(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0116404
(43) 공개일자 2015년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/237 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 36/233 (2006.01) *A61K 36/238* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/237 (2013.01)
A23L 1/3002 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0047549
(22) 출원일자 2015년04월03일
심사청구일자 2015년04월03일
(30) 우선권주장
1020140040440 2014년04월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
조익현
서울특별시 관악구 은천로 93 벽산블루밍아파트 208동 104호
최종희
경상북도 경주시 외동읍 입실2리 711번지
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 9 항

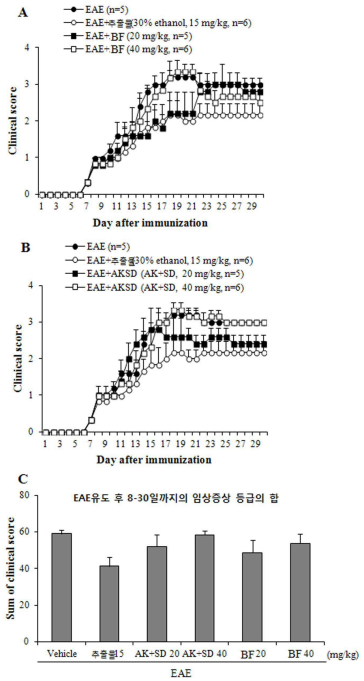
(54) 발명의 명칭 **복합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 강활(*ostericum koreanum*), 독활(*aralia cordata*), 시호(*bupleurum falcatum*), 전호(*anthriscus sylvestris*), 형개(*schizonepeta rhizome*), 방풍(*saposhnikovia*), 적복령(*poria cocos*), 생지황(*rehmannia*

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도18



glutinosa), 지골피(*lycium chinense*) 및 차전자(*plantago asiatica*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 MOG(myelin oligodendrocyte glycoprotein) 펩타이드에 의해 유도된 자가면역성 뇌척수염(EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) 동물모델에서 질병의 신경학적인 임상증상 척도를 개선하고, EAE에 의해 증가된 말초혈액 내의 백혈구의 수를 감소시키고, 척수의 탈수초화, 염증세포의 침윤, 미세아교세포의 활성화 및 침윤을 감소시키며, 전염증성 사이토카인, iNOS 및 백혈구와 관련한 케모카인의 발현과 MAPKs 및 NF-κB의 신호기전 및 비장 세포의 증식을 억제하고, 혈액뇌장벽을 안정화시키면서 세포독성은 나타내지 않으면서, 강활 및 방풍 혼합추출물이나 시호 단독추출물에 비해 질병의 신경학적인 임상증상 척도를 더 효과적으로 개선하므로, 상기 혼합추출물은 신경계 자가면역질환 예방 및 치료를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 36/233 (2013.01)
A61K 36/238 (2013.01)
A61K 2236/33 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0263000013
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 한의약선도기술개발
연구과제명 자가면역성 다발성경화증 동물모델에서 형방패독산의 신경보호효과 및 작용기전 연구
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2013.05.15 ~ 2014.05.14

명 세 서

청구범위

청구항 1

강활(*ostericum koreanum*), 독활(*aralia cordata*), 시호(*bupleurum falcatum*), 전호(*anthriscus sylvestris*), 형개(*schizonepeta rhizome*), 방풍(*saposhnikovia*), 적복령(*poria cocos*), 생지황(*rehmannia glutinosa*), 지골피(*lycium chinense*) 및 차전자(*plantago asiatica*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환(autoimmune disease in nervous system) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 신경계 자가면역질환은 다발성경화증(multiple sclerosis), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 중증근무력증(myasthenia gravis), 길랑바레증후군(guillain-barre syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmune uveitis), 급성 파종성뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis), 급성 횡단척수염(acute transverse myelitis), 자가면역성뇌증(autoimmune encephalopathy) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 신경계 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 물, C_1~C_2의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 제조된 것을 특징으로 하는 신경계 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 신경계 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자는 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1의 중량비로 혼합되는 것을 특징으로 하는 신경계 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수의 탈수초화 억제를 특징으로 하는 신경계 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역 질환 예방 또는 개선용 건강 기능 식품.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 신경계 자가면역질환은 다발성경화증, 시신경척수염, 중증근무력증, 길랑바레증후군, 자가면역성 포도막염, 급성 파종성뇌척수염, 급성 횡단척수염, 자가면역성뇌증 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 신경계 자가면역질환 예방 또는 개선용 건강 기능 식품.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자는 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1의 중량비로 혼합되는 것을 특징으로 하는 신경계 자가면역 질환 예방 또는 개선용 건강 기능 식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 강활(*ostericum koreanum*), 독활(*aralia cordata*), 시호(*bupleurum falcatum*), 전호(*anthriscus sylvestris*), 형개(*schizonepeta rhizome*), 방풍(*saposhnikovia*), 적복령(*poria cocos*), 생지황(*rehmannia glutinosa*), 지골피(*lycium chinense*) 및 차전자(*plantago asiatica*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환(autoimmune disease in nervous system) 예방 및 치료용 약학적 조성물, 또는 건강 기능 식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 면역(immunity)은 생체 조직으로 침입하거나 주입되는 모든 외부 고분자물질에 대한 생체의 자기보호체계의 하나이다. 면역체계의 주요한 구성성분으로 림프구가 있는데, 이는 골수에서 만들어져서 혈액을 따라 림프 조직이나 기관, 주로 림프절비장편도 등으로 순환하는 백혈구다. B세포는 적절한 항원에 의해 자극되면 빠르게 증식하여, 그 항원을 중화시킬 특별한 항체(면역글로불린)를 만들어내는 클론을 형성한다. B세포가 생성하는 항체는 체액에서 순환하면서 체액성 면역을 수행한다. T세포는 흉선에서 만들어져 림프 조직으로 이동하는데, 항원을 직접 공격하는 세포매개성 면역을 담당한다.

[0004] 모든 정상 개체에 있어서 가장 중요한 특성 중의 하나는 자기(self)를 구성하고 있는 항원 물질에 대해서는 해롭게 반응하지 않는 반면, 많은 비자기(non-self) 항원에 대해서는 이를 인식하고 반응하여 제거할 수 있는 능력을 가지고 있다는 것이다. 이처럼 자기항원에 대한 생체의 무반응을 면역학적 무반응성(immunologic unresponsiveness) 또는 관용(tolerance)이라 한다. 이러한 자기관용을 유도하거나 계속 유지하는데 있어서 문제가 생기게 되면 자기항원에 대하여 면역반응이 일어나게 되고, 이로 인하여 자신의 조직을 공격하는 현상이 발생하면서 자가면역질환(autoimmune disease)이 생긴다.

[0005] 자가면역질환은 숙주의 면역 반응이 외래 항원을 자가 분자(자가 항원)와 구별하는데 실패하여 비정상적인 면역반응을 유도할 때 초래된다. 자가면역 질병에서 자가 분자에 대한 면역 반응은 자가-내성의 정상적인 상태를 벗어나게 하는데, 이는 자가항원에 대해 반응할 수 있는 T 세포 및 B 세포의 파괴를 수반하며 살아있는 동안 면역계의 발육에 조기에 발생하는 사건에 의해 예방되어 왔다. 프로세싱된 펩티드를 T 세포에 결합시키고 제시하는 능력을 통해 면역 반응의 조절에서 중추적인 역할을 하는 세포표면단백질이 주조직적합복합체(MHC)분자이다. MHC는 두 개의 형태는 클래스Ⅰ또는 클래스Ⅱ로 존재하며, 둘 모두는 단일 유전자 복합체내에서 엔코딩된다. 자가면역질환은 MHC 클래스Ⅰ또는 클래스Ⅱ 유전자의 특정 대립유전자와 현저한 유전적 관련성을 갖는다.

[0006] 자가면역질환 중 신경계 자가면역질환(autoimmune disease in nervous system)이 있고, 이는 중추신경계 자가면역질환(autoimmune disease in central nervous system)으로도 불린다. 신경계 자가면역질환은 자가면역 프로세스가 뉴런의 수초(myelin sheath)의 손상에 참여하는 질환이다. 이러한 질환의 예로는 다발성경화증(multiple sclerosis), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 중증근무력증(myasthenia gravis), 길랑바레증후군(guillain-barre syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmune uveitis), 급성 파종성뇌척수염(acute

disseminated encephalomyelitis), 급성 횡단척수염(acute transverse myelitis), 자가면역성뇌증(autoimmune encephalopathy) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy) 등이 있다.

[0007] 자가면역질환 치료는 자기 세포에 대한 이상 반응으로 나타나는 질병이므로 주로 자기면역 기능을 억제하는 약물이 사용되고 있다. 그러나 부작용이 많아 지속적으로 사용하기 곤란하고 재발을 충분히 막지 못하여 치료에 한계가 있다. 여러 가지 면역요법들이 있으나, 아직 확실한 치료효능을 보이는 방법으로 인정된 사례는 없다. 사람 자가면역질환의 다양한 동물모델이 존재하는데, 이들은 가능 치료법을 실험하는데 사용되고 있다.

[0009] 염증반응은 척수손상 후에 나타나는 이차적 손상의 주된 요인 중 하나로서 급성, 만성 척수손상의 병리현상 조절에 중추적인 역할을 한다. 척수손상 후 염증반응은 염증과 관련한 유전자 및 단백질의 발현이나 활성이 증가되어 발생하는데, 특히 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 초기 염증성사이토카인(pro-inflammotory cytokines)이나 사이클로옥시게나제(COX-2, cyclooxygenase-2), 유도형 일산화질소 합성 효소(iNOS, inducible nitric oxide synthase) 및 프로스타글란딘 합성효소(prostaglandin synthase-2) 등의 염증 매개물질이 관여한다고 알려져 있다. 이러한 물질들은 손상 후 유입된 혈액세포나 척수 내에 존재하는 미세아교세포(microglia)에서 분비되어 세포 독성을 나타내며 축삭퇴화나 탈수초화(demyelination)의 진행에도 영향을 미치게 된다. 또한, 척수손상 후에 유입되는 혈액세포 중에서 특히 호중성백혈구(neutrophil)나 대식세포 등이 염증반응을 유도하여 세포사멸 및 신경아교성반흔(gliolic scar)의 형성에 관여하고, 주위 세포의 부가적인 활성화를 야기하여 연속적인 염증반응을 일으킨다고 알려져 있어 이들의 유입을 억제하는 것이 중요한 치료전략 중 하나로 평가되고 있다.

[0011] 시신경척수염은 주로 척수와 시신경을 침범하는 중추신경계의 염증성 탈수초질환으로 이전에는 다발성경화증의 다른 형태로 여겨졌다. 시신경척수염은 자가항체에 의해 주로 일측, 혹은 양측성 시신경염과 척수염을 주증상으로 하는 질환이다. 다발성경화증과 임상증상이 비슷하여 구분이 어렵고 진단에 혼란이 있어 왔지만, 중추신경계 수분통로 단백질인 aquaporin-4(AQP-4)에 대한 자가항체가 발견되면서 시신경척수염의 발병기전과 임상적 특징에 대하여 많은 사실이 알려지게 되었다. 시신경척수염은 양안성 시신경염과 척수염이 동시에, 혹은 짧은 시간에 연속적으로 발병하는 경우 임상적으로 진단하여 왔으나, 최근에는 AQP-4 항체와 특징적인 뇌 영상소견이 알려지면서 이러한 소견을 종합하여 새로운 진단기준이 마련되었다. 시신경 척수염은 다발경화증에 비해 초기에 재발이 잦고 빠르게 악화되기 때문에 예후가 더 나쁘며 면역억제제 등의 재발방지 효과도 더 낮은 것으로 알려져 있다.

[0013] 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증은 다리와 팔의 느린 진행성 약화 및 감각 장애를 특징으로 하는 신경계질병이다. 이 질병은 말초신경계의 수초의 손상에 의해 야기된다. 신경 뿌리의 팽윤 또한 이 질병의 특징이다. 이 질병은 어느 연령 및 성별에서도 일어날 수 있음에도 불구하고 젊은 성인에서 그리고 여자보다 남자에 더 일반적이다. 증상은 저림 또는 무감각(발가락 및 손가락에서 시작함), 팔과 다리의 약함, 근육통, 깊은 힘줄 반사의 소실(무반사), 피로 및 비정상적인 감각을 포함한다. 치료되지 않은 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증은 물리적 및 작업적 요법, 보조기학 장치 및 장기적 치료를 요하는 축적성 장애를 특징으로 한다.

[0015] 다발성경화증은 인체 내 면역계의 결손에 의해 유발되는 질환으로 뇌와 척수의 백질부분의 신경을 덮는 지방질로 된 수초(myelin sheath)를 침범하여 탈수초화(demyelination)를 산발적으로 일으키는 질환으로 수초가 손상을 받아 수초층의 두께가 감소하면 신경자극은 전달되지만 효율성이 떨어지고 이에 정상적인 신경자극 전달이 방해를 받아 발병되는 질병이다. 쉽게 설명하자면 전선을 둘러싸고 있는 절연체가 손상되면 전기의 전도가 느려지는 것과 마찬가지로 신경세포 간의 전도 속도가 느려지는 현상을 초래하여 증상을 일으킨다. 초기에는 수초가 회복되면서 완화증상이 나타나지만, 결국 악화가 반복되며 손상이 영구화된다. 이 같은 수초의 손상으로 인해 신경이 적절히 작용을 하지 못하여 시야장애나 균형감 상실 등의 증상이 야기되고 일부 환자에서는 마비가 올 수 있다.

[0016] 다발성경화증의 치료는 크게 급성기 치료와 장기적인 질병완화 치료, 그리고 증상완화 치료로 나눌 수 있다. 급성기에는 일반적으로 고용량 스테로이드의 정맥주사 요법을 사용한다. 스테로이드는 급성기에 증상을 완화시키고 회복 기간을 줄여주지만, 장기적으로 투여할 경우에는 다양한 부작용이 나타날 수 있으므로 사용에 주의를

요한다. 여러 가지 원인에 의해 질병완화 치료를 하기 어려운 환자들은 저용량 스테로이드 유지 요법을 사용하기도 한다. 대표적인 질병완화 치료제로는 인터페론(beta-interferon)과 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate)가 있다. 이들은 재발완화형 다발성경화증에서 재발하는 횟수를 줄이고, 재발 시에 나타나는 증상을 완화하는 효과를 가지고 있다. 그러나 이차진행형으로 전환된 환자에서는 뚜렷한 효과가 나타나지 않기 때문에 이 경우에는 환자의 장애를 예방하기 위한 조기 치료가 가장 중요하다. 다발성경화증으로 인해 나타나는 여러 증상과 신경학적 장애를 줄여주기 위한 증상완화 치료도 시행한다. 이러한 치료들은 재발율이 높으며, 재발을 확실하게 방지하는 방법은 없다.

[0018] 실험적자가면역성뇌척수염(EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis)은 수초기본단백질(MBP, myelin basic protein, 뇌의 백질 및 척수의 성분)에 대하여 동물을 자가면역시킴으로써 유도되고 신경계 자가면역질환에서 관찰되는 동일한 임상적 증상인 탈수초화와 마비(paralysis)를 발생시킨다. EAE 동물모델에서 임상증상이 발현하는 원인이 사람의 다발성경화증과 동일하기 때문에 다발성경화증을 비롯한 신경계 자가면역질환 연구를 위하여 적합한 동물모델이다. Steinman 등은 다발성경화증 환자의 뇌 병소에서 관찰되는 우세한 세포유형이 $CD4^+$ T-세포라는 것(Oksenberg et al., 1990, Nature 345:344-345), 그리고 이들 뇌 병소에서 세포와 연관된 T-세포 수용체(항원 인식을 주도하는 분자)가 EAE를 유발하는 원인이 되는 $CD4^+$ T-세포 상에서 동일한, 항원 인식을 위한 3개의 아미노산 결합 모티프를 갖는다는 것(Oksenberg et al., 1993, Nature 362:68-70)을 증명하였다.

[0020] 이에 본 발명자들은 신경계 자가면역질환 예방 및 치료제를 개발하기 위하여 연구하던 중, 강활(*ostericum koreanum*), 독활(*aralia cordata*), 시호(*bupleurum falcatum*), 전호(*anthriscus sylvestris*), 형개(*schizonepeta rhizome*), 방풍(*saposhnikovia*), 적복령(*poria cocos*), 생지황(*rehmannia glutinosa*), 지골피(*lycium chinense*) 및 차전자(*plantago asiatica*)의 혼합추출물이 MOG(myelin oligodendrocyte glycoprotein) 펩타이드에 의해 유도된 EAE 동물모델에서 질병의 신경학적인 임상증상 척도를 개선하고, EAE에 의해 증가된 말초혈액 내의 백혈구의 수를 감소시키고, 척수의 탈수초화, 염증세포의 침윤, 미세아교세포의 활성화 및 침윤을 감소시키며, 전염증성 사이토카인, iNOS 및 백혈구와 관련한 케모카인의 발현과 MAPKs 및 NF-κB의 신호기전 및 비장 세포의 증식을 억제하고, 혈액뇌장벽(blood-brain barrier, BBB)을 안정화시키면서 세포독성은 나타내지 않으면서, 강활 및 방풍 혼합추출물이나 시호 단독추출물에 비해 질병의 신경학적인 임상증상 척도를 더 효과적으로 개선하므로, 상기 혼합추출물을 신경계 자가면역질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0022] 본 발명의 목적은 강활(*ostericum koreanum*), 독활(*aralia cordata*), 시호(*bupleurum falcatum*), 전호(*anthriscus sylvestris*), 형개(*schizonepeta rhizome*), 방풍(*saposhnikovia*), 적복령(*poria cocos*), 생지황(*rehmannia glutinosa*), 지골피(*lycium chinense*) 및 차전자(*plantago asiatica*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환(autoimmune disease in nervous system) 예방 및 치료용 약학적 조성물, 또는 건강 기능 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 강활(*ostericum koreanum*), 독활(*aralia cordata*), 시호(*bupleurum falcatum*), 전호(*anthriscus sylvestris*), 형개(*schizonepeta rhizome*), 방풍(*saposhnikovia*), 적복령(*poria cocos*), 생지황(*rehmannia glutinosa*), 지골피(*lycium chinense*) 및 차전자(*plantago asiatica*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환(autoimmune disease in nervous system) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환 예방 및 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 강활(*ostericum koreanum*), 독활(*aralia cordata*), 시호(*bupleurum falcatum*), 전호(*anthriscus sylvestris*), 형개(*schizonepeta rhizome*), 방풍(*saposhnikovia*), 적복령(*poria cocos*), 생지황(*rehmannia glutinosa*), 지골피(*lycium chinense*) 및 차전자(*plantago asiatica*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 MOG(myelin oligodendrocyte glycoprotein) 펩타이드에 의해 유도된 자가면역성 뇌척수염(EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) 동물모델에서 질병의 신경학적인 임상증상 척도를 개선하고, EAE에 의해 증가된 말초혈액 내의 백혈구의 수를 감소시키고, 척수의 탈수초화, 염증세포의 침윤, 미세아교세포의 활성화 및 침윤을 감소시키며, 전염증성 사이토카인, iNOS 및 백혈구와 관련한 케모카인의 발현과 MAPKs 및 NF-κB의 신호기전 및 비장 세포의 증식을 억제하고, 혈액뇌장벽을 안정화시키면서 세포독성은 나타내지 않으면서, 강활 및 방풍 혼합추출물이나 시호 단독추출물에 비해 질병의 신경학적인 임상증상 척도를 더 효과적으로 개선하므로, 신경계 자가면역질환 발생을 예방하거나 발생 초기 증상의 치료법으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 실험 프로토콜(protocol)을 나타낸 도이다.

