



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월15일
(11) 등록번호 10-1307501
(24) 등록일자 2013년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/288 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0106083
(22) 출원일자 2007년10월22일
심사청구일자 2008년08월06일
(65) 공개번호 10-2009-0040631
(43) 공개일자 2009년04월27일
(56) 선행기술조사문헌
J. Food Sci. Nutr., Vol. 10, pp.172-178.
(2005)*
Nutrition Research Vol. 27, pp. 362- 366.
(2007)
Food Sci. Biotechnol. Vol. 15, No. 2, pp.
270-276. (2006)
Biochemical Pharmacology. Vol. 66, pp.
1821-1832. (2003)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
인제대학교 산학협력단
경상남도 김해시 어방동 607 인제대학교 내
(72) 발명자
예성수
부산광역시 부산진구 복지로 70, 현대I아파트 20
7동 1806호 (개금동)
최춘연
부산광역시 사상구 삼덕로89번길 12-3, 5/5 (덕포
동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
원영호

전체 청구항 수 : 총 2 항

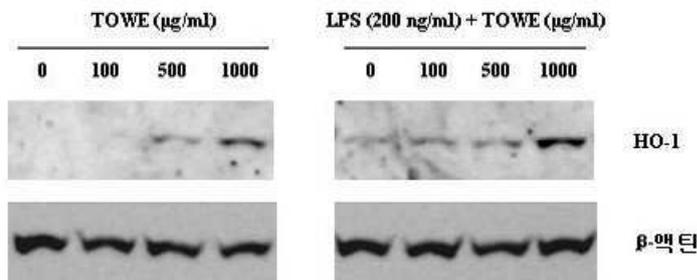
심사관 : 이정아

(54) 발명의 명칭 **민들레 열수추출물을 유효성분으로 함유하는 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 민들레 (*dandelion (Taraxacum officinale)*) 열수추출물을 유효성분으로 함유하는 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 헴옥시게나제-1 (heme oxygenase-1, HO-1)의 mRNA 및 단백질 발현을 촉진시키고 효소 활성을 증가시킴으로써 일산화질소 (NO) 및 iNOS (inducible NOS)의 생성을 억제하고 과산화수소에 의한 세포손상을 감소시키므로, 산화적 스트레스 감소를 통한 면역질환의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

최일환

부산 연제구 연산9동 연산엘지아파트 113-1304

송영선

경남 김해시 삼방동 한일아파트 7-1001호

특허청구의 범위

청구항 1

민들레 열수추출물 (dandelion (*Taraxacum officinale*) water extract, TOWE)을 유효성분으로 함유하고, 헴옥시게나제-1 (heme oxygenase-1, HO-1)의 mRNA 및 단백질 발현을 촉진시켜, 유도성 일산화질소 합성효소 발현억제, 일산화질소의 생성억제 및 산화적 스트레스에 의한 세포손상을 억제하는 항염증제.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 항염증의 대상이 되는 염증이 급성 및 만성 감염, 급성 및 만성 기관지염, 골관절염, 류마티스 관절염, 정맥동염, 위장염, 대장염, 방광염, 요도염, 피부염, 결막염, 심막염, 복막염, 활막염, 흉막염, 건염, 담낭염, 질염 및 포도막염으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는, iNOS 발현억제, NO의 생성억제 및 산화적 스트레스에 의한 세포손상을 억제하는 항염증제.

청구항 4

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 민들레 열수추출물 (dandelion (*Taraxacum officinale*) water extract, TOWE)의 신규한 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 헴옥시게나제-1의 발현 및 활성을 유도하는 상기 민들레 열수추출물을 유효성분으로 함유하는 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 민들레 (dandelion (*Taraxacum officinale*))는 안질방이, 무순들레라고도 불리우며, 들이나 길가에 피는 다년생 초본 식물로 꽃은 4-5월에 피며, 예로부터 어린 잎은 나물과 국거리로 식용해 왔다 (김일혁 및 성환길, 약이 되는 풀과 나무, 중앙대학교 출판부, p332, 1997). 또한, 민들레는 꽃이 피기 전에 전초를 건조한 것을 포공영 (김원, 자원식물학, 경북대학교 출판부, p190, 1987)이라 하며 한방에서는 강장, 해열, 이뇨, 건위, 거담, 해독 등에 이용되어 왔다 (홍석화, 한국의 토종 101가지, 웅진출판사, 1990, 18). 민들레의 맛과 성질은 쓰고 달며, 차갑다. 전초는 이담 작용이 있으며 위액의 분비를 빠르게 한다.

