



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0044171
(43) 공개일자 2019년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/36 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/36 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0136222
(22) 출원일자 2017년10월20일
심사청구일자 2018년08월10일

(71) 출원인
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
(72) 발명자
임영호
서울특별시 관악구 신림로29길 8, 104동 110호(신림동, 신림현대아파트)
신순영
서울특별시 광진구 능동로 18, A동 1801호(자양동, 이튼타워리버3차)
이영한
서울특별시 성동구 독서당로62길 43, 11동 1202호(응봉동, 대림아파트)
(74) 대리인
위병갑

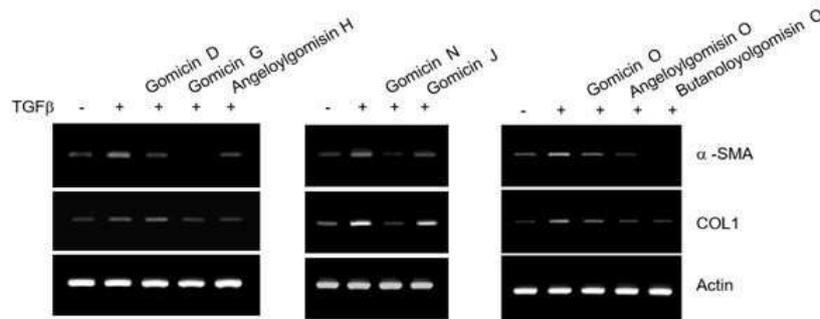
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 고미신 유도체를 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 고미신 유도체를 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 고미신 유도체는 간 정상세포의 분화를 억제하고, 제1형A1콜라겐 섬유유 단백질 축적을 감소시키고, α-SMA와 콜라겐 유전자의 mRNA 발현을 억제하는 효과가 있어 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용할 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

Y10S 514/893 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 316028-3

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 (2차) 약용작물 유효성분 DB구축 및 개별인정형 자료 확보

기 여 율 1/1

주관기관 건국대학교

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

고미신 G(Gomisin G) 및 고미신 O(Gomisin O) 중에서 1종 이상을 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 간질환은 간경화, 간섬유증, 급성간염, 만성간염 또는 간암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 간질환은 간섬유증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 간 정상세포에서 제1형A1 콜라겐유전자(COL1A1) 및 α -평활근액틴(α -SMA, α -smooth muscle actin)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

고미신 G(Gomisin G) 및 고미신 O(Gomisin O) 중에서 1종 이상을 포함하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 간질환은 간경화, 간섬유증, 급성간염, 만성간염 또는 간암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 간질환은 간섬유증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 5항에 있어서,

상기 조성물은 간 정상세포에서 제1형A1 콜라겐유전자(COL1A1) 및 α -평활근액틴(α -SMA, α -smooth muscle actin)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

고미신 G(Gomisin G) 및 고미신 O(Gomisin O) 중에서 1종 이상을 포함하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 간질환은 간경화, 간섬유증, 급성간염, 만성간염 또는 간암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서,
상기 간질환은 간섬유증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 9항에 있어서,
상기 조성물은 간 정상세포에서 제1형A1 콜라겐유전자(COL1A1) 및 α -평활근액틴(α -SMA, α -smooth muscle actin)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고미신 유도체를 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간은 우리 몸에서 가장 큰 기관 중의 하나로, 단백질, 당, 비타민, 지방 등을 합성하고 지방과 지용성 비타민의 흡수를 도와주는 담즙을 생산하며, 알코올, 암모니아, 각종 약물 뿐 아니라 소화하면서 생긴 몸에 해로운 독성 물질을 해독시키는 작용을 한다. 간 섬유증(Liver fibrosis)은 간염에서 간경화/간경변(Liver cirrhosis)으로 진행되는 초기 과정으로서, 간에서 교원섬유 (collagen) 등이 과다하게 축적되어 발생된다 (J Biol Chem, 275 (2000), pp. 2247-2250). 간 섬유화가 만성적으로 지속되면 간경화/간경변증으로 발전되어 간 기능이 손상되면서, 간의 구조적 구조가 파괴되고, 결국에는 간암으로 진행될 수 있다. 만성 간질환은 식욕감퇴와 만성 피로 증상을 나타내는 국내에서 중요한 성인병이며, 2013년 통계 기준으로 폐암에 이어 우리나라 암사망률 2위인 간암의 80% 이상에서 간경화 상태를 보이고 있다.

[0003] 간섬유증은 바이러스성 간염, 알콜성 간염, 알콜중독 또는 독성약물 등의 만성 자극에 대한 상처 치유 작용으로 나타난다. 다양한 원인에 의해 간염이 생겨 간세포가 손상을 받으면, 탐식세포의 일종인 쿠퍼 (Kupffer) 세포가 형질전환성장인자- β (TGF- β), 혈소관유래성장인자(PDGF), 종양괴사인자- α (TNF- α) 등과 같은 여러가지 세포 활성 물질을 분비하여, 염증을 유도함으로써 손상된 간 조직을 재생시켜 준다 [Alcoholism Clin Exp Res 1999;23:911-6]. 이때, 간세포(hepatocyte)와 동모양 혈관내피세포(sinusoidal endothelial cell) 사이에 위치하고 있는 간성상 세포(Hepatic stellate cell; HSC)는 쿠퍼 세포와 손상된 간세포에서 분비되는 활성 물질에 의해 휴지기 상태에서 근섬유아세포유사세포 (myofibroblast-like cells)로 분화되고 활성화되면서 (J Gastroenterol Hepatol, 14 (1999), pp. 618-633), 콜라겐섬유 (collagen fiber)를 포함하여 프로테오글리칸(proteoglycan) 등과 같은 세포외간질 물질(ECM)을 다량 방출하여, 손상된 간 조직 주변에 새로운 세포외간질 물질을 침착 시켜 조직 재생을 촉진시켜준다 (J Gastroenterol 2000; 35:665-672).