도 2a 내지 도 2b는 EAE(experimental autoimmune encephalomyelitis)가 유도된 동물모델에서 본 발명의 혼합추출물의 추출방법 및 농도에 따른 효과를 확인한 도이다:

도 2a의 A 내지 C는 혼합 열수추출물의 농도에 따른 임상증상의 척도(clinical score)와 체중의 변화를 나타내며, D 내지 F는 에탄올 30% 혼합추출물의 농도에 따른 임상증상의 척도와 체중의 변화를 나타내며, 도 2b의 G 내지 I는 에탄올 70% 혼합추출물의 농도에 따른 임상증상의 척도와 체중의 변화를 나타내며, J 내지 L은 에탄올 100% 혼합추출물의 농도에 따른 임상증상의 척도와 체중의 변화를 나타낸다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델; 및

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 3은 EAE가 유도된 동물모델에서 본 발명의 혼합추출물의 추출방법에 따른 효과를 확인한 도이다:

A 및 B는 임상증상의 척도를 나타내며, C 및 D는 체중의 변화를 나타낸다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델; 및

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 4는 본 발명의 혼합추출물을 EAE 유도 후 투여시기에 따른 효과를 임상증상의 척도로 나타낸 도이다:

EAE : EAE가 유도된 동물모델; 및

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 5는 본 발명의 혼합추출물의 성분을 HPLC로 확인한 도이다.

도 6은 EAE가 유도된 동물모델에서 본 발명의 혼합추출물을 투여 후 혈액을 분석한 도이다:

(A)는 백혈구의 수를 나타낸 도이고, (B)는 적혈구의 수를 나타낸 도이고, (C)는 혈소판의 수를 나타낸다:

Nor : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델; 및

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 7은 EAE 유도된 동물모델에서 탈수초화에 대한 본 발명의 혼합추출물의 효과를 룩솔페스트블루 염색(LFB, luxol fast blue) 사진 및 MBP 단백질 발현 확인으로 나타낸 도이다:

A 및 E는 정상대조군의 사진이고, B 및 F는 EAE가 유도된 동물모델의 사진이고, C 및 G는 EAE 유도 후 혼합추출물을 투여한 동물모델의 사진이며, D 및 H는 정상대조군에 혼합추출물을 투여한 동물모델의 사진이고, J 및 K는 MBP 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 확인한 도이다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델; 및

추출물 : EAE가 유도되지 않은 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 8은 EAE 유도된 동물모델에서 면역세포 침윤에 대한 본 발명의 혼합추출물의 효과를 H&E 사진으로 나타낸 도이다:

A 및 E는 정상대조군의 사진이고, B 및 F는 EAE가 유도된 동물모델의 사진이고, C 및 G는 EAE 유도 후 혼합추출물을 투여한 동물모델의 사진이고, D 및 H는 정상대조군에 혼합추출물을 투여한 동물모델의 사진이다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델; 및

추출물 : EAE가 유도되지 않은 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 9는 EAE가 유도된 동물모델에서 전염증성 사이토카인, iNOS 및 백혈구 관련 케모카인의 발현에 대한 본 발명의 혼합추출물의 효과를 나타낸 도이다:

A 및 B는 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction)으로 분석한 전염증성 사이토카인, iNOS 및 백혈구 관련 케모카인의 발현을 나타내며, C 내지 I는 A 및 B의 상대적인 mRNA의 발현 정도를 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델; 및

추출물 : EAE가 유도되지 않은 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 10은 EAE가 유도된 동물모델에서 미세아교세포의 활성화에 대한 본 발명의 혼합추출물의 효과를 미세아교세포의 마커인 Iba-1(ionized calcium-binding adapter molecule-1)에 대한 항체를 이용하여 면역염색하여 사진으로 나타낸 도이다:

A 및 E는 정상대조군의 사진이고, B 및 F는 EAE가 유도된 동물모델의 사진이고, C 및 G는 EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델의 사진이며, D 및 H는 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델의 사진이고, I는 Iba-I 단백질 발현 정도를 나타낸 도이고, J는 Iba-I 유전자 발현 정도를 나타낸 도이다:

Nor : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델; 및

추출물 : EAE가 유도되지 않은 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 11은 EAE가 유도된 동물모델에서 본 발명의 혼합추출물의 단핵구-유래 면역세포의 침윤 억제를 유세포 분석(flow cytometry assay)을 통해 확인한 도이다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델; 및

추출물 : EAE가 유도되지 않은 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 12는 EAE가 유도된 동물모델에서 본 발명의 혼합추출물의 T 세포의 발현 및 침윤 억제를 확인한 도이다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델; 및

추출물 : EAE가 유도되지 않은 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 13a 내지 도 13b는 EAE가 유도된 동물모델에서 본 발명의 혼합추출물의 Th1, Th17, Th2 및 Treg 세포(T 세포)의 침윤 억제를 유세포 분석을 통해 확인한 도이다:

A 내지 F는 Th1 및 Th17을 나타낸 것이고, G 내지 L은 Th2 및 Treg 세포를 나타낸 것이다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델; 및

추출물 : EAE가 유도되지 않은 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 14는 EAE가 유도된 동물모델에서 본 발명의 혼합추출물의 세포 독성 및 비장 세포의 증식 억제 효과를 확인한 도이다.

도 15a 내지 도 15b는 EAE가 유도된 동물모델에서 본 발명의 혼합추출물의 혈액뇌장벽 투과성 안정화를 확인한 도이다:

A 내지 H는 GFAP 면역염색으로 확인한 도이며, A 및 E는 정상대조군의 사진이고, B 및 F는 EAE가 유도된 동물모델의 사진이며, C 및 G는 EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델의 사진이고, D 및 H는 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델의 사진이며, I는 GFAP 단백질 발현 정도를 나타낸 도이고, J는 GFAP 유전자 발현 정도를 나타낸 도이며, K 내지 P는 ICAM-1, VCAM-1, Claudin-3, Claudin-5 및 Zona occluden-1의 유전자 발현 정도를 나타낸 도이다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델; 및

추출물 : EAE가 유도되지 않은 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 16은 EAE가 유도된 동물모델에서 MAPKs 및 NF-κB 신호기전에 대한 본 발명의 혼합추출물의 효과를 나타낸 도이다:

A는 웨스턴 블롯 분석으로 MAPKs 및 NF-κB 관련 단백질의 발현 정도를 나타내며, B 내지 F는 A의 단백질 발현 정도를 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델; 및

추출물 : EAE가 유도되지 않은 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 17은 본 발명의 혼합추출물의 혈액, 간, 비장 및 신장에서의 독성을 확인한 도이다:

A는 본 발명의 혼합추출물의 농도에 따른 체중 변화를 나타낸 도이고, B 내지 D는 세포 독성을 나타낸 도이다:

Con : EAE가 유도되지 않은 정상대조군;

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델; 및

추출물 : EAE가 유도되지 않은 정상대조군에 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델.

도 18은 EAE가 유도된 동물모델에서 본 발명의 혼합추출물과 시호 추출물 또는 강활 및 방풍 혼합추출물의 효과를 확인한 도이다:

EAE : EAE가 유도된 동물모델;

EAE+추출물 : EAE 유도 후 본 발명의 혼합추출물을 투여한 동물모델;

EAE+BF : EAE 유도 후 시호 추출물을 투여한 동물모델; 및

EAE+AKSD : EAE 유도 후 강활 및 방풍 혼합추출물을 투여한 동물모델.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0032] 본 발명은 강활(*ostericum koreanum*), 독활(*aralia cordata*), 시호(*bupleurum falcatum*), 전호(*anthriscus sylvestris*), 형개(*schizonepeta rhizome*), 방풍(*saposhnikovia*), 적복령(*poria cocos*), 생지황(*rehmannia glutinosa*), 지골피(*lycium chinense*) 및 차전자(*plantago asiatica*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환(autoimmune disease in nervous system) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0033] 상기 신경계 자가면역질환은 다발성경화증(multiple sclerosis), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 중증근무력증(myasthenia gravis), 길랑바레증후군(guillain-barre syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmune uveitis), 급성 파종성뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis), 급성 횡단척수염(acute transverse myelitis), 자가면역성뇌증(autoimmune encephalopathy) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0034] 상기 혼합추출물은 하기와 같은 단계로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0035] 1) 건조한 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0036] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0037] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축하는 단계.

[0038] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출 용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물, 바람직하게는 C_1 내지 C_2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 에탄올 수용액을 사용하는 것이 더욱 바람직하며, 30% 에탄올 수용액을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 용매의 양은 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자의 건조 중량의 5 내지 15배로 하는 것이 바람직하고 7 내지 10배로 하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출방법은 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 또는 초음파추출 등의 추출방법을 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 시 온도는 10℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며 상온인 것이 더욱 바람직하다. 상기 추출 시간은 30분 내지 3시간이 바람직하고, 1시간 내지 2시간이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 횟수는 1회 내지 5회인 것이 바람직하고 3회인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0039] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하며, 건조는 동결건조하는 것이 바람직하다.

[0040] 상기 혼합추출물은 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자를 혼합한 후 추출할 수 있고, 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자를 각각 추출한 추출물을

혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 상기 혼합추출물은 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자를 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1의 중량비로 혼합되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0043] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자의 혼합추출물을 제조한 후, MOG 펩타이드에 의해 유도된 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) 동물모델에 도 1의 프로토콜(protocol)의 방법으로 투여한 결과, EAE에 의한 질병의 임상증상을 개선시키는 효과를 확인하였고(도 1 내지 도 4 참조), 본 발명의 혼합추출물의 성분을 확인한 결과, 옥시포이세다닌(oxypeucedanin; 강활의 성분)과 복령산(pachymic acid; 적복령의 성분)이 표준그래프와 동일하게 확인되었다(도 5 참조).

[0044] 또한, 본 발명자들은 신경계 자가면역질환의 예방 및 치료의 효과를 확인하기 위해, EAE 동물모델에 본 발명의 혼합추출물을 처리한 후, 혈액학적인 변화를 조절하는지 확인하기 위하여 염증세포의 수를 확인한 결과, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 EAE에 의하여 증가한 말초혈액 내의 백혈구의 수를 감소시키는 것을 확인하였고(도 6 참조), 혼합추출물의 EAE 동물모델에서의 탈수초화 현상 및 면역세포의 침윤 억제 효과를 확인한 결과, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 탈수초화 정도와 면역세포의 침윤 정도를 감소시켰으며, MBP의 발현 정도 및 염증 세포의 침윤 정도도 감소시키는 것을 확인하였다(도 7 내지 도 8 참조).

[0045] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 혼합추출물의 전염증성 사이토카인, iNOS 및 백혈구와 관련한 케모카인의 mRNA 발현 억제 효과를 확인한 결과, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6, 및 iNOS와 백혈구와 관련한 케모카인인 MCP-1, MCP-1α 및 RANTES의 mRNA 발현 정도를 감소시키는 것을 확인하였고(도 9 참조), 미세아교세포의 활성화 억제 효과를 확인한 결과, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 Iba-1 면역양성 미세아교세포의 활성화 정도 및 발현을 감소시키는 것을 확인하였으며(도 10 참조), 단핵구-유래 면역세포의 침윤 억제를 확인한 결과, 미세아교세포 및 대식세포의 침윤 정도를 감소시키는 것을 확인하였고(도 11 참조), Th1, Th17 및 Treg 세포(T세포)의 분화 및 침윤 억제를 확인한 결과, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 T세포의 침윤 정도를 감소시키고, Th1 및 Th17 세포의 침윤 정도를 감소시키는 것을 확인하였다(도 12 내지 도 13b 참조).

[0046] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 혼합추출물의 비장 세포의 증식 억제를 확인한 결과, 본 발명의 혼합추출물은 세포 독성을 나타내지 않으며, EAE 유도에 의해 증가된 비장 세포의 증식을 억제시키는 것을 확인하였고(도 14 참조), 혈액뇌장벽 투과성 안정화를 확인한 결과, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 GFAP 면역양성 성상세포의 활성화 정도 및 발현이 감소하는 것을 확인하였으며(도 15a 참조), EAE+추출물 투여군은 EAE군에서 증가된 ICAM-1 및 VCAM-1을 감소시키고, EAE+추출물 투여군은 EAE군에서 감소된 Claudin-3, Claudin-5 및 Zona occluden-1을 증가시키는 것을 확인하였고(도 15b 참조), MAPKs 및 NF-κB 신호기전 억제효과를 확인한 결과, EAE+추출물 투여군은 EAE에 의해 증가된 p-ERK, p-p38, NF-κB(p65) 및 p-IκB의 발현을 감소시키는 것을 확인하였으며(도 16 참조), 본 발명의 혼합추출물은 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였고(도 17 참조), 비교군(강활 및 방풍 혼합추출물 또는 시호 단독추출물)과의 임상증상 척도 개선을 비교한 결과, 비교군에 비해 임상증상의 척도를 더욱 효과적으로 개선하는 것을 확인하였다(도 18 참조).

[0047] 따라서, 본 발명의 혼합추출물은 MOG 펩타이드에 의해 유도된 EAE 동물모델에서 질병의 신경학적인 임상증상 척도를 개선하고, EAE에 의해 증가된 말초혈액 내의 백혈구의 수를 감소시키고, 척수의 탈수초화, 염증세포의 침윤, 미세아교세포의 활성화 및 침윤을 감소시키며, 전염증성 사이토카인, iNOS 및 백혈구와 관련한 케모카인의 발현과 MAPKs 및 NF-κB의 신호기전 및 비장 세포의 증식을 억제하고, 혈액뇌장벽을 안정화시키면서 세포독성은 나타내지 않으면서, 강활 및 방풍 혼합추출물이나 시호 단독추출물에 비해 질병의 신경학적인 임상증상 척도를 더 효과적으로 개선하므로, 상기 혼합추출물은 신경계 자가면역질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 활용할 수 있다.

[0049] 상기 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0050] 상기 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사 또는 흉부내주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되

는 것은 아니다.

[0051] 상기 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 생지황, 복령, 인삼 및 꿀의 혼합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 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 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 1 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 ㎎/kg으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0054] 또한, 본 발명은 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환 예방 및 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

[0055] 상기 신경계 자가면역질환은 다발성경화증, 시신경척수염, 중증근무력증, 길랑바레증후군, 자가면역성 포도막염, 급성 파종성뇌척수염, 급성 횡단척수염, 자가면역성뇌증 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0056] 상기 혼합추출물은 하기와 같은 단계로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0057] 1) 건조한 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0058] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0059] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축하는 단계.

[0060] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출 용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물, 바람직하게는 C_1 내지 C_2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 에탄올 수용액을 사용하는 것이 더욱 바람직하며, 30% 에탄올 수용액을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 용매의 양은 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자의 건조 중량의 5 내지 15배로 하는 것이 바람직하고 7 내지 10배로 하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출방법은 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 또는 초음파추출 등의 추출방법을 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 시 온도는 10℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며 상온인 것이 더욱 바람직하다. 상기 추출 시간은 30분 내지 3시간이 바람직하고, 1시간 내지 2시간이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 횟수는 1회 내지 5회인 것이 바람직하고 3회인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0061] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하며, 건조는 동결건조하는 것이 바람직하다.

[0062] 상기 혼합추출물은 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자를 혼합한 후 추출

할 수 있고, 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자를 각각 추출한 추출물을 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0063] 상기 혼합추출물은 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자를 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1의 중량비로 혼합되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0064] 본 발명의 혼합추출물은 MOG 펩타이드에 의해 유도된 EAE 동물모델에서 질병의 신경학적인 임상증상 척도를 개선하고, EAE에 의해 증가된 말초혈액 내의 백혈구의 수를 감소시키고, 척수의 탈수초화, 염증세포의 침윤, 미세아교세포의 활성화 및 침윤을 감소시키며, 전염증성 사이토카인, iNOS 및 백혈구와 관련한 케모카인의 발현과 MAPKs 및 NF-κB의 신호기전 및 비장 세포의 증식을 억제하고, 혈액뇌장벽을 안정화시키면서 세포독성은 나타내지 않으면서, 강활 및 방풍 혼합추출물이나 시호 단독추출물에 비해 질병의 신경학적인 임상증상 척도를 더 효과적으로 개선하므로, 상기 혼합추출물은 신경계 자가면역질환 예방 및 개선용 건강 기능 식품의 유효성분으로 활용할 수 있다.

