(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0076718
(43) 공개일자 2011년07월06일

(51) Int. Cl.
A61K 36/28 (2006.01) *A61K 8/97* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0012586
(22) 출원일자 2010년02월10일
심사청구일자 2010년02월10일
(30) 우선권주장
1020090132171 2009년12월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 퇴계동 916-3 그린타운아파트 102동 401호
임도영
서울특별시 은평구 수색동 322-18
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 천지

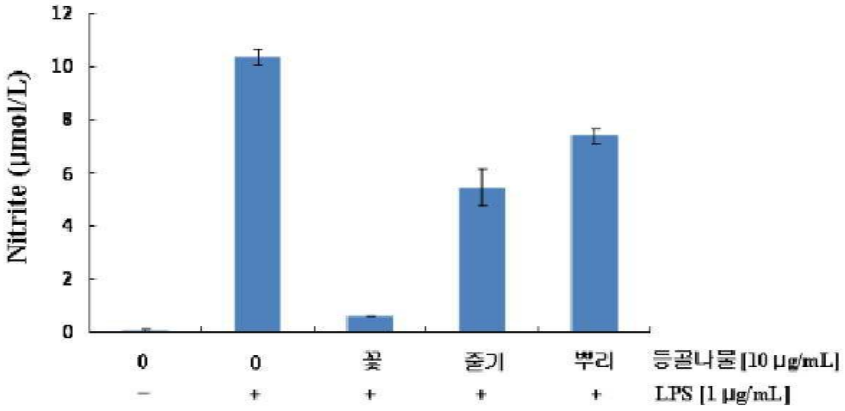
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 등골나물 추출물을 포함하는 항염증제

(57) 요 약

본 발명은 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물에 관한 것이다. 상기 등골나물 추출물은 세포 독성이 없을 뿐만 아니라, 염증과 관련된 각 수준의 단백질의 발현 구체적으로, NO 분비량, iNOS 및 COX-2의 발현여부, iNOS 및 COX-2의 mRNA의 전사여부와 염증과 관련된 여러 사이토카인(cytokine)의 mRNA의 전사여부를 확인한 결과, 효과적으로 염증을 저해할 수 있다는 것이 확인되었으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 항염 조성물은 염증과 관련된 질병에서 염증을 억제하는 항염증제 및 항염효과가 있는 화장료 조성물 등으로 응용될 수 있다.

대 표 도 - 도2a



(72) 발명자

이한나

강원도 춘천시 석사동 836-3

윤정한

강원도 춘천시 후평1동 846-1 현대맨숀 101동 101호

김종대

강원도 춘천시 동산면 군자리 482번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

부처명 교육과학기술부 한국연구재단

연구관리전문기관

연구사업명 지역거점연구단육성산업 / 의료, 바이오 신소재 융복합 연구사업단

연구과제명 천연물유래 항산화 신소재 발굴 및 응용

기여율

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 등골나물 추출물은 등골나물 꽃을 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 추출한 것인 항염 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 등골나물 추출물은 등골나물 꽃 에탄올 추출물에 헥산 및 메틸렌클로라이드로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 분획용매로 분획한 것인 항염 조성물.

청구항 4

제1항의 항염 조성물을 유효성분으로 포함하는 항염증제.

청구항 5

제1항의 항염 조성물을 유효성분으로 포함하는 항염효과가 있는 화장품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항염효과가 있는 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증은 외부에서 들어온 해로운 물질이나 유기체 등과 같은 여러 요인에 의하여 세포나 조직이 손상을 입거나 파괴되었을 때 그 손상을 최소화하고 손상된 부위를 원상으로 회복시키기 위하여 국소적으로 일어나는 면역반응으로서, 생체를 보호하고 조직 손상으로 생성된 산물들을 제거하는데 유용한 방어 메카니즘이다. 상기 방어 메카니즘에 의해, 결과적으로 통증, 부종, 발적 또는 발열 등이 일어나 기능장애가 유발되기도 한다. 상기 염증을 유발하는 여러 요인에는 외상, 화상, 동상, 방사능 등에 의한 물리적 요인, 산(acid)과 같은 화학물질에 의한 화학적 요인 및 항체반응에 의한 면역학적 요인들이 있으며, 그 외에 혈관이나 호르몬 불균형에 의해 발생되기도 한다.

[0003] 상기 염증은 정상적인 경우에는 생체 내에서 염증반응을 통하여 발병 요인을 중화시키거나 제거하고 상한 조직을 재생시켜서 정상적인 구조와 기능을 회복시키는 작용을 하지만, 염증의 정도가 일정 수준 이상이 되거나 만성화되어 만성염증과 같은 질병 상태로 진행되는 경우 문제가 된다. 임상질환 가운데 거의 모든 질환에서 염증반응을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 암발생과정(carcinogenesis)에서도 염증 반응과 관련된 효소들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 최근 밝혀진 바에 의하면, 체내에서의 염증반응의 진행은 COX(cyclooxygenase) 효소 활성과 관련된 것으로 알려져 있다. 상기 COX 효소는 생체 내에 존재하는 프로스타그란딘(prostaglandin)의 생합성에 관련하는 주 효소로서(Smith 등, J. Biol.Chem., 271, 33157(1996)), 두 종류의 이성 효소인 COX-1과 COX-2가 존재하는 것으로 알려져 있다. 상기 COX-1은 위나 신장과 같은 조직에 일정하게 존재하며, 정상적인 항상성을 유지하는데 관여하는 반면, 상기 COX-2는 염증이나 기타 면역 반응 시 세포분열인자(mitogen)나 사이토카인(cytokines)류에 의해 세포 내에서 일시적이고 빠르게 발현되는 효소이다. 따라서, 주로 비가역적인 반응과 관련된 COX-1 억제와 관련된 부작용 없는 항염증효과를 위하여, COX-2를 선택적으로 억제할 수 있는 물질이 염증을 저해하는 효과적인

방법으로 보고되고 있다.

[0005] 또 하나의 강력한 염증 매개물인 나이트릭 옥사이드(Nitric oxide, NO)는 NO 합성효소(NOS)에 의해 L-알지닌으로부터 생성되며, UV와 같은 외부 스트레스나 엔도톡신 또는 사이토카인과 같은 물질에 의해 많은 종류의 세포에서 생성된다. 상기와 같은 염증 자극들은 세포 내의 유도성 NOS(iNOS)의 발현을 증가시키고, 이를 통하여 세포 내에서 NO 생성을 유도하여, 대식 세포를 활성화시킴으로써 염증 반응을 일으킬 수 있다.

