



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0113479
(43) 공개일자 2018년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/605 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)

(52) CPC특허분류
A61K 36/605 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0118456(분할)

(22) 출원일자 2018년10월04일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2016-0135249

원출원일자 2016년10월18일

심사청구일자 2016년10월18일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

임영희

서울특별시 서대문구 통일로25길 30, 108동 208호 (홍제동, 한양아파트)

황다현

경기도 성남시 분당구 판교역로 109, A동 266호 (백현동, SKHUB)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤드남

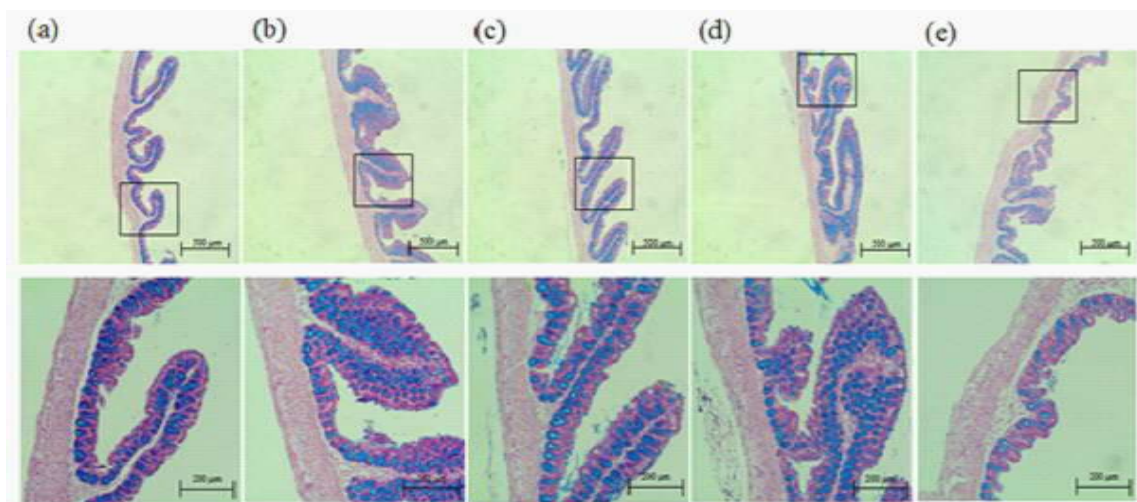
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 상지 주정 추출물을 함유하는 장질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은, 상지(*Ramulus mori*) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 조성물은 천연물인 상지로부터 추출된 상지 주정 추출물을 유효성분으로 포함하므로, 인체에 부작용 없이 장의 술잔세포로부터의 뮤신 생성을 유도하고 손상된 장점막을 회복시킬 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/21 (2013.01)

(72) 발명자

김정근

서울특별시 관악구 관악로30길 27, 118동 802호 (청림동, 관악푸르지오아파트)

김준호

서울특별시 동대문구 회기로29길 63- 5 (회경동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313028033SB010

부처명 보건과학대학학사지원부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 노인성 만성질환(혈액순환, 고지혈·혈압, 당뇨 등)완화를 위한 복합식품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.20 ~ 2016.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

상지(Ramulus mori) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 상지 주정 추출물은 뮤신(mucin) 생성을 유도하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 상지 주정 추출물은, MUC2 또는 TFF3 유전자의 발현을 유도하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 상지 주정 추출물은, MUC2 단백질의 발현을 유도하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 염증성 장질환은 크론병(Chron's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 장형 베체트병(intestinal Behcet's disease), 장결핵(intestinal tuberculosis) 및 장염(enteritis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약학적 조성물인, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

상지(Ramulus mori) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 상지(Ramulus mori) 주정 추출물을 함유하는, 장 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대장 질환은 한때 서구사회에서만 그 발병수준이 높았다. 하지만 최근 한국에서도 대장 질환 발병률이 높아지고 있는데 이는 서구화된 식생활에서 비롯된 것으로 분석된다. 한국에서 현재 증가하고 있는 대장 질환은 크게 염

