



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2017년12월19일  
(11) 등록번호 10-1810795  
(24) 등록일자 2017년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/28 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 36/28 (2013.01)  
A23L 33/105 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2016-0165325  
(22) 출원일자 2016년12월06일  
심사청구일자 2016년12월06일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020040065498 A  
KR1020050050633 A  
KR1020120117115 A

(73) 특허권자  
건국대학교 글로컬산학협력단  
충청북도 충주시 충원대로 268 (단월동, 건국대학교글로벌캠퍼스)  
(72) 발명자  
송민동  
충청북도 충주시 연수동산로 38, 202동 1602호 (연수동, 연수세영리첼 2단지)  
신광모  
대구광역시 수성구 천을로 180, 105동 1601호 (매호동, 동서1차아파트)  
김진섭  
경기도 포천시 내촌면 소리개길 17  
(74) 대리인  
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 8 항

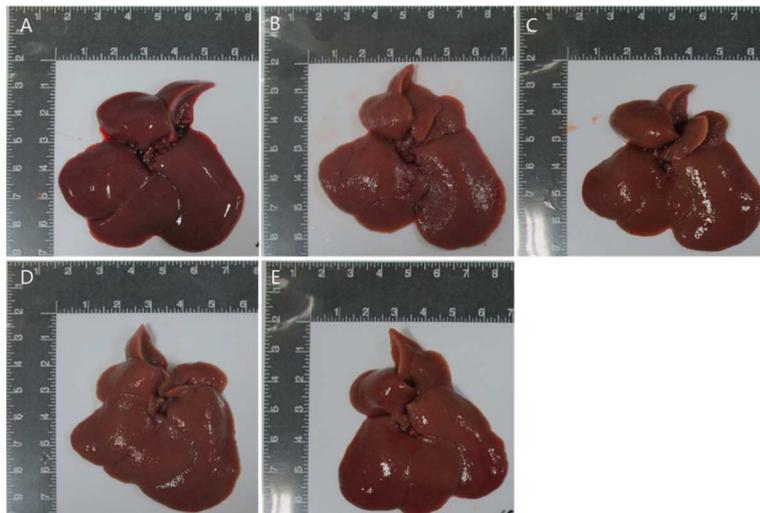
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 **자란 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유화 또는 간경화 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 자란 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유화 또는 간경화 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 HSC-T6 세포주와 간성상세포에서의 증가된 세포사멸, 콜라겐 감소 및 ECM 축적의 감소를 통해 뛰어난 간보호 효과를 나타낸다. 또한, TAA로 유도된 간섬유화 동물 모델에서 혈청 AST 및 ALT를 개선시키고, 총 GSH 수준을 정상 수준으로 회복시키며, 하이드록시프롤린의 수준 감소 및 간 섬유화와 연관된 유전자인 TGF-β, α-SMA 및 Col1a2의 발현을 하향 조절하여 우수한 항섬유화 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 조성물은 간 기능 개선 또는 간섬유화 또는 간경화 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

**대표도 - 도6**



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

Y10S 514/893 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016A0190320

부처명 건국대학교

연구관리전문기관 건국대학교

연구사업명 학술진흥연구비

연구과제명 자란 에탄올 추출물을 이용한 간 섬유화 억제 및 간 항상화능에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 건국대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

공지예외적용 : 있음

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

자완 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유화 또는 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 자완 추출물은 자완을 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 알코올 및 물로 이루어진 군에서 선택한 1종 이상의 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 상기 추출 용매는 70% 에탄올인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 자완 추출물은 간성상세포의 활성화 및 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

**청구항 5**

자완 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유화 또는 간경화 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 자완 추출물은 자완을 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 알코올 및 물로 이루어진 군에서 선택한 1종 이상의 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

**청구항 7**

제5항에 있어서, 상기 추출 용매는 70% 에탄올인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

**청구항 8**

제5항에 있어서, 상기 자완 추출물은 간성상세포의 활성화 및 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 자완 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유화 또는 간경화 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자완 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유화 또는 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및/또는 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 간질환은 알코올, 각종 약물, 독성화학물질, B형 및 C형 간염 바이러스, 담즙정체, 자가면역 등과 같은 다양한 원인에 의해 발생하며, 보통 지방간을 거쳐 간염, 간섬유화 및 간경변으로 진행된다. 지방간은 그 자체로 병적인 상태는 아니며, 원인물질이 제거되면 자연히 회복되는 가역적인 증상이다. 그러나, 간조직에 지방이 과도하게 축적된 상태가 지속적으로 유지되면 지방간염이 발생하고, 그 결과 간세포 괴사와 재생이 반복적으로 일어나며, 이 과정에서 섬유상의 세포외 기질(extracellular matrix: ECM)의 증가 및 축적으로 인하여 간의 섬유화가 진행된다.

[0003] 간 섬유화는 여전히 전세계 인구의 중요한 질환 중 하나이다. 간 섬유화는 콜라겐, 피브로넥틴 및 라미닌과 같

은 세포외 기질 (ECM) 단백질의 축적과 함께 간의 만성적인 손상의 결과로, 대부분의 종류의 만성적인 질환의 특성은 또한 지속적인 염증, 상처 조직의 형성, 조직 구조 변화 및 장기 부전과 함께 반복적인 간 손상으로 야기된다. 간성상세포(HSC)는 간 섬유화에서 핵심적인 역할을 하는 세포로 주목되며, 이는 소섬유 및 비-미소섬유 기질 단백질의 주요 근원으로서 섬유화의 중심 과정이다. 휴지 상태의 HSC는 활성화된 상태의 HSC 보다 적은 ECM 단백질을 생산하지만, 반복되는 손상으로 휴지 상태의 HSC가 활성화 상태로 변경되면, 증식하여 활성화로 일컬어지는 과정인 근섬유아세포-유사 표현형으로 변형된다.

[0004] 활성화된 HSC 기능은 과도한 ECM의 축적을 야기하고, 정상적인 구조의 간을 파괴하며, 이는 간에 병리생리학적 으로 손상을 입힌다. ECM 단백질의 과발현은 결국 간 부전, 섬유화, 간경변 또는 HSC 활성화에 의한 암을 유발 한다. 간 조직에서 축적 및 과발현을 포함하는 ECM 단백질의 비정상적인 상태는 후기 간질환 또는 장애에서 과 도한 간기질을 야기한다. 이러한 상태는 진행성 간 질환동안 가장 중요한 단계이다. 따라서, 간 섬유화의 예방 및 억제는 만성적인 간질환을 개선하는데 매우 중요하다.

[0005] 수세기 동안 서구, 아시아 및 다른 국가들에서 간질환의 치료에 한방약재와 천연물을 사용해왔다. 많은 인자들 이 한약재의 매력에 기여하며, 한약재의 지지자들은 약초가 질환을 치료하고 예방할 수 있다는 것을 주장한다.

[0006] 한편, 자완(*Aster tataricus Linne fil*)은 개미취의 뿌리를 말하며, 주로 중국, 일본 및 한국에 분포한다. 약리 효과로는 거담, 진해, 항균, 항암작용이 있는 것으로 보고된 바 있다. 주요 성분은 테페노이드 (terpenoids), 스테롤 (sterols), 플라보노이드 (flavonoids), 및 사이클로펩티드 (cyclopeptides)이다. 또한, 한국공개특허 제10-2004-0065498호에는 자완이 알러지성 피부염 및 피부 가려움 완화 효과를 갖는 천연조성물로 개시되어 있 고, 한국등록특허 제10-0516194호에는 항종양 활성을 갖는 생약 추출물에 자완이 개시되어 있으며, 한국공개특 허 제10-2012-0117115호에는 자완 추출물을 함유하는 모발 성장 촉진 또는 탈모 방지용 조성물에 관해 개시되어 있다.

[0007] 그러나, 최근까지 자완의 항섬유증 효과에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 간성 상세포를 이용한 시험관 내(*in vitro*) 시스템 및 티오아세트아미드 (Thioacetamide, TAA)로 유도된 간 섬유증 래트 모델의 생체 내(*in vivo*)에서 자완 추출물의 항-섬유증 효과에 대해 연구하던 중 자완 추출물이 간섬유화 억제 및 간 보호효과를 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로, 본 발명의 목적은 자완 추출물을 이용하여 간섬유화 또는 간경화 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다. 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이 상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하 게 이해될 수 있을 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 자완 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유화 또는 간경화 예방 또 는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 자완 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유화 또는 간경화 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 자완 추출물은 자완을 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 알코올 및 물로 이루어진 균에 서 선택한 1종 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 추출 용매는 70% 에탄올일 수 있다.

[0013] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 자완 추출물은 간성상세포의 활성화 및 증식을 억제할 수 있다.

