(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
A61K 36/28 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0076613
(43) 공개일자 2007년07월25일

(21) 출원번호 10-2006-0005684
(22) 출원일자 2006년01월19일
심사청구일자 2006년01월19일

(71) 출원인 경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원캠퍼스내

(72) 발명자 박동석
서울 송파구 문정2동 훼미리아파트 210동 1503호
유명철
서울 동대문구 이문동 346-73호
최도영
경기 광주시 오포읍 신현리 현대모닝사이드1차아파트 204동1502호
이재동
서울특별시 동대문구 이문동 426번지 삼성래미안APT 204-1601호
조용백
경기 안양시 동안구 평촌동 꿈마을아파트 101동 1105호
김남재
서울 도봉구 방학동 718-7번지 이에스에이아파트 105동 802호
조은미
서울 영등포구 당산동4가 현대5차아파트 501동 203호

(74) 대리인 신동인

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 희첨 추출물을 포함하는 관절염의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 관절염에 효과를 갖는 희첨 추출물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 본 발명의 희첨 추출물은 관절 연골세포 및 연골조직에서 프로테오글리칸 및 콜라겐 분해억제효과, MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 활성 억제효과를 가지면서 세포 독성 및 형태학적 변화는 유발하지 않는 연골보호 효과를 가지며, 아라키돈산 및 크로톤오일로 유발한 동물모델에서 부종을 탁월히 억제시키고, 아세톤으로 유발한 진통에 유용한 진통억제효과를 가지며, COX-2에 의한 PGE2 활성을 억제하는 동시에 TNF-α 및 NO 생성을 유의적으로 억제시키는 염증억제효과를 가져, 효과적이고 안전한 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

희첨 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매에 가용한 추출물인 약학조성물.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 관절염은 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염 또는 루푸스 관절염인 약학조성물.

청구항 4.

관절염의 예방효과를 나타내는 희첨 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 건강기능식품.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 희첨 추출물을 함유하는 관절염 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

한의학에서 관절염은 주로 비증(痺證)으로 표현하는데 비증(痺證)의 임상표현은 주로 통증이며 통증은 병리적으로 기혈(氣血)순환의 문제로 야기될 수 있다. 주된 외적 요인은 풍(風), 한(寒), 습(濕), 열(熱) 등으로 구분할 수 있으며, 이러한 원인에 의해 관절, 근육 등의 기혈 순환 장애가 초래되고 통증이 나타나며, 심하면 관절의 운동범위의 제한이 나타난다. 내부적 요인으로는 장부(臟腑)중 간(肝)과 신(腎)에 주된 원인이 있는데, 근(筋)은 간(肝)에 속하며 간은 혈을 관장하며(肝藏血), 이것이 근골 관절을 자양(滋養)하여 간의 혈액을 조절하는 기능이 원활해야 어혈(瘀血)등 병리적 산물을 예방할 수 있다. 또한 신은 뼈를 관장하며(腎主骨) 인체의 정(精)기를 조절하는데 이 정(精)은 골수에 영양을 공급하고 골격을 자윤(滋潤)하는 기능을 한다. 따라서 관절의 이상은 간과 신의 기능과 밀접한 관련이 있어, 한의학에서 골관절염의 예방 및 치료는 이러한 원리를 바탕으로 하여 보다 근본적인 치료를 목표로 하고 있다. 대표적 골관절 질환중 하나인 퇴행성 관절염은 만성 관절염이다. 난치성 질환으로서 현재 임상에서 사용되고 있는 항염증제 위주의 약물로는 완치가 어렵고, 또한 소화장애, 위장관 장애 및 신장기능 감소 등과 같은 전신적인 부작용을 유발하여 환자의 연령이 증가할수록 부작용 발생의 빈도가 높아져 노년층에 많은 골관절질환의 치료시 장기간에 걸친 전신투여는 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 인구의 노령화에 비례하여 증가하는 퇴행성 관절염에 항염증작용 등의 대증요법적 접근보다는 좀더 적극적인 증상의 호전 및 예방을 위한 항염, 연골의 보호 및 재생효과를 목표로 한 신약의 개발이 그 어느 때보다 절실하다. 해외에서도 최근에는 항염증작용의

약물개발에서 한걸음 더 나아가 관절연골보호, 연골분해방지 및 재생촉진에 관심을 두고 관절조직분해효소 저해제, 자유라디컬 소거제(SOD등 활성산소류 제거효소), 관절조직구성성분(Chondroitin, Glucosamine etc.)의 장기 복용에 의한 보호 요법(conservation therapy) 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Badger, A.M., Cook, M.N., et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290, pp587-593, 1999; Choi, J.H., Choi, J.H., et al., *Osteoarthritis and Cartilage* 10, pp471-478, 2002).

생체에 있어서 관절염의 발생원인으로서는 다양한 생화학적인 현상이 관여하고 있으며, 특히 니트릭옥사이드(nitric Oxide; NO)를 발생시키는 효소인 니트릭옥사이드 신타제 (nitric oxide synthase; NOS)와 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생합성과 관련된 효소들이 염증 반응을 매개하여 관절염 발생에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 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.

최근의 연구 결과에 따르면, NOS는 몇가지 종류가 존재하는데 뇌에 존재하는 bNOS (brain NOS), 신경계에 존재하는 nNOS(neuronal NOS), 혈관계에 존재하는 eNOS(endothelial NOS) 등은 체내에 항상 일정수준으로 발현되고 있으며, 이들에 의해 소량 생성되는 NO는 신경전달이나 혈관확장을 유도하는 등 정상적인 신체의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데 반하여, 각종 사이토카인(cytokines)이나 외부 자극물질에 의해 유도되는 iNOS(induced NOS)에 의해 급격히 과량 발생되는 NO는 세포독성이나 각종 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 만성 염증은 iNOS 활성의 증가와 관련있다는 연구가 있다(Miller M. J. et al., *Mediators of inflammation*, 4, pp387-396, 1995 : Appleton L. et al., *Adv. Pharmacol.*, 35, pp27-28, 1996).

또한, 시클로옥시게나제도 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 염증반응시 세포내에서 급격히 증가되어 염증 반응을 일으키는 데 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Weisz A., *Biochem. J.*, 316, pp209-215, 1996). NO와 PGs의 정도를 향상시키는 iNOS 및 COX-2를 포함하는 전사 염증 인자는 관절염을 포함하는 만성 질환의 병인에 관련한다.