[0003] 민들레는 타락사스테롤 (taraxasterol), 콜린, 이눌린 및 펙틴 등의 성분을 함유하고, 뿌리는 타락솔 (taraxol), 타락세롤 (taraxenol), 타락사스테롤, 베타아미린, 스티그마스테롤, 콜린, 유기산, 과당, 자당, 포도당, 글루코시드 등을 함유하고, 잎은 루틴, 비올라잔틴, 플라스토퀴논, 비타민 C (50-70 mg/100 g) 및 비타민 D (5-9 mg/100 g)를 함유하며, 꽃은 알니디올, 루틴 및 플라보잔틴을 함유한다 (동양의학대사전, 경희대학교 출판국, p514, 1999). 특수 성분으로 이눌린, 스테롤, 콜린, 팔미틴, 세로친 등을 많이 함유하고 있으며, 특히 민들레의 리놀산과 콜린 성분은 고혈압, 심장병, 간질환 등 성인병에 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Kim YG et al., Free radical, YeMoonGak, Seoul, 1997).

[0004] 이러한 민들레속 식물의 성분연구로는 서양민들레 뿌리에서 p -하이드록시 페닐아세트산 (p -hydroxyphenyl-acetic acid), 3,4-다이하이드록시신남산 (3,4-dihydroxycinnamic acid), 멜리시산 (melissic acid), 타락사스테릴아세테이트 (taraxasteryl acetate), 타락솔, 타락세롤, ψ -타락사스테롤 등의 많은 약효성분을 분리한 것이 보고되었다 (황완균 등, 쯤민들레의 약효 성분 (I) 쯤민들레 지상부의 Phenol 성분, 25(3):209-213, 1994;

및 Hans-Willi R and Jai-tung H, *Phytochemistry*, 24:1557-1562, 1985). 서양에서 민들레는 담즙분비 촉진, 항류마티스, 이노 등에 약재로 사용되고 있으며 (Yang KS and Jeon CM, *Korean J. Pharmacogn.*, 27:267-273, 1996), 건조한 민들레의 잎과 뿌리는 커피 대용품으로 애용되는데 (Jeong JY *et al.*, *Arch. Pharm. Res.*, 14:68-72, 1991), 특히 폴리페놀화합물 중 플라보노이드, 루테올린, 신남산, 쿠마린, 타락사스테롤 등의 성분 및 엽록소와 비타민 C가 많이 함유되어 있다 (Williams CA *et al.*, *Phytochemistry*, 42:121-127, 1996).

[0005] 헴옥시게나제 (heme oxygenase, HO)는 항산화반응과 관련하여 최근 그 역할이 중요하게 인식되고 있다. HO는 헴 (heme)을 빌리버딘 (biliverdin)으로 변환시키는 속도-제한 효소로서, 이때 일산화탄소 (CO)와 철 (Fe)이 부수적으로 생성된다. 빌리버딘은 이어서 빌리루빈 (bilirubin)으로 환원되어 여러가지 산화물들을 청소하는데 사용된다. HO는 현재까지 알려진 바로는 3가지의 이성체가 존재하는데 (McCoubrey *et al.*, 1997), 계속 발견되는 HO-2 및 HO-3와는 달리 HO-1은 여러 자극들에 의해 유도되는 효소로서 특히 산화성 스트레스에 의해서 유도되어 지는 것으로 알려져 있고 (Tenhunen *et al.*, 1970; 및 Choi and Alam, 1996), 특히 항산화와 항염증과 관련된 보호기능을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Otterbein *et al.*, 2000; 및 Lee *et al.*, 2003).

[0006] 또한, HO의 최종산화물인 빌리루빈은 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하며, 최근 연구에 의하면 빌리루빈 이외에 일산화탄소 (CO)도 세포를 보호하는데 관여하는 것으로 생각되고 있다. HO가 결핍된 세포에서는 산화적 스트레스에 의한 세포손상을 더욱 증가시킨다고 하는 보고 (Akihiro *et al.*, 1999)에서 알 수 있듯이 HO는 산화적 스트레스에 대한 면역계의 보호에 특히 중요한 효소이다.

[0007] HO-1의 증가는 박테리아독소인 지질다당류 (lipopolysaccharide, LPS)에 의해 과잉생성이 유도되는 유도성 일산화질소 합성효소 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)를 억제하며, 최근에는 이러한 기전을 활용하여 HO-1 증가를 통한 iNOS 억제를 유도하는 유용한 물질들의 개발이 이루어지고 있다 (Chen TH *et al.*, 2007).

[0008] NO는 각종 세포에 의해 생산되어 이들 세포에 작용하고, 염증 및 자가면역이 중재된 조직의 파괴에 관여하는 다기능 중재자인 것으로 알려져 있다. 상기와 같은 NO는 생체 내에서 일산화질소 합성효소 (nitric oxide synthase, NOS)에 의하여 생성되며, NOS는 지속적으로 생성되는 것 (constitutive NOS, cNOS)과 자극에 의해서 생성이 유도되는 것 (inducible NOS, iNOS)이 존재한다.

