



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0003002
(43) 공개일자 2018년01월09일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/07 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 36/07 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0082231</p> <p>(22) 출원일자 2016년06월30일
심사청구일자 2016년06월30일</p> | <p>(71) 출원인
한남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 유성대로 1646 (전민동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
장해동
대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트
105동 301호
김영호
대전광역시 유성구 봉명로 48, 801-302(인스빌리
베라)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
박노춘</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 차가버섯 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물

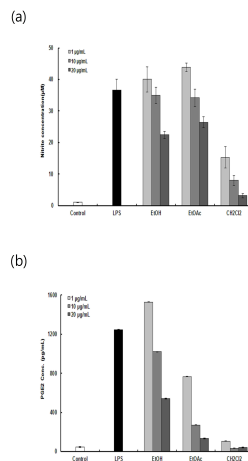
(57) 요약

본 발명은 차가버섯 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 차가버섯 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명은 쉽고 간단하게 제조할 수 있으며 약효가 우수한 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

또한 본 발명은 장기간 복용 시 체중 증가, 두통 등의 부작용을 최소화할 수 있는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/575 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/208 (2013.01)

이대근

대전광역시 유성구 전민로 34 화인빌리지 401호

(72) 발명자

이상현

대전광역시 중구 학교개로34번길 16-6

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345261167

부처명 교육부

연구관리전문기관 한남대학교 산업단지캠퍼스

연구사업명 교육-R&D-고용 선순환 창조생태계조성 사업

연구과제명 산학융합연구실 (건강기능식품 효능검증 산학융합연구실)

기 여 율 1/1

주관기관 한남대학교

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.04.30

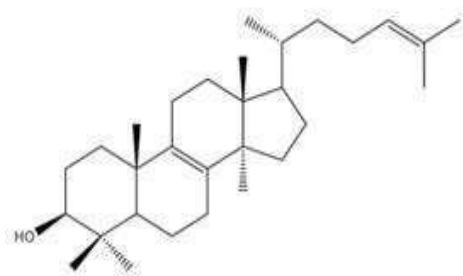
명세서

청구범위

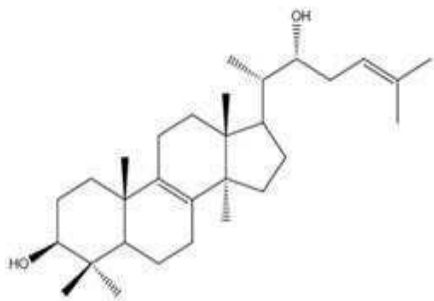
청구항 1

- (a) 차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 추출물을 수득하는 단계;
 (b) 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 디클로로메탄으로 분배 추출하여 디클로로메탄 분획물을 수득하는 단계;
 및
 (c) 상기 디클로로메탄 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화학식 1 내지 3의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는 차가버섯으로부터 염증 예방 또는 치료용 화합물을 분리하는 방법.

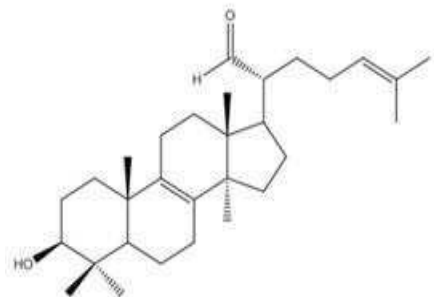
[화학식 1]



[화학식 2]



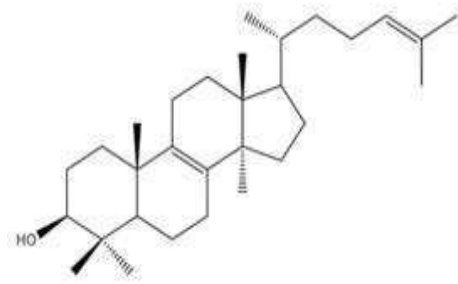
[화학식 3]



