



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0095740
(43) 공개일자 2009년09월10일

(51) Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0020863

(22) 출원일자 2008년03월06일

심사청구일자 2008년03월06일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

김성훈

서울 강남구 도곡동 타워팰리스 E동 2405호

김지영

서울 서초구 잠원동 신반포 한신아파트 306동 1204호

이효정

경기 수원시 영통구 망포동 GS자이 201동 1204호

(74) 대리인

노재철

전체 청구항 수 : 총 4 항

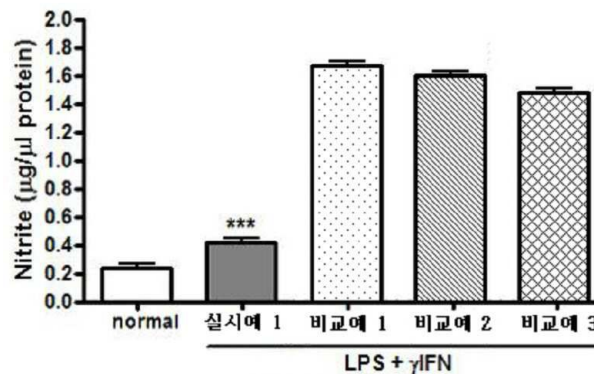
(54) 항염증 및 항통증 작용을 갖는 관절염 예방 및 개선을 위한 건강기능식품

(57) 요약

본 발명은 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함유하는 추출물로부터 소염진통 작용 및 항염증 작용을 갖는 관절염 예방 및 개선을 위한 건강기능식품에 관한 것이다.

본 발명은 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함께 투여함으로써 위장장애, 위염, 위궤양 등의 부작용을 나타내지 않을 뿐만 아니라, 소염진통 작용 및 항염증 작용에 있어서 획기적인 상승작용을 나타냄으로써 상기 생약재를 단독으로 사용할 때 보다 효과적으로 소염진통 작용 및 항염증 작용을 갖는 관절염 예방 및 개선을 위한 건강기능식품에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070401-080-076-001-01-00

부처명 농촌진흥청

연구사업명 현장협력기술개발사업

연구과제명 자초추출물 및 복합제의 항염증작용 규명 및 기능성유효성분의 효능검증

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2005년 04월 25일 ~ 2008년 04월 24일

특허청구의 범위

청구항 1

자초(Lithospermum erythrorhizon), 백굴채(Chelidonium majusLinne) 및 계지(Cinnamomum cassia) 추출물을 필수적으로 함유하며 소염진통 작용 및 항염증 작용을 갖는 관절염 예방 및 개선을 위한 건강기능식품.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 자초 : 백굴채 : 계지의 중량비(w/w)는 1 : 0.5 : 0.5 중량비로 함유되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 건강기능식품은 산제, 정제, 과립제, 환제, 경질캡셀제, 연질캡셀제 또는 액제 제형 중에서 선택됨을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 건강기능식품은 생즙, 파우치, 음료, 또는 다류 임을 특징으로 하는 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함유하는 추출물로부터 소염진통 작용 및 항염증 작용을 갖는 관절염 예방 및 개선을 위한 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 히스타민(histamine), 세로토닌(serotonine), 브래드키닌(bradykinin), 프로스타그랜딘류(prostaglandins), 하이드록실-에이코사테트라에노익산(hydroxyl-eicosatetraenoic acid, HETE), 류코트리엔(leukotriene)과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 손상에 따른 초기에 발생하는 적당한 염증은 손상 부위에 대한 빠른 복구를 가져오기 위한 정상적인 반응이다.
- <3> 그러나 장기간에 걸친 지속적인 염증반응은 손상부분에 대한 복구를 어렵게하고 주위 세포에 대한 위해를 가져 주변조직에 대한 방어력을 떨어뜨려 더욱 증세를 악화시킬 수 있다. 또한 장기간에 걸친 염증반응은 주변조직에 대한 지속적인 손상을 유도해 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 발생 시킬 수도 있다.
- <4> 따라서 염증반응이 나타난 조직은 빠른 시간 내에 복구프로그램이 잘 작동하도록 적절한 항 염증제를 처치해야 할 것이나, 염증성 질환을 치료하기 위해 사용되고 있는 스테로이드성 제제들은 여러 가지 많은 부작용을 나타내고 있어 그 사용을 제한하고 있으며, 효과가 탁월하며 부작용이 적은 항염증제의 개발이 요구되고 있는 실정이다(Miller M.J. et al., Mediators of inflammation, 4, pp387-396. 1995: Appleton L. et al., Adv Pharmacol., 35, pp27-28, 1996).
- <5> 한편, 관절염이란 관절에 어떤 원인에 의해서든 염증성 변화가 생긴 것을 총괄해서 지칭하는 병명이다. 퇴행성 또는 골성 관절염, 류머티즘 관절염 등 여러종류가 있으나 원인을 불문하고 관절의 물렁뼈가 없어지는 것을 관절염이라고 한다. 관절염의 유형중 퇴행성 관절염이 가장 흔한 관절염의 유형으로 젊은 시절 관절을 많이 사용하거나 상처를 입어 이미 시작되었을 수도 있지만, 증상은 주로 노인들에게서 보여 지는 유형이다. 주로 몸무게가 실리는 무릎, 엉덩이, 척추 관절에서 발생되지만, 그 외에도 외상이나, 골절, 과도한 운동 등으로 인해 모든 관절 부위에 발생될 수 있다.
- <6> 류마티스 관절염은 장기 질환으로 관절을 포함하여 인체 각 부분에 영향을 주는 질병이다. 류마티스성 관절염은 관절 부분이 부으면서 주위 조직까지 침범하며, 특정 화학물질을 분비하여 관절 표면을 공격하여 파괴시켜 버린

다. 주로 손과 발의 관절에서 발생되지만, 간혹 엉덩이, 무릎, 팔꿈치 등의 관절에서도 발생되기도 한다. 사용하지 않는 관절임에도 불구하고 부종, 통증, 뻣뻣한 증상이 발생된다. 류마티스성 관절염은 모든 연령층에서 발생되지만, 전체 환자의 70%이상은 30세 이상이다. 많은 관절들에서 동시에 발생할 수도 있다.

