



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0094782

(43) 공개일자 2022년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/815 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61P 1/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/815 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0186361

(22) 출원일자 2020년12월29일

심사청구일자 2020년12월29일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (공동, 충남대학교)

(72) 발명자

조진아

대전 유성구 엑스포로 448 506동 201호

(74) 대리인

김진동

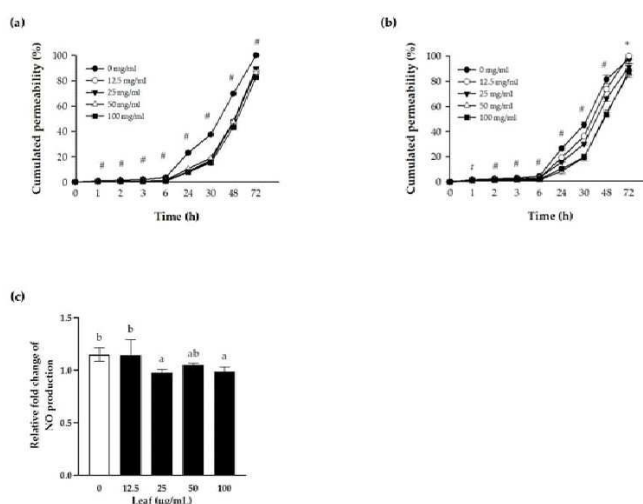
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 구기자나무 잎 추출물을 포함하는 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 구기자나무 잎(Lycium barbarum leaf) 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 장내 염증예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/32 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

구기자나무 잎(Lycium barbarum leaf) 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물의 추출 용매는 알코올인 것을 특징으로 하는, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 일산화질소(NO)의 생산을 저하시키는 것을 특징으로 하는, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 추출물은 장세포의 소포체 스트레스를 저해하는 것을 특징으로 하는, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

구기자나무 잎 추출물을 유효 성분으로 포함하는 장내 염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 식품은 건강 기능성식품인 것을 특징으로 하는, 장내 염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 구기자나무 잎(Lycium barbarum leaf) 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 소포체(endoplasmic reticulum, ER)는 분비계와 막관통 단백질(transmembrane proteins)의 합성, 폴딩(folding) 및 처리에 중요한 역할을 한다. 소포체 스트레스(ER stress)는 아미노산 결핍이나, 반응산소종과 같은 유전적 또는 환경적 요인으로 인해 소포체에서 잘못 접히거나 펼쳐진 단백질의 축적에 의해 발생된다.

[0003] ROS 및 NO를 포함한 자유 라디칼은 주요 염증 매개체일뿐만 아니라 세포 생리학 및 질병 발병에 중요한 역할을 하는 세포 내 신호 전달체 역할을 한다. ER 스트레스가 발생하면, 칼슘에 의존하는 단백질 폴딩 효소는 ER Lumen으로부터 칼슘을 방출하고, 세포질 속으로 공급되는 칼슘의 농도를 증가시킨다. 이는 미토콘드리아 대사를 자극하여 더 많은 ROS가 생성되고, ER에 축적된misfolded 단백질이 ER 스트레스, 산화반응 및 염증 반응을 더욱 악화시켜, ER 스트레스를 더 촉진시키게 되며, 이 과정은 IRE1(inositol-requiring1), PERK(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase) 그리고 ATF6(activating transcription factor)의 세가지 소포체 막 횡단 영역(ransmembrane domains)을 활성화시킨다.

- [0004] 휴면상태에서는 ER 스트레스의 중심 조절기인 분자 샤페론(chaperone) BiP(78 kDa glucose control protein GRP78)는 그들의 luminal 도메인과 결합하여 IRE1, PERK, ATF6을 비활성 상태로 유지할 수 있으며, 잘못 접힌 단백질, 펼쳐진 단백질, 또는 단순히 과발현된 단백질의 노출된 소수성 부위와 결합하기 위해서는 더 많은 양의 BiP가 필요하다. 결과적으로 BiP는 이러한 요구 사항을 충족하기 위해 이러한 수용체 사이트에서 분리되며, 세포내 수용체로부터의 분리는 세포내 수용체 영역을 활성화시킬 수 있다.
- [0005] 첫째, eIF2의 PERK 의존적 인산화(PERK-dependent phosphorylation)로 인한 translational attenuation는 ER의 부담 극복에 도움이 됩니다. 이는 전사 인자로서 강력한 활성을 갖는 XBP1 isoform 변형 및 번역틀 변동(translational frameshifting)을 초래하여 NF-κB 경로의 활성화가 이루어진다.
- [0006] 장기간의 스트레스 조건 하에서, PERK에 의한 변환 차단에도 불구하고 proapoptotic protein CHOP(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein)는 PERK에 의해 상향 조절되며, 그것은 미토콘드리아 손상, 사이토 크롬 c 방출 및 카스파 제 3 활성화를 유발하는 단백질에 의해 미토콘드리아에서 전세포자멸(프로옵토틱스, Proapoptotic) drive를 일으킨다.
- [0007] ER 스트레스와 UPR 유도는 장내 줄기 세포에 매우 중요하며 UPR 신호의 손상은 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD) 및 과민성 대장 증후군(Irritable bowel syndrome, IBS)과 같은 만성 염증성 질환으로 이어진다. IBD에 의해 기능적으로 손상된 장내 상피세포는 염증 반응을 유발할 수 있다. 서방 국가의 과민성 대장 증후군 환자의 약 20-40 %가 비만이며, 콜레스테롤 및 동물성 지방이 풍부한 식단을 섭취한 동물의 경우 과민성 대장증군의 발병률이 증가한다.
- [0008] 배상세포는 점액을 분비하여 보호 내강 점액층(protective luminal mucus layer)을 형성하고 파넬세포(paneth cells)는 디펜신을 분비하며, 소장의 토글을 멸균 상태로 유지하기 위해 디펜신 및 기타 항균 펩티드를 분비한다. 배상세포의 감소는 병원성 박테리아의 침입을 막지 못하는 결과를 초래하는데 이는 과민성 대장 증후군에서 흔히 볼 수 있는 병리학적 현상이다.
- [0009] 한편, Goji berry로도 알려진 Lycium barbarum(L. barbarum, LL)는 서구 국가들에서 슈퍼 푸드로 주목받고 있으며, 중국과 한국 등의 동양권 국가에서는 오랜 시간 동안 Lycium barbarum을 식용 및 전통 약재로 사용되어 왔다. Lycium barbarum에는 클로로젠산, p-커마린산, 산성 카페인산, 페룰산, 젠티산 등 의 다당류, 플라보노이드, 폴리페놀 화합물이 많이 함유되어 있으며, 재배된 Lycium barbarum leaf의 주된 활성 플라보노이드는 루틴 성분이다.
- [0010] 또한, 종래에는 Lycium barbarum가 저혈당, 항균, 항산화, 항노화, 지질저하 효과를 가지는 기능성 식품으로 사용되어 왔다. 그러나, Lycium barbarum이 장에 미치는 영향 및 메커니즘에 대해서는 거의 알려져 있지 않다.
- [0011] 본 발명자는 Lycium barbarum leaf의 장내 항염증 및 항산화 효과를 ER 스트레스와 산화 스트레스를 통해 실험적으로 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) (00001) 대한민국공개특허 제10-2019-0041256(2019.04.22. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 구기자나무 잎(Lycium barbarum leaf) 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 실시예에 따른 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 구기자나무 잎(Lycium barbarum leaf) 추출물을 유효 성분으로 포함한다.