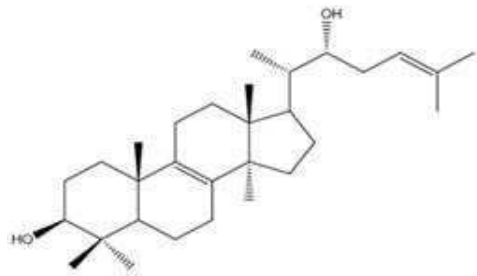
청구항 2

차가버섯 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

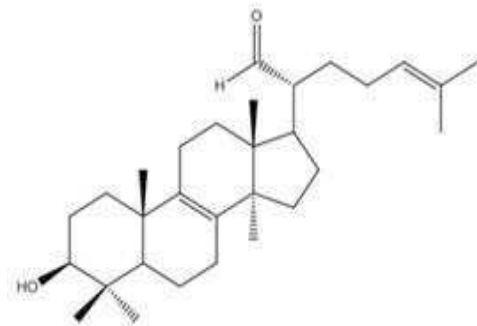
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 3

제2항에 있어서,

상기 차가버섯 추출물은 차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 획득하는 것을 특징으로 하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 분획물은 상기 차가버섯 추출물을 물에 현탁 시킨 후 디클로로메탄으로 분배 추출하여 획득되는 디클로로메탄 분획물인 것을 특징으로 하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

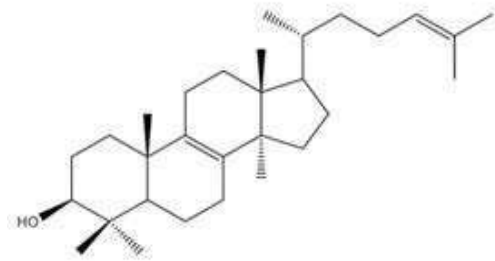
제4항에 있어서,

상기 화학식 1 내지 3의 화합물은 상기 디클로로메탄 분획물을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 수득되는 것을 특징으로 하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

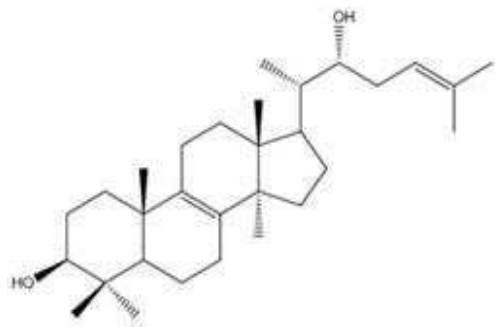
청구항 6

차가버섯 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

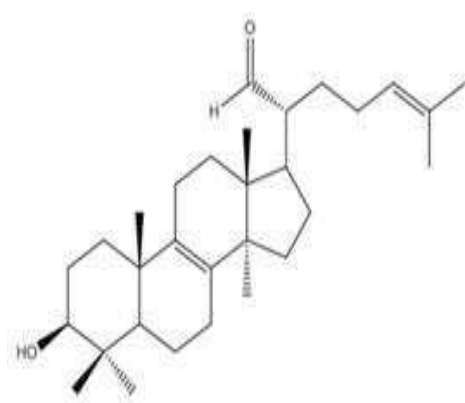
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 7

제6항에 있어서,

상기 차가버섯 추출물은 차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 수득하고,

상기 분획물은 상기 차가버섯 추출물을 물에 현탁 시킨 후 디클로로메탄으로 분배 추출하여 수득되는 디클로로

메탄 분획물이며,

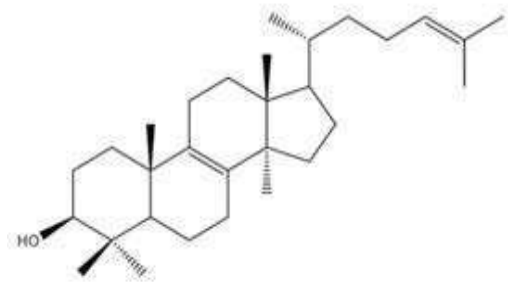
상기 화학식 1 내지 3의 화합물은 상기 디클로로메탄 분획물을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 수득되는 것을 특징으로 하는 염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

