



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0120446
(43) 공개일자 2016년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/97 (2006.01) A61K 36/185 (2006.01)
A61K 36/47 (2006.01) A61Q 17/04 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/97 (2013.01)
A61K 36/185 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0049437

(22) 출원일자 2015년04월08일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

주식회사 오비엠텔

대전광역시 서구 갈마역로 155, 102호 (월평동,
둔산아파트형공장)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

대전대학교 산학협력단

대전광역시 동구 대학로 62 (용운동, 대전대학교)

(72) 발명자

김창덕

대전광역시 중구 계백로1716번길 40, 101동 101호

노석선

대전광역시 유성구 지족로 362, 310동 1404호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

오국진

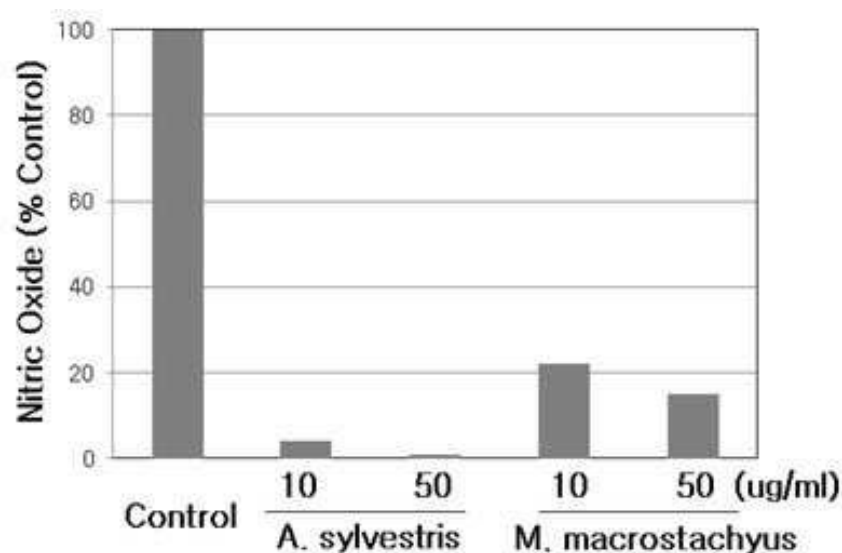
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 염증의 억제 또는 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 또는 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증의 억제 또는 개선용 화장료 조성물; 및 염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/47 (2013.01)

A61Q 17/04 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

(72) 발명자

이민호

대전광역시 유성구 지족동로 123, 603동 603호

김영호

대전광역시 유성구 봉명로 48, 801동 302호

판반키엠

베트남 하노이 카우 지아이 18 호앙 쿠오크 비엠티
로드 베트남 아카데미 오브 사이언스 앤드 테크놀로지
로지 인스티튜트 오브 마린 바이오케미스트리

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0615

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 한의약선도기술개발사업

연구과제명 한방 피지분비 조절제 및 한방 여드름화장품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.15 ~ 2016.05.14

명세서

청구범위

청구항 1

아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 또는 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증의 억제 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 2

아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 또는 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물이 건조된 잎 또는 줄기를 물, C₁~C₄ 알코올 또는 C₁~C₄ 알코올과 물의 혼합용매로 추출하는 것을 포함하는 추출방법에 의해 얻어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물이 건조된 잎을 물, C₁~C₄ 알코올 또는 C₁~C₄ 알코올과 물의 혼합용매로 추출하는 것을 포함하는 추출방법에 의해 얻어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 추출이 95% 에탄올을 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 염증이 피부염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 피부염이 접촉성 피부염, 알러지성 피부염, 알러지성 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 또는 자외선에 의한 피부염인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 천연물 소재의 항염 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 또는 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증의 억제 또는 개선용 화장품 조성물; 및 염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증(inflammation)이란 생체에 해로운 자극원(박테리아, 곰팡이, 다양한 알러지 유발물질 등)에 의한 생체조직의 손상에 대한 방어 기작으로서, 생체의 세포나 조직에 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하는 생체의 방어 반응과정이다. 따라서 이러한 일련의 반응에는 국소 혈관, 체액의 각종 조직세포, 면역 세포 등이 관여되는 것으로 알려져 있다. 최근 분자생물학의 발달과 더불어 염증성 사이토카인 등 염증질환에 영향을 주는 다양한 인자들도 규명되고 있다.

