



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월10일
(11) 등록번호 10-1316701
(24) 등록일자 2013년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/282 (2006.01) A61P 15/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0035153

(22) 출원일자 2012년04월04일

심사청구일자 2012년04월04일

(56) 선행기술조사문헌

KR100414453 B1

KR1020070042405 A

KR1020120005686 A

KR1020100097517 A

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

최정혜

서울특별시 성동구 옥수동 극동 아파트 8동 907호

이경태

서울특별시 노원구 중계본동 신안동진아파트 10동 702호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유지열, 이승열

전체 청구항 수 : 총 7 항

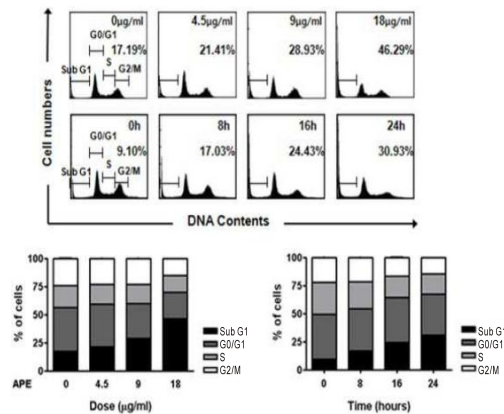
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **쑥 추출물의 신규 용도**

(57) 요약

본 발명은 쑥 추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물 및 쑥 추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다. 본 발명에 의해 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 및/또는 예방할 수 있다는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김지현

서울특별시 노원구 공릉동 380-1 대동2차 아파트
102동 1004호

백남인

경기도 화성시 반송동 동탄중앙로 51, 동탄나루마
을한화꿈에그린아파트 629동 901호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0068979

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 천연물유래 선택적 에스트로겐 수용체 조절제의 발굴

주관기관 경희대학교

연구기간 2009.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

쑥 추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 쑥 추출물의 쑥은 아르테미시아 프린세스(*Artemisia princeps*), 아르테미시아 카필라리스(*Artemisia capillaris*), 및 아르테미시아 이와요모기(*Artemisia iwayomogi*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 쑥 추출물은

- (A) 쑥을 탄소수 1~4 알콜로 추출한 추출물을 준비하는 단계;
- (B) 상기 (A)단계의 알콜 추출물에 물을 가하는 단계;
- (C) 상기 (B)단계의 물이 가해진 알콜 추출물을 n-헥산과 에틸아세테이트의 1차 혼합용매로 추출하는 단계; 및
- (D) 상기 (C)단계의 추출물을 제거하고 남은 수층을 n-헥산과 에틸아세테이트의 2차 혼합용매로 추출하여 2차 혼합용매 분획 추출물을 수득하는 단계에 의해 수득한 추출물이고,

상기 1차 혼합용매는 부피비 20~30:1의 n-헥산과 에틸아세테이트 혼합용매이며,

상기 2차 혼합용매는 부피비 0.5~2:1의 n-헥산과 에틸아세테이트 혼합용매인 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 쑥은 아르테미시아 프린세스이고, 상기 알콜은 에탄올, 상기 1차 혼합용매는 부피비 24:1의 n-헥산과 에틸아세테이트 혼합용매이며, 상기 2차 혼합용매는 부피비 1:1의 n-헥산과 에틸아세테이트 혼합용매인 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 치료 또는 예방은 자궁내막증 세포생존 억제에 의한 것인 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 자궁내막증 세포생존 억제는 Akt 활성 감소, NF κ B의 발현 또는 전위(translocation) 억제, 및 XIAP, Bcl-2 또는 Bcl-xL의 발현 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의한 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 7

쑥 추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 개선 또는 예방용 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 쑥 추출물의 신규 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 쑥 추출물의 자궁내막증의 치료, 개선 또는 예방을 위한 의약 또는 식품 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 자궁내막증(endometriosis)은 가임기 여성의 3~10%, 불임 여성의 25~35% 정도에서 나타나는 매우 흔한 부인과 질환으로 자궁내막조직이 자궁 이외에 장소(난소, 복강, 장관, 방광)에서 비정상적으로 증식하는 질환이다.
- [0003] 자궁내막증은 월경통(dysmenorrhoea), 성교통(dyspareunia) 및 침범부위에 따른 다양한 통증(ex. 폐침범시: 기흉, 혈흉/ 요관침범시: 요관폐쇄, 혈뇨)을 증상으로 하며, 30~50%의 환자에서 불임의 원인으로 확인되고 있다.
- [0004] 현재까지 수술을 통한 자궁내막 제거수술 외에 자궁내막증에 대한 근본적인 치료법이 없으며, 이러한 수술요법은 차후 임신에 제약을 줄 수 있으며 재발을 또한 높은 편이다.
- [0005] 현재 내과적 치료로는 통증완화를 위해 진통제, 소염제를 사용하는 보존적 요법과 다나졸, 프로게스테론, GnRH를 사용하여 생리주기를 제어하는 호르몬치료가 사용되고 있으나 이들은 근본적 치료법이 아닌 증상의 개선일 뿐이다.
- [0006] 또한 이들 호르몬의 장기적 사용은 여러 가지 부작용(체중의 증가, 수분 축적, 피로, 여드름, 지성 피부, 조모증, 위축성 질염, 안면 홍조, 근육 경련, 불안정한 감정 상태, 간세포 독성)을 야기하며, 게다가 이러한 치료에 대한 재발률도 매우 높은 것으로 알려져 있다.
- [0007] 이처럼 자궁내막증은 치명적이지는 않지만 극심한 통증으로 인해 일상생활에 불편함이 있고 심한 경우 불임에까지 이르는 질환으로, 여성의 삶의 질과 임신의 문제에서 심각하게 인식되어야 하고 반드시 극복해야 할 질병임에도 불구하고 아직까지 이렇다 할 예방 및 치료방법이 존재하지 않고 있다.
- [0008] 따라서 여성, 특히 가임기 여성들에게 침습적인(invasive) 수술요법이나 단순한 진통요법, 인위적인 생리주기제어법 등이 아닌 자연적이면서도 부작용이 낮은 새로운 개념의 자궁내막증 예방, 치료제의 개발이 시급한 실정이다.
- [0009] 한편, 쑥은 애엽(艾葉)이라고도 하며, 쑥 추출물은 위장질환 치료 등의 효과를 가짐이 알려져 있다(대한민국 특허 특0181751호).