[0066] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스켓, 떡, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0067] 본 발명의 혼합추출물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량 %로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 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.

[0068] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 혼합추출물을 함유하는 것 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 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0069] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿2등), 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 혼합추출물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 혼합추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0071] 이하 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0072] 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0074] **<실시예 1> 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자의 혼합추출물의 제조**

[0075] **<1-1> 혼합 열수추출물의 제조**

[0076] 건조한 강활, 독활, 시호, 전호, 형개, 방풍, 적복령, 생지황, 지골피 및 차전자를 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1 비율로 200 g으로 혼합한 후 환류추출기에 증류수 2.0 L와 함께 넣고 1.5시간 동안 방치한 다음 가열하여 탕액이 끓기 시작하는 시점부터 1.5시간 동안 더 가열하였다. 상기 추출액을 여과지로 감압 여과한 후, 여과액을 진공감압

농축기를 사용하여 농축액을 만든 다음 동결건조기를 이용하여 분말 시료를 만들어 실험에 사용하였다(DW).

[0078] **<1-2> 100% 에탄올 혼합추출물 제조**

[0079] 추출용매로 물 대신 100% 에탄올을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 <1-1>의 추출방법과 동일하게 추출하였다(100% ethanol).

[0081] **<1-3> 70% 에탄올 혼합추출물 제조**

[0082] 추출용매로 물 대신 30% 물과 70% 에탄올을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 <1-1>의 추출방법과 동일하게 추출하였다(70% ethanol).

[0084] **<1-4> 30% 에탄올 혼합추출물 제조**

[0085] 추출용매로 물 대신 70% 물과 30% 에탄올을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 <1-1>의 추출방법과 동일하게 추출하였다(30% ethanol).

[0087] **<실시예 2> 마이엘린 희소돌기아교세포 당단백질(MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein) 펩타이드에 의해 유도된 동물모델 제조**

[0088] 본 발명의 혼합추출물의 효과를 알아보기 위해 하기와 같은 방법으로 MOG 펩타이드에 의해 유도된 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) 동물모델을 제조하였다.

[0089] 구체적으로, 동물모델은 출생 후 8-9주령의 암컷 C57BL/6 마우스(18-20 g)(Narabiotech Co., Ltd., 대한민국)를 준비하여 일주일 동안 안정시킨다. 마우스에 MOG 펩타이드 35-55(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; 서열번호 : 1, Anygen, 미국) 200 ㎍이 포함된 인산완충식염수 100 ㎕와 결핵균(mycobacterium tuberculosis) 550 ㎍이 포함된 완전프로인트항원보강제(CFA, complete Freund's adjuvant) 100 ㎕를 혼합하여 양쪽 허리부위의 피하에 주사하였고, 동시에 백일해독소(PTX, pertussis toxin, Sigma, 미국) 250 ng을 복강으로 주사하였다. 48시간 후에 동일한 양의 백일해독소를 복강으로 다시 주사하였다.

[0090] MOG에 의해 유도된 EAE 동물모델은 네 그룹으로 디자인하였다.

[0091] 도 1에 나타낸 바와 같이, MOG 펩타이드와 같은 날부터 혼합추출물을 투여한 실험군(전투여, pre-treatment), EAE 유도 후 6 내지 8일부터 혼합추출물을 투여한 실험군(온셋투여, onset-treatment), EAE 유도 후 12일부터 혼합추출물을 투여한 실험군(후투여, post-treatment) 및 EAE 유도 후 임상증상이 가장 높은 날부터 혼합추출물을 투여한 실험군(최고점투여, peak-treatment)으로 진행하였다(도 1). 따로 표기하지 않은 경우에는 온셋투여로 실험을 진행하였다.

[0093] **<실시예 3> 혼합추출물의 신경계 자가면역질환에서의 효과 확인**

[0094] **<3-1> 신경학적인 행동 변화 확인**

[0095] 상기 마우스의 EAE가 유도된 날부터 30일 동안 매일 몸무게를 측정하였으며, 임상 증상의 척도를 하기의 7가지로 구분하여 확인하였다.

[0096] 질병의 임상증상은 EAE 유도 후, 5일 내지 7일 사이에 나타나기 시작하여 14일 내지 17일에 임상 증상이 최고조에 달하는 것을 확인하였다. 임상 증상의 척도는, 반응이 없음(0 단계), 꼬리 끝이 처짐(1 단계), 꼬리 전체가 처짐(2 단계), 한쪽 뒷다리의 약한 마비(3 단계), 양쪽 뒷다리의 마비(4 단계), 한쪽 앞 다리까지 마비(5 단계), 앞쪽 양쪽 다리까지 마비(6 단계) 및 죽음(7 단계)으로 구분하였다.

[0097] 혼합추출물의 추출방법에 따른 EAE에 대한 효과를 확인하기 위하여 추출방법별 두 가지 농도를 정하여 확인하였다.

[0098] 구체적으로, 상기 <실시예 1>과 동일한 방법으로 제조한 열수 혼합추출물(15 mg/kg 및 30 mg/kg), 30% 에탄올

혼합추출물(15 mg/kg 및 30 mg/kg), 70% 에탄올 혼합추출물(10 mg/kg 및 20 mg/kg) 및 100% 에탄올 혼합추출물(5 mg/kg 및 10 mg/kg)을 EAE 유도한 후 온셋투여로 투여한 후 임상증상 및 체중을 확인하였다.

[0099] 그 결과 도 2a 내지 도 2b에 나타낸 바와 같이, 열수, 30%, 70% 및 100% 에탄올로 추출한 혼합추출물은 각각 20, 15, 30 및 10 mg/kg의 농도에서 가장 효과적으로 EAE의 임상증상을 회복시키는 것을 확인하였으며(도 2a 내지 도 2b), 이를 다시 비교하여 확인한 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 30% 에탄올로 추출한 혼합추출물 15 mg/kg이 가장 효과적인 것을 확인하였다(도 3).

[0101] 이에, 30% 에탄올로 추출한 15 mg/kg 농도의 혼합추출물을 사용하여 혼합추출물의 투여 시간에 따른 EAE에 대한 효과를 확인하였다.

[0102] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>와 동일한 방법으로 제조한 30% 에탄올 혼합추출물(15 mg/kg)을 상기 <실시예 2> 및 도 1에 나타난 방법으로 네 가지 그룹으로 투여한 후 임상증상을 확인하였다.

[0103] 그 결과 도 4에 나타낸 바와 같이, 전투여, 온셋투여 및 후투여 하였을 때 EAE 유도에 의해 증가된 임상증상을 감소시키는 것을 확인하였다(도 4).

[0104] 상기 결과들을 토대로 이후의 실험은 30% 에탄올로 추출한 15 mg/kg 농도의 혼합추출물을 EAE가 유도된 마우스에 온셋투여하여 수행하였다.

[0106] **<3-2> 혼합추출물의 성분 확인**

[0107] 30% 에탄올로 추출한 혼합추출물의 성분을 HPLC(고속 액체 크로마토그래피, high-performance liquid chromatography)를 수행하였다.

[0108] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>와 동일한 방법으로 제조한 30% 에탄올 혼합추출물 1 g을 200 ㎖의 70% 메탄올에 녹이고, 0.45 ㎛ PVDF(polyvinylidene difluoride) 필터로 여과하였다. 혼합추출물의 정성분석에 사용되는 표준물질은 사이코사포닌(saikosaponin) A(시호), 옥시포이세다닌(oxypeucedanin)(강활), 풀레곤(pulegone)(형개), 프림-O-글루코실시미푸긴(prim-O-glucosylcimifugin)(방풍) 및 복령산(pachymic acid)(복령)이다. 표준 저장용액은 50 ㎖의 메탄올에 5 mg 시료를 각각 용해시켜 준비하였다. 시료는 30℃에서 phenomenex luna C18 reverse phase C18(250 × 4.6 ㎜, 5 ㎛)(Phenomenex, Torrance, 미국)로 분리하였다. 검출 파장은 UV 210(사이코사포닌 A, 풀레곤 및 복령산) 및 254(옥시포이세다닌 및 프림-O-글루코실시미푸긴)이다. 이동상은 (A) 아세토나이트릴(acetonitrile)/물(40/60, v/v)을 구성으로하여, 유속 1.0 ㎖/분으로 하였다.

[0109] 그 결과 도 5에 나타낸 바와 같이, 30% 에탄올 혼합추출물은 대표적인 지표물질인 옥시포이세다닌과 복령산을 포함하고 있었다(도 5).

[0111] **<3-3> 말초혈액 내의 백혈구의 수 변화 확인**

[0112] 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물의 EAE 동물모델에서의 혈액학적인 변화를 조절하는지 확인하기 위하여 염증세포의 수를 확인하였다.

[0113] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>와 동일한 방법으로 제조한 30% 에탄올 혼합추출물(15 mg/kg)을 EAE를 유도한 후에 온셋투여로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 18일 사이에 마우스를 마취하고 심장을 통하여 혈액을 채취한 다음 에틸렌디아민테트라 아세틱산(EDTA, ethylenediaminetetra acetic acid)가 함유된 채혈관(BD, 미국)에 담아 혈액이 응고되지 않게 잘 흔들어주고, 혈액이 든 채혈관을 수집 후 1 내지 2시간 이내에 네오딘의학연구소(서울, 대한민국)로 보내어 혈액학적인 분석을 시행하여 혈중 염증세포의 수를 확인하였다.

[0114] 그 결과 도 6에 나타낸 바와 같이, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 EAE에 의하여 증가한 말초혈액 내의 백혈구의 수를 감소시키는 것을 확인하였다(도 6).

[0116] **<3-4> 척수의 탈수초화 및 면역세포의 침윤 억제 확인**

[0117] 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물의 EAE 동물모델에서의 탈수초 현상의 억제 효과를 확인하기 위하여 수초의 주성분인 인지질을 염색하는 룩솔페스트블루(LFB) 염색을 통해 탈수초화 정도를 비교하고, H&E 염색을 통해 면역세포의 침윤 정도를 비교하기 위해 실험을 하여 확인하였다.

[0118] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>와 동일한 방법으로 제조한 30% 에탄올 혼합추출물(15 ㎎/㎏)을 EAE를 유도한 후에 온셋투여로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 18일 사이에 마우스를 마취하고 4% 파라포름알데하이드(PFA, paraformaldehyde)를 심장으로 관류하여 고정하고 허리부위의 척수(요수 4-5번; L4-5)를 적출하였다. 적출한 척수는 4% PFA에 담가 4℃에서 하루 정도 더 고정시킨 다음 30% 수크로스(sucrose)로 바꾸어 4℃에서 3일 이상 기간 동안 보관하여 동결손상을 방지하였다. 동결절편기를 이용하여 척수를 30 ㎛ 두께로 잘라 PBS에 5분간 담근 후 95% 에탄올에 5분 동안 담갔다. 그 후 95% 에탄올에 녹아있는 0.1% 룩솔페스트블루 용액에 조직을 담가 56℃에서 14시간 동안 방치한 다음 0.5% 리튬 카보네이트(lithium carbonate) 용액과 70% 에탄올, 증류수에 순서대로 각각 30초씩 담그는 과정을 5-6회 반복하여 색을 조절한 뒤 95%, 100% 에탄올에 5분씩 담가 탈수한 후 자일렌(xylene)에 담근 뒤 커버 그라스를 덮었다. 척수 바깥부분의 백질에 축삭이 존재하기 때문에 정상 조직을 염색한 경우에는 척수 백질이 진한 파란색으로 나타나지만, 외상 후 탈수초화 현상으로 인하여 수초가 소실되게 되면 듬성듬성 염색이 되며 흐린 파란색을 띤다.

[0119] 또한, 탈수초화 정도를 확인하기 위하여 수초의 마커인 수초기초단백질(myelin basic protein, MBP)의 발현을 웨스턴 블롯을 이용해서 확인하였다.

[0120] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>와 동일한 방법으로 제조한 30% 에탄올 혼합추출물(15 ㎎/㎏)을 EAE를 유도한 후에 온셋투여로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 18일 사이에 마우스를 마취하여 안락사한 뒤 허리부위의 척수(요수 4-5번; L4-5)를 적출하였고, 이를 단백질 용해 완충액(protein lysis buffer; 10 mM 트리스, 0.5 mM EDTA, 0.25 M 수크로스) 200 ul를 넣고 분쇄기를 이용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 소혈청알부민(BSA, bovine serum albumin, sigma, 미국)를 사용한 Bradford(Bio-rad, 미국) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤 단백질 30 ㎍은 10% SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF(polyvinylidene difluoride)멤브레인(membrane, Gendepot, 영국)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% 탈지유(skimmed milk, BD, 미국)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBST로 씻은 후 1차 항체 MBP(Millipore, 미국)를 3% 탈지유에 1:1,000으로 희석시켜 4℃에서 하루 동안 반응시킨 후 TBST로 10분씩 3회 씻고 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBST에 씻은 뒤 ECL system(Santacruz, 미국)로 밴드를 확인하였다. 단백질의 확인 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+(Bio-Rad)를 이용하였다.

[0121] 그 결과 도 7에 나타낸 바와 같이, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 탈수초화 정도와 면역세포의 침윤 정도를 감소시키고, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 MBP의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 7).

[0123] 또한, 염증 세포의 침윤을 확인하기 위해 H&E 염색을 수행하였다.

[0124] 구체적으로, 상기와 동일한 방법으로 준비한 척수조직을 H&E 염색을 위해 슬라이드에 두고 헤마톡실린(hematoxylne) 용액을 떨어뜨려 3분간 기다린 후 증류수로 1분씩 세 번 세척하였다. 그리고 에오진(eosin) 용액을 떨어뜨려 10분간 기다린 후 증류수로 1분씩 세 번 세척하였으며, 70%, 90%, 95%, 100% 에탄올에 차례로 2분간 담그어 탈수하였다.

[0125] 그 결과 도 8에 나타낸 바와 같이, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 염증 세포의 침윤 정도를 감소시키는 것을 확인하였다(도 8).

[0127] **<3-5> 전염증성 사이토카인(cytokines), iNOS 및 백혈구와 관련한 케모카인(chemokines)의 mRNA 발현 억제 확인**

[0128] 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물의 전염증성 사이토카인, iNOS 및 백혈구와 관련한 케모카인의 mRNA 발현 억제 효과를 확인하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction) 실험을 하였다.

[0129] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>와 동일한 방법으로 제조한 30% 에탄올 혼합추출물(15 ㎎/㎏)을 EAE를 유도한 후에 온셋투여로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 18일 사이에 마우스를 마취하여 안락사한 뒤

허리부위의 척수(요수 4-5번; L4-5)를 적출하여 트리졸(Trizol, Invitrogen, 미국) 1 ml을 넣고 분쇄기로 조직을 갈고 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 RT-PCR kit(Invitrogen, 미국)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 cDNA 4 ul와 하기 표 1에 기재된 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6, 및 iNOS와 백혈구와 관련한 케모카인인 MCP-1, MCP-1α 및 RANTES 프라이머(Bionics, 미국)를 각각 1 ul와 2x SYBR GREEN(ABI) 5 ul를 이용하여 50℃ 2분 1회, 95℃ 10분 1회, 95℃ 15초, 60℃ 1분 40회의 조건으로 ABI PRIAM 7500 기기를 통하여 실시간 RT-PCR 분석법을 사용하여 측정하여 확인하였다.

표 1

[0131]

목적 유전자	primer			
	명칭	서열	방향	서열번호
CD11b	CD11b_F	TGC TTA CCT GGG TTA TGC TTC TG	정방향	서열번호 : 2
	CD11b_R	CCG AGG TGC TCC TAA AAC CA	역방향	서열번호 : 3
CD3	CD3_F	CTC TGG GCT TGC TGA TGG	정방향	서열번호 : 4
	CD3_R	GGT TGG GAA CAG GTG GTG	역방향	서열번호 : 5
Claudin-3	Claudin3_F	CTG GGA GGG CCT GTG GAT GAA CT	정방향	서열번호 : 6
	Claudin3_R	TCG CGG CGC AGA ATA GAG GAT	역방향	서열번호 : 7
Claudin-5	Claudin5_F	ACG GGA GGA GCG CTT TAC	정방향	서열번호 : 8
	Claudin5_R	GTT GGC GAA CCA GCA GAG	역방향	서열번호 : 9
GAPDH	GAPDH_F	AGG TCA TCC CAG AGC TGA ACG	정방향	서열번호 : 10
	GAPDH_R	CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA T	역방향	서열번호 : 11
GFAP	GFAP_F	CGA GTC CCT AGA GCG GCA AAT G	정방향	서열번호 : 12
	GFAP_R	CGG ATCT GGA GGT TGG AGA AAG TC	역방향	서열번호 : 13
ICAM-1	ICAM1_F	TGC GTT TTG GAG CTA GCG GAC CA	정방향	서열번호 : 14
	ICAM1_R	CGA GGA CCA TAC AGC ACG TGC AG	역방향	서열번호 : 15
IL-1β	IL1b_F	TTG TGG CTG TGG AGA AGC TGT	정방향	서열번호 : 16
	IL1b_R	AAC GTC ACA CAC CAG CAG GTT	역방향	서열번호 : 17
IL-6	IL6_F	TCC ATC CAG TTG CCT TCT TGG	정방향	서열번호 : 18
	IL6_R	CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G	역방향	서열번호 : 19
iNOS	iNOS_F	GGC AAA CCC AAG GTC TAC GTT	정방향	서열번호 : 20
	iNOS_R	TCG CTC AAG TTC AGC TTG GT	역방향	서열번호 : 21
MCP-1	MCP1_F	CTT CTG GGC CTG CTG TTC A	정방향	서열번호 : 22
	MCP1_R	CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA	역방향	서열번호 : 23
MCP-1α	MCP1a_F	CAG CCA GGT GTC ATT TTC CT	정방향	서열번호 : 24
	MCP1a_R	AGG CAT TCA GTT CCA GGT CA	역방향	서열번호 : 25
RANTES	RANTES_F	ACA CCA CTC CCT GCT GCT TT	정방향	서열번호 : 26
	RANTES_R	GAC TGC AAG ATT GGA GCA CTT G	역방향	서열번호 : 27
TNF-α	TNFa_F	AGC AAA CCA CCA AGT GGA GGA	정방향	서열번호 : 28
	TNFa_R	GCT GGC ACC ACT AGT TGG TTG T	역방향	서열번호 : 29
VCAM-1	VCAM1_F	CCT CAC TTG CAG CAC TAC GGG CT	정방향	서열번호 : 30
	VCAM1_R	TTT TCC AAT ATC CTC AAT GAC GGG	역방향	서열번호 : 31
Zona occluden-1	Zona occluden1_F	AAG GCA ATT CCG TAT CGT TG	정방향	서열번호 : 32
	Zona occluden1_R	CCA CAG CTG AAG GAC TCA CA	역방향	서열번호 : 33

[0133] 그 결과 도 9에 나타낸 바와 같이, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6, 및 iNOS와 백혈구와 관련한 케모카인인 MCP-1, MCP-1α 및 RANTES의 mRNA 발현 정도를 감소시키는 것을 확인하였다(도 9).