한편 한국, 중국 및 일본 등의 동양권에서는 수천년에 걸친 임상적 평가로서 그 효능이 검증된 상기 질환 치료제가 사용되어져 왔으며, 민간에서도 나름대로의 비법이 전수되어 활용되고 있는 실정으로서, 이에 본 연구팀에서는 이러한 처방을 토대로 개발가능성이 있는 한약물을 선별하고 보다 엄밀한 기초 연구을 통해 그 기전을 규명함으로써, 신개념의 관절염 치료 천연약물을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

한편, 본 발명에서 사용하는 생약인 희첨은 희렴이라고도 하는 한약재로 국화과에 속한 1연생 초본인 진득찰의 지상부이다. 진득찰 속 식물(Siegesbeckia spp.)로는 진득찰(Siegesbeckia glabrescence), 털진득찰(S. pubescens), 그리고 제주진득찰(S.orientalis)이 있다. 일년생 초본으로 높이는 50 ~ 100 cm이며, 줄기는 직립하고 보통 자색을 띤다. 전국 산비탈이나 길가에 자라는 진득찰 및 동속 근연식물이라고 일컫는 것으로서 여름에 꽃이 피기 전에 전초를 베어 불순물을 버리고 볕에 반쯤 말린 후에 다시 바람이 잘 통하는 곳에 옮겨 말린 것을 약재로 사용하여온 한방 생약이다. 한방에서는 예로부터 사지 마비, 근육통, 학질, 급성 간염, 고혈압, 외상 출혈 등을 치료하는 목적으로 사용되어 왔다. 지금까지 알려진 주요 성분으로는 16-아세틸-키레놀, 다루티제놀, 다루토사이드, 이소프로필리데네키레놀, 키레놀, 네오다루토사이드, 시에제스벡키올(siegesbeckiol), 시에제스벡키오사이드(siegesbeckioside) 등의 디테르펜 류가 알려져 있다 (중약대사전, 도서출판 정담, pp6660-6666, 1998년). 희첨에 관계된 문헌보고로는 히스타민 유리의 저해작용(J. Ethnopharmacol., 57, PP73~79, 1997), 육모제 조성물(대한민국 특허 등록번호 제 165937호) 등이 있고, 최근에 희첨 추출물이 당뇨병에도 유효하다는 연구 결과가 있으나, 관절염질환과 관련하여서는 아직까지 연구된 바 없다.

본 발명은 한의학에서는 중풍, 고혈압과 종창 등의 치료에 처방되는 약재로 알려진 희첨을 보다 과학적으로 이용하고자 노력한 결과, 희첨 추출물이 관절 연골세포 및 연골조직에서 프로테오글리칸 및 콜라겐 분해억제효과, MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 활성 억제효과를 가지면서 세포 독성 및 형태학적 변화는 유발하지 않는 연골보호 효과를 가지며, 아라키돈산 및 크로톤오일로 유발한 동물모델에서 부종억제효과, 아세톤으로 유발한 진통에 진통억제효과를 가지며 COX-2에 의한 PGE2 활성억제효과 및 TNF-α 및 NO 생성을 억제하는 항염효과를 확인하여 관절염 치료 및 예방용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 희첨 추출물을 효과적이고 안전한 관절염 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품으로 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 희첨 추출물을 포함하는 관절염의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 에탄올과 물의 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.

상기 관절염은 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염, 루푸스(Lupus) 관절염을 포함한다.

본 발명의 희첨로부터 추출물을 분리하는 방법은 하기와 같다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

예를 들어, 본 발명의 희첨 추출물은 희첨을 음건하여 마쇄한 후, 건조된 시료의 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 5 내지 15배 분량의 물, 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 약 1:0.1 내지 1:10, 바람직하게는 1:0.2 내지 1:5의 혼합비(kg/L)를 갖는 물과 에탄올의 혼합용매로, 실온에서 약 0.5 내지 20시간, 바람직하게는 1 내지 10시간 동안 교반추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 열수 추출한 후 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 건조하여 본 발명의 추출물을 얻을 수 있다.

또한, 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있다(Harborne J.B., Phytochemical methods: *A guide to modern techniques of plant analysis,* 3rd Ed., pp6-7, 1998).

상기와 같은 방법으로 얻어진 희첨 추출물은 관절 연골세포 및 연골조직에서 프로테오글리칸 및 콜라겐 분해억제효과, MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 활성 억제효과를 가지면서 세포 독성 및 형태학적 변화는 유발하지 않는 연골보호 효과를 가지며, 아라키돈산 및 크로톤오일로 유발한 동물모델에서 부종을 탁월히 억제시키고, 아세톤으로 유발한 진통에 유용한 진통억제효과를 가지며 COX-2에 의한 PGE2 활성을 억제하는 동시에 TNF-α 및 NO 생성을 유의적으로 억제시키는 항염효과를 확인함으로써, 효과적이고 안전한 관절염 예방 및 치료에 탁월한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

본 발명은 상기 제조방법으로 얻어지는 희첨 추출물을 유효성분으로 함유하고, 관절염 질환 예방 및 치료에 효과적인 약학조성물을 제공한다.

본 발명의 관절염 질환 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 ~ 50 중량%로 포함한다.

본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 희첨 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 화피 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출액에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포

함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 희첨 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

본 발명의 희첨 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

본 발명은 관절염 예방 및 치료의 효과를 나타내는 상기 희첨 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품을 제공한다. 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등이 있다.

또한, 관절염의 예방 및 치료 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 희첨 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

상기 외에 본 발명의 희첨 추출물은 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 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 희첨 추출물 제조

경희의료원 한방병원에서 구입한 희첨을 약 1.0cm 정도의 크기로 세절하여 250 g을 고루 섞은 후, 2 L의 50%(v/v) 에탄올을 가해 잘 교반하여 주면서 6 시간 환류 추출하였다. 여액을 취하여 모으고 잔사에 1.5 L의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 3 시간 재 가온 추출한 후 여액을 모두 합하여 1 L로 농축후, 동결 건조하여 분말상태의 희첨 추출물 31.1g을 얻어 본 발명의 시료로 사용하였다(이하 SP라 명명함).

참고예 1. 연골 세포 및 연골 조직 준비

사람의 관절연골은 인공관절 수술을 받는 환자의 샘플을 이용하였고, 토끼의 관절연골은 5주령 토끼(Samtako Biokorea Co., 대한민국)의 관절에서 채취하였으며, 연골세포는 2주령 토끼(Samtako Biokorea Co., 대한민국)의 관절에서 채취하였다.

1-1. 연골조직 배양

멸균상태에서 수술을 통하여 관절 표면을 드러낸 후, 대략 200-220 mg의 관절 표면을 취하여 배지(열처리로 비활성화된 5% fetal bovine serum(FBS)와 페니실린-스트렙토마이신 100 unit/ml이 함유된 DMEM)에 담가 놓았다. 조직을 배지로 수차례 씻어 낸 다음 37℃의 습한 95% CO_2 배양기에서 1-2일간 배양하였다. 기존 배지를 기본 배지(열처리로 비활성화된 5% fetal bovine serum ; FBS), 10 mM HEPES 및 페니실린-스트렙토마이신 100 unit/ml이 함유된 DMEM)로 교체하였고, 30mg의 관절 조직을 48-웰 플래이트에 옮겨 놓은 후, 희첨 추출물을 처리하였다. 1시간동안 배양후, 인터루킨-1α 5ng/mL을 배지에 넣어 염증을 유발시키고, 37℃ 3일간 더 배양하였다. 상등액을 수거하였고, 시약이 들어있는 신선한 배지로 옮겼으며, 25일간 더 배양하였다. 3, 7, 14, 28일이 되는 때에 상등액을 수집하였으며, 이를 -20℃에 보관하였다.

