(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0119922
(43) 공개일자 2010년11월12일

(51) Int. Cl.
A61K 31/716 (2006.01) *A61K 36/07* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0038812
(22) 출원일자 2009년05월04일
심사청구일자 2009년05월04일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
강원도
강원 춘천시 봉의동 15번지 강원도청
강원대학교산학협력단
강원 춘천시 효자동 192-1 강원대학로 42
(72) 발명자
음원식
강원 춘천시 후평2동 904번지 포스코더샵아파트 112동 802호
이병용
강원도 춘천시 석사동 대우아파트 102동 901호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

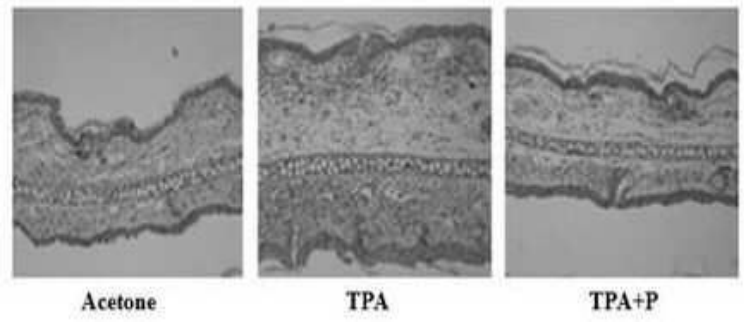
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 차신고버섯 추출 베타글루칸을 함유하는 항염증성 조성물

(57) 요 약

본 발명은 차신고버섯 유래 베타글루칸을 함유하는 항염증 조성물에 관한 것으로서, LPS-유도 산화질소와 사이클로옥시게나제-2에 대한 차신고버섯 유래 베타글루칸의 영향을 쥐 대식세포 Raw 264.7 세포에서 살펴보았고, 마우스에서 TPA-유도 귀 부종에 대한 영향을 살펴보았다. 차신고버섯에서 추출한 베타글루칸은 세포 내 LPS-유도 iNOS 및 COX-2 발현 수준을 현저히 억제하였고, 상기 베타글루칸을 국소적용한 경우 마우스의 TPA-유도 귀 부종이 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 상기 차신고버섯 유래 베타글루칸이 항염증 조성물로서 유용함을 제시한다.

대 표 도 - 도4a



(72) 발명자

최수영

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105-706

허장현

강원도 춘천시 석사동 현진 에버빌 2차 1001호

함헌주

강원도 홍천군 홍천읍 희망3리 토우 APT 2동 503호

이광재

강원도 춘천시 퇴계동 금호 APT 205-108

김경희

강원도 춘천시 후평동 동아아파트 105동 806호

박영학

강원도 춘천시 후평3동 석사주공APT 210동 208호

특허청구의 범위

청구항 1

차신고버섯에서 추출한 베타글루칸을 포함하는 항염증성 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 베타글루칸은 차신고버섯을 고압 열수로 추출한 가압열수추출물 또는 차신고버섯 가압열수추출물 원심분리 상층액에 에탄올을 처리하여 원심분리로 얻어지는 펠렛층임을 특징으로 하는 항염증성 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 베타글루칸은 상기 펠렛층을 알파-아밀라제, 프로테아제 및 아밀로글루코시다제로 처리하여 얻어지는 분획인 것을 특징으로 하는 항염증성 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 차신고버섯은 차신고버섯 자실체임을 특징으로 하는 항염증성 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 차신고버섯 추출물은 0.001~10%(w/v) 포함되며, 약제학적으로 가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 항염증성 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 차신고버섯 추출 베타글루칸을 함유하는 항염증 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증의 진행은 단핵세포와 대식세포의 활성화를 포함하며, 이는 산화질소와 같은 염증성 매개자를 분비한다. 유도성 산화질소 합성효소(이하 "iNOS"와 혼용함)는 산화질소를 생성하는 세 가지 효소 중 하나이며, 산화질소는 많은 생리학적 사건을 매개한다. 유도성 산화질소 합성효소의 과잉생성이 염증 및 신경질환과 같은 다양한 인간 질병과 관련 있다는 것이 널리 알려져 있다(Yu, H. H. et al., (2008) *J. Neurosci. Res.* **86**, 2963-2972, Colton, C. A. et al.,(2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 12867-12872, Dawson, V. L. et al., (1996) *J. Neurosci.* **16**, 2479-2487, Good, P. F. et al.,(1998)*J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**, 338-342, Huang, Z. et al., (1994) *Science* **265**, 1883-1885, Iadecola, C. et al., (1997) *J. Neurosci.* **17**, 9157-9164, Martin, L. J. et al., (2007) *J. Comp. Neurol.* **500**, 20-46, Amin, A. R. et al.,(1999) *Curr. Opin. Rheumatol.* **11**, 202-209).

[0003] 프로스타글란딘(PGs)은 사이클로옥시게나제(COXs)에 의한 아라키돈산 대사에서 유래하는 강력한 친염증성 매개

자이고, 염증성 및 알러지 면역반응을 포함하는 병리학적 상황을 조정하는데 중요한 기능을 수행한다(Tilley, S. L. et al.,(2001) *J. Clin. Invest.* **107**, 191-195). 두 종류 아이소폼의 사이클로옥시게나제(이하 "COX"와 혼용함) 효소가 잘 알려져 있다. COX-1은 지속적으로 발현되고 세포의 정상 생리 기능을 유지하는데 중요한 기능을 수행한다. COX-2는 염증 반응 동안 상토카인을 포함하는 몇몇 촉진자에 의해 현저히 유도된다(Smith, W. L. and Dewit, D. L. (1990) *Adv. Immunol.* **62**, 167-215, Carey, M. A. et al., (2003) *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* **69**, 157-162, Vancheri, C. et al., (2004) *Trends Immunol.* **25**, 40-46).

[0004] 리포다당류(Lipopolysaccharide, 이하 "LPS"와 혼용함)는 엔도톡신의 주요 요소이고, 친수성 헤테로다당류에 공유결합되는 인당지질(phosphoglycolipid)에 의해 형성된다(Rietschel, E. T. et al., (1994) *FASEB J.* **8**, 217-225). 리포다당류는 대식세포의 증식을 저지하며, 대식세포가 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 친염증성 인자를 생산하도록 활성화한다(Adams, D. O. and Hamilton, T. A. (1984) *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 283-318, Morrison, D. C. and Ryan, J. L. (1987) *Annu. Rev. Med.* **38**, 417-432).