[0004] 그러나, 간세포 파괴와 재생 과정이 반복적으로 일어나면, 모든 원인의 간 손상에서 세포외간질의 콜라겐 단백질은 가는 미세섬유(fibril) 상태에서 굵은 섬유(fiber) 상태로 변형되어 과다 축적되면서, 간 섬유화(liver fibrosis) 과정이 진행되게 된다 (Semin Liver Dis 1990;10:30-46). 간섬유화 과정에서 가장 일반적으로 관찰되는 특징은 제1형 콜라겐섬유가 극적으로 증가하고, 3형 콜라겐섬유는 작지만 유의하게 증가되는 것이다. 특히, 제1형 콜라겐섬유는 정상 간 조직의 경우 총 단백질 중 2% 정도를 차지하지만, 간 섬유화가 진행되고 있는 간 조직에서는 총 단백질의 10~30%까지 증가되는 것으로 알려져 있다 (Conn Tis Res 1989;23:19-31). 이와 같이, 콜라겐 섬유가 다량 축적되어 간 섬유화가 지속되면, 간의 구조가 변형되고 간 기능이 감소되면서, 간이 딱딱하게 되는 간경변(liver cirrhosis)으로 진행된다.

[0005] 간경화/간경변은 비가역적이지만, 간 섬유화는 가역적으로 일어나는 반응이므로, 예방 및 조기 치료가 가능하다고 알려져 있다. 따라서, 간경화/간경변증을 효과적으로 예방 및 치료하기 위해서는 간 정상세포(HSC)의 활성을 억제시켜 콜라겐섬유 등의 합성을 차단시켜 간 섬유화의 진행 과정을 차단시켜주는 것이 절대적으로 중요하다 (J Gastroenterol 2000; 35:665-672).

[0006] 이에 본 발명자들은 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O)가 간 정상세포의 분화를 억제하고, 제1형A1콜라겐 섬유의 단백질 축적을 감소시키는 효능 및 콜라겐 유전자의 mRNA 발현을 억제하는 효과를 알아내고

본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2009-0069720호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 고미신 G(Gomisin G) 및 고미신 O(Gomisin O) 중에서 1종 이상을 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 고미신 G(Gomisin G) 및 고미신 O(Gomisin O) 중에서 1종 이상을 포함하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 고미신 G(Gomisin G) 및 고미신 O(Gomisin O) 중에서 1종 이상을 포함하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0014] 본 발명은 고미신 G(Gomisin G) 및 고미신 O(Gomisin O) 중에서 1종 이상을 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 고미신 G(Gomisin G) 및 고미신 O(Gomisin O) 중에서 1종 이상을 포함하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0018] 나아가 본 발명은 고미신 G(Gomisin G) 및 고미신 O(Gomisin O) 중에서 1종 이상을 포함하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 고미신 유도체는 간 정상세포의 분화를 억제하고, 제1형A1콜라겐 섬유의 단백질 축적을 감소시키고, α -SMA와 콜라겐 유전자의 mRNA 발현을 억제하는 효과가 있어 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 TAA에 의한 마우스 간손상 모델에서 오미자추출물의 간 섬유화 과정 억제 실험 과정을 도식화한 것이다.

도 2는 TAA로 간 손상을 유도한 마우스에 오미자 추출물을 투여 하였을 때의 간 기능 회복 효과를 ALT와 AST 효소 활성 측정으로 실험한 결과이다.

도 3은 TAA로 간 손상을 유도시킨 마우스에서 오미자추출물에 의한 간섬유화 반응 억제 효과를 조직염색법으로 관찰한 결과이다.

도 4는 오미자추출물에 의해 TAA로 간 손상을 유도시킨 마우스 간 조직에서 발현되는 α -SMA 와 제1형A1 콜라겐 섬유(COL1A1)의 단백질 양을 감소시키는 결과이다

도 5는 간 정상세포(HSC)에 오미자추출물을 처리하면 TGF β 에 의해 증가되는 α -SMA와 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA의 발현이 감소되는 결과를 RT-PCR법으로 분석한 결과이다.

도 6은 간 정상세포(HSC)에 오미자추출물을 처리하면 TGF β 에 의해 증가되는 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA의 발현이 감소되는 결과를 QRT-PCR법으로 분석한 결과이다.

도 7은 간 정상세포(HSC)에서 TGF β 에 의해 증가되는 α -SMA와 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA의 발현을 감소시키는 오미자추출 분획층 분석을 RT-PCR법으로 실험한 결과이다.

도 8은 오미자에 포함된 9종의 authentic sample에 대한 chromatogram이다.