[0006] 따라서, 최근 효과적인 염증 완화를 위하여, COX-2 및 iNOS를 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 이러한 연구에 의해 개발된 항염물질의 경우 몇 가지 부작용이 문제되고 있다. 일 예로, 급성 또는 류마티스성 관절염과 같은 만성의 염증 질환의 치료에 사용되는 비스테로이드성 소염 약물들은 COX-2 효소를 억제할 뿐만 아니라 COX-1 효소도 억제함으로써 위장관 장애와 같은 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0007] 한편, 일상생활에 사용되는 화장품은 피부를 보호하고 미화 청결을 위해 사용되는 제품이지만 화장품 조성물을 살펴보면 피부 보호 목적과는 상이한 성분들이 제품 형성에 필수 불가결한 존재로서 사용된다. 예를 들어, 계면활성제, 방부제, 향료, 자외선 차단제, 색소 및 기타 효능이나 효과를 부여하기 위해 쓰이는 여러 가지 성분들을 들 수 있다. 상기 화장품 제조에 필수적으로 사용되는 성분은 일반적으로 피부에 염증이나, 뾰루지 또는 부종 등과 여러 가지 부작용을 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0008] 또한, 체내로부터 배출되는 피지 성분, 땀 성분 및 화장품 성분 중의 지방산, 고급 알코올, 단백질 등이 피부상에 존재하는 피부 상재균들에 의해 독성이 강한 물질로 분해되면, 이들에 의해 피부 염증이 유발될 수도 있으며, 태양으로부터 나오는 자외선에 의해서도 피부 염증이 유발된다는 것은 잘 알려진 사실이다.

[0009] 이렇듯 화장품에 있어서 피부 부작용 유발요인은 항상 잠재되어 있으며 이를 해결 하고자 여러 가지 연구가 진행되어 왔다. 현재까지 홍반이나 부종 같은 자극완화 및 염증 완화 목적으로 이용되고 있는 물질로는 비스테로이드계로 플루페나믹산(flufenamic acid), 이부프로펜(ibuprofen), 벤지다민(benzydamine), 인도메타신(indomethacin)등이 있고, 스테로이드계로는 프레드니솔론(prednisolone), 덱사메타손(dexamethasone) 등이 있으며, 알란토인, 아즈렌, ε-아미노키프론산, 하이드로코티존, 감초산 및 그 유도체(β-글리칠레친산, 글리칠레친산 유도체) 등이 항염증에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0010] 그러나, 일반적으로 항염제로 쓰이는 상기 인도메타신은 화장료에는 사용할 수 없는 물질이고, 상기 하이드로코티존은 사용량이 제한되어 있으며, 감초산 및 그 유도체는 안정화시키기 어렵거나 용해도가 좋지 않아 실제 적용 시 농도의 제한으로 인하여 실질적인 효과를 거두기가 어려운 점이 있는 등 지금까지 알려진 항염제는 피부 안전성 면이나 화장료 배합시의 안정성 면에서 대부분 문제점을 가지고 있어서 그 사용이 제한되고 있다.

[0011] 그러므로, 천연물질 유래 물질로 이러한 부작용이나 세포독성에 대한 위험이 없거나 적으면서, 효과적으로 COX-2 및 iNOS를 억제할 수 있어 항염효과가 우수하여, 부작용없이 염증을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 그 함량의 제한 없이 화장품에 사용될 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다.

[0012] 특히, 최근에는 소비자들의 욕구에 부응하기 위하여 천연 원료를 이용한 화장품 또는 화장료 조성물에 대한 연구개발이 활발히 진행되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 부작용과 관련된 문제가 발생될 가능성이 적은 식물 추출물을 유효성분으로 하는 항염 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 또한, 기존의 항염물질과 달리 식용으로 사용될 수 있는 천연식물에서 비롯하여 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수할 뿐만 아니라, 염증과 관련된 COX-2 및 iNOS를 억제할 수 있는 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증제 또는 화장품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 등골나물 추출물은 NO 분비를 억제할 수 있고, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제할 수 있고, iNOS 및 COX-2의 mRNA의 전사량을 제어하며, 염증과 관련된 여러 사이토카인(cytokine)의 mRNA의 전사량을 제어할 수 있을 뿐만

아니라, 천연물로부터 유래된 것으로 부작용이 문제될 가능성도 낮고, MTT 분석 결과 세포 독성도 없는 것으로 확인되었다.

[0017] 따라서, 본 발명의 항염 조성물은 항염증제의 유효성분 또는 염증을 억제하기 위한 목적으로 화장료 조성물의 유효성분으로 제공될 수 있다.

[0018] 본 발명자들은 등골나물 추출물이 염증을 직접적으로 유도할 수 있는 NO의 분비를 억제할 수 있고, 상기 NO의 분비 및 염증을 유발하는 프로스타글란딘 생성과 관련된 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제할 수 있으며, 상기 iNOS의 mRNA 및 COX-2의 mRNA 전사를 제어할 수 있을 뿐만 아니라, 염증과 관련된 사이토카인의 mRNA 전사를 억제할 수 있다는 결과를 통하여, 등골나물 추출물이 항염효과가 우수하다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명은 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물에 관한 것이다.

[0021] 상기 등골나물(*Eupatorium japonicum*)는 국화과에 속하는 여러해살이풀로, 한국, 중국 및 일본 등지에 분포한다. 전체에 가는 털이 있고 줄기는 곧게 서며, 높이는 70cm 정도이다. 밑동에서 나온 잎은 작고 꽃이 필 때쯤이면 없어지며, 중앙부에 커다란 잎이 마주나고 짧은 잎자루가 있고, 상기 중앙부에 나는 잎은 난형 또는 긴 타원형으로, 가장자리에 톱니가 있다. 상기 등골나물의 꽃은 흰자주빛으로 두상꽃차례를 이루고 7 내지 10월에 핀다. 열매는 수과로 11월에 익는다. 예부터 식용으로 사용되었으며, 구체적으로 등골나물의 어린 순은 살짝 데쳐 양념에 무쳐 먹고, 묵나물로 쓰기도 하며, 꽃을 그늘에 말린 뒤 차로 마시기도 하였다.

[0022] 상기 등골나물 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 등골나물의 꽃, 잎, 가지, 뿌리, 열매 또는 껍질이나 이의 분쇄물, 바람직하게는 등골나물의 꽃에 추출용매를 가하여 추출함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다.

[0023] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 희석수 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 희석수는 알코올을 50 내지 99.9%(v/v)로 물에 희석한 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 등골나물 추출물의 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 희석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 75 내지 99% 에탄올 수용액일 수 있다. 상기 추출과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 60℃ 내지 80℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간일 수 있다.

[0025] 본 발명의 등골나물 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 냉침추출법, 온침추출법, 열 추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.

[0026] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매, 바람직하게는 헥산 및 메틸렌클로라이드로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다. 또한, 상기 분획과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 60℃ 내지 80℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0027] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일 예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[0028] 본 발명의 등골나물 꽃 에탄올 추출물을 5 ㎍/㎖를 처리한 경우 세포 내 실험에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 염증 유도 전의 상태로 억제할 수 있고, 10 ㎍/㎖를 처리한 경우 NO 생성과 관련된 iNOS의 발현을 염증이 전

혀 발생되지 아니한 대조군의 수준까지 제어할 수 있을 뿐만 아니라, iNOS의 mRNA 및 COX-2의 mRNA 전사를 제어할 수 있고, 염증 유발 사이토카인인 IL-6의 mRNA와 IL-1β의 mRNA 전사도 억제할 수 있는 것으로 확인되었다. 또한, 등골나물 꽃 에탄올 추출물은 뿌리 추출물에 비하여 약 800%, 줄기 추출물에 비하여 약 600%의 NO 분비량 억제 효과를 나타내었고, 염증이 유발되지 않은 LPS 무처리군인 대조군과 거의 유사한 NO 분비량이 측정되어 항염효과가 매우 우수한 것으로 확인되었다. 또한, 상기 등골나물 꽃 에탄올 추출물에 대한 분획물에 대하여 실험을 수행한 결과, 물 또는 부탄올을 분획용매로 실험을 수행한 경우, 오히려 추출물 보다 NO 함량이 증가하였으나, 헥산 및 메틸렌 클로라이드의 경우에는 추출물에 비하여 NO 함량이 현저하게 감소되었을 뿐만 아니라 LPS를 처리하지 않은 대조군에 준하는 정도 즉, 거의 NO가 측정되지 아니하여 다른 분획용매에 비하여 현저하게 우수한 효과가 있는 것으로 확인되었다. 한편, 등골나물 꽃 에탄올 추출물은 MTT 분석결과 10 ㎍/㎖의 농도를 처리한 경우에도 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다.