1-2. 연골세포의 배양

멸균상태에서 관절조직을 PBS가 담긴 배양접시에 담그고, 관절조직에서 필요없는 살을 가위로 제거한 후 아래쪽과 위쪽 다리를 분리하기 위해 뼈가 서로 맞닿는 부위를 칼로 잘라 뼈를 분리하였다. 약 0.5mm 두께로 평균 2*2mm 넓이의 조직편을 PBS로 3회 이상 세척한 후, 0.2% 2형 콜라게나아제를 첨가하고 CO2 배양기에서 약 6시간 반응시키면서 30분 간격으로 흔들어 주었다. 1200rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 새 튜브에 모으고, 이 과정을 3회 반복하여 단일 분리된 세포만을 수집하였다. 배양접시 당 $28.36 * 10^5$ 세포/100mm 농도로 접종 후 컨플리언트 상태가 되면 계대해 주었다. 5계대가 되면 6, 96 웰 플래이트에 세포수를 일정수 분주하여 배양한 후 각각의 웰에 희첨 추출물 시료를 농도별로 첨가하여 각각 48시간, 72시간 배양후, 인터루킨-1α 5ng/mL을 배지에 넣어 염증을 유발시키고, 37℃ 3일간 더 배양하였다. 상등액을 수거하였고, 시약이 들어있는 신선한 배지로 옮겼으며, 25일간 더 배양하였다. 3, 7, 14, 28일이 되는 때에 상등액을 수집하였으며, 이를 -20℃에 보관하였다.

참고예 2. RT-PCR

PCR은 Thermal cycler(Bio-Rad, U.S.A)의 기종을 사용하였으며, 분리된 RNA를 94℃에서 5분간의 열변성 후 94℃에서 60초, 55℃에서 60초, 72℃에서 90초를 1회로 하여 30회 반응시켰고, 최종증폭(last extension)은 72℃에서 5분간 수행하였다. PCR 반응 산물 20㎕와 6 * 겔 로딩 버퍼 4㎕를 섞은 후 1.8% 아가로스 겔에 로딩한 후 전기영동 (5V/cm) 하였다. 전기영동 후 EtBr 2㎍/ml 로 5분간 염색하고 증류수로 10분간 세척한 다음, 자외선(260nm)하에서 관찰하였다.

실험예 1. 연골보호 효과 측정

연골 생성 요소인 프로테오글리칸이나 콜라겐을 빨리 생산해내지 못하며, 연골의 쿠션기능이 없어지면 연골이 상하고, 관절염이 유발한다. 관절 연골은 물(70~80%), 콜라겐(10~15%), 프로테오글리칸(5~10%), 연골세포로 구성되어있으며, 프로테오글리칸은 한 줄의 중심단백(core protein)에 여러 개의 글리코스아미노글리칸(GAG; glycosaminoglycan)이 붙어 있는 구조를 가지고 있다.

본 발명의 희첨 추출물의 프로테오글리칸과 콜라겐 분해억제 효과를 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 실시하였다.

1-1. 글리코스아미노글리칸(GAG) 분해정도 측정

본 발명의 희첨추출물의 사람 및 토끼의 관절 연골조직 보호효과를 측정하기 위해 프로테오글리칸을 구성하는 GAG의 분해정도를 알아보는 하기와 같은 실험을 실시하였다 (French, M.M., et al., *Ann. Biomed. Eng.* 32, pp50-56, 2004).

상기 참고예 1-1의 방법으로 배양된 연골조직의 배지 중 GAG 수치는 1,9-디메칠메틸렌블루와 반응한다. 음이온성(polyanionic)물질의 양에 의해 측정하였으며, 표준물질로는 황산콘드로이틴(chondroitin sulfate)을 사용하였고, 양성대조군으로 Df (diclofenac)을 처리하였다. 540 nm에서 분광학적 GAG량을 측정하였고, 인터루킨 1α로 유도된 GAG 분해량을 기준으로 억제율을 계산하여 나타내었다.

실험결과 하기 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 희첨추출물은 배지중으로의 GAG 분해를 탁월히 억제하여, 인터루킨 1α로 유도된 연골세포 분해를 농도 의존적으로 유의하게 억제함을 확인할 수 있었고, 양성대조군으로 사용한 디클로페낙과 비교시, 희첨 추출물이 사람연골조직에서 GAG 분해를 더 효과적으로 억제하였다.

1-2. 프로테오글리칸 유전자 분해정도 측정

상기 실시예에서 얻어진 희첨 추출물을 토끼 연골조직 및 연골세포를 이용하여 프로테오글리칸 분해억제 효과를 RT-PCR을 실시하여 알아보았다.

실험결과 하기 도 2에 나타낸 바와 같이 본 발명의 희첨 추출물은 토끼 연골조직 및 연골세포에서 프로테오글리칸 발현을 농도 의존적으로 증가시켜 연골조직 및 연골세포를 동시에 보호하는 효과를 나타내었다.

1-3. 배지중 제 II형 콜라겐 농도 측정

본 발명의 희첨추출물의 관절 연골세포 보호효과를 측정하기 위해 관절의 구성성분인 콜라겐의 분해정도를 알아보는 하기와 같은 실험을 실시하였다.

배지 중 제 II형 콜라겐 수치는 Sircol 콜라겐 시험법(Liu., X.D., et al., *J. Lab. Clin. Med.* 137, pp208-219, 2001)을 사용하여 측정하였다. 시료을 설폰산이 함유된 사이리스 레드 염료(Sirius red dye)와 실온에서 30분 동안 반응시킨 후, 540nm에서 반응액의 광학 밀도(optical density)를 측정하였다. 사람 연골조직에서 인터루킨 1α로 유도된 콜라겐 분해량을 기준으로 본 발명의 추출물의 콜라겐 분해 억제율(%)을 계산하여 나타내었다.

실험결과 하기 도 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 희첨추출물은 배지중의 콜라겐의 농도를 탁월히 억제하였고, 손상된 사람의 연골조직의 생성을 회복시킴을 확인할 수 있었고, 양성대조군으로 사용한 디클로페낙 (Df)처리군과 비교시 희첨추출물 0.2㎎/㎖의 낮은 농도에서 인터루킨 1α로 유도된 콜라겐 분해를 더 효과적으로 억제하여 탁월한 연골보호효과를 확인할 수 있었다.

1-4. 제 II형 콜라겐 유전자(Col II) 발현 측정

상기 실시예에서 얻어진 희첨 추출물의 Col II 발현정도를 확인하기 위해, 상기 참고예 1-1 및 1-2의 토끼 연골조직 및 연골세포를 이용하여 RNA를 분리한 후 참고예 2의 방법으로 RT-PCR을 실시하였다.

실험결과, 하기 도 4에 나타난 바와 같이, 희첨 추출물 0.01 ㎎/㎖ 농도 처리군에서 Col II 유전자 발현을 유의적으로 억제시켜 콜라겐의 분해를 저해함을 확인할 수 있었다.