**발명의 효과**

[0014] 본 발명의 자완 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 HSC-T6 세포주와 간성상세포에서의 증가된 세포사멸, 콜라겐 감소 및 ECM 축적의 감소를 통해 뛰어난 간보호 효과를 나타낸다. 또한, TAA로 유도된 간섬유화 동물 모

텔에서 혈청 AST 및 ALT를 개선시키고, 총 GSH 수준을 정상 수준으로 회복시키며, 하이드록시프롤린의 수준 감소 및 간 섬유화와 연관된 유전자인 TGF-β, α-SMA 및 Col1a2의 발현을 하향 조절하여 우수한 항섬유화 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 조성물은 간 기능 개선 또는 간섬유화 또는 간경화 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

[0015] 아울러, 본 발명의 자원 추출물은 천연물 소재로 인체에 안전하고 부작용이 없으며, 원료 가격이 저렴하여 경제성이 매우 우수하다.

**도면의 간단한 설명**

[0016] 도 1은 자원 에탄올 추출물 처리에 따른 Chang 세포와 HSC-T6 세포의 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.  
 도 2는 자원 추출물 처리에 따라 활성화된 HSC의 형태학적 변화를 현미경으로 관찰한 사진이다. 사진에서 화살표는 HSC를 나타낸다.

도 3은 자원 추출물로 처리한 HSC-T6 세포의 세포 주기를 분석한 결과로, (A)는 히스토그램, (B)는 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 자원 추출물로 처리한 HSC-T6 세포의 세포 사멸을 분석한 결과로, (A)는 히스토그램, (B)는 그래프로 나타낸 것이다. 데이터 값은 평균 ±SEM으로 나타냈다 (대조군과 비교하여 \*P<0.05, \*\*P<0.01).

도 5는 간섬유화 동물 모델 확립 과정을 모식도로 나타낸 것이다.

도 6은 도 5의 간섬유화 동물 모델로부터 적출한 간의 사진을 나타낸 것으로, A는 정상군, B는 TAA 처리군, C는 실리마린으로 처리한 양성 대조군, D는 0.5 mg/kg의 자원 추출물을 처리한 ATE 500군, E는 0.1 mg/kg의 자원 추출물을 처리한 ATE 100군을 나타낸다.

도 7은 자원 추출물 처리에 따른 TAA-유도 간섬유화 래트에서의 혈청 AST(A) 및 ALT(B) 수준 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 자원 추출물 처리에 따른 TAA-유도 간섬유화 래트 간조직에서의 총 GSH 함량 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 자원 추출물 처리에 따른 TAA-유도 간섬유화 래트 간에서의 총 하이드록시프롤린 수준 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 10은 H&E 염색법으로 염색된 래트의 간을 보여주는 사진으로, A는 정상군, B는 TAA 처리군, C는 실리마린으로 처리한 양성 대조군, D는 0.5 mg/kg의 자원 추출물을 처리한 ATE 500군, E는 0.1 mg/kg의 자원 추출물을 처리한 ATE 100군을 나타낸다.

도 11(A)는 메이슨 트릭롬 염색법으로 염색된 래트의 간을 보여주는 사진이고, A는 정상군, B는 TAA 처리군, C는 실리마린으로 처리한 양성 대조군, D는 0.5 mg/kg의 자원 추출물을 처리한 ATE 500군, E는 0.1 mg/kg의 자원 추출물을 처리한 ATE 100군을 나타내고, 도 10(B)는 섬유증 영역의 비율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 12는 실시간 PCR을 이용하여 간조직에서 섬유증 관련 유전자 발현의 측정 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 데이터 값은 대조군에 대하여 정규화된 폴드값으로 나타냈다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0017] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명한다.

[0018] 상술한 바와 같이, 최근까지 자원의 항섬유증 효과에 대해서는 밝혀진 바가 없었다. 이러한 배경 하에 본 발명자들은 간성상세포를 이용한 시험관 내(*in vitro*) 시스템 및 TAA로 유도된 간 섬유증 래트 모델의 생체 내(*in vivo*)에서 자원 추출물의 항-섬유증 효과에 대해 연구하던 중 자원 추출물이 간섬유화 억제 및 간 보호효과를 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0019] 이에 본 발명은 자원 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유화 또는 간경화 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공함으로써 상술한 문제의 해결을 모색하였다. 본 발명의 자원 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 HSC-T6 세포주와 간성상세포에서의 증가된 세포사멸, 콜라겐 감소 및 ECM 축적의 감소를 통해 뛰어난 간보호 효과를 나타낸다. 또한, TAA로 유도된 간섬유화 동물 모델에서 혈청 AST 및 ALT를 개선시키고, 총 GSH 수준을 정

상 수준으로 회복시키며, 하이드록시프롤린의 수준 감소 및 간 섬유화와 연관된 유전자인 TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA 및 Col1a2의 발현을 하향 조절하여 우수한 항섬유화 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 조성물은 간 기능 개선 또는 간섬유화 또는 간경화 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

- [0020] 본 발명에서 사용되는 용어는 다음과 같이 정의된다.
- [0021] 용어 “약학적 조성물(pharmaceutical composition)”은 본 발명의 자란 추출물에 희석제 또는 담체와 같은 다른 화학 성분들의 혼합물을 의미한다.
- [0022] 용어 “담체(carrier)”는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.
- [0023] 용어 “희석제(diluent)”는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다.
- [0024] 용어 “치료”는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화(즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로), 검출가능하거나 또는 검출되지 않거나의 여부를 포함한다. 또한, “치료”는 치료를 받지 않았을 때 예상되는 생존율과 비교하여 생존율을 늘이는 것을 의미할 수도 있다. “치료”는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방조치 방법 모두를 가리킨다. 상기 치료들은 예방되는 장애뿐만 아니라 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다. 질병을 “완화(alleviating)”하는 것은 치료를 하지 않은 경우와 비교하여, 질병상태의 범위 및/또는 바람직하지 않은 임상적 징후가 감소되거나 및/또는 진행의 시간적 추이(time course)가 늦춰지거나 길어지는 것을 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0026] 본 발명은 자란 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섬유화 또는 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 자란 추출물은 통상적으로 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다:
- [0028] 1) 자란에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0029] 2) 상기 1) 단계의 추출물을 여과하는 단계; 및
- [0030] 3) 상기 2) 단계의 여과된 추출물을 감압농축한 후 건조하여 자란 추출물을 제조하는 단계.
- [0031] 상기 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 저급 알코올, 바람직하게는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>2</sub>의 저급 알코올을 사용할 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니며, 식물체에서 유효성분을 효과적으로 추출할 수 있는 용매라면 특별한 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>2</sub>의 저급 알코올로는 30% 내지 100% 메탄올 또는 에탄올을 사용하는 것이 좋다. 본 발명의 일실시예에서는 70% 에탄올을 용매로 하여 자란 추출물을 제조하였다.
- [0032] 추출방법으로는 교반추출, 감압고온추출, 열탕추출, 환류추출, 열수추출, 냉침추출, 상온추출, 초음파 추출 또는 증기추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매는 자란 중량의 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 20℃ 내지 120℃인 것이 바람직하고, 추출방법에 따라 온도를 적절하게 변경할 수 있다. 추출시간은 2시간 내지 72시간인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 아울러, 추출회수는 2 내지 5회인 것이 바람직하고, 3회 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0033] 상기 방법에 있어서, 3) 단계의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않고, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 자원 추출물은 정상 간세포주에서는 크게 독성을 나타내지 않고 (도 1), HSC-T6와 primary-HSC에서 세포 억제 및 감소능을 나타내며 (도 2 및 4), TAA-유도 간섬유화 동물 모델에서 혈청 AST 및 ALT를 개선시키고 (도 7), 총 GSH 수준을 정상 수준으로 회복시키며 (도 8), 하이드록시프로콜린의 수준 감소 (도 9) 및 간 섬유화와 연관된 유전자인 TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA 및 Col1a2의 발현을 하향 조절하여 우수한 항섬유화 효과를 나타낸다 (도 9). 따라서, 본 발명의 조성물은 간 기능 개선 또는 간섬유화 또는 간경화 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 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.
- [0037] 본 발명의 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스(lactose), 덱스트로스, 수크로스(sucrose), 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0038] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0039] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 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 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0040] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 간 질환에 유효한 다른 성분들을 추가로 함유할 수 있다. 이러한 유효성분의 예로는 천연물질에서 유래한 실리마린이나 우르소테스옥시콜린산(ursodesoxycholic acid, UDCA)과 같은 담즙산 등을 들 수 있다. 그러나, 실리마린이나 UDCA의 함유는 자원 추출물을 주성분으로 하는 약학적 조성물의 한 예에 해당할 뿐이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 조성물 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 무엇보다도, 치료대상 개체의 상태, 치료 대상 질환의 특정한 카테고리 또는 종류, 투여 경로, 사용되는 치료제의 속성, 및 상기 특정한 치료제에 대한 종양의 감수성에 의존적일 것이다.
- [0043] 본 발명의 약학적 조성물은 개별적으로 예방제 또는 치료제로서 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0044] 상기 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0045] 특히, 임의의 의학적으로 적합한 방법, 예를 들면, 정상적인 정맥내 투여 또는 동맥내 투여, 뇌척수액으로의 주사에 의해 투여될 수 있다. 일부 경우에, 피내(intradermal) 투여, 강내(intracavity) 투여, 경막내(intrathecal) 투여, 종양 또는 상기 종양에 공급하는 동맥으로의 직접 투여가 유리하다. 종양 또는 그의 일부가 이전에 외과수술에 의해 제거된 경우, 치료제는 직접 주사 또는 미리 이식된 저장부(reservoir)를 통해 종양 부위(및 특히, 종양 부위에 있는 포위된 강(enclosed cavity) 또는 "절제 강(resection cavity)")로 투여될 수

있다.