[0003] 산화질소(Nitric oxide, NO)는 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 L-아르기닌이 산화되어 생성된다. NO는 염증과정의 매개체로 작용하며, 병원성 DNA를 손상시켜 세포를 방어하고, 항상성에 기여하는 것

으로 알려져 있다. NOS는 I형, II형, III형의 3종류가 있으며, 이중 생체에서 항상성과 관련해 중요한 역할을 담당하는 I형이나 III형과 달리, II형은 유도성 산화질소 합성효소[inducible nitric oxide synthase, inducible NOS(iNOS)]로서 사이토카인이나 세균 등에서 분비되는 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS) 등에 의해 세포에서 생성되며, 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다. 생산된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만, 활성산소의 하나인 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide anion, O_2^-)과 반응해 맹독성을 가진 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite, $ONOO^-$)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 압 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(박광균, 구강생화학 12장 면역과 염증, pp318-325, 군자출판사, 1999). 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 iNOS의 활성을 억제하는 것이 중요하다.

[0004] 프로스타글란딘(Prostaglandin, PG)은 염증반응 등에 작용하는 세포내 및 세포간 매개체로서, 세균의 감염에서 유래한 LPS 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 포스포리파아제 A2(phospholipase A2)에 의해 유리되어 생성되는 아라키돈산으로부터 생성된다. 즉, 아라키돈산은 사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase, COX) 효소의 작용을 받아 PG를 합성하며, PGE2와 PGI2는 혈관 투과성 항진에 작용을 하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. COX는 I형과 II형의 2가지 동형체(isoform)가 존재한다. I형 효소인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절, 혈소판 응집 등 인체의 정상적인 기능을 유지하는데 중요한 작용을 하는 효소인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 COX-II는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다 (서영준, 발암 과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방. 분자세포생물학뉴스 13:8-17, 2001). 따라서 항염증제의 개발을 위해 COX-II의 활성을 억제시키는 물질의 탐색에 많은 연구자들이 힘을 쏟고 있다.

[0005] 현재 개발된 약제 중 가장 강력한 항염 작용을 지니고 있는 약제는 스테로이드 제제이다. 그러나 스테로이드는 장기적으로 사용할 때 부작용을 수반하게 된다. 염증 치료에 있어 스테로이드제는 처음 사용할 때 효과적으로 염증을 억제하지만, 염증 증상은 스테로이드 사용을 중지해 따라 다시 나타나므로, 반복사용에 따른 부작용의 문제는 더욱 심해져 간다. 스테로이드제의 부작용으로는 등근다혈성의 얼굴, 체액의 저류, 부신억제, 감염에 대한 감수성의 증가와 기타 백내장, 녹내장, 소화성 궤양, 창상치유 지연, 초기 감염의 재활성화 등의 많은 부작용 등이 보고되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 안전성이 우수한 천연식물 유래의 추출물로서 우수한 항염증 활성을 나타내는 천연물 유래의 추출물을 다양하게 검색하였다. 놀랍게도, 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 및 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물이 우수한 NO 생성 억제, COX-II 활성 억제, 및 염증성 사이토카인 발현 억제를 나타냄으로써, 염증의 억제, 개선, 예방, 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0007] 따라서, 본 발명은 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 또는 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증의 억제 또는 개선용 화장품 조성물 혹은 염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 태양에 따라, 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 또는 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증의 억제 또는 개선용 화장품 조성물이 제공된다.

[0009] 본 발명의 다른 태양에 따라, 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 또는 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공된다.