<7> 치료는 주로 외과적 수술, 약물요법 및 물리치료 등이 시행되어지고 있으나, 일부 보조요법을 제외하면 많은 부작용의 위험을 감수해야 한다. 약물 요법으로 사용되는 아스피린, 이부프로펜, 나프록센 등의 약들은, 효과적으로 통증과 염증을 감소시켜 주지만, 만약 환자가 궤양, 천식, 신장 질환, 간 질환이 있는 경우에는 경구용 약물이 안전하지 못할 수 있다. 또한 같은 관절 부위에 계속적으로 주사하는 것은 오히려 관절에 손상을 주거나 예상치 못한 위장장애, 위염, 위궤양 부작용이 생기기도 한다.

<8> 최근에는 위와 같은 부작용을 개선하기 위하여 생약을 주성분으로 이루어진 약제가 개발되어 몇가지 제품이 시판되고 있지만, 이러한 제품들을 치료효과가 떨어지거나 극히 제한된 질병에만 효과가 있어서 그 활용범위가 좁다는 문제점이 있어 효력이 강하면서도 비교적 부작용이 적은 건강기능식품 및 치료제에 대응하는 것이 요구되어 왔다.

<9> 생체에 있어서 염증의 발생 원인으로서 다양한 생화학적 현상이 관여하고 있다. 대식세포(Macrophage)는 다양한 기능을 가진 세포로 산화적 스트레스 상황에서 여러 가지 사이토카인(cytokine)과 NO를 생성하여 염증반응에서 중요한 역할을 한다. 특히 대식세포에서 리포다당류(Lipopolysaccharide; LPS), 사이토카인, TNF- α 와 같은 자극에 의해 발현되는 iNOS는 장시간 동안 다량의 NO를 생산한다. 이러한 산화적 스트레스는 염증반응의 전사인자인 NF κ B 활성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. p50과 p65의 이형이합체(heterodimer)로 구성된 NF κ B는 활성화된 후 핵으로 이동하여 iNOS와 COX-2 등의 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며, 이러한 NF κ B 활성을 저해하면 염증반응을 억제하는 것으로 알려져 있다(Baeuerle P. et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 12, pp141-179, 1994; Allenm R. et al, *Free Radic. Biol. Med.*, 28, pp463-499, 2000).

<10> 최근의 연구 결과에 따르면, NO는 세 가지 주요한 NOS 이성질체(isoform)인 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS), inducible NOS(iNOS)에 의해 아르기닌(arginine)으로부터 생성되는 자유라디칼이다. nNOS와 eNOS는 Ca²⁺/칼모듈린(calmodulin)에 의해 조절되지만, iNOS는 인터루킨(interleukin), 인터페론(interferon), LPS와 같은 염증성 자극에 의해 전사 수준에서 조절된다. nNOS나 eNOS에 의해 소량 생성된 NO는 혈관확장, 신경전달, 병원체에 대한 세포파괴 등과 같은 정상적인 생리기능을 담당하지만, 대식세포에서 iNOS에 의해 과다 생성된 NO는 슈퍼옥사이드(superoxide)와 반응하여 퍼옥시니트라이트(peroxynitrite)를 형성하고 이는 강력한 산화제로 작용하여 세포에 손상을 입히고, 염증성 자극에 의해 활성화된 대식세포에서 NF κ B를 활성화시켜 염증반응, 암, 동맥경화 등 만성질환에 관련하는 것으로 알려져 있다(Lawrence T. et al., *Nat Med.*, 7, pp1291-1297, 2001; Riehemann K. et al., *FEBS Lett.*, 442, pp89-94, 1999; Kang JL. et al., *Mol. Cell. Biochem.*, 215, pp1-9, 2000; El-Mahmoudy A. et al., *International Immunopharmacology*, 2, pp1603-1611, 2002).

<11> NO는 염증과 암을 포함한 다양한 병리생리학적 과정에서 iNOS에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. NOS는 염증, 혈관확장, 신경전달, 종양세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 NO를 생성하며, 염증 상태에서는 대식세포에서 iNOS에 의해 NO를 다량 생성하여 여러 만성질환을 일으키는 것으로 알려져 있다(Kim KM. et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 30(7), pp747-756, 2001; Stamler J S. et al., *Science*, 258, pp1898-1902, 1992). iNOS의 발현은 NF κ B 활성으로 유도되며 이는 대식세포에서 LPS나 사이토카인(cytokine)에 의해 염증성 매개물들이 과잉 생산되는 중요한 매카니즘이 된다. 대식세포에서 NO의 생성은 iNOS의 발현과 직접적으로 연관되어 있고, LPS는 그람(Gram) 음성 세균의 세포벽 물질로서 면역 세포 등을 자극하여 NO의 생성을 상승적으로 증가시킨다.

<12> NF κ B는 사이토카인 반응, 염증, 세포 성장 조절과 같은 다양한 단계에 참여하는 전사 인자로 최근의 연구들은 유도(inducible) NF κ B가 죽상동맥경화 발병에 관여함을 강하게 제기되고 있다. 많은 세포에서 NF κ B는 세포질에서 핵으로의 다양한 신호 전달에 관여하는 산화환원 의존적 전사인자(redox-sensitive transcription factor)로 세포질 속에서 p50, p65, I κ B 서브유닛(subunit)의 삼합체(trimer)로 발견되고, 산화적 스트레스에 의해 I κ B가 분해되면 p50/p65 이형이합체(heterodimer)가 핵 속으로 이동하여 연속적인 DNA 결합을 초래하는 것으로 알려져 있다(Gius D. et al., *Toxicol. Lett.*, 106, pp93-106, 1999).

