 AOAC 방법에 따라 분석하였다. 수분은 시료 0.5 g을 각각 칭량접시에 담고 105℃ dry oven에서 향량이 될 때까지 건조시켜 무게를 측정하여 구하였다. 조회분은 시료 0.5 g을 250℃에서 예비 회화한 후 600℃에서 직접 회화법으로, 조단백질의 함량은 Kjeldahl법으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조지방의 함량은 Soxhlet 추출법으로, 조섬유는 Henneberg Stohmann 개량법으로 구하였다. 그리고 가용성 무질소물의 함량은 총량에서 수분, 조회분, 조단백질, 조지방 및 조섬유의 함량을 뺀 값으로 산출하였다.
- [0012] 마늘 시료의 알리인 분석은 포름산을 이용하여 pH 3.0으로 조절한 80% 메탄올 용액을 사용하여 초음파로 추출한 후 액체크로마토그래피 및 자외선 흡광광도 검출기를 사용하여 208 nm에서 정량 분석하였다. 이때 컬럼온도는 30℃로 하였으며 이동상은 인산이수소나트륨과 헤파탄설폰산나트륨용액(50:80)과 아세토니트릴용액을 gradient 조건으로 하였다. 평균적인 알리인 함량은 15.84의 값을 얻었다.
- [0013] 또한, 유용성분에 대한 기능성 검사를 통하여 유용성분들의 효과를 아래와 같은 방법으로 조사하였다.
- [0014] -. 세포 독성 테스트를 이용한 추출물의 in vitro 처리
- [0015] -. 소재조합 추출물의 in vivo 처리
- [0016] -. ROS(Reactive oxygen species) 및 NO 측정
- [0017] -. 세포독성능 분석(51Cr release assay)
- [0018] -. 유전자 발현 분석
- [0019] -. 유세포 분석 (flow cytometry analysis)
- [0020] -. 세포주기 및 apoptosis 변화 관찰
- [0021] 다음은 추진된 다양한 기능성 검사 결과들 중 대표적인 결과에 대한 고찰이다. 먼저, 버섯, 마늘, 혼합 추출물의 독성을 확인하고 적정 처리 농도를 확립하기 위하여 Raw264.7에 각 추출물을 농도별로 처리한 후 48시간 후에 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 마늘을 제외한 버섯, 혼합 추출물에서 50 µg/ml에서 독성을 나타내어 각 추출물 처리 농도를 EC50: 12.5 µg/ml로 고정하여 실험을 진행하였다. (도 1). Raw264.7에서 버섯, 마늘, 혼합 추출물에 의한 염증 반응 지표 물질의 감소 효과를 확인하기 위하여 Raw264.7에 각 추출물을 농도별로 처리하고 ROS(Reactive oxygen species)와 NO의 생성을 촉진 시키는 LPS(500ng/ml)를 처리하여 ROS와 NO의 양을 측정하였다. LPS에 의해 증가된 ROS의 양이 버섯1, 버섯2, 마늘, 혼합2를 처리한 군에서 다소 감소한 것을 확인하였고, NO의 양은 대조군과 비교하여 추출물 모두에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (도 2).
- [0022] in-vivo 실험계획은 아래와 같이 버섯1, 버섯2, 마늘, 혼합1, 혼합2 추출물을 3주간 이틀에 한번 마우스 당 20 µg, 100 µg, 500 µg씩 경구 투여하면서 진행하였다. 3주간 실험마우스의 무게 변화를 측정한 결과, 모든 그룹에서 추출물 경구 투여에 의한 독성은 보이지 않았음을 확인할 수 있었다(도 4). 3주 후 마우스를 희생하여 장기(lung, liver, kidney, stomach, heart, large intestine)를 분리하여 무게 및 길이를 측정하여 독성이 없는 것을 확인하고 실험을 진행하였다.
- [0023] 다음으로, 각 추출물을 경구 투여한 마우스 모델의 주요 장기에서의 면역 세포의 활성을 실험하였다. 각 추출물을 경구 투여한 마우스에서 주요 면역기관인 spleen, LN, MLN을 분리하여 세포를 얻은 후 CD4 (CD4 T cell marker), CD8 (CD8 T cell maker), CD11b (macrophage marker), CD69 (activation marker) 항체로 형광 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. 그 결과 spleen에서 버섯1, 버섯2, 혼합2 추출물에 의해 CD4 T cell의 수가 증가하였고, 버섯2, 마늘, 혼합2에 의한 CD8 T cell의 수가 증가한 것을 확인하였으며, 모든 추출물에 의해 macrophage의 수가 증가된 것을 확인할 수 있었다. LN에서 모든 추출물에 의해 CD4 T cell과 macrophage의 수가 증가된 결과를 보여주었다. 또한 MLN에서 버섯1, 버섯2, 혼합1 추출물에 의해 CD4 T cell의 수가 증가된 것을 확인하였고, 버섯2에 의한 CD8 T cell의 수가 증가된 것을 확인할 수 있었다. 각 추출물을 경구 투여한 마우스 모델에서 PEC를 추출하여 B220 (B cell marker)과 CD69 (activation marker) 항체로 형광 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. 도 3은 이에 대한 결과를 보여준다. 모든 추출물에 의해 B cell의 수가 증가된 것을 확인할 수 있다.
- [0024] 방사선조사에 따른 면역력 감소에서 각 추출물들의 효능을 알아보기 위하여 다음과 같은 마우스 모델을 제작하여 실험을 진행하였다. 조사 후 추출물 경구 투여 마우스 모델의 혈액에서 백혈구(WBC) 수의 변화, 혈장에서의

