



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0087347
(43) 공개일자 2017년07월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/04 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/04 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0007234
(22) 출원일자 2016년01월20일
심사청구일자 2016년01월20일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
안동현
부산광역시 남구 분포로 113, 201동 204호(
용호동, 엘지메트로 시티)
김꽃봉우리
부산광역시 사하구 낙동대로355번길 23, 크로바
109호
김민지
부산광역시 기장군 정관면 방곡로 39, 103동 205
호(가화만사성정관타워)
(74) 대리인
위병갑

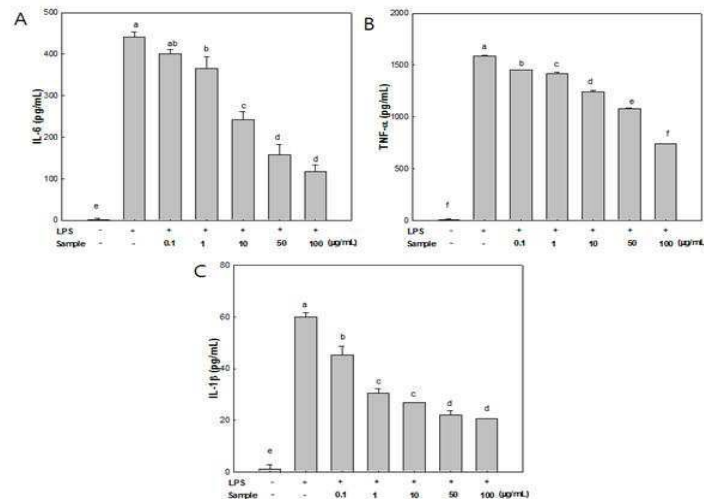
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 가락진두발 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 가락진두발 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 가락진두발 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 가락진두발 추출물은 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- α 또는 IL-1 β 의 활성을 감소 또는 억제시키는 활성이 우수하고, 산화질소(NO), iNOS, COX-2 또는 NF-kB의 활성을 감소 또는 억제시키는 활성이 우수하여 염증 질환의 예방 또는 치료할 수 있는 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/202 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A0104

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산기술지역특성화사업

연구과제명 [영남씨그랜트사업] 경남 인근 해양생물을 이용한 고부가 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2015.03.01 ~ 2016.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

가락진두발(*Chondrus nipponicus Yendo*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기가락진두발 추출물은가락진두발에 중량비 7 ~ 13배량의 에탄올을 가하여 현탁시키고, 원심분리한 상등액을 감압농축시킨 것을 특징을 하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기가락진두발 추출물은 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- α , IL-1 β , 산화질소(NO), iNOS, COX-2 또는 NF-kB의 활성을 감소 또는 억제하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

가락진두발(*Chondrus nipponicus Yendo*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은가락진두발 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증 반응은 조직(세포)의 손상이나 외부감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)에 감염되었을 때 국소 혈관과 체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종, 발열, 통증 등 외적 증상을 나타낸다. 정상인 경우 염증반응은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능회복작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 내부물질이 원인이 되어 염증반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 질환의 주요 병리현상(과민성 질환, 만성 염증)이 되며, 수혈, 약물투여, 장기이식 등 치료과정에서도 장애요인이 된다.

[0003] 생체에 있어서 염증의 발생 원인으로서 다양한 생화학적 현상이 관여하고 있으며, 특히 니트릭옥사이드(nitric Oxide; NO)를 발생시키는 효소인 니트릭옥사이드 신타제(nitric oxide synthase; NOS)와 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생합성과 관련된 효소들은 염증 반응을 매개하는데 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있으며, 따라서 L-아르기닌(L-Arginine)으로부터 NO를 생성시키는 효소인 NOS나, 아라키돈산

(Arachidonic acid)으로부터 프로스타글란딘류를 합성하는데 관련된 효소인 COX (시클로옥시게나제)는 염증을 차단하는데 있어서 주된 목표가 되고 있다.

[0004] 시클로옥시게나제는 2종류의 이소형태가 존재하는데, 시클로옥시게나제-1(cyclooxygenase-1, COX-1)은 세포내에 항상 존재하여 세포보호작용에 필요한 프로스타글란딘(PGs)을 합성하는 작용을 나타내는 것에 반하여, COX-2는 염증 반응 시 세포내에서 급격히 증가되어 염증 반응을 일으키는 데 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Weisz A., Biochem. J., 316, pp.209-215, 1996). NO와 PGs의 정도를 향상시키는 iNOS 및 COX-2를 포함하는 전사 염증 인자는 다양한 경화(sclerosis), 파킨슨병(parkinson's disease), 알츠하이머병 및 결장암을 포함하는 만성 질환의 병인에 관련한다.