[0135] **<3-6> 미세아교세포의 활성화 억제 확인**

[0136] 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물의 미세아교세포의 활성화 억제 효과를 확인하기 위하여 H&E 염색을 수행하였다.

[0137] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>와 동일한 방법으로 제조한 30% 에탄올 혼합추출물(15 ㎎/㎏)을 EAE를 유도한 후에 온셋투여로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 18일 사이에 마우스를 마취하여 안락사한 뒤 허리부위의 척수(요수 4-5번; L4-5)를 적출하였고 적출한 척수는 4% PFA에 담가 4℃에서 하루 정도 고정시킨 다음 30% 수크로스로 바꾸어 4℃에서 3일 이상 기간 동안 보관하여 동결손상을 방지하였다. 동결절편기를 이용하여 척수를 30 ㎛ 두께로 잘라 동결 절편을 제작하여 H&E 염색을 위해 척수조직을 슬라이드에 두고 헤마톡실린(hematoxylne) 용액을 떨어뜨려 3분간 기다린 후 증류수로 1분씩 세 번 세척하였다. 그리고 에오진(eosin) 용액을 떨어뜨려 10분간 기다린 후 증류수로 1분씩 세 번 세척하였으며, 70%, 90%, 95%, 100% 에탄올에 차례로 2분간 담그어 탈수하였다. 미세아교세포의 마커인 Iba-1(ionized calcium-binding adapter molecule-1)에 대한 항체를 이용하여 면역염색 시행하였으며 정량적으로 분석하여 염증반응의 정도를 확인하였다.

[0138] 또한, Iba-1 항체를 이용하여 상기 실시예 <3-4>와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였고, 상기 표 1의 CD11b 프라이머를 사용하여 상기 실시예 <3-5>와 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하였다.

[0139] 그 결과 도 10에 나타낸 바와 같이, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 Iba-1 면역양성 미세아교세포의 활성화 정도 및 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 10).

[0141] **<3-7> 척수에서 단핵구-유래 면역세포의 침윤 억제 확인**

[0142] 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물의 EAE 동물모델의 척수에서 단핵구-유래 면역세포의 침윤 억제를 유세포분석(flow cytometry assay)을 통해 확인하였다.

[0143] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>와 동일한 방법으로 제조한 30% 에탄올 혼합추출물(15 ㎎/㎏)을 EAE를 유도한 후에 온셋투여로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 18일 사이에 마우스를 마취하여 안락사한 뒤 허리부위의 척수(요수 4-5번; L4-5) 및 림프절을 적출하였다. 적출한 조직으로부터 단일세포 현탄액을 제조하였고(300 g에서 5분 동안 원심분리), 2% PFA로 고정시킨 다음 PBS에 2% FBS가 포함된 세척 용액으로 세척하였다. 이를 마우스 항-렛트 CD32(BD Bioscience)에 10분 동안 반응시켜 Fc 수용체를 블로킹하였고, 2% FBS 세척 용액으로 2번 세척하였다. 형광 표지된 면역 마커의 세포표면염색을 위해 세포는 APC 항-렛트 CD4(OX-35, BD Biosciences), PE 항-렛트 CD8a(OX-8, BD Biosciences), APC 항-렛트 CD11b/c(OX-42; Biolegend) 및 PE 항-렛트 CD45(OX-1; Biolegend)와 함께 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 염색되지않은 세포는 음성 대조군으로 사용하였다. 또한, 세포 내 염색의 경우, PMA(phorbol 12-myristate-13-acetate, Sigma), 이오노마이신(ionomycin)(Sigma) 및 Golgistop(protein transport inhibitor, BD Biosciences)으로 5시간 동안 재자극하였다. 자극한 후, 세포는 PerC3 항-렛트 CD4(OX-35, BD Biosciences), FITC 항-렛트 IFN-γ(DB-1; BD Biosciences), PE 항-마우스/렛트 IL-17A(eBio 17B7; eBiosciences), PE 항-렛트 IL-4(OX-81; BD Biosciences) 또는 APC 항-마우스/렛트 forkhead box P3(Foxp3)(FJK-16s; eBioscience)와 함께 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 염색된 세포는 2% FBS 세척 용액으로 2번 세척하였고, 유세포 분석기에 사용되었다. 데이터는 FACSCalibur flow cytometer(BD Biosciences)로 수집하고, CellQuest Pro software(BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

[0144] 그 결과 도 11에 나타낸 바와 같이, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 미세아교세포 및 대식세포의 침윤 정도를 감소시키는 것을 확인하였다(도 11).

[0146] **<3-8> Th1, Th17 및 Treg 세포(T세포)의 분화 및 침윤 억제 확인**

[0147] 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물의 EAE 동물모델에서 Th1, Th17 및 Treg 세포(T세포)의 분화 및 침윤 억제를 확인하였다.

[0148] 구체적으로, 상기 실시예 <3-5>와 동일한 방법으로 상기 표 1의 T세포 마커인 CD3 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하였고, 상기 실시예 <3-7>과 동일한 방법으로 유세포 분석을 수행하였다.

[0149] 그 결과 도 12에 나타낸 바와 같이, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 T세포의 침윤 정도를 감소시키는 것을 확인하였다(도 12).

[0151] 또한, 상기 실시예 <3-7>과 동일한 방법으로 유세포 분석을 수행한 결과 도 13a 내지 도 13b에 나타낸 바와 같

이, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 Th1 및 Th17 세포의 침윤 정도를 감소시키는 것을 확인하였고(도 13a), EAE+추출물 투여군과 EAE군이 Th2 세포의 침윤 정도는 크게 차이가 없는 것을 확인하였다(도 13b).

[0153] **<3-9> 비장 세포의 증식 억제 확인**

[0154] 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물의 EAE 동물모델에서 비장 세포의 증식 억제를 확인하였다.

[0155] 구체적으로, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 EAE를 유도한 마우스를 마취하여 안락사한 뒤 비장을 적출하였다. 적출한 조직으로부터 단일세포 현탁액을 제조하였고(300 g에서 5분 동안 원심분리), 상기 세포를 10%(v/v) 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)(Gibco, 영국) 및 100 U/㎖ 페니실린(penicillin)을 첨가한 RPMI 1640 배지에 $1x10^5$ 세포/㎖의 농도로 현탁하여 96 웰 플레이트에 접종하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 4시간 동안 배양하였다. 그 후, 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로 제조한 혼합추출물을 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 ㎍/㎖의 농도로 처리하였다. 20시간 동안 더 배양한 후, 5 mg/㎖의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 웰 당 5 ㎕씩 첨가한 후 4시간 더 배양한 후, 상등액을 제거하였고, 이에 DMSO를 100 ㎕씩 첨가하고 10분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 측정기(Bio-Rad Laboratories)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 혼합추출물을 처리하지 않은 세포의 흡광도를 100%로 하여 상대적인 값(%)으로 나타내었다.

[0156] 또한, 상기와 동일한 방법으로 분리한 세포를 10%(v/v) FBS 및 100 U/㎖ 페니실린을 첨가한 RPMI 1640 배지에 $4x10^5$ 세포/웰의 농도로 현탁하여 96 웰 플레이트에 접종하였고, 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로 제조한 혼합추출물(0, 25, 50, 200 ㎍/㎖), MOG(0, 1, 10, 20, 50, 100, 200 ㎍/㎖) 또는 콘카나발린(concanavalin) A(5 ㎍/㎖)를 1 ㎕씩 처리한 후, 37℃, 5% CO_2 조건에서 72시간 동안 배양하였다. 세포는 배양 마지막 18시간 동안 배양 배지에 20 μM의 BrdU(bromodeoxyuridine, Sigma-Aldrich)를 사용하여 표지하였고, 배양 후 300 g로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 세포는 60℃에서 2시간 동안 말려주었고, 70% 에탄올 및 HCL이 포함된 고정 용액으로 상온에서 20분간 고정시켰다. 세포에 항-BrdU-페록시다아제(peroxidase) 항체(Millipore, 독일)을 각 웰에 넣어주고, 상온에서 90분 동안 반응시켰다. PBS로 3번 세척해준 후, 페록시다아제 기질 용액(peroxidase substrate solution)(BD Biosciences, 미국)을 첨가하였다. 기질 반응에 의해 나타나는 색을 흡광도 370 nm에서 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 측정기(Molecular Devices, 미국)를 사용하여 측정하였다.

[0157] 그 결과 도 14에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 혼합추출물은 세포 독성을 나타내지 않으며, EAE 유도에 의해 증가된 비장 세포의 증식을 억제시키는 것을 확인하였다(도 14).

[0159] **<3-10> 혈액뇌장벽(blood-brain barrier, BBB) 투과성 안정화 확인**

[0160] 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물의 EAE 동물모델에서 혈액뇌장벽 투과성 안정화를 확인하였다. 성상세포(astrocytes)는 혈액뇌장벽의 형성과 연관되기 때문에 성상세포 활성화 수준을 확인하였다.

[0161] 구체적으로, 상시 실시예 <3-6>과 동일한 방법으로 GFAP(glial fibrillary acidic protein)에 대한 항체를 이용하여 면역 염색을 시행하였으며, GFAP 항체를 이용하여 상기 실시예 <3-4>와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였고, 상기 표 1의 GFAP 프라이머를 사용하여 상기 실시예 <3-5>와 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. 또한, 상기 표 1의 접착력과 관련된 ICAM-1 및 VCAM-1, 결합 분자인 Claudin-3, Claudin-5 및 Zona occluden-1 프라이머를 사용하여 상기 실시예 <3-5>와 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하였다.

[0162] 그 결과 도 15a 내지 15b에 나타낸 바와 같이, EAE+추출물 투여군은 EAE군에 비하여 GFAP 면역양성 성상세포의 활성화 정도 및 발현이 감소하는 것을 확인하였고(도 15a), EAE군에서 증가된 ICAM-1 및 VCAM-1을 EAE+추출물 투여군은 감소시키고, EAE군에서 감소된 Claudin-3, Claudin-5 및 Zona occluden-1을 EAE+추출물 투여군은 증가시키는 것을 확인하였다(도 15b).

[0163] 이로 인해 본 발명의 추출물이 혈액뇌장벽 안정화에 효과가 있음을 확인하였다.

[0165] **<3-11> MAPKs 및 NF-κB 신호기전 억제 확인**

[0166] 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물의 MAPKs 및 NF-κB 신호기전 억제효과를 확인하기 위해 웨스턴 블롯 실험을 하였다.

[0167] 구체적으로, 상기 실시예 <3-4>와 동일한 방법으로 1차 항체로 ERK(extracellular signal-regulated kinase 1/2), JNK(c-Jun N-terminal kinase), p38, NF-κB(p65) 및 IκB를 사용하여 확인하였다.

[0168] 그 결과 도 16에 나타낸 바와 같이, EAE+추출물 투여군은 EAE에 의해 증가된 p-ERK, p-p38, NF-κB(p65) 및 p-IκB의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다(도 16).

[0169] 이로 인해 척수의 신호전달 경로인 p-ERK, p-p38, NF-κB(p65) 및 p-IκB의 인산화를 억제하여 탈수초화를 감소시키는 것을 확인하였다.

[0171] **<3-12> 혼합추출물의 세포 독성 확인**

[0172] 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물의 혈액, 간, 비장 및 신장에서의 독성을 확인하였다.

[0173] 구체적으로, 정상 암컷 마우스(9주령)에 상기 실시예 <1-4>에서 제조한 혼합추출물을 15, 30 및 60 mg/kg/일씩 35일 동안 투여한 후, 체중을 확인하였고, 간 손상 및 질환의 지표인 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase) 및 LDH(lactate dehydrogenase)의 수치를 IDEXX Laboratories(미국)에서 구입한 키트를 이용하여 혈청 수준을 확인하였으며, 상기 실시예 <3-6>과 동일한 방법으로 H&E 염색으로 조직을 확인하였다.

[0174] 그 결과 도 17에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 혼합추출물은 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다(도 17).

[0176] **<실시예 4> 비교군과 혼합추출물의 신경계 자가면역질환에서의 효과 비교**

[0177] **<4-1> 비교군의 제조**

[0178] 강활(*Angelica koreana*, AK), 방풍(*Saposhnikovia divaricata*, SD) 및 시호(*Bupleurum falcatum*, BF) 각 200 g을 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 열수추출물을 제조하였다.

[0179] 강활 및 방풍은 제조한 건조분말을 1:1의 비율로 혼합하여 실험에 사용하였고(강활 및 방풍 혼합추출물, AKSD), 시호 추출물은 단독추출물(BF)로 실험에 사용하였다.

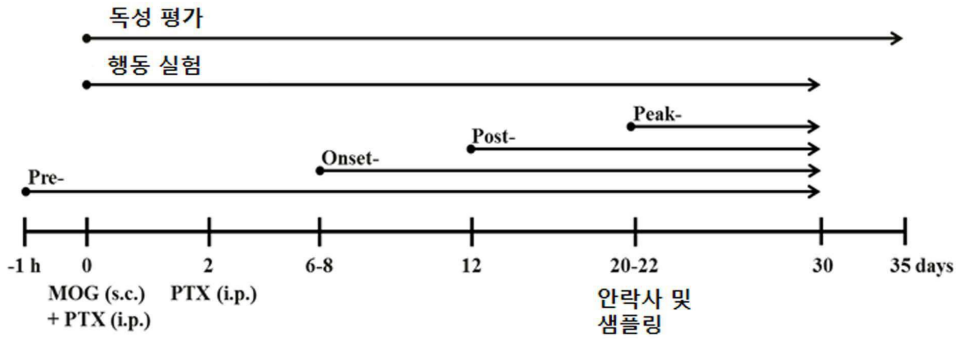
[0181] **<4-2> 비교군과 혼합추출물의 신경학적인 행동 변화 확인**

[0182] 상기 실시예 <4-1>에서 제조한 비교군(강활 및 방풍 혼합추출물, 시호 추출물)과 상기 실시예 <1-4>에서 제조한 본 발명의 혼합추출물의 EAE 유도 동물모델에서의 임상증상의 척도를 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 확인하였다.

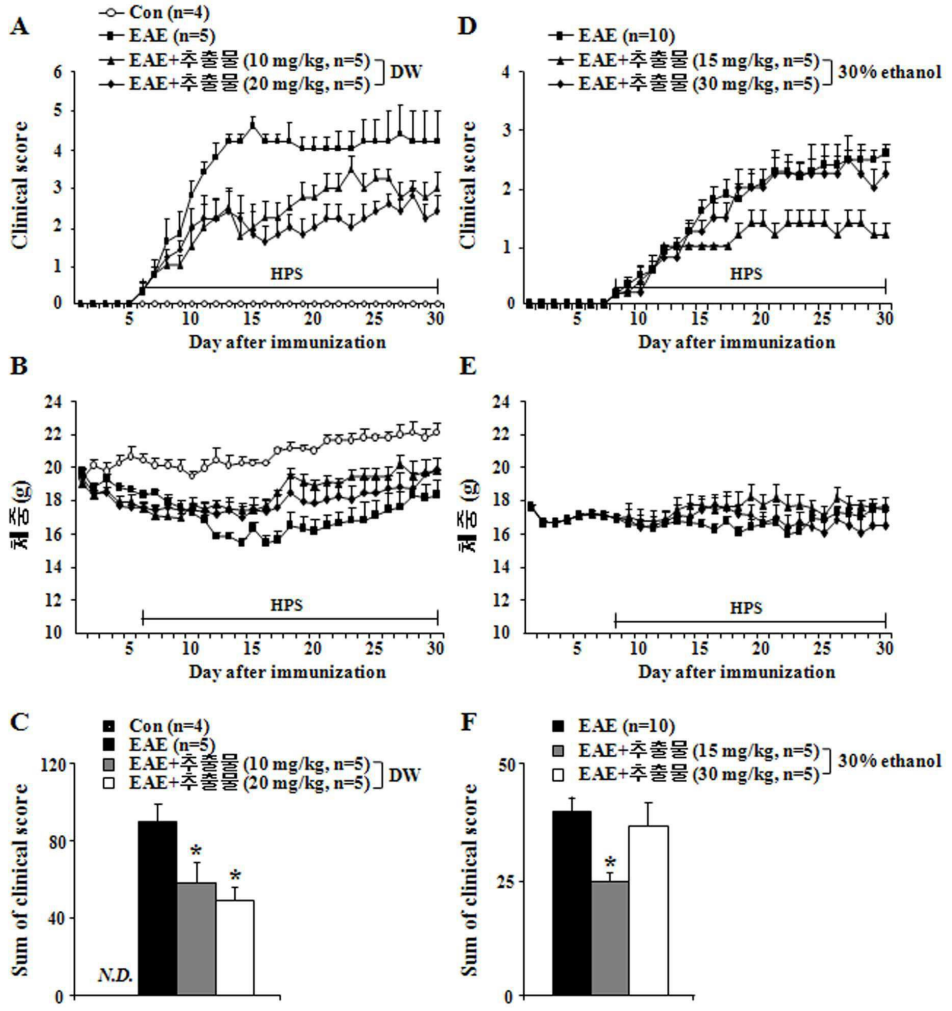
[0183] 그 결과 도 18에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 EAE+추출물 투여군은 EAE+AKSD 투여군이나 EAE+BF 투여군에 비하여 가장 효과적으로 EAE의 임상증상을 회복시키는 것을 확인하였다(도 18).