<13> 자초(紫草)는 지치과의 여러해살이풀로서 지치(Lithospermum erythrorhizon)의 뿌리에 해당하며, 한방에서는 혈열(血熱)로 인한 반진(斑疹)이 암자색을 보일 때에 유효하며, 토혈, 코피, 소변 출혈에도 빠른 효과를 보이고, 홍역의 예방과 치료에 발병물을 감소시키며, 종기 초기와 피부가 혈어 생긴 발진, 만성궤양, 자궁경부미란, 습

진, 불이나 뜨거운 물에 데었을 때 내복하거나 외용하는 것으로 알려져 있다. 또한, 황색포도상구균, 대장균, 인플루엔자균, 이질균, 피부진균에 억제 작용이 있고, 면역 반응에 억제 작용을 나타내며, 항염증 작용과 가벼운 해열 작용을 보이며, 자궁의 생리 주기 및 발육을 현저하게 억제시키므로 피임 작용을 나타내고, 생리혈과 반응시 항균 효과를 나타내어 미생물의 번식을 억제함으로써 산화적인 환경을 억제하여 생리시 냄새의 소지를 없애는 작용을 하는 것으로 알려져 있고, 대한민국 등록특허공보 제661014호, 대한민국 등록특허공보 제299916호 및 대한민국 등록특허공보 제388668호에는 자초가 항염증 작용이 있음이 개시되어 있다.

<14> 백굴채는 애기똥풀(*Chelidonium majus* Linne, 양귀비과)의 전초를 사용하는 생약으로 동통, 궤양 등에 대한 진통 작용이나 항종양, 혈압강하, 항균, 중추신경 억제작용 등의 활성이 보고되어 있으며, 대부분 이소퀴놀린(isoquinoline)계 알칼로이드인 켈리도닌(chelidone), 헤모켈리도닌(hemochelidone), 켈리루빈(chelirubine), 프로토피(protopine), 알파알로크립토피(α -allocryptopine), 베타알로크립토피(β -allocryptopine), 스틸로핀(Stylopin)과 벤조페난스리딘(benzophenanthridine) 알칼로이드인 산귀나린(sanguinarine), 켈레리스린(chelerythrine)이 약리작용의 주성분으로 보고되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제310059호, 대한민국 등록특허공보 제503926호에는 백굴채 추출물의 진통작용, 항암활성, 면역증강성 및 조절성 효과가 공지되어 있다.

<15> 계지(*Cinnamomum cassia*) 장나무과의 상록교목식물인 계수나무(또는 계피나무라고도 함)의 어린 가지로, 맵고 달며 성질은 따뜻하고 심과 폐와 방광에 작용한다. 위를 튼튼하게 하고, 중풍을 억제하며 진통, 강심작용이 있고 피부혈관을 확장시키고 한선을 자극하여 땀을 내어 해열작용을 하며 바이러스의 억제작용을 한다고 알려져 있으며, 오한, 발열, 두통, 몸의 통증, 땀이 나지 않는 경우나 심계항진 등에 사용하여 오고 있으며, 대한민국 공개특허공보 제2005-97013호 및 대한민국 등록특허공보 제778078호에는 계지 추출물이 염증 및 통증에 효과가 있음이 공지되어 있다.

<16> 그러나, 본 발명자들은 종래 항염증 및 항통증 작용을 갖는 생약재를 탐색 하던 중 상기 종래 기술에 기재되어 있는 자초, 백굴채 및 계지는 각각 단독 투여한 경우에는 염증반응을 매개하는 두가지 중요한 효소인 iNOS와 COX-2 효소 억제능과 염증을 유발하는 IL-8, IL-1 β , IL-6, MCP-1 와 같은 사이토카인의 생성에 대한 억제 활성에 관한 유의성이 없으며, 항통증 작용이 매우 미약한 것임을 확인할 수 있었다.

<17> 그런데, 놀랍게도 본 발명자들은 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함께 투여함으로써 소염진통 작용 및 항염증 작용에 있어서 상기 생약재를 단독으로 사용할 때 보다 획기적인 상승작용을 나타내어 효과적으로 소염진통 작용 및 항염증 작용을 갖게 될 뿐만 아니라 위장장애, 위염, 위궤양 등의 부작용을 나타내지 않음을 확인하고 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함유하는 추출물로부터 관절염 예방 및 개선을 위한 건강기능식품에 유용하게 사용될 수 있는 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<18> 본 발명은 소염진통 작용 및 항염증 작용에 있어서 획기적인 상승작용을 나타냄으로써 효과적으로 소염진통 및 항염증 작용을 갖고, 위장장애, 위염, 위궤양 등의 부작용을 나타내지 않는 관절염 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<19> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 자초(*Lithospermum erythrorhizon*), 백굴채(*Chelidonium majus* Linne) 및 계지(*Cinnamomum cassia*)를 필수적으로 함유하는 추출물로부터 소염진통 작용 및 항염증 작용을 갖는 관절염 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

<20> 구체적으로, 본 발명에 의한 건강기능식품은 자초, 백굴채 및 계지는 필수적으로 함유하며, 그 구성비가 자초 : 백굴채 : 계지의 중량비(w/w) 1~5 : 0.5~2 : 0.5~2이며, 바람직하게는 1 : 0.5 : 0.5로 구성된다.