[0010] 상기 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물은 건조된 잎 또는 줄기를 물, $C_1 \sim C_4$ 알코올 또는 $C_1 \sim C_4$ 알코올과 물의 혼합용매로 추출하는 것을 포함하는 추출방법에 의해 얻어질 수 있다. 또한, 상기 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물은 건조된 잎을 물, $C_1 \sim C_4$ 알코올 또는 $C_1 \sim C_4$ 알코올과 물의

혼합용매로 추출하는 것을 포함하는 추출방법에 의해 얻어질 수 있다. 일 구현예에서, 상기 추출은 약 95% 에탄올을 사용하여 수행될 수 있다.

- [0011] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 염증은 피부염(dermatitis)일 수 있으며, 바람직하게는, 접촉성 피부염(contact dermatitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 또는 자외선에 의한 피부염(ultraviolet radiation-induced dermatitis)일 수 있다.

발명의 효과

- [0012] 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 및 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물이 우수한 항염 활성을 갖는다는 것이 본 발명에 의해 밝혀졌다. 특히, 상기 추출물은 우수한 NO 생성 억제, COX-II 활성 억제, 및 염증성 사이토카인 발현 억제를 나타냄으로써, 염증의 억제, 개선, 예방, 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 및 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물의 NO 생성에 대한 영향을 평가하여 얻어진 결과이다.

도 2는 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물의 염증성 사이토카인 발현에 대한 영향을 평가하여 얻어진 결과이다.

도 3은 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물의 염증성 사이토카인 발현에 대한 영향을 평가하여 얻어진 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 또는 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증의 억제 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 또는 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

- [0015] 본 발명자들은 베트남 유래의 1000 여종의 천연물을 대상으로 다양한 생리활성을 평가하였다. 얻어진 추출물 중 우수한 NO 생성 억제 및 COX-II 활성 억제를 나타내는 소재 중 산업화가 가능한 천연물 2종, 즉 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 및 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물이 항염 소재로 활용될 수 있음을 확인하였다.

- [0016] 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*)는 베트남의 북동부 지방에 자생하는 작은 관목으로, 북통해소 등에 사용되는 것으로 알려져 있으나, 함유 성분에 대한 문헌은 보고된 바 없다. 또한, 말로투스 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*)는 베트남, 태국, 말레이시아에 숲 등에서 성장하는 관목으로 뱀독에 대한 해독제로 잎이 사용된 것으로 알려져 있다. 구성물질 연구에서 잎의 메탄올 추출물로부터 시클로아르탄 유도체(cycloartane derivatives)가 분리된 바 있으며, 상기 유도체는 암세포에 대한 세포독성 활성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다(Nguyen Hoai Nama, et al., *Phytochemistry Letters*, Volume 4, Issue 3, September 2011, Pages 348-352). 그러나, 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*)와 염증과의 관련성은 아직 보고된 바 없다.

- [0017] 상기 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물은 건조된 잎 또는 줄기를, 필요할 경우 물리적으로 분쇄한 다음, 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 클로로포름, 디클로로메탄, 헥산, 에틸아세테이트 등의 적절한 추출용매를 사용한 용매 추출방법을 이용하여 추출하거나 혹은 초임계 추출법 등을 이용하여 얻을 수 있다. 바람직하게는, 건조된 잎 또는 줄기를 물, C₁~C₄ 알코올 또는 C₁~C₄ 알코올과 물의 혼합용매로 추출하는 것을 포함하는 추출방법에 의해 얻어질 수 있다. 또한, 상기 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물은 건조된 잎을, 필요할 경우 물리적으로 분쇄한 다음, 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 클로로포름, 디클로로메탄, 헥산, 에틸아세테이트 등의 적절한 추출용매를 사용한 용매 추출방법을 이용하여 추출하거나 혹은 초임계 추출법 등을 이용하여 얻을 수 있다. 바람직하게는, 건조된 잎을 물, C₁~C₄ 알코올 또는 C₁~C₄ 알코올과 물의 혼합용매로 추출하는 것을 포함하는 추출방법에 의해 얻어질 수 있다. 일 구현예에서, 상기 추출은 약 95% 에탄올

(즉, 95 중량% 에탄올 수용액)을 사용하여 수행될 수 있으며, 예를 들어, 실온에서 1일 내지 10일, 예를 들어 약 5일 동안 수행될 수 있다. 얻어진 추출액은 통상의 방법에 따라 농축하여 추출물을 얻을 수 있다.