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 특0181751, 1999.5.1, 요약

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방에 효과를 나타내는 물질의 신규 용도를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 과제는 상기에 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명자들은 놀랍게도 쑥 추출물이 자궁내막증의 치료, 개선 및/또는 예방에 효과를 나타냄을 알게 되어 본 발명을 완성하였다.
- [0014] 본 발명은 쑥 추출물의 자궁내막증의 치료, 개선 및/또는 예방을 위한 의약 및/또는 식품 용도를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 쑥 추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [0016] 상기 쑥 추출물의 쑥은 쑥속 식물을 의미하며, 예를 들어 아르테미시아 프린셉스(Artemisia princeps), 아르테미시아 카필라리스(Artemisia capillaris), 및 아르테미시아 이와요모기(Artemisia iwayomogi)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 아르테미시아 프린셉스일 수 있다. 상기 아르테미시아 프린

웹스는 이로써 제한되는 것은 아니나, 사주아리쑥과 사자발쑥을 통칭한다.

[0017] 또한, 상기 쑥은 쑥의 지상부일 수 있다.

[0018] 상기 쑥 추출물은 (A) 쑥을 탄소수 1~4 알콜로 추출한 추출물을 준비하는 단계; (B) 상기 (A)단계의 알콜 추출물에 물을 가하는 단계; (C) 상기 (B)단계의 물이 가해진 알콜 추출물을 n-헥산과 에틸아세테이트(부피비 20~30:1)의 1차 혼합용매로 추출하는 단계; 및 (D) 상기 (C)단계의 추출물을 제거하고 남은 수층을 n-헥산과 에틸아세테이트(부피비 0.5~2:1)의 2차 혼합용매로 추출하여 2차 혼합용매 분획 추출물을 수득하는 단계에 의해 수득한 추출물일 수 있으며, 바람직하게는 상기 쑥은 아르테미시아 프린셉스이고, 상기 알콜은 에탄올, 상기 1차 혼합용매는 부피비 24:1의 n-헥산과 에틸아세테이트 혼합용매이며, 상기 2차 혼합용매는 부피비 1:1의 n-헥산과 에틸아세테이트 혼합용매일 수 있다.

[0019] 상기 치료 또는 예방은 자궁내막증 세포생존 억제에 의한 것일 수 있으며, 바람직하게는 상기 자궁내막증 세포생존 억제는 Akt 활성 감소, NFκB의 발현 또는 전위(translocation) 억제, 및 XIAP, Bcl-2 또는 Bcl-xL의 발현 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 쑥 추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.

[0021] 별도의 언급이 없는 한 상기 식품 조성물은 본 발명의 약학조성물에서 언급된 사항이 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다. 상기 '개선'은 '치료'에 포함되며, 상태 또는 증세가 호전되는 것을 의미한다.

[0022] 상기 식품조성물은 음료를 포함하는 식품에 다양하게 포함될 수 있고, 음료, 껌, 차, 건강기능식품 등의 형태일 수 있으며, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제 등의 제형으로 제제화할 수 있다. 상기 건강기능식품이라 함은 대한민국 건강기능식품에 관한 법률 제10219호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공을 포함한다. 이하 같다)한 식품을 말하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다. 상기 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 케톤류, 글리신, 구연산나트륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0023] 상기 쑥 추출물 또는 조성물은 인간을 포함한 포유류에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 유효성분을 약학적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 제제화하여 투여할 수 있다. 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 및/또는 젤라틴 등을 첨가하여 제조한다. 또한, 마그네슘, 탈크 등 윤활제도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및/또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 주사가 가능한 액제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 비강세척제 및 좌제가 포함된다. 주사가 가능한 액제, 현탁제, 유제는 물, 비수성용제나 현탁용제와 유효성분을 혼합하여 제조할 수 있으며, 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가 가능한 에스테르 등일 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및/또는 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사로 투여가능하다.

[0024] 본 발명의 조성물에 포함되거나, 용도 중 사용되는 쑥 추출물은 성인 여성 기준으로 1일 0.0001 ~ 100 mg/kg, 바람직하게는 0.001~10mg/kg의 용량으로 사용가능하다. 투여는 하루에 한번 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 범주는 상기 투여량 및 투여횟수에 의해 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.1~99.9중량% 함유할 수 있다.