- [0046] 본 발명의 조성물은 체내에서 활성성분의 흡수도, 배설속도, 환자의 연령 및 체중, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 성인에게 1일 1~500mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 이렇게 제형화된 단위투여형 제제는 필요에 따라 일정시간 간격으로 수회 투여할 수 있다.
- [0047] 본 발명은 또한, 자원 추출물을 유효성분으로 함유하는 간섭유화 또는 간경화 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0048] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 자원 추출물은 본 발명의 약학적 조성물에 함유된 자원 추출물과 동일한 방법으로 제조될 수 있으며, 제조된 추출물의 효과 또한 동일하므로 이에 대한 설명은 생략한다.
- [0049] 상기 건강기능식품은 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 천연 과일 주스 및 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 건강 음료 조성물은 자원 추출물을 함유하는 것 외에는 액체성분에는 특별한 제한은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, “식품첨가물”로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0052] 상기 “식품첨가물공전”에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.
- [0053] 상기 외에 본 발명의 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. 그밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0054] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 자원 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 상기 건강기능식품에 포함된 자원 추출물의 유효용량은 상기 약학 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있고, 유효성분의 혼합양은 예방 또는 치료적 처치 등의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다.
- [0055] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하지만, 하기의 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

**실시예 1**

- [0056] **1-1. 자원 추출물의 제조**
- [0057] 시판되는 자원을 믹서기를 이용하여 가루 형태로 분쇄하고 에탄올 70% (에탄올 1000ml + 자원 500g)을 이용하여 자원을 3일(72 시간)동안 추출을 하였다. 추출된 자원 필터링 후 농축기를 이용하여, 농축을 한 뒤, 동결 건조기를 이용하여 -70℃, 7일간 동결 건조를 하였다. 동결 건조된 자원 추출물을 랜덤으로 이용하여 실험에 사용하였다. 동결 건조된 자원은 31.51g으로 추출 수율은 15.7%이다.
- [0058] **1-2. 시약 및 화합물**
- [0059] 티오아세트아미드 (TAA) 및 실리마린, 하이드록실-프롤린, p-디메틸아미노벤즈알데히드, 1,1,3,3-테트라에톡시프로판 (TEP), 클로라민-T, 5,5-디티오비스-2-니트로벤조산 (DTNB), 환원된 글루타티온, 글루타티온 환원효소

(GSH-red), 글루타티온 과산화효소 (GSH-px),  $\beta$ -니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드인산 및 이의 환원된 형태 ( $\beta$ -NADPH)는 Sigma (세인트루이스, 미주리, 미국)에서 구입하였고, 과염소산은 GFS chemical Co. (콜럼버스, 오하이오, 미국)에서 입수하였다. 모든 식물체는 제천한방약초 (제천, 대한민국)에서 구입하였다.

**[0060] 1-3. 세포주**

**[0061]** 불멸화된 간성상세포주 (HSC-T6)는 대전대학교 한방병원의 손창규 교수로부터 제공받았으며, 정상 간 세포주인 Chang liver cell line은 ATCC (ATCC<sup>®</sup> CCL-13<sup>™</sup> 머메서스, 버지니아, 미국)로부터 구매하였다.

**실시예 2**

**[0062] 2-1. 세포 배양**

**[0063]** Chang 간세포주를 정상 간세포 조직으로부터 유래된 정상 인간 세포주로 사용하였다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 습윤 대기에서 10% 소태아혈청 (FBS, GIBCO, 미국), 1% 항생제-항진균약 (Invitrogen, 미국)으로 보충된 최소 필수 배지 (EMEM, 깁코, 미국)에 배양하였다.

**[0064]** 불멸화된 간성상세포주 (HSC-T6)를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 습윤 대기에서 5% FBS, 1% 항생제-항진균약으로 보충된 DMEM에 배양하였다.

**[0065] 2-2. 세포 생존율 어세이**

**[0066]** 세포 생존율 어세이는 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐-2H-테트라졸리움 브로마이드 (MTT) 방법으로 평가하였다. 96-웰 플레이트에서, Chang 세포 (7x10<sup>5</sup> 세포/ml)와 HSC-T6 (6x10<sup>5</sup> 세포/ml)를 상기 기재된 바와 같이 보충된 DMEM 배지에 배양하였다. 시료 물질을 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 습도의 대기에 37°C에서 24시간 동안 다양한 농도 (0, 0.1, 0.5 및 1 mg/ml)로 평가하였다. 그 다음 세포를 3시간 동안 0.5mg/ml MTT (SIGMA, 미국)와 함께 배양하였고, 반응을 디메틸설폭사이드 (DMSO, JUNSEL, 일본)를 첨가하여 정지시켰다. ELISA 판독기를 사용하여 540 nm에서 결과를 측정하였다. 대조군 세포의 생존율을 100%의 대조값 (control value)으로 사용하였다.

**[0067]** 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 자란 에탄올 추출물은 1 mg/ml 이상의 농도에서 독성을 보였으며 정상 간세포주에서는 독성을 크게 확인할 수 없었다. 상기와 같은 결과를 통해, 자란 에탄올 추출물은 정상 간세포에서는 거의 독성을 나타내지 않으며 간성상세포주에서 독성을 보이는 것을 확인 하였다. 따라서, 이후의 실험에서는 0.5 mg/ml의 자란 에탄올 추출물을 이용하여 실험을 수행 하였다.

**실시예 3**

**[0068] Primary HSC의 형태 확인**

**[0069]** HSC를 프로테아제, 콜라게나아제, 디엔에이즈 관류, 및 단일 단계 히스토젠즈 구배 (single-step Histogenz gradient)를 이용하여 (in situ) 7주령의 수컷 SD 래트로부터 분리하였다.

**[0070]** 구체적으로, CO<sub>2</sub>를 이용하여 래트를 마취시키고 복부를 개복한 후, 18 가우지 카테터를 간문맥에 삽관하여 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>가 포함되지 않은 HBSS (Hank's balanced salt solution) 200 ml를 관류 후, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>가 포함된 HBSS와 0.015%(W/V) 콜라게나아제를 포함한 용액 60 ml를 관류한 뒤 간 적출 후 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>가 없는 HBSS 10 ml를 넣은 50 ml 튜브에 넣고 적출한 간을 세척하였다.

**[0071]** 세척한 간을 프로나아제 6ml, 콜라게나아제 6ml 및 DNase 6ml를 넣은 50 ml 튜브에 넣고 활성화를 위해 워터 베스에서 10분간 보관하였다. 소화된 간을 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>가 포함된 HBSS에 10mg DNase TYPE II를 포함한 용액 36ml에 넣고 간막을 벗겨냈다. 100π 크기의 디쉬 두 개를 이용하여 각각 17ml를 사용하였다. 간세포가 유리되어 나온 용액을 거르고 다시 0.45 나일론 메쉬를 사용하여 걸러냈다. 걸러낸 용액을 50ml 튜브에 담고 50g에서 1분 동안 원심분리하고, 100π 크기의 디쉬에 다시 한번 DNase Type II 를 포함한 용액 10ml를 이용하여 잔여물을 모아준 뒤 다시 한번 50g에서 1분 동안 원심분리 하였다.

**[0072]** 원심분리 후, 상층액을 새 튜브에 덜어내고 450g에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 제거하고 모아진 간세포를 0.3% BSA가 포함된 차가운 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>가 포함된 HBSS 10ml에 다시 현탁하여 450g에서 10분 동안 원심분리 하였

다. 상층액을 제거한 후, 0.3% BSA ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 가 포함되지 않은 HBSS) 9.5 ml와 28.7% Nycodenz ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 가 포함되지 않은 HBSS) 10 ml를 이용하여 아래층과 잘 섞어주었다. 0.3% BSA ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 가 포함되지 않은 HBSS) 6 ml를 상기 세포액 위에 매우 천천히 아래층과 섞이지 않도록 조심스럽게 흘려주었다. 1400g 에서 20분 동안 원심 분리 하였다. Nycodenz 위층과 BSA층 사이의 뿌옇게 보이는 부분에서 HSC 6 ml를 추출한 후 1% 항생제와 10% FBS가 포함된 DMEM 배지 5ml을 이용하여 1200g에서 3분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 흡입한 후 HSC를 DMEM 200 $\mu\text{l}$ 을 이용하여 잘 풀어주었다. 6웰 플레이트에 DMEM 2ml, primary HSC 100 $\mu\text{l}$ 와 섞어서 총 2100ml를 두 개의 흡에 각각 균주하고 5%  $\text{CO}_2$ 가 공급되는 배양기에서 7일간 배양하였다. 7일째에 자란 추출물 0.5 mg/ml를 24 시간 동안 처리한 후 HSC의 형태를 관찰하였다.