도면

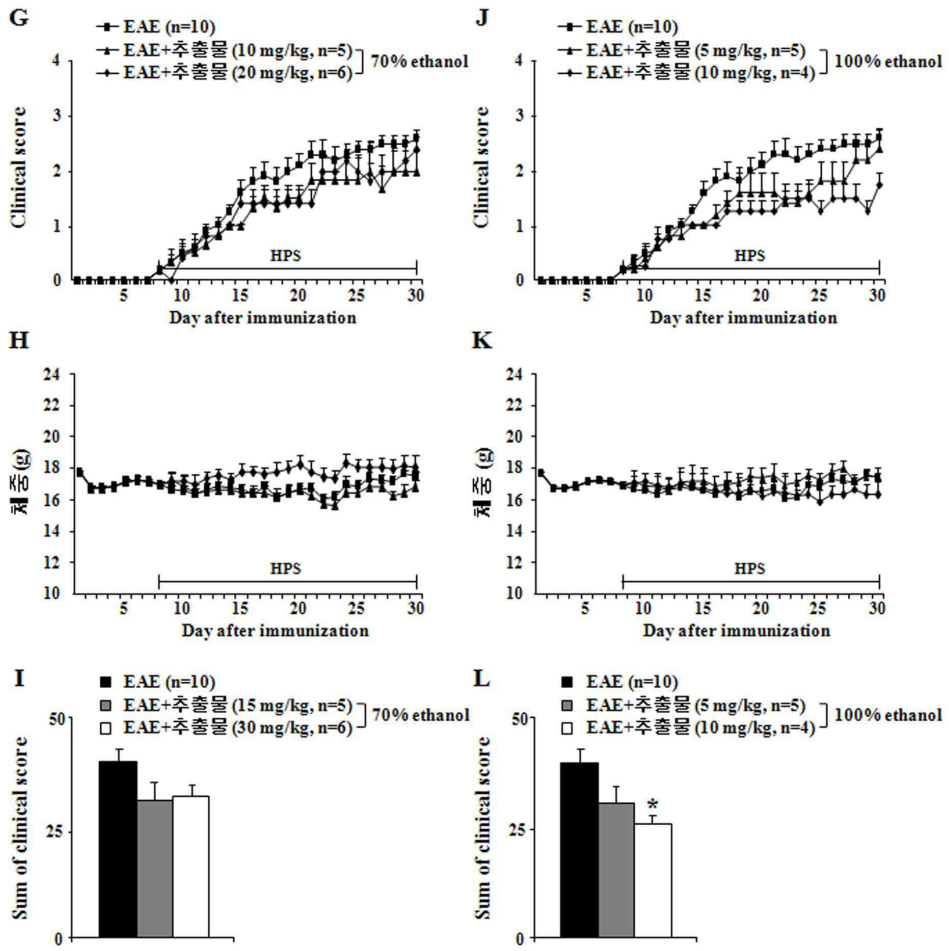
도면1


독성 평가
행동 실험
Peak-
Post-
Onset-
Pre-
-1 h
0
2
6-8
12
20-22
30
35 days
MOG (s.c.)
+ PTX (i.p.)
PTX (i.p.)
안락사 및
샘플링

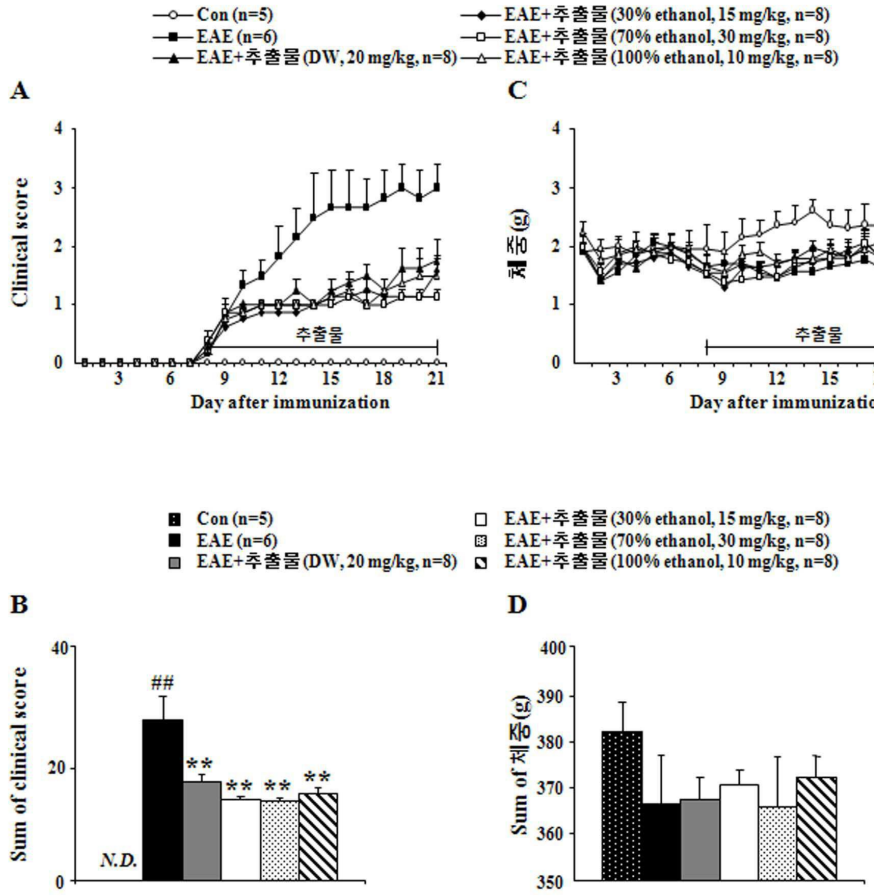
도면2a


A
Con (n=4)
EAE (n=5)
EAE+추출물 (10 mg/kg, n=5)
EAE+추출물 (20 mg/kg, n=5)
DW
Clinical score
HPS
Day after immunization
D
EAE (n=10)
EAE+추출물 (15 mg/kg, n=5)
EAE+추출물 (30 mg/kg, n=5)
30% ethanol
B
E
체중 (g)
C
F
Sum of clinical score
N.D.

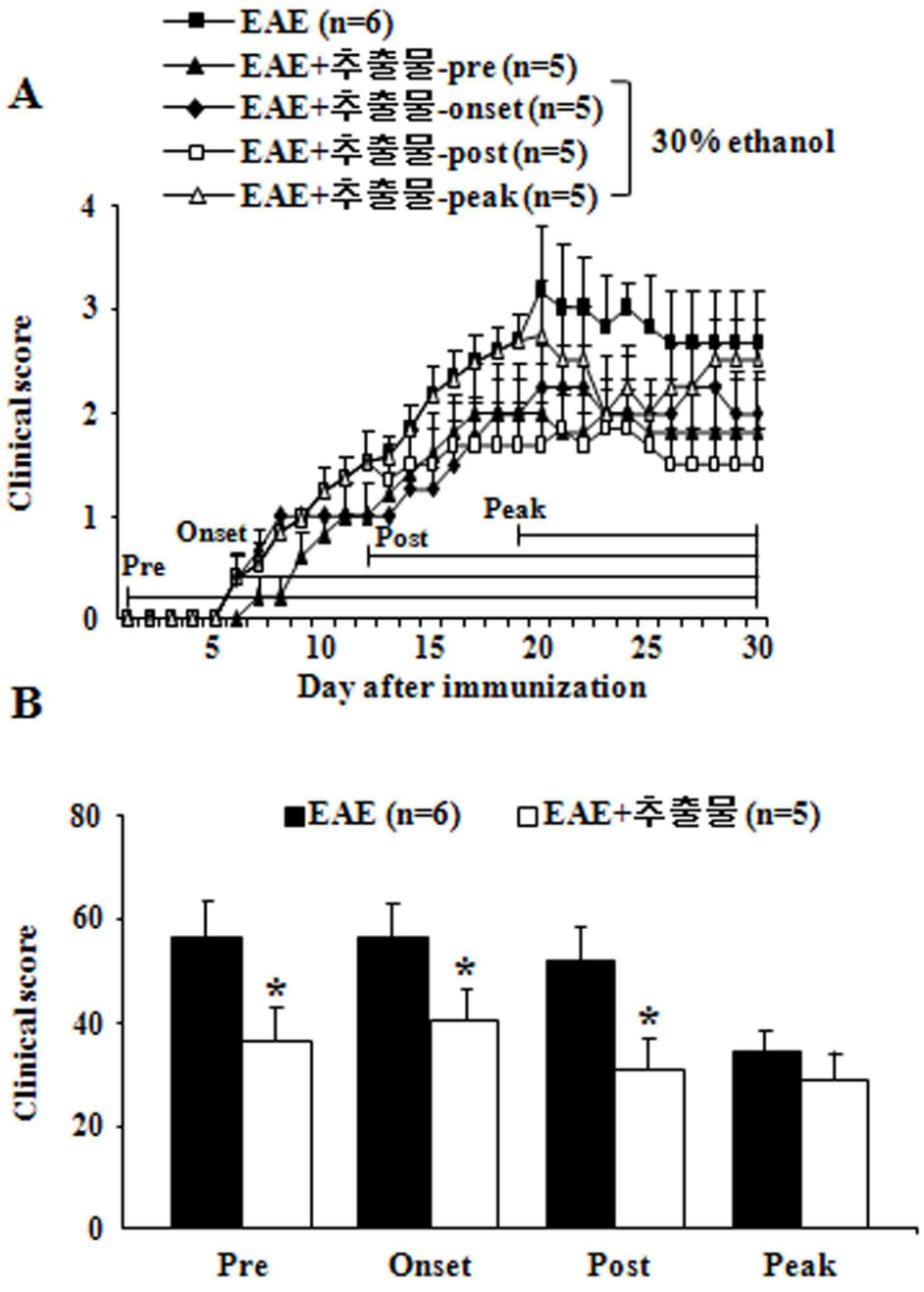
도면2b


G
EAE (n=10)
EAE+추출물 (10 mg/kg, n=5)
EAE+추출물 (20 mg/kg, n=6)
70% ethanol
Clinical score
HPS
Day after immunization
J
EAE (n=10)
EAE+추출물 (5 mg/kg, n=5)
EAE+추출물 (10 mg/kg, n=4)
100% ethanol
Clinical score
HPS
Day after immunization
H
체중(g)
HPS
Day after immunization
K
체중 (g)
HPS
Day after immunization
I
EAE (n=10)
EAE+추출물 (15 mg/kg, n=5)
EAE+추출물 (30 mg/kg, n=6)
70% ethanol
Sum of clinical score
L
EAE (n=10)
EAE+추출물 (5 mg/kg, n=5)
EAE+추출물 (10 mg/kg, n=4)
100% ethanol
Sum of clinical score
*

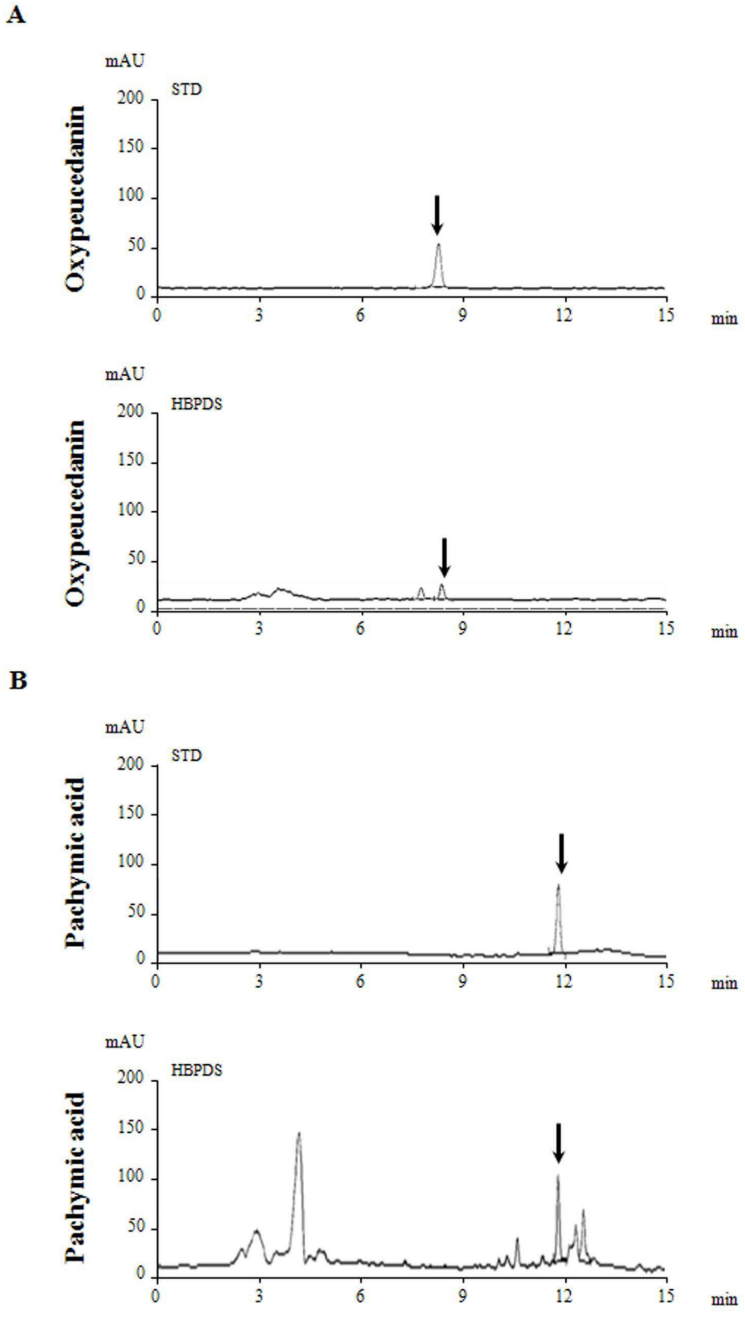
도면3


Con (n=5)
EAE (n=6)
EAE+추출물(DW, 20 mg/kg, n=8)
EAE+추출물(30% ethanol, 15 mg/kg, n=8)
EAE+추출물(70% ethanol, 30 mg/kg, n=8)
EAE+추출물(100% ethanol, 10 mg/kg, n=8)
A
Clinical score
추출물
Day after immunization
C
체중(g)
추출물
Day after immunization
B
Sum of clinical score
N.D.
##
**
D
Sum of 체중(g)

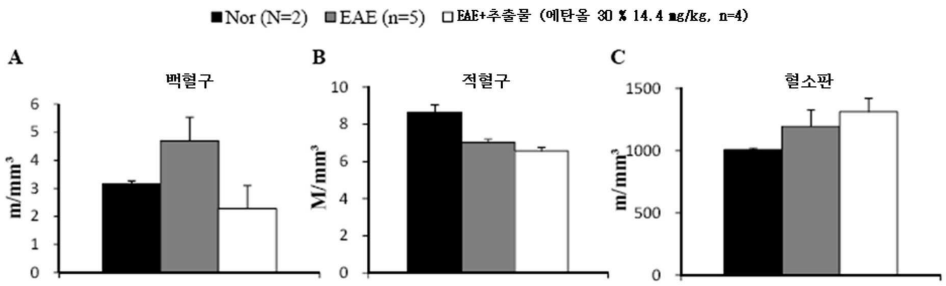
도면4


A
EAE (n=6)
EAE+추출물-pre (n=5)
EAE+추출물-onset (n=5)
EAE+추출물-post (n=5)
EAE+추출물-peak (n=5)
30% ethanol
Clinical score
Pre
Onset
Post
Peak
Day after immunization
B
EAE (n=6)
EAE+추출물 (n=5)
Clinical score
Pre
Onset
Post
Peak