염증성 장질환(inflammatory bowel disease)과 대장암(colorectal cancer)으로 분류할 수 있다. 염증성 장질환은 입에서 항문까지 소화기관 전체에 걸쳐 장기적 또는 평생 발생하는 만성 질환으로 크게 크론병(crohn's disease)과 궤양성 대장염(ulcerative disease)으로 나뉘며, 현재 원인 불명의 만성 질환으로 분류되고 있다. 발병된 환자들은 설사, 복통과 함께 혈변, 체중감소, 식욕 감퇴, 미열, 빈혈, 잔변감 등의 증상을 보인다. 이 질환이 심각한 이유는 병의 증가속도가 빠르며, 특히 젊은 층의 환자수가 절반 이상을 차지하고 있기 때문이다. 또한 염증성 장질환은 발병 후 10년 이상 방치되면 대장암으로 발전할 가능성이 크므로 조기 진단과 적극적인 치료가 요구된다.

[0003] 현재까지 염증성 장질환이 발병하는 정확한 이유를 규명하진 못했지만, 의료계는 장 내에 정상적으로 존재하는 세균에 대한 과도한 면역반응, 서구화된 식생활 등을 원인으로 추정하고 있다. 원인이 불확실 하므로, 현재까지는 이를 치료하는 방법 또한 정확하게 알려져 있지 않다. 그러므로 한번 병이 발병하면, 환자의 대부분은 국소적인 치료에 따른 증상 호전과 재발을 반복하며 오랜 시간 동안 고통 받게 된다. 이에 따라 질환으로 인한 경제적, 정신적인 영향 또한 상당할 것으로 예측된다.

[0004] 화학합성 제제는 염증성 장질환의 치료에 가장 먼저 사용되기 시작하여 현재도 가장 보편적으로 사용되고 있다. 대표적인 항염증제(sulfasalazine, mesalamine)와 스테로이드가 이에 속하며, 병이 재발하는 경우에는 면역 억제제(azathioprine, 6-mercaptopurine)를 사용한다. 하지만 이러한 전통적 치료제는 대장염의 치료나 질환의 활동성 조절에 성공적이지 못한 경우가 많았는데, 이는 이러한 제제들은 대장염의 치료만을 특이적으로 한 것이 아니기 때문이다. 이러한 이유로 발진, 부종 및 신경질환과 같은 급성 부작용과 각종 기회 감염을 일으키는 위험성을 가지고 있다. (Wolfe, F., Michaud, K., Anderson, J. & Urbansky, K. (2004) Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arthritis & Rheumatism* 50, 372-379) 1998년, 최초의 생물학 제제인 키메라 단일클론 항체인 infliximab이 염증성 장질환의 치료제로 승인되고, 이후 2005년 전체 인간화 단일클론 항체인 adalimumab 또한 궤양성 대장염 치료제로 승인되며 단일클론 항체치료제들이 현재 임상에서 내과적 치료제로서 새로운 선택이 되었다. 항 TNF제제와 같은 생물학적 치료제의 출현은 스테로이드를 사용하지 않고, 치료를 유지할 수 있으며 염증성 장질환의 최근 치료목표로 대두되고 있는 점막치유(mucosal healing)를 이끌어 낼 수 있다는 점에서 궤양성 대장염과 같은 만성 염증성 장질환의 내과적 치료약제의 선택에 있어서 획기적인 변화를 가져왔다. 하지만 기회감염으로 결핵을 일으키는 부작용이 있어 특히 결핵 유병률이 높은 국내에서는 문제가 되고 있다. (Sandborn, W. *et al.* (2013) One-year maintenance outcomes among patients with moderately-to-severely active ulcerative colitis who responded to induction therapy with adalimumab: subgroup analyses from ULTRA 2. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 37, 204-213) 최근에는 이런 치료약제들의 부작용을 극복하고자, 근본적인 장 기능 개선을 위한 점막 생성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 염증성 장질환의 환자의 가장 큰 특징은 대장의 뮤신 생성이 저하되어 있다는 점이다. 점막 층의 부재로 인해 세균이 장상피세포로 직접 도달하게 되고 이것들이 심각한 염증 반응을 일으킨다. (Johansson, M. E. (2014) Mucus layers in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 20, 2124-2131; 이유희, 백순옥, 김현경 & 류명현. (2004) 장기능개선제-신소재(KTG075)의 대장관 내 mucin2 분비에 미치는 영향. *한국식품과학회지* 36, 991-994) 그러므로 건강한 장 기능을 유지하기 위해서는 점액의 분비와 점액층의 형성이 제대로 이루어져야 한다.

