(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0023165
(43) 공개일자 2022년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/48 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 1/04 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/48 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0104726
(22) 출원일자 2020년08월20일
심사청구일자 2020년08월20일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
호서대학교 산학협력단
충청남도 아산시 배방읍 호서로79번길 20 (호서대학교)
(72) 발명자
김성조
충청남도 아산시 배방읍 호서로79번길 20, 401호
이운규
경기도 이천시 마장면 덕평로882번길 22
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

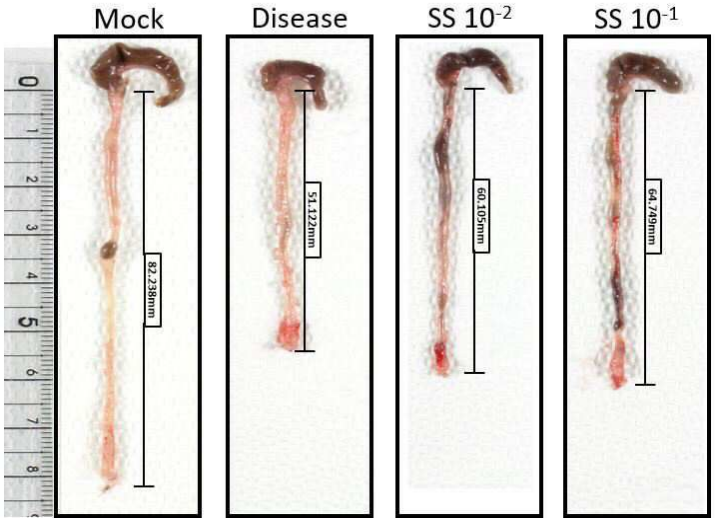
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **계혈등 추출물을 포함하는 항염증 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 계혈등 추출물을 포함하는 항염증 약학적 조성물에 관한 것으로써, 특히, 대장염, 위염 또는 위궤양과 같은 소화기관 염증질환에 대한 항염효과가 있는 약학적 조성물에 대한 것이고, 또한, 계혈등 추출물을 포함하는 IκBα 발현 촉진용 시약 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약학적 조성물, 치료 방법, 건강기능식품 조성물을 이용하면 염증성 질환, 특히 위염, 위궤양 또는 대장염을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 시약 조성물을 시용하면, *in vitro* 상에서 세포의 IκBα 발현을 현저히 증가시킬 수 있다. 상기 효과를 바탕으로, 본 발명은 의료업계, 건강기능식품업계 또는 의료용 시약 업계에서 다양한 목적으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61P 1/04 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
(72) 발명자
정예린
인천광역시 연수구 센트럴로 232

김형근
충청남도 아산시 배방읍 솔치로 261, 101동 1008호(삼정백조1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395063126
과제번호 PJ013230012020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명 In vivo 효력평가시스템을 통한 유용자원의 활용도 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 인하대학교산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395063597
과제번호 PJ013230052020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명 제주 흑돈 Primary cell bank를 활용한 ex-vivo 스크리닝 기술개발 및 돼지 생애주기별 최적 대사기전 조절 유용동물자원 발굴
기 여 율 1/2
과제수행기관명 호서대학교 산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

계혈등(*Spatholobus suberectus*) 추출물을 포함하는 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 계혈등 추출물은 건조된 계혈등을 고온, 고압 조건으로 열수 추출하는 단계를 포함하여 제조한 것인, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 고온, 고압 조건은 105 내지 115℃ 및 25 내지 65 kPa 압력 조건에서 추출하는 것인, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 계혈등은 계혈등의 줄기인, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 조성물은 위염 및 대장염 동시 예방 또는 치료용인, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 대장염은 DSS(dextran sulfate sodium)에 의해 발병한 것인, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 위염은 인도메타신(indomethacin)에 의해 발병한 것인, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물을 인간을 제외한 개체에 처리하는 단계를 포함하는, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 개체는 위염 및 대장염 동시 발현 개체인, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료 방법.

청구항 10

계혈등(*Spatholobus suberectus*) 추출물을 포함하는, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 계혈등 추출물은 건조된 계혈등을 고온, 고압 조건으로 열수 추출하는 단계를 포함하여 제조한 것인, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 12

계혈등(*Spatholobus suberectus*) 추출물을 포함하는 *IκBα* (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) 발현 촉진용 시약 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 계혈등 추출물은 건조된 계혈등을 고온, 고압 조건으로 열수 추출하는 단계를 포함하여 제조한 것인, IκBα 발현 촉진용 시약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 계혈등 추출물을 포함하는 항염증 약학적 조성물에 관한 것으로써, 특히, 대장염, 위염 또는 위궤양과 같은 소화기관 염증질환에 대한 항염효과가 있는 약학적 조성물에 대한 것이고, 또한, 계혈등 추출물을 포함하는 IκBα 발현 촉진용 시약 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 계혈등(*Spatholobus suberectus* Dunn; SS)은 중국의 일반적인 용어로는 '지쑤에텡'이라 하고, 콩과(Leguminosae family)에 속하는 식물이다. 계혈등의 줄기부분은 혈류 개선, 불규칙적인 월경 개선, 월경통, 혈액양 감소의 치료에 사용되어 왔다. 또한, 임상적 연구를 통해 계혈등은 헵시딘(hepcidin)을 암호화하는 유전자(HAMP)에 대한 강력한 발현 저해효과를 나타내고, 젖산탈수소효소 A(lactate dehydrogenase A; LDH-A)의 저해제이며, 사람 유방암세포주인 MDA-MB-231에 항암효과를 나타냄이 보고된 바 있다. 더욱이, matrix metalloproteinase(MMP-1, -3, -9)와 사람 연골육종 세포인 SW1353에서 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) 억제제의 발현수준을 저해하는 것을 발견하였다. 상기와 같은 연구결과들을 통해, 계혈등은 파골세포형성(osteoclastogenesis)을 억제하고 연골형성을 자극하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 한편, 염증은 물리적인 외상, 유해한 화학물질, 박테리아, 곰팡이, 바이러스에 의한 감염이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 의하여 야기되는 병리적 상태에 대응하여 나타나는 국소적인 생체의 방어 반응이다. 염증반응에는 다양한 생화학적 현상이 관여하지만, 특히 대식세포(Macrophage)가 화학적 자극 등에 의하여 산화질소

(NO)와 여러 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6)을 생성함으로써 염증반응에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 현재 항염증제로서 널리 사용되고 있는 비스테로이드성 소염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDS)는 위장관 장애, 간장애, 신장애 등의 심각한 부작용을 야기한다고 알려져 있다(Rainsford KD., Subcell biochem., 42:3-27, 2007; Guruprasad P. Aithal.,Rheumatology., 7:139-150, 2011; Praveen P. N. Rao et al.,Pharmaceuticals., 3:1530-1549, 2010). 따라서, 생체 내 부작용이 적은 천연물질에 의한 항염증 조성물에 대한 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 약용 작물들을 이용하여, 항염 효과가 있는 천연물질을 탐색하였다. 그 결과, 계혈등 추출물이 위염, 위궤양 또는 대장염에 효과가 있으며, 특히 특정 압력 및 온도 조건에서 추출한 계혈등 추출물이 항염증 작용을 하는 유전자의 발현을 현저히 증가시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 위염, 위궤양 또는 대장염에 효과가 있는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 계혈등(*Spatholobus suberectus*) 추출물을 포함하는 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 처리하는 단계를 포함하는, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 계혈등(*Spatholobus suberectus*) 추출물을 포함하는, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 계혈등(*Spatholobus suberectus*) 추출물을 포함하는 IκBα (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) 발현 촉진용 시약 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 약학적 조성물, 치료 방법, 건강기능식품 조성물을 이용하면 염증성 질환, 특히 위염, 위궤양 또는 대장염을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 시약 조성물을 시용하면, *in vitro* 상에서 세포의 IκBα 발현을 현저히 증가시킬 수 있다. 상기 효과를 바탕으로, 본 발명은 의료업계, 건강기능식품업계 또는 의료용 시약 업계에서 다양한 목적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 계혈등 추출물을 대장암 세포에 처리하였을 때, 대장암 세포의 생존률 억제를 나타낸 도이다.