- [0015] 상기 추출물의 추출 용매는 알코올일 수 있다.
- [0016] 상기 조성물은 일산화질소(NO)의 생산을 저하시킬 수 있다.
- [0017] 상기 추출물은 장세포의 소포체 스트레스를 저하시킬 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 실시예에 따른 장내 염증 예방용 식품 조성물은 구기자나무 잎 추출물을 유효 성분으로 포함한다.
- [0019] 상기 식품은 건강 기능성식품일 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 구기자나무 잎(Lycium barbarum leaf) 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 Caco-2 세포에서 염증을 억제하고, 소포체 스트레스를 억제시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0021] 따라서, 구기자나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 Lycium barbarum leaf 추출물의 시험관 및 생체 내 세포 생존력을 평가한 그래프이다; 도 1a는 Caco-2 세포에 각각 다른 농도의 Lycium barbarum leaf 추출물을 24시간 동안 처리하고 WST 분석을 통해 세포 생존력을 측정된 그래프; 도 1b는 Zebrafish 알을 최대 75 시간 동안 난수에서 다양한 농도의 Lycium barbarum leaf 추출물과 함께 배양한 이미지; 도 1c는 Zebrafish 알의 생존율을 나타낸 그래프; 데이터는 최소 3개의 독립 실험의 평균 $\pm$ SD로 표시; Duncan의 One-way ANOVA 분석을 통한 다중 범위 테스트를 사용하여 서로 다른 농도 간의 유의한 차이를 분석; 흰색 막대는 100%로 설정된 음의 제어를 나타냄. *** $p < 0.001$
- 도 2는 세포 투과성에 대한 L. barbarum leaf 추출물의 보호 효과를 나타낸다; 도 2a는 분극화된 Caco-2 세포의 정단부는 24 시간 동안 L. barbarum leaf 추출물로 전처리한 군; 도 2b는 분극화된 Caco-2 세포의 정단부는 24 시간 동안 L. barbarum leaf 추출물로 전처리한 다음 24 시간 동안 사이토카인 콕테일((50 ng/mL TNF- α + 50 ng/mL IFN- γ + 25 ng/mL IL-1 β + 10 μ g/mL LPS) 처리한 군; 도 2c는 조건부 배지를 수집하고 그에 따른 NO의 생성을 측정하고 분석한 그래프; 데이터는 최소 3개의 독립 실험의 평균 $\pm$ SD로 표시; Duncan의 One-way ANOVA 분석을 통한 다중 범위 테스트를 사용하여 서로 다른 농도 간의 유의한 차이를 분석; 흰색 막대는 100%로 설정된 음의 제어를 나타냄. *** $p < 0.001$
- 도 3은 XBP1 의존 ER 스트레스에 의해 유도된 전-염증 반응에 대한 Lycium barbarum leaf 추출물의 항염증 효과를 나타낸 것이다; 분극화된 Caco-2 세포(도 3a 및 도 3b), wt MEF 세포(도 3c 내지 도 3d, 도 3i 및 도 3j), IRE1 α KO MEF(도 3e 및 도 3f), XBP1 KO MEF(도 3g 및 도 3h) 24 시간 동안 Lycium barbarum leaf 추출물로 전처리(도 3a 내지 3h)한 후 1시간 동안 정단부에 3 μ M TG 자극(도 3i 및 도 3j)을 가함; Caco-2에 대한 인간 GAPDH, 또는 MEF에 대한 마우스 액틴에 의해 표준화하고, TG에 의한 IL8, IL6 및 XBP1s fold change는 Lycium barbarum leaf 추출물 농도(b, d, f, h, j)에 따라 계산함; 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시; One-way ANOVA 분석을 통해 Lycium barbarum leaf 추출물 농도 간 차이를 분석하고, 각 농도에서의 TG 효과는 student's t-test를 사용하여 분석. * $p < 0.05$
- 도 4는 고지방식이(HFD)를 먹고 LPS 자극을 받은 마우스의 소장에서 Lycium barbarum leaf 추출물의 항염증 효과를 나타낸 것이다; 도 4a 내지 4c는 RT-PCR, 도 4d 내지 4k는 실시간 qPCR, 도 4l는 ELISA, 도 4m은 H&E 염색을 나타낸 것이다.
- 도 5는 비장세포의 B 림프구 활성화 효과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 분극화된 Caco-2 세포에서 염증인자인 IL8 mRNA에 대한 leaf와 fruit 추출물을 효과를 비교한 것이다.
- 도 7은 분극화된 Caco-2 세포에서 ER stress인자인 XBP1 mRNA에 대한 leaf와 fruit 추출물을 효과를 비교한 것이다.
- 도 8은 wt MEF 세포에서 염증인자인 IL6 mRNA에 대한 leaf와 fruit 추출물을 효과를 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명을 보다 자세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 구기자나무 잎(Lycium barbarum leaf) 추출물을 유효 성분으로 하는 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물의 추출 용매는 알코올일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 일산화질소(NO)의 생산을 저하시키는 것이 바람직하며, 이에 한정되지 아니한다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 장세포의 소포체 스트레스를 저해하는 것이 바람직하며, 이에 한정되지 아니한다.
- [0029] 상기 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 상기 유효 성분 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.
- [0030] 상기 약학 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0031] 상기 약학 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, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약학적으로 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 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 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.
- [0033] 또한, 본 발명은 구기자나무 잎(Lycium barbarum leaf) 추출물을 유효 성분으로 포함하는 장내 염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 식품 조성물은 제제화되어 장내 염증 예방용 식품 조성물로 기능화된 건강기능성 식품으로 이용할 수 있거나, 각종 식품에 첨가될 수 있다.
- [0036] 상기 제제 형태는 상기 약학 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용되거나, 각종 식품에 첨가될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 식품은 음료, 젤리, 캔디, 껌 또는 유제품일 수 있으며, 구체적으로, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류, 알코올 음료류, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등을 들 수 있다.
- [0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

- [0041] <실험방법>
- [0042] 1. 재료 및 방법
- [0043] 1-1. 재료
- [0044] 건조된 구기자나무 잎(Lycium barbarum leaf)은 중국의 Ningxi Hui로부터 구입하였으며, 70 %의 에탄올을 이용하여 7 일 동안 잎을 추출하였다. 다음으로, 여과지를 이용하여 여과하고 회전증발기를 사용하여 농축한 농축액을 실험에 사용하였다. 구기자나무 잎의 추출물을 70 % DMSO에 25mg/ml 용해하여 Stock solution으로 사용하였다.
- [0046] 1-2. 세포배양
- [0047] 인간의 장내 상피 세포인 Caco-2는 미국식 문화 컬렉션(American Type Culture Collection, 미국식 문화 컬렉션)에서 구입하고, MEF 세포는 데이비드 론(University of Cambridge, UK)에게 받아 준비하였다.
- [0048] 이 세포들은 1 % Penicillin-Streptomycin과 10 % 열-비활성 소태아 혈청을 포함하는 Dulbecco's 변형된 Eagle's 배지에서 37℃의 조건으로 5%의 CO₂ 분위기에서 배양했다.
- [0049] Caco-2 세포는 Transwell(35024 · SPL · 한국)에 396 μg/cm² 타입 I 콜라겐(코닝 · 미국)을 코팅하고 10일간 성장시켜 단일층을 극대화하였다.
- [0050] 전기 저항은 Trans Epithelial Electric Resistance Measurements(EVOM2, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL USA)을 사용하여 측정하였다.
- [0051] TEER(Transepithelial/Transendothelial Electrical Resistance)가 500~600 Ωcm²에 도달했을 때 세포의 정단부(apical side of the cells)을 Lycium barbarum 추출물로 처리한 후 1 ~ 4 시간 동안 Thapsigargin(TG, Sigma-Aldrich Co.)으로 자극하여 ER 스트레스를 유도하거나 사이토카인 콕테일(CT, 50 ng/ml TNFα + 50 ng/ml IFN-γ + 25 ng/ml IL-1β + 10 μg/mL LPS) 16 시간 동안 염증을 유발하였다.
- [0053] 1-3. 실험동물
- [0054] 1-3-1. 마우스
- [0055] 생후 5주된 수컷 BALB/c 마우스는 DaHanBioLink Co., Ltd.(Eumseong, Korea)에서 구매하였다. 검역 1 주일 후, 마우스에게 46 일 동안 60 % 고지방식(Research Diet, USA)을 섭취하도록 하였다.
- [0056] 23일 후 마우스들은 고지방식만을 섭취한 군(H), 고지방식 섭취 및 LPS 주입군(HL), 고지방식 섭취, LPS 주입 및 150 mg/kg LL 경구 투여군(HLL) 및 고지방식 섭취, LPS 주입 및 300 mg/kg의 LL 경구 투여군(HLH)으로 4개 군으로 나누었다.
- [0057] HLL 및 HLH 군의 마우스는 20일 동안 매일 150mg/kg 및 300mg/kg의 Lycium barbarum 경구 투여하였다. HL, HLL 및 HLH 군의 마우스는 5 mg/kg의 LPS를 복강 내 주사하고 1 시간 후에 희생시켰다.
- [0058] 모든 동물 실험은 충남 대학교 동물 관리 실험위원회(201909A-CNU-134)의 승인을 받았으며 실험실 동물 관리 및 사용을 위한 국립 보건원 지침서에 따라 수행되었습니다(NIH Publications No. 8023, revised 1978).
- [0060] 1-3-2. Zebrafish
- [0061] 제브라피쉬는 광주기에 14시간, 암흑주기에 10시간 동안 28℃로 유지시켰다.
- [0062] 실험실에서 키운 Brine 새우를 제브라피쉬에게 하루 4회 공급하였다. 수정된 배아를 수집하기 위해, 수컷과 암컷을 밤새 교배 케이지에서 분리하고 다음날 아침에 산란시켰다.
- [0063] 제브라피쉬 배아에 대한 독성을 평가하기 위해 수정란을 0.1%의 난수에 녹인 (Egg water) 4 ppm 농도의 메틸렌

블루(Methylene blue)로 5~6회 세척한 후 1ppm 농도의 메틸렌 블루로 다시 세척하였다. 세척된 수정란은 현미경으로 관찰하여 정상 수정란을 실험에 사용하였다.