[0009] 상기 NOS는 L-아르기닌 (L-arginine)으로부터 NO를 생성시키는 효소로 그 중에서 신경계에 존재하는 nNOS (neuronal NOS) 및 혈관계에 존재하는 eNOS (endothelial NOS)는 체내에서 항상 일정 수준으로 발현되고 있으며, 이들에 의해 소량 생성되는 NO는 신경전달이나 혈관확장을 유도하는 등 정상적인 신체의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 하지만, iNOS는 각종 사이토카인 (cytokines)이나 외부 자극물질에 의해 유도되어 과량의 NO를 급격히 발생시켜 세포독성이나 각종 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 특히, 만성 염증은 iNOS 활성의 증가와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다 (Miller M. J. *et al.*, *Mediators of inflammation*, 4:387-396, 1995; 및 Appleton L. *et al.*, *Adv. Pharmacol.*, 35:27-28, 1996). 또한, iNOS의 유전자 발현은 NF- κ B와 AP-1 등의 전자조절인자들에 의하여 조절되며, 정상시에는 거의 발현되지 않다가 면역체계가 활성화될 경우에 급격히 그러나 한시적으로 발현이 유도되어 단백질이 합성된다고 알려져 있다.

[0010] 이러한 NO가 세포내에서 과도하게 발현될 경우, 염증이나 자가면역 질환 등의 면역계 질환을 야기하게 되어 염증 및 자가면역 질환 등을 일으키게 된다. 따라서, NO 생성을 저해하는 활성을 갖는 성분은 NO의 과잉생산에 의해 유발되는 질환인 상기 염증이나 자가면역 질환의 예방 및 치료에 효과적일 것이다.

[0011] 이에 본 발명자들은 NO의 과잉생산으로 인한 질환을 예방 또는 치료하기 위한 치료제의 개발을 위하여 연구를 거듭하던 중, 민들레의 열수추출물이 HO-1의 mRNA 및 단백질 발현을 촉진시키고 효소 활성을 증가시킴으로써 NO 및 iNOS의 생성을 억제하고 과산화수소에 의한 세포손상을 감소시킬 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 HO-1의 발현 및 활성 유도를 통하여 면역질환을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 면역질환을 효과적으로 예방할 수 있는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 민들레 열수추출물을 유효성분으로 함유하는 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 민들레 열수추출물을 포함하는 면역질환의 예방용 식품 조성물을 제공한다.

효과

[0016] 민들레 열수추출물을 포함하는 본 발명의 조성물은 면역세포 내에서 HO-1의 유전자 발현 및 효소 활성을 증가시킬 수 있으므로, 면역질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명에 따른 민들레 열수추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 HO-1의 발현 및 효소 활성을 증가시키는 활성을 가지고 있을 뿐 아니라, LPS에 의해 과잉생산이 유도되는 NO 및 iNOS의 생성을 억제하고, 과산화수소에 의해 유도되는 세포손상을 막아주며, 또한 상기 민들레 열수추출물은 세포의 생존율에 영향을 주지 않아 부작용을 나타내지 않으며, 식용 식물에서 유래된 천연물질이므로 안전하다.

[0018] 본 발명의 일실시예에서는 민들레 열수추출물이 HO-1의 발현을 유도하는지 여부를 확인하기 위해 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포주에 민들레 열수추출물을 처리하고 배양한 후, 세포로부터 단백질을 분리하고, HO-1 단백질에 대하여 효소 반응을 실시하였다. 그 결과, 민들레 열수추출물이 HO-1의 효소 활성을 증가시키는 것을 확인하였으며, 민들레 열수추출물에 의한 HO-1 효소 활성의 증가는 기존의 HO-1 활성 증가제인 hemin의 효과에 버금감을 알 수 있었다 (도 1 참조).

[0019] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 민들레 열수추출물을 단독으로 또는 염증반응과 같은 면역반응을 유도하는 박테리아 독소인 LPS (lipopolysaccharide)와 혼합 처리하고 배양한 후, 세포로부터 단백질을 분리하고, HO-1 단백질에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 (western blot)을 실시하였다. 그 결과, 민들레 열수추출물이 HO-1의 단백질 생성의 증가를 유도하는 것을 확인하였다 (도 2 참조). 따라서, 민들레 열수추출물에 의한 HO-1 효소 활성의 증가는 HO-1 단백질 발현 증가 효과에 기인한 것임을 알 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 민들레 열수추출물 및 LPS를 처리한 세포를 배양 후, 세포로부터 RNA를 분리하여 역전사-중합효소반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction) 분석을 실시하였다. 그 결과, 민들레 열수추출물이 mRNA 수준에서 HO-1의 유전자 발현을 유도하는 것을 확인하였다 (도 3 참조).