[0005] 상지(*Ramulus mori*)는 진해, 소염, 진정, 혈압강화, 항균 등의 약리작용이 알려져 있는 생약재로 대한약전수제 생약일 뿐만 아니라 식품공전 별표 1에 "식품에서 사용할 수 있는 원료"로 등재된 식품원료로서, 안전성이 이미 입증된 바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은, 뮤신 생성을 유도하는 상지 주정 추출물을 포함하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 일실시예에 따르면, 상지(*Ramulus mori*) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료

용 조성물을 제공한다.

- [0009] 일측에 따르면, 상기 상기 주정 추출물은 뮤신(mucin) 생성을 유도할 수 있다.
- [0010] 일측에 따르면, 상기 상기 주정 추출물은 *MUC2* 또는 *TFF3* 유전자의 발현을 유도할 수 있다.
- [0011] 일측에 따르면, 상기 상기 주정 추출물은 *MUC2* 단백질의 발현을 유도할 수 있다.
- [0012] 일측에 따르면, 상기 염증성 장질환은 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 장형 베체트병(intestinal Behcet's disease), 장결핵(intestinal tuberculosis) 및 장염(enteritis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0013] 일측에 따르면, 상기 조성물은 약학적 조성물일 수 있다.
- [0014] 일측에 따르면, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0015] 일실시예에 따르면, 상기(*Ramulus mori*) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명의 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은, 천연물인 상기(*Ramulus mori*)로부터 추출된 상기 주정 추출물을 유효성분으로 포함하므로, 인체에 부작용 없이 장의 술잔세포로부터의 뮤신 생성을 유도하고 손상된 장점막을 회복시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 상기 주정 추출물을 술잔세포에 처리한 후의 세포 증식효과를 나타낸 것이다.
- 도 2는, 상기 주정 추출물을 술잔세포에 처리한 후 뮤신 생성에 관련된 유전자인 *MUC2*와 *TFF3*의 발현 변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 상기 주정 추출물을 술잔세포에 처리한 후 뮤신단백질인 *MUC2*의 발현에 대한 면역형광염색 실험 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 4는, 상기 주정 추출물을 대장염모델마우스에 공급한 후의 몸무게 변화 실험 결과를 나타내는 것이다.
- 도 5는 상기 주정 추출물을 대장염모델마우스에 공급한 후, 병 발병 정도(disease activity index)를 측정한 실험 결과를 나타내는 것이다.
- 도 6은 상기 주정 추출물을 대장염모델마우스에 공급한 후, 장에서의 뮤신 생성 정도를 Alcian blue 염색을 통해 측정한 실험 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 7은 도 6의 결과를 토대로 상기 주정 추출물을 대장염모델마우스에 공급한 후, 장에서의 뮤신 생성 정도를 수치화한 결과를 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.
- [0019] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0020] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0021] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일

반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

- [0022] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0023] 일실시예에 따르면, 상지(*Ramulus mori*) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 특히, 상기 상지 주정 추출물은 장상피세포에서 뮤신(mucin)의 생성을 유도할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 "상지(*Ramulus mori*)"는 식품 원료로 등재된 물질로서 장기간 또는 다량으로 사용하여도 부작용(예: 간독성)이 없으며, 본 발명의 상지 주정 추출물을 함유하는 조성물은, 경구로 투여되더라도 뮤신 생성 유도 효과를 충분히 달성할 수 있다.
- [0025] 일측에 따르면, 상기 상지 주정 추출물은 *MUC2* 또는 *TFF3* 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 실시예 3을 참고하면, 상지 주정 추출물을 처리한 술잔세포에서 뮤신 생성에 관련된 유전자인 *MUC2*와 *TFF3*의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 상지 주정 추출물의 농도가 증가할수록 유전자 *MUC2*와 *TFF3*의 발현 또한 함께 증가할 수 있다.
- [0026] 일측에 따르면, 상기 상지 주정 추출물은 *MUC2* 단백질의 발현을 유도할 수 있다. 실시예 4를 참고하면, 상지 주정 추출물을 처리한 술잔세포에서 뮤신 생성에 관련된 단백질인 *MUC2*의 양이 증가된 것을 확인할 수 있다. 상지 주정 추출물의 농도가 증가할수록 단백질 *MUC2*의 발현량이 함께 증가할 수 있다.
- [0027] 일측에 따르면, 상기 염증성 장질환은 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 장형 베체트병(intestinal Behcet's disease), 장결핵(intestinal tuberculosis) 및 장염(enteritis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물일 수 있으며, 이에 따라 본 발명의 조성물뿐만 아니라, 항염증 활성을 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관, 또는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용 가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 평균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피