[0073] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 자란 추출물 처리 전에는 HSC의 콜라겐과 피브로넥틴이 많이 관찰되었으나, 자란 추출물 처리 후에는 콜라겐이 감소하고 세포가 분해된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 자란 추출물이 간성상세포주인 HSC-T6와 primary HSC에서 세포 억제 및 감소능을 나타냄을 확인 할 수 있었다.

#### 실시예 4

##### [0074] 4-1. 세포 주기 분석

[0075] HSC-T6 세포 ( $15 \times 10^5$  세포/웰)를 실시예 2-1에 기재된 바와 같이 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 시료 물질을 5%  $\text{CO}_2$  및 95% 습도의 대기에 37 $^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 각각 0.1 및 0.5 mg/ml 농도의 자란 에탄올 추출물로 평가하였다. 24시간 후, 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 1 ml의 차가운 프로피디움 요오드화물 (Propidium iodide, PI) 용액 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  I PI 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A)에 현탁시켰다. 그 다음, 세포를 빛을 차단한 후 30분 동안 상온에 보관하고 유세포 분석기로 분석하였다. 실리마린 처리군은 양성 대조군으로 사용하였다.

[0076] 그 결과, 도 3의 (A) 및 (B)에 나타난 바와 같이 0.1 mg/ml의 자란 추출물을 단독으로 처리한 ATE 100군의 경우, 아무것도 처리하지 않은 NT군과 차이가 없었으나, 0.5 mg/ml의 자란 추출물을 처리한 ATE 500군의 경우, NT군과 비교하여 sub-G1기에서 2.58%의 세포가 나타났다(도 3(B)). G0기와 S기가 미미한 차이를 보인 것을 확인 하고 세포사멸 (apoptosis)을 유도하는 자란 추출물의 능력을 확인하기 위해 아넥신 V 및 PI 이중 염색을 수행 하였다.

##### [0077] 4-2. 세포사멸 분석

[0078] HSC-T6 세포를 실리마린 (0.05 mg/ml) 또는 자란 추출물 (0.1 및 0.5 mg/ml)로 24시간 동안 처리한 후, 세포사멸을 아넥신 V-FITC 및 PI (FICS 아넥신 V 세포사멸 검출 키트 I, BD Biosciences, 미국)로 식별하였다. 검출 과정은 제조업자의 지시에 따라 수행하였다. 데이터 분석은 CellQuest software (Beckton Dickinson)로 수행하였고, 이는 특이적인 집단만 평가하는 것을 가능하게 한다. 게이트에 의한 개별화는 크기 (FSC), 입상도 (SSC), 및 형광 (FL) 파라미터에 따랐다. 초기 사멸 세포 (아넥신 V<sup>+</sup> 및 PI<sup>-</sup>) 및 후기 사멸 세포 (아넥신 V<sup>+</sup> 및 PI<sup>+</sup>)를 세포사 측정에 포함시켰다.

[0079] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 자란 추출물 0.5 mg/ml는 NT군과 비교하여 약 2배의 세포사멸능을 나타내었다. 이를 통해 자란 추출물이 HSC-T6 세포를 감소 및 억제시키고 세포 주기에서의 간섭을 통해 세포사멸을 유도 한다는 것을 확인하였다.

#### 실시예 5

##### [0080] 5-1. 실험 동물 및 실험 설계

[0081] 30마리의 무특이 병원체 Sprague Dawley (SD) 수컷 래트 (6주령, 190-210g)를 오리엔트 바이오(경기도, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. 실험 동물을 온도 23  $\pm$  3 $^\circ\text{C}$ , 상대 습도 50  $\pm$  20% 및 12시간/12시간의 명암 주기의 조절된 조건 하에 통상적인 케이지에 수용하였다. 적응 일주일 후, 래트를 각각 6마리씩 5개의 그룹으로 무작위로 다음과 같이 나누었다: 정상군, TAA군 (TAA만 처리), ATE 500군 (TAA 및 500 mg/kg의 자란 추출물 처리), ATE 100군 (TAA 및 100 mg/kg의 자란 추출물 처리) 및 양성 대조군 (TAA 및 50 mg/kg의 실리마린 처리).

[0082] 도 5에 나타난 바와 같이, 간섭유증을 유도하기 위해 정상군 (생리식염수, 복강내 주사)을 제외한 나머지 군에 TAA (200 mg/kg)를 13주 동안 일주일에 세 번 복강내 주사하였다. 자란 추출물 (100 mg/kg 또는 500 mg/kg), 실리마린 (50 mg/kg), 또는 증류수를 7주차부터 일주일에 여섯 번 위관영양으로 투여하였고, 몸무게는 일주일에

두 번 측정하였다.

[0083] 마지막 약물 투여 후, 래트를 18시간 동안 절식시킨 다음 CO<sub>2</sub> 마취 하에 혈액을 심장천자로부터 수집하였다. 간을 분리하여 절대 무게 및 상대 무게를 측정하였다.

[0084] -80℃에서 저장된 간 조직의 일부를 하이드록시프롤린, GSH, 단백질 발현 측정을 위해 분리하였다. Bouin 용액에서 고정된 간 조직을 조직형태학적 연구를 위해 가공하였다. RNAlater 용액에 고정시킨 간 조직의 작은 부분을 유전자 발현 연구를 위해 -80℃에서 저장하였다. 본 발명에서 실시된 동물 실험은 건국대학교 실험동물 윤리위원회의 지침에 따라 수행하였다 (IACUC No. KU15148).

[0085] **5-2. 간섬유화 동물 모델의 간 형태 변화 분석**

[0086] 실험 마지막날에 각 군마다 래트를 개복하여 간을 적출한 뒤 간의 크기 및 변화를 육안으로 확인하였다. 도 6에 나타난 바와 같이 TAA군 (B)은 정상군 (A)과 비교하여 간에 생기가 없고 병변이 생긴 것을 확인할 수 있었고, 자란 추출물을 처리한 군 (C 및 D)의 간은 생기가 돌아오고 병변이 완화된 것을 확인할 수 있었다.

[0087] **5-3. 혈청 생화학적 분석**

[0088] 실험 마지막날에 CO<sub>2</sub> 마취 하에 심장천자로부터 혈액을 수집하고, 혈청을 원심분리 (3,000 x g, 15분)를 이용하여 분리하였다. 혈액 응고 후, AST (aspartate transaminase) 및 ALT (alanine transaminase)의 혈청 수준을 GOT-GTP 어세이 키트 (아산제약, 대한민국)를 이용하여 측정하였다.

[0089] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 TAA군은 혈청 AST 및 ALT 수준이 현저하게 증가하였으나, 자란 추출물 처리군 (ATE 100군 및 ATE 500군)은 TAA군과 비교하여 농도 의존적으로 혈청 AST 및 ALT 수준이 현저하게 감소하였다. 특히, ATE 500군 (0.5 mg/kg)은 양성 대조군인 실리마린 처리군과 유사한 수준으로 혈청 AST 및 ALT를 회복하였다.

## 실시예 6

[0090] **6-1. 글루타티온 어세이 (GSH assay)**

[0091] 총 GSH는 Ellman 방법에 따라 측정하였다. 요약하면, 간조직을 100mg으로 절단한 후 PBS에 10%(w/w)로 간 조직을 균질화시킨 후 10000 x g로 15분 동안 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 시료 (또는 GSH 표준)의 이중 50 μl 부분 표본을 96웰 플레이트에 미리 준비된 80 μl의 DTNB 및 NADPH 혼합물 (10 μl 4 mM DTNB와 70 μl 0.3mM NADPH)과 혼합하였다. 마지막으로 20 μl (0.06 U)의 GSH 환원효소 용액을 각 웰에 첨가하고 5분 후에 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0092] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 TAA군은 정상군과 비교하여 총 GSH 함량이 현저하게 증가하였으나, ATE 100군 및 ATE 500군은 정상군 수준으로 총 GSH 수준을 회복하였다. 특히 ATE 500군은 양성 대조군보다 높은 수준으로 GSH 수준을 회복하였다. 이를 통해, 자란 추출물이 양성 대조군보다 효과적으로 간을 보호한다는 것을 확인하였다.

[0093] **6-2. 하이드록시프롤린 어세이 (Hydroxyproline Assay)**

[0094] 하이드록시프롤린 측정은 종래 방법에서 약간 변형한 방법을 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 요약하면, -70℃에서 저장한 간 조직 (156 mg)을 1 ml의 6N HCl에서 균질화하고 100℃에서 하루간 보관하였다. 여과지 (Toyo Roshi Kaisha, 도쿄, 일본)를 통해 산 가수분해물을 여과한 후, 6N HSL에 용해된 50 μl 시료 또는 하이드록시프롤린 표준물을 자연 건조하였다. 건조된 시료를 메탄올 (50 μl)에 용해한 다음 1.2 ml의 50% 이소프로판올 및 200 μl의 클로라민-T 용액을 각각에 첨가하고 실온에서 10분 동안 보관하였다. Ehrlich 용액 (1.3 ml)을 추가하고 시료를 50℃에서 90분 동안 보관하였다. 반응 생성물의 광학 밀도를 분광 광도계 (Tecan, 미국)를 이용하여 558 nm에서 판독하였다. 표준 곡선을 0.5 mg/ml 하이드록시프롤린 용액의 계열회석을 이용하여 구성하였다.