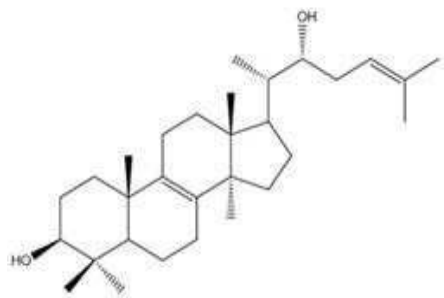
차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 제조되는 염증 예방 또는 개선용 차가버섯 추출물에 있어서,

상기 차가 버섯 추출물은 화학식 1 내지 3의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 염증 예방 또는 개선용 차가버섯 추출물.

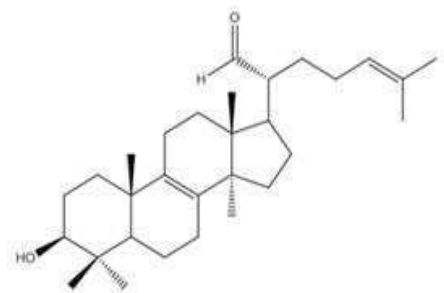
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 차가버섯 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 차가버섯 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합

으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 식물 유래의 다양한 화학물질들은 항염증 작용과 세포보호 작용을 포함한 여러 가지 생리활성들을 나타내어 건강기능식품의 유용한 소재로서 각광을 받고 있다.
- [0004] 차가버섯은 소나무비늘버섯과에 속하는 다년생의 담자균 버섯으로, 자연 상태에서 시베리아, 핀란드, 노르웨이, 우크라이나, 헝가리 등의 북위 45도 이상의 춥고 습한 북반구에 분포하며, 일반적으로 자작나무, 오리나무, 마가목 등의 줄기나 그루터기에 자생하는 극내한성 버섯이다.
- [0005] 국내에서 자생한다는 보고는 아직 없으며, 백색부후균의 일종으로 자연 상태에서 성장하면 검은색의 균핵 덩어리가 되어 자작나무 등의 줄기에 기생하는 것으로 알려져 있다.
- [0006] 최근에 차가버섯의 다양한 생리활성에 대한 연구결과들이 다수 보고되고 있으며, 이와 관련하여 한국등록특허 제10-0574356호는 (a) 차가버섯을 70~85℃에서 열수추출하고 여과하여 여액과 잔사를 분리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 잔사를 80~100℃에서 열수추출하고 여과하여 여액과 잔사를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 잔사를 100~121℃에서 열수추출하고 여과하여 여액과 잔사를 분리하는 단계로부터 수득한 상기 (a), (b) 및 (c) 단계의 여액을 혼합한 차가버섯의 추출물을 개시하고 있다.
- [0007] 또한 한국등록특허 제10-1011028호는 차가버섯 추출물; 영지버섯 추출물; 상황버섯 추출물; 홍삼 농축액; 프로폴리스 농축액; 인진쑥 추출액; 울금 추출액; 감초 추출액; 돈태반 농축액 및 액상과당을 함유하는 조혈모세포 증식 촉진용 조성물을 개시하고 있다.
- [0008] 한편 한국공개특허 제10-2010-0104578호는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 염증 완화 효과를 갖는 청버섯 추출물 및 청버섯 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물을 개시하고 있다.
- [0009] 그러나 상기 문헌에 개시된 기술은 차가버섯 추출물에 관한 것이거나 조혈모 세포 증식 촉진용 조성물에 관한 것으로서, 제조방법이 복잡하고 약효가 우수하지 않다.
- [0010] 또한 장기간 복용 시 체중 증가, 두통 등의 부작용을 초래하는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0574356호
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1011028호
- (특허문헌 0003) 한국공개특허 제10-2010-0104578호