[0026] 상기 쑥 추출물은 약학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등을 첨가하여 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 의해 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 및/또는 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 쑥 추출물의 자궁내막증세포 생존 억제에 의한 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 Akt 활성 감소 작용에 의한, 쑥 추출물의 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 NF- κ B의 발현 또는 전위(translocation) 억제 작용에 의한, 쑥 추출물의 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 XIAP, Bcl-2 또는 Bcl-xL의 발현 억제 작용에 의한, 쑥 추출물의 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 실시예 및 제조예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명하나, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐으로 본 발명의 내용이 하기 실시예나 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0030] 자궁내막증의 특징인 세포성장, 자궁내막증세포의 세포성장 관련 대표인자들(Akt, XIAP, Bcl-2, Bcl-xL)의 발현 변화, 통증과 관련된 염증성 NF- κ B 신호전달기전의 변화에 쑥 추출물이 미치는 영향을 확인함으로써, 쑥 추출물이 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과를 가짐을 아래와 같은 방법으로 확인하였다.

[0031] 하기 실시예 중 RPMI 1640 배지, OPTI-MEM, DMEM/F12 배지, 우태아혈청(FBS), 페니실린, 스트렙토 마이신은 라이프 테크놀로지사(그랜드 아일랜드, 뉴욕, 미국)에서 입수하였고, NS398, 피로피디움 이오다이드(PI)는 시그마사(세인트루이스, 미주리주, 미국)에서 구입하였다. p-Akt 항체는 셀 시그널링 테크놀로지(버벌리, 메사츄세츠, 미국)에서 입수하고, XIAP 항체는 BD 바이오사이언스(산호세, 캘리포니아, 미국)에서 입수하였으며, 그 이외 항체는 산타크루즈 바이오테크놀로지사(산타크루즈, 캘리포니아, 미국)에서 구입하였다. 벡터는 Addgene(맘브릿지, 메사츄세츠, 미국)에서 입수하였다. 별도 언급이 없는 시약은 시그마사에서 입수하였다.

[0032] <실시예 1> 쑥 추출물의 자궁내막증세포 생존 억제에 의한 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인

[0033] 1-1. 쑥 추출물의 준비

[0034] 건조된 아르테미시아 프린세스(Artemisia princeps Sajabalssuk; 사자발쑥(또는 싸주아리쑥); 대한민국, 강화도} 지상부 1kg을 건식분쇄기로 분쇄하였다. 상기 분쇄물에 95%에탄올 10L를 첨가하여 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 여과지로 여과한 후, 여과물(residue)을 95%에탄올 10L로 섭씨 50도에서 8시간 동안 추출하고 여과지로 여과하였다. 반복 추출로 수득한 추출물을 섭씨 40도에서 증발시킨 후 동결건조하였다.

[0035] 에탄올 추출물 동결건조물(80g)을 물 100mL를 포함하는 분액여두(separating funnel)에 넣었다. 다시 부피비 24:1의 n-헥산과 에탄올아세테이트 1차 혼합용매 200mL를 첨가하고 교반하면서 1~2시간 동안 추출하였다. 상기 추출과정을 2회 반복하고 1차 혼합용매(24:1) 분획을 제거하였다. 그 후 남은 수층에 부피비 1:1의 n-헥산과 에탄올아세테이트 2차 혼합용매 200mL를 첨가하고 교반하면서 1~2시간 동안 추출하였다. 상기 추출과정을 2회 반복하였고, 2차 혼합용매(1:1) 분획을 섭씨 40도에서 증발시켜, 쑥 추출물을 준비하였다.

[0036] 1-2. 세포 준비

[0037] 자궁내막증 여성의 활성 자궁내막증 조직을 이용하여 개발된, human immortalized endometriotic epithelial cells인 11Z세포주와 12Z 세포주를 자궁내막증 모델 세포로 준비하였다(Johann-Wolfgang-Goethe-Universitaet(Germany)의 Dr. Starzinski-Powitz 제공). 이들 세포들은 기존에 알려진 활성 자궁내막증 조직(active endometrotic tissue)의 분자생물학적 성격과 유사함이 증명되어(Banu et al., 2008), 자궁내막증의 분자생물학적 연구에 대한 새로운 인 비트로 모델로 사용되고 있다.

[0038] 또한, 정상인 자궁내막세포(Human endometrial epithelial cells)는 HES 세포주(University of Illinois at

Chicago의 Dr. Asgi Fazleabas 제공)를 준비하였다.

[0039] 각 세포는 RPMI 1640 및 DMEM/F12 배지(10% 우태아혈청, 100 U/ml 페니실린 G, 100g/ml 스트렙토마이신 첨가됨; 라이프 테크놀로지, 그랜드 아일랜드, 뉴욕) 중, 섭씨 37도, 5%이산화탄소-95%공기 조건에서 유지되었다.

[0040] 1-3. 세포 생존 시험(cell viability assay)

[0041] 세포 생존시험은 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheyltetrazoliumbromide; Sigma-Aldrich) 어췌이에 의하였다. 세포는 96-웰 플레이트에 웰당 5X10³ 세포 농도로 식종하고, 24시간 배양하였다. 쑥 추출물의 성장 억제 효과를 시험하기 위해, 각 세포는 48시간 동안 1-1에서 준비된 추출물(0-100ug/ml 범위의 복수개 농도)로 처리하였다. 채취일에 25ul의 MTT 용액을 배지에 넣고, 세포는 4시간 동안 섭씨 37도에서 배양하였다. MTT염색된 배지를 제거 후, 세포를 30분간 DMSO(50ul)에서 용해하였다. 세포생존을 알아보기 위해, 광학밀도(optical density)를 마이크로플레이트 스펙트로미터(SpectraMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여, 540nm에서 측정하였다. 또한, 양성대조군에 대하여, COX-2 저해제인 NS398을 쑥 추출물 처리와 동일한 방법으로 처리하였고, 대조군에 대하여는 쑥 추출물 또는 NS398 처리를 제외하고 쑥 추출물 처리와 동일한 방법으로 처리하였다.