[0005] 종래 연구들은 12-O-테트라데카노일포볼 13-아세트산 (tetradecanoylphobol 13-acetate, 이하 "TPA"와 혼용함)이 마우스 피부 종양발생을 촉진하며, 그것이 염증반응과 유사함을 밝혀내었다. 이러한 반응은 부종 및 비대증 발생, 친염증성 사이토카인의 유도, 활성산소종, COX-2 및 iNOS 발현을 포함한다. 그리하여, COX-2와 iNOS 발현 유도를 억제하는 것이 염증 및 종양을 포함하는 피부질환을 억제하는 새로운 패러다임이다(DiGiovanni, J. (1992)*Pharmacol. Ther.* **54**, 63-128, Slaga, T. J. et al.,(1982) *J. Cell Biochem.* **18**, 99-119, Furstenberger, G. et al., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7722-7726, Furstenberger, G. et al., (1983) *Science* **220**, 89-91, Song, H. Y. et al., (2008) *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1348-1357, Chung, W. Y. et al.,(2007)*Carcinogenesis* **28**, 1224-1231, Ho, Y. S. et al., (2007) *Biochem. Pharmacol.* **73**, 1786-1795, Surh, Y. J. et al., (2001) *Mutat. Res.* **480-481**, 243-268).

[0006] 버섯은 일반적으로 의학적 가능성을 지닌 천연물로 알려져 있고, 중국을 비롯한 동양권 국가에서 수백년간 종양을 비롯한 다양한 질환 치료에 널리 사용되어 왔다. 버섯은 그 종류에 따라 항종양, 항균 및 항바이러스 활성이 있다고 보고된다(Yoon, S. Y. et al., (1994) *Arch Pharm. Res.* **17**, 438-442, Wang, S. Y. et al., (1997) *Int. J. Cancer* **70**, 699-705). 몇몇 버섯의 다당류 분획이 항암 효과에 관여한다는 시험관 내 연구와 생체 연구가 확립되어 있다.

[0007] 또한, 다른 연구들은 항암 및 항염증효과의 분자 기작이 COX-2 및 iNOS 발현을 억제하는 것임을 보여준다.

[0008] 버섯은 오랫동안 질병치료제뿐만 아니라 질병을 예방할 수 있는 건강보조식품으로 이용되어 왔으며 면역증강, 항암 및 노화방지 효과가 있다는 것이 다양한 연구를 통하여 입증되고 있다.

[0009] 버섯의 기능성에 대한 연구는 버섯 내 단백다당체(glycoprotein) 성분에 집중되어 연구되고 있으며(박 등 1998, Korean J. Food Sci. Technol, 30(5) : 1236-1242 ; 진 등 1999, 약학회지, 43(5): 635-641 ;정 등 2002, 대한민국특허 10-0340663; 조 등 2004, 한국미생물학회지, 40(3) : 217-220), 현재까지 연구된 바에 의하면 이러한 버섯의 단백다당체 성분들은 다양한 항암 및 항산화활성이 있는 것으로 보고되었고(Lin, J. Y. and Chou, T. B. 1984, J. Biochem. 6 : 35-40 ; Kawagishi, H. *et. al.*, 1990, Biochim. Biophys. Acta, 1034 : 247-252 ; Yu, L. G. *et. al.*, 1993, Cancer Res. 53 : 4627-4632 ; Ye, S-F *et. al.*, 2003, Life Sciences. 74 : 593-602), 다양한 버섯으로부터 항암활성을 갖는 단백다당체들이 밝혀지고 있으며 그 중 특히 표고버섯에서 추출한 레티난(Letinan), 치마버섯의 쉬조필란(Schizophyllan), 구름버섯의 크레스틴(PSK) 등은 활성이 우수하여 항암 보조제로서 임상시험에 이용되고 있다(Zhu D. 1987, Abstr. Chin. Med. 1:251-286; Hayakawa K. *et. al.*, 1993, Anticancer Res. 13: 1815-1820; Nakajato H. *et. al.*, 1994, Cancer. Lancet 343:1122-1226; Hobbs C. 1995, Fenichel RL,Chirigos MA (eds) Immunomodulation agents and their mechanisms. Dekker, New York, 409-436).

[0010] 차신고버섯(*Agrocybe chaxingu*)은 차(茶)나무 고사목에서 발생하는 목재부후균으로서 주름버섯목-소똥버섯과-볏짚버섯(*Agrocybe*) 속에 속하며, 이뇨작용 및 비장과 위를 돕고 눈을 밝게 하는 등 의약적 가치가 높은 것으로 알려져 있다.

[0011] 차신고버섯은 아그로사이브(*Agrocybe*) 속에 속하는 버섯 중 국내에 많이 알려진 버들송이버섯(*Agrocybe*

aegerita)과 유전적으로 비교적 가까우며(Gonzalez, P. and J. Labarre, 1998, Appl. Environ. Microbiol., 64(11) : 4149-4160) 버들송이버섯의 기능성 대해서는 여러 차례 보고된바 있으나(Hyun, J. W. *et. al.*, 1996, Arch. Pharm. Res., 19(3) : 207-212 ; Kim, B. K. *et. al.*, 1997, Arch. Pharm. Res., 20(2) : 128-137 ; 김 등, 2000, 한국균학회지, 36(1) : 64-68 ; 김 등, 한국균학회지, 30(2):124-130), 차신고버섯의 기능성에 대하여는 보고되지 않았다.

[0012] 일본특허공개 2006-025725(2006.02.02.)“다용도용 일식 소스 및 그 제조방법”은 차신고버섯 추출물, 일식 맛간장, 다시마, 가다랭이 등으로 제조된 일식 소스를 개시한다. 또한, 중국특허공개 제1349767호(2002.05.22.) "차신고버섯을 이용한 풍미 치킨 요리법”은 치킨 요리의 풍미를 더하기 위한 용도로 차신고버섯을 이용하였음을 개시한다.

[0013] 이와 같이, 차신고버섯은 요리 용도나 일부 민간 요법의 용도로만 사용되어 왔을 뿐 항염증 효능에 대해서는 전혀 알려지지 않았다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0014] 본 발명은 인체에 안전하고 염증을 억제하는 천연물 유래 항염증 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 항염증 활성이 알려져 있지 않은 차신고버섯에서 다당류인 베타글루칸을 추출한 후 암세포주에 대한 차신고버섯 베타글루칸의 항염증 활성을 실험하여 우수한 항염증 활성을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0016] 본 발명자들은 차신고버섯 유래 베타글루칸의 LPS-유도된 쥐 대식세포 Raw 264.7 세포에서 산화질소와 COX-2 발현을 억제하는 효과와 TPA-유도된 마우스 귀 부종을 억제하는 효과를 시험하였다. 결과는 상기 베타글루칸이 LPS- 및/또는 TPA-유도 세포 손상을 시험관 내에서 그리고 생체 내에서 보호함을 보여준다.

효 과

[0017] 본 발명의 차신고버섯에서 추출한 다당류는 세포 내 LPS-유도 iNOS(induced Nitrogen Oxide Synthase) 및 COX-2 발현 수준을 심각하게 억제하였고, 상기 다당류를 국소적용한 경우 마우스의 TPA-유도 귀 부종이 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 상기 차신고버섯 유래 다당류가 항염증 조성물로서 유용함을 제시한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 차신고버섯 추출 베타글루칸을 포함하는 항염증성 조성물을 제공한다.