[0029] 따라서 상기 항염 조성물은 염증을 억제하거나 염증을 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 상기 염증은 일반적인 염증질환을 포함하는 개념이며, 일 예로 상기 염증질환은 각종 피부염, 알레르기, 전신성 홍반성 낭창, 망막염, 위염, 간염, 장염, 췌장염 및 신장염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 상기 알레르기는 과민증(anaphylaxis), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 천식(asthma), 알러지성 결막염, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 접촉성 피부염, 두드러기(urticaria), 곤충 알러지, 식품 알러지 및 약품 알러지를 포함한다. 따라서, 본 발명의 항염 조성물은 염증질환의 치료 또는 예방용 조성물로 응용되거나, 상기 염증질환의 예방 또는 개선용 식품조성물로 응용될 수 있다. 상기 식품조성물은 일 예로 상기 염증질환의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품 조성물일 수 있다.

[0030] 상기 건강기능식품은 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 상기 등골나물 추출물을 전체 식품 중량의 0.001 내지 15 중량% 포함될 수 있다.

[0032] 상기 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0033] 상기 등골나물 추출물은 상기 항염 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 등골나물 추출물을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 등골나물 추출물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.

[0034] 이 경우 상기 조성물 내 등골나물 추출물의 함량은 0.001 중량 % 내지 99.9 중량 %, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 화합물의 함량은 바람직한 함량으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.

[0035] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 또한, 상기 약학 조성물은 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 등골나물 추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 항염효과가 있는 것으로 인정된 물질, 일 예로 COX-2 저해제, NO 저해제 또는 항염증제 등으로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.

[0037] 상기 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0038] 또한, 상기 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캅셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSTESIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0039] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOULTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.

[0040] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.

[0041] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0042] 본 발명은 또한, 상기 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물을 유효성분으로 포함하는 항염증제를 제공한다.

[0043] 상기 등골나물 추출물은 바람직하게는 등골나물 꽃 에탄올 추출물, 더욱 바람직하게는 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 헥산 및 메틸렌클로라이드로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 용매로 분획한 분획물일 수 있다.

[0044] 상기 항염증제는 상기 유효성분을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 혼합물로 제공되는 경우, 상기 유효성분은 항염증제 전체에 대해 0.1 내지 99.9 중량%로 포함될 수 있으나, 통상 0.001 내지 50 중량%의 함량으로 포함되는 것이 일반적이다.

[0045] 상기 항염제는 류마티스 관절염, 루푸스, 다발성 경화증과 같은 각종 만성 염증 질환, 패혈증, 쇼크, 장기이식의 거부반응과 같은 각종 급성 염증 질환, 안과질환, 기관지염, 또는 염증성 장질환의 예방 및 치료의 목적으로 사용가능하다.

[0046] 상기 담체 또는 부형제의 일예로는 물, 덱스트린, 칼슘카보네이드, 락토스, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수, 덱스트로스, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 담체 또는 부형제는 2종이상 사용될 수 있다.

[0047] 또한 항염증제를 약제화하는 경우, 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있다.

[0048] 또한 본 발명의 항염증제는, 등골나물 추출물 이외에 공지의 항염활성을 갖는 화합물 또는 식물 추출물을 더욱 포함할 수 있으며, 등골나물 추출물 100 중량부에 대하여 각각 5 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.

[0049] 항염증제의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다. 구체적인 제형의 예로는 경고제, 과립제, 로션제, 리니멘트제, 리모나데제, 산제, 시럽제, 안연고제, 액제, 에어로솔제, 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제, 연고제, 유동엑스제, 유제, 현탁제, 전제, 침제, 점안제, 정제, 좌제, 주사제,

주정제, 캅셀제, 크림제, 환제, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀 등이 있다.

[0050] 본 발명에 따른 항염증제는 경구 또는 비경구로 사용될 수 있으며, 예컨대 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내, 코안, 경막외 및 구강경로를 통하여 사용될 수 있으며, 이의 투여량은, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일예로, 본 발명의 항염증제는 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.1 내지 100 mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여가능하다. 그러나 상기한 투여량은 예시하기 위한 일예에 불과하며 상기 범위에 한정되지는 않는다.

[0051] 본 발명은 또한, 상기 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.

[0052] 상기 등골나물 추출물은 식용으로 사용되던 천연물질 유래이므로 부작용이 문제되지 아니하고, 세포독성도 없을 뿐만 아니라, 염증 억제 효과가 뛰어나기 때문에 항염 및 항자극 활성이 뛰어나므로, 화장품에 포함된 성분들에 의해 유도되는 염증 및 외부 환경에 의해 유도되는 염증을 효과적으로 제어할 수 있기 때문에, 상기 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물은 염증 개선 및 완화효과를 갖는 화장료 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0053] 상기 등골나물 추출물은 등골나물 꽃 에탄올 추출물, 바람직하게는 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 헥산 및 메틸렌클로라이드로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 용매로 분획한 분획물, 더욱 바람직하게는 등골나무 꽃 에탄올 추출물의 헥산 분획물일 수 있다.

[0054] 상기 화장료 조성물은 기초 화장료, 메이크업 화장료, 바디 화장료, 두발용 화장료, 두피용 화장료, 면도용 화장료 또는 구강용 화장료의 용도로 제공될 수 있다.

[0055] 상기 기초 화장료의 예로는 크림, 화장수, 팩, 마사지 크림, 유액 등이 있고, 상기 메이크업 화장료의 예로는 파운데이션, 메이크업 베이스, 립스틱, 아이섀도, 아이라이너, 마스카라, 아이브로우 펜슬 등이 있으며, 상기 바디 화장료의 예로는 비누, 액체 세정제, 입욕제, 선스크린 크림, 선 오일 등이 있고, 상기 두발용 화장료의 예로는 샴푸, 린스, 헤어 트리트먼트, 헤어 무쓰, 헤어 리퀴드, 포마드, 헤어 칼라제, 헤어 블리치제 또는 칼라 린스 등이 있으며, 상기 두피용 화장료의 예로는 헤어 토닉 또는 스칼프 트리트먼트 등이 있고, 상기 면도용 화장료의 예로는 애프터셰이브로션 또는 셰이빙 크림 등이 있으며, 상기 구강용 화장료의 예로는 치약 또는 마우스 워셔 등이 있다.