도 2는 계혈등 추출물이 활성화된 대식세포의 생존률에 미치는 효과를 나타낸 도이다.

도 3은 추출조건을 달리한 계혈등 추출물의 염증 관련 유전자에 미치는 효과를 나타낸 도이다.

도 4는 계혈등 추출물의 항 대장염 효과를 확인하기 위한, DSS 유도 대장염 마우스 모델을 처리과정을 도식화하여 나타낸 도이다.

도 5는 계혈등 추출물 처리에 따른 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 대장 길이 변화를 확인한 도이다.

도 6은 계혈등 추출물 처리에 따른 DSS 유도 대장염 마우스 체중 변화를 확인한 도이다.

도 7은 계혈등 추출물 처리에 따른 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 질병 활성 지수 스코어 변화를 확인한 도이

다.

도 8은 계혈등 추출물 처리에 따른 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 조직학적 상태를 확인한 도이다.

도 9는 계혈등 추출물 처리에 따른 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 조직학적 상태를 수치화하여 나타낸 도이다.

도 10은 계혈등 추출물 처리에 따른 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 조직 내 염증인자를 염색하여 확인한 도이다.

도 11은 계혈등 추출물 처리에 따른 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 조직 내 염증인자인 COX2, iNOS의 발현량을 수치화하여 나타낸 도이다.

도 12는 계혈등 추출물의 항 위염 효과를 확인하기 위한, 인도메타신 유도 위염 랫트 모델을 처리과정을 도식화하여 나타낸 도이다.

도 13은 계혈등 추출물을 처리한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델의 위의 육안적 모습을 나타낸 도이다.

도 14는 계혈등 추출물을 처리한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델의 위의 조직학적 상태를 나타낸 도이다.

도 15는 계혈등 추출물을 처리한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델의 위의 조직학적 상태를 수치화하여 나타낸 도이다.

도 16은 계혈등 추출물을 처리한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델의 조직 내 염증인자를 염색하여 확인한 도이다.

도 17은 계혈등 추출물을 처리한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델의 조직 내 염증인자인 iNOS, TNF-α의 발현량을 수치화하여 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 계혈등(*Spatholobus suberectus*) 추출물을 포함하는 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 계혈등 추출물은 건조된 계혈등을 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것 일 수 있으며, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등의 C1-C4 알코올(alcohol), 증류수(distilled water, deionized water) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 건조된 계혈등을 고온, 고압의 조건에서 열수 추출한 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게 상기 고온, 고압의 조건은 105 내지 115℃ 및 25 내지 65kPa 압력 조건일 수 있다.

[0019] 보다 구체적으로, 105℃ 미만의 온도에서 추출한 계혈등 추출물은 항염증 효과가 미약하게 나타날 수 있으며, 115℃ 초과의 온도에서 추출한 계혈등 추출물은 항염효과를 나타내는 유효성분의 변성으로, 항염증 효과가 약하게 나타날 수 있어, 상기 105 내지 115℃ 및 25 내지 65kPa 압력 조건에서 추출한 계혈등 추출물은 현저한 항염증 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0020] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 계혈등 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 계혈등 추출물은 계혈등의 전초, 뿌리, 줄기 및 잎으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상을 추출한 것일 수 있으며, 바람직하게는, 계혈등의 줄기를 추출한 것일 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 염증성 질환에 대하여 예방 또는 치료할 수 있는 것 일 수 있으며, 바람직하게는 위염, 위궤양 또는 대장염을 예방 또는 치료할 수 있는 것일 수 있고, 위염 및 대장염을 함께 예방 또는 치료할 수 있는 것 일 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 대장염은 세균성 감염, 바이러스성 감염, 자가면역성 질환 또는 독성물질 등에 의해 발생하는 것일 수 있으며, DSS(dextran sulfate sodium)에 의해 발생하는 것 일 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 위염 또는 위궤양은 세균성 감염, 바이러스성 감염, 자가면역성 질환 또는 독성물질 등

에 의해 발생하는 것일 수 있으며, 인도메타신(indomethacin)에 의해 발생하는 것 일 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 개체에 처리되었을 때, 염증 유발 유전자 및 염증 관련 인자의 발현을 낮추고, 항염증 유전자의 발현을 증진시키는 것일 수 있으며, 바람직하게 상기 염증 유발 인자는 *ASC(Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)* 또는 *NLRP3(NLR family pyrin domain containing 3)*일 수 있고, 상기 염증 관련 인자는 *NF-κB(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)*일 수 있으며, 상기 항염증 유전자는 *IκBα (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)*일 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물이 포함하는 계혈등 추출물이 105 내지 115℃ 및 25 내지 65kPa 압력 조건에서 추출된 경우, 상기 항염증 유전자의 발현이 다른 조건으로 추출된 계혈등 추출물에 비해 현저히 증가하는 것 일 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물은, 계혈등 추출물 이외에 공지의 항염증 활성을 갖는 화합물 또는 식물 추출물을 더욱 포함할 수 있으며, 조성물 100 중량부에 대하여 각각 5 중량부 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0028] 상기 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0029] 상기 약학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 처리하는 단계를 포함하는, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 개체는 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 질병을 가진 개체일 수 있으며, 위염 및 대장염이 동시에 발현한 개체 일 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 계혈등(*Spatholobus suberectus*) 추출물을 포함하는, 위염, 위궤양 및 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 질병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명의 건강기능식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 캔디, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임 식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 건강기능식품이란 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 의미하며, 바람직하게는 본 발명의 건강기능식품은 염증성 질환의 예방 또는 개선에 관한 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현할 수 있는 식품을 의미하는 것일 수 있다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 계혈등(*Spatholobus suberectus*) 추출물을 포함하는 IκBα (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) 발현 촉진용 시약 조성물을 제공한다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 계혈등 추출물은 건조된 계혈등을 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것 일 수 있으며, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등의 C1-C4 알코올(alcohol), 증류수(distilled water, deionized water) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 건조된 계혈등을 고온, 고압의 조건에서 열수 추출한 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게 상기 고온, 고압의 조건은 105 내지 115℃ 및 25 내지 65 kPa 압력 조건일 수 있다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 시약 조성물은 *in vitro*상에서 세포에 처리되었을 때, 염증 유발 유전자 및 염증 관련 인자의 발현을 낮추고, 항염증 유전자의 발현을 증진시키는 것일 수 있으며, 바람직하게 상기 염증 유발 인자는 *ASC(Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)* 또는 *NLRP3(NLR family pyrin domain containing 3)*일 수 있고, 상기 염증 관련 인자는 *NF-κB(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)*일 수 있으며, 상기 항염증 유전자는 *IκBα (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)*일 수 있다.

[0042] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0044] **통계 분석**

[0045] 세 번의 실험으로부터 얻은 데이터를 mean ± standard deviation(SD)로 나타냈으며, 데이터 분석은 GraphPad PRISM 8(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)과 Microsoft Excel(Office 365, Microsoft, Redmond, WA, USA)을 사용하였다. Two-tailed Student's t-test로 p-value를 계산하였고, p-value가 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의하다고 간주하였으며, p-value가 0.05 미만 일 경우 *, 0.01 미만일 경우 **, 0.001 미만일 경우 ***로 도면상에 표시하였다.

[0047] **실시예 1. 계혈등 추출물 제조**

[0048] 건조된 계혈등(Spatholobus suberectus)의 줄기 30 g(Daemyung pharm, Seoul, Korea)에 증류수 300 mL을 가한 뒤, Wiseclave WAC-60(Daihan Scientific, Wonju-si, Gangwon-do, Korea)를 사용하여 온도를 110℃로 하고, 39.23kPa로 하여, 15분간 고온, 고압 추출하였다. 추출물의 상등액을 3~5 μm 여과지 (Quantitative Ashless, Hyundai Micro, Seoul, Korea)로 거른 뒤, 0.2 μm 주사기 필터(Minisart, Sartorius, Goettingen, Germany)로 걸러 계혈등 추출물을 제조하였다.