[0042] 그 결과를 하기 표에 IC₅₀로 나타내었다. 상기 IC₅₀는 시료 처리하지 않은 대조군과 비교하여 세포수가 50% 감소되는 농도를 의미한다. 하기 표에서 각각의 값은 각각 독립적인 3회 실험 결과의 평균을 의미한다.

[0043] <표 1>

세포주	기원	IC ₅₀	
		실시에 1-1 추출물 (ug/ml)	NS398 (uM)
HES	Human epithelial endometrial cells	11.93 ±2.27	82.02 ±4.70
11Z	Human epithelial endometriotic cells	10.61 ±0.15	89.61 ±1.31
12Z	Human epithelial endometriotic cells	8.23 ±0.21	>100

[0045] 그 결과 세포독성을 나타내는 지표인 IC₅₀가 쑥 추출물의 처리시, 양성대조군으로 사용한 NS398에 비해 매우 낮음을 알 수 있다. 이와 같은 결과로부터 쑥 추출물이 자궁내막증 세포의 생존을 억제함을 알 수 있다. 또한, NS398은 자궁내막증세포에 비해 정상세포에서 더 높은 독성을 나타내나, 쑥 추출물은 정상세포에 대한 독성은 더 적음을 알 수 있다. 따라서, 쑥 추출물은 정상세포에 대한 독성은 적으면서, 자궁내막증세포의 생존을 효과적으로 억제함을 알 수 있다.

[0046] 결과적으로, 쑥 추출물은 부작용은 적게 나타내며, 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 또는 예방할 수 있음을 알 수 있다.

[0047] <실시에 2> 쑥 추출물의 자궁내막증세포 생존 억제에 의한 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인

[0048] PI 염색법을 이용하여, 쑥 추출물이 자궁내막증세포 생존 억제에 의한 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과를 확인하고자 하였다.

- [0049] 2-1. 쑥 추출물 준비
- [0050] 실시예 1의 1-1.과 동일한 방법으로 쑥 추출물을 준비하였다.
- [0051] 2-2. 세포 준비
- [0052] 실시예 1의 1-2.과 동일한 방법으로 세포를 준비하였다.
- [0053] 2-3. PI staining
- [0054] 자궁내막증 세포주(11Z)에 2-1.의 쑥 추출물을 처리(처리 농도: 0, 4.5, 9, 18 ug/ml)한 후, 8, 16, 24시간 후 Flow cytometry를 이용하여 세포주기를 관찰하였다. 세포 수확일에 2회에 걸쳐 얼음-냉 PBS로 세포를 세척하고, 섭씨 4도에서 1시간 동안 얼음-냉 에탄올(70%)로 세포를 고정(fix)하고, 투과성을 올렸다. 세포는 PBS로 세척 후, 50ul/ml의 프로피디움 이오다이드(PI, propidium iodide)를 포함하는 염색액으로 재분산시켰다. 세포 분산물은 실온에서 30분간 배양하고, 형광 활성 세포 계수기-플로우 사이토미터{fluorescence-activated cell(FACS) sorting cater-plus flow cytometry; Beckman Coulter, Calif, USA}를 이용하여 세포주기별 세포의 수를 계수하였다.
- [0055] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1의 상단 그래프는 농도별, 시간별 쑥 추출물 처리에 따라 변화하는 세포주기별 세포의 수를 나타내는 그래프이고, 백분율로 표시된 숫자는 Sub G1을 나타내는 세포의 비율을 나타낸 것이다.
- [0056] 도 1의 하단 그래프 중 좌측 그래프는 처리한 쑥 추출물 농도별 세포주기별 세포의 상대적 비율을 나타낸 그래프이고, 우측 그래프는 쑥 추출물 처리 시간별 세포주기별 세포의 상대적 비율을 나타낸 그래프이다.
- [0057] 도 1에서 보는 바와 같이, 자궁내막증 세포에 쑥 추출물 처리시, 처리 농도가 증가함에 따라 세포죽음을 나타내는 주기인 Sub G1이 증가함을 알 수 있다. 또한, 처리시간 증가에 따라서도 Sub G1이 증가함을 알 수 있다.
- [0058] 이와 같은 결과로 부터 쑥 추출물은 처리시간과 농도 의존적으로 자궁내막증 세포의 생존을 억제함을 알 수 있다.
- [0059] 그 결과 쑥 추출물은 농도의존적으로 또한 시간의존적으로, 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 또는 예방할 수 있음을 알 수 있다.
- [0060] <실시예 3> Akt 활성 감소 작용에 의한, 쑥 추출물의 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인
- [0061] Akt는 세포 생존에 관여하는 중요한 단백질로서, 세포생존의 감소 등에 의해 단백질 양이 감소한다. 따라서, 자궁내막증 세포에서 쑥 추출물 처리시 Akt 활성 변화를 측정하여, 자궁내막증 세포에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.
- [0062] Akt는 프로틴 키나아제 비{Protein Kinase B(PKB)로도 알려져 있으며, 세린/쓰레오닌-특이 단백질 키나아제 (serine/threonine-specific protein kinase)이다.
- [0063] 3-1. 쑥 추출물 준비
- [0064] 실시예 1의 1-1.과 동일한 방법으로 쑥 추출물을 준비하였다.
- [0065] 3-2. 세포 준비
- [0066] 실시예 1의 1-2.과 동일한 방법으로 세포를 준비하였다.
- [0067] 3-3. 웨스턴 블롯팅
- [0068] 자궁내막증 세포주(11Z)에 3-1.의 쑥 추출물을 처리(9ug/ml)한 후, 시간별로(0, 15, 30, 60분) 수확하여, 웨스

턴 블롯팅 분석을 하였다.