[0064] 선택된 수정란을 Well 당 10 개씩 24-Well 플레이트(Hyundai Micro Co., Korea)에 투입한 후 0.1 %의 난수에 농도가 다른 Lycium barbarum(0, 12.5, 25, 50, 100, 250 μ g/mL) 추출물을 각각 2 ml씩 처리하였다.

[0065] Lycium barbarum의 농도가 다른 난수는 24시간 마다 교체하였다.

[0066] 발달과정 및 독성은 2, 4, 8, 14, 22, 30, 48 및 75시간 동안 라이카 현미경(DDM2000, Leica Co., Wetzlar, Germany) 및 캐논 현미경(SZ2-ILST, Tokyo, Japan)으로 평가하였다.

[0067] 제브라피쉬에 대한 모든 실험은 충남대학교 동물보호이용위원회(CNU-01027)가 승인한 의정서에 따라 수행하였다.

[0069] 1-4. 세포 생존 검사

[0070] 세포 생존력 검사를 확인하기 위해 WST 분석 키트(EZ-cytox, Daeil lap service Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 수용성 테라졸륨(Water-Soluble Tetrazolium, WST) 분석하였다. 세포를 24시간 동안 Lycium barbarum leaf 추출물(0, 12.5, 25, 50, 100, 250 μ g/mL) 처리한 후 WST 분석하였다.

[0071] 3 시간 후에 마이크로플레이트 판독기(xMarkTM Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Inc., Hercules, California, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0073] 1-5. 산화질소(NO) 분석

[0074] Transwell 상에 분극된 Caco-2 세포는 다른 농도의 Lycium barbarum(0, 12.5, 25, 50 및 100 μ g/mL) 추출물을 24시간 동안 처리하고 사이토카인 콕테일(CT, 50 ng/ml TNF α + 50 ng/ml IFN- γ + 25 ng/mL-1 β + 10 μ g/mL LPS) 처리군과 미처리군으로 나누어 16시간 동안 염증을 유도하였다.

[0075] IL-1 β 및 TNF- α 는 JW Creagene Co. (Seongnam, Korea)에서 구입하였으며, IFN- γ 는 Systems Inc. (Minneapolis, USA)에서 구입하였고, LPS는 InvivoGenInvivoGen (San Diego, CA, USA)에서 구입하여 준비하였다.

[0076] 그리스 시약 시스템(Promega Co., Madison, USA)을 이용하여 챔버의 정단부에서 조건부 배지의 산화질소(NO)의 생성을 측정하였다.

[0077] 마이크로플레이트 판독기(xMarkTM Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Inc., Hercules, California, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0079] 1-6. 세포 주위 투과성

[0080] 분극화된 Caco-2 세포는 24시간 동안 정단부에 Lycium barbarum 추출물로 처리하였으며, 추가로 16 시간 동안 사이토카인 콕테일 처리(처리군/미처리군)하여 염증을 유발하였다.

[0081] 정단부측과 기저부측에 10 mM HEPES(Hanks' balanced salts, Sigma-Aldrich Co., USA)이 첨가된 HBSS(Sigma-Aldrich Co, USA)를 이용하여 세척하였다.

[0082] HBSS/HEPES 용액에 담긴 4kDa Fluorescein Isotiocyanate 텍스트란(FITC- dextran, Sigma-Aldrich Co., SWEDEN) 1 mg/mL를 정단부에 첨가하고 72시간 동안 배양했다. HBSS/HEPES 용액 기저부의 흡광도는 0, 1, 2, 3, 6, 24, 30, 48 및 72 시간 마다 측정하였다.

[0083] 형광신호(fluorescence signal)는 여기(excitation) 상태의 경우 490nm에서, 방출(emission) 상태의 경우 520nm에서 DTX 800 멀티모드 검출기(DTX800, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0085] 1-7. RNA 추출 및 cDNA 합성

- [0086] 세포 배지를 제거한 후 Tri-reagent(MRC Inc., Cincinnati, USA)를 각 well에 첨가하여 생성된 용해물을 수집하였다.
- [0087] 다음으로, 용해물에 클로로포름을 투입한 혼합물 12,000g을 4℃에서 15 분 동안 원심분리하였다. 원심분리된 혼합물의 상등액을 분리한 다음 이소프로판올을 투입한 혼합물 12,000g을 20 ℃의 온도에서 8 분 동안 원심 분리하였다.
- [0088] 마지막으로 RNA pellet을 회수하고, Nano Drop(Nano Drop ONE, Thermo Scientific Inc., USA)을 이용하여 농도를 측정하였다.
- [0089] cDNA는 RT-Kit(M-MLV, RNase H -, BioFACT Co., Korea)을 이용하여 합성하였다.
- [0091] **1-8. 실시간 중합 효소 연쇄 반응**
- [0092] 2X Real-time PCR Master Mix Kit(Including SYBR Green, Low ROX, BioFACT Co., Korea)를 이용하여 합성한 cDNA를 이용하여 실시간 qPCR를 측정하였다.
- [0093] 실시간 qPCR 과정은 다음과 같이 진행된다; denaturation step은 95℃에서 15분; denaturing step은 95℃에서 20초; Anneal and Extension 단계는 60℃에서 40초, 45 사이클 동안 한번의 증폭 사이클(Agilent Co., Santa Clara, California, USA)
- [0094] 데이터는 Agilent AriaMX 1.0 프로그램을 이용하여 분석하였다.
- [0095] 하기의 표 1은 본 발명에서 사용된 프라이머 시퀀스(실시간 qPCR 프라이머 서열)를 나열한 것이다.

표 1

Gene	Primer	Sequence (5'→ 3')
Human		
GAPDH	Forward	ATG GGG AAG GTG AAG GTC G
	Reverse	GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A
IL8	Forward	GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A
	Reverse	CAT GAA GTG TTG AAG TAG ATT TGC TTG
Mouse		
β-actin	Forward	TAC CAC CAT GTA CCC AGG CA
	Reverse	CTC AGG AGG AGC AAT GAT CTT GAT
XBP1s	Forward	ACA CGC TTG GGA ATG GAC AC
	Reverse	CCA TGG GAA GAT GTT CTG GG
IL6	Forward	CTG CAA GAG ACT TCC ATC CAG
	Reverse	AGT GGT ATA GAC AGG TCT GTT GG
IL1β	Forward	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG
	Reverse	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
CXCL1	Forward	ACT GCA CCC AAA CCG AAG TC
	Reverse	TGG GGA CAC CTT TTA GCA TCT T
IL4	Forward	ACA GGA GAA GGG ACG CCA T
	Reverse	GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA
IL12p40	Forward	AGC AGT AGC AGT TCC CCT GA
	Reverse	AGT CCC TTT GGT CCA GTG TG
IFNγ	Forward	TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA
	Reverse	TGG CTC TGC AGGATTTTCATG

[0096]

[0098] 1-9. 역전사 중합 효소 연쇄 반응(RT-PCR)

[0099] 표적 유전자의 RNA 발현을 측정하기 위해 RT-PCR(2X Taq Basic PCR Master Mix2, BioFACT Co., Korea)을 수행하였다.

[0100] 하기의 표 2는 본 발명에 사용된 프라이머 서열(역전사 PCR 프라이머 서열 (마우스))을 나타낸 것이다.

[0101] PCR 혼합물에 3 %의 아가로스 겔을 45 분 동안 로딩(전기영동)한 후 UV 광선(AE-9000 E-graph, ATTO, Japan)에 노출시켰다.

표 2

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')	Base pair (bp)
β-actin	Forward	TCTCCAGCAACGAGGAGAAT	348
	Reverse	TGTGATCTGAAACCTGCTGC	
IL6	Forward	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	421
	Reverse	GGAAATTGGGGTAGGAAGGA	
BiP	Forward	CTG GGT ACA TTT GAT CTG ACT GG	398
	Reverse	GCA TCC TGG TGG CTT TCC AGC CAT TC	
CHOP	Forward	CAC ATC CCA AAG CCC TCG CTC TC	286
	Reverse	TCA TGC TTG GTG CAG GCT GAC CAT	

[0102]

[0104]

1-10. ELISA 검사

[0105]

마우스의 혈액은 마우스를 마취시키고 심장에 구멍을 내어 혈액을 채취한 다음 실온에서 30 분 동안 응고시켜 준비하였다.