[0050] **실시예 2. 계혈등 추출물의 항염증 효과 확인**

[0051] **2.1 계혈등 추출물의 대장암 세포에 대한 세포 생존률 억제 효과**

[0052] 대장암 세포주인 CT26 세포(American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA, USA)를 96-웰 세포 배양 플레이트(SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea)에 준비하고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 12시

간 배양하였다. 실시예 1에서 제조한 계혈등 추출물을 배지의 양 대비 1/10000(10^{-4}), 1/1000000(10^{-6}) 및 1/100000000(10^{-8}) 농도로 처리한 실험군과 증류수를 처리한 대조군을 준비하고, 24시간 배양한 후, 10 μL의 Ez-cytox (WST-1 assay kit, DoGenBio, Seoul, Korea)를 각 웰 마다 넣고 다시 2시간을 배양하였다. 마이크로 플레이트 리더(Sunrise™, Tecan, Mannedorf, Switzerland)로 흡광도(450 nm)를 측정하여 대조군에 상대적인 세포 생존률을 계산하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0053] 도 1에 나타낸 바와 같이, 10^{-4} 및 10^{-6} 농도의 계혈등 추출물 처리군에서 대장암 세포의 생존률이 억제된 것을 확인하였다. 장에서 발생하는 염증의 진행은 장내 암 발생을 유도할 수 있는 높은 잠재력을 지니고 있으며, 항염증 효과는 암세포의 발생과 성장을 억제하는 역할을 수행할 수 있다. 따라서, 계혈등 추출물의 대장암 세포 생존률 억제 효능은 계혈등 추출물이 지닌 항염증 작용에 의해 발생함을 확인하였다.

[0055] **2.2 계혈등 추출물의 대식세포에 대한 세포 생존률 증진 효과**

[0056] 돼지 대식세포주인 3D4/31 세포(ATCC, Manassas, VA, USA)를 96-웰 세포 배양 플레이트에 준비하고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 12시간 배양하였다. 실시예 1에서 제조한 계혈등 추출물을 10^{-4}, 10^{-6} 및 10^{-8} 농도 처리한 실험군과 증류수를 처리한 대조군을 각각 2세트 준비하고, 2세트 중 하나의 세트에는 2nM Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 염증을 유도하였다. 24시간 배양한 후, 10 μL의 Ez-cytox를 각 웰 마다 넣고 다시 2시간을 배양하였다. 마이크로 플레이트 리더로 흡광도(450 nm)를 측정하여 대조군 대비 상대적인 세포 생존률을 측정하였으며, 이를 도 2에 나타내었다.

[0057] 도 2에 나타낸 바와 같이, 10^{-6} 농도 이상의 계혈등 추출물이 PMA에 의해 염증이 유도되어 활성화된 대식세포의 생존률을 향상시키는 것을 확인하였다. 대식세포는 바이러스, 박테리아, 다른 세포의 신호 등에 의해서 활성화되는데, 염증 작용에 의해 활성화된 대식세포는 세포사멸이 유도된다. 본 실시예에서 확인한 결과에 의해, 계혈등 추출물의 항염증 효능에 의해 활성화된 대식세포의 생존률이 향상된 것을 확인하였다.

[0059] **실시예 3. 추출 조건에 따른 항염증 활성 분석**

[0060] **3.1 추출조건을 달리한 계혈등 추출물의 제조**

[0061] 건조된 계혈등(Spatholobus suberectus)의 줄기 30 g에 증류수 300 mL을 가하여 준비한 후 온도(압력) 조건을 80℃(0.35 kPa), 110℃ (39.23 kPa) 및 121℃ (117.68 kPa)로 달리하고 15분 동안 Wiseclave WAC-60를 사용하여 추출하였다. 추출물의 상등액을 3~5 μm 여과지로 거른 뒤, 0.2 μm 주사기 필터로 걸러, 추출조건을 달리한 계혈등 추출물을 제조하였다.

[0063] **3.2 추출조건에 따른 계혈등 추출물의 항염효과 확인**

[0064] CT26 세포(ATCC, Manassas, VA, USA)를 60mm 세포 배양 접시에 준비하고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 12시간 배양하였다. 각 온도별로 추출한 계혈등 추출물을 10^{-6} 농도로 처리하고 대조군으로 증류수를 사용하여 24시간 배양하였다. 그 후, Trizol reagent(15596018; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 RNA를 분리하였고, WizScript cDNA synthesis kit (W2002, Wizbiosolutions, Seongnam, Korea)를 사용해 10ng의 RNA를 cDNA로 제조사의 매뉴얼에 따라 합성하였다. 그리고 2×Real-Time PCR Master Mix including SYBR green(Biofact, Yuseong-gu, Daejeon, Korea)와 StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 qRT-PCR 분석을 수행하였다. 염증 유발 유전자인 *ASC*, *NLRP3*, 염증 관련 인자인 *NF-κB*, 및 항염증성 인자인 $I\kappa B\alpha$의 발현 수준을 확인하기 위해, ACTB mRNA 대비 상대적인 mRNA 발현 수준을 $2^{-\Delta\Delta Ct}$방법으로 측정하였으며, 측정 결과를 도 3에 나타내었고, 사용한 프라이머의 서열을 표 1에 나타내었다.

[0065] [표 1]

Target genes	Sequences (5' to 3')
ASC (PYD And CARD Domain Containing)	F: GGATGCTTTGCATGGCAGTG R: ATCTTGTCTTGGCTGGTGGT
NLRP3 (NLR Family Pyrin Domain Containing 3)	F: TACGAAGCAATGCCCTTGGAG R: TAGTTTACAGTCCGGGTGCAG
IκBα (inhibitor of nuclear factor kappa B)	F: AGTGTAGCAGTCTTGACGCA R: GGCCAGGTAGCCGTGAGTA
NF-κB2 (nuclear factor kappa B)	F: CTTTAGATGACAGGCTGGGGC R: TCGCTGATGTGTAGCAAAGTG
ACTB (β-actin)	F: AAGTGTGACGTTGACATCCGTAAA R: GCTAGGAGCCAGAGCAGTAATC

[0066]

[0067] 도 3에 나타낸 바와 같이, NF-κB의 활성을 저해해 염증 반응을 저해하는 항염증성 인자인 IκBα는 타온도(압력)군 추출물 대비 110℃(39.23 kPa) 추출물에서 발현량이 현저히 증가된 것을 확인하였으며, 80℃ (0.35 kPa), 110℃ (39.23 kPa), 121℃ (117.68 kPa)에서 추출한 각각의 계혈등 추출물은 염증 유발 유전자인 ASC, NLRP3 및 NF-κB2의 발현을 저해하는 것을 확인하였다.

[0068] 이러한 결과를 통해서 계혈등 추출물이 유전자 발현 수준에서 항염효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 특히 110℃ (39.23 kPa)에서 추출한 계혈등 추출물이 현저히 우수한 항염활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0070] **실시예 4. DSS 유도 대장염 마우스 모델을 이용한 계혈등 추출물의 항 대장염 효과**

[0071] **4.1 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 제조**

[0072] 실험에 사용한 마우스는 Orient bio사에서 5주령의 C57BL/6 수컷 마우스를 구입하여, 인하대학교 의과대학 생명과학연구소 SPF 동물실에서 일주일간의 순화기간을 거쳤다. 마우스는 개별 케이지 당 5마리씩 넣어 스트레스를 최소화하였으며, 동물들은 12시간 밤낮으로 온도 23℃±2℃, 습도 55%±10% 의 일정한 사육환경을 유지하였다. 마우스는 일반규격의 사료와 멸균된 음수를 자유 섭취토록 하였다. 동물실험은 동물실험 윤리위원회에 승인 아래 규정에 따라 실험하였다. 실험은 각 그룹 당 10마리의 마우스를 사용하여 총 40마리의 마우스를 사용하였다.