[0056] 상기 화장료 조성물에는 유효성분 외에 사용용도 및 화장료 조성물의 성질에 따라 통상 화장료 조성물에 배합되고 있는 성분, 일예로 보습제, 자외선 흡수제, 비타민류, 동식물 추출성분, 소화제, 미백제, 혈관확장제, 수렴제, 청량제, 호르몬제 등을 추가로 배합될 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 약물 또는 유효성분을 피부조직으로 침투 또는 이행시키기 위해서 필요한 기제를 추가로 포함할 수 있다.

[0057] 상기 화장료 조성물의 제형은 사용용도 및 화장료 조성물의 성질에 따라 적절한 형태를 취할 수 있으며, 일 예로 수용액계, 가용화계, 유화계, 유액계, 겔계, 페이스트계, 연고계, 에어졸계, 물-기름 2층계 또는 물-기름-분말 3층계일 수 있으며, 상기 제형의 예는 단순한 예시일 뿐, 상기 예시에 의해 본 발명의 화장료 조성물의 제형 및 형태가 제한되는 것은 아니다.

[0058] 상기 유효성분은 상기 화장료 조성물 총 중량을 기준으로 0.001 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.01 내지 20 중량%일 수 있으나, 상기 함량은 제형 또는 화장료 조성물에 함유되는 유효성분 외의 성분의 함량에 따라 적절히 조절할 수 있으며, 상기 함량에 의해 본 발명에 포함되는 유효성분의 함량이 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0059] 본 발명의 등골나물 추출물은 식용으로 사용되는 식물 유래 추출물로서 부작용이나 안전성에 대한 문제가 없고, 세포 독성이 없을 뿐만 아니라, 염증과 관련된 각 수준의 단백질의 발현 구체적으로, NO 분비량, iNOS 및 COX-2의 발현여부, iNOS 및 COX-2의 mRNA의 전사여부와 염증과 관련된 여러 사이토카인(cytokine)의 mRNA의 전사여부에 미치는 영향을 통하여 확인한 결과, 효과적으로 염증을 저해할 수 있는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물은 염증을 억제하여 염증과 관련된 질병을 치료 또는 예방하기 위한 항염증제 및 특정 제형 등과 관련하여 화장품 제조에 필수적으로 사용되는 성분 또는 외부환경으로 인한 피부의 염증을 효과적으로 억제할 수 있는 특징을 갖는 화장료 조성물 등에 응용될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 염증과 관련된 질병에 대한 치료와 관련된 의료산업 및 피부염증의 제어와 관련된 화장품 산업의 분

야에서 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 세포독성을 MTT assay법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 CON은 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군을 나타내며, 가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량(㎍/mL)량을 나타내는 수치이며, 가로축의 화살표로 표시된 실험군은 LPS(1 ㎍/mL)를 함께 처리하였다는 것을 의미한다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, NO 분비량을 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 도 2a에서 +는 LPS(1 ㎍/mL)를 함께 처리하였다는 것을 의미하고, -는 LPS를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축은 등골나물 추출물의 종류(부위별) 및 투여여부를 나타내고, 세로축은 NO 분비량을 나타내는 것이며, 도 2b에서 CON은 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군을 나타내고, 가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량(㎍/mL)량을 나타내는 수치이며, 가로축의 화살표 표시는 LPS(1 ㎍/mL)를 함께 처리하였다는 것을 의미한다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, iNOS 단백질 발현량 및 COX-2 단백질 발현량을 웨스턴 블롯 분석법을 통하여 확인한 결과를 나타낸 사진으로, 상기 사진에서 CON은 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군을 나타내며, 좌측 세로축의 수치는 단백질의 크기(kDa)를 나타내고, 우측 세로축은 해당 단백질의 종류를 나타내는 것이며, 가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량(㎍/mL)량을 나타내는 수치이고, 가로축의 화살표 표시는 LPS(1 ㎍/mL)를 함께 처리하였다는 것을 의미한다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, iNOS mRNA 및 COX-2 mRNA 전사량을 RT-PCR법을 통하여 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 사진에서 CON은 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군을 나타내고, 세로축의 수치는 를 나타내고, 가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량(㎍/mL)량을 나타내는 수치이며, 가로축의 화살표 표시는 LPS(1 ㎍/mL)를 함께 처리하였다는 것을 의미한다. 도 4a는 iNOS mRNA 전사량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 4b는 COX-2 mRNA 전사량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, 염증과 관련된 사이토카인의 mRNA 전사량을 RT-PCR법을 통하여 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 사진에서 CON은 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군을 나타내고, 세로축의 수치는 GADPH 대비 mRNA 함량을 대조군에 비해 증가한 배수로 나타내고, 가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량(㎍/mL)량을 나타내는 수치이며, 가로축의 화살표 표시는 LPS(1 ㎍/mL)를 함께 처리하였다는 것을 의미한다. 도 5a는 IL-6 mRNA 전사량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 5b는 IL-1β mRNA 전사량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이며, 도 5c는 TNF-α mRNA 전사량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 분획물의 항염효과를 분획용매의 종류에 따라 확인하기 위하여, NO 분비량을 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 도 6에서밑줄이 처진 부분은 LPS(1 ㎍/mL)를 함께 처리하였다는 것을 의미하고, CON은 LPS를 처리하지 않은 것을 의미하며, 0은 LPS를 척리한 후, 아무런 시료를 투여한 않은 것을 의미하고, 등골나물은 등골나물 에탄올 추출물을 투여한 것을 의미하며, 가로축은 등골나물 추출물의 분획물의 종류(분획용매별)를 나타내고, 세로축은 NO 분비량을 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐으로 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으므로, 이는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0062] **<실시예 1> 등골나물추출물 및 분획물의 제조**

[0063] 등골나물(*Eupatorium japonicum*)의 꽃, 줄기 및 뿌리 각각 100g을 에탄올 10L에 침지한 후, 온침 추출법으로 추출하였다.

[0064] 보다 구체적으로 상기 등골나물 꽃, 줄기 및 뿌리 각각 500g에 에탄올 50L를 가하여 상기 등골나물 꽃, 줄기 및 뿌리를 각각 추출용매에 완전히 침지시킨 후, 70℃에서 환류시키면서 추출하였다. 상기 추출을 통해 제조된 등골나물 부위별 추출액을 각각 감압농축기를 이용하여 감압 농축한 뒤, -20℃에서 동결건조하였다. 상기 동결건조를 통하여, 50g의 추출물을 얻었다(수율 5%).

[0065] 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 분획물은 상기 조 추출물 30g을 10배의 증류수 즉, 300g의 증류수로 치환한 후, 헥산(hexane)을 첨가하고 분획하여 헥산 층만을 분리함으로써 헥산 분획액을 제조하고, 상기 헥산 층을 분리하고 남은 나머지 용액(물층)에 동일한 양의 메틸렌클로라이드(methylenechloride)를 첨가하고 분획하여 메틸렌클로라이드 층만을 분리함으로써 메틸렌클로라이드 분획액을 제조하고, 상기 메틸렌클로라이드 층을 분리하고 남은 나머지 용액(물층)에 동일한 양의 에틸아세테이트를 첨가하고 분획하여 에틸아세테이트 층만을 분리함으로써 에틸아세테이트 분획액을 제조하고, 상기 에틸아세테이트 층을 분리하고 남은 나머지 용액(물층)에 동일한 양의 부탄올(butanol)을 첨가하고 분획하여 부탄올 층만을 분리함으로써 부탄올 분획액을 제조하고, 나머지 용액을 물(water) 분획액으로 사용하였다. 상기 분획을 통해 제조된 각 용매별 등골나물 분획액을 각각 감압농축기를 이용하여 감압 농축한 뒤, -20℃에서 동결건조하여 분획물을 제조하였다.