[0106]

이 후 혈청을 1,000 × g을 10분 동안 원심분리하였다.

[0107]

원심분리된 혈청의 상등액을 수집하여 인터루킨(interleukin 6, IL6)에 대한 ELIAS 분석을 수행하였다.

[0109]

1-11. 세포 사이클에 대한 유세포 분석

[0110]

마우스에서, 비장세포를 분리하였다. 세포 사이클 분석을 위해, 마우스 비장세포는 으갠 후 직경 100 μm의 세포 strainer를 사용하여 분리하고 RPMI1640으로 두 번 세척하였다. 비장세포는 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에서 배양하였고, 72시간 동안 10 μg/mL의 LPS로 자극했으며, 70% 에탄올로 고정시켰다.

[0111]

세포는 암실의 실온에서 30 분간 세포 사이클 키트(미국 밀리포어)로 염색하고 볼텍싱(vortexd)한 후 Muse Cell analyzer(Millipore, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0113]

2. 통계분석

[0114]

모든 실험의 통계적 처리는 SPSS/Windows 24.0(SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 분석하였다. 모든 실험은 3 회 이상 실시하였으며, 실험 결과는 평균 ± 표준 편차로 표현하였다.

[0115]

student's t-test를 이용하여 두 그룹 간의 평균값의 차이를 조사하였다. One-way ANOVA를 이용하여 3 개 이상의 그룹 간 평균 값의 차이를 분석하였다. One-way ANOVA 분석 후 Duncan의 다중 범위 테스트를 이용하여 독립 변수 간의 차이를 확인하였고, 통계적 유의성은 p<0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 정의 하였다.

[0117]

<결과>

[0118]

실험예 1. 실험관 및 생체 내 독성 평가

[0119]

Lycium barbarum의 세포 생존력을 평가하기 위해 인간 장내 상피 세포인 Caco-2 세포에 대하여 WST 분석을 수행하였다.

[0120]

도 1a에서 확인할 수 있듯이, 세포를 24시간 동안 다른 농도의 L. barbarum leaf 추출물을 처리했을 때 세포 생존율은 L. barbarum leaf 추출물을 처리하지 않은 그룹(100%) 보다 최대 50 μg/mL의 L. barbarum leaf 추출물을 처리한 그룹이 더 높은 세포 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 이는 L. barbarum leaf 추출물이 장의 세포 증식에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 의미하며, 50 μg/mL 이후부터는 세포 증식에 큰 변화를 나타내지

않았다.

- [0121] 상기 결과를 바탕으로 이후 모든 시험관 실험에 사용된 *L. barbarum* leaf 추출물의 농도를 250 $\mu\text{g/mL}$ 미만으로 결정하였다.
- [0122] Zebrafish(*Danio rerio*)의 유전자 서열을 인간 유전자 서열과 78% 유사하다. 따라서, zebrafish에서 유사한 인간 위장 질환을 유발할 수 있고, 이를 연구할 수 있다. Zebrafish의 알은 투명하여 내부 장기 구조의 발달 과정을 쉽게 관찰할 수 있기 때문에 연구에 널리 사용되고 있다.
- [0124] 본 발명에서는 Zebrafish에 다양한 농도의 *L. barbarum* leaf 추출물을 처리하고 관찰하여 생체 내 *L. barbarum* leaf 추출물의 독성 및 발달 효과를 조사하였다(도 1b).
- [0125] 도 1b에서 확인할 수 있듯이, Zebrafish의 알이 발달하는 동안에 최대 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 *L. barbarum* leaf 추출물을 처리하여도 구조적인 이상은 관찰되지 않았다. 그러나, Zebrafish 알의 부화는 시험관내 세포 증식 결과와 일치하는 결과로 음성 대조군보다 25~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 처리한 군에서 더 빠르게 일어났다.
- [0126] 도 1c를 참조하면, *L. barbarum* leaf 추출물은 농도에 관계없이 어떠한 농도에서도 난자의 생존율과 발달에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0127] 결과적으로, *L. barbarum* leaf 추출물은 시험관 및 생체 내 어디에서 최대 250 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 독성을 나타내지 않으며, *L. barbarum* leaf 추출물은 장 상피 세포의 증식 및 Zebrafish 알의 초기 발달에 효과가 있다는 것을 확인할 수 있다.
- [0129] **실험예 2. 분극화된 Caco-2 세포에서의 산화질소(NO) 생산 및 세포 주위 투과성**
- [0130] 도 2는 세포 투과성에 대한 *L. barbarum* leaf 추출물의 보호 효과를 나타낸 것이다.
- [0131] 타이트 정션(Tight junction, TJ)은 장 상피 세포의 선택적인 투과성 및 안정한 상태를 유지하기 위해 장 상피에서 가장 중요한 해부학적 구조이다.
- [0132] 장에 국소 염증이 발생하면 IFN- γ , IL1 β , IL6, TNF- α 등의 염증성 사이토카인의 수치가 상승하며, TJ 안정한 상태를 손상시키고 병원균이 장 조직에 쉽게 침투할 수 있도록 하여 장벽의 기능을 저하시킨다. 분극화된 Caco-2 세포는 장내 상피 세포와 유사한 기능 및 구조를 가지고 있어 장내 상피 세포의 투과성을 관찰하는 데 적용할 수 있다.
- [0133] 본 발명에서 분극화된 Caco-2 세포의 정단부는 24 시간 동안 *L. barbarum* leaf 추출물로 전처리하였으며, 추가적으로 24 시간 동안 사이토카인 콕테일을 처리군/미처리군으로 나누어 처리하였다. 이후, 분극화된 Caco-2 세포의 정단부에 FITC-dextran을 첨가하고, 시간 경과에 따른 TJ의 투과성을 조사하기 위해 기저부의 조건부 배지로부터 흡광도를 측정하였다.
- [0135] FITC-dextran은 정단부에서 대조군 세포에 비하여 *L. barbarum* leaf 추출물을 처리한 세포에서 현저하게 덜 침투되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0136] 기저부층의 경우 *L. barbarum* leaf 추출물의 농도가 증가함에 따라 누적 침투량은 증가하였다(도 2a).
- [0137] 사이토카인 콕테일 자극에 의한 염증이 있는 경우, *L. barbarum* leaf 추출물을 처리한 세포는 FITC-dextran의 농도에 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있으며, 이는 *L. barbarum* leaf 추출물이 장의 정상 세포 또는 염증이 있는 세포 모두에서 장 상피 세포를 보호한다는 것을 의미한다(도 2b).
- [0138] 결과적으로, *L. barbarum* leaf 추출물은 분극화된 Caco-2 세포에서 외부 염증 자극의 유무에 관계없이 TJ 안정한 상태를 유지시키고, 장 기능을 향상시킨다는 것을 의미한다.
- [0139] 따라서, 본 발명에서는 *L. barbarum* leaf 추출물이 염증이 없는 상태에서 분극화된 Caco-2 세포의 산화질소(NO)의 생산을 조절하는지를 확인하였다.
- [0140] 도 2c는 조건부 배지를 수집하고, 그에 따른 NO의 수준을 나타낸 것이다.