[0073] 마우스에서 대장염을 유발하기 위하여 DSS(dextran sulfate sodium; MPBio사, No. 16110)을 사용하였다. 마우스는 정상 대조군(Mock control), DSS 처리한 질병유발군(Disease control), 실시예 1에서 제조한 계혈등 추출물을 100배, 10배 희석한 물질을 DSS처리와 동일하게 7일간 투여한 실험군인 SS 10^{-2}, SS 10^{-1} 군으로 나누어 실험을 실시하였다. 물질은 투여 전에 마우스의 체중을 측정하여 체중에 맞는 투여 용량을 결정하고 매일 오전 9시에 강제 경구 투여하였다. 음수에 2% DSS첨가하여 자유 섭취하도록 하였으며 계혈등 추출물은 군간 농도에 맞게 투여하였고 대조군과 질병유발군에는 계혈등 추출물의 용매인 증류수를 투여하였다. 물질 투여가 종료된 후에는 오후 절식을 수행하였으며, DSS 첨가된 음수는 멸균처리 된 음수로 교체해 주었다. 절식은 오후 5시부터 다음날 오전 9시까지, 총 16시간 동안 수행하였다. 실험군과 대조군의 처치 및 투여량을 표 2에 나타내었으며, 처치과정을 도식화하여 도 4에 나타내었다.

[0074] [표 2]

Group	Treatments and dosing
Mock	DW + DW(1ml/kg)
Disease	DSS 2% + DW(1ml/kg)
SS 10^{-2}	DSS 2% + SS(0.35mg/kg)
SS 10^{-1}	DSS 2% + SS(3.5mg/kg)

[0075]

[0076] **4.2 계혈등 추출물 투여에 의한 DSS 유도 대장염 마우스 모델 외관 변화**

[0077] 계혈등 추출물 투여에 의해 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 대장 중 결장의 길이와 체중이 변화하는지 확인하는 실험을 수행하였다. 구체적으로, 실시예 4.1에서 제조한 DSS 유도 대장염 마우스 모델을 실험 종료 시점에서 부검하였다. 포란(forane-isoflurane USP 100ml, 중외제약)을 이용하여 마우스를 흡입 마취시킨 후 알코올을 복부 주위로 분사하여 개복하였다. 맹장부터 항문까지 대장을 적출하고 깨끗한 종이에 올려 길이를 측정할 수 있는 자를 두고 사진을 찍어 결장(colon) 길이를 측정하였다. 결장 길이 측정 결과를 도 5에 나타내었으며, 계혈등 추출물 투여 전과 대비하여 체중 변화를 측정하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0078] 도 5에 나타낸 바와 같이, 100배 또는 10배 희석시킨 계혈등 추출물 투여군 (SS 10^{-2}, SS 10^{-1}) 모두에서 결장의 길이가 질병유발군보다 통계적으로 유의하게($P<0.001$) 결장의 길이가 긴 것을 확인하여, 계혈등 추출물에 의해 결장 길이가 회복된 것을 확인하였다.

[0079] 도 6에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군(Mock)에 비해 질병유발군은 급격한 체중감소가 나타났으며, 계혈등 추출물 투여군의 경우 투여농도 의존적으로 체중 감소량이 줄어드는 것을 확인하였다.

[0080] 이러한 결과를 통해, 계혈등 추출물이 대장염에 의해 유발되는 대장 길이 감소와 체중 감소 효과를 경감시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0082] **4.3 계혈등 추출물 투여에 의한 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 임상증상 변화**

[0083] 계혈등 추출물 투여에 의해 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 임상증상이 변화하는지 확인하는 실험을 수행하였다. 구체적으로, 실시예 4.1에서 제조한 DSS 유도 대장염 마우스 모델에서 DSS 및 계혈등 추출물을 처치하는 7일 동안 체중, 설사, 출혈을 분석하여 질병 활성 지수 스코어(disease activity index score)를 산출하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0084] 도 7에 나타낸 바와 같이, 질병 활성 지수 스코어는 질병유발군에서 가장 높았으며, 질병 활성 지수 스코어는 계혈등 추출물의 투여농도에 의존적으로 줄어드는 것을 확인하였다.

[0086] **4.4 계혈등 추출물 투여에 의한 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 조직학적 변화**

[0087] 계혈등 추출물 투여에 의한 DSS 유도 대장염 마우스 모델 대장의 조직학적 변화를 확인하는 실험을 수행하였다. 구체적으로, 실시예 4.2에서 적출한 실험군과 대조군 대장의 맹장을 제거하고 장관을 따라 길게 반을 가르고 면봉을 이용하여 남아있는 변을 제거하였다. 펼쳐진 대장을 이쑤시개를 이용하여 대장의 바깥부분이 이쑤시개 안으로 감기게 하여 끝까지 감아주었고(swiss roll) 바로 10% NBF용액에 저장, 고정하였다. 고정된 샘플을 파라핀에 삽입하여 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 3㎛ 두께의 절편 후 유리 슬라이드(Superfrost plus slide)에 올려 H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색을 하였다. 염색된 슬라이드를 광학 현미경(Axioplan2 imaging, SPOT Software; Version 4.6, Flex 64 Mp mosaic camera)으로 관찰하여 대장의 조직학적 구조를 비교하였다. H&E 염색한 대장 조직의 현미경 사진을 도 8에 나타내었고, 이를 토대로 궤양(Ulceration), 염증(inflammation) 및 크립트 파괴(crypt destruction) 정도에 기반한 조직학적 스코어(histological score)를 산출하여 비교한 결과를 도 9에 나타내었다.

[0088] 도 8에 나타낸 바와 같이, 질병유발군에서는 점막 상피의 상당한 파열과 침윤현상이 관찰되었으나, 계혈등 추출물 투여군(SS 10^{-2}, SS 10^{-1})에서는 점막상피세포의 파괴와 세포층의 무너짐이 경감된 것을 관찰하였다.

[0089] 도 9에 나타낸 바와 같이, H&E 염색에 대해 조직학적 스코어 분석결과 질병유발군에서 가장 높은 수치로 평가되었고, 계혈등 추출물 투여군(SS 10^{-2}, SS 10^{-1})에서 통계적으로 유의미하게 그 수치가 감소($P<0.01$)한 것을 확인하였다.

[0090] 이러한 결과를 통해, 계혈등 추출물이 대장의 염증에 의한 손상으로부터 보호하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0092] **4.5 계혈등 추출물 투여에 의한 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 조직 내 염증인자 발현 변화**

[0093] 계혈등 추출물 투여에 의한 DSS 유도 대장염 마우스 모델 대장 내 대표적인 염증인자인 COX2(Cyclooxygenase-2)와 i-NOS(inducible Nitric oxide synthase)의 발현 변화를 확인하는 면역화학염색 실험을 수행하였다. 구체적으로, 실시예 4.4에서 제작한 실험군과 대조군의 대장 조직 파라핀 블록을 3㎛ 두께로 절편 후 유리 슬라이드에 올린 조직을 통해 수행하였다. 건조된 슬라이드를 자일렌 4단계(70% - 80%- 95% - absolute alcohol에 수화, 각 10분씩) 과정을 통해 파라핀을 제거하고, 증류수로 세척하였다. 조직의 항원 회수과정으로 0.01M 시트르산염 완충액 (pH 6.0)을 사용하여 15분 동안 끓이는 과정을 거쳤다. 내인성 퍼옥시다제 활성을 억제하기 위해 절편을 3 % 과산화수소에 10 분 반응시킨 후 tris-hcl 버퍼 솔루션(ph 7.6) / tween 0.05% 로 린스하였다. Cox2 토끼 다클론 항체(rabbit polyclonal antibody, ab15191, Abcam)와 i-NOS 토끼 다클론 항체 (rabbit polyclonal antibody, PA5-16855, Thermo scientific)를 각각 1:200과 1:100으로 4 ℃ 가습 챔버에서 밤새 반응시켰다. Envision System-HRP 표지된 항-토끼 폴리머(Dako K4002)를 2차 항체로 실온에서 30분 반응시켰다. 3,3-디아미노벤지딘 퍼옥시다제 기질 (3,3-diaminobenzidine peroxidase substrate)로 발색 후 헤마톡실린으로 배경염색을 하였다. 최종 절편을 탈수, 자일렌 단계 후 퍼마운트(permount)로 슬라이드를 봉입하였다. 염증 손상 정도를 보기 위해 광학 현미경(Axioplan2 imaging, SPOT Software; Version 4.6, Flex 64 Mp mosaic camera)으로 관찰하였으며, 현미경 사진을 도 10에 나타내었고, 면역염색 발현량을 수치화하여 도 11에 나타내었다.