[0018] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 염증은 피부염(dermatitis)일 수 있으며, 바람직하게는, 접촉성 피부염(contact dermatitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 또는 자외선에 의한 피부염(ultraviolet radiation-induced dermatitis)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명은 다른 화장료 조성물은 예를 들어 기능성 화장료 조성물의 형태로 제조될 수 있다. 상기 화장료 조성물은 통상의 화장료 제조방법에 따라, 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 화장료 조성물은 상기 추출물을 함유하는 향장 제품, 화장수, 크림, 로오손 등의 형태로 제조될 수 있으며, 이는 통상의 클렌징액, 수렴액 및 보습액으로 희석하여 사용될 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 화장료 조성물 분야에서 통상적으로 사용되는 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다. 상기 화장료 조성물에 있어서, 상기 조성물의 함량은 염증의 억제 또는 개선 효과를 달성하기에 유효한 양, 예를 들면 조성물 총 중량에 대하여 약 0.0001 ~ 10 중량%의 함량으로 함유될 수 있고, 바람직하게는 약 0.001 ~ 1 중량%의 함량으로 함유될 수 있다.

[0020] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 락토즈, 옥수수전분 등의 부형제, 마그네슘 스테아레이트 등의 윤활제, 공지되어 사용가능한 유화제, 현탁제, 완충제, 등장화제 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여 형태, 바람직하게는 비경구 투여형태로 제제화될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 다양한 염증, 특히 피부염을 앓고 있는 환자에게 1일 약 0.1 mg/kg ~ 1 g/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 적절한 투여량은 환자의 연령, 체중 및 증상에 따라 일반적으로 변경될 수 있다.

[0021] 이하, 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 실시예 1. 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물의 제조

[0023] 건조한 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*)의 잎과 줄기 분쇄물 100 g에 95 중량% 에탄올 수용액 1000 ml를 가하여 실온에서 5일간 추출한 후, 여과하였다. 얻어진 추출액을 감압농축하여 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 18 g을 얻었다.

[0024] 실시예 2. 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물의 제조

[0025] 건조한 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*)의 잎 분쇄물 100 g에 95 중량% 에탄올 수용액 1000 ml를 가하여 실온에서 5일간 추출한 후, 여과하였다. 얻어진 추출액을 감압농축하여 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물 16 g을 얻었다.

[0026] 시험예 1. NO 형성 억제 활성 평가

[0027] RAW 264.7 세포주(ATCC number: CRL-2278)를 이용한 GRIESS 법으로 NO 형성억제력 실험을 실시하였다. 즉, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 첨가된 DMEM에서 배양한 RAW 264.7 세포를 24 웰 플레이트에 1×10^5 cells/ml의 농도로 가하여 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 인산염 완충용액으로 2회 세척한 후, 페놀 레드(phenol red)를 첨가되지 않은 DMEM에 희석한 시료를 50 µg/ml과 5 µg/ml의 농도로 가하여 1시간 동안 배양하였다. 리포폴리사카라이드(LPS)를 1 µg/ml의 농도로 가하여 48시간 배양한 후, 생성된 NO의 양을 GRISS 시약을 이용해 평가하였다. 즉, 상층액을 100 µl씩 취해 96 웰 플레이트에 옮기고, GRIESS 시약을 100 µl씩 가해 상온에서 10분간 반응시키고, ELISA 리더를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO 형성 억제율(%)은 아래의 식에 의해 계산하였다.