[0019] 상기에서 차신고버섯 추출 베타글루칸은 자실체로부터 추출하는 것이 바람직하다.

[0020] 상기에서 항염증성 조성물은 차신고버섯을 고압 열수로 추출한 가압열수추출물을 포함하거나 차신고버섯 가압열수추출물 원심분리 상층액에 에탄올을 처리하여 원심분리로 얻어진 펠렛층을 0.001~10%(w/v) 포함하는 것이 바람직하다.

[0021] 또한, 상기 항염증성 조성물은 더욱 바람직하게는 상기 펠렛층을 알파-아밀라제 처리, 프로테아제 처리, 아밀로글루코시다제 처리하여 얻어지는 베타글루칸 분획인 것을 특징으로 한다.

[0022] 이하 본 발명에 대하여 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0023] 본 발명은 차신고버섯 추출 베타글루칸을 포함하는 항염증성 조성물에 관한 것이다.

[0024] 본 발명자들은 차신고버섯 자실체를 열수, 유기용매 등으로 추출한 베타글루칸을 배양된 피부세포에 적용하여 항염증 효과를 살펴본 결과, 항염증 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 천연물 유래 차신고버섯 추출물은 요리에 많이 사용되고 민간요법 용도로도 사용되는 등 독성이 거의 없으므로 그 적용이 더욱 광범위하다.

[0025] 본 발명에서 “항염증”이라는 용어는 염증의 발생을 억제하거나 염증을 완화시키는 능력을 의미한다. 차신고

버섯 추출 베타글루칸을 투여할 때 피부세포주에서 염증이 완화되는 것을 확인할 수 있었다.

[0026] 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하고 인체 또는 동물용으로 제형화될 수 있다.

[0027] 경구 투여용의 약제학적 조성물은 예컨대 캅셀제 또는 정제, 산제 또는 과립제, 용제, 시럽 또는 현탁제를 포함한다.

[0028] 정제 또는 경질 젤라틴 캅셀제에 적합한 부형제로는 락토스, 옥수수 전분 또는 이의 유도체, 스테아르산 또는 이의 염이 있다. 연질 젤라틴 캅셀제에 사용하기 적합한 부형제로는 예를 들어, 식물성 오일, 왁스, 지방, 반-고형물 또는 액상 폴리올 등이 있다. 용제 및 시럽제를 제조하기 위해 사용될 수 있는 부형제로는 예를 들어, 물, 폴리올 및 당이 있다. 현탁제를 제조하기 위하여 오일(예: 식물성 오일)을 사용하여 수중유 또는 유중수 현탁제를 제공할 수 있다. 경피 투여용 약제학적 조성물은 장시간 동안 수용자의 표피와 친밀하게 접촉될 수 있도록 하기 위한 별개의 패치로서 제시될 수 있다.

[0029] 비경구 투여용 약제학적 조성물에는 산화방지제, 완충제, 정균제(bacteriostat) 및 수용자의 혈액과 실질적으로 등장성인 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 주사 용제; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁제가 포함된다. 주사용 용제에 사용될 수 있는 부형제에는 예컨대 물, 알코올, 폴리올, 글리세린 및 식물성 오일이 포함된다. 이러한 조성물은 단위-용량(1회분) 또는 다중-용량(수 회분) 용기, 예를 들면, 밀봉된 앰플 및 바이알에 저장할 수 있고, 사용 직전에 멸균성 액상 담체, 예컨대 주사용수를 부가하기만 하여 사용할 수 있도록 동결-건조 조건 하에 저장할 수 있다.

[0030] 즉석 주사 용제 및 현탁제는 멸균성 산제, 과립제 및 정제로부터 제조할 수 있다.

[0031] 본 발명 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 상기 나열한 투여방법으로만 제한되지는 않는다. 또한 제약 조성물은 활성 물질을 표적 세포로 이동시킬 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 여기에서 "약제학적으로 유효한 양"이라 함은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 약제학적으로 유효한 양은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0033] 본 발명 조성물을 포함하는 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구 방식, 비경구 방식 즉, 피하 투여, 근육 투여 또는 국소적용할 수 있으며, 용량은 일일 투여량 0.001㎍~10㎎/㎏의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다.

[0034] 본 발명은 차신고버섯으로부터 추출한 항염증 활성을 가지는 조성물에 관한 것으로, 차신고버섯 추출물은 항염증 활성이 우수하여 염증반응 특히 피부염증반응의 예방 및 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 항염증성 조성물은 차신고버섯 추출물을 포함하는 것으로, 차신고버섯을 열수 및 유기용매로 추출 분획하여 얻은 것이다.

[0036] 이하 본 발명을 다음 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 좀더 상세하게 설명하기 위한 것으로서 본 발명의 권리범위가 실시예의 기재에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0037] **<재료>**

[0038] 우태혈청(FBS), DMEM 및 페니실린-스트렙토마이신 항생제는 Gibco BRL(Grand Island, USA)에서 구입하였다. COX-2, iNOS 및 액틴에 대한 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology company(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 다른 시약들은 1등급 제품을 사용하였다.

[0039] 실험용 차신고버섯 시료는 강원도 농업기술원 농산물이용시험장에서 육종된 차신고버섯(*Agrocybe chaxingu*) 자실체를 분양받아 50℃에서 열풍건조한 후 분쇄하여 보존하면서 실험에 사용하였다.

[0040] **<실시예 1-1: 가압열수추출물 제조>**

[0041] 분쇄한 차신고버섯 100g에 증류수 2000㎖를 가하여 121℃에서 2시간 동안 추출한 후 가압열수추출물을 6,000rpm에서 40분간 원심분리하였으며, 상층액에 4배(v/v)의 95% 에탄올을 첨가하여 4℃에서 24시간 동안 정치한 후 6,000rpm에서 40분간 원심분리하여 펠렛층을 회수하였다. 회수된 펠렛층을 *d*-H_2O로 충분히 용해시킨 다음 동결건조기를 이용하여 건조시키고 동결 건조된 가압열수추출물 시료를 냉장 암조건에 보관하며 사용하였다.

[0042] **<실시예 1-2: α-아밀라제 처리>**

[0043] 추출물에 포함된 α-1,4 결합의 글루칸을 분해하기 위하여 상기 가압열수추출물을 20mM 아세트산나트륨 완충액(pH 6.0) 5㎖에 녹인 후 α-아밀라제를 5U로 처리하여 55℃에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 4배(v/v)의 에탄올을 첨가하여 침전시킨 후 4℃ 6,500rpm으로 30분간 원심분리하여 침전물을 얻었다.