[0094] 도 10에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군에서는 낮은 수준의 COX2 및 i-NOS의 발현이 관찰되었으며, 질병유발군에서는 COX2 및 i-NOS의 발현양이 매우 높아지는 것을 확인하였다. 계혈등 추출물 투여군(SS 10^{-2}, SS 10^{-1})에서는 이러한 발현 상승이 농도 의존적으로 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

[0095] 도 11에 나타낸 바와 같이, COX2의 경우, 계혈등 추출물 100배 희석 투여군(SS 10^{-2})에서 유의한 정도로 발현양이 감소하는 것을 확인하였고($P<0.01$), 계혈등 추출물 10배 희석 투여군(SS 10^{-1})에서는 더 높은 수준으로 발현양이 감소하는 것을 확인하였다($P<0.001$). 또한 계혈등 추출물 100배 희석 투여군과 10배 희석 투여군 간에도 유의한 발현량 차이가 있음을 확인하였다($P<0.01$). 또한, iNOS의 경우, 계혈등 추출물 100배 및 10배 희석 투여군 모두에서 질병유발군에 비해 발현양이 감소한 것을 확인하였다($P<0.001$).

[0096] 이러한 결과를 통해, 계혈등 추출물이 대장염 발생 조직 내 염증 관련 인자의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다.

[0098] **실시예 5. 인도메타신(Indomethacin) 유도 위염 랫트 모델을 이용한 계혈등 추출물의 항 위염 효과**

[0099] **5.1 인도메타신 유도 위염 랫트 모델의 제조**

[0100] 인도메타신에 의해 유도된 위염 랫트 모델을 제작하여 이용하였다. 실험에 사용한 랫트는 Orient bio사에서 6주령의 Sprague-Dawley 수컷 랫트를 구입하여 인하대학교 의과대학 생명과학연구소 SPF 동물실에서 일주일간의 순화기간을 거쳤다. 랫트는 개별 케이지당 2마리씩 넣어 스트레스를 최소화하였으며 동물들은 12시간 밤낮으로 온도 23℃±2℃, 습도 55%±10%의 일정한 사육환경을 유지하였다. 랫트는 일반규격의 사료와 멸균된 음수를 자유섭취토록 하였다. 이러한 동물실험은 동물실험 윤리위원회에 승인 아래 규정에 따라 실험하였다. 실험은 각 그룹 당 10마리의 랫트를 사용하여 총 50마리의 랫트를 실험에 사용하였다.

[0101] 랫트의 위염을 유발하기 위하여 인도메타신 (Sigma-Aldrich, No.I7873)을 사용하였다. 1주일 순화기간 후에 랫트를 16시간 절식을 하여 공복 상태를 만들었다. 각각의 화학물질은 신선함을 유지하기 위해 당일 오전 제조 후 사용하였으며 인도메타신은 5% 중탄산나트륨 솔루션(Sodium Bicabonate solution)에 넣어 완전히 용해될 때까지 초음파 처리하였다. 란소프라졸(Lansoprazole) 투여액은 0.5% CMC (Carboxymethyl cellulose sodium salt) solution에 밤새 교반하여 제조하였다. 계혈등 추출물은 100배와 10배로 희석하였다. 투여물질 투여 전에 랫트의 체중에 맞는 투여용량을 결정하였다. 실험은 정상 대조군(Mock)과 질병유발군(disease)에는 증류수를 투여하여, 실험군(SS 10^{-2}, SS 10^{-1})과 동일한 처치상태를 유지하였으며 양성 대조군(positive)에는 위염증 치료제로 알려진 란소프라졸을 사용하였다. 랫트는 용액 투여 30분 경과 후에 인도메타신을 투여하였다. 투여는 존데(zonde)를 이용한 경구투여 방식으로 투여하였으며, 시간은 랫트 한 마리 당 일정한 간격을 두어 정확한 시간에 투여할 수 있게 투여 및 부검시간표를 이용하였다. 실험군과 대조군의 처치 및 투여량을 표 3에 나타내었으며, 처치과정을 도식화하여 도 12에 나타내었다.

[0102] [표 3]

[0103]

Group	Treatments and dosing
Mock	DW(1ml/kg) + DW(1ml/kg)
Disease	DW(1ml/kg) + Indomethacin(80mg/kg)
Positive	Lansoprazole(30mg/kg) + Indomethacin(80mg/kg)
SS 10^{-2}	SS(0.35mg/kg) + Indomethacin(80mg/kg)
SS 10^{-1}	SS(3.5mg/kg) + Indomethacin(80mg/kg)

[0105] **5.2 계혈등 추출물 투여에 의한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델 위 염증부위 변화**

[0106] 계혈등 추출물이 위염에 미치는 육안적 효과를 확인하기 위하여, 실시예 5.1에서 제작한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델에 위 적출을 위한 부검을 실시하였다. 초기 인도메타신 투여 후 6시간 후에 부검을 실시하였다. 부검은 포란(forane-isoflurane 100ml; 중외제약)을 이용하여 랫트를 호흡마취시킨 후 알코올을 복부 및 흉부 부위로 분사하여 개복하고, 위 조직을 적출하였다. 적출한 위조직을 5% NBF에서 10분간 고정하고, 위 대만곡을 따라 절개 후 식염수에 부드럽게 씻어내었다. 절개한 위는 넓게 펼쳐 핀으로 고정하여 병변 영역을 확인할 수 있도록 사진 촬영하였으며, 이를 도 13에 나타내었다.

[0107] 도 13에 나타낸 바와 같이, 100배 또는 10배 희석시킨 계혈등 추출물을 투여한 실험군(SS 10^{-2}, SS 10^{-1}) 모두에서 질병유발군 대비 위염에 의한 손상부위가 감소된 것이 관찰되어($P<0.01$), 계혈등 추출물의 위염 손상부위 감소 효과를 확인하였다.

[0109] **5.3 계혈등 추출물 투여에 의한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델의 조직학적 변화**

[0110] 계혈등 추출물 투여에 의한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델 위 조직의 조직학적 변화를 확인하는 실험을 수행하였다. 구체적으로, 실시예 5.2 에서 적출한 위 조직을 10 % NBF로 고정하고, 파라핀에 삽입하여 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 3㎛ 두께로 절편하고, 유리 슬라이드에 올려 H&E(Hematoxylin & Eosin) 염색을 하였다. 염색된 슬라이드를 광학 현미경(Axioplan2 imaging, SPOT Software; Version 4.6, Flex 64 Mp mosaic camera)으로 관찰하고, 염증 손상도를 평가하였다. 현미경 관찰 결과를 도 14에 나타내었고, 염증 손상도 평가 결과를 도 15에 나타내었다.

[0111] 도 14에 나타낸 바와 같이, 인도메타신에 의한 위염 랫트 모델의 조직학적 변화를 평가한 결과, 정상 대조군 및 양성 대조군에서 위점막의 표면 상피는 정상적인 구조를 유지하고 있었다. 반면, 질병유발군에서는 위상피 파괴 및 침윤현상을 확인하였다. 계혈등 추출물 투여군(SS 10^{-2}, SS 10^{-1})에서는 점막상피세포의 파괴 및 세포층의 무너짐이 경감된 것을 확인하였다.

[0112] 도 15에 나타낸 바와 같이, H&E 염색한 조직 샘플에 대해 조직학적 스코어(histological score) 분석한 결과, 질병유발군의 스코어가 가장 높은 것으로 측정되었고, 질병유발군 대비 계혈등 추출물 투여군(SS 10^{-2}, SS 10^{-1})에서 조직학적 스코어가 감소한 것을 확인하였다($P<0.05$).