- [0141] 도 2c를 참조하면, 음성 대조군 대비 25~100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 *L. barbarum* leaf 추출물을 처리한 조건부 배지에서 NO의 분비가 크게 감소한 것을 확인할 수 있다.
- [0143] **실험예 3. 염증반응 및 XBP1 splicing**
- [0144] 본 발명에서는 X-box binding protein 1(XBP1)가 *L. barbarum* leaf 추출물의 기능적인 측면에서 ER 스트레스와 전-염증 반응 사이에 어떠한 관련이 있는지 확인하였다.
- [0145] 전-염증 사이토카인인 인간 IL8, 마우스 IL6 mRNA 발현 및 XBP1 splicing(XBP1는 ER 스트레스의 요인)는 분극화된 인간 장 상피 Caco-3 세포 또는 knockout 마우스 배아 섬유 아세포(mouse embryonic fibroblast, MEF) 세포주에서 인간 GAPDH 또는 마우스 β -액틴을 이용하여 표준화하였으며, 모든 실험은 적어도 3회 수행하였다.
- [0146] 분극화된 Caco-2 세포(도 3a 및 도 3b) 및 MEF(도 3c 및 도 3j)를 *L. barbarum* leaf 추출물을 이용하여 24 시간 동안 전처리하였다.
- [0147] ER 스트레스는 selective sarcoplasmic/ER Ca^{2+} -ATPase(SERCA) 억제제인 3 μM Thapsigargin(TG)로 유도하여 세포 내 Ca^{2+} 의 저장을 억제하고, 세포막 관련 채널을 통해 세포 외 Ca^{2+} 의 유입을 증가시켜 세포질의 Ca^{2+} 레벨을 높였다.
- [0148] 도 3a 및 도 3c에서는 음성 대조군에 비하여 TG 처리한 군의 경우 IL8 또는 IL6 mRNA 발현이 증가한 것을 확인할 수 있다. 이는 염증이 Caco-2 세포 및 MEF 세포에서 ER 스트레스에 의해 유도된 것을 의미한다.
- [0149] 그러나, Caco-2 세포 및 MEF 세포 모두 *L. barbarum* leaf 추출물을 처리했을 때, ER 스트레스에 의한 IL8 및 IL6 mRNA 발현은 음성 대조군에 비하여 감소하는 것을 확인할 수 있다(도 3a 내지 도 3c).
- [0150] 따라서, ER 스트레스에 의해 유도된 IL8 및 IL6 mRNA 발현의 fold change는 *Lycium barbarum* leaf 추출물의 항염증 효과를 나타내는 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도부터 감소하는 것을 확인할 수 있다(도 3b 및 도 3d).
- [0151] ER 스트레스에 의해 IRE1 α 가 활성화되면 IRE1 α endonuclease 활성화되고 XBP1 mRNA가 분열하여 XBP1s이 생성된다.
- [0152] IRE1 α 가 없으면, TG는 IL6 mRNA 발현을 유도했으며, *L. barbarum* leaf 추출물의 최저 농도인 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서만 증가하였다(도 3e).
- [0153] *L. barbarum* leaf 추출물에 의한 IL6 유도 fold change는 IRE1 α 가 없을 때 변동이 없었으며, IRE1 α 가 있을 때 *L. barbarum* leaf 추출물에 의해 감소하였다. 이는 IRE1 α 가 *L. barbarum* leaf 추출물의 작용 메커니즘에서 전-염증 반응 억제의 매개체(mediator)임을 의미한다(도 3f).
- [0154] 반면, XBP1이 없을 때, TG는 *L. barbarum* leaf 추출물의 모든 농도에서 IL6 mRNA 발현을 유도 하였다. 이는 XBP1이 ER 스트레스를 통해 염증을 유도하는 유일한 인자가 아님을 의미한다(도 3g).
- [0155] wt MEF에서 *L. barbarum* leaf 추출물의 용량이 증가할수록 IL6 mRNA 발현을 억제되는 것에 비해(도 3d), XBP1이 없는 MEF 세포에서 TG 처리에 의한 IL6 발현의 fold change는 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 *L. barbarum* leaf 추출물을 처리한 군을 제외하고는 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다(도 3h).
- [0156] 따라서, 본 발명에서는 TG에 의해 유도된 염증이 *L. barbarum* leaf 추출물에 의해 억제되고, 이는 IRE1과 XBP1에 의해 매개되는 것을 알 수 있다.
- [0157] 상기 TG는 Wt MEF 세포에서 XBP1s mRNA의 발현을 증가시켰으며, 이는 TG가 XBP1 splicing를 유도했다는 것을 의미한다(도 3i). 또한, ER 스트레스가 없는 경우에도 *L. barbarum* leaf 추출물 자체에 의해 XBP1s mRNA의 발현은 최고 높은 농도를 제외하고는 통계적으로 유의미하지 않았음에도 불구하고 용량에 따라 증가하는 것으로 나타났다.
- [0158] TG 처리에 의한 XBP1s 발현의 fold changes를 *L. barbarum* leaf 추출물의 농도를 달리하여 계산하였을 때, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도를 제외하고는 *Lycium barbarum* leaf 추출물에 의해 억제되었다(도 3j).
- [0159] 요약하면, *Lycium barbarum* leaf 추출물은 분극된 Caco-2 세포 및 야생형 MEF 세포에서 ER 스트레스 존재하에 염증 및 XBP1 splicing 억제 효과가 있는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 IRE1 α -XBP1이 *Lycium barbarum*

leaf 추출물의 항염증 기능의 메커니즘에서 ER 스트레스에 의해 유발된 염증에 대한 주요 임계 연결고리인 것을 의미한다.

[0161] **실험예 4. 체내 염증 반응 및 ER 스트레스에 대한 Lycium barbarum leaf 추출물의 억제 효과**

[0162] 체내 염증과 ER 스트레스에 대한 Lycium barbarum leaf 추출물의 억제 효과를 확인하기 위해 모든 마우스에게 23일 동안 고지방식(HFD)을 섭취하도록 하였으며, 고지방식을 먹인 마우스 2개 그룹에 20 일 동안 매일 150mg/ml의 Lycium barbarum leaf 추출물(HLL) 및 300mg/ml의 Lycium barbarum leaf 추출물(HLH)을 경구투여 하였다.

[0163] 실험 종료 후, 대조군(H)를 제외하고 모든 그룹에 5 mg/kg의 LPS를 복강 내에 주사하고 1시간 후에 희생시켰다. 혈청, 소장 및 대장을 채취하여 추가 분석에 사용하였다. 소장 및 결장 조직을 균질화하고, RT-PCR과 실시간 qPCR을 분석을 위해 총 RNA 및 cDNA를 합성하였다.

[0164] 도 4a는 RT-PCR로 소장 전체에서 전-염증 마커(IL6), ER 스트레스 홀마커(BiP) 및 ER 스트레스-유도 세포자멸 마커(CHOP)를 조사한 것이고, 도 4b 내지 도 4d는 소장 전체에서 전-염증 마커(IL6), ER 스트레스 홀마커(BiP) 및 ER 스트레스-유도 세포자멸 마커(CHOP)의 정량화된 그래프이다.

[0165] 고지방식만을 섭취한 그룹(H)에서 최소 수준의 타겟 유전자를 확인하였으며, 본 발명에서 H 그룹을 만성 경염증에 대한 음성 대조군으로 사용하였으며, LPS를 염증에 대한 부스터로 사용하였다.

[0166] Lycium barbarum leaf 추출물을 고용량 투여한 그룹(HLH)은 대조군인 H 그룹 및 HL 그룹보다 IL6, BiP 및 CHOP의 레벨이 현저히 낮은 것을 확인할 수 있다. Lycium barbarum leaf 추출물 처리 그룹의 경우 HL 그룹에 비해 IL6, BiP, CHOP가 현저하게 감소하였으며, 이는 전-염증이 LPS의 주입에 의해 유도되었을 때 마우스 결장에서 염증 및 ER 스트레스에 대하여 Lycium barbarum leaf 추출물이 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

[0167] 다음으로 소장의 조직 전체에서 전-염증 사이토카인을 검사하였다.

[0168] 전-염증 사이토카인(IL1b) 및 케모카인(C-X-C motif) 리간드 1(CXCL1)에서도 Lycium barbarum leaf 추출물이 전-염증 사이토카인을 억제함을 확인할 수 있다(도 4d 및 도 4e).

[0169] IL4는 체액성면역 및 후천면역의 주요 조절자로서 미접촉 T- 보조세포(Naive helper T cells)에서 Th2 세포로의 분화를 시토카인이다(도 4f). 또한, 활성화된 B 세포의 자극, T 세포의 증식 및 B 세포의 형질 세포 분화, 알레르기와 관련된 MHC 클래스 II의 생산, Th1 세포, 대식세포, 인터페론 감마(IFN- γ), 그리고 수지상세포의 생산 감소 등 많은 생물학적 역할을 한다.

[0170] 도 4f를 참조하면, HL 그룹에 비하여 HLL 그룹에서는 IL4가 유의적으로 증가하였으나 HLH 그룹에서는 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 만성 염증 과정에서 Lycium barbarum leaf 추출물이 선천적 면역에서 후천면역으로 감소시킬 수 있고, 알레르기를 수반할 수 있다.

[0171] 반대로, IL12a(p35)와 IL12b(p40)로 구성된 IL-12는 T세포의 분화에 관여하여 T세포와 자연살인자(NK)세포로부터 IFN-med와 TNF- α 의 생성을 자극하고, IFN- γ 의 IL-4 매개 억제를 감소시키는데 본 발명의 Lycium barbarum leaf 추출물은 염증에 의해 유도된 IL12b(p40)(p=0.015)를 감소시켜 소장의 염증을 억제할 수 있다(도 4g).

[0172] 다음으로 대장 전체 조직에서 전-염증성 사이토카인을 검사하였다.

[0173] XBP1이 결장에서 HFD 및 LPS 처리에 의해 slicing 되었을 때, Lycium barbarum leaf 추출물을 처리한 그룹은 H 그룹과 HL 처리 그룹에 비하여 XBP1 slicing을 유의적으로 억제하는 것을 확인할 수 있다.