[0028] 억제율(%) = $(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / (\text{Abs}_{\text{LPS}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100$

[0029] Abs_{sample}: 시험물질 처리군의 흡광도

[0030] Abs_{blank}: Blank의 흡광도

[0031] Abs_{LPS}: LPS처리군의 흡광도

[0032] 상기와 같이 NO 생성 억제율을 평가한 결과는 하기 표 1 및 도 1과 같다.

표 1

샘플 처리	처리 농도	흡광도(540nm) 평균 ± SD	억제율(%)
컨트롤	-	0.069 ± 0.008	-
리포폴리사카라이드	-	0.593 ± 0.016	-
아르디시아 실베스트리스(<i>Ardisia sylvestris</i>) 추출물	50 ug/ml	0.075 ± 0.007	99%
	10 ug/ml	0.089 ± 0.006	96%
말로투스 마크로스타키우스(<i>Mallotus macrostachyus</i>) 추출물	50 ug/ml	0.163 ± 0.008	85%
	10 ug/ml	0.182 ± 0.012	78%

[0034] 하기 표 1의 결과로부터, 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 및 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물은 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제함을 알 수 있다.

[0035] 시험예 2. COX II 활성 억제 활성 평가(PGE₂ 측정)

[0036] 96 웰 플레이트에 RAW 264.7 세포를 10⁵ cell/well의 농도로 시딩하고 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 4시간 배양하여 부착시켰다. 배양액을 제거하고, 인산염 완충용액으로 세척한 후, 3% FBS가 첨가된 DMEM을 웰당 200 μl씩 첨가하였다. 실시예 1 및 2에서 얻어진 추출물을 각각 10 μg/ml 및 50 μg/ml의 농도로 처리한 다음, 1시간 배양한 후, LPS(1 μg/ml)를 가하고, 24시간 배양한 후에 배지를 수거하여 ELISA KIT (Amersham, 미국)을 이용하여 PGE₂를 측정하였다.

[0037] PGE₂ 측정을 이용한 COX-II 활성의 억제율을 평가한 결과는 다음 표 2와 같다.

표 2

샘플 처리	처리 농도	PGE ₂	억제율(%)
컨트롤	-	5.6 pg/ml	-
리포폴리사카라이드	-	74.1 pg/ml	-
아르디시아 실베스트리스(<i>Ardisia sylvestris</i>) 추출물	10 ug/ml	22.6 pg/ml	75 %
	50 ug/ml	5.5 pg/ml	100 %
말로투스 마크로스타키우스(<i>Mallotus macrostachyus</i>) 추출물	10 ug/ml	33.0 pg/ml	60 %
	50 ug/ml	17.5 pg/ml	83 %

[0039] 하기 표 2의 결과로부터, 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물 및 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물은 농도 의존적으로 COX-II 활성을 억제함을 알 수 있다.

[0040] 시험예 3. 염증성 사이토카인 발현 억제 평가

[0041] 실시예 1 및 2에서 얻어진 추출물의 염증성 사이토카인 즉, 인터루킨-1(interleukin-1, IL-1), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), 종양괴사인자-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)의 유전자 발현에 미치는 영향을 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)법으로 평가하였다.

[0042] Raw 264.7 세포를 1X10⁵ cells/ml의 농도로 60mm 세포배양용기에 넣어 70-80% 정도(콘플루언시)까지 배양한 후,

배지를 제거하고 혈청이 첨가되지 않은 DMEM 배지를 가하여 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 16시간 배양하였다. 실시예 1 및 2에서 얻어진 추출물을 각각 10 µg/ml 및 50 µg/ml의 농도로 처리한 다음, 약 30분후 LPS(0.5 µg/ml)를 처리하고, 6시간 후 트리졸(Trizol) 시약을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 분리한 총 RNA 5 µg을 에펜도르프 튜브에 넣고 랜덤 헥사머(random hexamer)와 역전사효소 (M-MLV reverse transcriptase)를 첨가하여 역전사반응을 수행하여 상보적 DNA (complementary DNA)를 제조하였다.