[0044] **<실시예 1-3: 프로테아제 처리>**

[0045] 추출물 속에 포함된 단백질을 분해하여 제거하기 위하여 20mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 5㎖에 녹인 후 프로테아제를 2.8×10^{-2}U로 처리하여 37℃에서 10분간 반응시켰다. 그 후 10% 삼염화아세트산 5㎖를 넣어 단백질을 침전시킨 후 6,500rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻었다.

[0046] **<실시예 1-4: 아밀로글루코시다제 처리>**

[0047] 추출물에 포함된 α-1,4 혹은 α-1,6 결합의 포도당을 제거하기 위해 20 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 4.3) 5㎖에 녹인 후 아밀로글루코시다제를 1×10^{-4}U로 처리하여 55℃에서 10분간 반응시킨 후, 4배(v/v)의 에탄올을 첨가하여 6,500rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻었다.

[0048] **<실시예 1-5: 한외여과법을 통한 분리>**

[0049] 동결 건조된 가압열수추출물을 이용하여 증류수에 재용해한 후 분자량에 따른 유용물질 분포 특성을 알아보기 위해 표 1과 같이 한외여과법(Ultra Filtration System)을 사용하였으며, 분자량별로 각각의 시료를 분리하였다.

표 1

[0050]

한외여과	멤브레인
흐름 농축기(Flow concentrators)	10,000 MWCO[a] PES(polyethersulfone) 3,000 MWCO PES(polyethersulfone) 1,000 MWCO PES(polyethersulfone)
스핀 농축기(Spin concentrators)	0.2 mm PES(polyethersulfone)

[a] molecular weight cut off,

[0051] **<실시예 1-6: 분리 물질의 성분 분석>**

[0052] 분리물질의 일성분은 AOAC에 준하여 분석하였다. 수분함량은 105℃ 상압 가열건조법으로 측정ㅇ하였으며, 단백질 함량은 젤달법으로 분석하였다. 상기와 같은 방법으로 분리된 물질의 베타글루칸 함량은 메가자임 베타글루칸 어세이 키트(Megazyme Pty. Ltd., Australia)를 사용하여 측정하였다.

[0053] **<실시예 1-7: 분리 물질의 분자량 결정>**

[0054] 상기와 같은 방법으로 분리된 물질의 분자량을 결정하기 위해 겔 여과 크로마토그래피를 실시하였다. Ø 15×230㎜ 유리 컬럼(Bio-rad, USA)에 세파로즈 CL-6B(분자량 범위:10,000 - 100,000)을 충진하였으며, 시료 1㎖을 로딩한 후 0.8㎖/min의 유속으로 전개하였으며, 자동 분획 수집기(auto fraction collector)를 이용하여 5㎖씩 분획화하였다. 또한 상기 조건과 같게 하여 분리된 다당류의 체류시간을 표준 덱스트란의 체류시간과 비교하여 분자량을 계산하였다(도 5).

[0055] **<실시예 2: 세포 배양과 MTT 분석>**

[0056] 쥐 대식세포 Raw 264.7 세포는 20mM HEPES/NaOH(pH 7.4), 5mM $NaHCO_3$, 10% 우태혈청(FBS) 및 항생제(100㎍/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린을 함유한 DMEM 배지에서 37℃, 95% 공기와 5% CO_2의 습한 분위기에서 배양하였다.

[0057] 차신고버섯 다당류의 생물학적 활성은 LPS(100ng/ml)로 12시간 동안 처리한 Raw 264.7 세포의 생존율을 측정함으로써 분석하였다. 세포는 6-웰 플레이트에 70% 정도 될 때까지 배양하였다. 세포는 먼저 다당류(10-100㎍)로 한 시간 전처리한 후 LPS 처리하였다. 세포 생존율은 MTT{3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide}로 염색하여 분석하였다.

[0058] **<실시예 3: 산화질소 생산 측정>**

[0059] Raw 264.7 쥐 대식세포를 24-웰 플레이트에서 70%가 되도록 12시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 다당류(10-100㎍)로 한 시간 동안 전처리한 다음 LPS(100ng/ml)로 12시간 동안 처리하고 배양배지를 거두었다. 산화질소 생산정도는 산화질소 산화생성물인 아질산염(nitrite)을 측정하여 분석하였다(34, 35). 간단히 설명하면, 세포 배양배지 100㎕를 같은 부피의 Griess 시약(1% 설파닐아마이드를 함유한 5% 인산 및 0.1% 나프틸에틸렌다이아민 다이하이드로클로라이드) 내에서 실온 조건으로 10분간 배양한 후 540nm 흡광도를 마이크로플레이트 판독기로 측정하였다. $NaNO_2$를 표준용액으로 사용하였다.

[0060] **<실시예 4: 웨스턴 블랏 분석>**

[0061] Raw 264.7 세포를 4℃, 30분간 용균완충액으로 처리하여 용균액을 얻었다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 측정 키트로 측정하였다. 단백질(40㎍)을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel) 상에 전개한 다음 나이트로셀룰로스 막으로 전이하였다. 막은 0.05% 트윈-20을 함유한 트리스 완충액 생리식염수(TBS; 20mM Tris, 0.2M NaCl, pH 7.5) (TBST)에 녹인 5% 탈지유로 두 시간 블로킹한 다음 한 시간 동안 실온에서 TBST에 용해시킨 항-COX-2, 항-iNOS, 및 항 β-액틴 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:500 희석)로 배양하였다. 세척 후 막은 호스래디쉬 퍼옥시다제가 결합된 2차 항체(TBST에 1:10000 희석)로 한 시간 동안 배양하였다. 막은 발광화학물질로 배양한 후 Hyperfilm ECL(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)에 노출하였다.

[0062] **<실시예 5: COX-2와 iNOS 발현 측정>**

[0063] Raw 264.7 쥐 대식세포를 24-웰 플레이트에서 70%가 되도록 12시간 동안 배양하였다. 세포를 한 시간 동안 다당류(10-50㎍)로 전처리 배양한 후 LPS (100ng/ml)로 12시간 동안 배양하고, 배지를 수확하였다. COX-2와 iNOS 단백질 수준을 항-COX-2 및 항-iNOS 항체를 이용하여 각각 웨스턴 블라팅하였다.

[0064] **<실시예 6: RT-PCR 분석>**

[0065] Raw 264.7 쥐 대식세포에서 분리한 총RNA를 트리졸(Trizol) 시약 키트(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)로

제조자의 지시에 따라 분리하였다(36). RNA(2㎍)는 10,000U의 역전사효소와 0.5㎍/㎕ 올리고-(dT) 개시체를 이용하여 가역적으로 전사되었다. cDNA 분획의 PCR 증폭은 아래와 같은 센스 개시체와 안티센스 개시체를 이용하여 수행하였다:

[0066] COX-2 안티센스 개시체, 5'-TGGACGAGGTTTTT CCACCAG-3';

[0067] COX-2 센스 개시체, 5'-AAAGGCCTCCATTGACCAGA-3';

[0068] 베타액틴 안티센스 개시체, 5'-GGACAGTGAGGCCAGGATGG-3';

[0069] 베타액틴 센스 개시체, 5'-AGTGTGACGTTGACATCCGTAA AGA-3';

[0070] iNOS 안티센스 개시체, 5'-CTGTCAGAGCCTCGTGGCTTT-3';

[0071] iNOS 센스 개시체, 5'-ATGGCT CGGGATGTGGCTAC-3'.