[0005] COX(cyclooxygenase)는 프로스타글란딘의 생합성에 관련하는 주 효소로(Smith et al., The Journal of Biological Chemistry, 271:33157-33160, 1996), 두 종류의 이성 효소, COX-1과 COX-2가 존재한다. 대부분의 비스테로이드 소염 진통제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)의 항염증 효과는 COX 효소 활성을 억제하는 것에 의해 매개된다(Vane et al., Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 38, pp.97-120, 1998). COX-1은 위나 신장과 같은 조직에서 일정하게 존재하는 효소로서 정상적인 항상성을 유지하는데 관여하는 반면, COX-2는 염증이나 기타 면역 반응 시 세포분열인자(mitogen)나 사이토카인(cytokines)류에 의해 세포 내에서 일시적이고 빠르게 발현된다. 급성 혹은 류마티스성 관절염과 같은 만성 염증 질환의 치료에 사용되는 NSAIDs는 COX-2 효소를 억제할 뿐만 아니라 COX-1 효소도 억제함으로써 위장관 장애와 같은 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(Masferrer et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, pp.3228-3232, 1994; Seibert et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, pp.12013-12017, 1994).

[0006] 현재 치료제로 사용되고 있는 NSAIDs 대부분이 위장 장애, 간장애, 신기능 장애 등의 부작용을 야기하여 장기간의 사용이 어려우므로, 염증 억제 효과가 뛰어나면서 장시간 사용에도 부작용이 적은 새로운 치료제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제656571호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제585562호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 가락진두발 추출물이 다양한 염증성 사이토카인을 효과적으로 억제시킨다는 것을 규명함으로써 염증성 질환의 치료제로 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 가락진두발(*Chondrus nipponicus* Yendo) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 가락진두발(*Chondrus nipponicus* Yendo) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 가락진두발(*Chondrus nipponicus* Yendo) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가락진두발 추출물은 가락진두발에 중량비 7 ~ 13배량의 에탄올을 가하여 현탁시키고, 원심분리한 상등액을 감압농축시킨 것을 사용할 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가락진두발 추출물은 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- α 또는 IL-1 β , 산화질소(NO), iNOS, COX-2 또는 NF-kB의 활성을 감소 또는 억제할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 가락진두발(*Chondrus nipponicus Yendo*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 가락진두발 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 가락진두발 추출물은 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- α 또는 IL-1 β 의 활성을 감소 또는 억제시키는 활성이 우수하고, 산화질소(NO), iNOS, COX-2 또는 NF-kB의 활성을 감소 또는 억제시키는 활성이 우수하여 염증성 질환의 예방 또는 치료할 수 있는 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

[0017] 또한, 세포독성이 일어나지 않으며, 약물에 대한 독성 및 부작용도 없어 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있으며, 체내에서도 안정한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 마우스로부터 대식세포를 수득하여 가락진두발 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 뒤 세포독성 여부를 확인한 결과이다.

도 2는 가락진두발 에탄올 추출물 처리에 따른 산화질소(NO) 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 3은 가락진두발 에탄올 추출물 처리에 따른 염증성 사이토카인(IL-6, TNF- α 또는 IL-1 β) 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 4는 가락진두발 에탄올 추출물 처리에 따른 iNOS, COX-2 또는 NF-kB 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 5는 가락진두발 에탄올 추출물 처리에 따른 인산화된 p38 ERK 또는 JNK 억제 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 가락진두발 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공함을 그 특징으로 한다.

[0020] 본 발명자들은 염증성 질환 치료를 위한 새로운 치료제를 개발하기 위해 연구하던 중, 가락진두발에 주목하였는데 가락진두발은 제주도 연안에 자라는 바닷말로서, 식물체는 자홍색 또는 황록색이며 가죽질이고 단추모양의 뿌리에서 썰기모양의 줄기가 나오고 이 줄기는 곧 넓어지며 윗 부분에서 가지를 많이 낸다. 작은 가지는 조금 말려 손가락모양으로 되고, 가장자리는 부풀지 않는다. 피층은 구슬모양의 세포가 식물체의 표면에 수직으로 배열하여 5 ~ 8겹으로 이루어졌고 수조직은 실 모양의 세포가 이리저리 배열하였다. 가락진두발은 조간대에서 자란다고 알려져 있다.