[0113] 이러한 결과를 통해, 계혈등 추출물이 위염 또는 위궤양에 의한 손상으로부터 보호하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0115] **5.4 계혈등 추출물 투여에 의한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델의 조직 내 염증인자 발현 변화**

[0116] 계혈등 추출물 투여에 의한 인도메타신 유도 위염 랫트 모델 위 내 대표적인 염증인자인 i-NOS와 TNF-α의 발현 변화를 확인하는 면역화학염색 실험을 수행하였다. 구체적으로, 실시예 5.2 에서 적출한 위 조직을 10 % NBF로 고정하고, 파라핀을 침투시켜 파라핀 블록을 제작하였으며 제작한 블록을 3㎛ 두께로 자르고 Superfrost plus

슬라이드에 올려 60 ℃에서 건조시켰다. 건조된 슬라이드를 자일렌 4단계(70% - 80%- 95% - absolute alcohol에 수화, 각 10분씩) 과정을 통해 파라핀을 제거하고, 증류수로 세척하였다. 조직의 항원 회수과정으로 0.01M 시트르산염 완충액 (pH 6.0)을 사용하여 15분 동안 끓이는 과정을 거쳤다. 내인성 퍼옥시다제 활성을 억제하기 위해 절편을 3 % 과산화수소에 10 분 반응시킨 후 tris-hcl 버퍼 솔루션(ph 7.6) / tween 0.05% 로 린스하였다. i-NOS 토끼 다클론 항체 (rabbit polyclonal antibody, PA5-16855, Thermo scientific)와 TNF alpha 토끼 다클론 항체(rabbit polyclonal antibody, Ab6671, Abcam)를 1:100으로 4 ℃ 가습챔버에서 밤새 반응시켰다. Envision System-HRP 표지된 항-토끼 폴리머(Dako K4002)를 2차 항체로 실온에서 30분 반응시켰다. 3,3-디아미노벤지딘 퍼옥시다제 기질 (3,3-diaminobenzidine peroxidase substrate)로 발색 후 헤마톡실린으로 배경염색을 하였다. 최종적으로 절편을 탈수, 자일렌 단계 후 퍼마운트(permount)로 슬라이드를 봉입하였다. 염증 손상 정도를 보기 위해 광학 현미경(Axioplan2 imaging, SPOT Software; Version 4.6, Flex 64 Mp mosaic camera)으로 관찰하였으며, 현미경 사진을 도 16에 나타내었고, 면역염색 발현량을 수치화하여 도 17에 나타내었다.

[0117] 도 16에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군에서는 낮은 수준의 i-NOS와 TNF-α 발현이 관찰되었으며 질병유발군에서는 그 발현양이 매우 높아짐을 확인하였다. 계혈등 추출물 투여군(SS 10^{-2}, SS 10^{-1})에서는 이러한 발현 상승이 농도 의존적으로 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

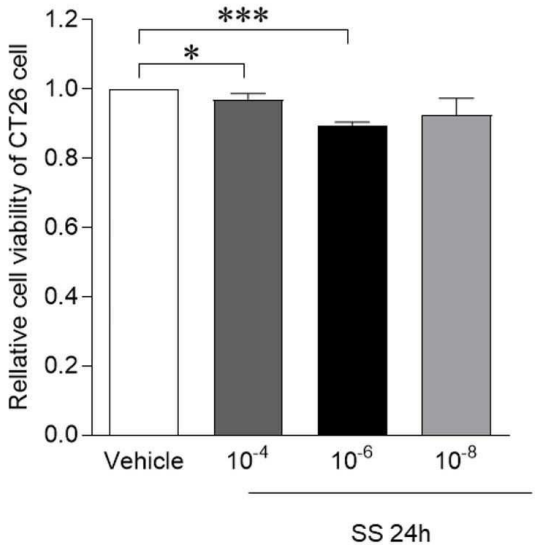
[0118] 도 17에 나타낸 바와 같이, i-NOS와 TNF-α의 발현양을 수치화 시킨 결과, iNOS의 경우, 질병유발군 대비 계혈등 추출물 100배 희석 투여군(SS 10^{-2})에서 발현양이 감소하는 것을 확인하였고($P<0.05$), 10배 희석군(SS 10^{-1})에서는 보다 큰 폭으로 발현양이 감소하는 것을 확인하였다($P<0.001$). 또한 계혈등 추출물 100배 희석 투여군과 10배 희석 투여군 간에도 유의한 발현량 차이가 있음을 확인하였다($P<0.01$). TNF-α의 경우, 질병유발군 대비 계혈등 추출물 100배 희석 투여군(SS 10^{-2})에서 발현양이 감소하는 것을 확인하였고($P<0.01$), 10배 희석군(SS 10^{-1})에서는 보다 큰 폭으로 발현양이 감소하는 것을 확인하였다($P<0.001$). 또한 계혈등 추출물 100배 희석 투여군과 10배 희석 투여군 간에도 유의한 발현량 차이가 있음을 확인하였다($P<0.01$).

[0119] 이러한 결과를 통해, 계혈등 추출물이 위염 또는 위궤양에 의해 손상된 조직 내 염증 관련 인자의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다.

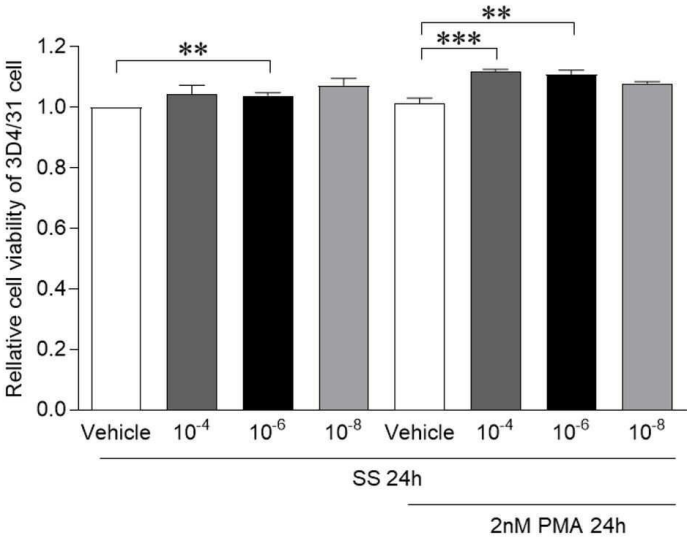
[0121] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

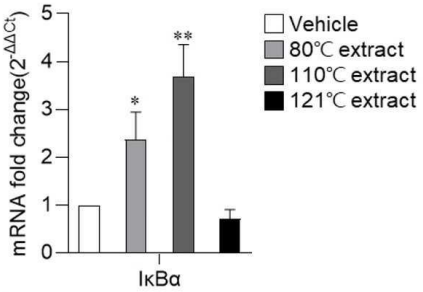
도면1



도면2

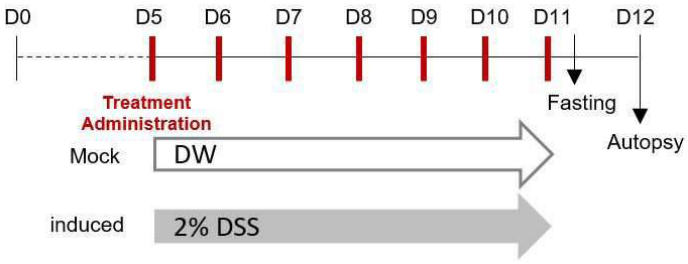


도면3

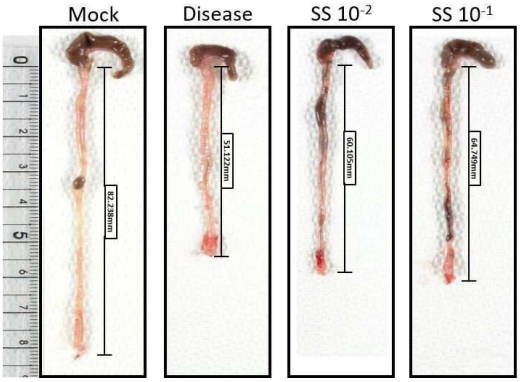


Gene	mRNA fold change(2-ΔΔCt)			
	Vehicle	80℃ extract	110℃ extract	121℃ extract
IκBα	1.00±0.00	2.36±0.58	3.69±0.67	0.71±0.2