도 9는 오미자 hexane 분획에 포함된 gomisin 유도체들에 대한 chromatogram이다.

도 10은 오미자 헥산 분획층에서 분리한 고미신 유도체들이 간 정상세포(HSC)에서 TGF β 에 의해 증가되는 α -SMA와 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA의 발현을 감소시키는 효과를 RT-PCR법으로 실험한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] **고미신 G 및/또는 고미신 O를 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물**
- [0024] 본 발명은 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O)를 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물이 치료, 예방, 개선할 수 있는 상기 간질환은 이에 제한되지는 않으나, 간경화, 간섬유증, 급성간염, 만성간염 또는 간암일 수 있으며, 바람직하게는 간경화 또는 간섬유증일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O)은 오미자 추출물의 분획물로부터 고미신 유도체를 분리하여 사용할 수 있으며, 이때 추출물을 수득하기 위해 사용할 수 있는 적절한 용매로는 당업계에서 허용되는 용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있다. 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 분획물은 오미자 추출물을 부탄올, 헥산, 클로로포름 또는 에틸아세테이트를 사용하여 분획한 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 헥산을 사용하여 분획할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 상기 조성물은 임상투여 시에 다양한 하기의 경구 또는 비 경구 투여 형태로 제제화 되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 이의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리 에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명에 따른 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O)의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.1 ~ 1,000 mg/일이며, 바람직하게는 1 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0032] 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 및 건강식품 조성물

[0033] 본 발명은 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O)를 유효성분으로 포함하는 건강기능식품 및 건강식품 조성물을 제공한다.

[0034] 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나, 본 발명의 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O)를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 김류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품 및 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0035] 본 발명에 따른 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O)를 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 및 건강기능식품 중의 상기 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O)의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O) 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능성 식품 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0037] 상기 외에 본 발명의 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O)를 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 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 본 발명의 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0038] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 고미신 G(Gomisin G) 및/또는 고미신 O(Gomisin O)를 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0040] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0042] <준비예 1> TAA를 이용하여 간 손상을 유도하는 마우스 동물 모델

[0043] 도 1과 같이 정상 음성대조군은 마우스 실험동물에 phosphate-buffered saline(PBS) 완충액만 10일간 투여한 후 8주 후에 간을 적출하였다. TAA 처리군은 PBS 완충액을 투여하고 10일 후에 100 mg/kg 농도의 TAA를 주당 3회씩 8주간 복강내로 투여하여 간 손상을 유도하였다. 오미자+TAA 처리군은 300 mg/kg 농도의 오미자 추출물을 경구 투여하고, 10일 후 부터는 주당 3회씩 8주간 오미자 추출물은 경구 투여하고 TAA는 복강내로 투여하였다. TAA 처리 8주 후, 채혈한 후에 간 조직을 적출하였다.

[0045] <실시예 1> 오미자 추출물의 제조

[0046] 그늘에서 건조한 오미자 1kg에 3L의 에탄올을 더한 후 3일간 침지시켰다. 거름종이로 액체성분만 걸러낸 후 감

압축기로 건조시키고 다시 동결건조 시켜 오미자 추출물을 제조하였다.

[0048] <실시예 2> 오미자 추출물의 분획물 제조

[0049] 상기 실시예 1의 에탄올 추출물의 극성에 따른 분획물을 얻기 위하여 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올을 이용하여 차례로 분획하여 수용액층을 포함한 5종의 분획층을 확보하였다. 에탄올 추출물과 동일하게 감압농축기로 건조시키고 다시 동결건조 시켜서 분획물을 제조하였다.

[0051] <실험예 1> 오미자 성분의 분석

[0052] 분석장비는 high performance liquid chromatography (HPLC) Agilent 1260 Infinity를 사용하였고, column으로는 Symmetry 4.6 X 250mm 5um을, detector는 UV/VIS 검출기로 220nm에서 분석하였다. 이동상은 65% 아세토니트릴을 사용하였다. hexane층 분획물을 HPLC 분석에 사용하였다. Authentic sample로 9종의 gomisin 유도체를 사용하였다. 9종의 gomisin 유도체들은 Gomisin D, Gomisin G, Gomisin H, Gomisin J, Gomisin N, Gomisin O, Angeloylgomisin H, Angeloylgomisin O, Benzoylgomisin O 이었다(도 8 참조).

[0053] Authentic sample과 동일한 조건으로 오미자 hexane 분획을 분석한 결과 아래 그림과 같은 결과를 얻었다. Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N, Gomisin O, Angeloylgomisin H, Angeloylgomisin O 의 6종 유도체가 관찰되었다(도 9참조).

[0055] <실험예 2> 티오아세트아미드(thioacetamide; TAA)로 간손상을 유도한 마우스에서 오미자추출물의 간기능 보호 효과

[0056] 티오아세트아미드(thioacetamide; TAA)는 만성적인 간 손상을 유도하여 간 섬유화 과정을 유발시키는 화학물질이다.

[0057] 알라닌 아미노전이효소[alanine aminotransferase(ALT), 일명 glutamic pyruvate transaminase(GPT)]와 아스파르테이트 아미노전이효소[aspartate aminotransferase(AST), 일명 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)] 효소들은 간 세포에 다량 존재하는 효소들로 주로 간세포가 손상을 받는 경우에 혈액내로 방출되어 혈중 농도가 증가하게 된다. 따라서, 혈청내의 ALT와 AST 효소 활성 변화는 간 기능 손상 상태를 간접적으로 판단할 수 있는 주요 지표로 사용되고 있다.