하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여될 수 있다. 본 발명에 사용된 "상지"는 식품 원료로 등재된 물질로서 장기간 또는 다량으로 사용하여도 부작용(예: 간독성)이 없으며, 경구로 투여되더라도 무신 생성 유도 효과를 충분히 달성할 수 있다. 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 장질환에 대한 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0033] 한편, 본 발명의 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물은 약학적 조성물 뿐만 아니라 식품 조성물일 수도 있으며, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있다.

[0034] 상기 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0035] 본 발명의 조성물은 통상의 건강기능식품과 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 조성물은 다양한 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0038] 실시예 1: 상지 주정 추출물의 제조

[0039] 잘게 잘린 상지 1 kg을 준비하였다. 증류수로 깨끗하게 세척한 후, 80 % 주정용 에탄올 8,000 mL를 첨가하여, 초음파 세척기(H0429115, Hwashin Instrument Co.)에서 48 시간 동안 추출하였다. 추출이 끝난 주정 추출물은 GFC 여과지(Cat No. 1822-047, Whatman)를 이용하여 감압 여과 후 회전식 감압 농축기(N-1000, Eyla)를 사용하여 약 500 mL까지 감압농축 하였다. 농축된 추출물은 -80 °C 초저온냉동고(DF8520, Ilshin Lab Co.)에서 동결 후, 동결건조기(FD8512, Ilshin Lab Co.)를 사용하여 48 시간 동안 동결 건조하여, 상지 주정 추출물을 분말 형태로 제조하였다.

[0041] 실시예 2: 상지 주정 추출물의 장내 술잔세포(goblet cell) 증식효과

[0042] 2-1) 장내 술잔세포(goblet cell) 배양 및 상지 주정 추출물의 처리

[0043] 술잔세포(goblet cell)를 Roswell Park Memorial Institute(RPMI)-1640 배지에서 10 % FBS(fetal bovine serum), 100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신을 첨가하고, 37°C 인큐베이터에서 5% CO₂-95% 공기 조성으로 배양하였다. 세포가 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 6.25 × 10⁴ cells/mL로 cell수를 조정 한 후, 96 well에 200 µL씩 seeding 하였다. 37°C incubator 에서 하루 동안 안정화 시킨 후, 상지 주정 추출물(12.5, 25, 50 µg/mL)을 처리한 후, 24 시간 배양하였다.

[0045] 2-2) 상지 주정 추출물의 세포 증식능 측정

[0046] 24 시간 후, 상등액을 제거하고 5 mg/mL MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)(Amresco, USA)를 RPMI-1640 배지에 1/40 희석해서 넣고 37°C incubator에서 1 시간 반응시켰다. 보라색 결정이 생기면 상등액을 제거한 후, DMSO(dimethyl sulfoxide)를 100 µL 첨가하고, microplate reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0047] 도 1은 상지 주정 추출물을 술잔세포에 처리한 후의 세포 증식효과를 나타낸 것이다.

[0048] 도 1을 참고하면, 상지 주정 추출물은 농도 의존적으로 술잔세포의 증식을 증가시킨다는 점을 확인할 수 있었다.

[0050] 실시예 3: 상지 주정 추출물에 의한 *MUC2*와 *TFF3* 유전자 발현

[0051] *MUC2*와 *TFF3* 유전자는 뮤신 생성과 안정화에 중요한 역할을 하는 유전자이므로, 상지 주정 추출물에 의하여 *MUC2*와 *TFF3*의 발현 수준이 변화하는지를 mRNA 수준에서 측정하였다.