<21> 본 발명에서 상기 건강기능식품에 함유되는 자초, 백굴채 및 계지는 물 또는 메탄올, 에탄올 등의 저급알콜 용매 또는 이들을 혼합한 용매로부터 선택된 용매 가용 추출물이며, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합 용매 가용 추출물, 더욱 바람직하게는 60~90% 에탄올 가용 추출물을 포함한다.

<22> 본 발명은 자초, 백굴채 및 계지를 세척한 다음 세절하여 그 중량의 약 2~20배, 바람직하게는 약 5~10배 부피의 85% 에탄올로 약 80~100℃에서 약 1일 내지 3일 동안 열수 추출, 환류냉각 추출, 초음파 추출 등의 추출방법,

바람직하게는 열수 추출방법으로 1~3회 반복 추출하여 추출물을 수득한 다음 상기 추출물을 실온에서 방냉한 후 여과하여 회전진공농축기로 감압농축한 다음 동결 건조하여 본 발명의 자초, 백굴채 및 계지는 필수적으로 함유하는 건강기능식품을 수득할 수 있다.

- <23> 본 발명에 이용되는 생약재 자초, 백굴채 및 계지는 각각은 항염증 또는 항통증 작용이 있는 것으로 알려져 있었으나, 실제 랫트의 카라기난 유도 급성관절염 모델 및 세로토닌 유도 급성관절염 모델에서의 소염 효과 및 마우스 모델에서의 Acetic acid wirthing 방법에 의한 진통효과 및 Hot plate method 열판법에 의한 진통작용 효과를 측정한 결과 종래 문헌 등에 알려져 있는 바와는 달리 소염 및 진통 작용이 미약할 뿐만 아니라, 마우스 대식세포를 이용한 항염증 작용 시험에서 NO 생성량, COX-2, 프로스타글란딘 2(PGE2), 사이토카인(IL-8, IL-1 β , IL-6)의 측정에서 유의성 있는 결과를 얻지 못하여 관절염 예방 및 개선을 위한 건강기능식품에는 부적합한 것으로 판단되었다.
- <24> 그러나, 놀랍게도 본 발명에 의한 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함유하는 조성물에서는 자초, 백굴채 및 계지 각각에서 보여준 결과와는 달리 랫트의 카라기난 유도 급성관절염 모델 및 세로토닌 유도 급성관절염 모델에서의 소염 효과 및 마우스 모델에서의 Acetic acid wirthing 방법에 의한 진통효과 및 Hot plate method 열판법에 의한 진통작용 효과를 측정한 결과 대조약물인 이부프로펜 및 인도메타신과 동등 이상의 소염작용을 나타내는 결과를 보였으며, 또한 본 발명은 마우스 모델에서의 Acetic acid wirthing 방법에 의한 진통효과 및 Hot plate method 열판법에 의한 진통작용 효과를 측정한 결과 대조약물인 아스피린 및 모르핀과 동등 이상의 진통작용을 나타내는 결과를 보였다.
- <25> 아울러, 본 발명은 세포수준에서 일산화질소 합성을 억제하였으며, 염증반응을 매개하는 두가지 중요한 효소인 iNOS와 COX-2효소를 억제하였으며, 염증을 유발하는 IL-8, IL-1 β , IL-6, MCP-1 와 같은 사이토카인의 생성에 대한 억제 활성이 우수하며 항염증 활성에 탁월한 효과가 있음을 확인하였다.
- <26> 특히, 본 발명은 PGE2 억제 작용이 매우 뛰어나 위장장애, 위염, 위궤양 등의 부작용을 나타내지 않아 소염진통 작용 및 항염증 작용을 갖는 관절염 예방 및 개선을 위한 목적의 건강기능식품으로 장기간 사용될 수 있다.
- <27> 본 발명은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등에 첨가하여 건강기능식품으로 개발할 수 있으며, 직접 환제, 분말, 정제, 캡슐제 등의 제형으로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 제제화할 경우에는 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

효 과

- <28> 상술한 바와 같이, 본 발명은 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함께 투여함으로써 위장장애, 위염, 위궤양 등의 부작용을 나타내지 않을 뿐만 아니라, 소염진통 작용 및 항염증 작용에 있어서 획기적인 상승작용을 나타냄으로써 상기 생약재를 단독으로 사용할 때 보다 효과적으로 소염진통 작용 및 항염증 작용을 갖는 관절염 예방 및 개선을 위한 건강기능식품에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <29> 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다. 단, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <30> <실시예 1> 본 발명에 의한 추출물의 제조
- <31> 자초 50g, 백굴채 25g, 계지 25g의 혼합물에 에탄올 1ℓ를 넣어 3일 동안 80℃에서 에탄올 추출하였으며, 에탄올 추출은 두 번 반복하여 실행하였다. 추출액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였고, 동결 건조하여 2.21g의 분말을 제조하였다.
- <32> <비교예 1> 자초 추출물의 제조
- <33> 자초 50g을 에탄올 1ℓ에 넣어 3일 동안 에탄올 추출하였으며, 에탄올 추출은 두 번 반복하여 실행한 다음 추출액을 실시예 1과 동일한 방법으로 감압 농축 및 동결 건조하여 1.32g의 분말을 제조하였다.
- <34> <비교예 2> 백굴채 추출물의 제조
- <35> 백굴채 25g을 비교예 1과 동일한 방법으로 추출하여 0.85g의 분말을 제조하였다.

<비교예 3> 계지 추출물의 제조

계지 25g을 비교예 1과 동일한 방법으로 추출하여 0.78g의 분말을 제조하였다.