[0072] PCR은 50㎕의 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 25mM $MgCl_2$, 10mM dNTP, 100U의 *Taq* DNA 중합효소 및 0.1μM의 각 개시체를 70℃로 15분간 가열하여 수행하였다. PCR 산물은 1% 아가로즈 젤 상에 전개하여 EtBr 처리한 것을 UV 광으로 관찰하였다.

[0073] **<실시예 7: TPA-유도 피부 염증>**

[0074] 6-8주령 수컷 ICR 마우스를 한림대 실험동물센터에서 입수하였다. 동물들은 일정 온도 (23℃)와 적당한 상대습도(60%)로 12시간 광:12시간 어둠 사이클, 그리고 먹이와 물은 자유롭게 섭취할 수 있는 조건에서 사육하였다. 본 발명에 사용한 동물은 "실험동물 보호규칙" (NIH Publication No. 86-23)에 따라 사육하였다.

[0075] 피부 염증은 TPA를 국소적용하여 마우스의 우측 귀에 유도되었다. 다섯 마리를 한 그룹으로 하였다. 20㎕ 아세톤에 TPA(1.0㎍)를 녹여 마우스 귀의 안쪽과 바깥쪽 표면에 매 24시간마다 이틀간 도포하였다. 다당류(300㎍)는 TPA 처리 한 시간 후 마우스 귀에 국소 도포하였다. 둘쨋날, TPA를 도포하고 한 시간 후 다당류를 같은 부위에 도포하였다. 다당류를 마지막으로 도포하고 24시간 경과 후 귀 피부 두께를 디지털 두께 측정기(Mitutoyo Corporation, 일본)로 측정하였다. 마우스의 귀는 펀치로 얻고(지름 5mm, Kai Industries Co. Ltd., Gifu, 일본) 무게를 측정하였다.

[0076] **<실시예 8: 조직학적 분석>**

[0077] 귀 생체검사는 귀를 10% (v/v) 완충 포르말린으로 고정하고, 파라핀에 삽입한 후 4㎛의 절편으로 제조하고 나서 헤마토자일린(hematoxyline)과 에오신으로 염색하였다. 염색된 조직 절편을 표준 명시야상 현미경(standard bright-field optics, Zeiss, AXIOIMAGER M1, Gottingen, Germany)을 이용하여 염증세포의 침윤을 분석 시험하였다.

[0078] **<통계 분석>**

[0079] 결과는 최소 3회의 독립적인 실험의 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 값은 일방(one-way) ANOVA와 이후의 GraphPad Prism 4.0 소프트웨어(GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA)를 이용한 던칸의 다중 범위 테스트(Duncan's multiple range tests)를 통하여 평가되었다. 차이는 $P<0.05$일 때 유의하다.

[0080] **<결과 1: 차신고버섯 추출물의 추출율 및 조성>**

[0081] 상기 실시예 1-6에 의하여 분석한 결과는 아래 표 2와 같다. 표 2로부터 상기 실시예 1의 정제 과정을 거치면서 베타글루칸의 순도 및 함량이 증가한 것을 확인하였다.

[0082]

	조추출물	정제 화합물
추출율(중량%)	7.34	4.23

조성(중량%)	베타글루칸	40.4	87.5
	단백질	23.8	9.24
	수분	6.8	3.21

[0083] 상기 실시예 1-7의 분석 결과는 표 6에 나타내었다.

[0084] **<결과 2: 세포생존율과 LPS-유도 산화질소 생산에 대한 차신고버섯 추출 베타글루칸의 효과>**

[0085] 식용 버섯인 차신고버섯(*Agrocybe chaxingu*) 베타글루칸의 항염 효과에 대해서는 알려져 있지 않다(도 1a). 그리하여 우리는 시험관 내에서 및 생체에서 차신고버섯 추출 베타글루칸의 항염효과에 대하여 실험하였다.

[0086] 대식세포는 염증의 개시와 유지에 중요한 역할을 수행한다. 산화질소의 농도는 염증 정도와 세포 생존율을 측정하는데 중요하다. 산화질소의 수준이 염증 정도 및 세포 생존율을 다루는 데 중요하기 때문에, 본 발명자들은 산화질소 발현 및 세포생존율을 억제하는 다당류의 효과를 조사하였다. 다당류가 Raw 264.7 세포에 대해 세포독성이 있는지를 결정하기 위하여, 세포는 다양한 농도(10-100㎍/ml)의 다당류로 처리하고 12시간 동안 배양하였다. 도 1b와 같이, 차신고버섯 추출 베타글루칸은 다양한 농도에서 세포생존율에 영향을 미치지 않았다. 산화질소가 많은 질병의 병리생리학에서 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다. 산화질소 생성에 대한 차신고버섯 추출 베타글루칸의 효과를 알아보기 위하여 Raw 264.7 세포를 리포다당(LPS, 100ng/ml)과 함께 12시간 동안 배양하였다. 이때 한 그룹은 다양한 농도(10-100㎍/ml)의 차신고버섯 추출 베타글루칸이 존재하는 상태로 배양하였고, 다른 그룹은 차신고버섯 추출 베타글루칸을 가하지 않은 상태에서 배양하였다. 세포배양 배지를 수거하여 아질산 수준을 결정하였다. 차신고버섯 추출 베타글루칸은 농도 의존적으로 산화질소 생성을 감소시켰다(도 1c).