[0021] 종래에는 진두발에 칼로리가 낮다고 알려져 있어 다이어트를 위한 용도 및 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키고 혈압을 내리는 용도로 사용할 수 있다고 알려져 있을 뿐, 본 발명의 가락진두발을 염증성 질환의 치료에 사용할 수 있다는 내용에 대해서는 전혀 언급된 바가 없다.

[0022] 따라서 본 발명에서는 가락진두발 추출물이 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 용도로 사용할 수 있다는 사실을 최초로 규명하였으며, 특히 가락진두발 추출물이 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- α 또는 IL-1 β 를 억제시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0023] 보다 구체적으로 본 발명의 일실시예에 의하면, 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도(0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL)에서 LPS로 염증반응을 유발한 RAW 264.7 cell의 NO 생성량을 확인한 결과, LPS 만으로 염증을 유발하였을 때 NO 생성량이 21.56 ± 0.22 μ M로, 아무것도 처리하지 않은 PBS 처리구의 2.38 ± 0.15 μ M 보다 약 9배 증가함을 보였다. 본 발명의 가락진두발 에탄올 추출물(CNYEE)을 처리하였을 때, LPS 단독처리구와 비교하여 농도 의존적으로 생성량을 유의성 있게 감소시킨 것을 확인하였다(도 2 참조). 특히, 비교적 낮은 농도인 50 μ g/mL에서 50% 이상의 억제효과를 나타냈음을 알 수 있었다.

- [0024] 또한, 본 발명자들은 다른 일실시예를 통해 가락진두발 에탄올 추출물이 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 분비량을 확인한 결과, 가락진두발 에탄올 추출물의 농도의존적으로 항염증 사이토카인인 IL-6, TNF- α , IL-1 β 의 분비를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다(도 3 참조).
- [0025] 또한, 본 발명자들은 다른 일실시예를 통해 RAW 264.7 세포에 가락진두발 에탄올 추출물을 0.1 ~ 100 μ g/mL 농도로 처리하고 웨스턴블롯을 통해 LPS에 의한 iNOS, COX-2 및 NF- κ B 단백질 발현 증가에 대한 억제효과를 확인한 결과, LPS 자극에 의해 급격히 증가한 iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현량이 가락진두발 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였다(도 4 참조).
- [0026] 나아가 본 발명자들은 가락진두발 에탄올 추출물에 의한 MAPKs 경로에서 단백질 발현 정도를 western blot을 통해 관찰한 결과, 가락진두발 에탄올 추출물은 MAP kinase에 있어 인산화된 3종의 MAPKs의 발현을 모두 농도 의존적으로 억제하였다(도 5 참조). 특히 가락진두발 에탄올 추출물을 100 μ g/mL 농도로 처리하였을 때, p-p38의 발현량을 60%이상 억제하는 효과를 나타내었고, p-ERK와 p-JNK의 단백질 발현량 또한 LPS를 단독 처리구에 비해 각각 45% 및 65% 이상의 억제효과를 보임을 알 수 있었다.
- [0027] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 가락진두발 에탄올 추출물은 대식세포에서 NF- κ B 및 MAPKs의 활성을 억제함으로써 iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인의 발현을 억제하여 염증반응에 있어 뛰어난 항염증 효과를 가져 염증성 질환을 예방 또는 치료할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.
- [0028] 본 발명에 따른 가락진두발은 당업계에서 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 '추출물'은 적절한 용매를 이용하여 가락진두발로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 가락진두발의 열수추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함할 수 있다.
- [0029] 가락진두발로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 당업계에서 허용되는 용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있다. 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0030] 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 가락진두발 추출물의 제조 방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0031] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 가락진두발 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.
- [0032] 따라서 본 발명에 있어서 가락진두발 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 회석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0033] 본 발명의 가락진두발 추출물 제조방법은 상기에서 개시한 바와 같이 당업계에서 허용되는 추출방법 어느 것을 사용하여도 무방하지만, 가장 바람직하게는 가락진두발에 중량비 7 ~ 13배량의 에탄올을 가하여 현탁시키고, 원심분리한 상등액을 감압농축시킨 것을 사용할 수 있다.
- [0034] 이러한 가락진두발 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약제학적 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.
- [0036] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를