[0021] 또한, 본 발명의 또 다른 실시예에서는 HO-1 발현 유도에 의한 iNOS 생성 억제 여부를 확인하기 위하여 민들레 열수추출물 및 LPS를 처리한 세포를 배양한 후, 세포로부터 단백질을 분리하고, iNOS 단백질에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 (western blot)을 실시하였다. 그 결과, 민들레 열수추출물이 단백질 수준에서 iNOS의 합성을 억제하는 것을 확인하였다 (도 4 참조). 따라서, 민들레 열수추출물에 의한 HO-1의 발현 유도는 iNOS 효소 발현 억제 효과와 관련이 있음을 알 수 있다.

[0022] 또한, 세포가 배양된 배지를 회수하여 세포가 생성하는 아질산염 (nitrite)의 양을 측정하여 NO 생성의 정도를 측정된 결과, 민들레 열수추출물이 농도-의존적으로 대식세포에서의 NO의 생성을 효과적으로 억제하였고, 이 때 세포의 생존율에는 변화가 없음을 확인하였다 (도 5 및 6 참조).

[0023] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 세포손상을 유도하는 산화 스트레스로서 과산화수소를 처리하였을 때 민들레 열수추출물의 세포 보호 효과를 확인하기 위하여 민들레 열수추출물 및 과산화수소를 처리하고 배양한 후, 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, 과산화수소에 의한 세포 생존율의 감소가 민들레 열수추출물에 의하여 회복

되는 것을 확인하였다 (도 7 참조), 이로부터 민들레 열수추출물은 과산화수소와 같은 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 막아준다는 것을 알 수 있었다.

- [0024] 따라서, 상기 민들레 열수추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 H₂O₂의 발현 및 활성을 유도할 수 있으므로, 면역질환의 치료제로써 사용될 수 있다.
- [0025] 상기 면역질환의 대표적인 예로 염증성 질환을 들 수 있는데, 염증은 열, 홍조, 팽윤, 통증 및 기능 상실로 나타난다. 염증의 원인은 미생물 감염 (세균 및 진균 감염), 물리적 인자 (화상, 조사 및 외상), 화학적 제제 (독소 및 유발 물질), 조직 괴사 및 각종 유형의 면역학적 반응과 같은 인자들을 포함하며, 특히 NO를 발생시키는 효소인 NOS와 프로스타글란딘의 생합성과 관련된 효소들이 염증반응을 매개하는데 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있고, 면역 반응 및 염증 반응에서 생산된 다수의 반응성 생성물 중 하나인 NO는 특히 만성 염증에 있어서 비특이적인 조직 파괴를 유발하는 것으로 알려져 있다.
- [0026] 본 발명의 민들레 열수추출물이 적용될 수 있는 NO의 과잉생산에 의한 질환은, 이에 한정되지는 않으나, 예를 들면, 급성 및 만성 감염, 급성 및 만성 기관지염, 골관절염, 류마티스 관절염, 정맥동염, 위장염, 대장염, 방광염, 요도염, 피부염, 결막염, 심막염, 복막염, 활막염, 흉막염, 건염, 담낭염, 질염 및 포도막염 등을 포함한다.
- [0027] 본 발명에서 사용가능한 민들레 열수추출물은 자연으로부터 얻거나 상업적으로 구입한 민들레, 예를 들어 경남 의령 소재 민들레식물로부터 유기농 민들레분말을 이용하여 추출물을 조제할 수 있다. 상기 추출물은 공지된 방법을 사용하여 추출할 수 있으며, 이를 감염여과한 후 동결건조하여 사용하는 것이 바람직하다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 민들레 열수추출물은 단독으로 사용되거나 또는 선택된 투여 경로에 따라 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체와 배합하여 제형화될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 경구 투여 또는 비경구 투여가 모두 가능하며, 비경구적인 투여 경로로는 이에 한정되지는 않으나, 피하 내, 정맥 내, 근육 내, 또는 복강 내 투여될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물의 경구 투여를 위해서는 캡슐, 정제, 환제, 과립제 및 산제와 같은 고체 형태 또는 엘릭시르 시럽 및 현탁제와 같은 액체 형태로 제형화될 수 있다. 경구 투여를 위해 고체 형태로 제형화하는 경우에는 적합한 담체로서 당분야에 공지된 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등을 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물을 캡슐로 제형화하기 위해서는 유당, 전분, 셀룰로오스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아린산과 같은 담체를 사용할 수 있다. 또한, 희석제를 사용하여 압착된 정제의 형태로 제조할 수 있으며 상기 정제와 캡슐은 모두 당분야에 공지된 방법에 따라 서방성으로 제조하여 수시간에 걸쳐 약제가 연속 방출되도록 할 수 있다. 또한, 압착된 정제는 당 피복 또는 필름 피복을 시킬 수 있다. 경구 투여를 위해 액체 형태로 제형화하는 경우에는 적합한 담체로서 당분야에 공지된 현탁제, 유제, 시럽제, 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물의 비경구 투여를 위해서는 앰플 또는 바이알 단위의 주사제 형태가 바람직하다. 주사제로 제형화하는 경우의 적합한 담체로는 당분야에 공지된 안정제, 완충물질 및 보존제 등을 사용할 수 있고, 적합한 안정제로는 나트륨 비설파이트, 나트륨 설파이트 및 아스코르브산 등이 있으며, 보존제로는 염화벤즈알코늄, 메틸 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올 등이 있다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물의 활성 화합물의 통상적인 1일 투여량은 0.000001 내지 1 mg/kg 체중, 바람직하게는 0.001 내지 500 mg/kg 체중, 바람직하게는 10 내지 300 mg/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 의사의 의학적 판단 하에 환자의 연령, 건강정도, 체중, 배설율, 식이, 질병 중증도, 사용된 화합물의 활성, 성별, 투여 시간, 투여 경로, 치료 기간 및 치료 횟수 등에 따라 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- [0033] 본 발명의 민들레 열수추출물은 천연약재로서 안전성이 확보되어 있으며, 마우스에 복강내투여시의 50% 치사량 (LD₅₀)은 적어도 추출물 28 g/kg 이상인 안전한 물질이다 (K. Schmitz et al., *Journal of Ethnopharmacology*, 107:313-323, 2006).
- [0034] 또한, 본 발명의 상기 민들레 열수추출물은 각종 면역질환의 예방 등의 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다.