1-5. 배지중 MMP-1 및 MMP-13 농도 측정

MMP (Matrix metalloproteinase)는 연골조직의 단백질을 파괴하는 단백질 분해효소의 일종으로 류마티스 관절염은 물론 골관절염에서 연골조직을 파괴하여 관절염을 악화시키는 역할을 하므로 이들의 생산을 억제하는 것은 관절의 연골보호 측면에서 특히 중요하다(Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr Marcel Dekker, NY., pp159-185, 1993)

상기 실시예에서 얻어진 희첨 추출물을 상기 참고예 1-1의 사람 연골조직을 이용하여 MMP 생성 억제효과를 ELISA 키트(Biomol Research Lab., Inc., PA, USA)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 간단히 설명하면, MMP 활성은 스트로미에린(stromyelin)-1/MMP-3 및 콜라게나아제-3/MMP-13에 의해 잘려지는 표색기질(Colorimetric substrate)로써, 티오펩토라이드 (Thiopeptolide; Ac - Pro - Leu - Gly - [2 - mercapto - 4 - methyl - pentanoly] - Leu - Gly - OC2H5)를 이용하여 측정하였다. 프로테라이틱(Protelytic) 활성을 측정하기 위해 각 시료를 25 ㎕씩 96 웰 플래이트에 효소와 함께 분주하였으며, 37℃에서 1시간 동안 배양한 후 450nm에서 측정하였다. 각 시료의 MMP-1 및 MMP-13 활성은 각 배지 웰에 들어있는 MMP의 %로 측정하여 하기 도 4에 나타내었다.

실험결과 도 5에 나타낸 바와 같이 본 발명의 희첨 추출물은 인터루킨-1α 로 유도된 단백질 분해효소 MMP-1 및 MMP-13의 활성을 0.01, 0.2, 0.4 ㎎/ml 처리군에서 농도의존적으로 유의성있게 억제시켰다. 또한 양성대조군으로 사용한 diclofenac 처리군과 비교시 0.2 mg/ml의 농도에서 본 발명의 희첨 추출물이 MMP-1 및 MMP-13의 활성을 더 효과적으로 억제시킴을 확인할 수 있었다.

1-6. MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 유전자 발현 억제 측정

희첨 추출물을 상기 참고예 1-1 및 1-2의 토끼 연골조직 및 토끼 연골세포를 이용하여 MMP 생성 억제효과를 알아보기 위해 참고예 2의 RT-PCR을 실시하였다.

실험결과 도 6에 나타낸 바와 같이 본 발명의 희첨 추출물은 토끼 연골조직에서는 MMP-1, MMP-3 및 MMP-13의 발현을 유의적으로 억제시켰다. 연골세포에서는 MMP-1의 발현이 현저히 농도 의존적으로 억제시켰으며, MMP-3 및 MMP-13의 발현은 MMP-1에 비해 약한 억제활성을 보였으나, 농도 의존적으로 유전자의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다.

1-7. 세포독성 측정

본 발명의 희첨 추출물이 연골세포중 하나인 콘드로사이트의 생존능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 상기 참고예 1-1 및 1-2의 사람 연골조직 및 토끼의 연골세포를 이용하여 하기의 방법으로 실험을 실시하였다.

세포의 생존능력의 지표로써 LDH (cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase; Promega Corp., Madison, WI, 미국)와 MTT(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide)를 측정하였다 (S.M. Hussain, S.M., et al., *Toxicol. In Vitro*, 19, pp975-983, 2005)

무처리군, 희첨 추출물의 농도별 처리군로 3일간 배양 후 배양액을 수거하였다. TBT (Tris-buffered Tetrazolium)용액(INT-chloride)으로 기질파우더 (diaphorase, lactate, NAD)를 녹인 후, 배양액 50 uL과 기질 혼합액 50 uL를 섞어준 후 30분간 실온에서 반응시켰다. 정지액을 50 uL 넣은 후 배양 배지의 흡광도를 490nm에서 측정하여 LDH 활성을 정량하였다.

MTT 어세이는 연골세포중 하나인 콘드로사이트를 96 웰 플래이트에 분주한 후 각각의 웰에 희첨추출물을 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ug/ml 의 농도로 첨가하여 72시간 배양한다. WST-8 (water-soluble tetrazolium salt)용액을 첨가후 약 2시간 배양하여 WST-8 코르마잔이 형성되면 흡광도 450 nm에서 측정하였다.

실험결과 하기 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 희첨 추출물은 사람 연골조직에서 0.4mg/ml 처리 후 3일간 배양액에서도 콘드로사이트 생존에 영향을 미치지 않았고, 토끼 연골세포에서는 100ug/ml 처리후 3일간 배양액에서 콘드로사이트 생존에 영향을 미치지 않았다. 따라서 연골조직 및 연골세포 모두에서 세포독성을 나타내지 않아 희첨 추출물이 안전한 조성물임을 확인할 수 있었다.

1-8. 형태 보전정도 측정

본 발명의 희첨 추출물이 연골 또는 콘드로사이트의 세포형태에 대한 영향을 확인하기 위해 하기의 방법으로 시험을 실시하였다.

상기 참고예 1-1의 방법으로 배양된 사람 및 토끼의 연골조직 조각을 10% 중성 포르말린에 고정시킨 후, 에탄올로 탈수하였고, 파라핀으로 처리 후 4 μm 두께의 얇은 절편으로 잘랐다. 현미경 검사를 위해 절단된 조직을 H&E (hematoxylin과 eosin)으로 염색하였다.

연골조직에서의 프로테로글리칸과 콜라겐을 각각 염색하기 위하여 사프라닌 O(Safranin O)와 맷슨 트리크롬(Masson's Trichrome) 염색을 실시하였다(Muir, H. M., Hardingham, T. E., *Churchill Livingstone, Edinburgh* , pp177-198, 1986). 시료에 대한 사전 정보가 전혀 없는 병리학자가 염색된 슬라이드를 판독하였으며, 200배율의 렌즈로 측정 후 사진 촬영 하였다.

실험결과 하기 도 8에 나타낸 바와 같이, 사람 연골조직에서는 무처리군에 비해 인터루킨-1α로 유도된 연골조직은 프로테로글리칸과 콜라겐의 손실이 유도되어 염색 후 발색정도가 흐려졌고, 연골세포의 수가 줄어들었다. 그러나 본 발명의 희첨 추출물은 인터루킨-1α로 유도된 연골조직의 손실을 회복시켜, 사프레닌 O 에 의해 염색된 프로테오글리칸의 농도가 높아졌음을 확인하였다. 한편 토끼의 연골조직에서도 프로테오글리칸과 콜라겐을 각각 사프레닌 O 와 맷슨 트리크롬 염색을 실시한 결과, 희첨 추출물은 인터루킨-1α로 유도된 연골조직의 손실을 회복하여 각각 염색정도가 진하게 발색되었고, 감소되었던 연골세포의 수가 증가함을 확인하는 동시에, 형태적 변화를 나타내지 않았음을 확인할 수 있었다.

실험예 2. 진통 및 소염활성 측정

2-1. 진통 시험

본 발명의 희첨 추출물의 진통 효과를 알아보기 위해 초산유도 진통시험을 실시하였다(B.A. Whittle, *Brit. J. Pharmacol.*, 22, pp246-253, 1964).