[0052] 3-1) 장내 술잔세포(goblet cell) 배양 및 상지 주정 추출물의 처리

[0053] 술잔세포를 RPMI-1640 배지에서 10 % FBS, 100 units/mL 페니실린과 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 첨가하여 37 °C 인큐베이터에 5% CO₂-95% 공기 조성으로 배양하였다. 세포가 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 2.5×10^5 cells/mL로 cell수를 조정된 후, 6 well에 2 mL씩 seeding 하였다. 37°C incubator 에서 하루 동안 안정화 시킨 후, 상지 주정 추출물(12.5, 25, 50 μ g/mL)을 처리한 후, 24 시간 배양하였다.

[0055] 3-2) RNA 분리 및 발현양 측정

[0056] Trizol을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit(Fermentas, EU)를 이용하여 cDNA로 conversion 한 후, DyNamoTMHS SYBR Green qPCR kit(FINNZYMES, Finland) 시약으로 StepOnePlusTM Real-Time PCR System(AppliedBiosystems, FosterCity, CA, USA) 기계를 사용하여 real time PCR 을 진행하였다. 사용된 primer의 sequence는 *GAPDH*(Sense: 5' - GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT -3' , Antisense: 5' - GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG -3'), *MUC2*(Sense: 5' - ACC CGC ACT ATG TCA CCT TC -3' , Antisense: 5' - GGA CAG GAC ACC TTG TCG TT -3')와 *TFF3*(Sense: 5' - CAG CTT TTC TGT CCC TTT GC -3' , Antisense: 5' - CAC GAC GCA GCA GAA ATA AA -3')이다. 아무것도 처리하지 않은 sample(Negative control)의 유전자 발현량을 1로 상대정량(2-deltadelta Ct method)하였다.

[0057] 도 2는, 상지 주정 추출물을 술잔세포에 처리한 후 뮤신 생성에 관련된 유전자인 *MUC2*와 *TFF3*의 발현 변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0058] 도 2를 참고하면, negative control에 비하여 상지 주정 추출물(12.5, 25, 50 μ g/mL)을 처리한 군의 발현량은 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

[0060] 실시예 4: 상지 주정 추출물에 의한 *MUC2* 단백질 발현

[0061] 4-1) 장내 술잔세포(goblet cell) 배양 및 상지 주정 추출물의 처리

[0062] 술잔세포를 RPMI-1640 배지에서 10 % FBS, 100 units/mL 페니실린과 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 첨가하여 37 °C 인큐베이터에 5% CO₂-95% 공기 조성으로 배양하였다. 세포가 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 2.5×10^5 cells/mL로 cell수를 조정된 후, Coverslip 을 미리 깔아둔 24 well 에 1mL씩 cell을 seeding하였다. 37°C incubator 에서 하루 동안 안정화 시킨 후, 상지 주정 추출물(12.5, 25, 50 μ g/mL)을 처리한 후, 24 시간 배양하였다.

[0064] 4-2) 면역형광염색

[0065] 4% formaldehyde로 세포를 고정시킨 후에 Antibody를 이용해 염색하였다. 사용된 1차 Ab는 anti-MUC2(GeneTex GTX100664)이고 2차 Ab는 Anti-rabbit, DyLight(Thermo 84546)이다.

[0066] 도 3은 상지 주정 추출물을 술잔세포에 처리한 후 뮤신 단백질인 *MUC2*의 발현에 대한 면역형광염색 실험 결과를 나타내는 사진이다. 도 3의 (a)는 음성대조군, (b)는 상지 추출물 12.5 μ g/mL 처리군, (C)는 상지 추출물 25 μ g/mL 처리군, (d) 상지 추출물은 50 μ g/mL 처리군을 나타낸다.

[0067] 도 3을 참고하면, 음성대조군에 비하여, MUC2 발현양이 상지 주정 처리군에서 농도 의존적으로 증가하는 점을 확인할 수 있었다.