발명의 내용

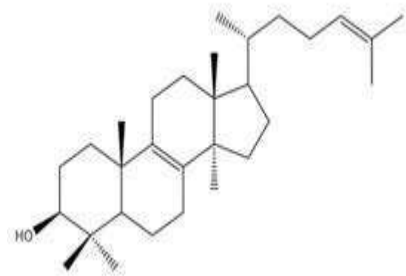
해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 상기 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 쉽고 간단하게 제조할 수 있으며 약효가 우수한 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0014] 또한 본 발명은 장기간 복용 시 체중 증가, 두통 등의 부작용을 최소화할 수 있는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

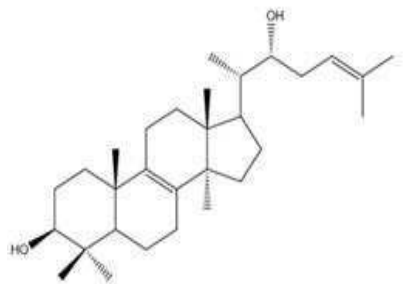
[0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 (a) 차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 추출물을 수득하는 단계; (b) 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 디클로로메탄으로 분배 추출하여 디클로로메탄 분획물을 수득하는 단계; 및 (c) 상기 디클로로메탄 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화학식 1 내지 3의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는 차가버섯으로부터 염증 예방 또는 치료용 화합물을 분리하는 방법을 제공한다.

[0018] [화학식 1]



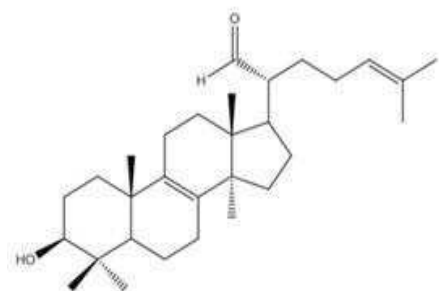
[0019]

[0021] [화학식 2]



[0022]

[0024] [화학식 3]



[0025]

[0027] 또한 본 발명은 차가버섯 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 차가버섯 추출물은 차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 수득하는 것을 특징으로 한다.

- [0029] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 분획물은 상기 차가버섯 추출물을 물에 현탁 시킨 후 디클로로메탄으로 분배 추출하여 수득되는 디클로로메탄 분획물인 것을 특징으로 한다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 화학식 1 내지 3의 화합물은 상기 디클로로메탄 분획물을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 수득되는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 본 발명은 차가버섯 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 차가버섯 추출물은 차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 수득하고, 상기 분획물은 상기 차가버섯 추출물을 물에 현탁 시킨 후 디클로로메탄으로 분배 추출하여 수득되는 디클로로메탄 분획물이며, 상기 화학식 1 내지 3의 화합물은 상기 디클로로메탄 분획물을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 수득되는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 아울러 본 발명은 차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 제조되는 염증 예방 또는 개선용 차가버섯 추출물에 있어서, 상기 차가 버섯 추출물은 화학식 1 내지 3의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 염증 예방 또는 개선용 차가버섯 추출물을 제공한다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명은 쉽고 간단하게 제조할 수 있으며 약효가 우수한 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.
- [0036] 또한 본 발명은 장기간 복용 시 체중 증가, 두통 등의 부작용을 최소화할 수 있는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 차가버섯 추출물 및 분획물의 NO(nitric oxide) 및 PGE₂ 생성 억제 효과를 나타낸다. (a) NO, (b) PGE₂
- 도 2는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 차가버섯의 디클로로메탄 분획물에서 분리한 화합물의 NO(nitric oxide) 및 PGE₂ 생성 억제 효과를 나타낸다. (a) NO, (b) PGE₂
- 도 3은 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 차가버섯의 디클로로메탄 분획물에서 분리한 화합물의 iNOS 및 COX-2 효소의 발현 억제 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 이하 실시예를 바탕으로 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명에 사용된 용어, 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고 통상의 기술자의 이해를 돕기 위하여 예시된 것에 불과할 뿐이며, 본 발명의 권리범위 등이 이에 한정되어 해석되어서는 안 된다.
- [0040] 본 발명에 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 다른 정의가 없다면 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 나타낸다.
- [0042] 본 발명은 (a) 차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 추출물을 수득하는 단계; (b) 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 디클로로메탄으로 분배 추출하여 디클로로메탄 분획물을 수득하는 단계; 및 (c) 상기 디클로로메탄 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화학식 1 내지 3의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는 차가버섯으로부터 염증 예방 또는 치료용 화합물을 분리하는 방법에 관한 것이다.
- [0043] 상기 에탄올은 70% 에탄올이 사용되는 것이 바람직하다.
- [0044] 가열 추출은 차가버섯 100중량부에 대하여 에탄올 500~3,000중량부를 가하고 50~90℃에서 1~12시간 가열하여 추