실험동물로 수컷 ICR 마우스(체중 20-25g)를 각 군당 10마리씩 사용하였다. 희첨추출물을 경구투여 후, 1시간 후에 0.7% 아세트산 (v/v in DW)을 복강투여하여 통증을 유발하였다. 다음 5분 후부터 10분간 동물을 관찰하여 뒤틀림(writhing) 횟수를 기록하고, 음성대조군의 횟수를 기준으로 억제율을 표시하였다.

[표 1]

구분	농도 (mg/kg)	부종 억제율(%)
희첨 추출물 (SP)	500	71.1
셀레콕시브 (celecoxib)	100	61.9

상기 표 1에서 보는 바와 같이, 본 발명의 희첨 추출물(SP)은 탁월한 진통효과를 나타내었고, 희첨추출물의 진통억제효과가 비스테로이드 소염진통제인 셀레콕시브보다 탁월한 억제효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

2-2. 아라키돈산유발 동물모델 시험

아라키돈산은 혈소판의 응고, 동맥경화, 심장병, 염증 등을 일으키는 프로스타그란딘의 전구체로 염증을 발생시키는 주요한 원인이 되는 물질이다. 상기 실시예의 희첨 추출물의 소염 활성을 평가하기 위해 아라키돈산(arachidonic acid)으로 부종을 유발한 마우스를 이용하여 하기의 실험을 실시하였다.

실험동물로 수컷 ICR 쥐(체중 20-30g)을 각 군당 6마리씩 사용하였다. 희첨 추출물(SP)을 경구투여 후, 1시간 후에 50㎎/㎖ 아라키돈산 (v/v in acetone)을 오른쪽 귀의 안쪽과 바깥쪽에 골고루 도포하여 귀의 부종을 유발하였다. 1시간 후 왼쪽 귀와 비교하여 귀두께의 증가율을 계산하여 하기 표 2에 나타내었다.

[표 2]

구분	농도 (mg/kg)	부종 억제율(%)
희첨추출물 (SP)	500	21.04
셀레콕시브 (celecoxib)	100	25.29

실험결과, 상기 표 2에서 나타낸 바와 같이 본 발명의 희첨 추출물은 실험쥐에 유발된 귀의 부종을 비스테로이드계 소염진통제인 셀레콕시브(celecoxib)와 유사한 억제효과를 나타내어 우수한 소염효과를 확인할 수 있었다.

2-3. 크로톤 오일유발 동물모델 시험

크로톤 오일(Croton oil)은 피부에 도포하면 도포면에 발적, 종창, 수포가 생기는 염증작용을 일으킨다. 상기 실시예의 희첨 추출물의 소염 활성을 평가하기 위해 크로톤 오일로 부종을 유발한 마우스를 이용하여 하기의 방법으로 실시하였다.

실험동물로 수컷 ICR 마우스(체중 20-30g)를 각 군당 6마리씩 사용하였다. 희첨 추출물(SP)을 경구투여 후, 1시간 후에 2.5% 크로톤오일 (v/v in acetone)을 오른쪽 귀의 안쪽과 바깥쪽에 골고루 도포하여 귀의 부종을 유발하였다. 4시간 후 왼쪽귀와 비교하여 귀두께의 증가율을 계산하여 하기 표 3에 나타내었다.

[표 3]

구분	농도 (mg/kg)	부종 억제율(%)
희첨추출물 (SP)	500	31.18
셀레콕시브 (celecoxib)	100	33.12

실험결과, 상기 표 3에서 나타낸 바와 같이 본 발명의 희첨 추출물은 실험쥐에 유발된 귀의 부종을 비스테로이드계 소염진통제인 셀레콕시브(celecoxib)와 유사한 정도로 억제시켜, 우수한 소염활성을 확인할 수 있었다.

2-4. PGE2 활성 억제실험

본 발명의 희첨 추출물의 PGE2저해 활성을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

DMEM 배지 (10% 열처리 비활성화 FBS, 100 U/㎖ streptomycin, 100 U/㎖ penicillin 첨가)가 담긴 6-웰 플레이트에서 37℃, 5% CO_2 의 환경에서 배양한 RAW264.7 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 5 X 10^5세포/ml 농도로 희석하고, 희석된 세포를 96 웰 플래이트에 200㎕씩 분주하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료 투여 4시간 전에 아스피린 500 uM 을 처리하여 세포내에 존재하는 COX-1 의 기본양의 활성 및 발현을 억제시켜 COX-2 활성에 의한 PGE2 활성만을 정량하였다. 본 발명의 희첨 추출물 (sp)을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하고, ELISA 방법 (Endogen, Cambridge, MA)으로 배지중의 PGE2 농도를 측정하여 각 시료들의 염증성 반응 억제 효과를 알아보았다. 무처리군을 0 으로 기준하여 저해율을 %로 계산하였다.

[표 4]

실험군	처리농도	저해율(%)
무처리군(음성대조군)	0	0
희첨추출물 (SP)	30㎍/㎕	14.5
	100㎍/㎕	25.6
	300㎍/㎕	47.5
디클로페낙(Diclofenac)	30μM	12.4
셀렉콕시브(Celecoxib)	30μM	67.5

실험 결과, 상기 표 4에 보이는 바와 같이 본 발명의 희첨 추출물(SP)이 PGE2 발현을 농도의존적으로 억제하였고, 대조군으로 사용한 비선택적 COX-2 저해제인 디클로페낙은 억제효과가 거의 없었으나, 선택적 COX-2 저해제인 셀렉콕시브는 탁월한 억제효과를 보여 COX-2 활성억제에 의한 PGE2활성억제를 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명의 희첨 추출물은 셀레콕시브와 같이 선택적 COX-2 저해효과를 보여 PGE2활성을 억제함을 확인할 수 있었다.

2-5. TNF-α 억제 실험

TNFα는 감염성 미생물에 대한 자연 면역 반응에 있어 초기 염증 반응을 유도하는 중요한 염증성 사이토카인이며 류마티스 관절염은 물론 골관절염에서 관절조직의 염증반응을 촉진하는 역할을 하므로 질병의 중요한 지표가 된다.

DMEM 배지 (10% 열처리 비활성화 FBS, 100 U/㎖ streptomycin, 100 U/㎖ penicillin 첨가)가 담긴 6-웰 플레이트에서 37℃, 5% CO_2 의 환경에서 배양한 RAW264.7 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 실험에 사용하였다. 준비된 세포를 다시 6-웰 평판 플레이트에 2×10^4 세포/웰의 농도로 조정한 후, 세포에 LPS를 1 ㎎/㎖ 농도로 처리하여 자극하였다. 본 발명의 희첨 추출물(sp)을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하고, ELISA 방법(Endogen, Cambridge, MA)으로 배지중의 TNFα 농도를 측정하여 각 시료들의 염증성 반응 억제 효과를 알아보았다.

[표 5]

구 분	농도 (μg/mL)	TNF-α (pg/ml)
LPS 처리 + SP	10	3.43
	50	2.15
	200	1.02
무처리	-	0.85
LPS 처리	-	3.67

상기 실험 수행결과, 상기 표 5에서 보이는 바와 같이, 본 발명의 희첨 추출물이 LPS로 유도된 TNF-α 생산을 농도 의존적으로 억제하여 탁월한 염증 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있다.