- [0035] 본 발명의 건강음료는 필수성분으로서 상기 민들레 열수추출물을 함유하는 것 외에는 액체성분에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 향미제로서는 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 다당류, 예를 들어 텍스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다.
- [0036] 상기 외에 본 발명의 식품 또는 음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 착색제 및 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0037] 건강 보조식품 개발을 위하여 본 발명의 상기 민들레 열수추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어 각종, 식품류, 음료류, 껌류, 미타민 복합제 등이 있다.
- [0038] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 더 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 한정하지는 않는다.
- [0039] 하기 실시예에서 도면상에 표시된 * 및 **는 통계분석결과를 나타내는 것으로서, 민들레 열수추출물을 처리하지 않은 군 (도면에서 처리 농도가 0인 군)에 대하여 *는 $p < 0.05$ 를 나타내며, **는 $p < 0.01$ 을 나타낸다 (통계분석은 Dunnett's two-tailed t-test를 수행한 것이다).
- [0040] 제조예 1: 민들레 열수추출물의 제조
- [0041] 본 발명의 민들레 열수추출물을 제조하기 위하여, 경남의령 소재 민들레식품으로부터 유기농 민들레 분말을 공급받아 분말 시료 1 kg에 10배의 증류수를 가한 다음, $100 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 환류냉각관을 부착하여 4시간 동안 추출하고 여과지 (Whatman paper No. 4)를 사용하여 감압여과한 후 동결 건조하였다. 이때, 민들레 추출물의 회수율은 22.5%였다.
- [0042] 실시예 1: 민들레 열수추출물에 의한 HO-1 효소 활성 증가 유도
- [0043] 본 발명의 민들레 열수추출물이 HO-1의 효소 활성을 유도하는지 확인하기 위하여, 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 사용하여 민들레 열수추출물의 효과를 측정하였다.
- [0044] 구체적으로, RAW 264.7 세포를 페니실린 100 유닛/ml, 스트렙토마이신 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 우태아혈청 (fetal bovine serum) 5%를 포함하는 RPMI 1640 배지 (이하, 편의상 'RPMI 배지'라 함)에서 1×10^6 세포/ml의 농도로 현탁하여 배양접시에 간 다음, 5% CO_2 배양기에서 37°C 의 조건으로 배양하였다. 상기 RAW264.7 세포를 배양하면서 민들레 열수추출물을 각각 100, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 18시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 기존의 HO-1 유도물질로 알려진 헤민 (hemin) 100 μM 을 처리한 군을 사용하였다. 이후, 세포를 회수하여 HO-1 효소 반응계를 이용하여 효소 반응을 시키고 그 산물인 빌리루빈의 흡광도를 측정하여 HO-1 효소 활성도를 측정하여 그 결과를 도 1에 나타내었다. 또한, 회수된 세포는 세포생존을 측정에도 이용하였으며, 세포생존율은 MTT 분석법에 따라 측정하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0045] 도 1 및 6에 나타난 바와 같이, 민들레 열수추출물을 처리한 군에서는 그 투여량이 증가함에 따라 HO-1 효소의 활성이 증가하였으며, 그 수준은 헤민을 처리한 대조군의 경우에 비견될 수 있었다. 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, 이때의 세포생존율에는 전혀 변화가 없음을 확인하였다.
- [0046] 실시예 2: 민들레 열수추출물에 의한 HO-1 발현 유도 측정