출할 수 있으며, 70% 에탄올로 1~3시간씩 1~5번 반복해서 가열 추출하는 것이 바람직하다.

[0045] 가열 추출한 후 감압 농축하여 용매를 모두 제거한 다음 차가버섯 추출물을 수득한다.

[0046] 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 디클로로메탄으로 분배 추출하여 디클로로메탄 분획물을 수득할 수 있다.

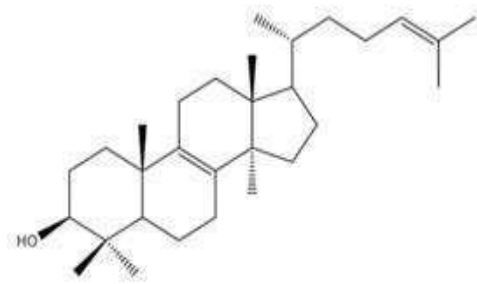
[0047] 또한 경우에 따라 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 에틸아세테이트로 분배 추출하여 에틸아세테이트 분획물을 수득할 수도 있다.

[0048] 상기 디클로로메탄 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화학식 1 내지 3의 화합물을 분리한다.

[0049] 분리한 화합물은 ^1H NMR, ^{13}C NMR 등의 핵자기공명분석(NMR), 융점, 적외선 분광분석(IR) 등을 이용하여 분자구조를 결정하였다.

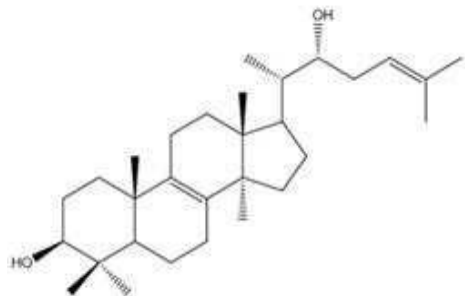
[0050] 화학식 1의 화합물은 라노스테롤(Lanosterol)이고, 화학식 2의 화합물은 이노토디올(Inotodiol)이며, 화학식 3의 화합물은 3- β -히드록실아노스타-8,24-디엔-21-알(3- β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-al)이다.

[0052] [화학식 1]



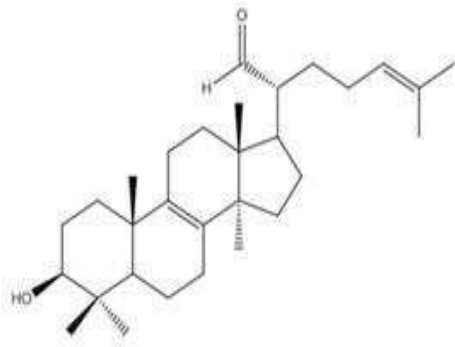
[0053]

[0055] [화학식 2]



[0056]

[0058] [화학식 3]



[0059]

[0061] 또한 본 발명은 차가버섯 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0062] 본 발명의 차가버섯 추출물, 그의 분획물 및 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상의 화합물은 염증의 예방 또는 치료를 위하여 사용될 수 있다.

[0063] 차가버섯 추출물, 그의 분획물 및 화학식 1 내지 3의 화합물은 LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7세포 주 내에서 NO 및 PGE₂ 함량을 감소시키므로, LPS에 의해 유도되는 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있다.

[0064] 또한 차가버섯 추출물, 그의 분획물 및 화학식 1 내지 3의 화합물은 염증 발현 효소인 iNOS와 COX-2의 발현을 효과적으로 억제할 수 있다.