IgG생성량, spleen에서의 면역세포 활성화, LN에서의 면역세포 활성화, MLN에서의 면역세포 활성화, spleen에서의 세포사멸 변화, spleen에서의 세포주기 변화 등에 대한 실험을 추가적으로 진행하였다. 또한, 조사 후 후보 추출물을 경구 투여한 마우스를 희생하여 spleen을 분리한 후 염증과 관련된 유전자들의 발현 평가에서도 기대할 만한 결과를 확인하였다.

[0025] ● γ-irradiation 마우스 모델에서 SF-051에 의한 면역증강효능 확인

[0026] - SF-051에 의한 면역증강 효능을 확인하기 위해 γ-irradiation 마우스 모델을 제작하여 SF-051을 3주간 전 처리한 후 γ-irradiation을 조사하였다. 이후 1주간 SF-051을 추가 처리한 후 마우스를 희생하여 면역증강 효능을 확인하였다(도 5).

[0027] - γ-irradiation 마우스 모델에서 SF-051의 처리에 의한 마우스 몸무게의 변화를 확인한 결과 γ-irradiation 대조군보다 SF-051을 처리한 그룹에서 γ-irradiation 조사 후 조금 더 빠른 회복률을 보인다(도 6A). 이후 마우스를 희생하여 혈액내의 WBC (White blood cells)의 수를 분석한 결과 대조군과 비교하여 γ-irradiation을 조사한 마우스 그룹에서 WBC의 수가 급격히 감소되었으며, 감소된 WBC를 SF-051에 의해 증가시킴을 확인하였으나 대조군과 차이를 보이지 않았다(도 6B). 하지만 혈액 내의 IgG level을 확인한 결과, γ-irradiation에 의해 감소된 IgG level이 SF-051에 의해 유의적으로 크게 증가됨을 확인할 수 있었다(도 6D). 또한 점막내의 IgA의 level의 변화를 확인한 결과, SF-051에 의한 IgA의 level은 효과를 확인할 수 없었다(도 6C). 이 결과를 통해 SF-051이 점막면역에는 효과를 주지 못하나 γ-irradiation에 의해 감소된 면역세포의 활성능력을 증가시킬 수 있을 것으로 여겨진다.

[0028] - γ-irradiation 마우스 모델에서 SF-051에 의한 면역세포의 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해 T cell 및 B cell의 분화에 중요하게 작용하는 Thymus 및 PEC (Peritoneal excudate cells)의 세포를 분리한 후 유세포 분석기를 이용하여 면역세포의 population을 확인하였다. 그 결과, γ-irradiation 마우스 모델에서 SF-051이 CD4+ T cells의 분화를 증가시키고 CD4+ T cells의 분화는 γ-irradiation 대조군보다 정상적인 수준으로 회복되도록 영향을 주는 것을 확인하였다(도 7A). PEC에서는 γ-irradiation에 의해 감소된 B cell의 population이 SF-051에 의해 회복되는 것은 확인할 수 없었다(도 7B). 이러한 결과에서 γ-irradiation에 의해 감소된 면역세포의 수가 SF-051에 의해 Thymus를 통해 회복될 가능성이 있음을 확인하였다.