<실험예 1> 랫트의 카라기난 유도 급성관절염 모델에서의 소염효과 측정 1

스프라그-도울리계(Sprague-Dawley)의 180-200g의 랫트(대한바이오링크, 한국)를 사용하였으며, 관절염 유발을 위한 기염제로는 1% 카라기난(carrageenin)을 이용하였다. 본 발명에 의한 실시예 1, 비교예 1 내지 3에서 추출된 동결 건조분말 각각 1g 썩을 생리식염수 10ml에 용해하여 200 mg/kg을 2주일 전부터 경구 투여한 다음 1%의 카라기난 용액 0.1 ml씩을 rat의 right hind paw에 주사하였다. 주사 후 1시간 및 2시간 지난 후에 발생하는 부종을 용적법에 따라 rat의 right hind paw의 일정부위(malleous lateral)까지의 용적을 Plethysmometer(UGO Basile, Italy)를 사용하여 부종 억제율(ml)을 구하여 표 1에 나타내었다. 대조약물로는 이부프로펜을 100mg/kg 투여하였다.

표 1

Treatment	Dose (mg/kg)	Volume(ml)		
		0	1	2 (hr)
Control		1.43±0.100	1.80±0.059	2.72±0.06
대조군	100	1.19±0.0425	1.63±0.0324*	1.83±0.040***
실시예 1	200	1.26±0.013*	1.66±0.076	1.88±0.033**
비교예 1	200	1.46±0.043*	1.76±0.056	2.56±0.033**
비교예 2	200	1.58±0.041	1.79±0.049	2.32±0.046***
비교예 3	200	1.41±0.072	1.72±0.034	2.47±0.046***

*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001

상기 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 실시예 1 추출물을 경구투여한 군에서는 투여하지 않은 대조군에 비하여 부종억제 효과를 나타내었으며, 특히 대조 약물인 이부프로펜과 동등 이상의 급성 소염효과가 있음을 확인할 수 있으나, 비교예 1 내지 3인 자초, 백굴채 및 계지를 각각 동량 투여한 투여군에서는 소염 효과가 매우 미약한 것임을 알 수 있다.

그러므로 자초, 백굴채 및 계지 추출물은 종래 알려진 바와는 달리 소염 작용이 매우 약하지만, 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함유하는 본 발명은 소염작용이 매우 탁월함을 알 수 있다.

<실험예 2> 랫트의 세로토닌 유도 급성관절염 모델에서의 소염효과 측정 2

본 발명에 따른 소염 작용을 재확인하기 위하여 세로토닌(serotonin)으로 유발한 랫트의 소염효과를 수행하였다. 상기 실험예 1에서와 같이, 본 발명에 의한 실시예 1, 비교예 1 내지 3에서 추출된 동결 건조분말 각각 1g 썩을 생리식염수 10ml에 용해하여 200 mg/kg을 2주일 전부터 경구 투여한 다음 세로토닌(1mg/ml)을 랫트의 right sub plantar region에 0.1ml 썩 주사하여 부종을 유발하고 주사 직전부터 주사 후 18분, 24분 및 30분에 pedal volume을 측정하여 표 2에 나타내었다. 비교 약물로는 인도메타신(10mg/kg)을 사용하였다.

표 2

Treatment	Dose (mg/kg)	Swelling thickness($\times 10^{-3}$ mm)		
		18	24	30(min)
Control		18.10 $\pm$ 0.639	27.10 $\pm$ 0.664	22.35 $\pm$ 1.0267
대조군	10	13.63 $\pm$ 1.165*	15.75 $\pm$ 0.8539***	12.60 $\pm$ 1.2014***
실시예 1	200	13.75 $\pm$ 0.7377	16.53 $\pm$ 0.3473***	13.45 $\pm$ 0.9465*
비교예 1	200	17.78 $\pm$ 0.6211	24.29 $\pm$ 0.3655***	20.15 $\pm$ 0.9277***
비교예 2	200	18.55 $\pm$ 0.5372	23.38 $\pm$ 0.8862***	18.25 $\pm$ 0.0624*
비교예 3	200	17.92 $\pm$ 0.3651	26.55 $\pm$ 0.2517***	19.75 $\pm$ 0.3382***

*;P<0.05, **;P<0.01, ***;P<0.001

<45>

<46>

상기 표 2로부터, 비교예 1 내지 3인 자초, 백굴채 및 계지를 각각 동량 투여한 투여군에서는 소염 효과가 매우 미약한 것임을 알 수 있으나, 본 발명의 실시예 1 추출물을 경구투여한 군에서는 대조 약물인 인도메타신과 동등한 정도의 급성 소염효과가 있음을 확인할 수 있으며, 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함유하는 본 발명은 소염작용이 매우 우수함을 알 수 있다.

<47>

<실험예 3> 마우스 모델에서의 진통효과 측정 1

<48>

Acetic acid writhing 방법으로 상기 실험예 1에서와 같이, 본 발명에 의한 실시예 1, 비교예 1 내지 3에서 추출된 동결 건조분말 각각 1g 씩을 생리식염수 10ml에 용해하여 200 mg/kg을 7일간 ICR 마우스(20g) 각각 경구 투여하였다. 투여 7일째 마지막 경구 투여한 후 한 시간 뒤에 0.6% 초산-생리식염수액을 0.1ml/10g을 복강 내에 투여한 다음 5분 후 10분간 마우스가 나타내는 writhing syndrome(동물의 복강에 아세트산을 투여했을 때, 사람으로 치면 기지개를 펴는 것 같이 허리를 젖히고 뒷다리를 뻗는 동작을 하는 것을 말는 것으로서, 아픔을 느낄 때 이런 식의 행동을 취한다)의 빈도수를 측정하여 표 3에 나타내었다. 비교 약물은 아스피린(100 mg/kg)을 사용하였다.