[0069] 세포를 얼음-냉 PBS로 세척 후, 단백질을 라이시스 버퍼(인트론, 서울, 대한민국)으로 추출하였다. 단백질 농도는 브래드포드법으로 측정하였다. 세포 라이세이트의 단백질 샘플은 동일 용량의 5×SDS 샘플 버퍼와 혼합하여, 4 분간 끓이고, 10~12% SDS-PAGE 겔로 분리하였다. 전기영동 후, 단백질은 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인 으로 트랜스퍼하였다. 상기 멤브레인은 5% 무지방 건조 우유로 1시간 동안 블럭시킨 후 세척하였다. 그 후 Tween-20(0.1%)를 함유하는 Tris-완충 saline 중에서 T-Akt, phospho-Akt(p-Akt), β -actin 각각에 대한 항체 와 함께 하룻밤 섭씨 4도에서 배양하였다. Tris buffered saline(TBS-T) 중에서 3회 멤브레인을 세척하여 1차 항체를 제거한 후, 호스래디쉬 퍼옥시다제-컨쥬게이트된 이차항체(1:1000-2000)와 함께 1시간 동안 배양하였다. 그 후 TBS-T 중 3회 세척하고, 항체-양성 밴드를 인헨스드 케미루미나센스로 시각화하고, ImageQuant Las-4000(도쿄, 일본)으로 분석하였다.

[0070] 그 결과를 도 2의 상부 그래프로 나타내었다.

[0071] 도의 APE는 실시예 3-1의 쑥추출물 처리를 의미하고, 숫자는 처리시간을 의미한다. p-Akt는 Akt의 인산화형이고, T-Akt는 총 Akt이며, 베타-액틴은 내부컨트롤이었다.

[0072] 그 결과, T-Akt의 발현이 일정하게 유지되는 것에 비해, p-Akt의 발현량은 처리시간에 비례하여 감소함을 알 수 있다.

[0073] 이와 같은 결과로부터, 쑥 추출물은 Akt의 phospho-form을 감소시킴으로써, Akt 활성을 유의적으로 억제함을 알 수 있다.

[0074] 3-4. MTT assay

[0075] 또한, 컨스티튜티브 활성형(constitutive active form)인 Akt-Myr 벡터를 사용하여, Akt의 활성을 증가시킨 군 에서 쑥 추출물에 의해 유도되었던 자궁내막증세포의 세포독성이 감소되는 것을 관찰하였다.

[0076] 구체적으로, 실험방법은 하기와 같다.

[0077] 자궁내막증 세포주(11Z)를 공벡터(empty vector)와 Akt-Myr 벡터로 트랜스팩션한 후, 3-1.의 쑥 추출물을 처리 (9ug/ml)한 후 24시간 경과시 MTT assay를 수행하였다. 즉, 세포를 70-80% 컨플루언스로 배양 후 배지를 제거하 고, 벡터와 2ug/ml의 폴리에틸렌이민(PEI)를 각각 함유한 혈청 무첨가 OPTI-MEM 배지에 넣어 섭씨 37도에서 6시 간 배양하였다. 트랜스팩션 이후, 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640으로 교체하고 쑥 추출물 처리 전 섭씨 37도에 서 하룻밤 배양하였다.

[0078] 약물처리 24시간 후, 25ul의 MTT 용액을 배지에 넣고, 세포는 4시간 동안 섭씨 37도에서 배양하였다. MTT염색된 배지를 제거 후, 세포를 30분간 DMSO(50ul)에서 용해하였다. 세포생존을 알아보기 위해, 광학밀도(optical density)를 마이크로플레이트 스펙트로미터(SpectraMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여, 540nm에서 측정하였다.

[0079] 그 결과를 도 2의 하부 그래프로 나타내었다. 도의 Cell cytotoxicity는 세포 사멸율을 의미하고, empty vector 는 Akt 활성을 증가시키지 않은 군을 의미하고, Akt-Myr은 Akt-Myr 벡터를 이용하여 Akt 활성을 증가시킨 군을 의미한다.

[0080] 도에서 보는 바와 같이, Akt의 활성을 증가시킨 군에서 쑥 추출물에 의해 유도되었던 자궁내막증세포의 세포독 성이 감소되는 것을 알 수 있다.

[0081] 이와 같은 결과는 쑥 추출물이 Akt 활성을 감소시켜 자궁내막증 세포의 세포독성을 일으킴을 뒷받침하는 것이다.

[0082] 3-3.과 3-4.의 결과로부터 쑥 추출물은 자궁내막증세포에서 Akt의 인산화를 억제하여 Akt 활성을 감소시킴으로 써, 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 또는 예방할 수 있음을 알 수 있다.