2-6. NO 생성 억제 시험(*in vitro*)

본 발명의 희첨 추출물의 산화질소 저해 활성을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

NO 합성의 표지인 아질산 축적(Nitrite accumulation)은 그리에스(griess) 반응에 의하여 배지에서 측정되었다. 복막 대식세포주(peritoneal macrophage)를 10% FBS, 페니실린(100 unit/㎖), 스트렙토마이신 설페이트(100㎍/㎖)가 포함된 RPMI 배지에서 37℃, 5% 이산화탄소의 환경에서 배양하였으며, 희첨 추출물 각각 1, 10, 100, 300㎍/㎖ 및 LPS 1㎎/㎖와 IFN-gamma 1 ng/㎖와 함께 96-웰 플레이트에 1 X 10^5 cells/well 농도가 되도록 배양하였다. 세포 배지 100㎕를 그리에스 시약(5%(v/v), 인산 및 0.1% (w/v) 나프틸에틸렌디아민-염산에 용해된 동량의 1% (w/v) 설파닐아미드) 100㎕에 혼합한 후, 실온에서 10분 동안 배양하였으며, 그후 마이크로 플레이트 리더(Power Wave 340, Bio-Tek, 미국)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 신선한 배지는 모든 실험에서 무처리군으로 사용하였다. 시료에서의 산화질소의 양은 배지에서 준비된 소듐 니트라이트(sodium nitrite) 표준 곡선으로부터 계산되었다.

[표 6]

구 분	농도 (μg/mL)	NO (μg/ml)
SP 처리군	1	47.32
	10	21.33
	100	10.51
	300	4.41
LPS 처리군	-	51.97
무처리군	-	1.61

실험 결과 상기 표 6에 나타낸 바와 같이, LPS로 유도된 NO 생성은 약 32.5배 정도이며, 희첨 추출물(SP)의 투여 의존적(dose-dependent)으로 NO 생성을 저해함을 확인할 수 있었다.

실험예 3. 랫트에 대한 경구투여 급성 독성실험

6주령의 특정병원부재(SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 다음과 같이 실시하였다.

군당 2 마리씩의 동물에 본 발명의 희첨 추출물(SP)을 용해시켜 1 g/kg/㎖의 용량으로 단회 경구 투여하였다. 추출물을 투여한 후 동물의 폐사 여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다. 그 결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 발명에 따른 희첨 추출물은 모든 랫트에서 5,000 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않으며 경구 투여 최소 치사량(LD_{50})은 5,000 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

하기에 본 발명의 추출물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

제제예 1. 산제의 제조

희첨 추출물 20 mg

유당 100 mg

탈크 10 mg

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

제제예 2. 정제의 제조

희첨 추출물 10 mg

옥수수전분 100 mg

유당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

제제예 3. 캅셀제의 제조

희첨 추출물 10 mg

결정성 셀룰로오스 3 mg

락토오스 14.8 mg

마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

제제예 4. 주사제의 제조

희첨 추출물 10 mg

만니톨 180 mg

주사용 멸균 증류수 2974 mg

$Na_2HPO_{4,}12H_2O$ 26 mg

통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2㎖) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

제제예 5. 액제의 제조

희첨 추출물 20 mg

이성화당 10 g

만니톨 5 g

정제수 적량

통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100㎖로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

제제예 6. 건강 식품의 제조

희첨 추출물 1000 ㎎

비타민 혼합물 적량

비타민 A 아세테이트 70 ㎍

비타민 E 1.0 ㎎

비타민 B1 0.13 ㎎

비타민 B2 0.15 ㎎

비타민 B6 0.5 ㎎

비타민 B12 0.2 ㎍

비타민 C 10 ㎎

비오틴 10 ㎍

니코틴산아미드 1.7 ㎎

엽산 50 ㎍

판토텐산 칼슘 0.5 ㎎

무기질 혼합물 적량

황산제1철 1.75 ㎎

산화아연 0.82 ㎎

탄산마그네슘 25.3 ㎎

제1인산칼륨 15 ㎎

제2인산칼슘 55 ㎎

구연산칼륨 90 ㎎

탄산칼슘 100 ㎎

염화마그네슘 24.8 ㎎

상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

제제예 7. 건강 음료의 제조

희첨 추출물 1000 ㎎

구연산 1000 ㎎

올리고당 100 g

매실농축액 2 g

타우린 1 g

정제수를 가하여 전체 900 ㎖

통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

발명의 효과

본 발명의 희첨 추출물은 관절 연골세포 및 연골조직에서 프로테오글리칸 및 콜라겐 분해억제효과, MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 활성 억제효과를 가지면서 세포 독성 및 형태학적 변화는 유발하지 않는 연골보호 효과를 가지며, 아라키돈산 및 크로톤오일로 유발한 동물모델에서 부종을 탁월히 억제시키고, 아세톤으로 유발한 진통에 유용한 진통억제효과를 가지며 COX-2에 의한 PGE2 활성을 억제하는 동시에 TNF-α 및 NO 생성을 유의적으로 억제시키는 항염효과를 확인함으로써, 효과적이고 안전한 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 희첨 추출물이 사람 및 토끼의 연골조직에서 인터루킨-1α에 의해 유도된 프로테오글리칸 (proteoglycan) 분해의 억제활성을 배지중 GAG (Glycosaminoglycan)의 농도를 통해 확인한 것이고,

도 2는 본 발명의 희첨 추출물이 토끼의 연골조직 및 연골세포에서 인터루킨-1α에 의해 유도된 프로테오글리칸 분해의 억제활성을 RT-PCR을 통해 프로테오글리칸 유전자 발현을 확인한 것이고,

도 3은 본 발명의 희첨 추출물이 사람의 연골조직에서 인터루킨-1α에 의해 유도된 콜라겐 분해의 억제활성을 배지중 제2형 콜라겐(type 2 Collagen)의 농도를 통해 확인한 것이고,

도 4는 본 발명의 희첨 추출물이 토끼의 연골조직 및 연골세포에서 인터루킨-1α에 의해 유도된 콜라겐 분해의 억제활성을 RT-PCR을 통해 제2형 콜라겐 유전자(Col II) 발현을 확인한 것이고,

도 5는 본 발명의 희첨 추출물이 사람의 연골조직에서 인터루킨-1α에 의해 유도된 MMPs의 억제활성을 ELISA 키트를 이용하여 수치로 나타낸 것이고,