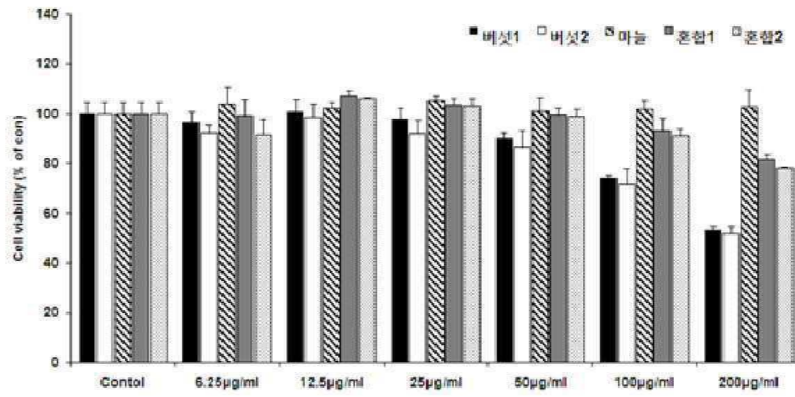
[0029] - γ-irradiation 마우스 모델에서 SF-051에 의해 면역세포들의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 주요 면역기관인 Spleen, Lymph node(LN), Mesenteric lymph node(MLN)의 세포를 분리한 후 유세포 분석기를 이용하여 면역세포들의 활성화 및 population을 확인하였다. 그 결과, Spleen에서 CD4+ T cells, CD8+ T cells, Dendritic cells의 population이 SF-051에 의해 γ-irradiation 대조군보다 증가하였으며 NK cells의 활성이 증가함을 확인하였다. 하지만 대식세포에서는 차이를 볼 수 없었다(도 8). LN에서 면역세포들의 활성화 및 population을 확인한 결과, SF-051에 의해 NK cells의 수가 증가되었지만, 활성화에는 큰 차이를 보이지 않았다. 그리고 나머지 면역세포들에서는 차이를 볼 수 없었다(도 9). MLN에서는 CD4+ T cells, NK cells의 활성이 증가되었지만, CD8+ T cells, 대식세포, Dendritic cells에서는 영향을 볼 수 없었다(도 10). 이 결과를 통해 SF-051이 NK cells의 수와 활성화에 주로 영향을 미치고 T cells에도 조금 영향을 주는 것을 확인하였지만 나머지 대식세포와 Dendritic cells에는 영향을 주지 못하는 것을 확인하였다.

[0030] - γ-irradiation 마우스 모델에서 SF-051에 의해 T cells 및 NK cells의 population이 증가됨을 확인하였다. 이에 γ-irradiation 마우스 모델의 spleen으로부터 세포를 분리하여 세포사멸 및 세포주기의 변화를 유세포 분석기를 이용하여 확인하였다. 그 결과, γ-irradiation에 의해 면역세포의 세포사멸이 증가되었으며, 증가된 세포사멸이 SF-051에 의해 감소되는 결과를 관찰하였다(도 11A). 또한 세포주기를 분석한 결과, γ-irradiation만 한 그룹과 비교하여 SF-051을 처리한 그룹에서 S-phase가 증가되는 결과를 확인하였다(도 11B). 또한 γ-irradiation 마우스 모델의 spleen으로부터 세포를 분리하여 다양한 사이토카인 유전자의 발현변화를 Real-time PCR을 통해 분석하였다(도 12). γ-irradiation 마우스 모델에서 SF-051에 의한 면역세포의 활성화 및 population 변화가 염증 사이토카인들의 변화에 미치는 영향을 확인하기 위해 IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, TGF-β와 같은 염증유발 사이토카인의 유전자 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 그 결과 대조군과 비교하여 SF-051을 처리한 마우스 그룹에서 염증유발 사이토카인들의 발현이 감소됨을 확인하였다. NK cells에서 분비되는 항바이러스, 항암, 면역조절과 관련있는 사이토카인인 IFN-γ를 확인한 결과, γ-irradiation 조사로 인해 감소된 IFN-γ가 SF-051에 의해 증가되었음을 확인하였다. 또한 T cells의 증식을 촉진하는 IL-17이 γ-irradiation 대조군보다 SF-051 그룹에서 증가되고 면역반응을 억제하는 IL-10이 감소됨을 확인하였다. 이 결과는 유세포 분석에서 NK cells의 population과 activation이 증가된 것과 일치하는 결과이다. 이 결과를 통해