[0174] 이는 Lycium barbarum leaf 추출물이 HFD과 비교하여도 XBP1 slicing을 억제하고 ER 스트레스를 억제함으로써, 소장에서 보다 결장(대장)에서 더 억제효과가 큰 것을 확인할 수 있다(도 4h).

[0175] 도 4i 내지 도 4k는 대장에서 HFD+LPS 자극으로 인해 주요 전-염증 사이토 카인인 IL1b, CXCL1 및 IFN- γ 이 증가를 나타낸 것이다. 또한, 이는 Lycium barbarum leaf 추출물의 용량에 따라 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다.

[0176] IFN- γ 는 선천적 면역과 후천적 면역 사이의 중간 연결고리 역할을 한다.

[0177] 본 발명에서는 Lycium barbarum leaf 추출물이 대장의 염증에 대해 장기간 노출되었을 때 후천적 면역반응에 대

한 면역력 발달을 억제할 수 있음을 의미한다.

[0178] 이 데이터는 Lycium barbarum leaf 추출물이 결장의 염증에 장기간 노출되었을 때 후천적 면역반응에 대한 면역력 발달을 억제할 수 있음을 의미한다.

[0179] 도 41을 참조하면, 혈청 IL 6 수준의 검사에서 주요 전-염증 사이토카인인 IL6는 HFD + LPS 자극으로 증가하여 전신 염증을 확인하였고, 이는 Lycium barbarum leaf 추출물을 투여한 그룹(HLL과 HLH)에 의해 감소한 것을 보아 ($p=0.001$) Lycium barbarum leaf 추출물의 처리에 의해 염증이 억제되는 것을 확인할 수 있으며, 이러한 결과는 순환계 시스템에서 Lycium barbarum leaf 추출물이 전-염증 사이토카인을 억제한다는 것을 의미한다.

[0181] 실험예 5. 체내 LPS에 의한 비장세포 증식

[0182] 적응성 면역에 대한 Lycium barbarum leaf 추출물의 억제 활성을 확인하기 위하여, 본 발명에서 사용된 마우스의 비장 세포를 분리하여 Lycium barbarum leaf 추출물의 B 림프구 증식/세포주기에 대한 영향을 확인하였다(도 5).

[0183] 도 5은 비장세포의 B 림프구 활성화 효과를 나타낸 것이다. 마우스들은 23일 동안 HFD를 섭취시켰다. 이후 HFD와 함께 20일 동안 매일 150mg/kg, 300mg/kg Lycium barbarum leaf 추출물을 투여하였으며, LPS를 5mg/kg 투여하고 1 시간 후 희생시켰다. 희생된 마우스의 비장을 분리하고 세포 스트레이너를 사용하여 72시간 동안 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 LPS로 자극을 준 후 70%의 에탄올로 고정하였다. 세포들은 세포순환을 위해 착색되었고 뮤즈 세포 분석기(Muse Cell analyzer)를 사용하여 분석하였다.

표 3

Group	Percentage of cell counts in different Phases (%)					
	Non-stimulation			LPS stimulation		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
H	48.47±3.28	19.08±0.95 ^b	5.73±0.66 ^b	46.14±1.89 ^a	20.02±1.46 ^a	6.5±0.7 ^c
HL	48.47±2	18.47±1.5 ^b	5.25±0.62 ^b	47.27±2.43 ^{ab}	18.63±1.65 ^{ab}	5.25±0.68 ^{ab}
HLL	48.47±3.7	16.23±1.9 ^a	5.01±1.09 ^b	44.99±4.59 ^a	19.92±2.44 ^b	5.8±0.78 ^{bc}
HLH	48.47±2.3	16.13±1.5 ^a	4.26±0.54 ^a	49.99±3.19 ^b	16.73±2.1 ^b	4.64±1.12 ^a

[0184]

[0185] * HFD 다이어트; H, HFD 다이어트+LPS, HL, HFD+LPS+150mg/kg LL, HLL, HFD+LPS+300mg/kg; HLH

[0186] 표 3을 참조하면, 비자극 상태에서는 G0/G1 arrest 그룹 간에 비장 세포의 차이가 없는 것을 확인할 수 있다.

[0187] 반대로, HLL 그룹은 S 상에서 감소를 보였으며, HLH는 DNA 복제 S 상 및 증식기 G2/M 상에서 감소를 나타내었다. 이는 Lycium barbarum leaf 추출물의 경구 섭취가 생체 내에서 비장 세포의 증식을 억제시킨다는 것을 의미한다.

[0188] 반면, LPS가 B 림프구의 활성화인자이기 때문에 비장세포를 B 림프구로 분화하기 위한 LPS 자극을 통해 HL군은 H 군에 비하여 G0/G1 cycle arrest은 증가하였으며, S 상 및 G2/M 상은 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0189] 반대로 HLL 그룹은 G0/G1 arrest는 감소시키고, S 상 및 G2/M 상은 증가시켰다 이는 저용량의 Lycium barbarum

leaf 추출물의 섭취가 적응 면역 반응의 위해 B 세포의 증식을 향상시킨다는 것을 의미한다. 그러나, *Lycium barbarum* leaf 추출물을 고용량 복용하는 경우 비장세포에 영향을 미친다.

[0190] 즉, *Lycium barbarum* leaf 추출물을 저용량 섭취할 경우 B 림프구 활성화를 촉진하지만, 고용량을 섭취하는 경우 B 림프구 활성화를 억제한다는 것을 의미한다.

[0191] 따라서, 본 발명에 일 실시예에 따른 *Lycium barbarum* leaf 추출물을 저용량 섭취함으로써, 알레르기와 같은 장기 면역성을 활성화시킬 수 있다. 또한, *Lycium barbarum* leaf 추출물을 저용량 섭취한 소장 그룹의 경우 알레르기를 조절할 수 있는 수준의 IL4를 확인하였다.

[0193] 실험예 6. *Lycium barbarum* leaf 추출물과 *Lycium barbarum* fruit 추출물의 효과 비교

[0194] 도 6은 분극화된 Caco-2 세포에서 염증인자인 IL8 mRNA에 대한 leaf와 fruit 추출물을 효과를 비교한 것이고, 도 7은 분극화된 Caco-2 세포에서 ER 스트레스인자인 XBP1 mRNA에 대한 leaf와 fruit 추출물을 효과를 비교한 것이며, 도 8은 wt MEF 세포에서 염증인자인 IL8 mRNA에 대한 leaf와 fruit 추출물을 효과를 비교한 것이다.

[0195] 도 6 내지 8를 참조하면, 분극화된 Caco-2 세포에서 ER 스트레스에 의해 발생하는 염증인자인 IL8 mRNA의 발현은 Fruit 추출물의 경우 저농도에서 감소되지 않았으나, leaf 추출물일 때 저농도에서부터 감소가 나타난 것을 확인할 수 있다.

[0196] 또한, 분극화된 Caco-2 세포에서 ER 스트레스에 의해 발생하는 염증인자 XBP1 발현은 Fruit 추출물의 경우 저농도에서 증가하였으나, leaf 추출물일 때 저농도에서부터 감소가 나타난 것을 확인할 수 있다.

[0197] 또한, wild type Mouse embryonic fibroblasts(wt MEF) 세포에서 ER 스트레스에 의해 발생하는 염증인자인 IL8 mRNA의 발현은 Fruit 추출물의 경우 저농도에서 증가하였으나, leaf 추출물일 때 저농도에서부터 감소가 나타난 것을 확인할 수 있다.

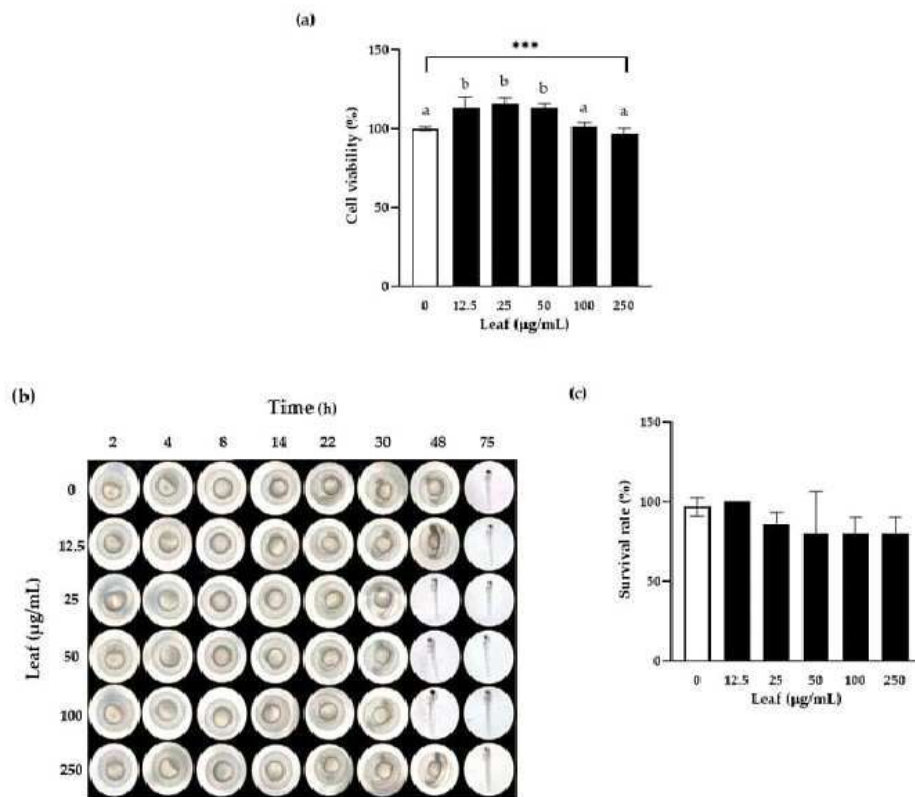
[0198] 즉, *Lycium barbarum* leaf 추출물이 *Lycium barbarum* fruit 추출물 보다 염증을 억제하는 효과가 더욱 우수하다는 것을 확인할 수 있다.