[0069] 실시예 5: 상지 주정 추출물에 의한 대장염모델마우스의 몸무게 변화 측정

[0070] 5-1) 동물실험 및 상지 주정 추출물의 투여

[0071] 대장염모델마우스는 female C57BL/6N mice, 7주령(16-18 g)을 사용하였다(코아텍, 경기도, 평택, 한국). 일정한 온도 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 와 습도 55%에서 사육하였으며 SPF(specific pathogen free) room을 사용하였다. 모든 동물은 물과 사료에 자유롭게 접근할 수 있게 환경을 조성해 주었고, 고려대학교 동물윤리위원회 KUIACUC-2015-92 승인을 받아 진행하였다.

[0072] 동물들은 한 그룹 당 6마리씩 무작위로 나누어 배정하였고, 3주간 상지 주정추출물을 경구 투여를 통해 공급하였다. 마지막 1주 동안은 대장염을 유발하기 위해 2% DSS(dextran sulfate sodium)를 음수를 통해 공급하였다.

표 1

그룹	처리조건
I	음성 대조군
II	대장염 모델마우스 (2% DSS + 물)
III	실험군 1 (2% DSS + 20 mg/kg 상지주정추출물)
IV	실험군 2 (2% DSS + 40 mg/kg 상지주정추출물)
V	실험군 3 (2% DSS + 80 mg/kg 상지주정추출물)

[0074] 상기 표 1은 각 동물모델 군에 대한 상지 주정 추출물 투여 조건을 나타낸 것이다.

[0076] 5-2) 몸무게 변화측정

[0077] 몸무게 변화는 마지막 한주동안 2% DSS로 대장염을 유발하면서 측정되었다. 첫 번째 날의 몸무게를 100%로 환산하여 변화량을 계산하였다,

[0078] 도 4는, 상지 주정 추출물을 대장염모델마우스에 공급한 후의 몸무게 변화 실험 결과를 나타내는 것이다.

[0079] 도 4를 참고하면, 2% DSS만을 공급한 대장염 마우스의 몸무게는 감소한 반면, 상지 주정 추출물을 함께 공급한 마우스의 몸무게는 그 변화량이 적은 것을 알 수 있었다.

[0081] 실시예 6: 상지 주정 추출물에 의한 대장염모델마우스의 질병 발병 정도(disease activity index, DAI) 측정

[0082] 질병 발병 정도의 측정은 마지막 한주동안 2% DSS로 대장염을 유발하면서 측정되었다. 아래의 표 2를 근거로 몸무게 감소량, 변의 강도, 피의 유무에 따라 점수를 매겨 합산 한 뒤, 3으로 나눈다.

표 2

점수	몸무게 감소량	변의 강도	피의 유무
0	None	정상 변	없음
1	1 5%	-	-
2	6 10%	무른 변	소량
3	11 20%		
4	> 20%	설사	대량

[0085] 도 5는 상지 주정 추출물을 대장염모델마우스에 공급한 후, 병 발병 정도(disease activity index)를 측정한 실험 결과를 나타내는 것이다.

[0087] 도 5를 참고하면, 2% DSS만을 공급한 대장염 마우스의 DAI값은 시간이 흐를수록 큰 폭으로 증가한 반면, 상지 주정 추출물을 공급한 마우스의 DAI 는 그 변화량이 작은 것을 알 수 있었다.

[0089] **실시예 7: 상지 주정 추출물에 의한 대장염모델마우스의 뮤신 회복도 측정**

[0090] **7-1) Alcian blue 염색**

[0091] 대장 내 뮤신 회복도를 측정하기 위해 조직염색을 실시하였다. 분리된 대장을 10% formalin 용액에 하루 동안 고정 한 후, 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 마이크로톰을 이용하여 절단하여 5 μ m 조직절편을 만든 후 Alcian blue 염색을 하고, 현미경을 이용하여 blue pigment로 염색된 뮤신 양을 관찰하였다.

[0092] 도 6은 상지 주정 추출물을 대장염모델마우스에 공급한 후, 장에서의 뮤신 생성 정도를 Alcian blue 염색을 통해 측정한 실험 결과를 나타낸 사진이다. 도 6의 (a)는 음성대조군, (b)는 2% DSS만 처리한 군, (C)는 2% DSS + 20 mg/kg 상지 추출물 처리군, (d)는 2% DSS + 40 mg/kg 상지 추출물 처리군, (e)는 2% DSS + 80 mg/kg 상지 추출물 처리군의 결과를 나타낸다.