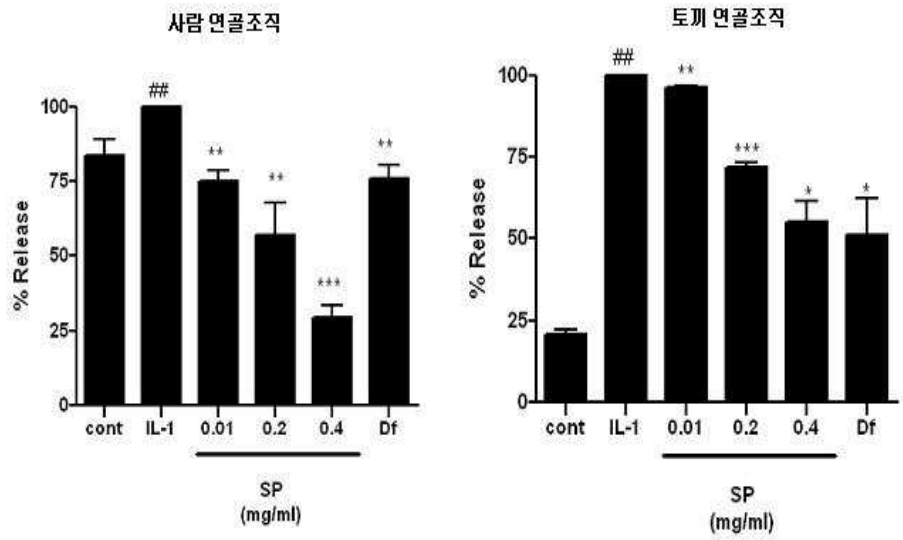
도 6는 본 발명의 희첨 추출물이 토끼의 연골조직 및 연골세포에서 인터루킨-1α에 의해 유도된 MMPs의 억제활성을 RT-PCR을 통해 MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 유전자 발현을 확인한 것이고,

도 7은 사람 연골조직 및 토끼 연골세포에 본 발명의 희첨 추출물 처리시 세포독성여부를 LDH 와 MMT를 통해 알아본 도이고,

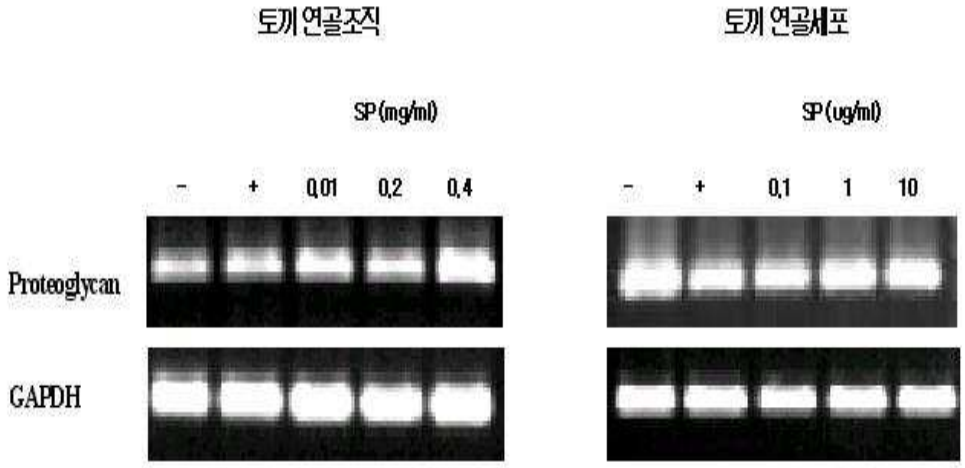
도 8은 사람 및 토끼의 연골조직에 본 발명의 희첨 추출물 처리시 형태학적 변화를 사프레닌 O 염색 및 멧슨 트라이크롬 염색을 통해 알아본 도이다.

도면

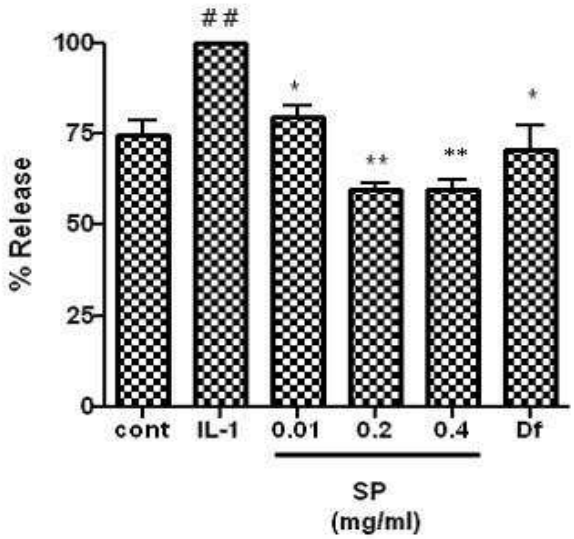
도면1



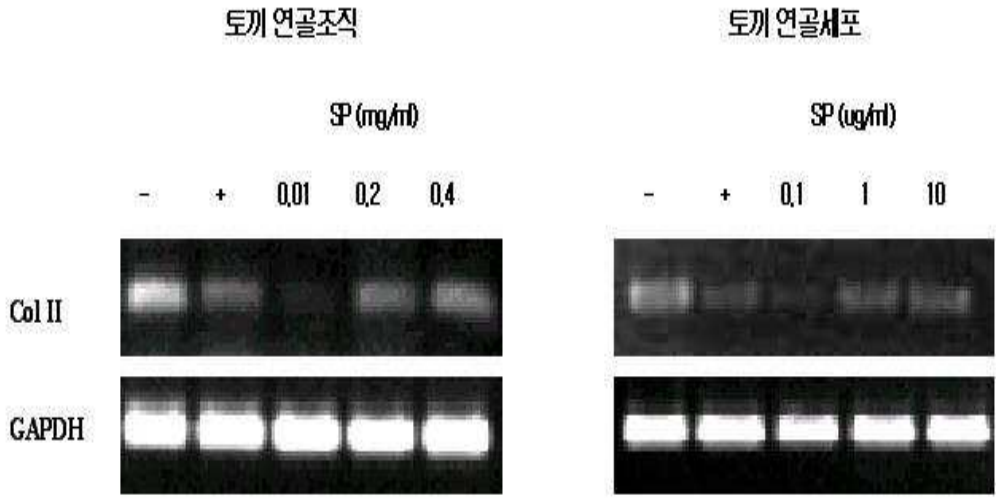
도면2


토끼 연골조직
토끼 연골세포
SP (mg/ml)
SP (ug/ml)
- + 0.01 0.2 0.4
- + 0.1 1 10
Proteoglycan
GAPDH