[0095] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 TAA군의 하이드록시프롤린 수준은 대조군에 비해 현저하게 증가하였다. 모든 자란 추출물 처리군은 TAA군에 비해 농도 의존적으로 하이드록시프롤린 수준을 약화시켰다. 특히 ATE 500군은 실리마린 처리군과 동일한 수준으로 하이드록시프롤린 수준을 감소시켰다.

[0096] 하이드록시프롤린은 전사 후 수식과정에 발생하는 물질로 콜라겐의 안정성과 관련되어 있어 하이드록시프롤린이 증가하면 콜라겐이 안정해져서 증가하는 것을 의미한다 (간에서의 콜라겐 수치를 의미). 따라서, 본 실시예의

결과를 통해 자란 추출물이 간에서 콜라겐을 감소시키는 것을 확인하였다.

**실시예 7**

**[0097] 간조직의 조직병리학**

**[0098] 7-1. 헤마톡실린 & 에오신 (H&E) 염색법**

**[0099]** 조직병리학 검사를 위해 Bouin 용액 고정 간조직을 파라핀에 고정하고, 5 μm 두께의 박편으로 절단하였다. 건조 후, 간조직 박편 슬라이드를 헤마톡실린 & 에오신 (H&E)으로 염색하였다.

**[0100]** TAA-유도 간독성에 의한 간조직의 조직학적 변화를 관찰하였다. 청색은 핵을 나타내고 적색은 세포질을 나타낸다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 정상군 (A)에서 발견되지 않았던 하얀색 병변이 TAA군 (B)에서 관찰되었고, 세포의 구조 또한 변화되었다. 그러나, ATE 500군 (C) 및 ATE 100군 (D)에서는 병변의 정도가 완화된 것을 육안으로 확인할 수 있었다.

**[0101] 7-2. 메이슨 트리크롬 염색법**

**[0102]** 상기 결과를 바탕으로, 좀 더 정확한 조직학적 변화를 확인하기 위해 메이슨 트리크롬 염색법을 수행하였다. 콜라겐 발현의 반정량 분석을 위해, 메이슨 트리크롬으로 염색된 박편에서 파란색으로 염색된 영역을 이미지 분석기로 측정하였다 (Image J, NIH). 청색은 피브로넥틴을 나타내고 적색은 근육 및 세포질을 나타내며 흑청색은 핵을 나타낸다.

**[0103]** 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 TAA군에서 넓게 분포된 콜라겐 축적 (파란색 부분)이 관찰되었으나, ATE 500군에서는 간 박편의 콜라겐 축적이 현저하게 감소하였고(도 11(A)), 간섬유증 영역 또한 자란 추출물 처리군에서 감소하였으며, 특히 ATE 500군에서 현저하게 감소하였다 (도 11(B)).

**실시예 8**

**[0104] TAA-유도 간에서의 간섬유증 관련 유전자 분석**

**[0105]** 자란 추출물의 항-섬유 효과를 확인하기 위해 실시간 PCR을 이용하여 간섬유증 관련 유전자를 분석하였다. 총 RNA를 TRIzol 시약 (QIAGEN, 캘리포니아)을 이용하여 간 조직 시료 및 HSC-T6 세포로부터 추출하였다. 고성능 cDNA 역전사 키트 (Applied Biosystems, 미국)를 이용하여 20 μl 반응물의 총 RNA (2μg)로부터 cDNA를 합성하였다. 본 실시예에 사용된 프라이머는 하기 표 1과 같다.

**표 1**

	서열
α-SMA	Forward: AACACGGCATCATCACCAACT (서열번호 1) Reverse: TTTCTCCCGTTGGCCTTA (서열번호 2)
Col1A1	Forward: CCCAGCGGTGGTTATGACTT (서열번호 3) Reverse: GCTGCGGATGTTCTCAATCTG (서열번호 4)
TGF-β 1	Forward: GGAGACGGAATACAGGGCTTT (서열번호 5) Reverse: AGCAGGAAGGTCGGTTCAT (서열번호 6)
β-actin	Forward: TAAGGCCAACCGTGAAAAGAT (서열번호 7) Reverse: ACCAGAGGCATACAGGGACAA (서열번호 8)

**[0107]** 각각의 유전자는 β-actin을 기준으로 하여 비교하여 측정하였다. 그결과, 도 12(A)에 나타난 바와 같이 TAA군에서는 TGF-β 발현이 상승되었으나, 자란 추출물 처리군에서는 현저하게 감소되었고, 도 12(B) 및 (C)에 나타난 바와 같이 Col1A1 및 α-SMA 유전자 발현은 자란 추출물 처리군에서 용량 의존적으로 현저하게 감소하였다. 이를 통해, 자란 추출물이 TAA-유도 간에서 항-섬유 활성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

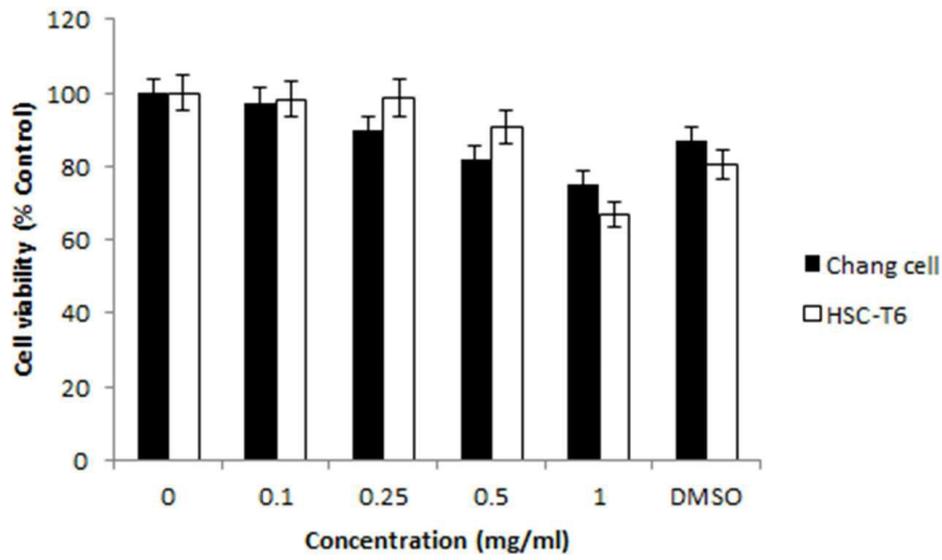
**[0108] 통계학적 분석**

**[0109]** 모든 데이터 값은 평균 ±SEM으로 나타냈다. 그룹 간의 통계적으로 유의한 차이는 one-way ANOVA를 수행한 다음스튜던트 t-테스트를 이용하여 분석하였다. p < 0.05 또는 p < 0.01의 값은 통계적으로 유의한 차이로 간주한다.

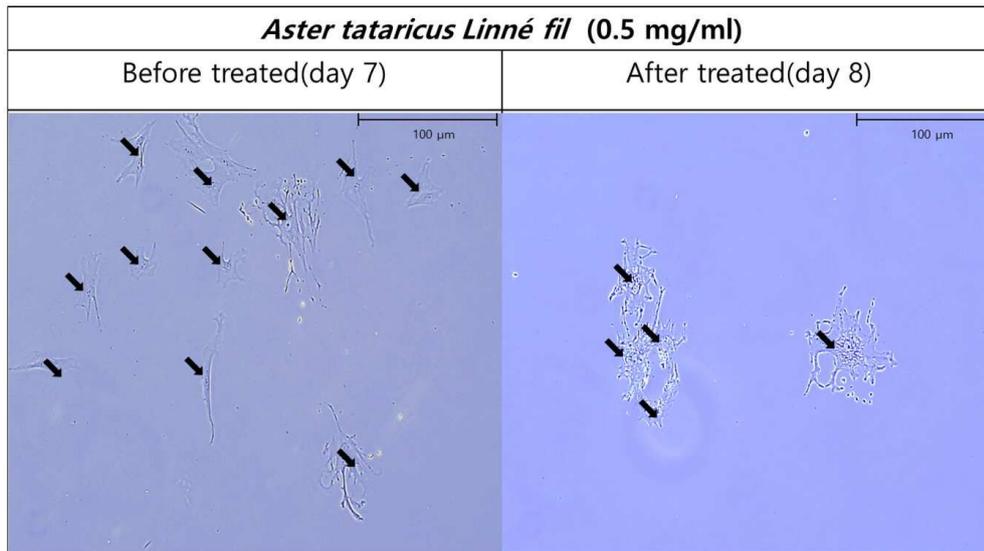
- [0110] **제조예 1. 주사제**
- [0111] 상기 실시예 1-1에서 제조한 자완 추출물: 300mg
- [0112] 소듐 메타비설파이트: 3.0mg
- [0113] 메틸파라벤: 0.8mg
- [0114] 프로필파라벤: 0.1mg
- [0115] 주사용 멸균 증류수: 적량
- [0116] 상기 성분을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2 ml이 되도록 제조하여, 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.
- [0117] **제조예 2. 정제**
- [0118] 상기 실시예 1-1에서 제조한 자완 추출물: 500mg
- [0119] 감자 전분: 100mg
- [0120] 락토오스: 100mg
- [0121] 콜로이드성 규산: 16mg
- [0122] 스테아린산 마그네슘: 적량
- [0123] 통상의 정제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 타정하고 정제를 제조하였다.
- [0124] **제조예 3. 캡슐제**
- [0125] 상기 실시예 1-1에서 제조한 자완 추출물: 300mg
- [0126] 유당: 50mg
- [0127] 전분: 50mg
- [0128] 탈크: 2mg
- [0129] 스테아린산 마그네슘: 적량
- [0130] 통상의 캡슐 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0131] **제조예 4. 환제**
- [0132] 상기 실시예 1-1에서 제조한 자완 추출물: 350mg
- [0133] 옥수수 전분: 100mg
- [0134] 멸균 증류수: 적량
- [0135] 상기 성분을 혼합하고, 통상의 환제 제조방법에 따라 적절한 크기를 갖는 구형으로 제환하여 환제를 제조하였다.
- [0136] **제조예 5. 건강 기능 식품**
- [0137] 1) 건강 음료
- [0138] 올리고당(2%), 액상과당(0.5%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%) 등의 음료 재료에 상기 실시예 1-1에서 제조된 자완 추출물을 적량 혼합하여, 살균함으로써 음료를 제조하였다.
- [0139] 2) 기능성 식품
- [0140] 상기 실시예 1-1에서 제조한 자완 추출물을 각종 비타민 및 미네랄 함유 기능성 식품에 적량 혼합하여 자완 추출물이 함유된 기능성 식품을 제조하였다.