[0065] 상기 차가버섯 추출물은 차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 수득한다.

[0066] 상기 에탄올은 70% 에탄올이 사용되는 것이 바람직하다.

[0067] 가열 추출은 차가버섯 100중량부에 대하여 에탄올 500~3,000중량부를 가하고 50~90℃에서 1~12시간 가열하여 추출할 수 있으며, 70% 에탄올로 3시간씩 3번 반복해서 가열 추출하는 것이 바람직하다.

[0068] 가열 추출한 후 감압 농축하여 용매를 모두 제거한 다음 차가버섯 추출물을 수득한다.

[0069] 상기 분획물은 상기 차가버섯 추출물을 물에 현탁 시킨 후 디클로로메탄으로 분배 추출하여 수득되는 디클로로메탄 분획물인 것을 특징으로 한다.

[0070] 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 디클로로메탄으로 분배 추출하여 디클로로메탄 분획물을 수득할 수 있다.

[0071] 또한 경우에 따라 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 에틸아세테이트로 분배 추출하여 에틸아세테이트 분획물을 수득할 수도 있다.

[0072] 상기 화학식 1 내지 3의 화합물은 상기 디클로로메탄 분획물을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 수득되는 것을 특징으로 한다.

[0073] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0074] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 갈슘 포스페이트, 갈슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0075] 본 발명의 약학 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0076] 본 발명의 염증 관련 질환은 류마티스 관절염, 천식, 급성 통증, 만성 통증, 신경병적 통증, 수술 후 통증, 편두통 및 관절통과 같은 통증, 신경병증, 신경손상, 과민성 장증후군, 내독소에 의한 쇼크, 염증성 장 질환 등이

해당될 수 있다.

- [0077] 본 발명은 차가버섯 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0078] 식품은 각종 식품류, 캔디, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등의 형태일 수 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 음료 등의 형태로 제공될 수 있다.
- [0079] 본 발명은 차가버섯을 분쇄한 후 에탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 제조되는 염증 예방 또는 개선용 차가버섯 추출물에 관한 것이다.
- [0080] 상기 차가 버섯 추출물은 화학식 1 내지 3의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하며, 염증의 예방 또는 개선에 효과가 있다.
- [0082] 이하 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 실시를 위하여 예시된 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0084] (실시예 1) 차가버섯 추출물 제조
- [0085] 600g의 차가버섯을 잘게 분쇄한 후 12L의 70% 에탄올로 3시간씩 3번 반복해서 가열 추출한 다음 감압 농축하여 용매를 모두 제거하여 58g의 추출물을 수득하였다.
- [0087] (실시예 2) 차가버섯의 디클로로메탄 분획물 제조
- [0088] 상기 차가버섯 추출물 58g를 3L의 물에 현탁 시킨 후, 디클로로메탄 3L을 이용하여 3번 반복 분획하여 12g의 디클로로메탄 분획물을 수득하였다.
- [0090] (실시예 3) 화학식 1 내지 3의 화합물 분리
- [0091] 상기 디클로로메탄 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 분리함으로써 화학식 1 내지 3의 화합물을 수득하였다.
- [0092] 분리한 화합물은 ^1H NMR, ^{13}C NMR 등의 핵자기공명분석(NMR), 융점, 적외선 분광분석(IR) 등을 이용하여 분자구조를 결정하였다.
- [0093] 화학식 1의 화합물은 라노스테롤(Lanosterol)이고, 화학식 2의 화합물은 이노토디올(Inotodiol)이며, 화학식 3의 화합물은 3- β -히드록실아노스타-8,24-디엔-21-알(3- β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-al)이다.
- [0095] (실시예 4) 차가버섯 추출물 및 분획물의 NO(nitric oxide) 및 PGE₂ 생성 억제 효과
- [0096] RAW 264.7 세포를 24-well plate에 5×10^5 cells/well의 수로 배양하여 24시간 예비 배양하고, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ LPS와 함께 test sample을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.
- [0097] 24시간 배양 후 배양액의 상등액을 취한 후 Griess kit를 이용해 NO의 생성량을 측정하였다.
- [0098] 한편 RAW 264.7 세포를 24-well plate에 5×10^5 cells/well의 수로 배양하여 24시간 예비 배양하고 0.5 $\mu\text{g/mL}$ LPS와 함께 test sample을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.
- [0099] 24시간 배양 후 배양액의 상등액을 취한 후 ELISA kit를 이용해 PGE₂ 생성량을 측정하였다.