[0058] 오미자 추출물이 TAA에 의한 간 기능 손상을 억제시키는 효과가 있는지 실험하기 위하여 도 1과 같이 3종류 실험군으로 분류하여 실험하였으며, 마우스 혈청에서 ALT와 AST 효소 활성 변화를 측정하였다.

[0059] ALT와 AST 효소 활성은 Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics 회사(Shenzhen, P.R.China)에서 제조된 키트를 구입하여, 키트의 사용 설명서에서 권장하는 방법대로 사용하였다. 시험관에 ALT 및 AST 기질액 1 mL와 마우스 혈청 시료 0.1 mL를 첨가하고 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0060] 그 결과, ALT 효소 활성은 대조군, TAA 처리군, 오미자추출물+TAA 처리군에서 각각 57.83±13.93, 665±390.4, 292.8±192.7 Unit/L 였으며(도 2a참조), AST 효소 활성은 대조군, TAA 처리군, 오미자추출물+TAA 처리군에서 각각 55.67±11.67, 158±57, 73.5±19.34 Unit/L 였다(도 2b참조). TAA에 의해 증가된 ALT와 AST 효소 활성을 억제하는 오미자 추출물 효능은 통계적으로 유의하였다 (P<0.05, 통계 적 유의성은 분산분석(ANOVA) 후 Sidak's multiple comparison test로 검정). 이러한 실험 결과를 통해, 오미자 추출물이 TAA로 손상된 간 기능을 보호하는 효과가 있다는 사실을 확인하였다.

[0062] <실험예 3> 티오아세트아미드(thioacetamide; TAA)로 간 손상을 유도한 마우스에서 오미자추출물의 간섬유화 억제 효과

[0063] 도 1과 같이 대조군과 TAA 단독 처리군, TAA+오미자 추출물 처리군에서 적출한 간조직을 10% 중성 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 담아 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀조직을 4 μm 크기의 절편으로 제작하였다. 파라핀 조직을 슬라이드에 부착시킨 후, 파라핀 제거와 수화(hydration) 과정을 단계적으로 거친 후, 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin) 염색(H&E staining)으로 간 조직을 염색하였다. 조직 내 콜라겐 섬유 염색은

파라핀 제거와 수화(hydration) 과정 후, Bouing Fluid, Heamatoxylin, Blebrich Xcarlet/Acid Fushsin solution, Phosphomolybdic/Phosphotungstic Acid Solution, Aniline Blue Solution, Acetic Acid Solution을 단계적으로 처리하여 염색하였다. 시리우스레드 염색법(Sirius Red Staining)을 이용하여 콜라겐 섬유 염색을 다시 한번 검증하였다.

[0064] 그 결과, TAA를 처리한 실험군에서 대조군과 비교할 때 간세포가 많이 손상된 것이 관찰되었다. 오미자 추출물을 투여한 실험군에서는 TAA 처리에 의한 간조직 손상이 현저히 감소되었다(도 3 상단 참조). 대조군에서 콜라겐섬유 침착은 거의 발견되지 않았지만, TAA를 처리한 간 조직에서는 중심정맥(central vein)혈관 주변을 중심으로 콜라겐섬유가 많이 침착 되었다(도 3 오른쪽 두번째 줄 참조). 오미자 추출물을 투여한 실험군에서는 TAA 처리에 의해 축적된 콜라겐 섬유가 현저하게 감소된 것이 관찰되었다 (도 3 오른쪽 셋째줄 참조).

[0065] 따라서, 오미자 추출물은 간 손상으로 유도되는 콜라겐섬유의 침착을 억제하여 간 섬유화 과정을 억제하는 효능이 있음을 확인하였다.

[0067] <실험예 4> 티오아세트아미드(thioacetamide; TAA)로 간 손상을 유도한 마우스에서 오미자추출물의 콜라겐 유전자 발현 억제 효과

[0068] 간 섬유화 과정에서 핵심적인 반응은 손상 받은 간세포 또는 쿠퍼세포에서 분비되는 TGF-β 등의 사이토카인에 의해 간 정상세포(HSC)가 활성화되어 콜라겐섬유 합성을 촉진하는 초기 단계이다. 휴지기의 간 정상세포(HSC)는 활성화자를 받으면 근섬유아세포유사 세포(myofibroblast-like cell)로 분화되면서 α-smooth muscle actin(α-SMA)의 발현이 증가된다 (Front Biosci, 7 (2002), pp. d793-d807). 본 발명에서는 간 섬유화 과정에서 핵심적 역할을 하는 간 정상세포(HSC)의 활성을 측정하는 분자 지표로서, 간 정상세포(HSC)에서 발현되는 제1형A1 콜라겐섬유(COL1A1)의 유전자 발현을 면역블롯법으로 측정하였다.