1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [0037] 상기 약제학적 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 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, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 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.
- [0038] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 가락진두발 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.1ug/ml 내지 500ug/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 조성물은 또한 식품 조성물일 수 있는데, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 가락진두발 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0040] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강 보조식품류 등이 있다.
- [0042] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 가락진두발 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 유효성분인 가락진두발 추출물은 천연물질로서 독성 및 부작용은 거의 없으므로 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 건강기능식품은 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 목적으로 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0046] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0047] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트

름제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

- [0048] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 가락진두발 추출물을 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [0049] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 가락진두발 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 가락진두발 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0050] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 가락진두발 추출물과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0051] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 가락진두발 추출물과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0052] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [0053] 나아가 본 발명의 조성물은 또한 화장료 조성물일 수 있는데, 본 발명에 따른 가락진두발 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 ~ 50 중량%로 첨가할 수 있다.
- [0054] 가락진두발 추출물을 화장료 총 중량에 대해 0.0001 중량% 미만으로 첨가하는 경우에는 본 발명의 화장료 조성물이 가지는 다양한 생리활성 효과를 나타내지 않으며, 반면 50 중량%를 초과하여 첨가될 경우에는 세포 등에 독성으로 작용하거나 또는 목적하는 효과를 첨가량에 비례하여 얻지 못하기 때문에 경제성을 고려하여 상기 기술된 범위 이내의 함량으로 첨가하는 것이 바람직하며, 또한 첨가량에 따른 화장료 조성물 가격이 상승되므로 경제적이지 못한 문제점이 있다.
- [0055] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 조성물은 상술한 가락진두발 추출물 뿐만 아니라, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0060] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수

있다.

- [0061] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명은 본 발명의 화장료 조성물을 인간의 피부에 도포하는 것을 특징으로 하는 화장방법을 제공한다.
- [0063] 본 발명의 화장 방법은 본 발명의 화장료 조성물을 인간의 피부에 도포하는 모든 화장 방법을 일컫는다. 즉, 화장료 조성물을 피부에 도포하는 당업계에서 공지된 모든 방법이 본 발명의 화장 방법에 속한다.
- [0064] 본 발명의 화장료 조성물은 단독 또는 중복 도포하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복 도포하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 아토피 치료 효과가 우수한 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 화장료 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 젤이며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0066] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0067] **<실시예 1>**
- [0068] **실험준비**
- [0069] **<1-1> 실험재료**
- [0070] 본 발명에서 사용한 가락진두발은 연화리에서 채취한 것으로 담수로 깨끗하게 수세한 후 동결건조하여 분말화하고 진공 포장상태로 20℃에서 저장하며 사용하였다.
- [0071] **<1-2> 통계처리**
- [0072] 모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software (ver. 9.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)에서 평균값을 분산분석 한 후, Duncan's multiple range test 법에 따라 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.
- [0073] **<실시예 2>**
- [0074] **가락진두발 에탄올 추출물 제조방법**
- [0075] 분말상태의 가락진두발은 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 10배 양의 95% 에탄올로 24시간 추출하였으며 추출물은 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)로 상층액을 취하였다. 남은 잔사는 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출하였고 상층액은 37℃에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 37℃에서 건조시킨 후, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.
- [0076] **<실시예 3>**
- [0077] **세포배양**
- [0078] Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) (GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% 불활성화된 소태아혈청(inactivated fetal bovine serum)과 1% 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 배지를 배양액으로 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.
- [0079] **<실시예 4>**
- [0080] **세포독성 측정 결과**
- [0081] 시료의 세포독성을 평가하기 위해 Park 등의 방법을 약간 변형하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포를

1×10^4 cells/mL의 농도로 96-웰 플레이트에 분주하고 20시간 전 배양하여 가락진두발 에탄올 추출물(CNYEE)을 농도별로 (0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) 첨가한 후 22시간 본 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL MTT (thiazol blue tetrazolium bromide, Sigma Chemical Co.) 용액을 첨가하고 2시간 재 배양하였다. 이를 4°C , 2,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 건어내고 다이메틸설폭시화물(dimethyl sulfoxide) 100 μL 분주하여 생성된 포르마잔(formazan)을 녹여내 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도(optical density(O.D.))를 측정하였다. 세포 증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

[0082] Proliferation index (%) = Sample 흡광도 / Control 흡광도 $\times$ 100

[0083] 가락진두발 에탄올 추출물을 농도에 따라(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 세포 생존의 변화여부를 MTT assay를 이용해 측정한 결과, PBS 처리군과 비교 시 유의적인 차이가 없음을 확인하였다(도 1 참조). 이를 통해 가락진두발 에탄올 추출물은 0.1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않아 독성이 없는 것으로 판단된다.