[0094] **7-2) 뮤신 생성량 정량화**

[0095] 상기 7-1)에서의 결과를 토대로 하여, MetaMorph software(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 blue pigment만을 특이적으로 선택하고, 그 양을 수치화 하였다.

[0096] 도 7은 도 6의 결과를 토대로 상지 주정 추출물을 대장염모델마우스에 공급한 후, 장에서의 뮤신 생성 정도를 수치화한 결과를 나타내는 것이다.

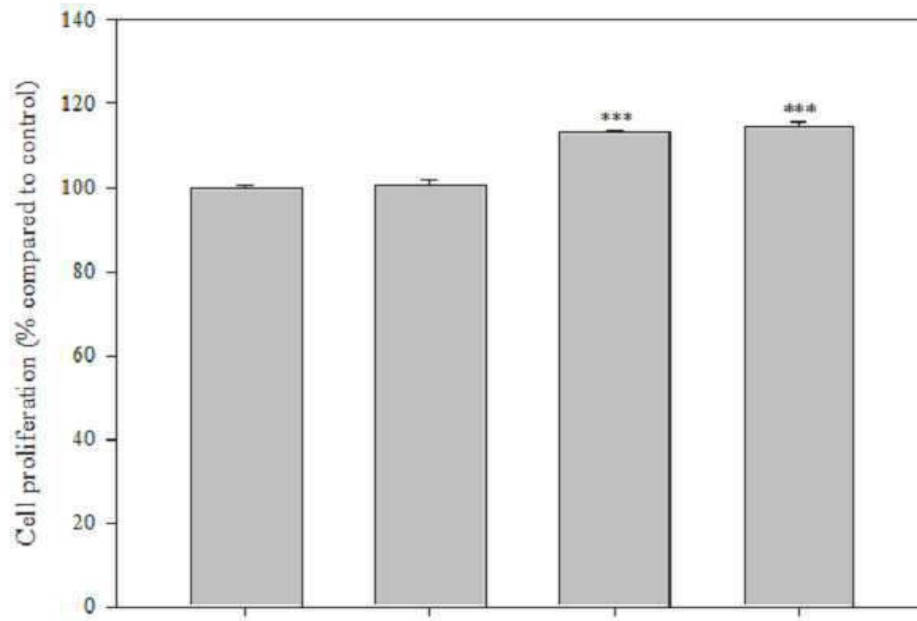
[0097] 도 7을 참고하면, 2% DSS만을 공급한 대장염 마우스의 뮤신양은 통계적으로 유의하게 감소한 반면, 상지 주정 추출물을 투여한 마우스의 뮤신 생성량은 정상과 같은 수준으로 회복되는 것을 알 수 있었다.

[0099] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0100] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