표 3

Group	Dose	writhing 횟수평균(count/10min)
Control		44.2 $\pm$ 1.019
대조군	100 mg/kg	13.2 $\pm$ 0.734***
실시예 1	200 mg/kg	15.2 $\pm$ 0.836***
비교예 1	200 mg/kg	39.8 $\pm$ 1.241***
비교예 2	200 mg/kg	37.2 $\pm$ 6.873***
비교예 3	200 mg/kg	40.3 $\pm$ 0.117***

***;P<0.001는 Control군과의 유의성

<49>

<50>

표 3에 기재된 바와 같이, 실험결과 비교예 1 내지 3인 자초, 백굴채 및 계지를 각각 동량 투여한 투여군에서는 진통 효과가 조금밖에 나타나지 않았으나, 본 발명의 실시예 1 추출물을 경구투여한 군에서는 대조 약물인 아스피린과 동등한 정도의 진통효과가 있음을 확인할 수 있으며, 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함유하는 본 발명은 진통작용이 매우 우수함을 확인할 수 있다.

<51>

<실험예 4> 마우스 모델에서의 진통효과 측정 2

<52>

진통효과를 다시 확인하기 위하여 Hot plate method 열판법에 의한 진통작용 효과를 측정 하였다. Hot plate를 사용하여 실험예 1과 같이, 시료를 각각 ICR 마우스(20g)에 경구투여하고 한 시간 후에 열판(70℃)에 넣고서 마우스가 열판위에 접촉함과 동시에 뛰어오를 때까지의 시간을 측정하여 표 4에 나타내었다. 비교약물로는 모르핀(10 mg/kg)을 사용하였다.

표 4

Group	Dose	Hot plate(sec)
Control		17.78±0.68
대조군	10 mg/kg	34.9±0.70***
실시예 1	200 mg/kg	31.28±0.58
비교예 1	200 mg/kg	21.62±0.72**
비교예 2	200 mg/kg	22.26±0.57**
비교예 3	200 mg/kg	21.74±0.26**

;P<0.01, *;P<0.001

<53>

<54>

표 4에서 알 수 있는 바와 같이, 실험결과 비교예 1 내지 3인 자초, 백굴채 및 계지를 각각 동량 투여한 투여군에서는 통증을 완화시키는 효과가 미약하였으나, 본 발명의 실시예 1 추출물을 경구투여한 군에서는 대조 약물인 모르핀과 동등한 정도의 통증을 완화시키는 효과가 있음을 확인할 수 있다.

<55>

그러므로 본 발명은 자초, 백굴채 및 계지를 필수적으로 함유하는 조성물에서 통증 완화 효과가 매우 탁월함을 알 수 있다.

<56>

<실험예 5> 마우스대식세포를 이용한 항염효과 :NO 생성량 측정

<57>

Murine RAW264.7 대식세포를 6 well plate에 각 well 당 10^6 세포수가 되도록 분주한 후 24시간 후에 본 발명에 따른 실시예 1, 비교예 1 내지 3을 각각 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 취하여 LPS 10 ng/ml과 IFN- γ 100U/ml을 동시 처리하여 48시간동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후 2000rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액으로부터 생성된 산화질소(nitric oxide)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂-의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 분주한 후 Griess reagent(0.8% sulfanilamide/ 0.75% N-(naphthyethylene)diamine in 0.5 N HCl, sigma) 100 μl 첨가하였다. 15분간 실온에서 방치한 후, 540 nm 파장에서 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA,USA)을 이용하여 nitrite 농도를 측정하여 도 1에 나타내었다. Sodium nitrite(0.5-100M)를 nitrite표준으로 이용하였다.

<58>

도 1 에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1은 LPS와 IFN- γ 로 유발된 세포의 NO 합성을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 79% 까지 억제하였으나, 비교예 1 내지 3은 세포의 NO 합성 억제정도가 매우 미약하였다.

<59>

<실험예 6> 마우스 대식세포를 이용한 항염효과; Cyclooxygenase (COX-2) 측정

<60>

Murine RAW264.7 대식세포를 6 well plate에 각 well 당 10^6 세포수가 되도록 분주한 후 24시간 후에 본 발명에 따른 실시예 1을 1, 10 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 취하여 농도별로 LPS 10 ng/ml과 IFN- γ 100U/ml을 동시 처리하여 48시간동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후 세포를 수거하여 Trizol Reagent를 이용한 방법으로 RNA를 추출하였으며, 2 μg RNA로 cDNA를 합성하여, cDNA를 가지고 COX-1,COX-2 각각의 primer로 PCR을 수행하였다. PCR조건은 Pre-denaturation 94 $^{\circ}\text{C}$ 5분, Denaturation 94 $^{\circ}\text{C}$, Annealing 58-65 $^{\circ}\text{C}$ 30초, polymeration 72 $^{\circ}\text{C}$ 30초, Extend polymeration 72 $^{\circ}\text{C}$ 5분 으로 30 cycle을 수행하였다. 비교약물로는 cox-2 억제제인 셀렉코시브(celecoxibe)를 사용하였다.

<61>

도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1의 1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 LPS와 IFN- γ 로 유도한 COX-2를 저해하는 효과를 나타내었다. 특히, 본 발명에 따른 실시예 1의 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 양성대조군인 셀렉코시브와 같은 정도로 저해하였으며, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 셀렉코시브 보다 저해하는 효과를 나타내었다.

<62>

<실험예 7> 마우스 대식세포를 이용한 항염효과: 프로스타글란딘 2(PGE2)량 측정

<63>

Murine RAW264.7 대식세포를 6 well plate에 각 well 당 10^6 세포수가 되도록 분주한 후 24시간 후에 본 발명에 따른 실시예 1, 비교예 1 내지 3을 각각 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 취하여 LPS 10 ng/ml과 IFN- γ 100U/ml을 동시 처리하여 48시간동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후 2000rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 프로스타글란딘 2(PGE2)량은 효소면역분석법으로 측정하여 도 3에 나타내었다(Kits, R&D system, USA). 비교약물로는 cox-2 억제제인 셀렉코시브(celecoxibe)를 사용하였다.