[0084] <실시예 5>

[0085] Nitric oxide 분비량 측정 결과

[0086] 본 발명자들은 가락진두발 에탄올 추출물의 NO 생성 억제효과를 알아보기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

[0087] 배양액 내의 nitrite 농도를 측정하기 위해 Griess 반응을 이용하였다. RAW 264.7 cell을 2.5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 웰 플레이트에 접종하고 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 그 후 CNYEE를 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리하고 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS로 자극하여 24시간 본 배양하였다. 이를 4°C , 2,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 얻어 정량 실험에 사용하였다. 상층액은 Griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)과 1:1로 상온에서 10 분간 반응시켜 흡광기를 이용해 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO_2)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

[0088] 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)에서 LPS로 염증반응을 유발한 RAW 264.7 cell의 NO 생성량을 확인한 결과, LPS 만으로 염증을 유발하였을 때 NO 생성량이 $21.56 \pm 0.22 \mu\text{M}$ 로, 아무것도 처리하지 않은 PBS 처리군의 $2.38 \pm 0.15 \mu\text{M}$ 보다 약 9배 증가함을 보였다. 본 발명의 가락진두발 에탄올 추출물(CNYEE)을 처리하였을 때, LPS 단독처리군과 비교하여 농도 의존적으로 생성량을 유의성 있게 감소시킨 것을 확인하였다(도 2 참조). 특히, 비교적 낮은 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 50% 이상의 억제효과를 나타냈음을 알 수 있었다.

[0089] 따라서 가락진두발 에탄올 추출물(CNYEE)은 LPS로 유도된 대식세포에서 증가된 NO의 생성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0090] <실시예 6>

[0091] 항염증 사이토카인 분비량 측정

[0092] 가락진두발 에탄올 추출물이 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 하기와 같이 실험을 진행하였다.