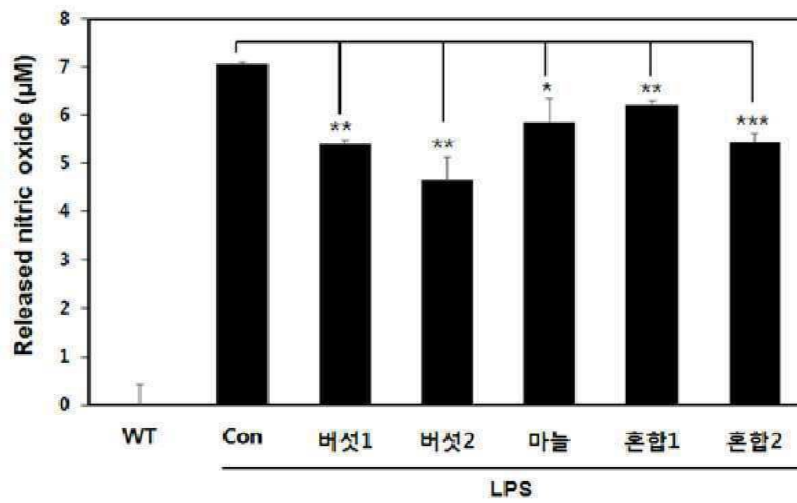
SF-051에 의해 면역세포의 세포사멸 및 세포주기가 조절됨을 알 수 있으며 염증유발 사이토카인의 발현이 조절됨으로써 염증반응을 감소시킬 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다.