[0083] <실시예 4> NF κ B의 발현 또는 전위(translocation) 억제 작용에 의한, 쑥 추출물의 자궁내막증 치료, 개선 또 는 예방 효과 확인

- [0084] p53와 RelA(p50), 두 개의 썬브유닛이 함께 콕플렉스를 이루고 있는 NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)는 세포 생존과 관련된 중요한 인자이며, 특히 핵 내로 전위(translocation)되어 여러 유전자들을 조절하는 전사인자(transcription factor)이다.
- [0085] NF- κ B의 발현 또는 전위(translocation)에 미치는 썬 추출물의 영향을 확인함으로써, 썬 추출물이 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과를 갖는지 알아보고자 하였다.
- [0086] 4-1. 썬 추출물 준비
- [0087] 실시예 1의 1-1.과 동일한 방법으로 썬 추출물을 준비하였다.
- [0088] 4-2. 세포 준비
- [0089] 실시예 1의 1-2.과 동일한 방법으로 세포를 준비하였다.
- [0090] 4-3. 웨스턴 블롯팅
- [0091] 자궁내막증 세포주(11Z)에 4-1.의 썬 추출물을 처리(9 μ g/ml)한 후, 시간별로(0, 4, 8, 16시간) 수확하여, 웨스턴 블롯팅 분석을 하였다.
- [0092] NF- κ B의 발현 이외에 핵 내 전위를 확인하기 위해, 총 세포 라이세이즈(lysates)와 핵 분획(nuclear fractions)을 준비하여 각각에서 NF- κ B p65, NF- κ B p50의 발현량 확인을 위한 웨스턴 블롯을 하기 방법으로 실시하였다. 이 때, β -actin은 총 세포 라이세이즈를 대상으로 할 경우 내부 컨트롤이었고, 뉴클레올린(Nucleolin)은 핵 분획을 대상으로 할 경우 내부 컨트롤이었다.
- [0093] 웨스턴 블롯을 위해, 세포를 얼음-냉 PBS로 세척 후, 단백질 라이시스 버퍼(인트론, 서울, 대한민국)로 추출하여 총 세포 라이세이즈를 준비하였다. 단백질 농도는 브래드포드법으로 측정하였다.
- [0094] 또한, 핵 분획은 세포(5×10^6 , 70~80% 컨플루언스)를 냉 PBS(phosphate-buffered saline)으로 세척 후 0.4mL의 하이포토닉 라이시스 버퍼{10mmol/L의 HEPES(pH 7.9), 1.5mmol/L의 MgCl₂, 10mmol/L의 KCl, 0.5mmol/L의 페닐메틸설포닐 플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.5mmol/L의 디티오프레이틀 플러스 프로테아제 억제제 콕테일(dithiothreitol plus protease inhibitor cocktail)}로 15분간 현탁시켰다. 그 후 세포를 12.5 μ L의 10% Nonidet P-40으로 용해(lyse)하였다. 용해물을 교반 후, 세포를 원심분리(13,000 $\times$ g, 5분)하였고, 상등액을 섭씨 80도에서 보관하였다. 핵 펠렛을 50 μ L의 얼음-냉 하이퍼토닉 추출 버퍼{10mmol/L HEPES(ph 7.9), 0.42M NaCl, 1.5mmol/L MgCl₂, 10mmol/L KCl, 0.5mmol/L 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 1mmol/L의 디티오프레이틀 플러스 프로테아제 억제제}로 재분산하였다. 40분간 섭씨 4도에서 교반 후, 추출물을 원심분리(13,000 $\times$ g, 10분, 섭씨 4도)하였고, 핵단백질을 포함하는 상등액을 취하였다. 단백질 농도는 브래드포드법으로 측정하였다.
- [0095] 총 세포 라이세이즈 또는 핵 분획의 단백질 샘플은 동일 용량의 5 $\times$ SDS 샘플 버퍼와 혼합하여, 4분간 끓이고, 10~12% SDS-PAGE 겔로 분리하였다. 전기영동 후, 단백질은 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 상기 멤브레인은 5% 무지방 건조 우유로 1시간 동안 블럭시킨 후 세척하였다. 그 후 Tween-20(0.1%)를 함유하는 Tris-완충 saline 중에서 NF- κ B p65, NF- κ B p50, β -actin 또는 뉴클레올린 각각에 대한 항체와 함께 하룻밤 섭씨 4도에서 배양하였다. TBS-T 중에서 3회 멤브레인을 세척하여 1차 항체를 제거한 후, 호스래디쉬 퍼옥시다제-컨쥬게이트된 이차항체(1:1000-2000)와 함께 1시간 동안 배양하였다. 그 후 TBS-T 중 3회 세척하고, 항체-양성 밴드를 인헨스드 케미루미나센스로 시각화하고, ImageQuant Las-4000(도쿄, 일본)으로 분석하였다.
- [0096] 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0097] 도 3의 좌측 그래프는 총 세포 라이세이즈에 대한 결과이고, 우측 그래프는 핵 분획에 대한 결과이다. 도에서 APE는 4-1.의 썬 추출물 처리군을 의미한다.
- [0098] 도에서 보는 바와 같이, 처리 시간 경과에 따라 NF- κ B p65와 NF- κ B p50의 발현량이 총 세포 라이세이즈와 핵 분획에서 모두 감소함을 알 수 있다.
- [0099] 이와 같은 결과로부터, 썬 추출물은 NF- κ B 의 발현을 억제하고, 핵 내로의 전위를 억제하여 전사인자로의 작용

을 억제함을 알 수 있다.