[0093] 먼저, RAW 264.7 cell의 세포배양액 내의 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 사이토카인의 분비량은 ELISA kit(Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포배양액을 얻기 위해 RAW 264.7 cell을 2.5×10^5 cells/mL로 조절하여 24 웰 플레이트에 접종하고 18 시간의 전 배양 후 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도별 CNYEE와 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리하였다. 그 후 12 시간의 본배양을 거쳐 원심분리를 통해 상층액을 얻었다. ELISA는 흡광기(microplate)에 capture antibody로 anti-mouse TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 를 분주하여 4°C 에서 하룻밤 동안 코팅시켰다. 이후 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% FBS 용액으로 블락킹(blocking) 하였고 PBST로 세척한 뒤 각 흡광기 웰에 세포 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 PBST로 세척하고 희석한 biotinylated anti-mouse TNF- α , IL-6 및 IL-1 β detection antibody와 스트렙타비딘-호스래디시 페록시다아제 콘쥬게이트(streptavidin-horseradish peroxidase conjugate)를 분주하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 다시 PBST로 세척하고 OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후 흡광기(microplate reader)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- [0094] 그 결과, IL-6의 분비량은 LPS 처리 시 약 441 pg/mL으로 PBS 처리군과 비교 시 440배 증가하였으며, 가락진두발 에탄올 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL 농도로 처리하였을 때 IL-6의 분비량이 농도 의존적으로 감소하였다(도 3 참조). 특히 100 μ g/mL 농도에서는 LPS 단독 처리군과 비교하였을 때 73% 이상의 억제효과를 보였다. 또한, TNF- α 의 경우, 농도 의존적으로 분비량이 억제되었는데 LPS를 단독으로 처리하여 1584.51 $\pm$ 10 pg/mL을 분비량을 나타낸 것과 비교하여 100 μ g/mL에서는 분비량이 740.63 $\pm$ 1.18 pg/mL로 53% 이상의 억제효과를 보임을 확인하였다(도 3B 참조).
- [0095] 본 발명의 가락진두발 에탄올 추출물은 IL-1 β 분비량에서 또한 다른 사이토카인 분비 감소 결과와 마찬가지로 분비량을 농도 의존적으로 감소시켰다. 특히, 50 및 100 μ g/mL 농도에서는 50% 이상으로 감소 효과가 크게 나타났음을 알 수 있었다(도 3C 참조).
- [0096] 따라서 이러한 결과를 종합해볼 때, 가락진두발 에탄올 추출물은 항염증 사이토카인인 IL-6, TNF- α , IL-1 β 분비 억제를 통해 우수한 항염증 효과를 나타냄을 알 수 있었다.
- [0097] <실시예 7>
- [0098] iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현량 측정
- [0099] 본 발명의 가락진두발 에탄올 추출물이 세포질 내 생성되는 iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, Sheeba와 Asha의 방법에 따라 iNOS 및 COX-2의 경우 cytosol lysis buffer[50 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40]를 이용하였으며, NF- κ B의 경우 nucleus lysis buffer(10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol)를 첨가하여 30분간 4 $^{\circ}$ C에서 용해(lysis)시킨 후, 12,000 rpm에서 20 분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였으며 30 μ L의 lysate를 Laemmli의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등의 방법을 참고하여 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(Bio-Rad)에 1시간 동안 전사시켜 5% 탈지유(skim milk)가 포함된 TBSS(tris buffered saline; pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 블락킹(blocking) 하였다.
- [0100] iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF- κ B를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBSS로 3회 세정하였다. 2차 항체로 HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBSS로 3회 세정하여 ECL 기질과 1~3분간 반응 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool(GeneGnome5, Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 가시화하였다.
- [0101] RAW 264.7 세포에 가락진두발 에탄올 추출물을 0.1 ~ 100 μ g/mL 농도로 처리하고 웨스턴블롯을 통해 LPS에 의한 iNOS, COX-2 및 NF- κ B 단백질 발현 증가에 대한 억제효과를 확인하였다. 그 결과, LPS 자극에 의해 급격히 증가한 iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현량이 가락진두발 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였다(도 4 참조).
- [0102] iNOS 발현량은 가락진두발 에탄올 추출물을 100 μ g/mL로 처리하였을 때, LPS 단독 처리군에 비하여 43% 이상의 억제효과를 나타냈다. 특히, 가락진두발 에탄올 추출물은 50 μ g/mL 농도에서 COX-2 및 NF- κ B의 발현량을 45% 및 50% 이상으로 억제시켰다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 가락진두발 에탄올 추출물이 LPS에 의해 유도된 염증반응에서 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 억제함에 따라 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제함으로써 NO와 사이토카인의 분비를 효과적으로 저해한 것으로 생각된다.
- [0103] <실시예 8>
- [0104] MAP kinase (JNK, ERK, p-38) 발현량 측정
- [0105] MAPKs의 발현량을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 1 $\times$ 10⁶ cells/mL으로 18시간 전 배양하고 가락진두발 에탄올 추출물을 처리하여 30분 동안 본 배양한 후 iNOS, COX-2 및 NF- κ B와 동일한 방법으로 이후의 실험을 진행하였다. 인산화된 c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 protein kinase (p38)의 발현량을 검토하기 위하여 anti-mouse JNK, ERK 및 p38 (Cell Signalling Technology Inc., Denvers, MA, USA) 항체를 1:5,000으로 희석하여 사용하였다.

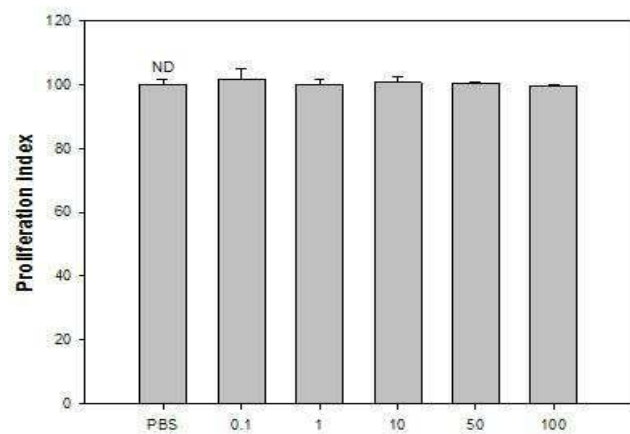
[0106] 가락진두발 에탄올 추출물에 의한 MAPKs 경로에서 단백질 발현 정도를 western blot을 통해 관찰한 결과, 가락진두발 에탄올 추출물은 MAP kinase에 있어 인산화된 3종의 MAPKs의 발현을 모두 농도 의존적으로 억제하였다 (도 5 참조). 특히 가락진두발 에탄올 추출물을 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때, p-p38의 발현량을 60%이상 억제하는 효과를 나타내었고, p-ERK와 p-JNK의 단백질 발현량 또한 LPS를 단독 처리구에 비해 각각 45% 및 65% 이상의 억제효과를 보였다.