<64>

도 3에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1은 RAW264.7 대식세포 주세포에서 LPS와 IFN- γ 로 유

도한 PGE2 생성은 비교약물과 동등하게 유의적으로 감소함을 나타내었으나, 비교예 1 내지 3은 거의 PGE2 생성을 감소시키지 못하였다.

<65> <실험예 8> 마우스 대식세포를 이용한 항염효과

<66> Murine RAW264.7 대식세포를 6 well plate에 각 well 당 10^6 세포수가 되도록 분주한 후 24시간 후 LPS 10 ng/ml과 IFN- γ 100U/ml와 본 발명에 따른 실시예 1, 비교예 1 내지 3을 각각 50 μ g/ml 취하여 동시처리하고, 양성 대조군으로 셀레코시브(50 μ g/ml) 사용하여 CO₂ 배양기에 48시간동안 배양하였다. 배양 후 플레이트를 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 배양 상층액을 수거하였다. MCP-1, IL-8, IL-1 β , IL-6의 양을 효소면역분석법으로 측정하여 도 4a, 4b, 4c 및 4d에 나타내었다(Kits, BD Pharmigen, USA). 비교약물로는 cox-2 억제제인 셀렉코시브(celecoxib)를 사용하였다.

<67> 도 4a, 4b, 4c 및 4d에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1은 RAW264.7 대식세포주세포에서 LPS와 IFN- γ 로 유도한 케모카인(MCP-1)및 사이토카인(IL-8, IL-1 β , IL-6)의 생성을 비교약물과 마찬가지로 유의적으로 감소시키는 효과를 나타내었으나, 비교예 1 내지 3은 거의 유의적으로 감소시키는 효과를 나타내지 못하였다.

<68> <실험예 9> 위염모델의 저해능

<69> 본 발명에 따른 실시예 1에서 제조된 각 추출물의 동결 건조분말 100 mg, 200mg 및 300mg을 각각 0.1% CMC에 녹여 SD 랫트(male, SPF, 150 - 200 g, 오리엔트바이오사로부터 구입)에 경구투여 하였다. 대조군으로 인도메타신을 10 mg/랫트의 용량으로 SD 랫트에 경구 투여하였다. 5시간 후 위부분을 절제하고 polytron homogenizer로 갈고, 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이후 에틸아세테이트로 추출하고 건조하였다. 이 후 메탄올에 녹인 후 Park등의 방법으로(Eur. J. Pharmacol. 425, 153-157, 2001) Sep-Pak C18 column에 넣고 유출한 후 N2로 건조한 후 ELISA 법으로 위의 염증의 parameter인 PGE 2의 양을 정량하고 그 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5

구분	투여량	PGE2 (ng/stomach) (Mean $\pm$ SD)
대조군	10 mg/랫트	3.2 $\pm$ 0.2
실시예 1	100 mg/랫트	0.4 $\pm$ 0.8*
	200 mg/랫트	0.4 $\pm$ 5.5*
	300 mg/랫트	0.5 $\pm$ 1.9

N= 6, *: P < 0.05, significantly different from the ethanol-treated

control group by ANOVA followed by Dunn' s test

<70>

<71> 표 5에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 의한 실시예 1은 투여량에 관계없이 위의 염증을 거의 일으키지 않았으나, 대조 약물은 위염 발생 위험이 높은 것으로서, 본 발명은 PGE2 억제 작용이 매우 뛰어나 위장장애, 위염, 위궤양 등의 부작용을 나타내지 않아 소염진통 작용 및 항염증 작용을 갖는 관절염 예방 및 개선을 위한 목적의 건강기능식품으로 장기간 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<72> 도 1은 본 발명에 따른 실시예 1, 비교예 1 내지 3에서 제조된 동결건조 분말의 마우스 대식세포에서의 NO 생성량 억제효과를 나타낸 그래프이며,

<73> 도 2는 본 발명에 따른 실시예 1에서 제조된 동결건조 분말의 농도별(1, 10 및 50 μ g/ml) 마우스 대식세포에서의 COX-2 생성량 억제효과를 나타낸 그래프이고,

<74> 도 3은 본 발명에 따른 실시예 1, 비교예 1 내지 3에서 제조된 동결건조 분말의 마우스 대식세포에서의 프로스타글란딘 2 생성량 억제효과를 나타낸 그래프이고,

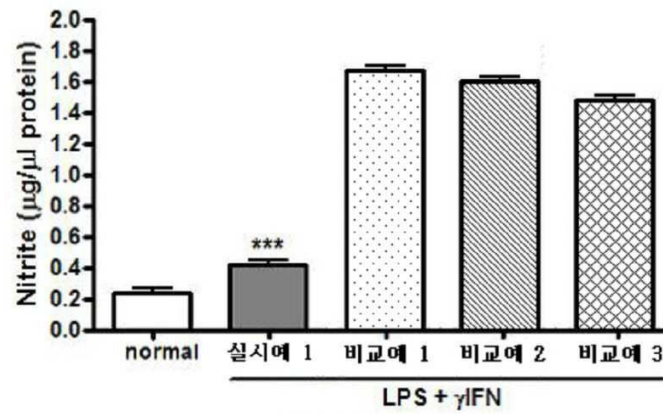
<75> 도 4는 본 발명에 따른 실시예 1, 비교예 1 내지 3에서 제조된 동결건조 분말의 마우스 대식세포에서의 염증성