[0087] **<결과 3: Raw 264.7 세포에서 리포다당-유도 iNOS 및 COX-2 발현 수준에 대한 차신고버섯 추출 베타글루칸의 영향>**

[0088] 리포다당류는 주요 내재독소이고, 대식세포 증식을 억제하고 친염증성 인자를 활성화하도록 하여 면역반응에서 중요한 기능을 수행한다. 그리하여, 본 발명자들은 리포다당 노출 하에서 COX-2 및 iNOS 발현 수준에 대한 다당류의 효과를 시험하였다. Raw 264.7 세포는 차신고버섯 추출 베타글루칸(10-50㎍/ml)이 있는 상태와 없는 상태에서 리포다당(100ng/ml)을 가하여 12시간 동안 배양하였다. 다당류는 리포다당-유도 COX-2 및 iNOS 단백질 발현 수준을 농도 의존적으로 억제하였다(도 2). 본 발명자들은 또한 리포다당-유도 세포에서 COX-2 및 iNOS mRNA 발현 수준에 대한 차신고버섯 추출 베타글루칸의 효과를 RT-PCR로 시험하였다. 도 3과 같이 차신고버섯 추출 베타글루칸은 리포다당-유도된 COX-2 및 iNOS mRNA 발현 수준을 농도 의존적으로 억제하였다. 이러한 결과는 차신고버섯 추출 베타글루칸에 의한 COX-2 및 iNOS mRNA 발현 수준 억제가 COX-2 및 산화질소 생성의 억제와 관련이 있음을 제시한다. 대식세포에서 생성되는 COX-2 및 산화질소가 염증성 질환에서 결정적인 역할을 수행한다는 것이 잘 알려져 있다. COX-2 및 iNOS 단백질은 피부 염증, 세포 증식 및 피부종양 촉진과 밀접한 관련이 있다고 보고되었고, 이것들은 친염증성 매개자에 의해 빠르게 유도될 수 있다. 또한, 다른 보고들은 COX-2 및 iNOS 발현 억제가 염증 완화 및 종양 억제에 중요하다는 것을 제시한다. 따라서, 차신고버섯 추출 베타글루칸에 의한 COX-2 및 iNOS 발현 저해는 염증 치료 및 질병 억제의 효과적인 새로운 전략이 될 수 있을 것이다.

[0089] **<결과 4: 마우스 TPA-유도 귀 부종에 대한 차신고버섯 추출 베타글루칸의 효과>**

[0090] TPA로 유도된 마우스 귀 부종을 염증 모델로 이용하였다. TPA를 마우스 귀에 국소적용하면 부종(edema), 상피비후(epidermal hyperplasia) 및 염증세포의 침윤과 같은 만성 피부염증이 유도되었다. TPA를 이틀에 걸쳐 두 번 마우스 귀에 적용하여 염증세포 침윤을 유도한 결과 귀 두께 및 귀 중량이 증가하였다. 도 4와 같이, 마우스 귀에 하루 한 번 이틀간 TPA를 적용하고 차신고버섯 추출 베타글루칸을 한 시간 동안 처리한 결과 TPA-유도되어 증가했던 귀 두께와 중량이 현저히 감소하였다. 또한, 차신고버섯 추출 베타글루칸은 피부에서 염증이 일어나는 초기단계의 하나인 단핵세포의 피부 침투를 억제하였다. 정확한 기작은 더 밝혀져야 하지만, 본 발명의 차신고

버섯 추출 베타글루칸은 TPA-유도 귀 부종을 효과적으로 억제하였다.

[0091] 요약하면, 차신고버섯(*Agrocybe chaxingu*) 추출 베타글루칸은 Raw 264.7 세포에서 LPS-유도 산화질소 및 COX-2 발현 수준과 세포 사멸을 효과적으로 억제하였다. 또한, 본 발명의 차신고버섯 추출 베타글루칸이 TPA-유도 피부 염증에 대한 보호효과를 나타냄으로써 국소 항염증 활성을 나타냄을 제시하였다. 정확한 기작은 더 밝혀져야 하지만, 본 발명의 차신고버섯 추출 베타글루칸은 피부종양과 같은 염증성 피부질환에 대해 국소 적용제로서 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0092] 도 1a는 차신고버섯 유래 다당류의 구조이다.

[0093] 도 1b는 세포생존율 및 LPS-유도 산화질소 생산에 대한 차신고버섯 추출 베타글루칸의 효과를 나타낸 것으로서, Raw 264.7 세포를 차신고버섯 추출 베타글루칸(10-100㎍/ml)과 함께 12시간 동안 배양한 후 세포생존율을 MTT를 이용하여 발색 측정하여 얻어내었다. Raw 264.7 세포는 먼저 차신고버섯 추출 베타글루칸(10-100㎍/ml)으로 한 시간 처리한 후 리포다당(LPS, 100ng/ml)로 12시간 처리하였다.

[0094] 도 1c는 아질산염 수준을 측정한 결과이다. 리포다당으로 자극한 세포 배양 배지에서 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. 각 막대는 5회 실험의 평균 ± 표준편차를 나타낸다. P는 본 발명의 차신고버섯 추출 베타글루칸을 나타낸다.

[0095] 도 2는 LPS-유도 iNOS (A) 및 COX-2 (B) 단백질 발현에 대한 차신고버섯 추출 베타글루칸의 효과를 나타낸다. Raw 264.7 세포는 먼저 차신고버섯 추출 베타글루칸으로 한 시간 동안 처리한 후 리포다당(LPS, 100ng/ml)으로 12시간 동안 처리하였다. 세포 용균액을 제조하여 웨스턴 블랏팅으로 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 수준을 측정하였다. P는 본 발명의 차신고버섯 추출 베타글루칸을 나타낸다.

[0096] 도 3은 Raw 264.7 세포에서 LPS-유도 iNOS (A) 및 COX-2 (B) mRNA 수준에 대한 차신고버섯 추출 베타글루칸의 억제효과를 나타낸다. 세포를 한 시간 동안 미리 차신고버섯 추출 베타글루칸으로 처리한 후 리포다당(LPS, 100ng/ml)으로 12시간 동안 처리하였다. 총 RNA를 추출하고 iNOS 및 COX-2 mRNA를 특정 개시체를 이용하여 RT-PCR 분석하였다. P는 본 발명의 차신고버섯 추출 베타글루칸을 나타낸다.

[0097] 도 4a, 4b, 4c는 TPA-유도 귀 부종에 대한 차신고버섯 추출 베타글루칸의 억제효과를 나타낸다. 마우스 귀를 하루에 한 번 이틀 동안 TPA(1㎍) 처리하였다. TPA 처리한 후 한 시간이 경과한 다음 차신고버섯 추출 베타글루칸을 국소적용하였다. 마우스는 마지막 차신고버섯 추출 베타글루칸 처리 후 24시간 경과한 때 희생되었다.

[0098] 도 4a는 TPA-유도 귀 부종에 대한 차신고버섯 추출 베타글루칸의 억제효과를 헤마토자일린 및 에오신 염색으로 분석하였다.

[0099] 도 4b는 귀 두께의 변화를 분석한 것이다. P는 본 발명의 차신고버섯 추출 베타글루칸을 나타낸다.

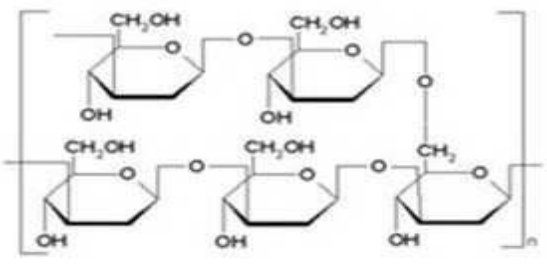
[0100] 도 4c는 귀 중량의 변화를 분석한 것이다. P는 본 발명의 차신고버섯 추출 베타글루칸을 나타낸다.