도면

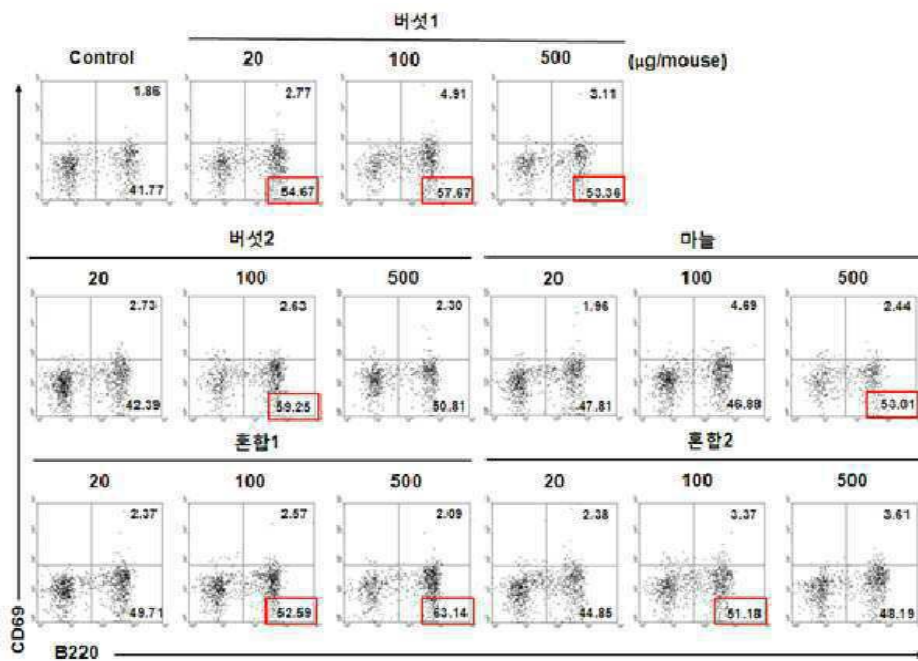
도면1



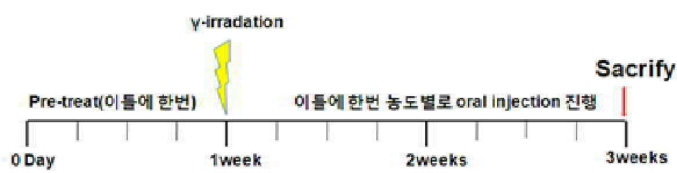
도면2



도면3

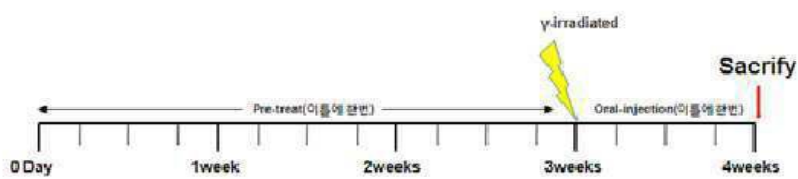


도면4



도면5

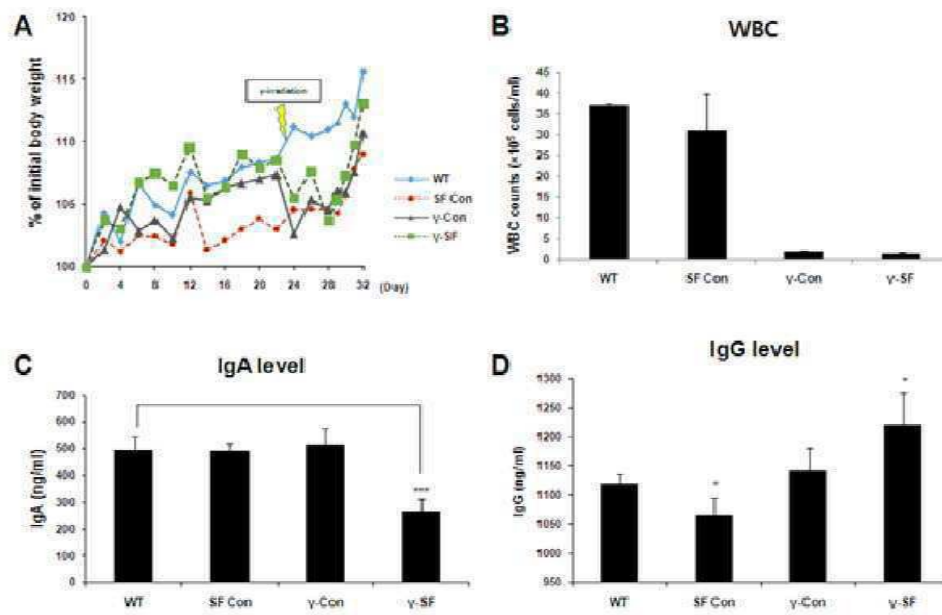