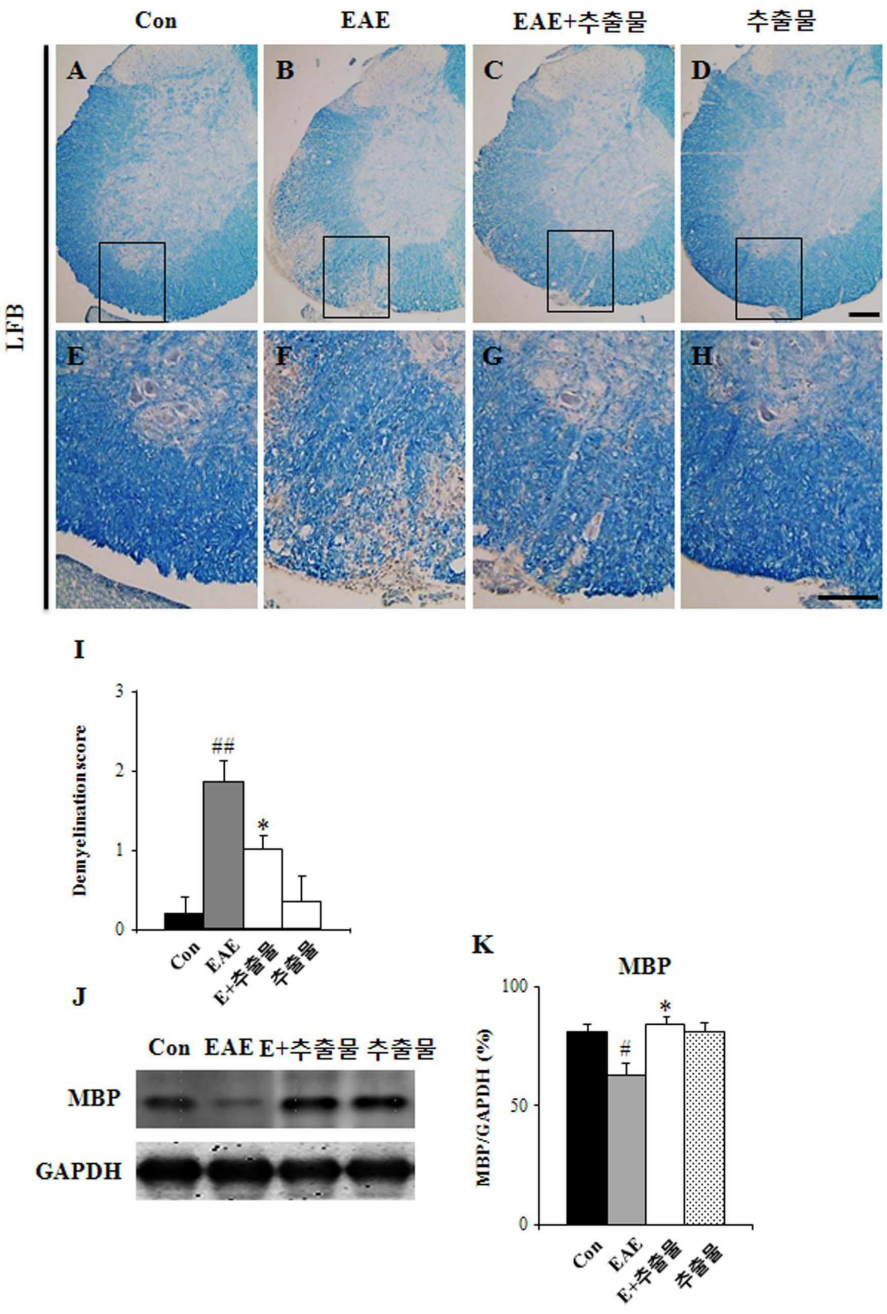
도면5


A
mAU
STD
Oxypeucedanin
200
150
100
50
0
0
3
6
9
12
15
min
mAU
HBPDS
Oxypeucedanin
B
mAU
STD
Pachymic acid
mAU
HBPDS
Pachymic acid

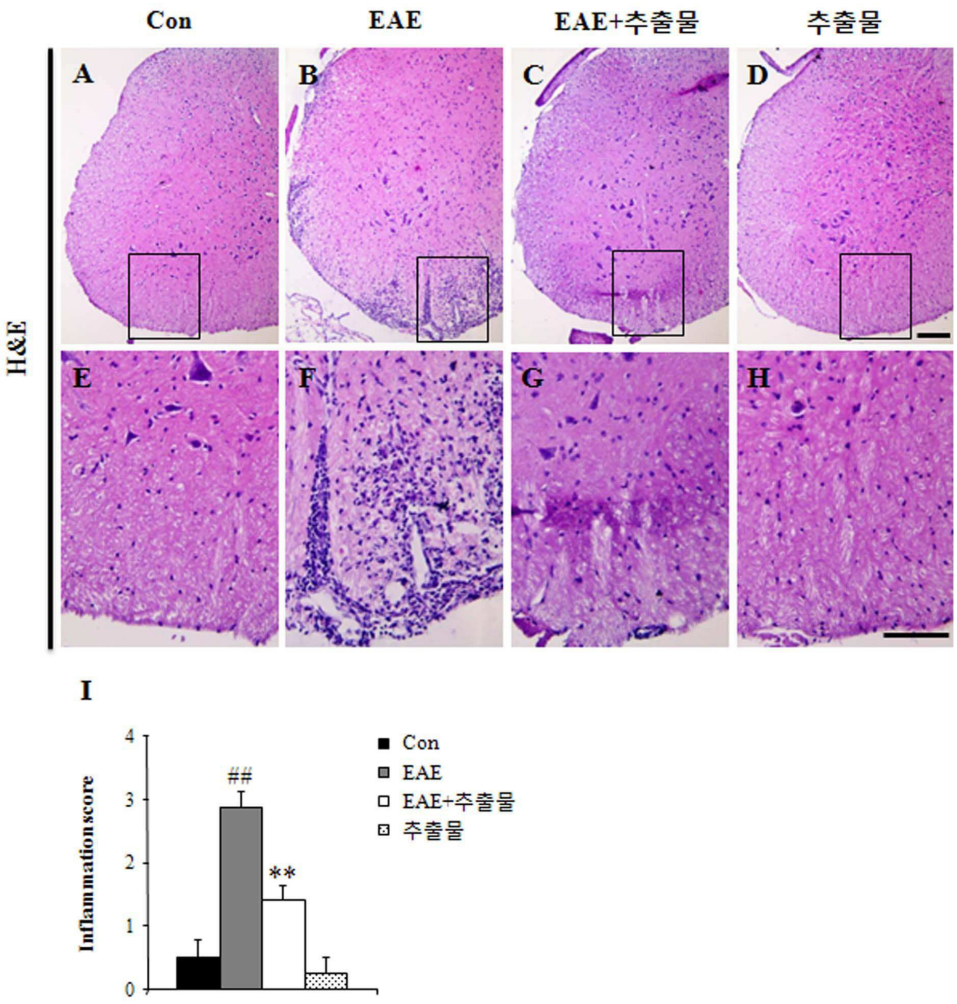
도면6


Nor (N=2)
EAE (n=5)
EAE+추출물 (에탄올 30 % 14.4 mg/kg, n=4)
A
백혈구
m/mm³
B
적혈구
M/mm³
C
혈소판
m/mm³
1500
1000
500

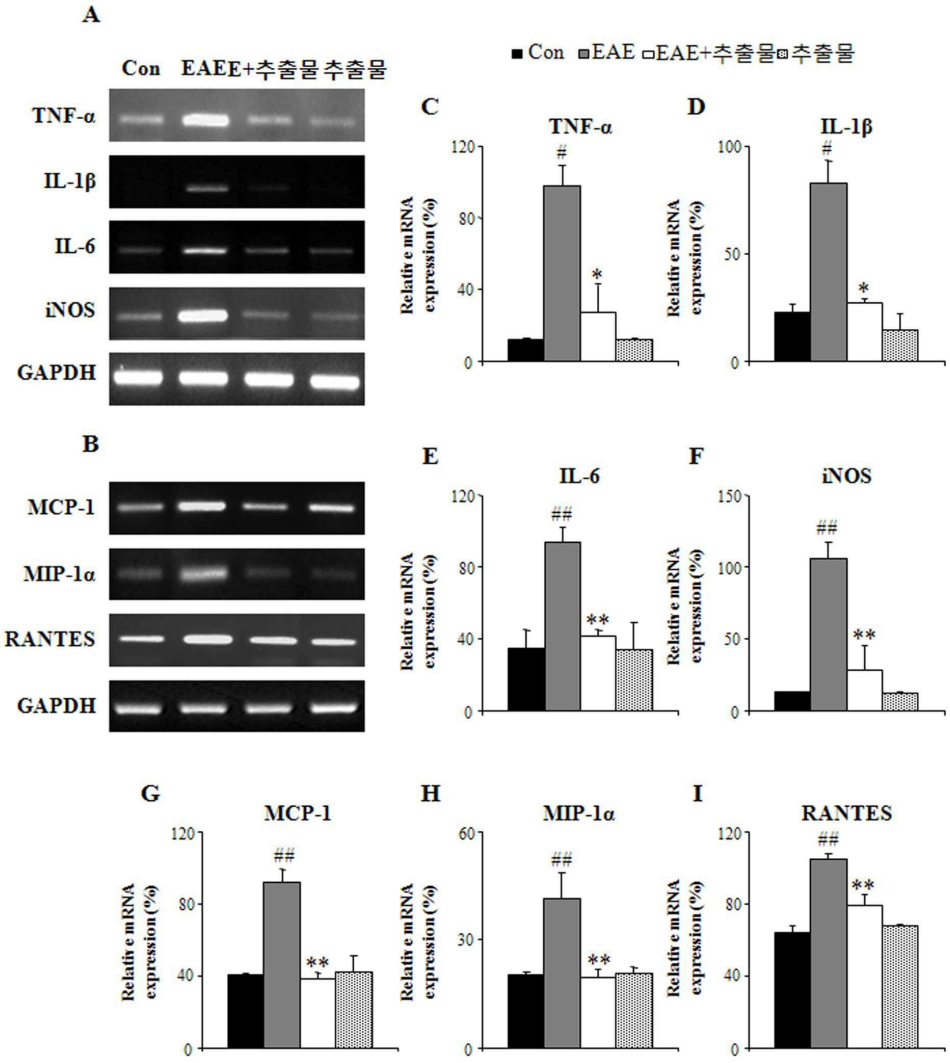
도면7


Con
EAE
EAE+추출물
추출물
A
B
C
D
LFB
E
F
G
H
I
Demyelination score
3
2
1
0
##
*
Con
EAE
E+추출물
추출물
J
Con EAE E+추출물 추출물
MBP
GAPDH
K
MBP
MBP/GAPDH (%)
100
50
0
#
*
Con
EAE
E+추출물
추출물

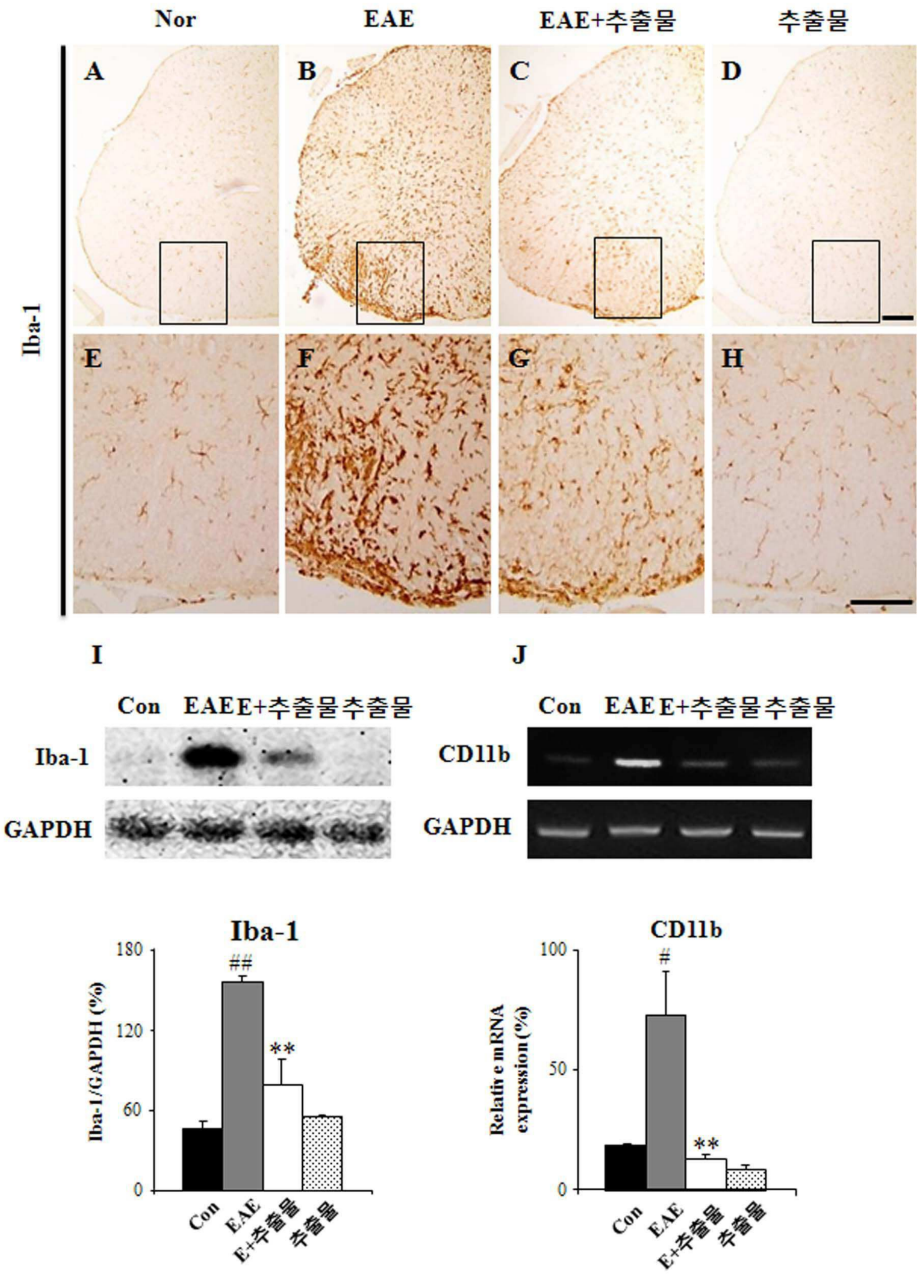
도면8


Con
EAE
EAE+추출물
추출물
A
B
C
D
H&E
E
F
G
H
I
Inflammation score
4
3
2
1
0
##
**
Con
EAE
EAE+추출물
추출물

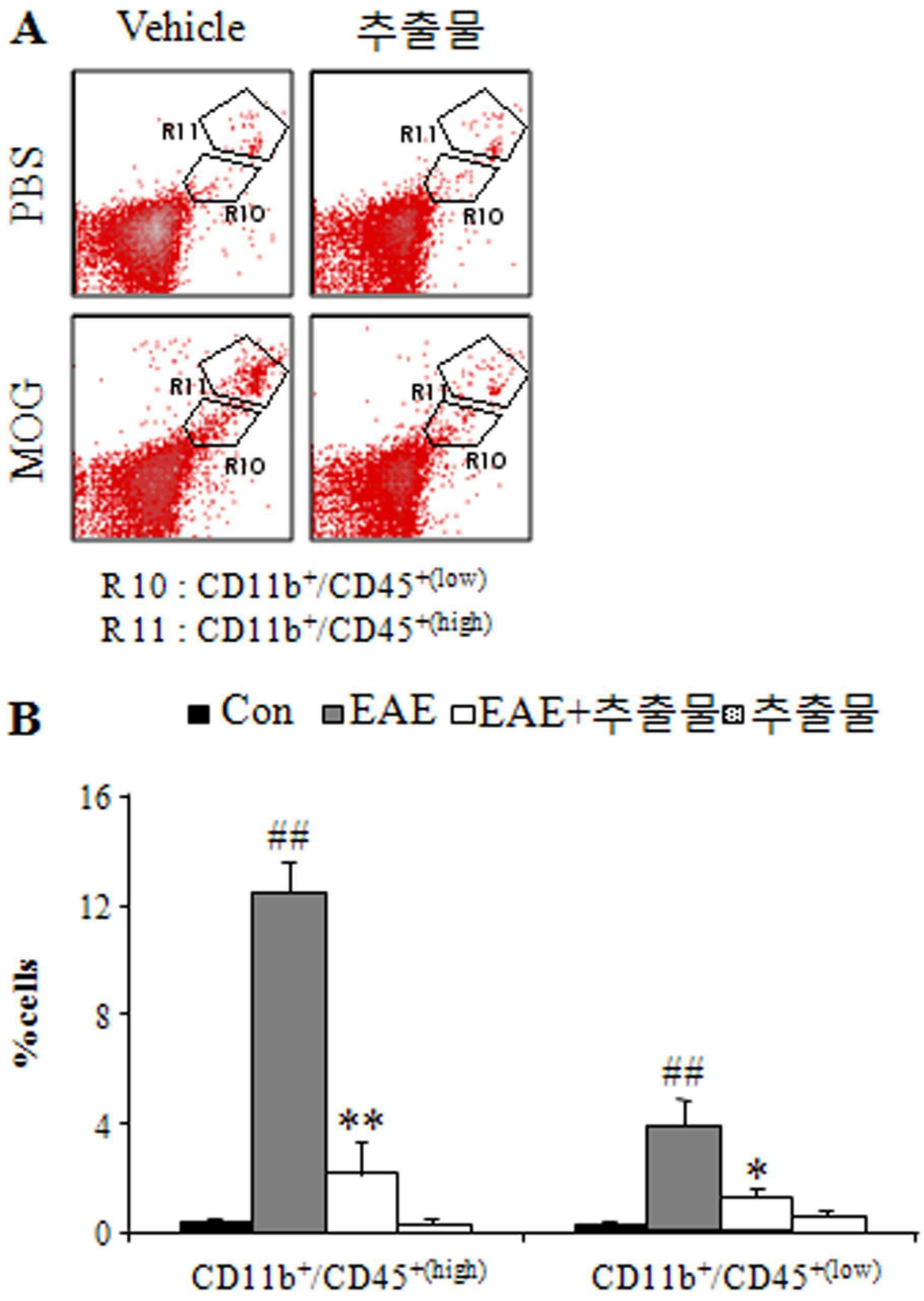
도면9


A
Con
EAE
EAE+추출물
추출물
TNF-α
IL-1β
IL-6
iNOS
GAPDH
B
MCP-1
MIP-1α
RANTES
GAPDH
Con
EAE
EAE+추출물
추출물
C
TNF-α
D
IL-1β
E
IL-6
F
iNOS
G
MCP-1
H
MIP-1α
I
RANTES
Relative mRNA expression (%)