[0200] 결론적으로, 본 발명에 따른 *Lycium barbarum* leaf 추출물은 염증이 항산화 활성을 나타내며, in vitro 및 in vivo에서 장내염증 원인 중 하나 인 염증 및 ER 스트레스를 억제할 수 있다. 반면, 고용량의 *Lycium barbarum* leaf 추출물의 섭취는 알레르기와 같은 적응성 면역 반응을 억제할 수 있다.

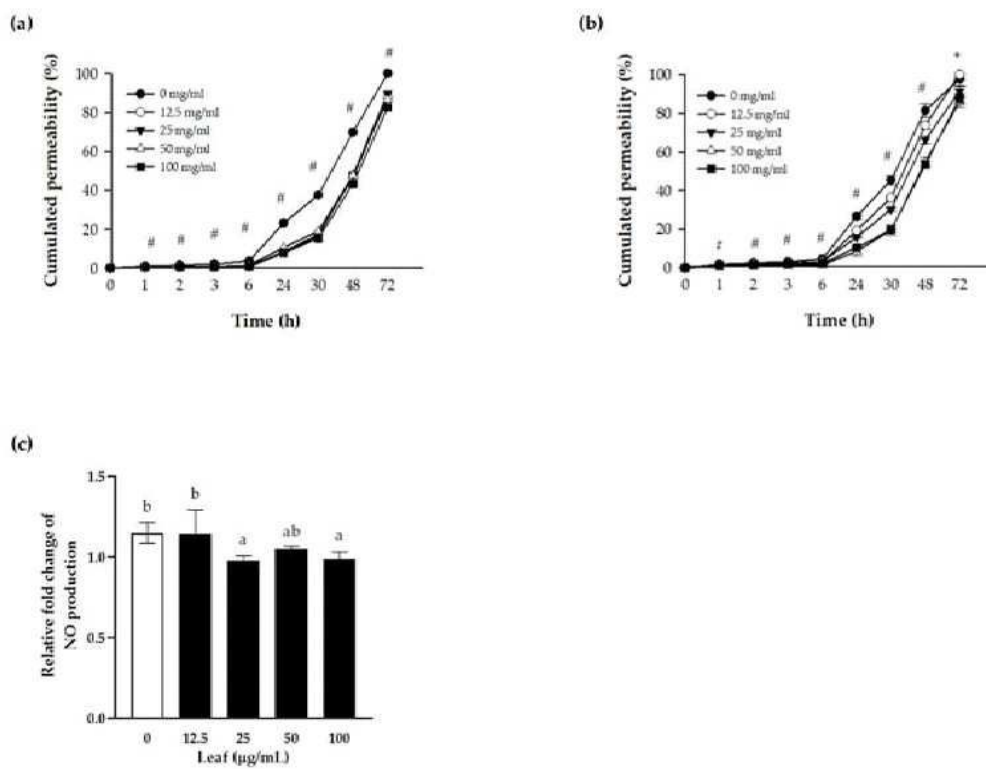
[0201] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 *Lycium barbarum* leaf 추출물의 적정량 섭취함으로써, 과도한 적응 면역반응과 관련된 ER 스트레스를 억제하고 장염증을 예방 및 치료할 수 있는 효과가 있다.