- [0047] <2-1> 웨스턴 블랏을 이용한 HO-1 발현 유도 측정
- [0048] 본 발명의 민들레 열수추출물이 HO-1의 발현을 유도하는지 여부를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.
- [0049] 구체적으로, RAW264.7 세포를 RPMI 배지를 이용하여 1×10^6 세포/ml의 농도로 현탁하여 배양접시에 간 다음, 5% CO₂ 배양기에서 37°C의 조건으로 배양하면서 민들레 열수추출물을 100, 500 및 1,000 µg/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 활성화된 세포에서의 영향 측정을 위해서는 민들레 열수추출물 처리 1시간 후에 LPS 200 ng/ml을 처리한 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포를 회수하여 항-마우스 HO-1 항체 (Santa Cruz Biotechnology 사, 미국; 희석비율 1:1,000)를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였고, 시료 내의 다른 단백질에는 변화가 없음을 보여주기 위한 대조군으로서 항-마우스 베타-액틴 항체 (Cell Signaling Technology 사, 미국; 희석비율 1:1,000)를 사용하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0050] 도 2에 나타난 바와 같이, LPS 처리 여부와 상관없이 민들레 열수추출물의 처리는 HO-1 단백질 합성을 증가시켰으며, 투여한 민들레 열수추출물의 양이 증가할수록 HO-1 단백질 합성이 더욱 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0051] <2-2> 역전사-중합효소반응 (RT-PCR)을 이용한 HO-1 합성 증가 측정
- [0052] 본 발명의 민들레 열수추출물에 의한 HO-1의 합성 증가를 mRNA 수준에서 확인하기 위하여, RT-PCR을 수행하였다.
- [0053] 구체적으로, 상기 <2-1>과 동일한 방법으로 세포를 배양한 후, 민들레 열수추출물을 100, 500 및 1,000 µg/ml의 농도로 처리한 다음, 1시간 후에 세포를 활성화시키기 위하여 LPS를 처리하고 6시간 동안 배양하였다. 이후, 세포를 회수하여 RNA를 분리한 다음, HO-1 유전자에 대한 RT-PCR을 수행하였고, 시료 내의 다른 유전자에는 변화가 없음을 보여주기 위한 대조군으로서 베타-액틴 유전자에 대한 RT-PCR도 수행하였다. RT-PCR의 반응산물로 1% 아가로스겔 전기영동을 수행하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0054] 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 민들레 열수추출물을 농도별로 처리한 군은 농도 의존적으로 HO-1의 mRNA의 양이 증가함을 확인할 수 있었다.
- [0055] 실시예 3: 민들레 열수추출물에 의한 iNOS 억제 활성 측정
- [0056] 본 발명의 민들레 열수추출물이 iNOS의 발현을 저해하는 활성을 갖는지 여부를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.
- [0057] 구체적으로, RAW264.7 세포를 RPMI 배지를 이용하여 1×10^6 세포/ml의 농도로 현탁하여 배양접시에 간 다음, 5% CO₂ 배양기에서 37°C의 조건으로 배양하면서 민들레 열수추출물을 100, 500 및 1,000 µg/ml의 농도로 처리하고, 1시간 후에 세포를 활성화시키기 위하여 LPS 200 ng/ml을 처리한 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 LPS를 처리하지 않은 군 및 LPS만 처리한 군을 사용하였다. 이후, 세포를 회수하여 항-마우스 iNOS 항체 (Santa Cruz Biotechnology 사, 미국; 희석비율 1:1,000)를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였고, 시료 내의 다른 단백질에는 변화가 없음을 보여주기 위한 대조군으로서 항-마우스 베타-액틴 항체 (Cell Signaling Technology 사, 미국; 희석비율 1:1,000)를 사용하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0058] 도 4에 나타난 바와 같이, LPS만 처리한 군에서는 iNOS 단백질 합성이 LPS를 처리하지 않은 군에 비해 월등히 증가되었음을 확인할 수 있었고, 민들레 열수추출물을 투여한 군에서는 민들레 열수추출물의 양이 증가할수록 iNOS 단백질 합성이 더욱 억제되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0059] 또한, 이때 민들레 열수추출물의 처리 시 HO-1 단백질은 농도-의존적으로 증가하는 결과를 보였으므로, 민들레 열수추출물의 iNOS 생성 억제 효과는 HO-1의 증가와 관련이 있음을 알 수 있었다.
- [0060] 실시예 4: 민들레 열수추출물에 의한 NO 생성 억제 활성 및 세포생존율 측정
- [0061] 본 발명의 민들레 열수추출물이 NO의 생성을 억제하는지 확인하기 위하여, 비활성화시에는 NO 생성 수준이 매우 낮으나, LPS로 활성화시킬 때 NO 생성이 유도된다고 알려져 있는 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 사용하여 민들레 열수추출물의 효과를 측정하였다.