도면

도면1

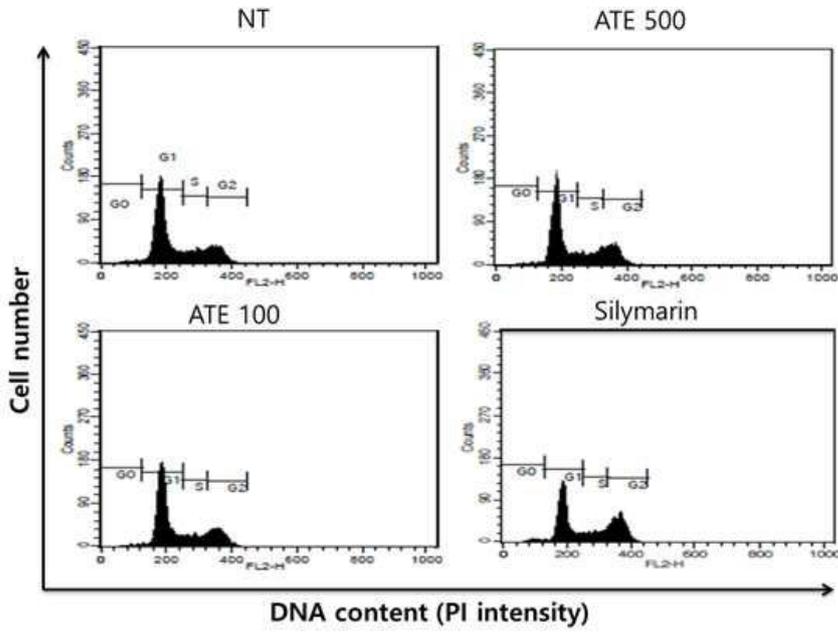


도면2

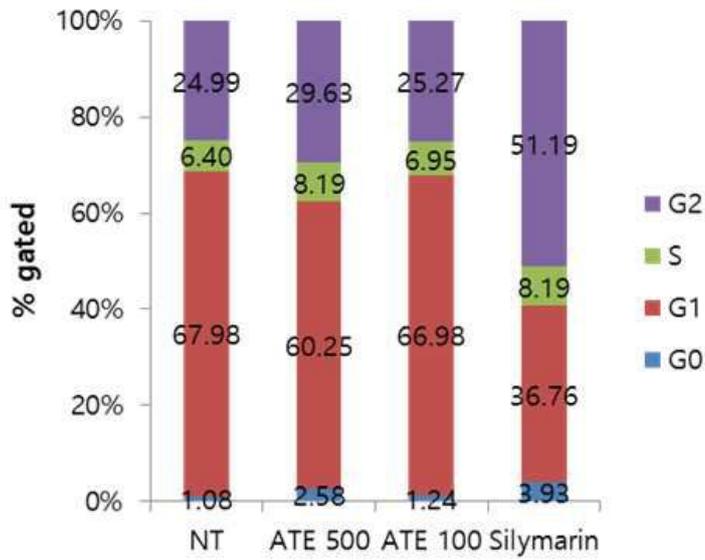


도면3

(A)

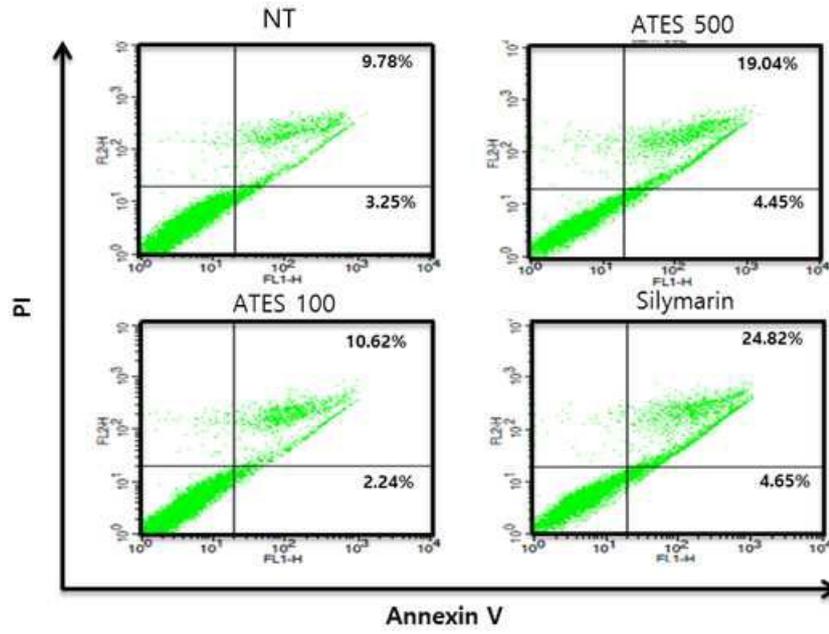


(B)

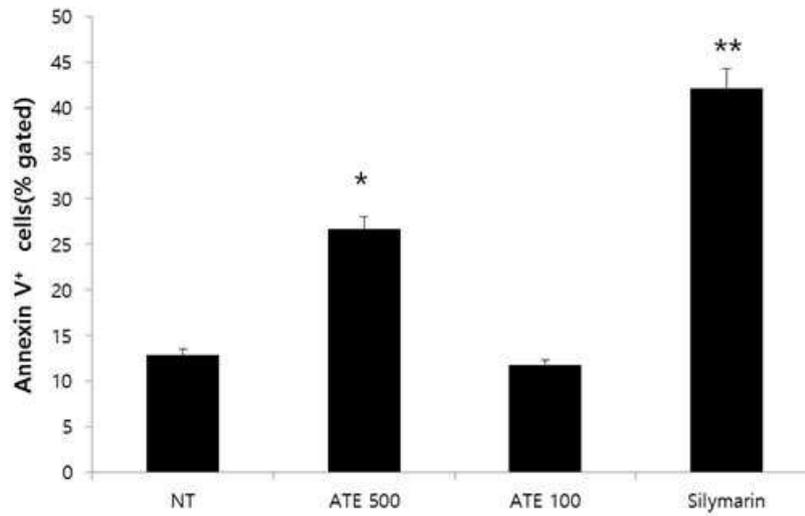


도면4

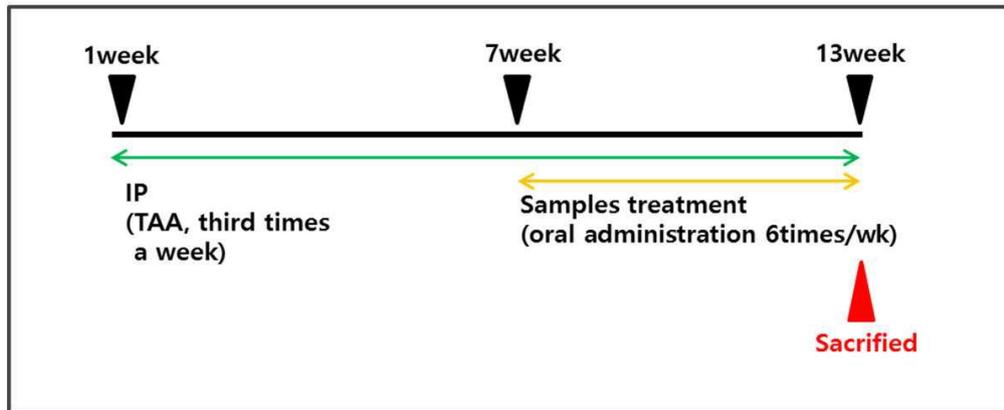
(A)