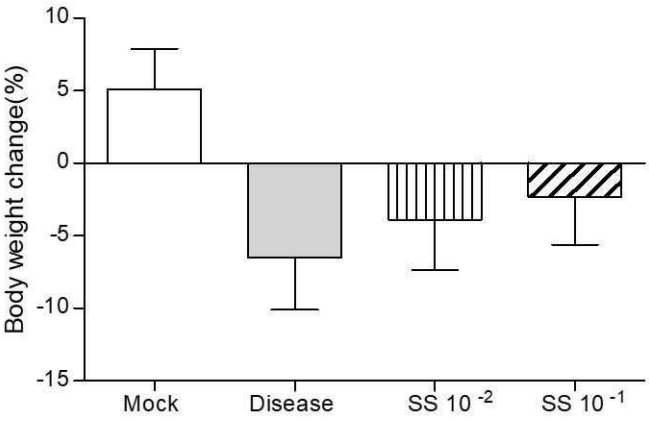
도면4


D0
D5
D6
D7
D8
D9
D10
D11
D12
Treatment Administration
Fasting
Autopsy
Mock
DW
induced
2% DSS

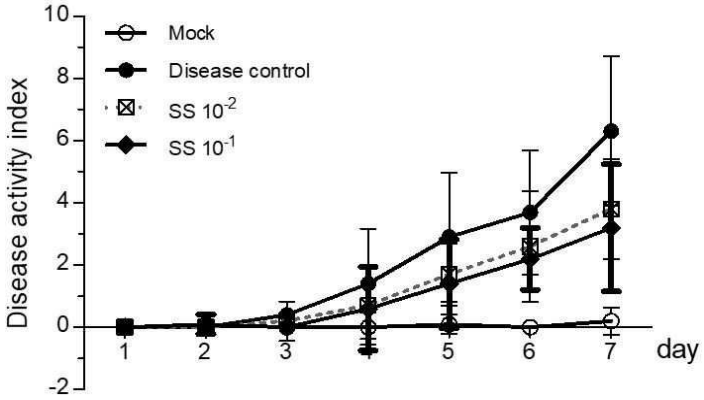
도면5


Mock
Disease
SS 10-2
SS 10-1

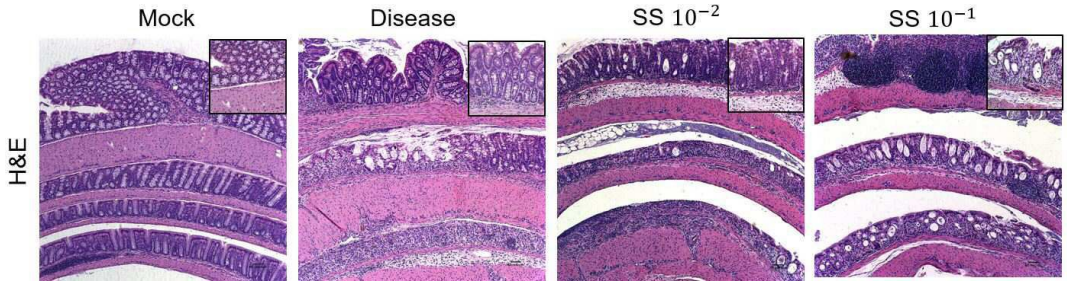
도면6


Body weight change(%)
10
5
0
-5
-10
-15
Mock
Disease
SS 10 -2
SS 10 -1

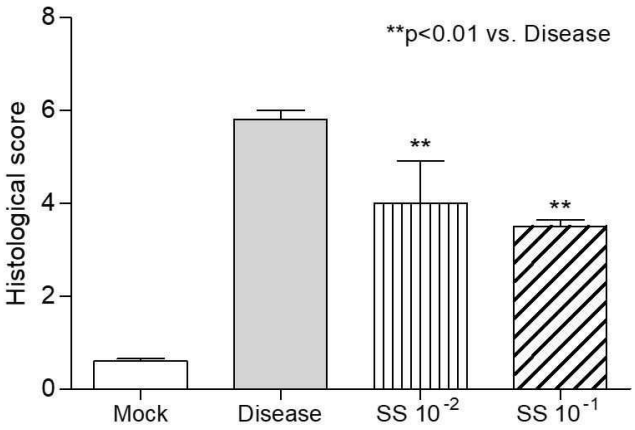
도면7


Mock
Disease control
SS 10-2
SS 10-1
Disease activity index
day

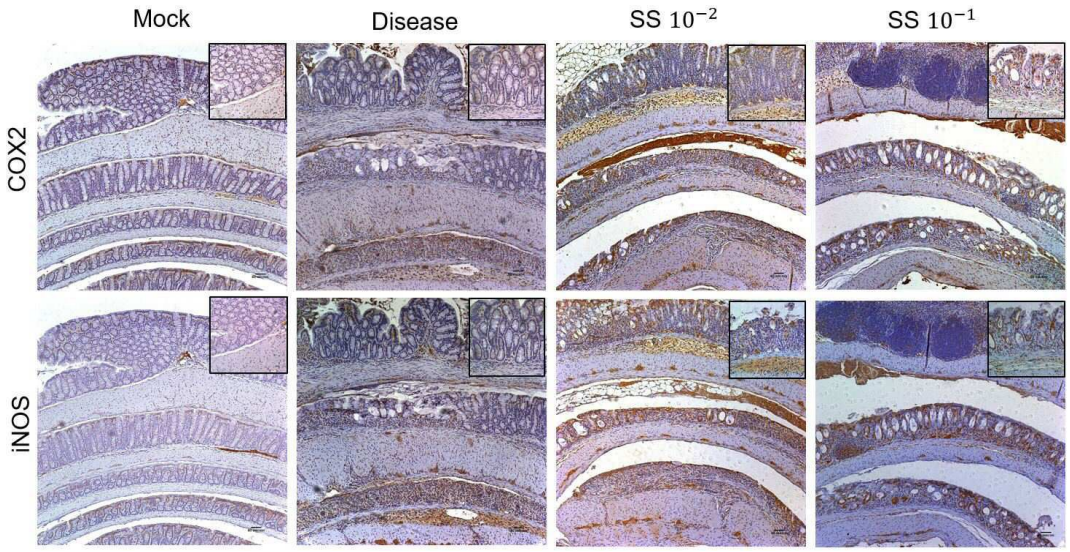
도면8


Mock
Disease
SS 10−2
SS 10−1
H&E