[0066] 상기 수득한 추출물 및 분획물은 실험에 사용하기 전까지 냉동보관하였다.

[0067] **<실시예 2> 세포 독성 실험**

[0068] 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물의 세포 독성을 측정하기 위하여, 쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 ATCC에서 구입하여 이용하였다.

[0069] 상기 세포의 배양(Cell culture)에 사용된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/ Nutrient Mixture Ham's F12), FBS(fetal bovine serum), L-glutamine, 페니실린-스트렙토마이신 및 인슐린(Insulin)은 Gibco/BRL(USA)에서 구입하였다.

[0070] 상기 RAW264.7 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 1% 페니실린 스트렙토마이신 1% L-글루타민 및 20 ㎍/㎖ 인슐린을 첨가한 배양액을 사용하여 배양하였고, 37℃ 습윤한 CO_2 배양기(5% CO_2 /95% air)에서 배양하였다. 상기 세포가 배양접시의 약 80%가 차게 배양된 후, PBS(pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후세척하고, 0.25% 트립신 및 2.56 mmol/L EDTA를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다.

[0071] 상기 배양한 세포는 50,000 cells/well의 밀도로 24 well-plate에 분주하여, 24시간 배양하였다. 상기 24시간 배양한 뒤, 1% charcoal stripped FBS가 포함된 serum-deprivation medium(SDM)으로 24시간동안 serum deprivation하였다. 24시간 경과 후, 아무런 처리를 하지 않은 대조군과 LPS와 다양한 농도의 상기 실시예 1의 등골나물 추출물을 함께 포함하는 SDM으로 교환한 후, 0시간, 4시간 및 24시간에 MTT 분석(MTT assay) 방법으로 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

[0072] 보다 구체적으로, MTT 분석이란 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸리움을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT 포르마잔 크리스탈로 환원시키는 세포내 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. 상기 실시예 1의 등골나물 추출물을 녹이기 위한 용매로는 세포 생존에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 확인된 DMSO를 사용하였다. 상기 MTT 분석을 위하여, 각 시간대 별로 세포배양 배지를 제거한 후 MTT를 1 ㎎/㎖로 포함하는 DMEM/F12 배지를 웰 당 1 ㎖씩 처리하고, 37℃ 습윤한 CO_2 배양기에서 3시간 더 배양하였다. 이후 배지를 제거한 후, 0.5 ㎖ 이소프로판올을 첨가하여 포르마잔 크리스탈을 용해시키고, 마이크로 플레이트리더(BIO-RAD)에서 570 ㎚파장으로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다. 24시간 동안 등골나물 추출물로 처리한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0073] 상기 도 1에 나타낸 바와 같이, 24시간을 처리한 경우에도, 아무런 시료를 처리하지 않은 대조예와 LPS와 함께 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 추출물을 다양한 농도로 처리한 경우 모두 세포의 증식에 별다른 영향을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 결과로부터 등골나물 추출물은 10 ㎍/㎖까지는 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

[0074] **<실시예 3> 항염효과 측정1 - NO 함량 측정**

[0075] 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 부위별 추출물의 항염 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 배양한

RAW264.7 세포를 이용하였다.

[0076] 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 부위별 추출물과 LPS를 함께 첨가한 후, 상기 실시예 2의 방법으로 24시간 배양한 뒤, 상기 24시간 배양한 후의 배양액을 수집하여, NO의 분비량을 Griess reagent system(Promega, USA)를 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다. 상기 Griess reagent system을 이용한 측정법은 보다 상세하게는 상기 시스템의 제조사인 Promega에서 제공한 실험방법(protocol)에 의하였고, 상기 수집된 세포배양액에 Sulfanilamide solution을 먼저 넣고, NED solution을 넣은 후에, microplate reader를 이용하여 540nm에서 측정하는 방법으로 수행하였다.

[0077] 상기 도 2a에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군의 경우 낮은 NO 분비량이 확인되었다. 반면, LPS를 첨가한 실험군의 경우 LPS로 인해 염증이 유발됨으로써 NO의 함량이 현저하게 증가하는 것이 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고, 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 부위별 추출물을 10 ㎍/㎖ 처리한 경우 농도의존적으로 NO 분비량이 감소되었고, 특히 등골나물 뿌리 추출물의 경우 약 20%의 NO 함량의 감소효과를 나타내고, 등골나물 줄기 추출물의 경우 약 40%의 NO 함량의 감소효과를 나타낸 반면, 등골나물 꽃 추출물의 경우 거의 LPS를 첨가한 실험군에 비하여 90% 이상의 NO 함량의 감소효과를 나타내어, LPS를 처리하지 않은 대조군가 거의 유사한 정도의 NO함량이 측정되었다. 상기 결과로부터 다른 부위의 추출물에 비하여 등골나물 꽃 추출물이 현저하게 우수한 NO 분비저해효과 즉, 항염효과가 있는 것으로 예상되어, 이후로 등골나물 추출물의 항염효과를 확인하기 위한 실험은 등골나물 꽃 추출물을 이용하여 수행하였다.

[0078] 또한, 상기 도 2b에 나타낸 바와 같이, 항염효과 즉, NO 분비저해효과가 확인된 등골나물 꽃 추출물을 함량을 달리하여 처리한 결과, 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 NO 분비량이 감소되었고, 5 ㎍/㎖를 처리한 경우에는 대조군가 거의 동일한 NO 함량이 측정되며, 10 ㎍/㎖를 처리한 경우에는 오히려 대조군보다 낮은 NO 함량이 측정되어, 본 발명의 등골나물 꽃 추출물은 세포 독성이 없고 안전할 뿐만 아니라, 항염효과도 있는 것으로 확인되었다.

[0079] **<실시예 4> 항염효과 측정2 - iNOS와 COX-2 발현량 측정**

[0080] 상기 실시예 3에서 NO 분비량을 확인된 항염효과를 다시 확인하기 위하여, 염증반응과 관련된 단백질인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현양을 웨스턴 블롯 분석법(Western blot analysis)을 통해 측정하였다.