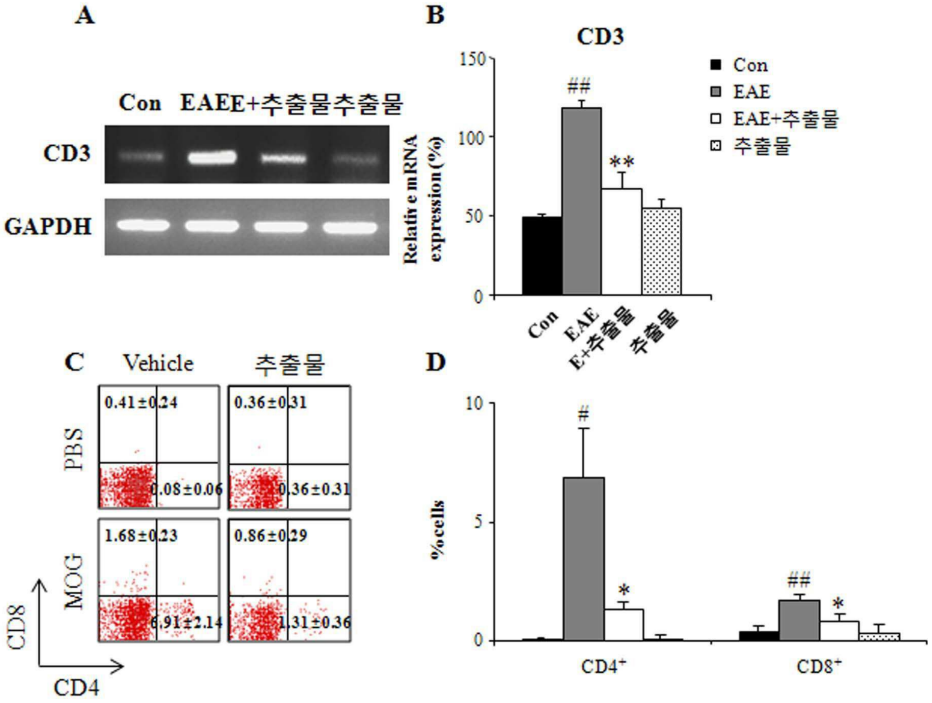
도면10


Nor
EAE
EAE+추출물
추출물
Iba-1
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
Con
EAE
E+추출물
추출물
Iba-1
GAPDH
CD11b
GAPDH
Iba-1
Iba-1/GAPDH (%)
180
120
60
0
##
**
Con
EAE
E+추출물
추출물
CD11b
Relative mRNA expression (%)
100
50
0
#
**
Con
EAE
E+추출물
추출물

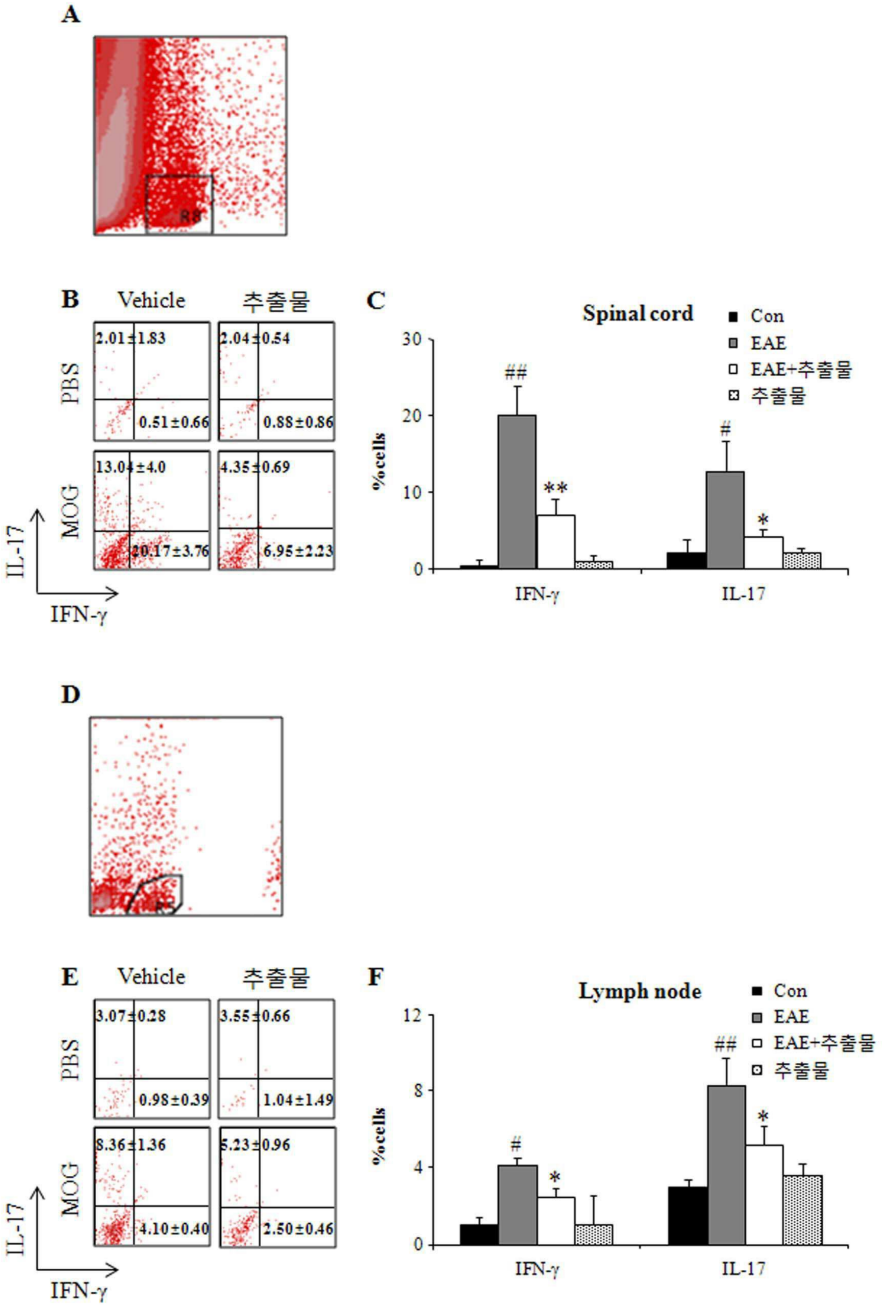
도면11


A
Vehicle
추출물
PBS
MOG
R11
R10
R 10 : CD11b+/CD45+(low)
R 11 : CD11b+/CD45+(high)
B
Con
EAE
EAE+추출물
추출물
%cells
16
12
8
4
0
##
**
##
*
CD11b+/CD45+(high)
CD11b+/CD45+(low)

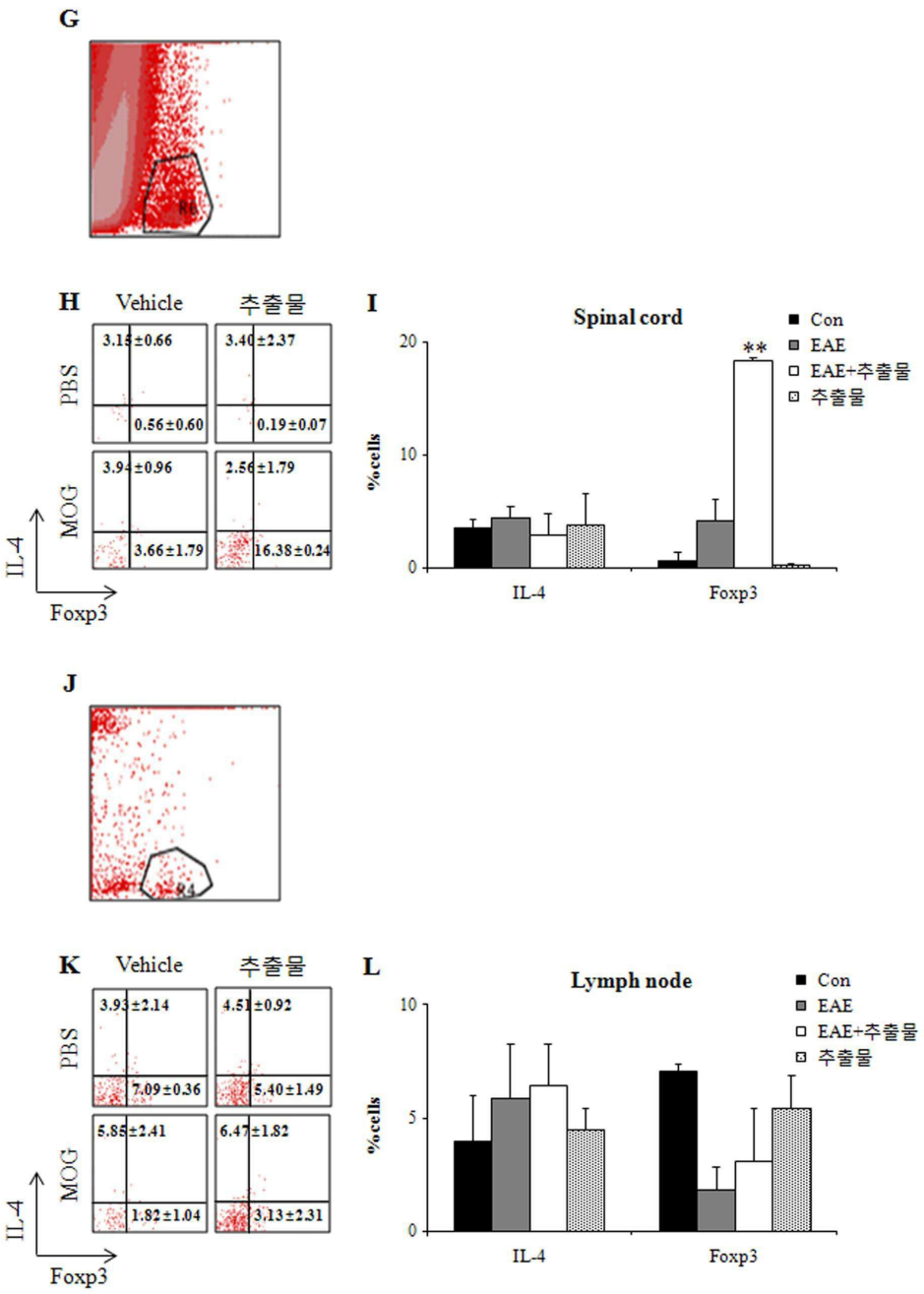
도면12


A
Con
EAE+추출물
추출물
CD3
GAPDH
B
CD3
Relative mRNA expression (%)
150
100
50
0
##
**
Con
EAE
EAE+추출물
추출물
C
Vehicle
추출물
PBS
MOG
0.41±0.24
0.08±0.06
0.36±0.31
0.36±0.31
1.68±0.23
6.91±2.14
0.86±0.29
1.31±0.36
CD8
CD4
D
%cells
10
5
0
#
*
##
*
CD4+
CD8+

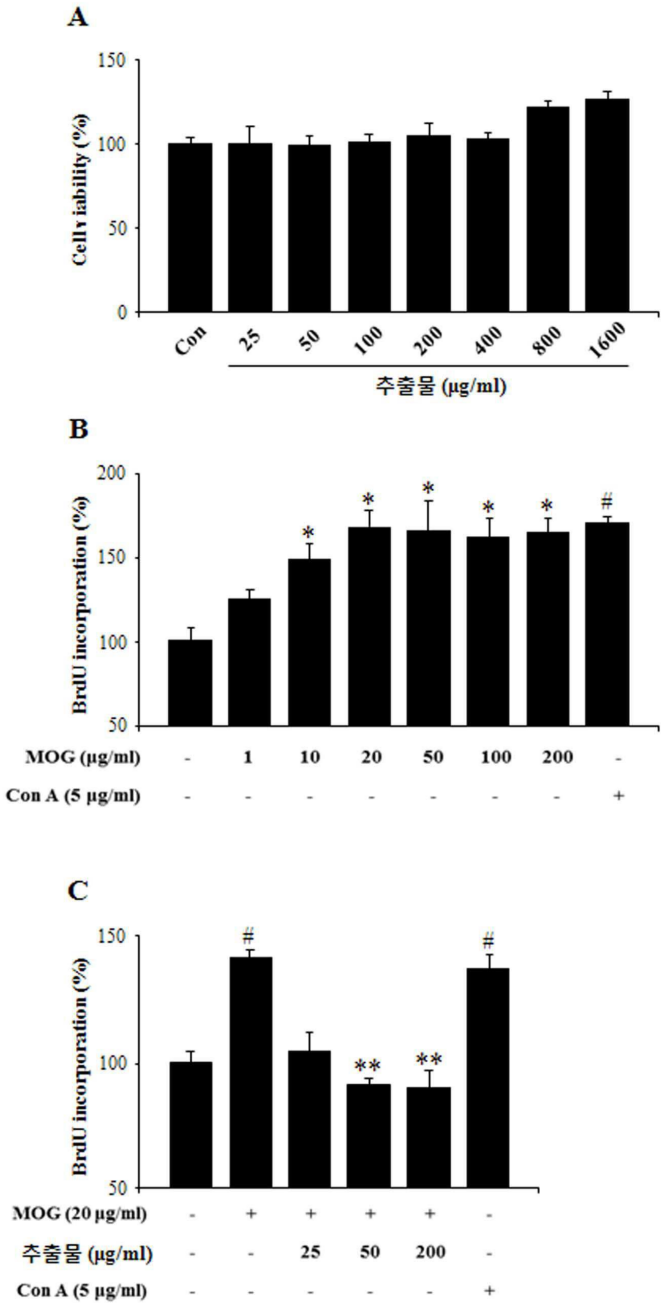
도면13a


A
R8
B
Vehicle
추출물
PBS
MOG
2.01±1.83
0.51±0.66
13.04±4.0
20.17±3.76
2.04±0.54
0.88±0.86
4.35±0.69
6.95±2.23
IL-17
IFN-γ
C
Spinal cord
Con
EAE
EAE+추출물
추출물
%cells
30
20
10
0
##
**
#
*
IFN-γ
IL-17
D
E
Vehicle
추출물
PBS
MOG
3.07±0.28
0.98±0.39
8.36±1.36
4.10±0.40
3.55±0.66
1.04±1.49
5.23±0.96
2.50±0.46
IL-17
IFN-γ
F
Lymph node
Con
EAE
EAE+추출물
추출물
%cells
12
8
4
0
#
*
##
*
IFN-γ
IL-17

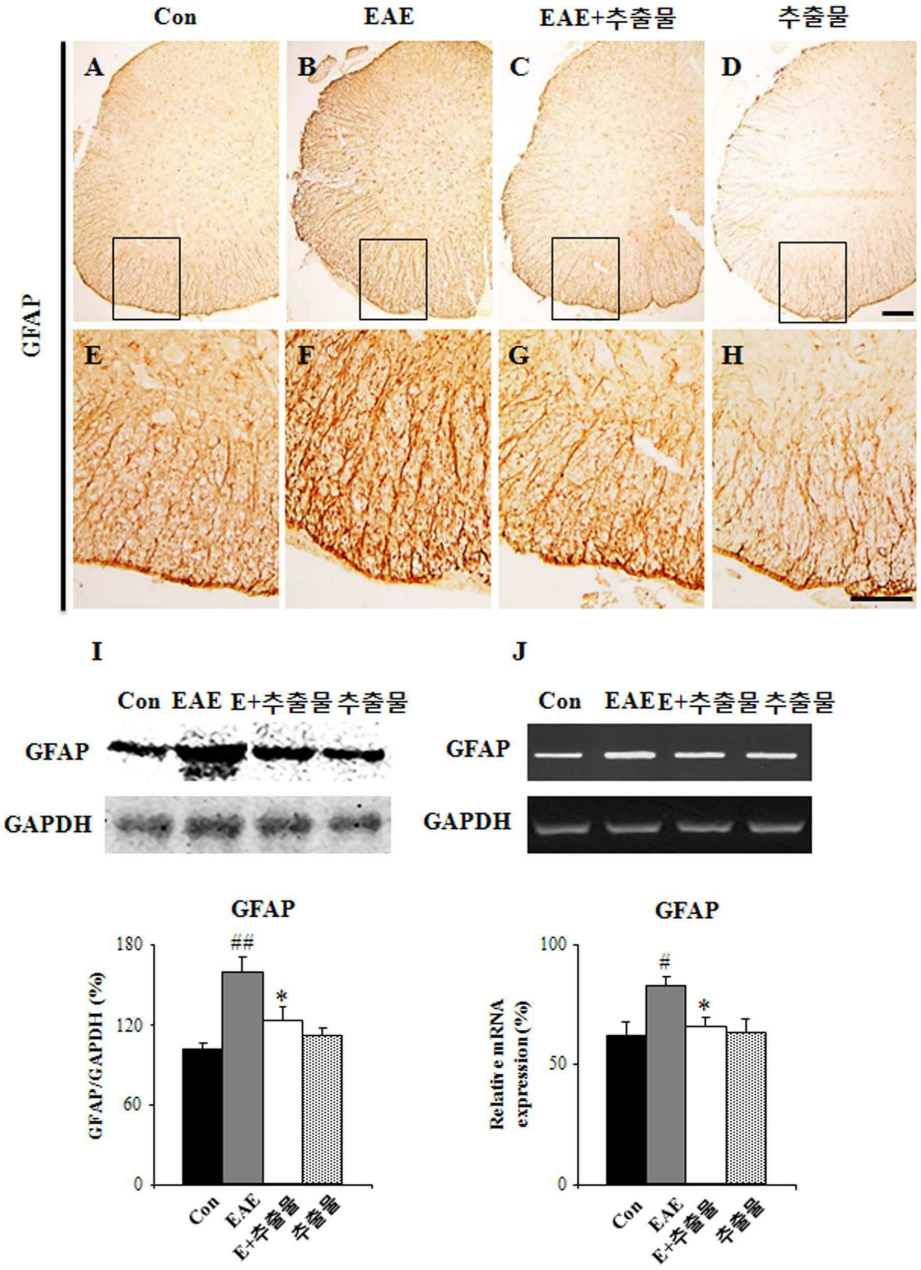
도면13b


G
R4
H
Vehicle
추출물
PBS
MOG
3.15±0.66
3.40±2.37
0.56±0.60
0.19±0.07
3.94±0.96
2.56±1.79
3.66±1.79
16.38±0.24
IL-4
Foxp3
I
Spinal cord
Con
EAE
EAE+추출물
추출물
%cells
20
10
0
**
IL-4
Foxp3
J
R4
K
Vehicle
추출물
PBS
MOG
3.93±2.14
4.51±0.92
7.09±0.36
5.40±1.49
5.85±2.41
6.47±1.82
1.82±1.04
3.13±2.31
IL-4
Foxp3
L
Lymph node
Con
EAE
EAE+추출물
추출물
%cells
10
5
0
IL-4
Foxp3