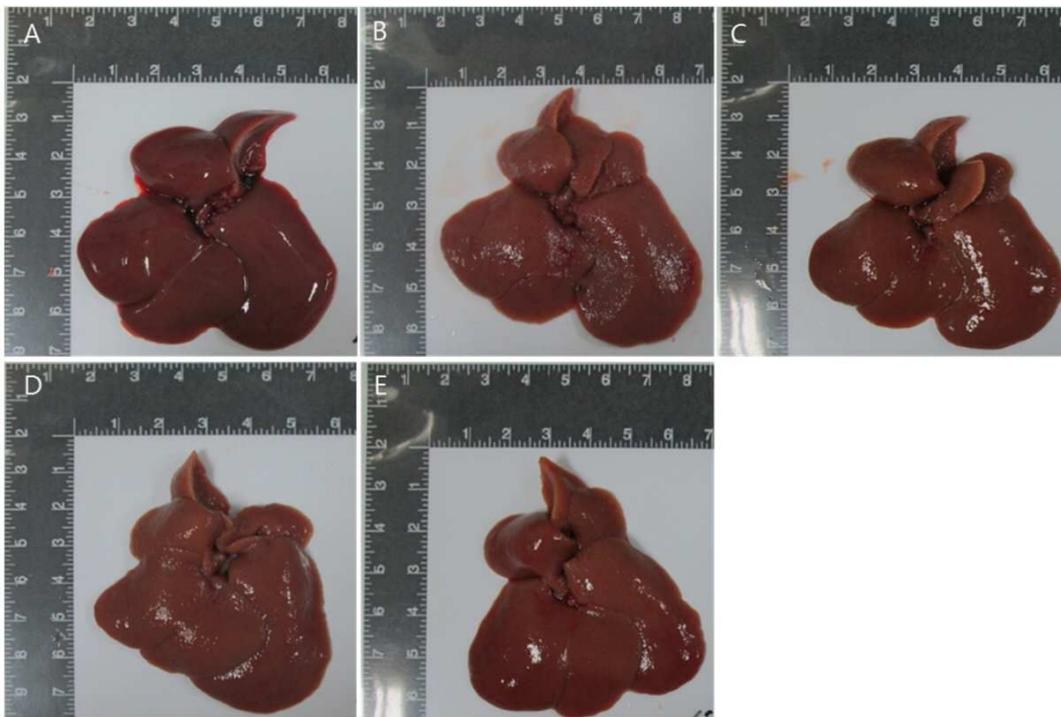
(B)



도면5

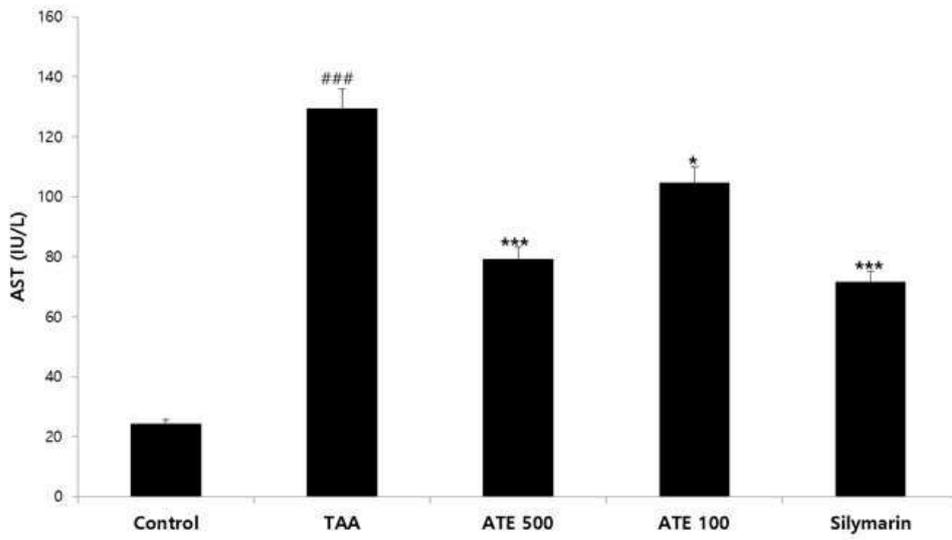


도면6

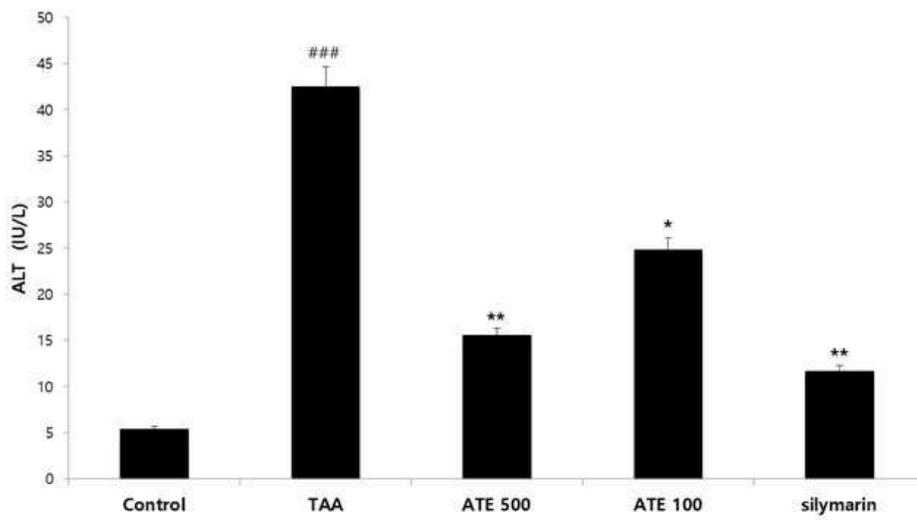


도면7

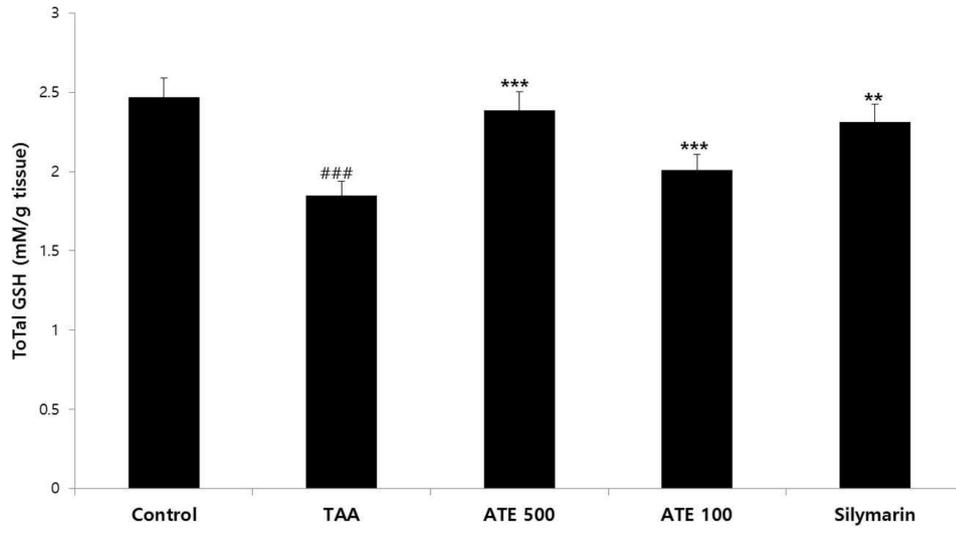
(A)



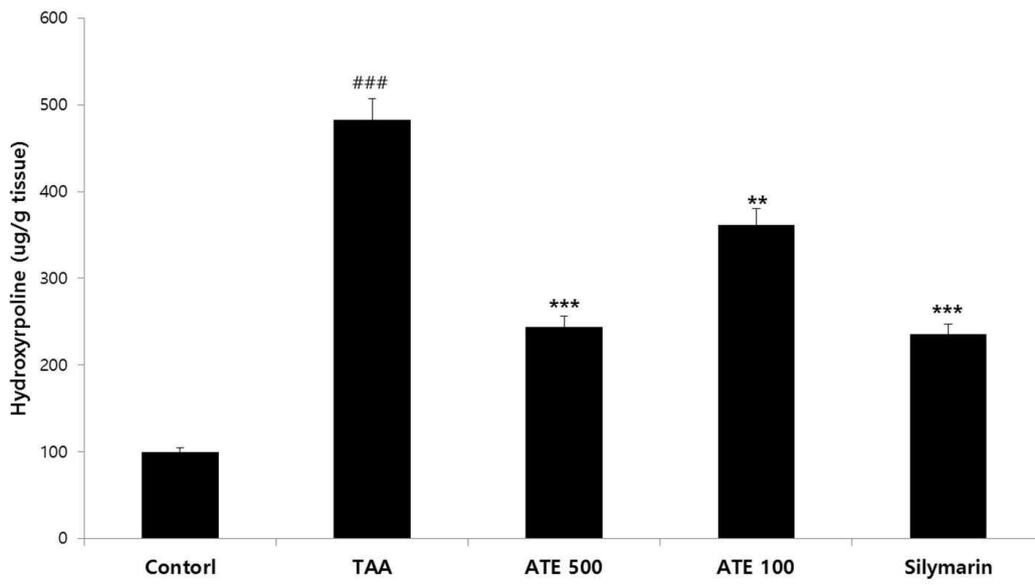
(B)