[0081] 보다 구체적으로, 우선 total cell lyaste를 수득하였다. 우선, total cell lyaste는 상기 실시예 2의 RAW264.7 세포를 1×10^6 cells/dish의 밀도로 100 mm dish에 분주하고 24시간 동안 배양한 후, serum starvation medium으로 24시간 동안 배양하였다. Serum starvation 후, 상기 다양한 농도의 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물과 LPS를 함께 첨가한 후, 상기 실시예 2의 방법으로 24시간 배양한 뒤, 상기 24시간 후, 상기 배양된 각각의 세포를 1 mmol/L iodoacetic acid와 1mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF)가 포함된 cold PBX로 헹구고, scraper로 세포를 수집하여 2,000 rpm 및 4 ℃의 조건에서 2분 동안 원심분리하였다. 상기 원심분리를 통해 얻은 펠렛(pellet)에 lysis buffer(20 mmol/L Hepes, pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 100 mmol/L NaF, 10 mmol.L iodoacetic acid, 0.2 mmol/L PMSF, 20 mg/L aprotinin, 10 mg/L antipain, 10mg/L lepeptin, 80 mg/L benzamidine HCl)를 첨가하여 4 °C에서 40분간 교반하여 세포를 용해(lysis)시킨 후, 원심 분리하여 상층액을 취하는 방법으로 total cell lysate를 제조하고, 이를 -70℃에 보관하였다.

[0082] 상기 total cell lyaste를 이용하여 iNOS와 COX-2 단백질의 발현량을 확인하기 위한 웨스턴 블롯 분석법은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0083] 상기 total cell lyaste(50 μg protein)를 4 내지 20% gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 법으로 분리하여, polyvinylodene fluoride(PVDF) membrane에 transfer하였다. 상기 단백질을 transfer시킨 PVDF membrane은 5% non-fat milk-TBST(20 mmol/L Tris·HCL, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking한 다음 TBST로 10분간 3회 세척하였다. 상기 TBST로 세척한 membrane에 COX-2 및 iNOS antibody를 첨가하여 4℃에서 24시간 incubation시킨 후, 다시 TBST를 이용하여 10분간 3회 세척하였다. 그 후, 상기 TBST로 세척한 membrane을 horseradish peroxidase(HRP)-linked anti-rabbit이나 mouse IgG를 첨가하여 1시간 incubation한 후 TBST로 10분간 3회 세척하였다. 상기 항체(Antibody)들에 결합한 단백질들의 신호는 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate를 이용하여

band를 가시화하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0084] 상기 도 3에 나타낸 바와 같이, 염증과 관련이 없는 β-actin의 경우 모든 실험군에서 유사한 정도의 밴드가 확인되어, 상기 밴드로부터 LPS 및 등골나물 꽃 추출물의 첨가가 세포 생존과 관련이 없으며, 염증과 관계없는 대부분의 단백질의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

[0085] 상기 염증과 관련된 iNOS 및 COX-2 단백질 발현여부를 확인한 결과, LPS를 첨가하지 않은 대조군에서는 상기 단백질들이 발견되지 아니하였으나, LPS를 첨가한 경우에는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 급격히 증가하는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명의 등골나물 꽃 추출물을 첨가한 경우에는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현량이 감소하는 것이 확인되었고, 특히 iNOS의 경우에는 5 ㎍/㎖를 첨가한 경우부터는 현저하게 단백질 발현량이 감소하는 것이 확인되었고, 10 ㎍/㎖를 처리한 경우에는 LPS를 첨가하지 않은 대조군과 동일한 것으로 확인되었다.

[0086] 상기 결과로부터 등골나물 꽃 추출물은 염증 관련 단백질 특히, iNOS의 발현을 억제하여, 염증을 저해할 수 있을 뿐만 아니라, COX-2의 발현도 저해하여 항염효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0087] **<실시예 5> 항염효과 측정3 - iNOS와 COX-2 mRNA 수준 측정 및 염증관련 사이토카인 mRNA 수준 측정**

[0088] 상기 실시예 3에서 NO 분비량을 확인된 항염효과를 다시 확인하기 위하여, 염증반응과 관련된 단백질인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현에 영향을 미치는 각 단백질의 mRNA 전사정도 및 염증과 관련된 사이토카인(cytokine)의 mRNA 함량의 변화를 확인하였다.

[0089] 상기 실시예 4에서 실시한 방법으로 상기 실시예 2의 RAW264.7 세포를 serum starvation medium으로 24시간 동안 배양하였다. Serum starvation 후, 상기 다양한 농도의 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물과 LPS를 함께 첨가한 후, 상기 실시예 2의 방법으로 24시간 배양한 뒤, 상기 24시간 후, 상기 배양된 각각의 세포로부터 Qiagen RNase mini kit(Qiagen, 독일)를 사용하여 RNA를 분리(RNA isolation)하였다. 상기 RNA 분리는 상기 kit에서 제공되는 방법(protocol)으로 수행하였다. 상기 방법으로 분리된 RNA 3㎍에 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, USA)를 첨가하고 42℃에서 1시간 45분 동안 incubation한 후, 70℃에서 15분 동안 incubation하여, cDNA를 수득하였다. 상기 수득한 cDNA는 real-time PCR법으로 정량하였다. 상기 real-time PCR을 수행하기 위한 Primer의 서열과 실험조건은 하기 표 1에 기재하였다.

표 1

[0090]

확인대상 mRNA	Primer sequence		Annealing Tm(℃)
GADPH	sense	CATCAGCAATGCCTCCTGCA	54
	anti-sense	CTGTGGTCATGAGTCCTTCC	
COX-2	sense	GAAGTCTTTGGTCTGGTGCCTG	56
	anti-sense	GTCTGCTGGTTTGGAATAGTTGC	
iNOS	sense	GGAGCGAGTTGTGGATTGTC	56
	anti-sense	GTGAGGGCTTGGCTGAGTGAG	
TNF-a	sense	TCCAGGCGGTGCCTATGT	56
	anti-sense	CGATCACCCCGAAGTTCAGT	
IL-6	sense	GATGCTAACAAACTGGATATAATC	56
	anti-sense	GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG	
I-1β	sense	GATGCTAACAAACTGGATATAATC	56
	anti-sense	GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG	

[0091] 상기 real-time PCR 결과는 ROTOR-GENE 6000 Series software 1.7을 이용하여 GAPDH 대비 mRNA 양으로 환산한 후, 대조군 대비 함량으로 표시하여 도 4 내지 도 5에 나타내었다.

[0092] 상기 도 4에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군은 iNOS와 COX-2 단백질의 mRNA가 전혀 확인되지 아니한 반면, LPS만을 처리한 경우 현저하게 높은 iNOS와 COX-2 단백질의 mRNA가 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 iNOS와 COX-2 단백질의 mRNA 함량이 현저하게 감소되는 것이 확인되었고, 특히 iNOS mRNA 함량은 더욱 현저하게 감소되는 것으로 확인되었다.

[0093] 또한, 상기 도 5에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군은 염증과 관련된 사이토카인(cytokine)인

IL-6의 mRNA, IL-1β의 mRNA 및 TNF-α mRNA가 전혀 확인되지 아니한 반면, LPS만을 처리한 경우 현저하게 높은 사이토카인 mRNA가 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 상기 IL-6의 mRNA, IL-1β의 mRNA 및 TNF-α mRNA의 함량이 현저하게 감소되는 것이 확인되었고, 특히 IL-6의 mRNA 및 IL-1β의 mRNA 함량은 LPS를 첨가하지 않아 염증을 유발하지 않은 수준으로 감소되는 것이 확인되었다.