- [0062] 구체적으로, RAW264.7 세포를 RPMI 배지를 이용하여 1×10^6 세포/ml의 농도로 현탁하여 배양접시에 간 다음, 5% CO₂ 배양기에서 37°C의 조건으로 배양하면서 민들레 열수추출물을 100, 500 및 1,000 µg/ml의 농도로 처리하고, 1시간 후에 세포를 활성화시키기 위하여 LPS 200 ng/ml을 처리한 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 LPS를 처리하지 않은 군 및 LPS만 처리한 군을 사용하였다. 이후, 세포 배양액을 회수하여 NO의 양을 그리아스 (Griess) 반응을 이용하여 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었다. 또한, 세포는 회수하여 세포 생존을 측정에 이용하였으며, 세포생존율은 MTT 분석법에 따라 측정하여 그 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.
- [0063] 도 5에 나타난 바와 같이, LPS만 처리한 군에서는 NO가 과량 생성되었으며, 상기 LPS와 함께 본 발명의 민들레 열수추출물의 농도를 점차 증가하여 투여했을 경우에는 그 농도가 증가할수록 NO의 생성이 더욱 억제됨을 확인할 수 있었고, 도 6에 나타난 바와 같이, 이때의 세포생존율에는 전혀 변화가 없음을 확인하였다.
- [0064] 따라서, 본 발명의 민들레 열수추출물은 면역세포가 활성화되었을 때 세포생존율에는 변화를 일으키지 않으면서 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하고 있음을 알 수 있었다.
- [0065] 실시예 5: 민들레 열수추출물에 의한 과산화수소에 의한 세포 손상 회복
- [0066] 본 발명의 민들레 열수추출물이 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 회복시키는지 확인하기 위하여, 과산화수소를 사용하여 세포 손상을 유도했을 때 민들레 열수추출물의 효과를 측정하였다.
- [0067] 구체적으로, RAW264.7 세포를 RPMI 배지를 이용하여 1×10^6 세포/ml의 농도로 현탁하여 배양접시에 간 다음, 5% CO₂ 배양기에서 37°C의 조건으로 배양하면서 민들레 열수추출물을 100, 500 및 1,000 µg/ml의 농도로 처리하고, 1시간 후에 세포 손상을 유발시키기 위하여 과산화수소 200 µM 및 500 µM을 처리한 후 다시 18시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 민들레 열수추출물을 처리하지 않은 군 및 과산화수소를 처리하지 않은 군을 사용하였다. 이후, 세포를 회수하여 세포생존을 측정에 이용하였으며, 세포생존율은 MTT 분석법에 따라 측정하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0068] 도 7에 나타난 바와 같이, 과산화수소만 처리한 군에서는 세포 손상에 의한 세포 생존율 감소가 나타났으며, 본 발명의 민들레 열수추출물의 농도를 점차 증가하여 투여했을 경우에는 그 농도가 증가할수록 과산화수소에 의한 세포 생존율 감소가 더욱 회복됨을 확인하였다.
- [0069] 따라서, 본 발명의 민들레 열수추출물은 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 방지하는 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [0070] 제제예 1: 민들레 열수추출물을 유효성분으로 함유하는 약제의 제조
- [0071] <1-1> 정제의 제조
- [0072] 민들레 열수추출물 25 mg을 부형제 직타용 락토오스 26 mg과 아비셀 (미세결정 셀룰로오스) 3.5 mg, 붕해 보조제인 나트륨 전분 글리코네이드 1.5 mg 및 결합제인 직타용 L-HPC (low-hydroxypropylcellulose) 8 mg과 함께 U형 혼합기에 넣고 20분간 혼합하였다. 혼합이 완료된 후 활택제로서 마그네슘 스테아레이트 1 mg을 추가로 첨가하고 3분간 혼합하였다. 정량 시험과 항습도 시험을 거쳐 타정하고 필름 코팅하여 정제를 제조하였다.
- [0073] <1-2> 시럽제의 제조
- [0074] 민들레 열수추출물 2 g, 사카린 0.8 g 및 당 25.4 g을 온수 80 g에 용해시켰다. 상기 용액을 냉각시킨 후 글리세린 8.0 g, 향미료 0.04 g, 에탄올 4.0 g, 소르브산 0.4 g 및 적량의 증류수를 혼합한 다음, 물을 첨가하여 100 ml가 되도록 하였다.
- [0075] <1-3> 캡슐제의 제조

[0076] 민들레 열수추출물 50 mg, 유당 50 mg, 전분 46.5 mg, 탈크 1 mg 및 적량의 스테아린산 마그네슘을 혼합하고 이를 경질 젤라틴 캡슐에 충전함으로써 캡슐제를 제조하였다.