도면

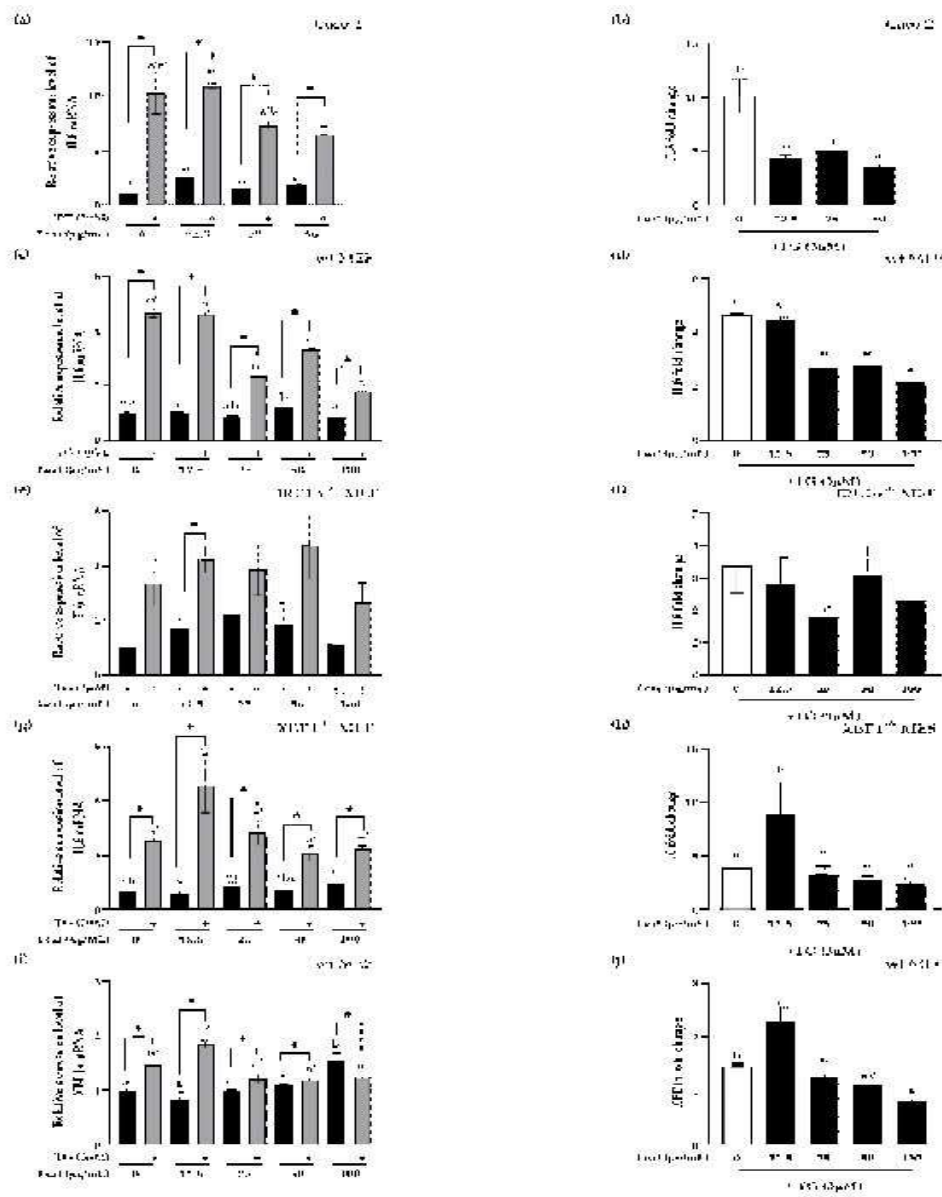
도면1



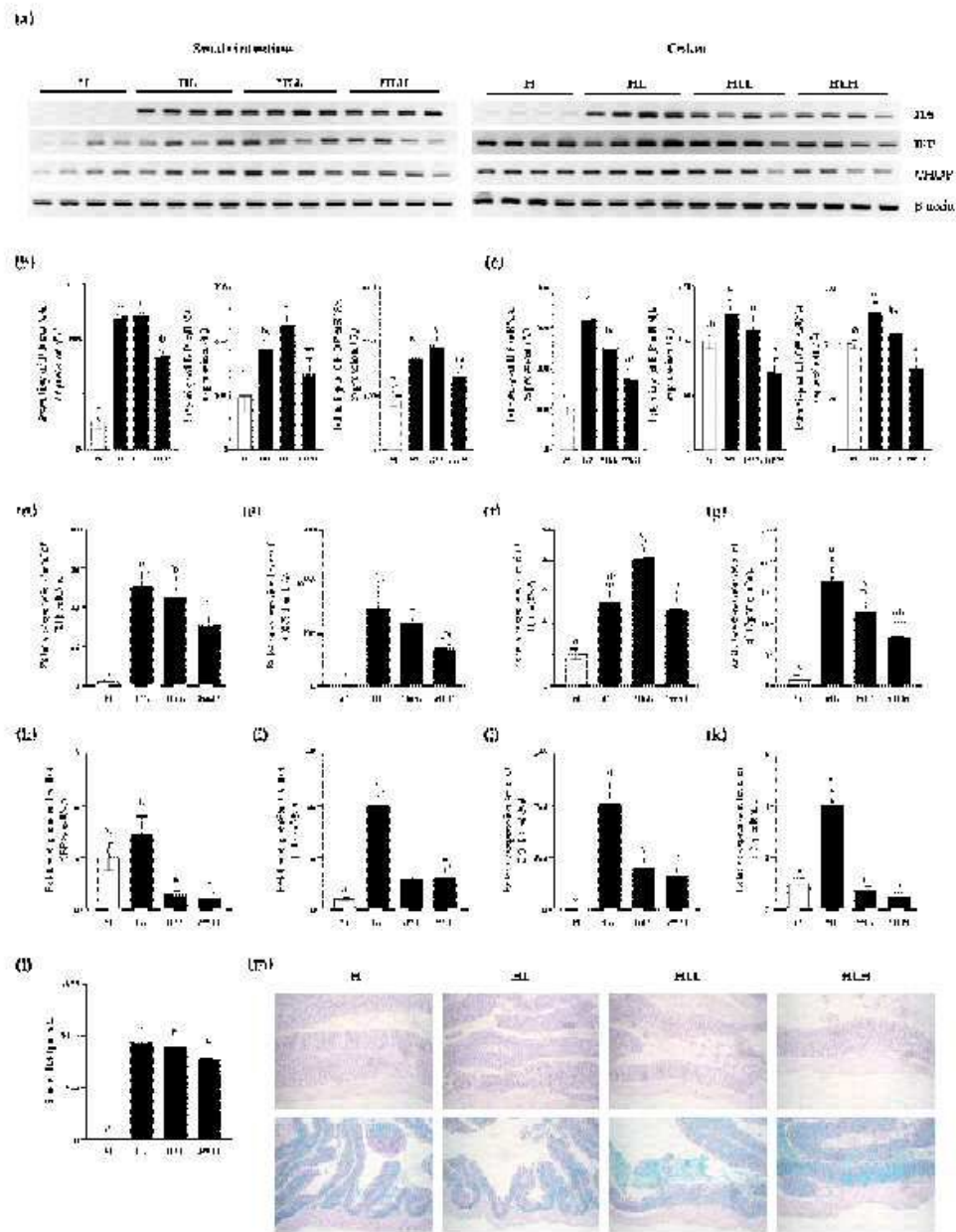
도면2



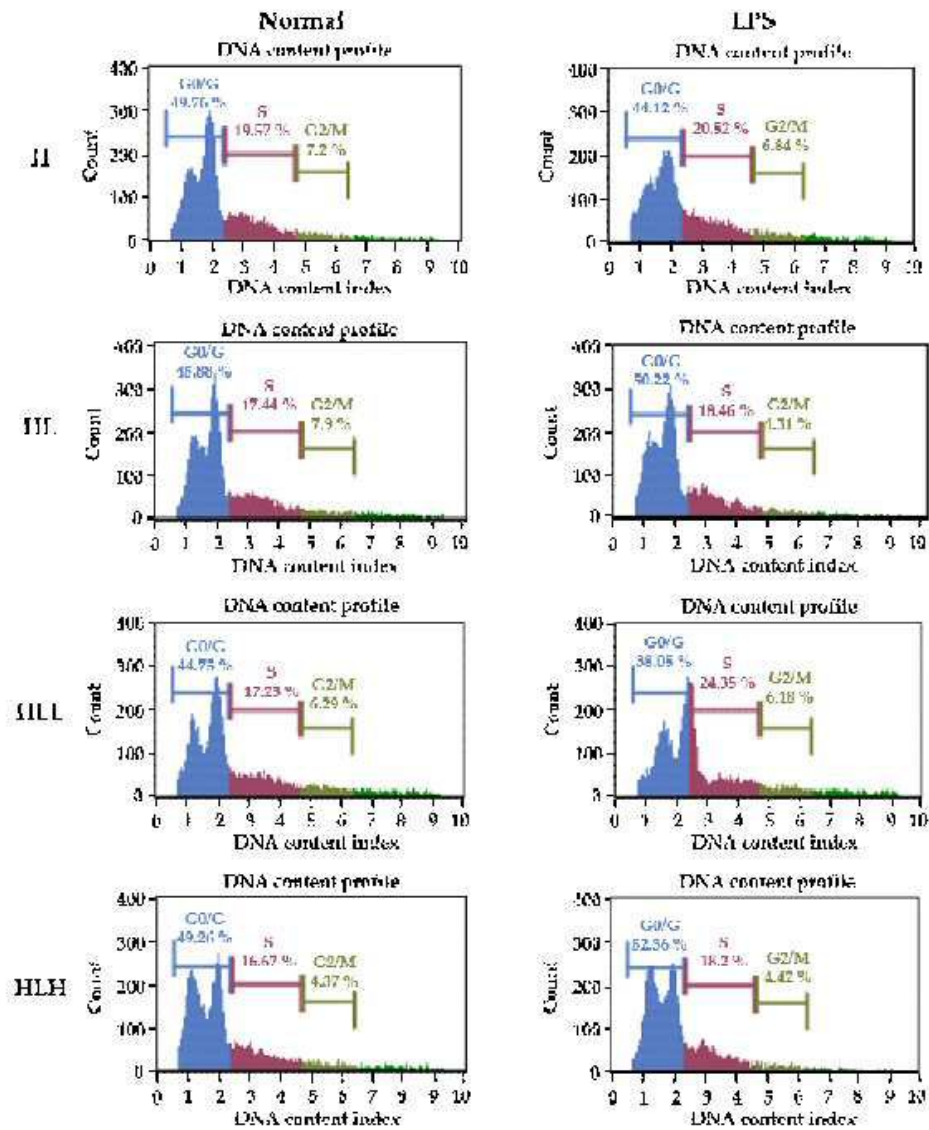
도면3



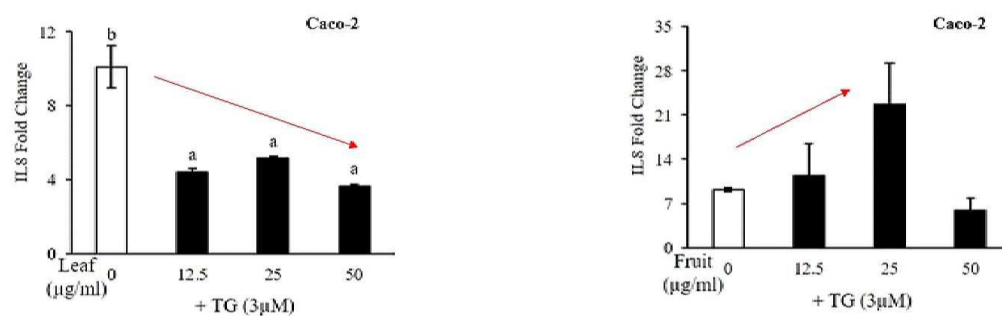
도면4



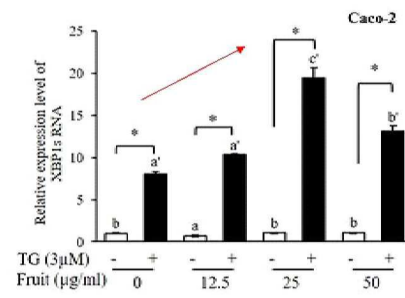
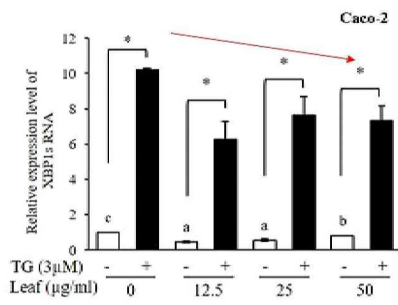
도면5



도면6



도면7



도면8