- [0100] 따라서, 쑥 추출물은 자궁내막증세포에서 세포생존에 관련된 NF κ B의 발현과 전위를 억제함으로써, 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 또는 예방할 수 있을 것으로 보인다.
- [0101] <실시에 5> XIAP, Bcl-2 또는 Bcl-xL의 발현 억제 작용에 의한, 쑥 추출물의 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인
- [0102] XIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein)은 IAP(Inhibitor of Apoptosis) 패밀리 중 하나로서 apoptosis의 핵심적인 역할을 하는 caspase와 결합하여 apoptosis를 막는 역할을 하고, Bcl-2(B-cell lymphoma 2)와 Bcl-xL(B-cell lymphoma-extract large)은 Bcl-2 패밀리 중 pro-survival로 작용하는 인자로서 미토콘드리아에서 cytochrome C의 유출을 막아 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다.
- [0103] 쑥 추출물이 XIAP, Bcl-2, Bcl-xL의 발현에 미치는 영향을 확인함으로써, 쑥 추출물이 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과를 갖는지 알아보고자 하였다.
- [0104] 5-1. 쑥 추출물 준비
- [0105] 실시예 1의 1-1.과 동일한 방법으로 쑥 추출물을 준비하였다.
- [0106] 5-2. 세포 준비
- [0107] 실시예 1의 1-2.과 동일한 방법으로 세포를 준비하였다.
- [0108] 5-3. 웨스턴 블롯팅
- [0109] 자궁내막증 세포주(11Z)에 3-1.의 쑥 추출물을 처리(9ug/ml)한 후, 시간별로(0, 2, 4, 8시간) 수확하여, 웨스턴 블롯팅 분석을 하였다.
- [0110] 세포를 얼음-냉 PBS로 세척 후, 단백질을 라이시스 버퍼(인트론, 서울, 대한민국)으로 추출하였다. 단백질 농도는 브래드포드법으로 측정하였다. 세포 라이세이트의 단백질 샘플은 동일 용량의 5 $\times$ SDS 샘플 버퍼와 혼합하여, 4 분간 끓이고, 10~12% SDS-PAGE 겔로 분리하였다. 전기영동 후, 단백질은 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인 으로 트랜스퍼하였다. 상기 멤브레인은 5% 무지방 건조 우유로 1시간 동안 블럭시킨 후 세척하였다. 그 후 Tween-20(0.1%)를 함유하는 Tris-완충 saline 중에서 XIAP, Bcl-2, Bcl-xL, β -actin 각각에 대한 항체와 함께 하룻밤 섭씨 4도에서 배양하였다. TBS-T 중에서 3회 멤브레인을 세척하여 1차 항체를 제거한 후, 호스래디쉬 퍼 옥시다제-컨쥬게이트된 이차항체(1:1000-2000)와 함께 1시간 동안 배양하였다. 그 후 TBS-T 중 3회 세척하고, 항체-양성 밴드를 인헨스드 케미루미나센스로 시각화하고, ImageQuant Las-4000(도쿄, 일본)으로 분석하였다.
- [0111] 그 결과를 도 4의 그래프로 나타내었다.
- [0112] 도의 APE는 실시예 5-1의 쑥추출물 처리를 의미하고, 숫자는 처리시간을 의미한다. 베타-액틴은 내부컨트롤이었다.
- [0113] 그 결과, 쑥 추출물 처리시간 증가에 따라, XIAP, Bcl-2, Bcl-xL의 발현량이 감소함을 알 수 있다.
- [0114] 이와 같은 결과로부터, 쑥 추출물은 자궁내막증세포에서 apoptosis를 억제하는 단백질인 XIAP, Bcl-2, Bcl-xL 발현을 억제함으로써, apoptosis 유도를 일으킨다고 볼 수 있다.
- [0115] 따라서, 쑥 추출물은 자궁내막증세포에서 apoptosis를 억제하는 단백질 발현을 억제함으로써, apoptosis를 유도 하여, 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 또는 예방할 수 있을 것으로 보인다.
- [0116] 상술한 실시예 1~5로부터 확인한 바와 같이, 쑥 추출물은 자궁내막증의 특징인 자궁내막증 세포성장을 유의적으로 억제하고, 세포성장에 중요한 역할을 하는 Akt pathway와 Bcl-2, Bcl-xL, XIAP 등의 세포사 억제인자들의 발현을 억제함을 알 수 있다. 또한, 통증과 관련된 염증성인자들의 발현에 중요한 작용을 하는 NF κ B pathway를 유의성 있게 억제시킴을 알 수 있다.
- [0117] 따라서, 쑥 추출물이 자궁내막세포의 증식을 저해하고, 통증을 억제하여 자궁내막증의 치료, 개선 또는 예방에

효과적일 것으로 판단된다.