[0094] **<실시예 6> 항염효과 측정4 - 분획물의 NO 함량 측정**

[0095] 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 분획물의 분획용매별 항염 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 배양한 RAW264.7 세포를 이용하여, 상기 실시예 3의 방법으로 분획물이 NO 생성에 미치는 영향을 측정하였다.

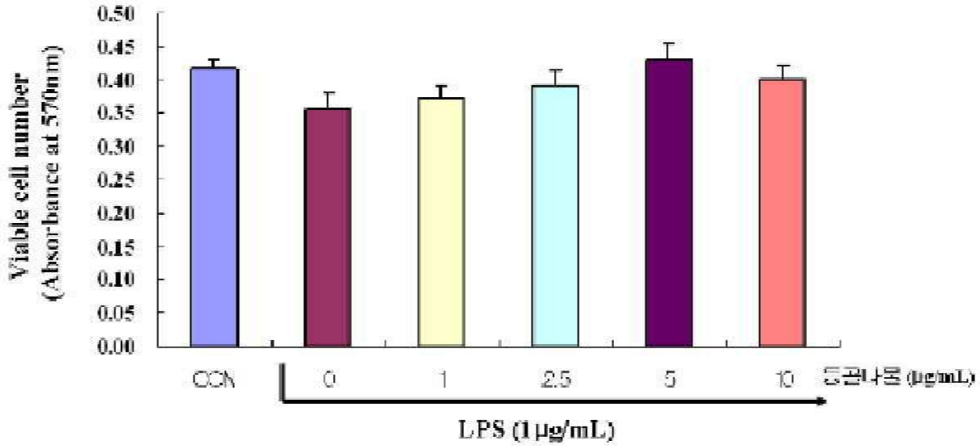
[0096] 보다 상세하게, 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 에탄올 추출물의 분획물 10 ㎍/㎖와 LPS를 함께 첨가한 후, 상기 실시예 2의 방법으로 24시간 배양한 뒤, 상기 24시간 배양한 후의 배양액을 수집하여, NO의 분비량을 상기 실시예 3과 같이 Griess reagent system(Promega, USA)를 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0097] 상기 도 6에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군(도 6의 CON)의 경우 NO 분비량이 거의 없는 것으로 확인되었다. 반면, LPS를 첨가한 실험군(도 6의 0)의 경우 LPS로 인해 염증이 유발됨으로써 NO의 함량이 현저하게 증가하여 약 20 μM인 것이 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고, 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물의 경우 거의 LPS를 첨가한 실험군에 비하여 75% 정도의 NO 함량의 감소효과를 나타내었다. 한편, 상기 에탄올 추출물의 물 분획물(도 6의 water)의 경우 거의 NO 분비저해효과가 없는 것으로 확인되었고, 부탄올 분획물(도 6의 butanol)의 경우도 에탄올 추출물의 300%에 해당하는 NO 함량을 나타내어 NO 분비저해효과가 매우 낮은 것으로 확인되었다. 또한, 에틸아세테이트 분획의 경우에도 에탄올 추출물의 50%가 넘는 NO 함량을 나타내어, 에탄올 추출물에 비하여 NO 분비저해효과의 상승정도가 낮은 것으로 확인되었다. 그러나, 헥산 분획 및 메틸렌클로라이드 분획의 경우에는 LPS를 처리하지 않은 대조군(도 6의 CON)과 거의 유사한 정도의 NO 함량을 나타내어 현저하게 향상된 NO 분비저해효과가 있는 것으로 확인되었다. 상기 NO의 생성은 염증 반응과 관련하여 UPSTREAM과 관련된 것이므로, 이러한 UPSTREAM 단계에서 NO 생성의 억제는 최종 염증반응과 관련하여 현저한 효과로 나타낼 수 있으므로, 상기 헥산 분획 및 메틸렌클로라이드 분획은 다른 분획에 비하여 현저한 항염효과가 있는 것으로 예상되었다.

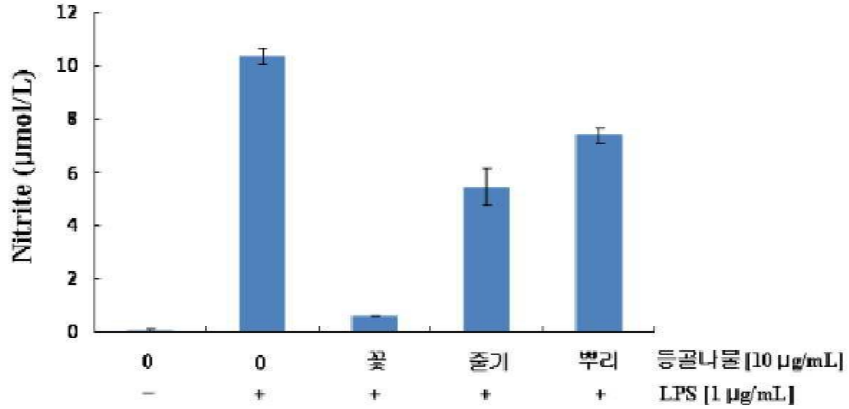
[0098] 상기 실험결과에 의하면, 식용으로 사용되었던 등골나물의 추출물은 예상한 바와 같이 MTT 분석결과 세포독성이 전혀 없는 것으로 확인되었고, 항염효과와 관련하여 염증을 유발하는 다양한 메카니즘을 검토하면 NO에 의해 유발되는 염증과 관련된 결과(NO의 분비량, NO 생성과 관련된 iNOS의 발현량 및 iNOS의 mRNA 전사량), COX-2에 의해 유발되는 염증과 관련된 결과(COX-2의 발현량 및 COX-2의 mRNA 전사량) 및 염증을 유발하는 다양한 사이토카인의 mRNA 전사량과 관련된 결과를 고려하면, 매우 효과적으로 염증을 저해할 수 있을 것으로 확인되었고, 특히 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 헥산 분획 및 메틸렌클로라이드 분획은 항염효과가 매우 뛰어난 것으로 확인되었으므로, 본 발명의 등골나물 추출물 특히, 등골나물 꽃 에탄올 추출물과 이의 헥산 분획 및 메틸렌클로라이드 분획은 기존 염증 치료제를 대체할 수 있을 뿐만 아니라, 기존 화장품에 사용되는 성분으로 인한 염증 발생을 적절하게 제어할 수 있어 화장료 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면