- [0101] 체내 염증반응을 유도하는 시토카인(cytokine) 중 NO(nitric oxide)와 PGE₂의 생성을 LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7세포 주에서 확인한 결과는 도 1에 제시되어 있다.
- [0102] NO 함량은 시료를 처리하지 않은 TC(treat control)은 36.604 ± 3.465 수준이며, 차가버섯 추출물(70% 에탄올)은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 40.034 ± 0.034 , 34.961 ± 2.574 , 22.401 ± 1.133 수준이었다.
- [0103] 에틸아세테이트 분획물은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 43.802 ± 1.324 , 34.188 ± 2.789 , 26.411 ± 1.760 수준이고, 디클로로메탄 분획물은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 15.300 ± 3.435 , 7.957 ± 1.556 , 3.174 ± 0.686 수준이었다.
- [0104] PGE₂ 함량은 시료를 처리하지 않은 TC(treat control)은 1248 ± 1.87 수준이며, 차가버섯 추출물(70% 에탄올)은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 1528 ± 2.03 , 1020 ± 1.95 , 541 ± 3.11 수준이었다.
- [0105] 에틸아세테이트 분획물은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 767 ± 2.13 , 270 ± 2.66 , 132 ± 3.14 수준이고, 디클로로메탄 분획물은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 106 ± 4.15 , 33 ± 4.24 , 40 ± 5.14 수준으로 나타났다.
- [0106] 따라서 디클로로메탄 분획물이 가장 낮은 NO 및 PGE₂ 함량을 나타내므로, LPS에 의해 유도되는 염증반응을 가장 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있다.
- [0108] (실시에 5) 차가버섯의 디클로로메탄 분획물에서 분리한 화합물의 NO(nitric oxide) 및 PGE₂ 생성 억제 효과
- [0109] 디클로로메탄 분획물에서 화학식 1 내지 3의 화합물을 분리하여 실시예 4와 동일한 실험 방법으로 확인한 결과는 도 2에 제시된다.
- [0110] NO 수준은 시료를 처리하지 않은 TC(treat control)은 32.995 ± 0.535 수준이며 화학식 1의 화합물은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 29.357 ± 0.714 , 24.188 ± 0.467 , 16.169 ± 0.326 수준이었다.
- [0111] 화학식 2의 화합물은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 34.043 ± 0.449 , 26.749 ± 2.108 , 17.522 ± 0.343 수준이고, 화학식 3의 화합물은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 27.763 ± 1.497 , 18.874 ± 0.613 , 10.807 ± 2.324 수준이었다.
- [0112] PGE₂ 수준은 시료를 처리하지 않은 TC(treat control)은 793.87 ± 27.30 수준이며 화학식 1의 화합물은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 484.54 ± 29.72 , 104.29 ± 11.15 , 51.46 ± 8.46 수준이었다.
- [0113] 화학식 2의 화합물은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 638.73 ± 25.58 , 167.37 ± 15.51 , 67.23 ± 7.55 수준이고, 화학식 3의 화합물은 농도 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 별로 307.88 ± 19.00 , 90.98 ± 12.68 , 33.76 ± 6.59 수준으로 억제되었다.
- [0114] 따라서 디클로로메탄 분획물로부터 분리된 화합물 중에서 화학식 3의 화합물이 가장 낮은 NO 및 PGE₂ 함량을 나타내므로, LPS에 의해 유도되는 염증반응을 가장 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있다.
- [0116] (실시에 6) 차가버섯의 디클로로메탄 분획물에서 분리한 화합물의 iNOS 및 COX-2 효소의 발현 억제 효과
- [0117] RAW 264.7 세포를 100mm Dish에 1×10^5 세포의 수로 24시간 예비 배양하고, 분화유도배지[50ng/mL receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)]와 함께 시료를 처리하여 1일간 분화를 진행하였다.
- [0118] Media를 제거한 후 1mL PBS(pH 7.4)로 2회 세척 후 150 μL RIPA lysis buffer를 처리한 후 4°C에서 5분간 반응시킨 후 세포를 모았다.
- [0119] 원심분리기를 이용하여 14,000rpm, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상등액 120 μL 를 취하고 Bradford assay를 사용하여 단백질을 정량하였다.
- [0120] 정량한 단백질에 loading buffer 20 μL 씩 넣고 불활성화 시킨 후 gel에 로딩하여 80V로 30분, 120V로 90분 동안 전기영동 하고, 100V에서 85분 동안 transfer시킨 후에 2% skim milk로 60분 동안 처리하였다.
- [0121] Blocking이 끝나면 첫 번째 항체를 4°C에서 12시간 동안 노출시킨 후 TBST로 15분씩 6번 세척하고, 두 번째 항체를 상온에서 90분간 노출시킨 후 TBST로 15분씩 6번 세척하였다.