Experimental schedule



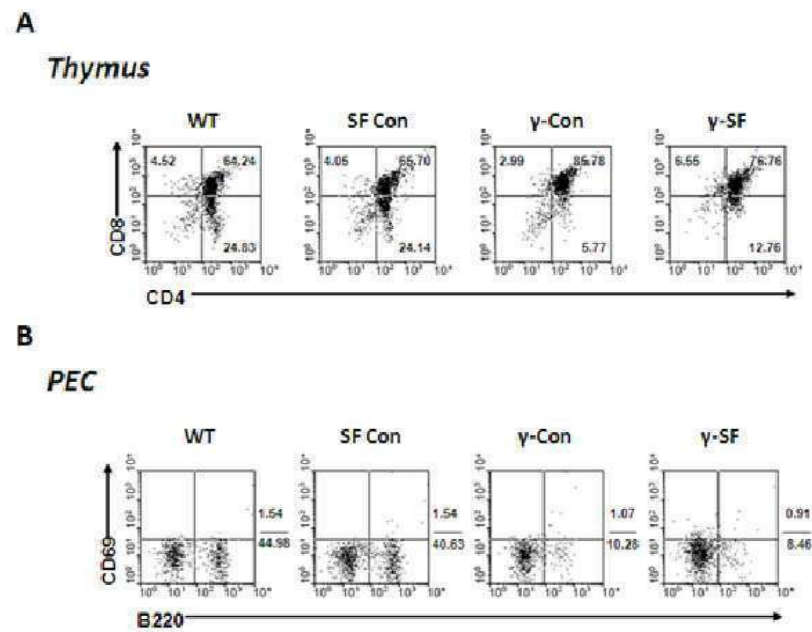
Group

- WT
 - SF Control
 - γ-Control
 - γ-SF
- γ-irradiated

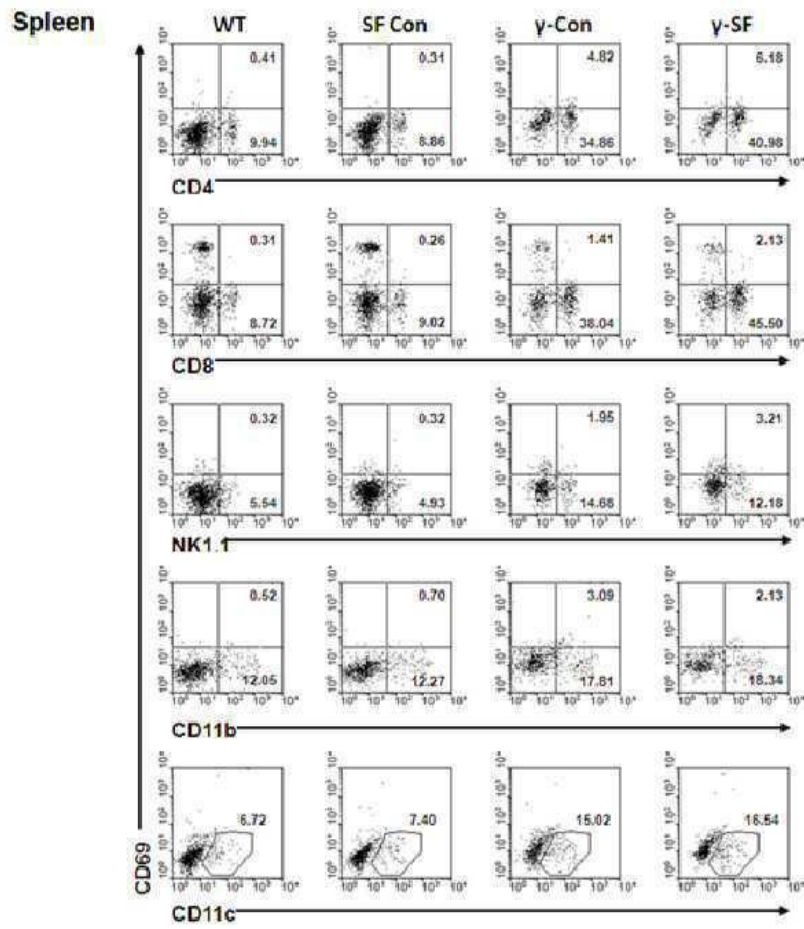