사이토카인과 케모카인 억제효과를 나타낸 그래프로서,

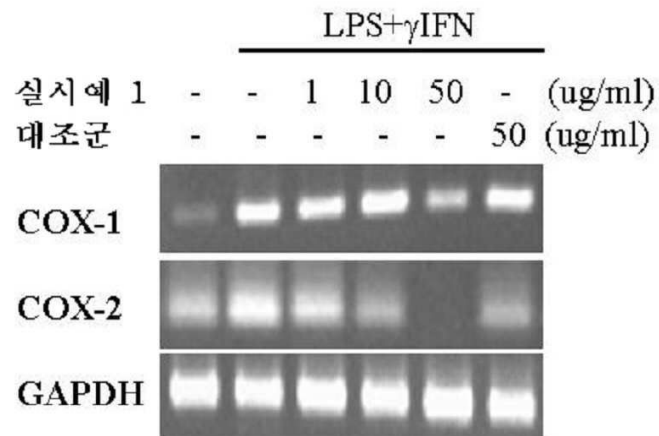
- <76> 도 4a는 MCP-1의 생성억제 효과를 나타낸 그래프,
 <77> 도 4b는 IL-8의 생성억제효과를 나타낸 그래프,
 <78> 도 4c는 IL-1 β 의 생성억제효과를 나타낸 그래프 및
 <79> 도 4d는 IL-6의 생성억제효과를 나타낸 그래프이다.

도면

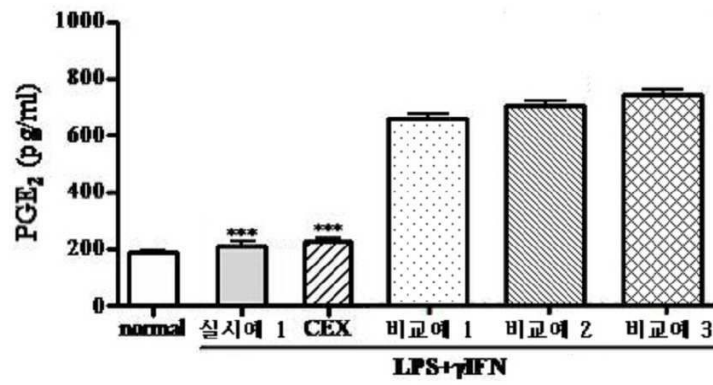
도면1



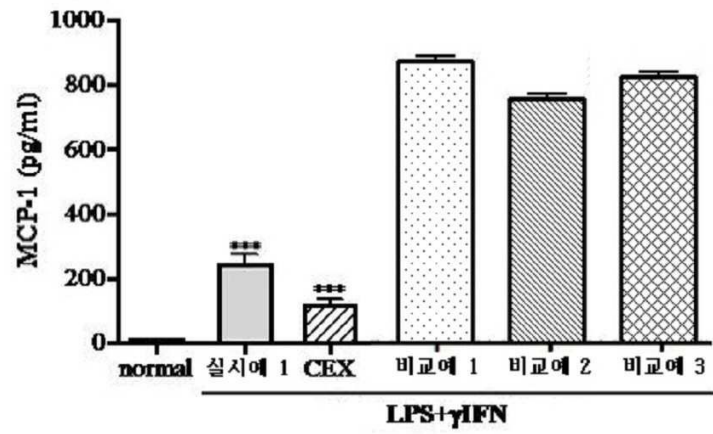
도면2



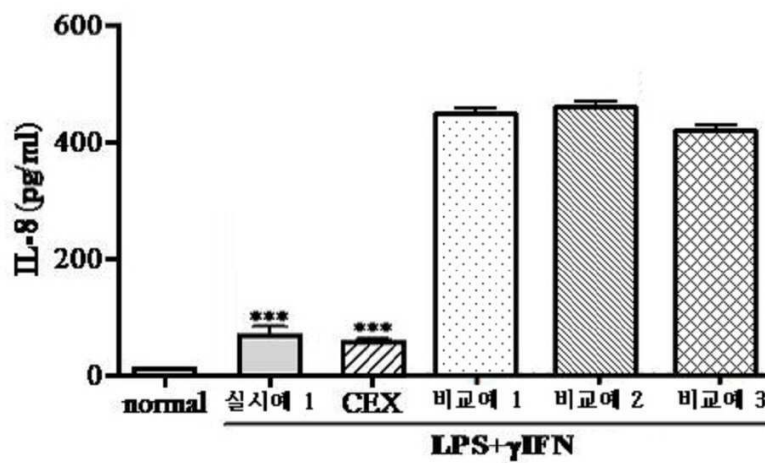
도면3



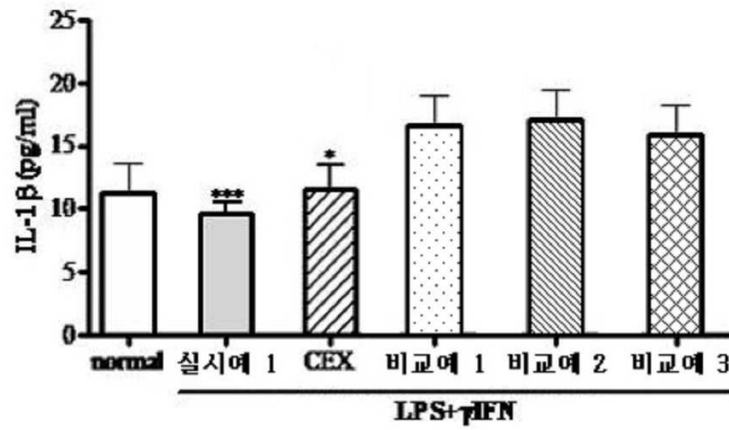
도면4a



도면4b



도면4c



도면4d