[0069] 도 1과 같이 대조군과 TAA 단독 처리군, TAA+오미자 추출물 처리군에서 적출한 간조직에 20mM HEPES(pH 7.2), 1% Triton X-100, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 10 μg/ml leupeptin, 1mM PMSF가 함유된 세포용해액(cell lysis buffer)을 첨가하여 조직분쇄기(homogenizer, Kinematica AG 회사, Polytron PT2500E)를 이용하여 분쇄하였다. 탁상원심기로 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 수확하고 동량의 단백질이 포함하도록 제조된 시료를 SDS-폴리아크릴아마이드 겔(SDS-polyacrylamide gel) 전기영동을 실시하여 세포에 존재하는 단백질을 분리하였다. 전기영동으로 분리된 단백질을 폴리스틸렌 막 (polystyrene membrane)으로 옮긴 후 표적 단백질을 특이적으로 인지하는 일차 항체(Primary antibody)를 5 시간 동안 반응시키고, 일차항체를 인식할 수 있는 겨자무과산화효소 결합 이차항체(horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody)를 1 시간동안 반응시킨 후, 화학형광감지 시약(Chemiluminescence detection system; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA. 에서 구입)을 이용하여, X-ray 필름에 인화시켜서 변화되는 단백질 양을 분석하였다. α-SMA 와 제1형A1 콜라겐섬유(COL1A1)를 인지하는 일차항체는 Dakocytomation과 Boster회사에서 각각 구입하였다. 이차항체는 Cell Signaling Technology 회사에서 구입하여 사용하였다.

[0070] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, TAA만을 단독 처리한 마우스의 간 조직에서 α-SMA 와 제1형A1 콜라겐섬유(COL1A1)의 단백질 양이 증가하였으나 TAA와 함께 오미자를 투여한 실험군에서는 이 들 단백질 발현양이 TAA 처리군에 비해 현저하게 감소된 것이 관찰되었다. 그러나, 항존유전자(housekeeping gene)인 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 단백질 양은 변하지 않았다. 이러한 결과는 오미자 추출물이 간 정상세포(HSC)의 분화를 억제하고 제1형A1 콜라겐섬유(COL1A1)의 단백질 축적을 감소시키는 효능이 있음을 의미하는 것이다.

[0072] <실험예 5> 간 정상세포(HSC)에서 역전사 증합효소 연쇄반응을 이용한 오미자추출물의 α-SMA와 콜라겐 유전자 mRNA 유전자 발현 억제 효과 분석

[0073] TAA로 손상된 간 조직에서 오미자 추출물에 의한 α-SMA 와 제1형A1 콜라겐섬유(COL1A1)의 단백질 발현 억제 효과가 간 정상세포(HSC)에서 일어나는 현상인지를 조사하였다. 간 조직이 손상되면 간세포(hepatocyte)나 쿠퍼세포에서 TGF β가 분비되어 간 정상세포(HSC)를 활성화시켜 간 섬유화가 촉진된다 (Proc Natl Acad Sci U S A, 96 (1999), pp. 2345-2349).

[0074] 간 정상세포(HSC)에 10 ng/mL TGF β를 처리한 후 오미자 추출물에 의해 α-SMA 와 제1형A1 콜라겐섬유(COL1A1)

mRNA 발현 변화를 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)으로 조사하였다.

[0075] 간 정상세포(HSC)는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하였고, 10% 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, Invitrogen Life Technologies), 항생제(Antibiotic-Antimycotic solution, Invitrogen Life Technologies에서 구입)이 포함된 DMEM(Invitrogen Life Technologies) 배양액을 사용하여 2일에 한 번씩 100-mm 세포배양접시에 1×10^6 의 접종 밀도(seed density)로 계대 하면서 37, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 총 RNA 분리는 TRIzol RNA Isolation Reagents(QIAGEN에서 구입)를 이용하였다. 역전사반응을 위한 이중나선 cDNA 합성은 총 RNA 0.5 µg을 iScript cDNA synthesis kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 구입하여 제조회사에서 권장하는 실험방법대로 합성하고, 이중나선 cDNA 0.0125 µg을 이용하여 PCR을 수행하였다. 유전자 증폭을 위한 프라이머 염기 서열은 이미 알려진 유전자 염기 서열에 근거하여 하기 표 1과 같이 마크로젠 회사(서울, 대한민국)에서 합성하여 사용하였다. 각 실험군의 상대적 양을 비교하기 위한 대조 유전자는 항존 유전자인 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 증폭하였다. PCR 반응은 95, 5분에서 DNA를 변성시킨 후, 94, 1분; 65, 2분; 및 70, 1분간 반응시키는 사이클을 30회 반복하였다. PCR 최종 산물은 1% 아가로오스 겔에서 전기영동하였고, EtBr(ethidium bromide)로 염색하여 확인하였다.

[0076] 그 결과, 도 5a에서와 같이 간 정상세포(HSC)에 10 ng/mL 농도의 TGFβ로 자극을 주면, 6시간 이후부터 α-SMA와 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA의 발현이 증가되는 것을 관찰하였다. 10과 20 µg/mL 농도의 오미자 추출물을 30분 동안 전처리(pre-treatment)하고, 10 ng/mL 농도의 TGFβ를 처리한 후, 12 시간 후에 세포를 수확하여 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 실험을 수행하였다. 그 결과, 도 5b에서와 같이 오미자 추출물은 농도 의존적으로 TGFβ에 의해 증가되는 α-SMA와 제1형A1 콜라겐 유전자(COL1A1) mRNA의 발현을 감소시켰다.