도면6



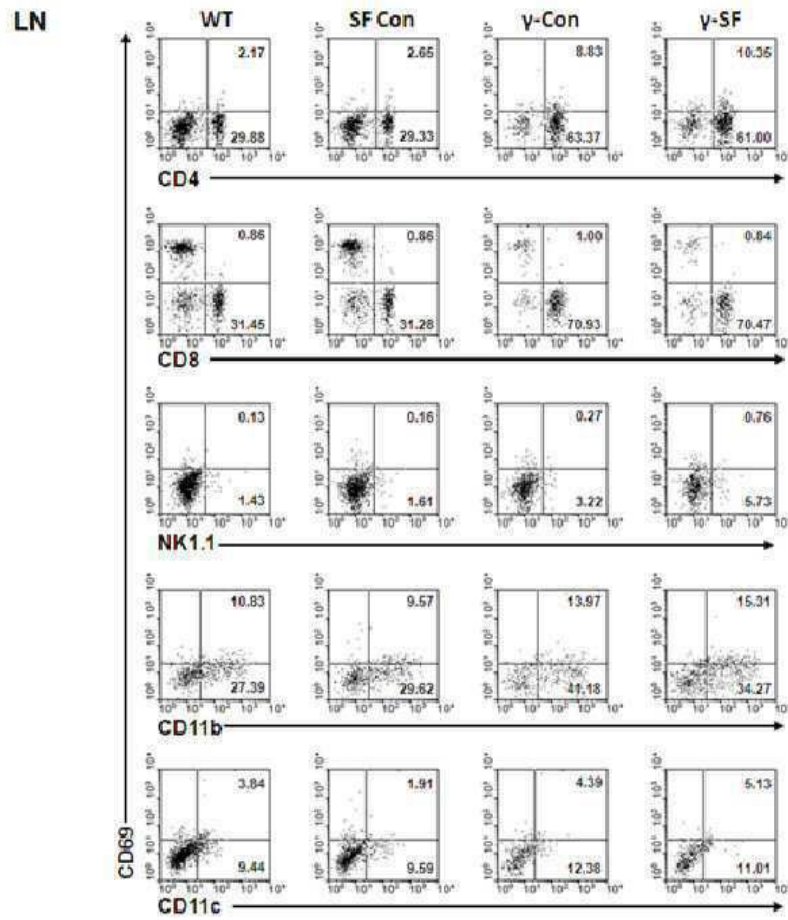
도면7



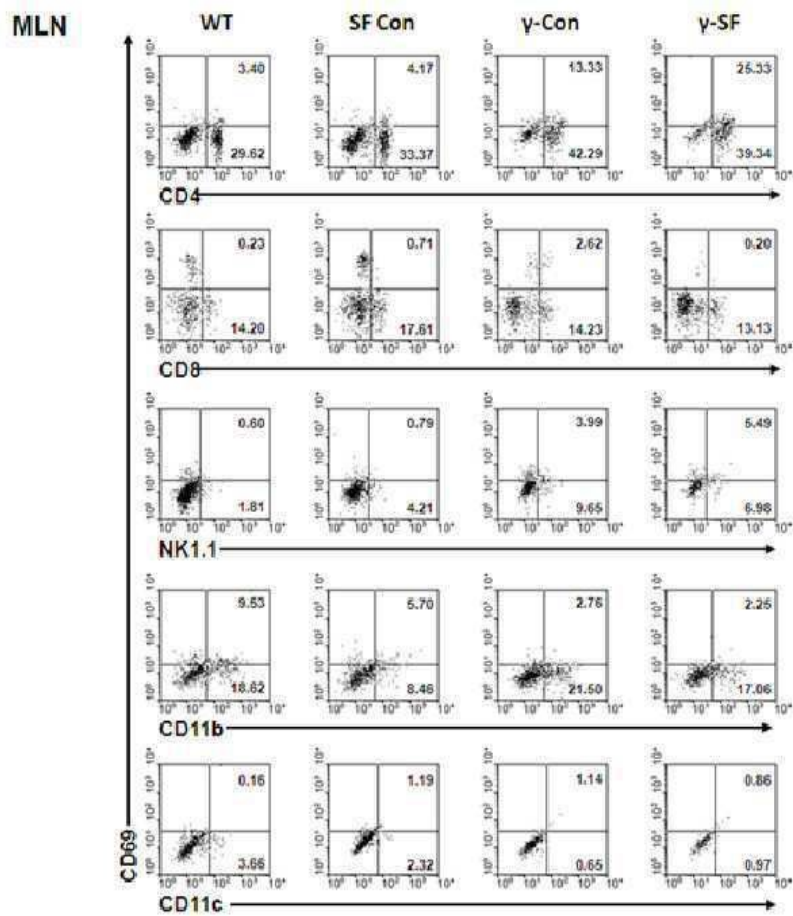
도면8



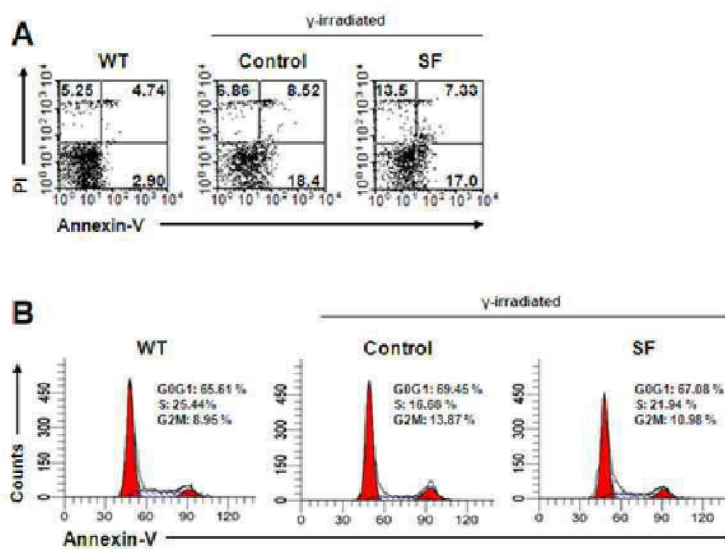
도면9



도면10



도면11



도면12