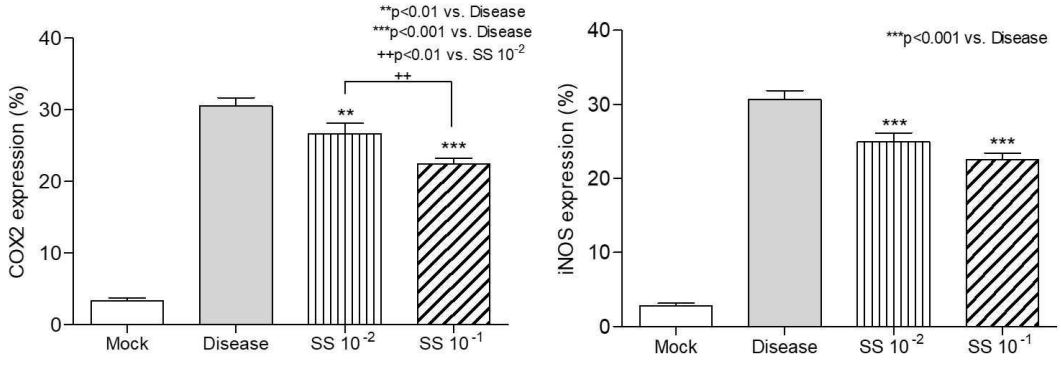
도면9


**p<0.01 vs. Disease
Histological score
Mock
Disease
SS 10-2
SS 10-1

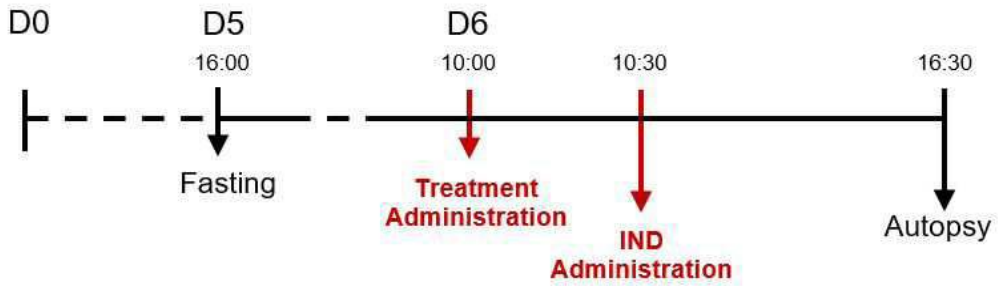
도면10



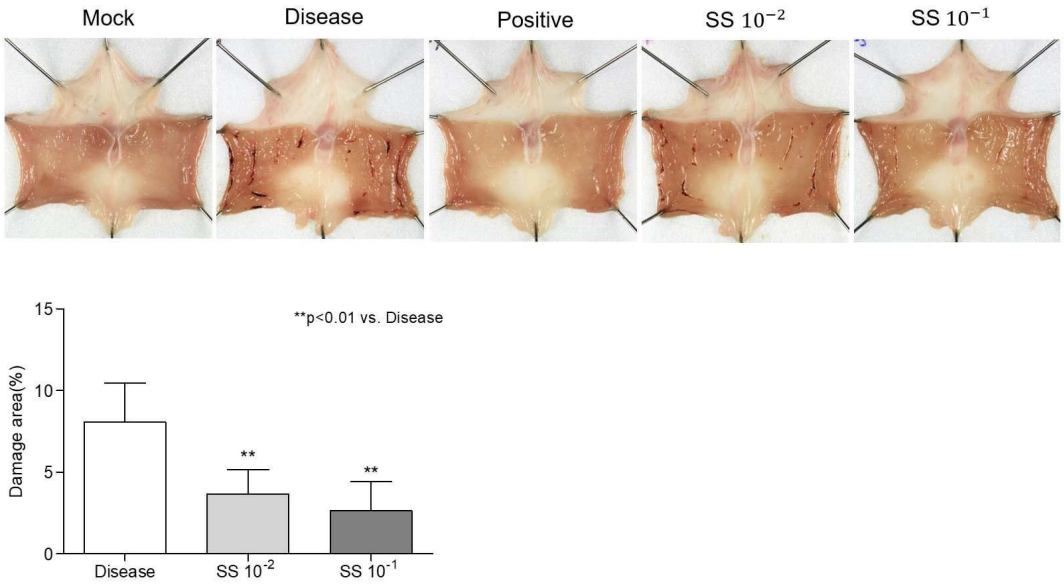
도면11



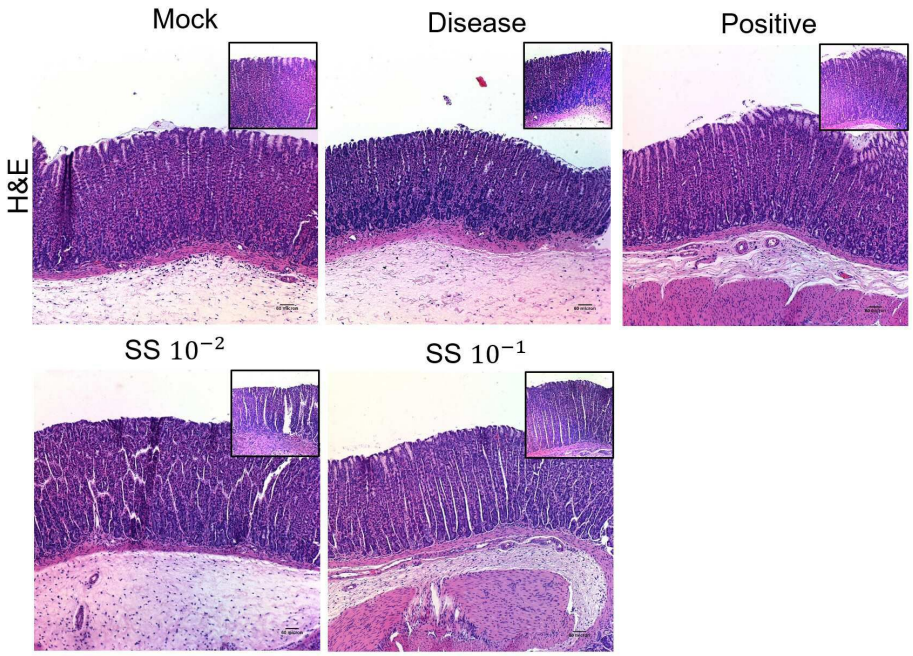
도면12



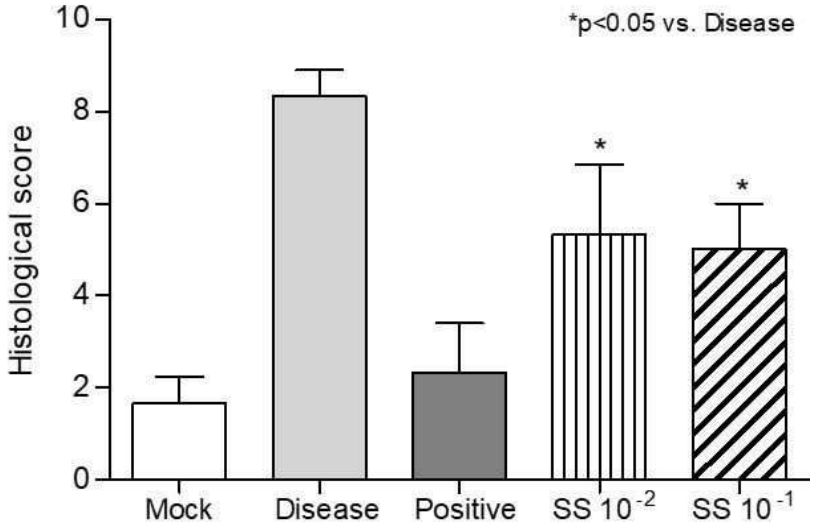
도면13


Mock
Disease
Positive
SS 10^{-2}
SS 10^{-1}
**p<0.01 vs. Disease
Damage area(%)
15
10
5
0
**
**
Disease
SS 10^{-2}
SS 10^{-1}

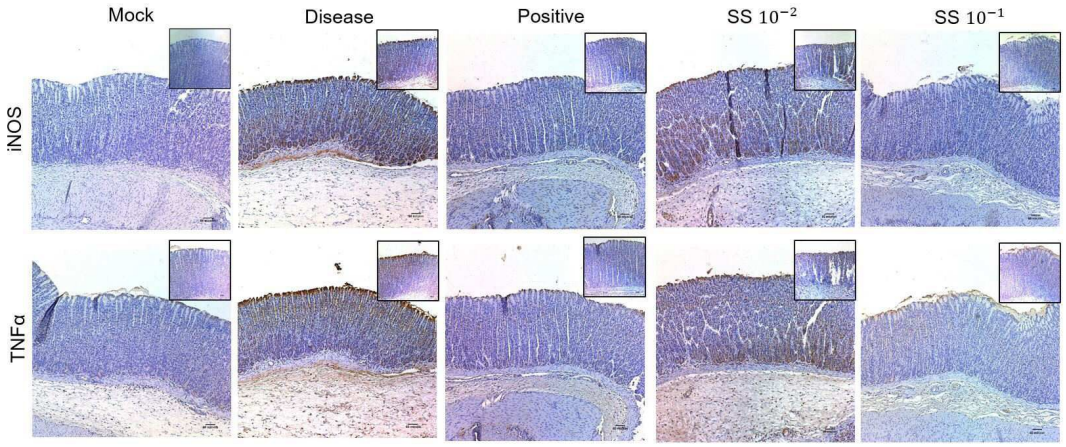
도면14


Mock
Disease
Positive
H&E
SS 10^{-2}
SS 10^{-1}

도면15



도면16



도면17