[0043]

중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction)은 PCR 튜브에 상기한 상보적 DNA와 PCR반응액(PCR buffer, 200uM dNTPs, 프라이머 20 pmol, Taq 폴리머라아제 2.5 units)을 가하여 PCR 기각에서 94℃ 30초, 60℃ 1분, 72℃ 1분의 조건으로 30사이클 증폭하였다. 이때 PCR반응에 사용된 프라이머들의 염기서열은 하기 표 3과 같다. RT-PCR 산물은 1.5% 아가로오즈 겔에서 전기영동하고, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색한 후, UV illuminator 상에서 폴라이드 카메라를 이용하여 사진 촬영하였으며, 그 결과는 덴시토미터(densitometer)를 이용하여 판정하였다.

표 3

[0044]

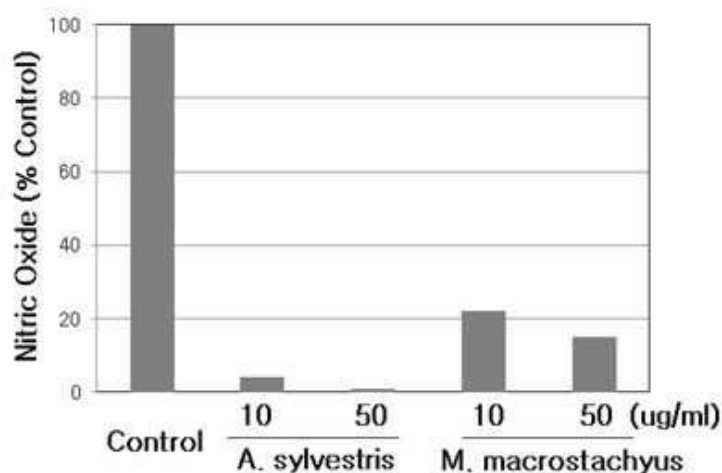
프라이머	서열번호	서열	크기
IL-1β	센스	5'-AAGCTCTCACCTCAATGGA-3'	301
	안티센스	5'-TGCTTGAGAGGTGCTGATGT-3'	301
IL-6	센스	5'-ATGAAGTTCCTCTCTGCAAG-3'	600
	안티센스	5'-CACTAGGTTTGCCGAGTAGA-3'	600
TNF-α	센스	5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'	324
	안티센스	5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'	324
iNOS	센스	5'-GAGGTACTCAGCGTGCTCCA-3'	472
	안티센스	5'-AGGGAGGAAAGGAGAGAGG-3'	472
COX-II	안티센스	5'-GGTCTGGTGCCTGGTCTGAT-3'	650
	안티센스	5'-GTCCTTTCAAGGAGAATGGT-3'	650
시클로필린 (Cyclophilin)	센스	5'-CACCACATGCTTGCCATCC-3'	325
	안티센스	5'-CTCCTTTGAGCTGTTGCAG-3'	325

[0045]