[0118] <제조예 1> 약학 조성물의 제조

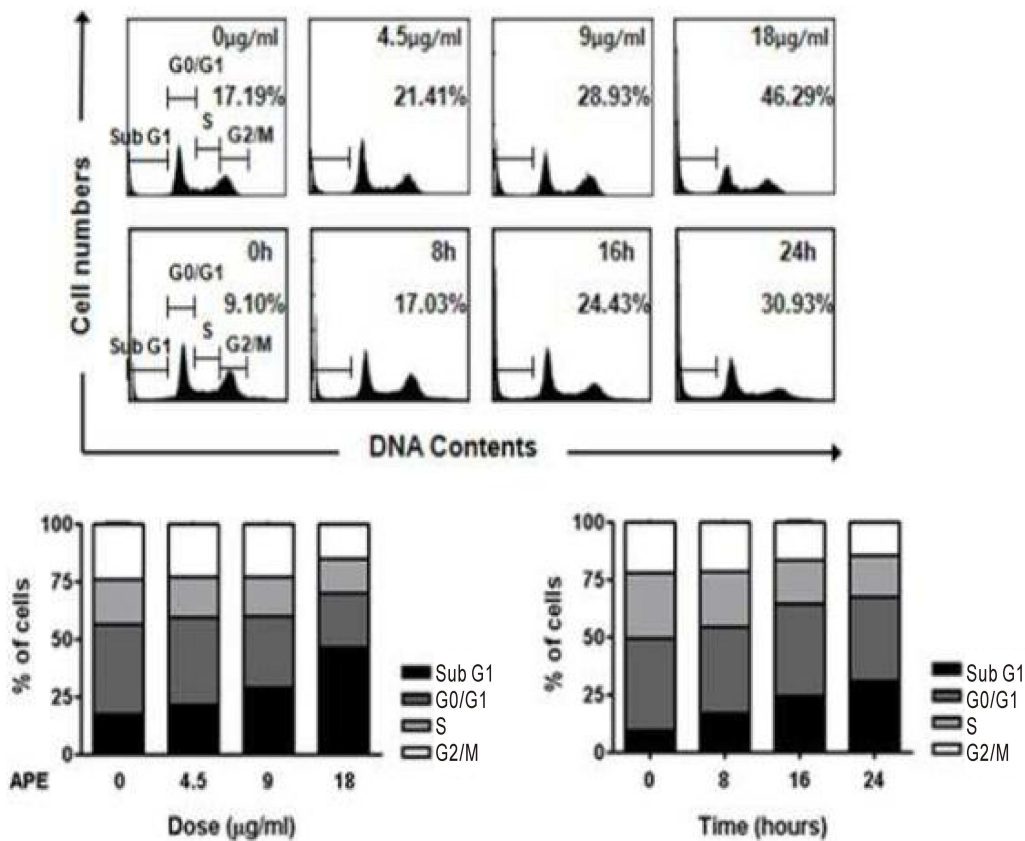
[0119] 실시예 1-1과 동일한 방법으로 준비한 쑥 추출물 300mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0120] <제조예 2> 식품 조성물의 제조

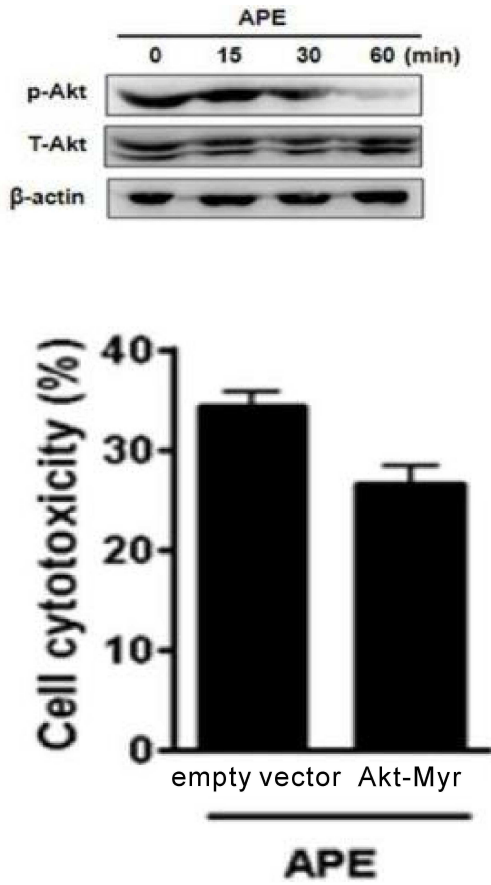
[0121] 실시예 1-1과 동일한 방법으로 준비한 쑥 추출물(4중량 %), 액상과당(0.5중량%), 올리고당(2중량%), 설탕(2중량 %), 및 식염(0.5중량%)에 물을 추가하여 잔량을 맞춘 후 균질하게 배합하여 순간 살균을 하여 건강음료를 제조하였다.

도면

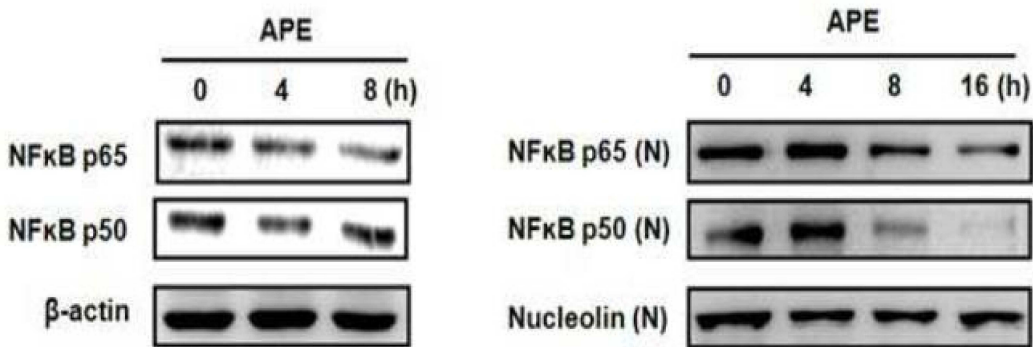
도면1



도면2



도면3



도면4