표 1

[0078] 역전사 중합효소 연쇄반응에 사용한 프라이머 염기서열

유전자	서 열	
α-SMA	forward	5'-CTGAGCGTGGCTATTTCCTT-3' (서열번호 1)
	reverse	5'-CTTCTGCATCCTGTGTCAGCAA-3' (서열번호 2)
COL1	forward	5'-GACGCCATCAAGGTCTACTG-3 (서열번호 3)
	reverse	5'-ACGGGAATCCATCGGTCA-3' (서열번호 4)
Actin	forward	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' (서열번호 5)
	reverse	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3' (서열번호 6)

[0080] <실험예 6> 간 정상세포(HSC)에서 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(Quantitative Real-time polymerase chain reaction; QRT-PCR)을 이용한 오미자추출물의 α-SMA와 콜라겐 유전자 mRNA 발현 억제 효과 분석

[0081] 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(Quantitative Real-time polymerase chain reaction; QRT-PCR)은 중합효소 연쇄 반응을 기반으로 한 정량적 실험방법이다. 즉, 타겟 유전자의 증폭 정도와 발현양을 동시에 측정함으로써 정확한 mRNA 양을 측정할 수 있는 방법이다. 상기와 같은 방법으로 cDNA를 합성한 후, TaqMan-iQ supermix kit (Bio-Rad)를 구입하여 정량적 실시간 PCR 실험을 수행하였다. 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA 측정을 위한 TaqMan probe 염기서열은 5'-6-FAM-CATCGTGGCTTCTCTGGTCTCC -BHQ-1-3'을 이용하였고, 대조 유전자인 GAPDH mRNA 측정을 위해 사용한 TaqMan probe 염기서열은 5'-Yakima Yellow-CGTCGCCAGCCGAGCCACATCGC-BHQ-1-3'(서열번호 8) 이었다. 간 정상세포(HSC) 10 ng/mL 농도의 TGFβ로 자극을 주고 0, 6, 12, 24 시간 후에 세포를 수확하여 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 실험을 수행하였다.

[0082] TGFβ 처리 6시간 후에 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA의 발현이 최대치로 증가하였으며, 이때 아무 처리도 하지 않은 대조군에 비해 4.3배 증가되었다. 그 이후, 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA의 발현양은 시간 의존적으로 점차 감소하였다(도 6a참조). 10과 20 µg/mL 농도의 오미자 추출물을 30분 동안 전처리하고, 10 ng/mL 농도의 TGFβ를 처리한 후, 6 시간 후에 세포를 수확하여 정량적 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 그 결과, 10과 20 µg/mL 농도의 오미자 추출물은 TGFβ에 의해 대조군보다 3.8배 증가되는 제1형A1 콜라겐 유

전자 (COL1A1) mRNA의 발현을 각각 2배와 1.5배로 감소시켰다(도 6b참조).

[0083] 따라서, 오미자 추출물은 간 정상세포(HSC)에서 TGFβ 자극에 의해 발현이 증가되는 제1형A1 콜라겐 유전자 (COL1A1) mRNA의 발현을 감소시킨다는 사실을 확인하였다.

[0085] <실험예 7> 섬유화 억제 효능을 보이는 오미자 추출물 분획 분석

[0086] 각 분획층의 간 섬유화 억제 효과를 분석하기 위하여 상기 실험예와 같이 간 정상세포(HSC)에 처리하여, TGFβ 에 의해 증가되는 α-SMA 와 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA 발현의 억제 효과를 조사하였다.

[0087] 그 결과, 도 7에서와 같이 에탄올, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 분획층이 TGFβ에 의해 증가되는 α-SMA 와 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA 발현을 억제시키는 것을 확인하였다. 이 후, 헥산 분획층을 이용하여 유효 성분 분리 실험에 사용하였다.

[0089] <실험예 8> 오미자 헥산 분획층에서 간 섬유화 억제 효능을 보이는 유효 성분 분리

[0090] 오미자 헥산 분획층에서 분리한 Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N, Gomisin O, Angeloylgomisin H, Angeloylgomisin O 의 6종 유도체의 감 섬유화 억제 효과를 α-SMA 와 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA 발현 억제 효과로 판정하였다. 고미신 유도체인 Gomisin D와 Angeloylgomisin H, Butanoloylgomisin O는 대조군으로 사용하였다.

[0091] 상기 실험예와 같이 간 정상세포(HSC)에 각종 고미신 유도체를 처리하고, TGFβ에 의해 증가되는 α-SMA 와 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA 발현의 억제 효과를 조사하였다. 그 결과, 도 10에서와 같이 오미자 헥산층에 존재하는 6 종의 고미신 유도체 모두가 TGFβ에 의해 증가되는 α-SMA 와 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA 발현을 억제시키는 것을 발견하였다.