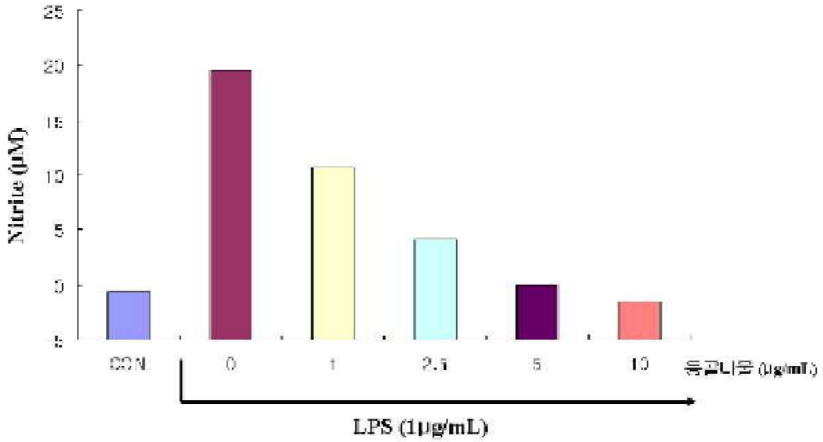
도면1



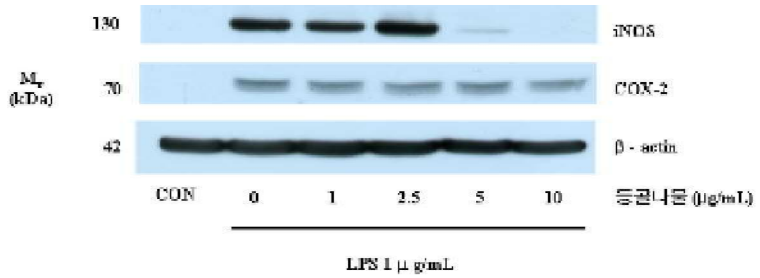
도면2a



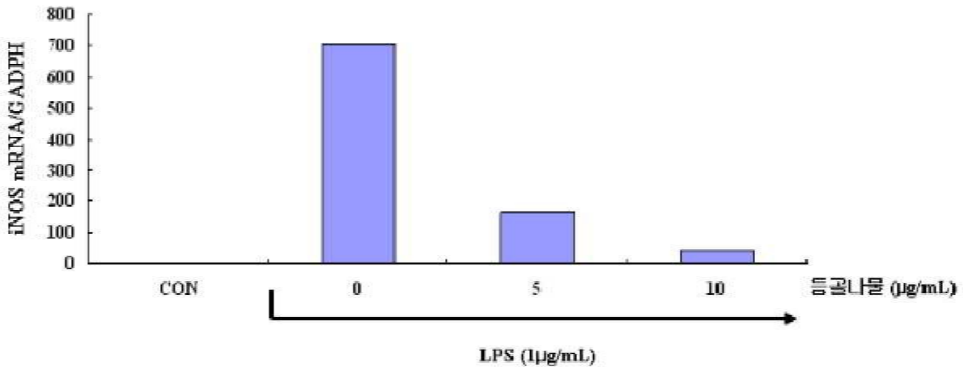
도면2b



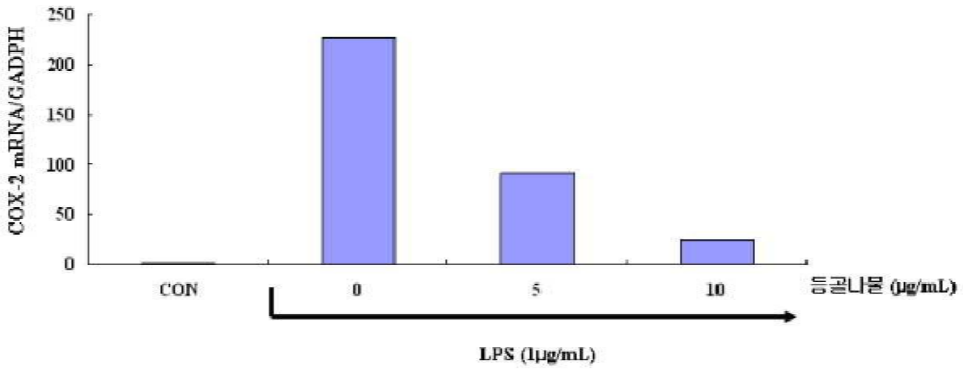
도면3



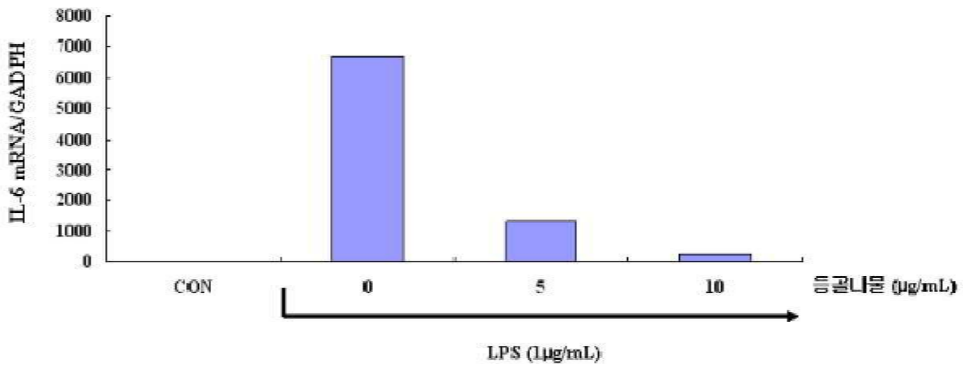
도면4a



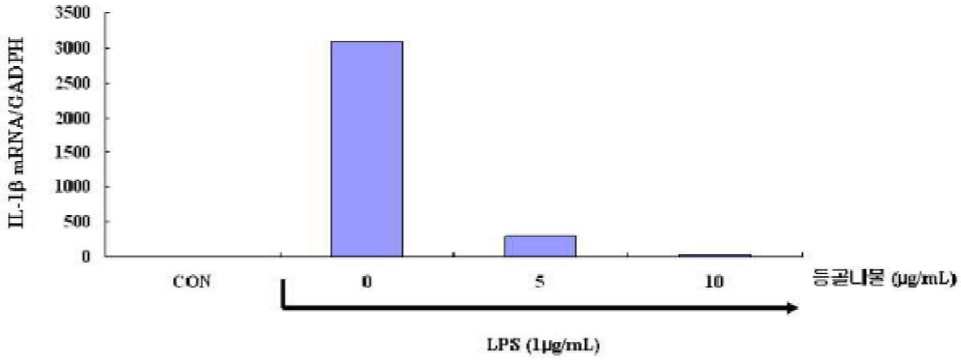
도면4b



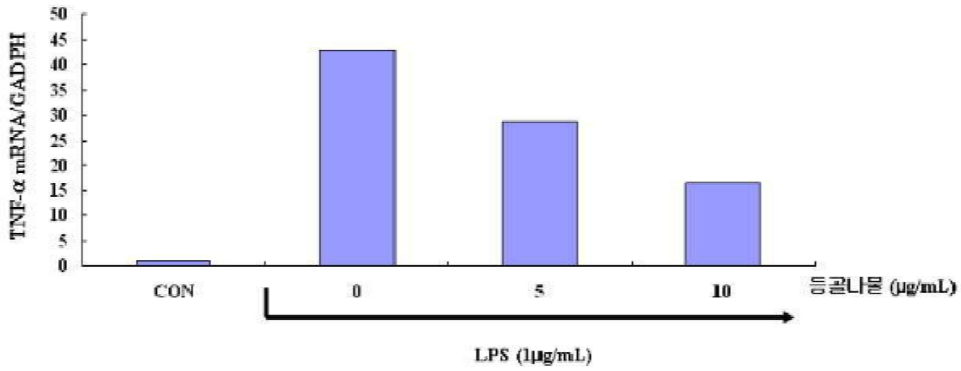
도면5a



도면5b



도면5c



도면6