[0077] <1-4> 주사제의 제조

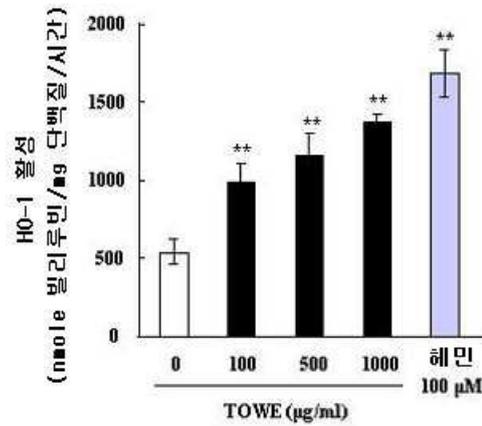
[0078] 민들레 열수추출물 1 g, 염화나트륨 0.6 g 및 아스코르브산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 최종 부피가 100 ml가 되도록 하였다. 상기 용액을 앰플에 충전하고 가열 멸균하였다.

도면의 간단한 설명

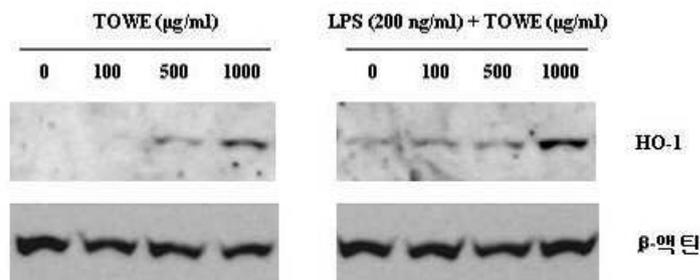
- [0079] 도 1은 민들레 열수추출물의 투여량에 따른 HO-1 효소 활성도의 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [0080] 도 2는 민들레 열수추출물 (TOWE)의 투여량에 따른 HO-1 단백질 생성 유도의 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [0081] 도 3은 민들레 열수추출물 (TOWE)의 투여량에 따른 HO-1의 mRNA 발현 유도를 나타낸 것이다.
- [0082] 도 4는 민들레 열수추출물 (TOWE)의 투여량에 따른 iNOS의 단백질 발현 억제를 나타낸 것이다.
- [0083] 도 5 및 6은 민들레 열수추출물 (TOWE)의 투여량에 따른 NO 생성 억제와 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [0084] 도 7은 민들레 열수추출물 (TOWE)의 투여량에 따른 과산화수소에 의한 세포 손상 회복을 나타낸 것이다.

도면

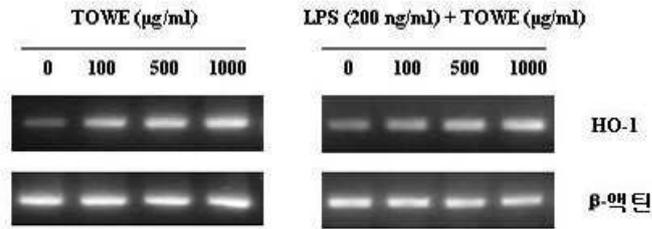
도면1



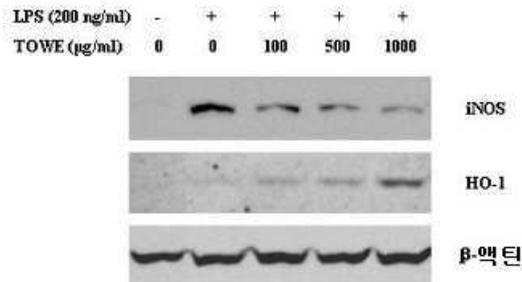
도면2



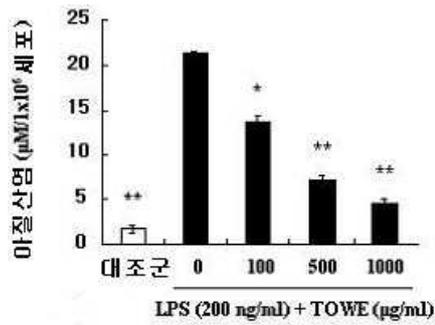
도면3



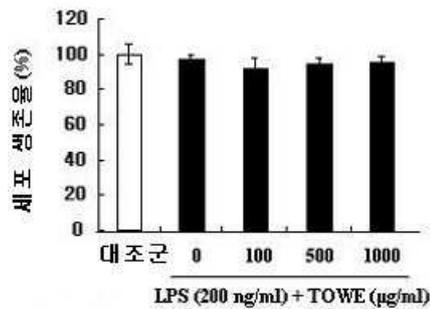
도면4



도면5



도면6



도면7