[0122] 세척이 끝나면 ECL solution을 상온에서 5분간 노출시킨 후 LAS 4000 mini(FUJIFILM, Japan)로 측정하였다.

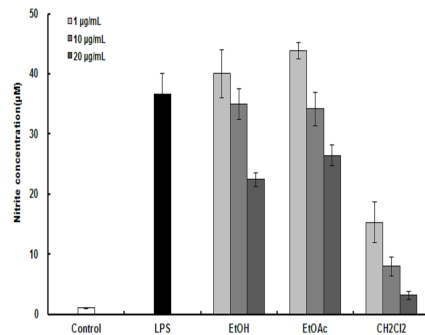
[0124] LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 세포 주에서 NO와 PGE₂ 생성에 관여하는 효소인 iNOS와 COX-2의 발현정도를 Western blot assay를 통해 분석한 결과는 도 3에 제시되어 있다.

[0125] 차가버섯의 디클로로메탄 분획물에서 분리한 화학식 1 내지 3의 화합물 중 10 μM 농도에서 iNOS와 COX-2의 발현 정도는 화학식 3의 화합물이 앞선 연구결과와 동일하게 가장 효과적으로 단백질 발현을 억제하는 것으로 확인되었다.

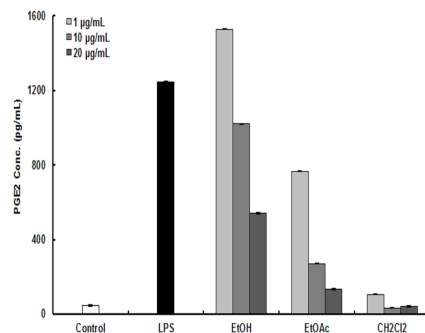
도면

도면1

(a)

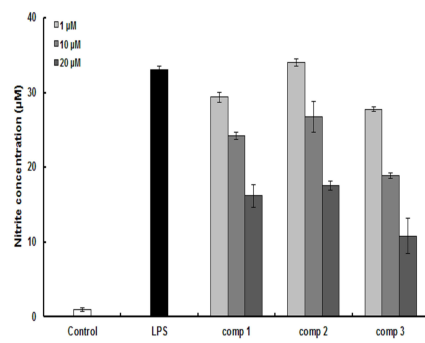


(b)

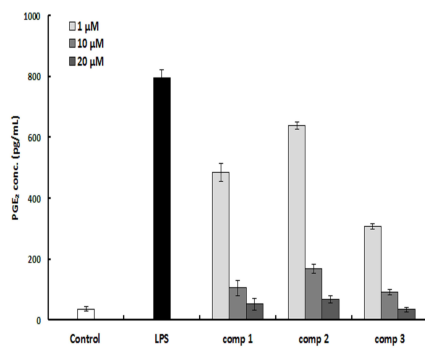


도면2

(a)



(b)



도면3