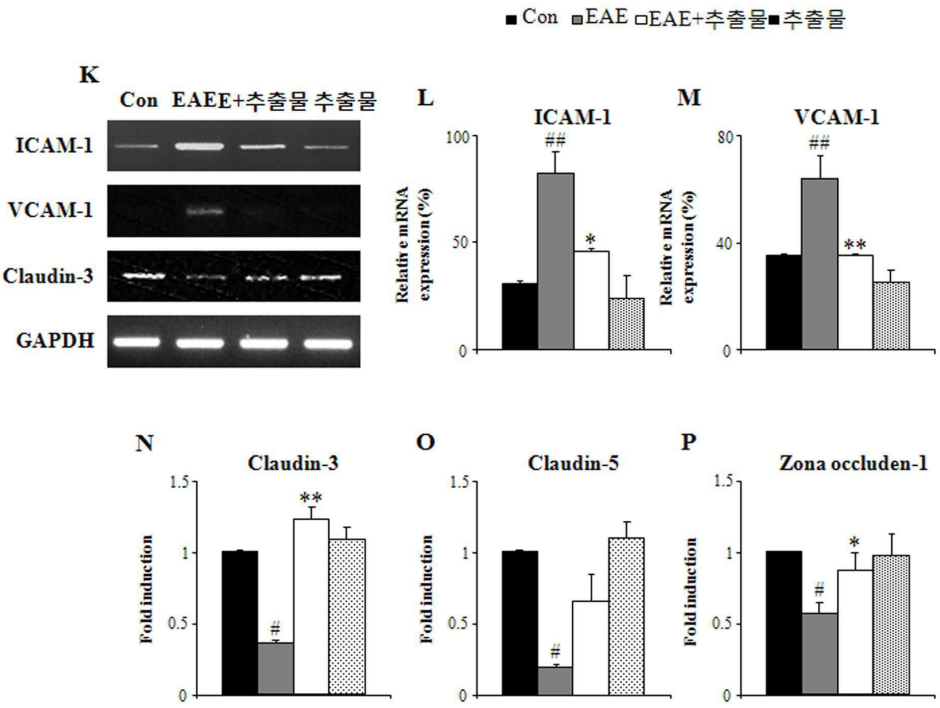
도면14


A
Cell viability (%)
150
100
50
0
Con
25
50
100
200
400
800
1600
추출물 (μg/ml)
B
BrdU incorporation (%)
200
150
100
50
MOG (μg/ml) - 1 10 20 50 100 200 -
Con A (5 μg/ml) - - - - - - - +
C
BrdU incorporation (%)
150
100
50
MOG (20 μg/ml) - + + + + -
추출물 (μg/ml) - - 25 50 200 -
Con A (5 μg/ml) - - - - - +

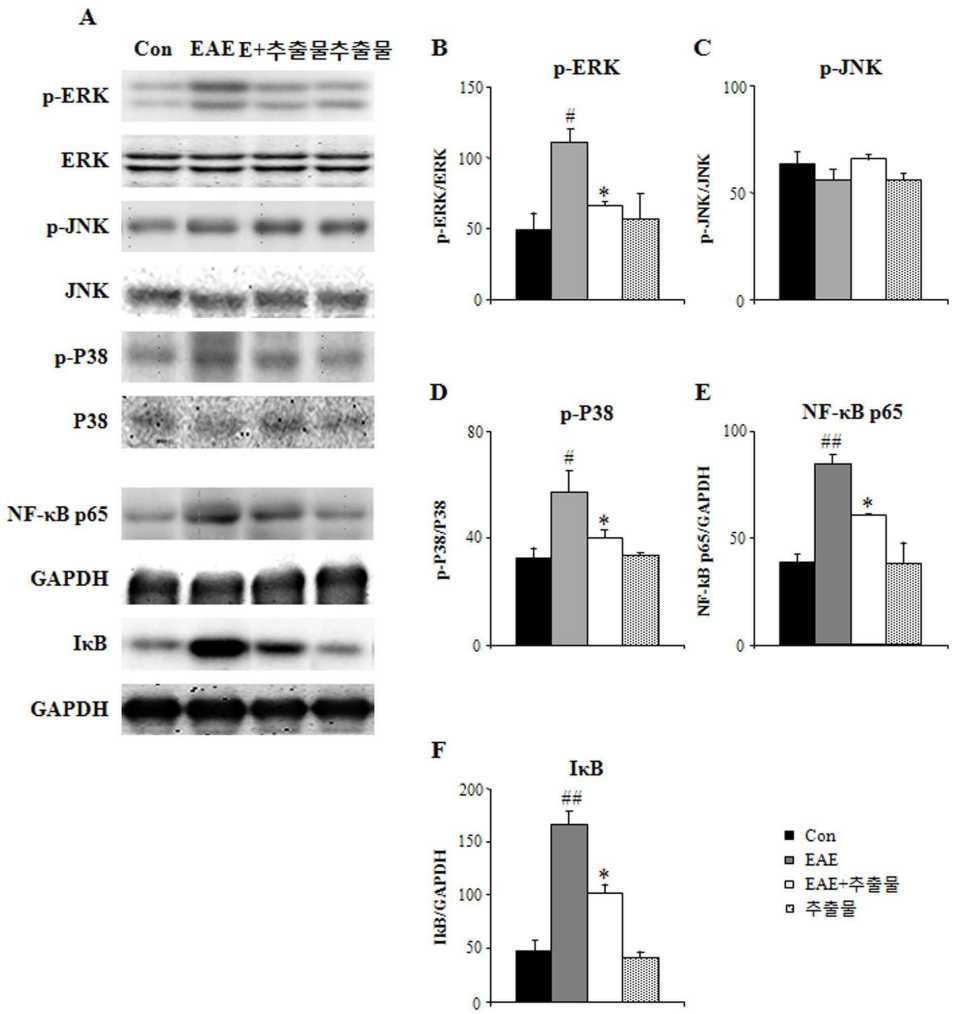
도면15a


Con
EAE
EAE+추출물
추출물
GFAP
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
Con EAE E+추출물 추출물
GFAP
GAPDH
GFAP
GAPDH
GFAP
GFAP/GAPDH (%)
180
120
60
0
##
*
Con
EAE
E+추출물
추출물
GFAP
Relative mRNA expression (%)
100
50
0
#
*
Con
EAE
E+추출물
추출물

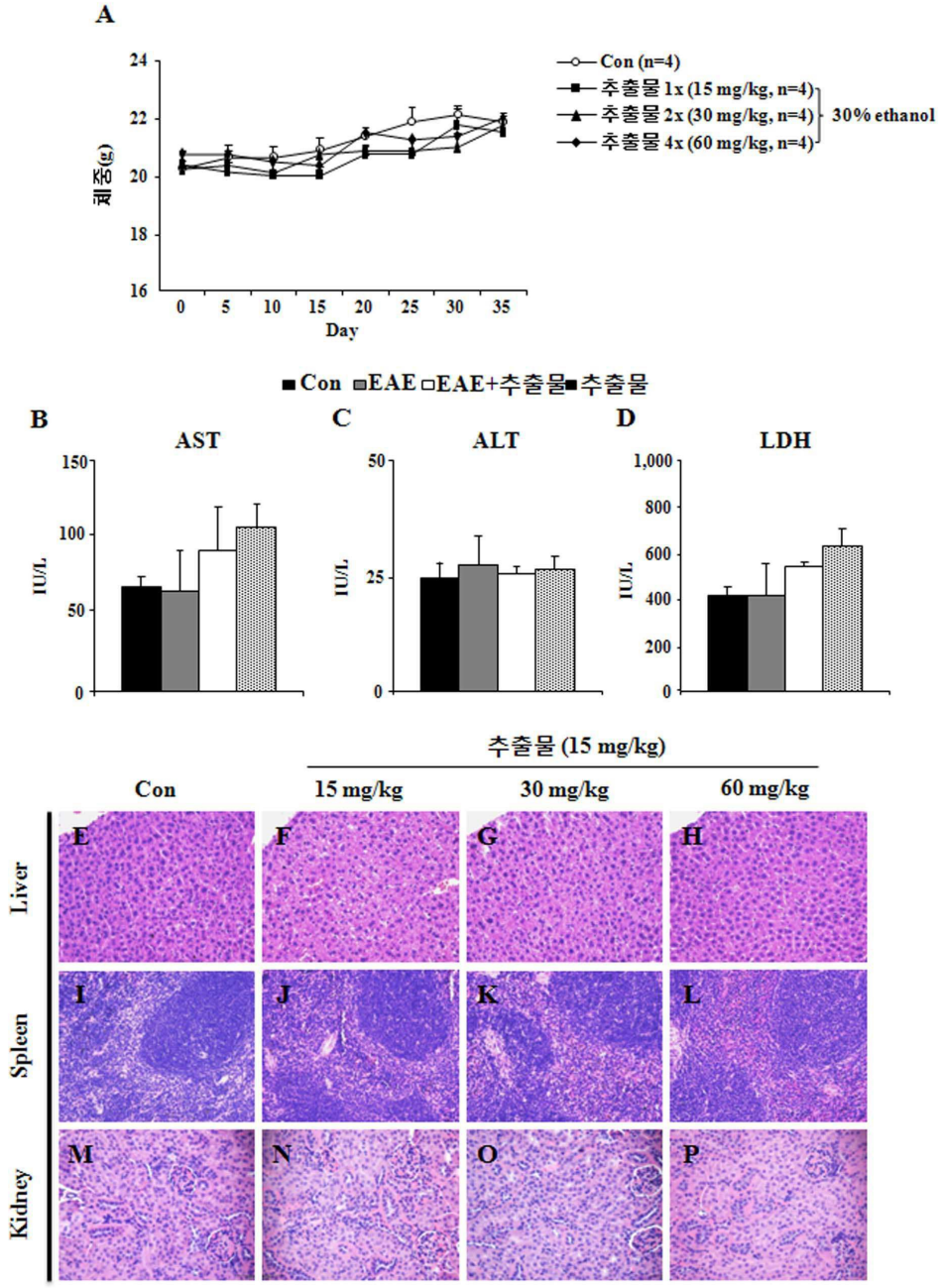
도면15b


■Con ■EAE □EAE+추출물■추출물
K
Con
EAE
EAE+추출물
추출물
ICAM-1
VCAM-1
Claudin-3
GAPDH
L
ICAM-1
Relative mRNA expression (%)
M
VCAM-1
Relative mRNA expression (%)
N
Claudin-3
Fold induction
O
Claudin-5
Fold induction
P
Zona occluden-1
Fold induction

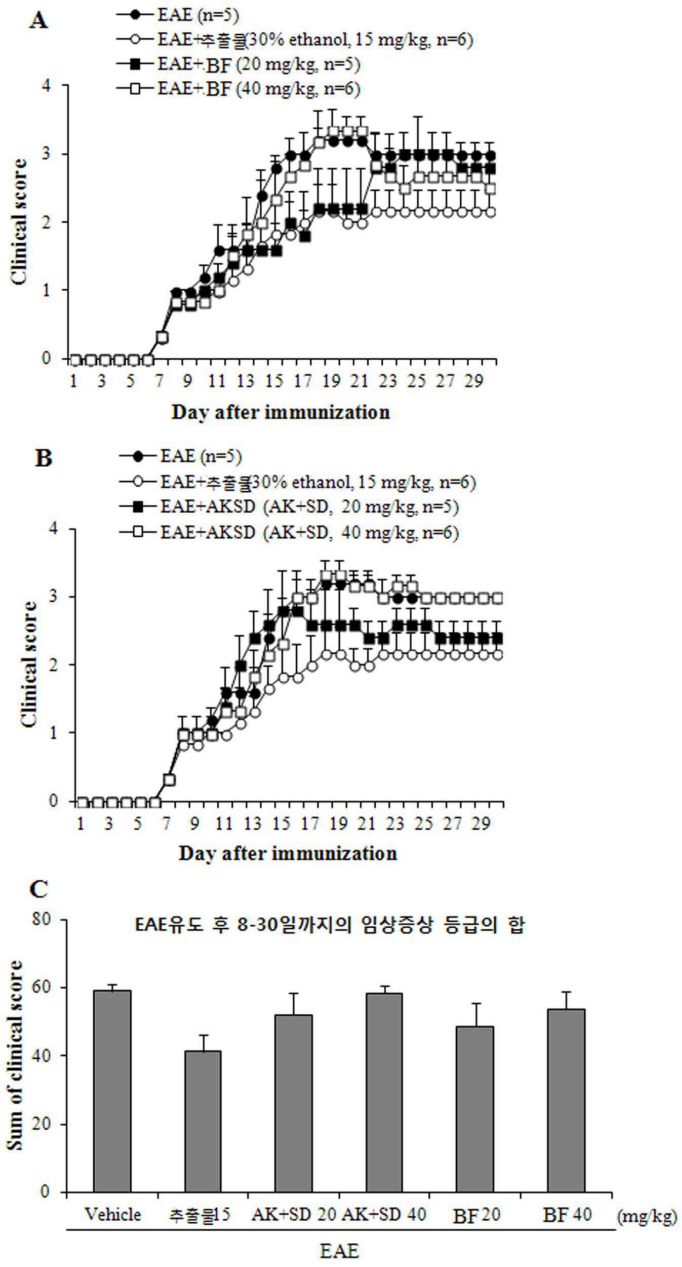
도면16


A
Con
EAE
E+추출물
추출물
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
p-P38
P38
NF-κB p65
GAPDH
IκB
GAPDH
B
p-ERK
p-ERK/ERK
C
p-JNK
p-JNK/JNK
D
p-P38
p-P38/P38
E
NF-κB p65
NF-kB p65/GAPDH
F
IκB
IkB/GAPDH
Con
EAE
EAE+추출물
추출물

도면17


A
체중(g)
Day
Con (n=4)
추출물 1x (15 mg/kg, n=4)
추출물 2x (30 mg/kg, n=4)
추출물 4x (60 mg/kg, n=4)
30% ethanol
Con EAE EAE+추출물 추출물
B
AST
C
ALT
D
LDH
IU/L
추출물 (15 mg/kg)
Con
15 mg/kg
30 mg/kg
60 mg/kg
Liver
Spleen
Kidney

도면18



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Croup of Kyung Hee University

<120> Pharmaceutical composition for the prevention and treatment of autoimmune disease in nervous system comprising extracts of crude drug complex

<130> 2015P-02-019

<150> KR 10-2014-0040440

<151> 2014-04-04

<160> 33

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu
1 5 10 15

Tyr Arg Asn Gly Lys
20

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD11b_F

<400> 2

tgcttacctg ggttatgctt ctg 23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD11b_R

<400> 3

ccgaggtgct cctaaaacca 20

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3_F

<400> 4

ctctgggctt gctgatgg 18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3_R

<400> 5

ggttgggaac aggtggtg 18

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Claudin3_F

<400> 6

ctgggagggc ctgtggatga act 23

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Claudin3_R

<400> 7

tcgcggcgca gaatagagga t 21

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Claudin5_F

<400> 8

acgggaggag cgctttac 18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Claudin5_R

<400> 9

gttggcgaac cagcagag 18

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_F

<400> 10

aggtcatccc agagctgaac g 21

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_R

<400> 11

caccctgttg ctgtagccgt at 22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFAP_F

<400> 12

cgagtcccta gagcggcaaa tg 22

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFAP_R

<400> 13

cggatctgga ggttggagaa agtc 24

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICAM1_F

<400> 14

tgcgttttgg agctagcgga cca 23

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICAM1_R

<400> 15

cgaggaccat acagcacgtg cag 23

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL1b_F

<400> 16

ttgtggctgt ggagaagctg t 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL1b_R

<400> 17

aacgtcacac accagcaggt t 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL6_F

<400> 18

tccatccagt tgccttcttg g 21

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL6_R

<400> 19

ccacgatttc ccagagaaca tg 22

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iNOS_F

<400> 20

ggcaaaccca aggtctacgt t 21

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iNOS_R

<400> 21

tcgctcaagt tcagcttggt 20

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP1_F

<400> 22

cttctgggcc tgctgttca 19

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP1_R

<400> 23

ccagcctact cattgggatc a 21

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP1a_F

<400> 24

cagccaggtg tcattttcct 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP1a_R

<400> 25

aggcattcag ttccaggtca 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RANTES_F

<400> 26

acaccactcc ctgctgcttt 20

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RANTES_R

<400> 27

gactgcaaga ttggagcact tg 22

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFa_F

<400> 28

agcaaaccac caagtggagg a 21

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFa_R

<400> 29

gctggcacca ctagttggtt gt 22

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VCAM1_F

<400> 30

cctcacttgc agcactacgg gct 23

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VCAM1_R

<400> 31

ttttccaata tcctcaatga cggg 24

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Zona occluden1_F

<400> 32

aaggcaattc cgtatcgttg 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Zona occluden1_R

<400> 33

ccacagctga aggactcaca 20