[0101] 도 5는 차신고버섯으로부터 베타글루칸을 추출하는 한 가지 방법을 도시한 것이다.

[0102] 도 6은 실시예 1-7에 의하여 각 분획의 분자량 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

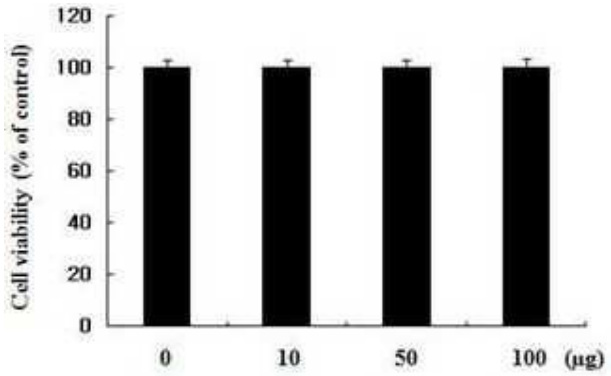
도면

도면1a

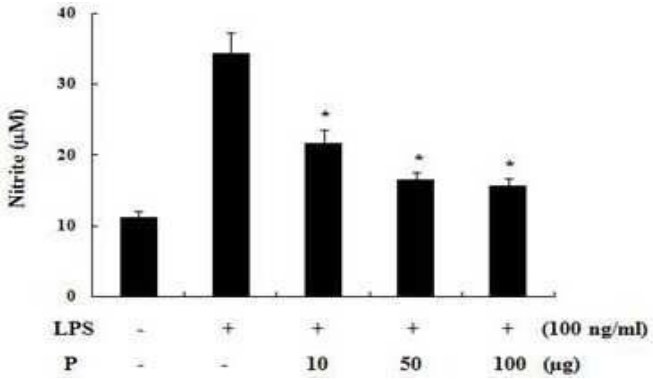


β-D-glucan

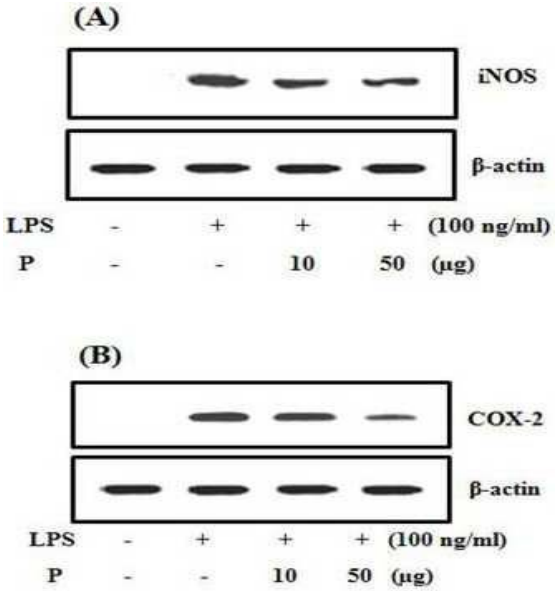
도면1b



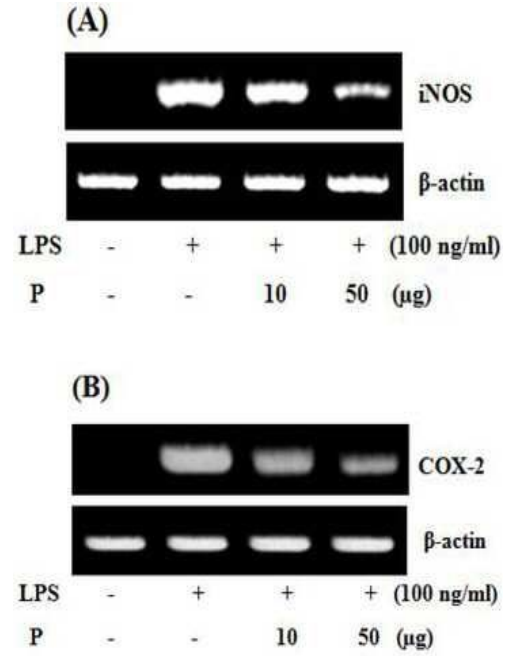
도면1c



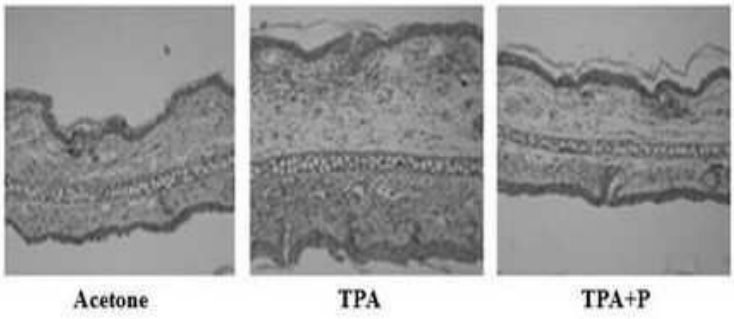
도면2



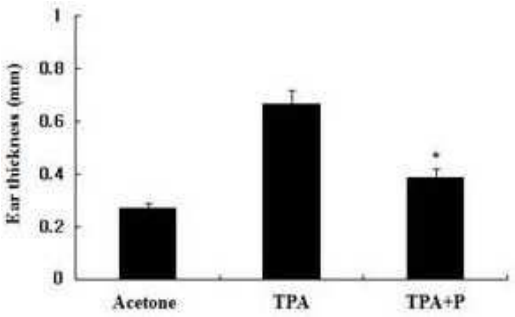
도면3



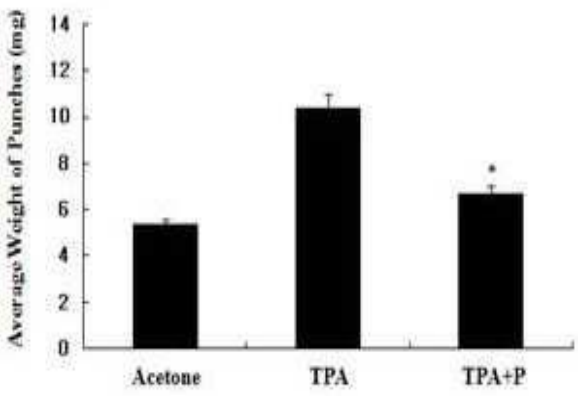
도면4a



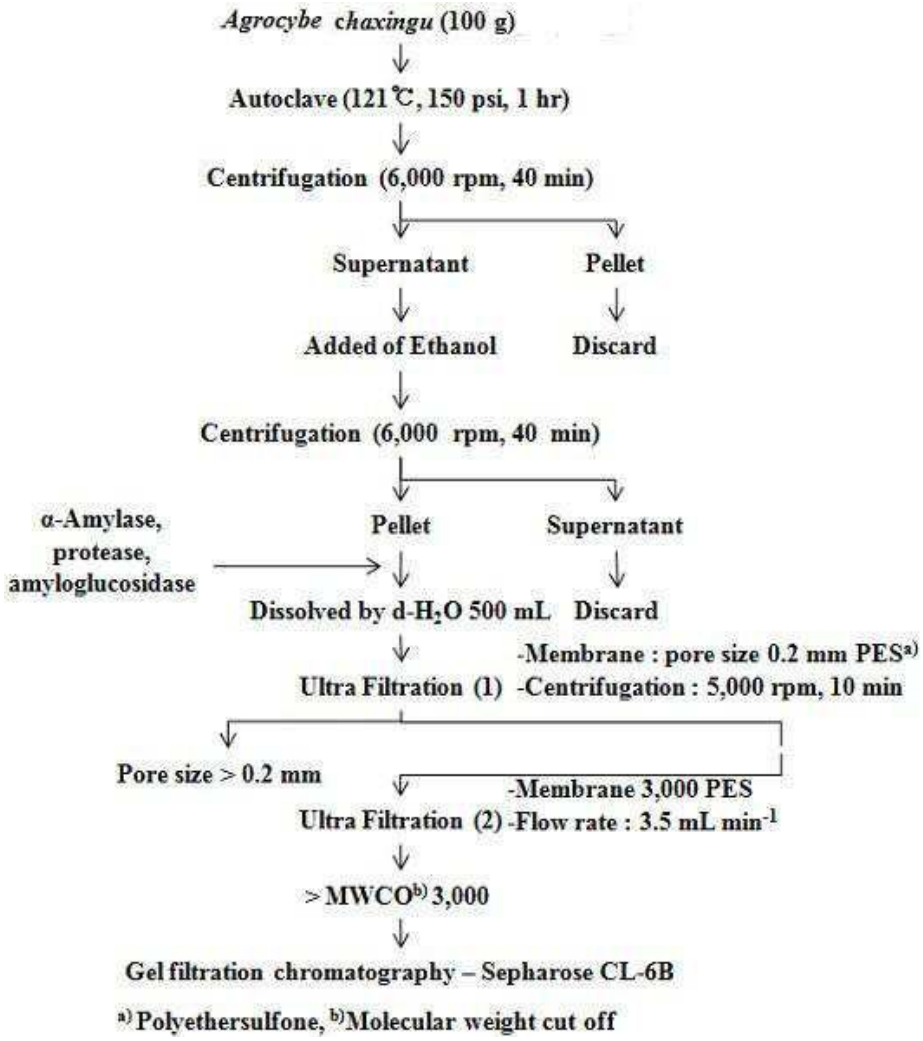
도면4b



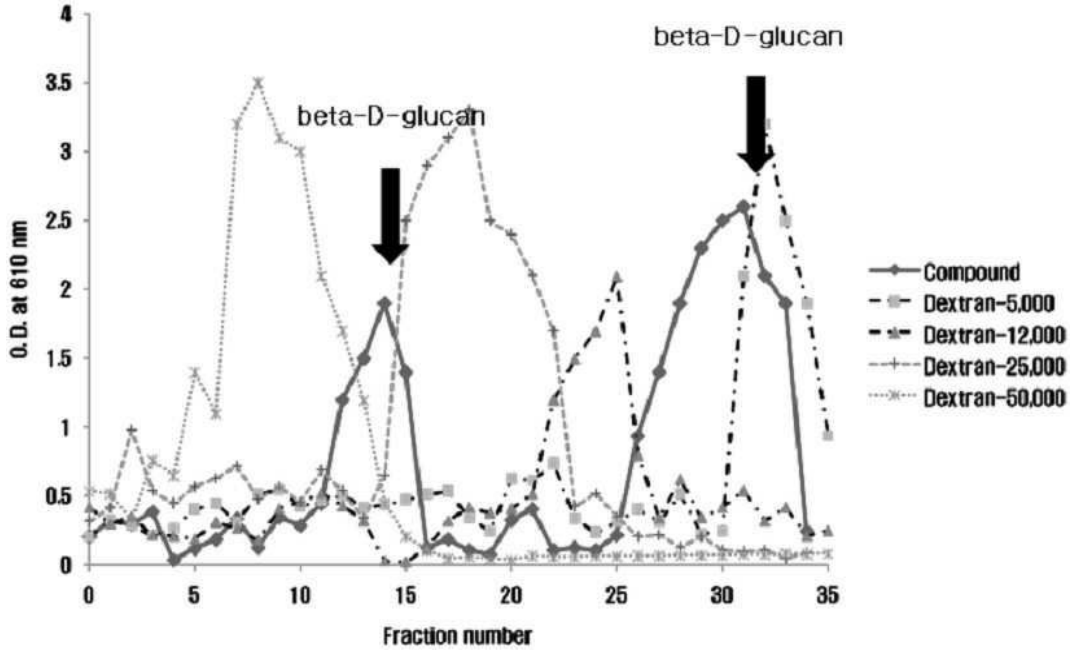
도면4c


Average Weight of Punches (mg)
14
12
10
8
6
4
2
0
Acetone
TPA
TPA+P
*

도면5


Agrocybe chaxingu (100 g)
Autoclave (121℃, 150 psi, 1 hr)
Centrifugation (6,000 rpm, 40 min)
Supernatant
Pellet
Added of Ethanol
Discard
Centrifugation (6,000 rpm, 40 min)
Pellet
Supernatant
α-Amylase, protease, amyloglucosidase
Dissolved by d-H2O 500 mL
Discard
-Membrane : pore size 0.2 mm PES a)
Ultra Filtration (1)
-Centrifugation : 5,000 rpm, 10 min
Pore size > 0.2 mm
-Membrane 3,000 PES
Ultra Filtration (2)
-Flow rate : 3.5 mL min-1
> MWCO b) 3,000
Gel filtration chromatography – Sepharose CL-6B
a) Polyethersulfone, b) Molecular weight cut off

도면6



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
<120> Anti-inflamatory composition containing betaglucan extracted from Agrocybe chaxingu

<130> HallymU-chaxingu2

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense primer of cyclooxygenase-2

<400> 1
tggacgaggt ttttccacca g 21

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense primer of cyclooxygenase-2

<400> 2
aaaggcctcc attgaccaga 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense primer of beta-actin

<400> 3
ggacagtgag gccaggatgg 20

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense primer of beta-actin

<400> 4
agtgtgacgt tgacatccgt aaaga 25

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense primer of iNOS

<400> 5
ctgtcagagc ctcgtggctt t 21

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense primer of iNOS

<400> 6
atggctcggg atgtggctac 20