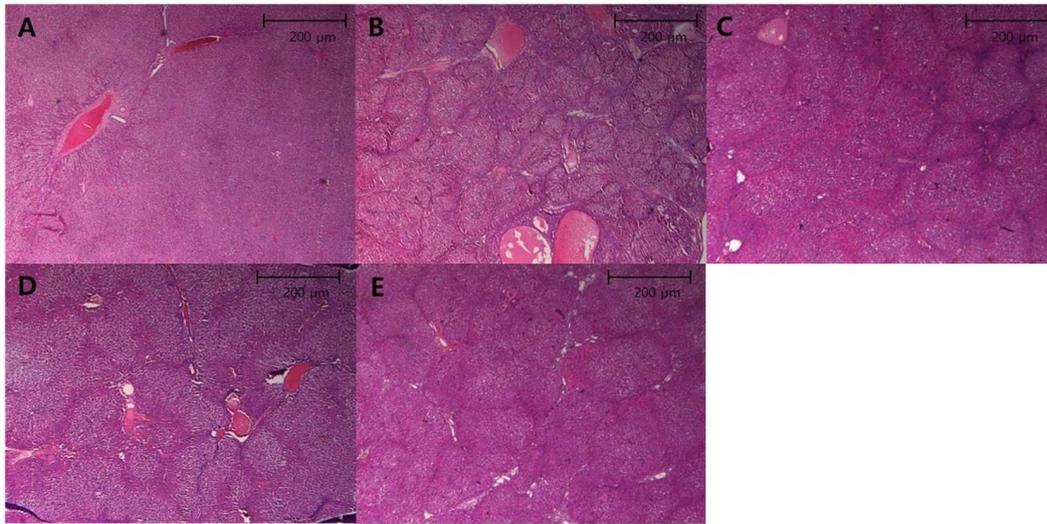
도면8



도면9

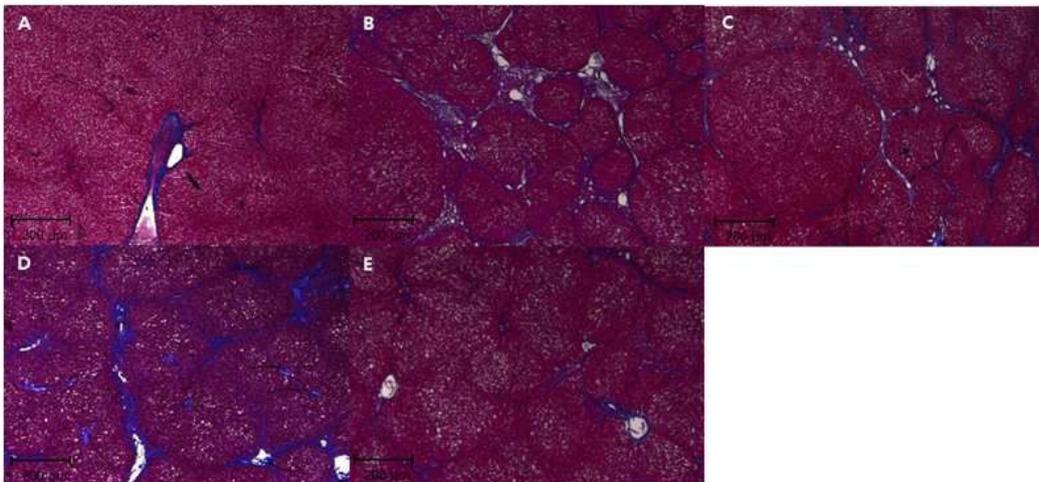


도면10

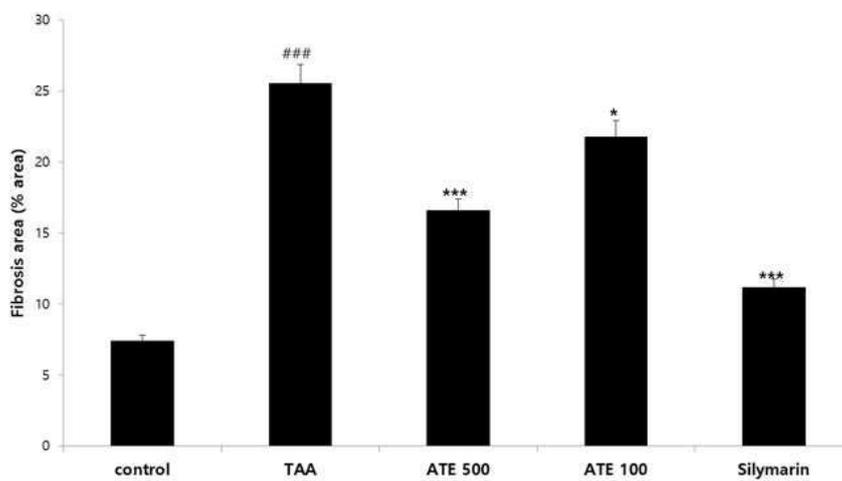


도면11

(A)

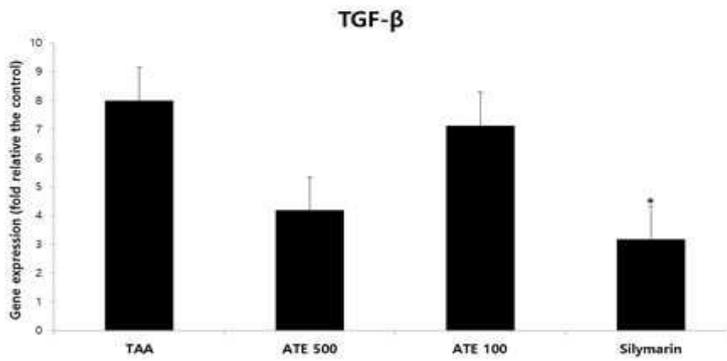


(B)

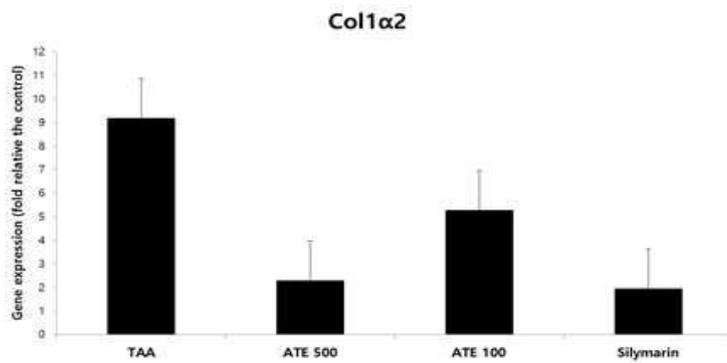


도면12

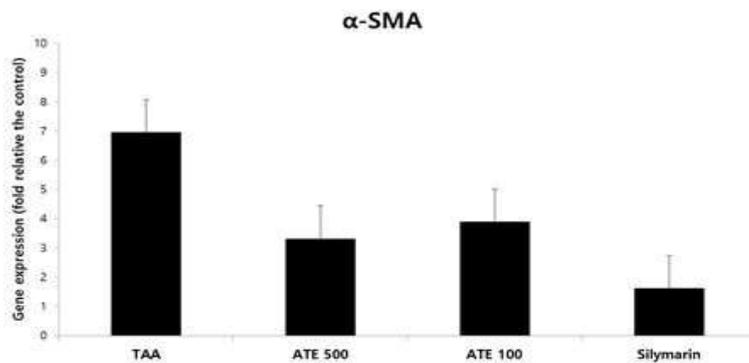
(A)



(B)



(C)



서열목록

- <110> Konkuk University Glocal Industry-Academic Collaboration Foundation
- <120> Composition for preventing, improving or treating hepatic fibrosis or liver cirrhosis comprising Aster tataricus Linne fil extract
- <130> 1061578
- <160> 8
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> alpha-SMA forward primer  
 <400> 1  
 aacacggcat catcaccaac t 21  
 <210> 2  
  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> alpha-SMA reverse primer  
 <400> 2  
 tttctcccgg ttggcctta 19  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> ColT1A1 forward primer  
 <400> 3  
 cccagcggtg gttatgactt 20  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> ColT1A1 reverse primer  
 <400>  
 > 4  
 gctgcggatg ttctcaatct g 21  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> TGF-beta1 forward primer

<400> 5  
 ggagacggaa tacaggcctt t 21  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> TGF-betal reverse primer  
 <400> 6  
 agcaggaagg gtcggttcat 20  
 <210> 7  
  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Beta-actin forward primer  
 <400> 7  
 taaggccaac cgtgaaaaga t 21  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Beta-actin reverse primer  
 <400> 8  
 accagaggca tacagggaca a 21