[0093] 한편, 본 발명에 따른 상기 고미신 G 및/또는 고미신 O는 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 상기 고미신 G 및/또는 고미신 O는 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0095] <제제예 1> 산제의 제조

[0096] 고미신 G 및/또는 고미신 O 2 g

[0097] 유당 1 g

[0098] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0100] <제제예 2> 정제의 제조

[0101] 고미신 G 및/또는 고미신 O 100 mg

[0102] 옥수수전분 100 mg

[0103] 유당 100 mg

[0104] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0105] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0107] <제제예 3> 캡슐제의 제조

[0108] 고미신 G 및/또는 고미신 O 100 mg

- [0109] 옥수수전분 100 mg
- [0110] 유당 100 mg
- [0111] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0112] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0114] <제제예 4> 주사제의 제조

- [0115] 고미신 G 및/또는 고미신 O 100 mg
- [0116] 만니톨 180 mg
- [0117] Na₂HPO₄ · 2H₂O 26 mg
- [0118] 증류수 2974 mg
- [0119] 통상적인 주사제의 제조방법에 따라, 상기 성분들을 제시된 함량으로 함유시켜 주사제를 제조하였다.

[0121] 건강식품의 제조예

- [0122] 본 발명에 따른 고미신 G 및/또는 고미신 O는 목적에 따라 여러 형태의 건강식품으로 제조 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 고미신 G 및/또는 고미신 O를 활성성분으로 함유시킨 몇몇 건강식품의 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0124] <건강식품 제조예 1> 유제품(dairy products)의 제조

- [0125] 본 발명의 고미신 G 및/또는 고미신 O를 0.01-1 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0127] <건강식품 제조예 2> 선식의 제조

- [0128] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 본 발명의 고미신 G 및/또는 고미신 O를 진공 농축기에서 감압농축하고 건조분말을 얻었다. 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 고미신 G 및/또는 고미신 O의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

- [0129] 곡물류(현미 34 중량부, 율무 19 중량부, 보리 20 중량부),
- [0130] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
- [0131] 고미신 G 및/또는 고미신 O (2 중량부),
- [0132] 영지(1.5 중량부), 및
- [0133] 지황(1.5 중량부).

[0135] 건강기능식품의 제조예

- [0136] 본 발명에 따른 고미신 G 및/또는 고미신 O는 목적에 따라 여러 형태의 건강기능식품으로 제조 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 고미신 G 및/또는 고미신 O를 활성성분으로 함유시킨 몇몇 건강기능식품의 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0138] <건강기능식품 제조예 1> 건강기능식품의 제조

[0139] 고미신 G 및/또는 고미신 O 100 mg

[0140] 비타민 혼합물 적량

[0141] 비타민 A 아세테이트 70 µg

[0142] 비타민 E 1.0 mg

[0143] 비타민 B1 0.13 mg

[0144] 비타민 B2 0.15 mg

[0145] 비타민 B6 0.5 mg

[0146] 비타민 B12 0.2 µg

[0147] 비타민 C 10 mg

[0148] 비오틴 10 µg

[0149] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0150] 엽산 50 µg

[0151] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0152] 무기질 혼합물 적량

[0153] 황산제1철 1.75 mg

[0154] 산화아연 0.82 mg

[0155] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0156] 제1인산칼륨 15 mg

[0157] 제2인산칼슘 55 mg

[0158] 구연산칼륨 90 mg

[0159] 탄산칼슘 100 mg

[0160] 염화마그네슘 24.8 mg

[0161] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능성 식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능성 식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능성 식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0163] <건강기능식품 제조예 2> 건강 기능 음료의 제조

[0164] 고미신 G 및/또는 고미신 O 100 mg

[0165] 구연산 100 mg

[0166] 올리고당 100 mg

[0167] 매실농축액 2 mg

[0168] 타우린 100 mg

[0169] 정제수를 가하여 전체 500 mL

[0170] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요

계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

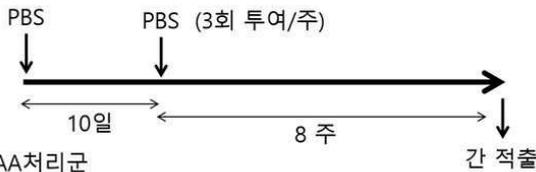
[0172]