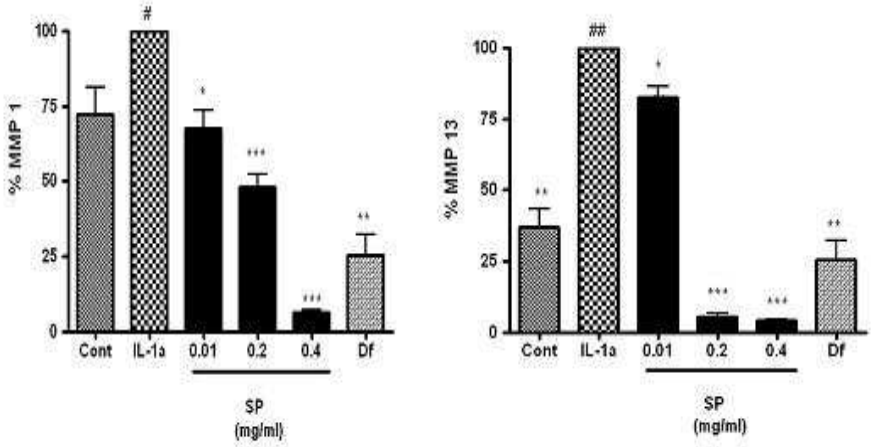
도면3


##
100
75
50
25
0
% Release
*
**
**
*
cont
IL-1
0.01
0.2
0.4
Df
SP
(mg/ml)

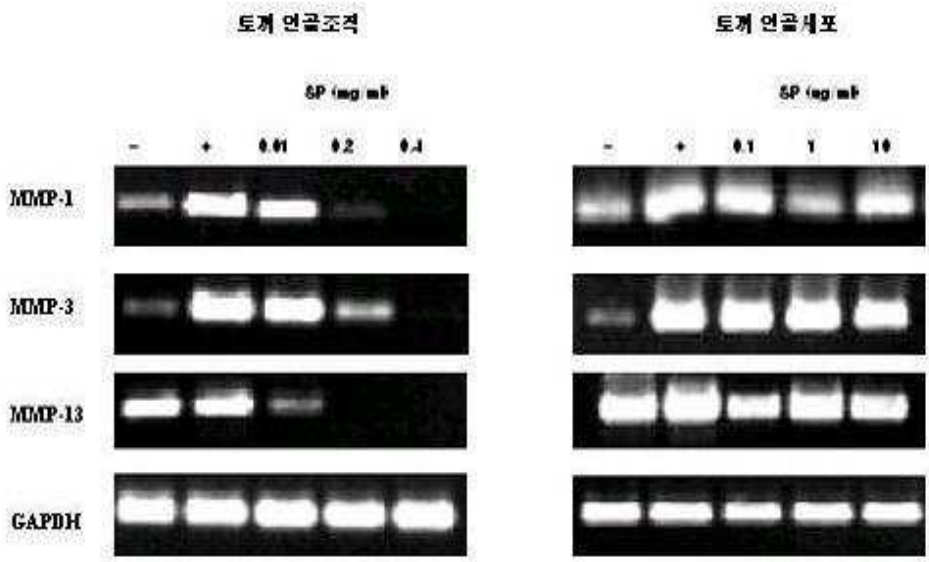
도면4


토끼 연골조직
토끼 연골세포
SP (mg/ml)
SP (ug/ml)
- + 0.01 0.2 0.4
- + 0.1 1 10
Col II
GAPDH

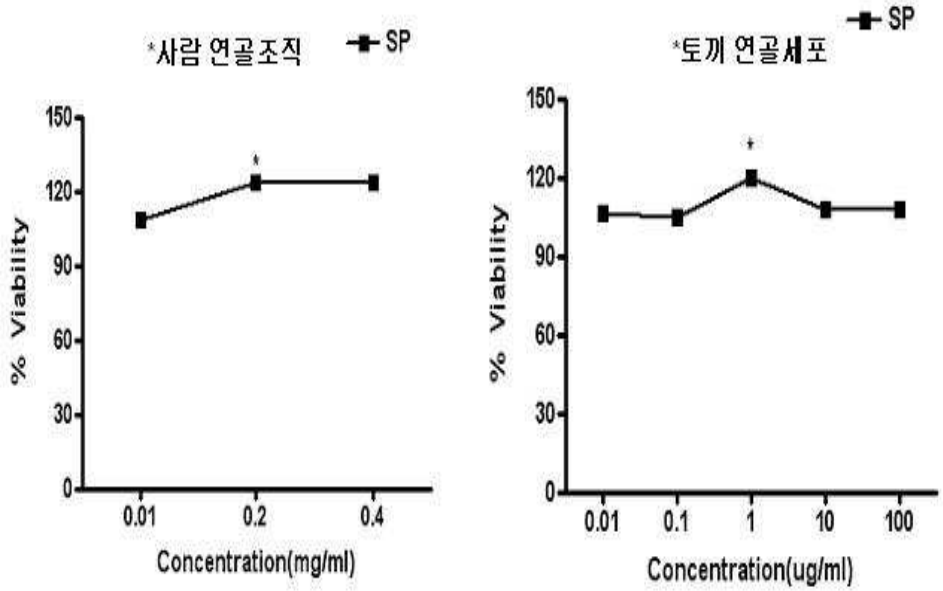
도면5


% MMP 1
100
75
50
25
0
#
*
***
***
**
Cont
IL-1a
0.01
0.2
0.4
Df
SP
(mg/ml)
% MMP 13
100
75
50
25
0
**
##
*
***
***
**
Cont
IL-1a
0.01
0.2
0.4
Df
SP
(mg/ml)

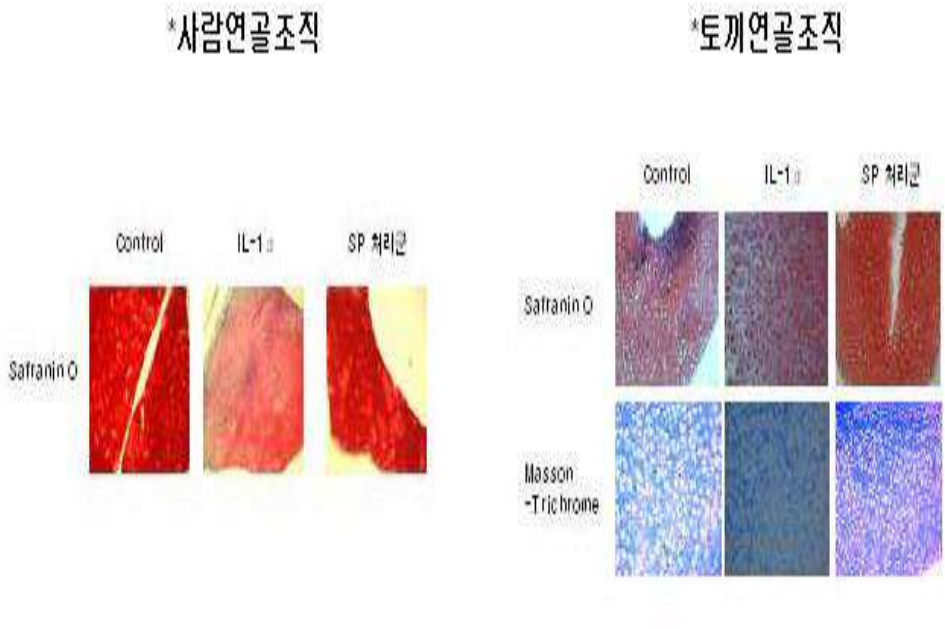
도면6


토끼 연골조직
SP (mg/ml)
-
+
0.01
0.2
0.4
MMP-1
MMP-3
MMP-13
GAPDH
토끼 연골세포
SP (mg/ml)
-
+
0.1
1
10

도면7


*사람 연골조직
SP
% Viability
150
120
90
60
30
0
0.01
0.2
0.4
Concentration(mg/ml)
*토끼 연골세포
SP
% Viability
150
120
90
60
30
0
0.01
0.1
1
10
100
Concentration(ug/ml)

도면8


*사람연골조직
Control
IL-1
SP 처리군
Safranin O
*토끼연골조직
Control
IL-1
SP 처리군
Safranin O
Masson
-Trichrome