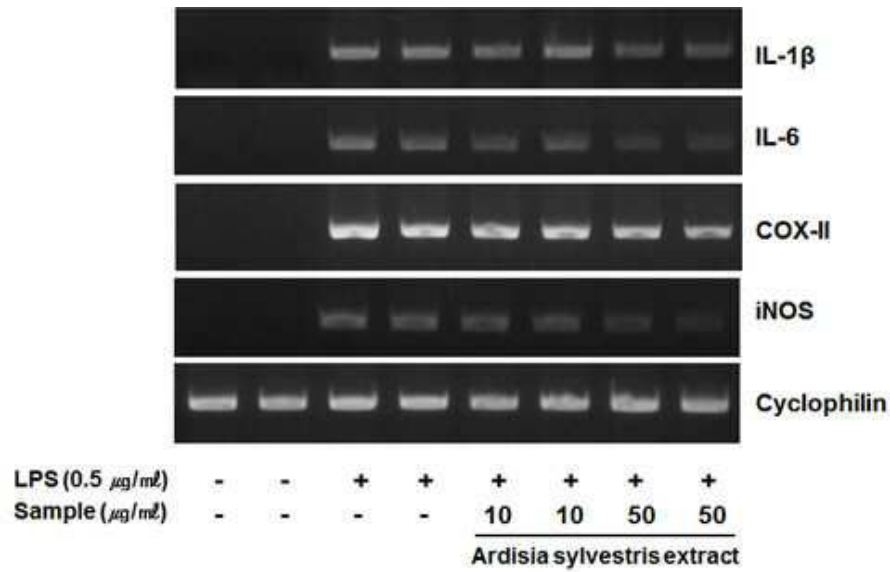
상기와 같이 RT-PCR법을 사용하여 염증성 사이토카인의 발현을 측정한 결과는 도 2 및 도 3과 같다. 도 2 및 도 3의 결과로부터, 아르디시아 실베스트리스(*Ardisia sylvestris*) 추출물은 농도 의존적으로 염증성 사이토카인인 IL-1와 IL-6 유전자 발현을 억제시키고, 말로투스 마크로스타키우스(*Mallotus macrostachyus*) 추출물은 농도 의존적으로 염증성 사이토카인인 IL-1, IL-6, TNF-α 유전의 발현을 억제함을 알 수 있다. 또한, 상기 추출물들은 NO 합성과 PGE2 합성에 관여하는 iNOS와 COX-II 유전자 발현도 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있다.

도면

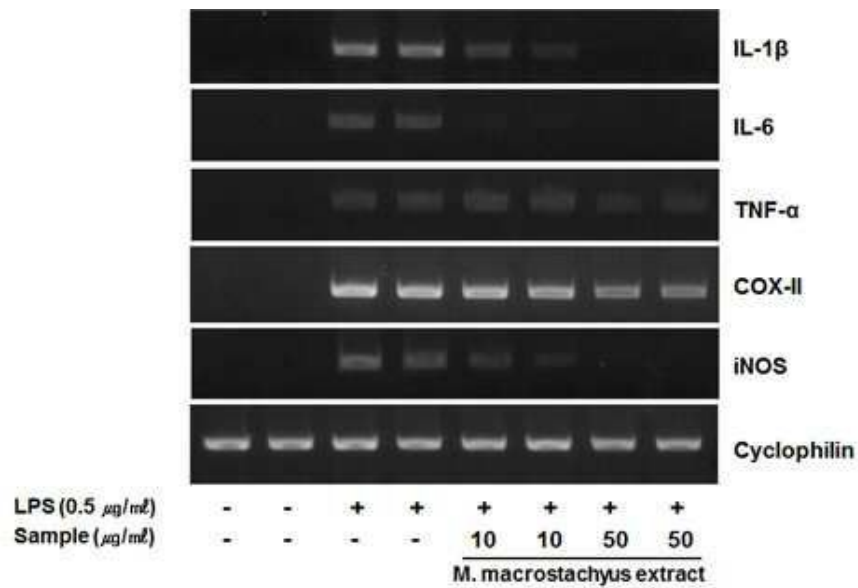
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> OBM LAB

The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

DAEJEON UNIVERSITY Industry-University Cooperation Foundation

<120> Composition for inhibiting or improving inflammation

<130> PN0730

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 1
 aagctctcac ctcaatgga 19
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 2
 tgcttgagag gtgctgatgt 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 3
 atgaagttcc tctctgcaag 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 4
 cactaggttt gccgagtaga 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer

<400>	5	
acggcatgga tctcaaagac		20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	6	
cggactccgc aaagtctaag		20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	7	
gaggtactca gcgtgctcca		20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	8	
agggaggaaa gggagagagg		20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	9	
ggtctggtgc ctggtctgat		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	Primer	
<400>	10	
gtcctttcaa	ggagaatggt	20
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	11	
caccacatgc	ttgccatcc	19
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	12	
ctcctttgag	ctgtttgcag	20