이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1

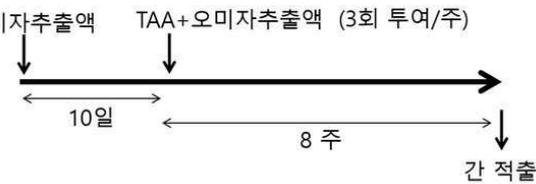
(1) 음성대조군



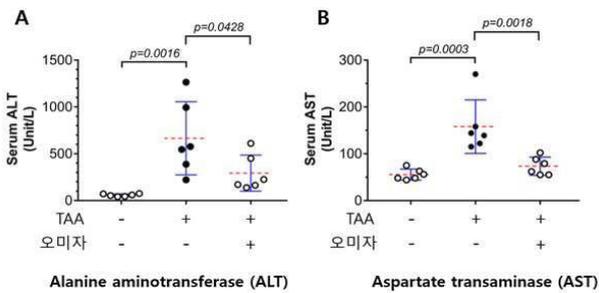
(2) TAA처리군



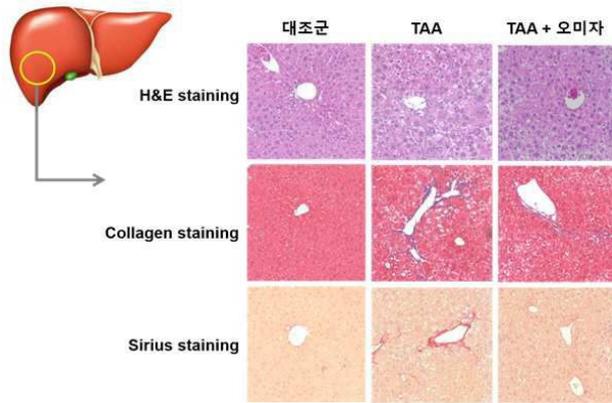
(3) 오미자+TAA처리군



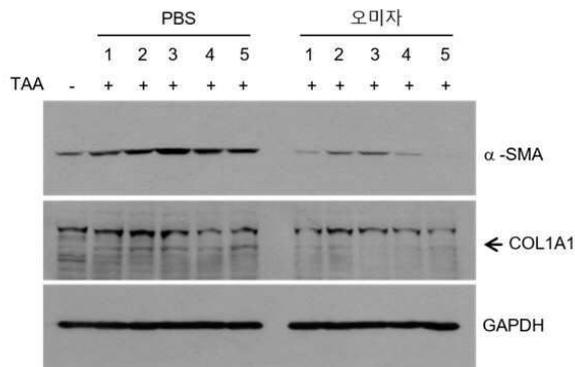
도면2



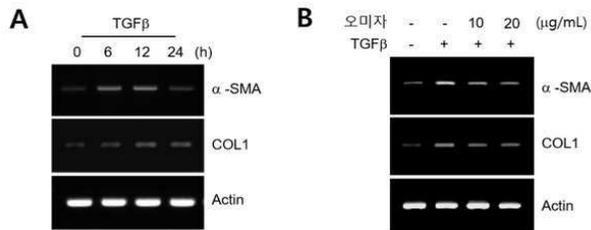
도면3



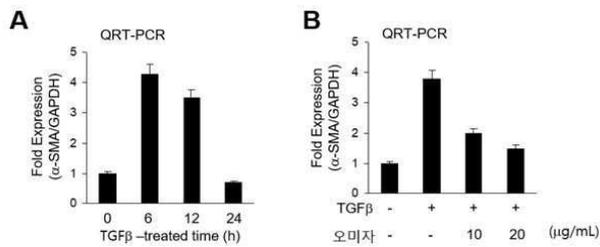
도면4



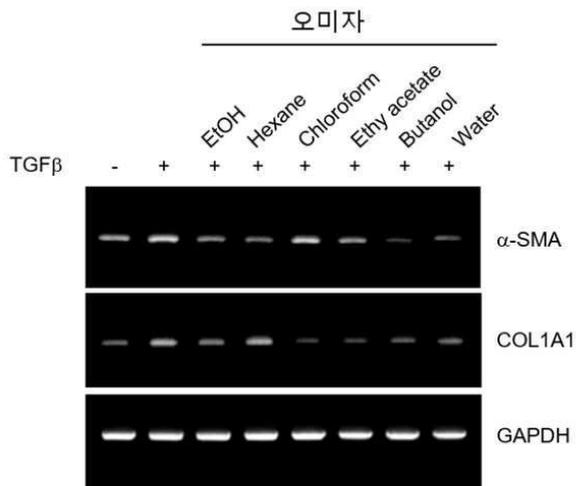
도면5



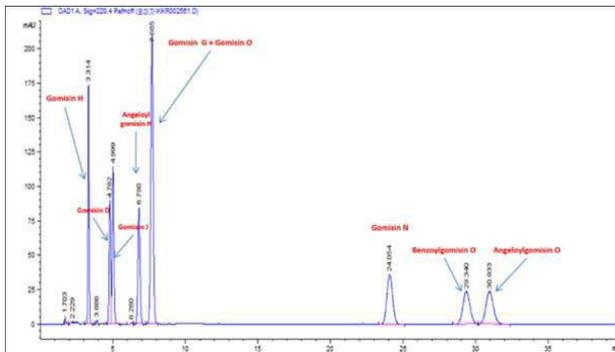
도면6



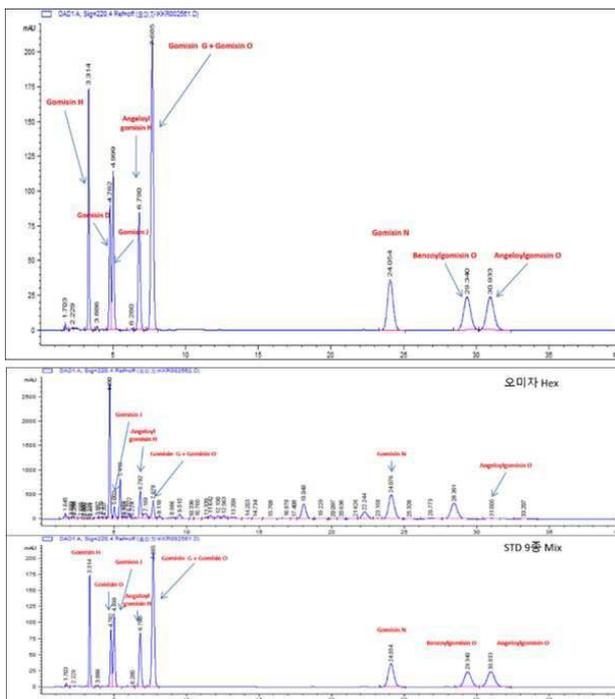
도면7



도면8



도면9



도면10