[0107] 상기의 결과를 종합해볼 때, 가락진두발 에탄올 추출물은 대식세포에서 NF- κ B 및 MAPKs의 활성을 억제함으로써 iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인의 발현을 억제하여 염증반응에 있어 뛰어난 항염증 효과를 가지는 것을 알 수 있었다.

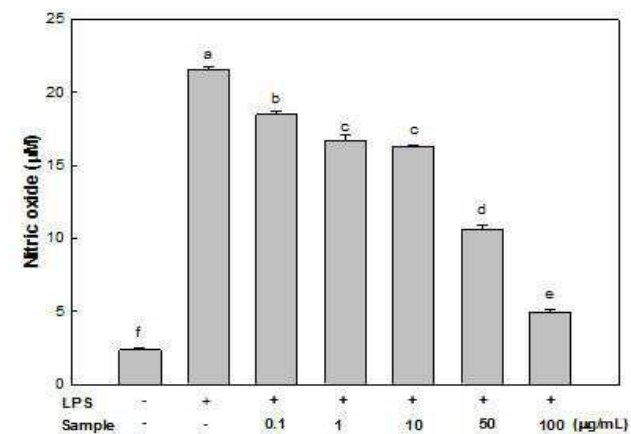
[0108] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

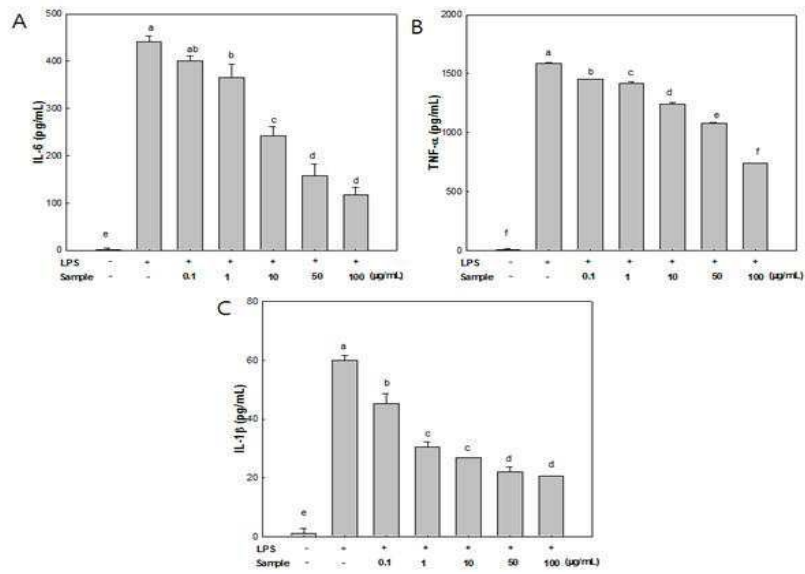
도면1



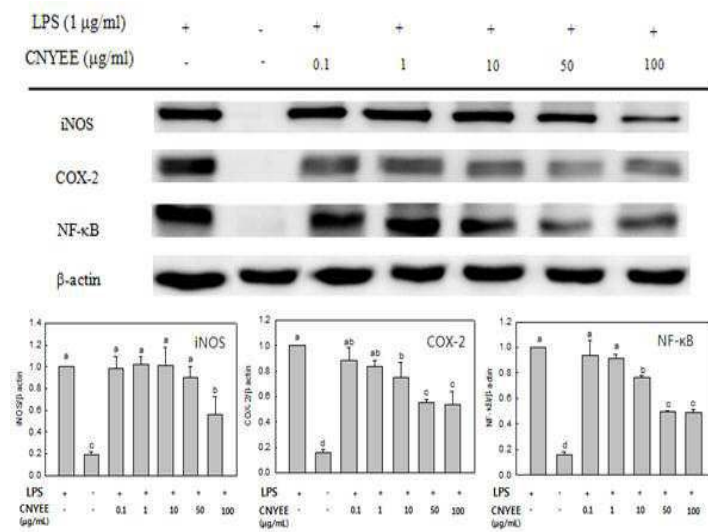
도면2



도면3



도면4



도면5