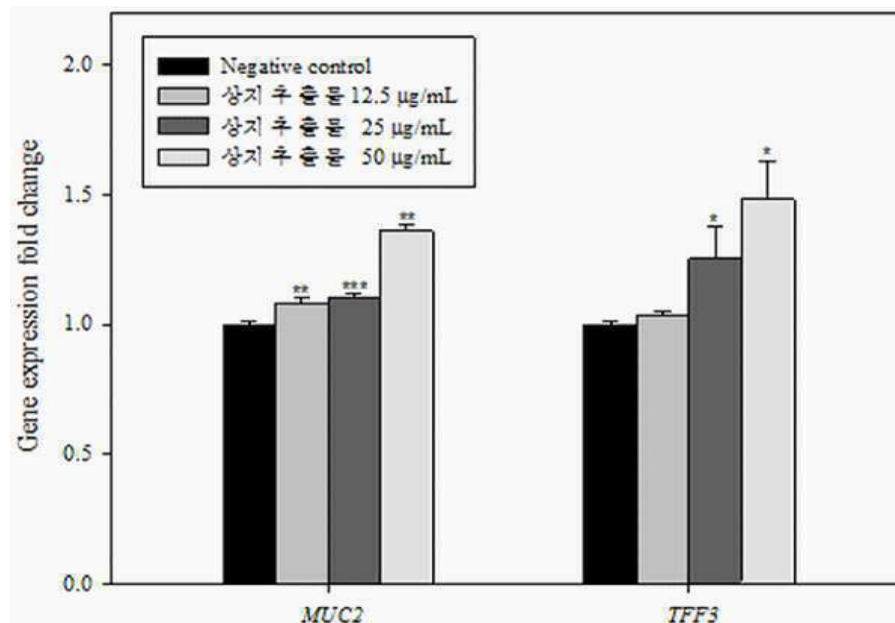
도면

도면1

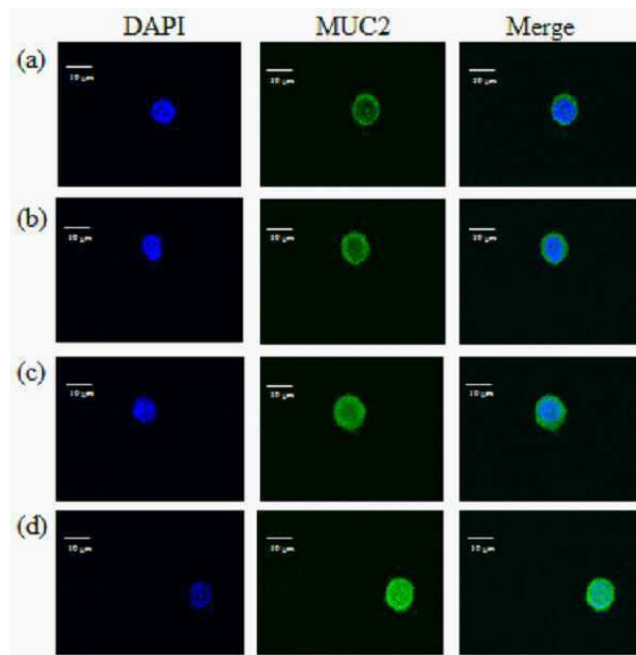


상지추출물 - 12.5 25 50
(µg/mL)

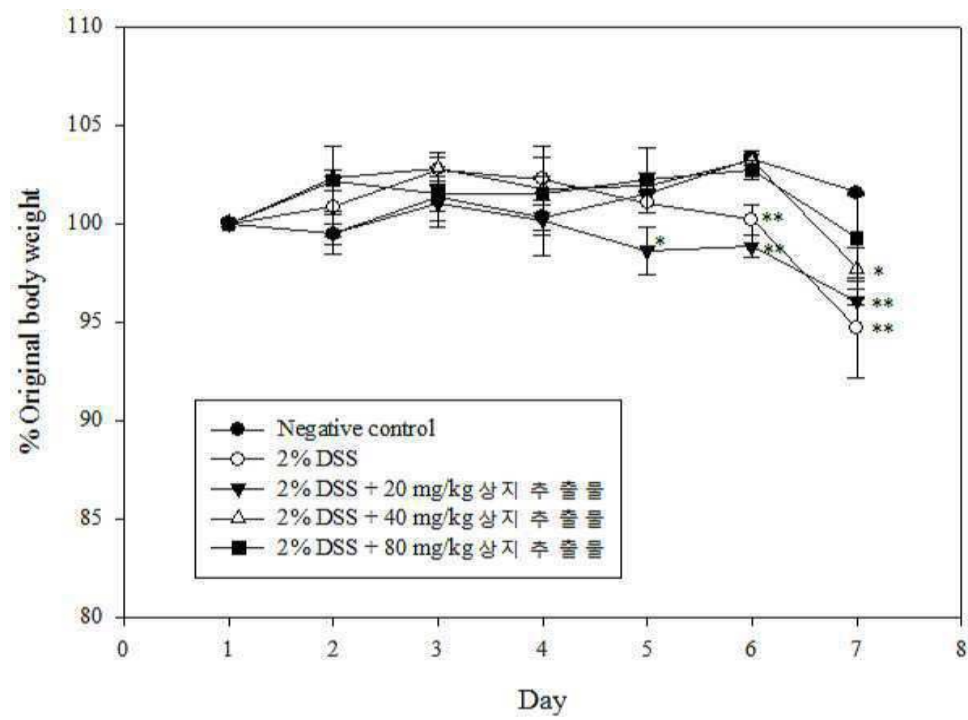
도면2



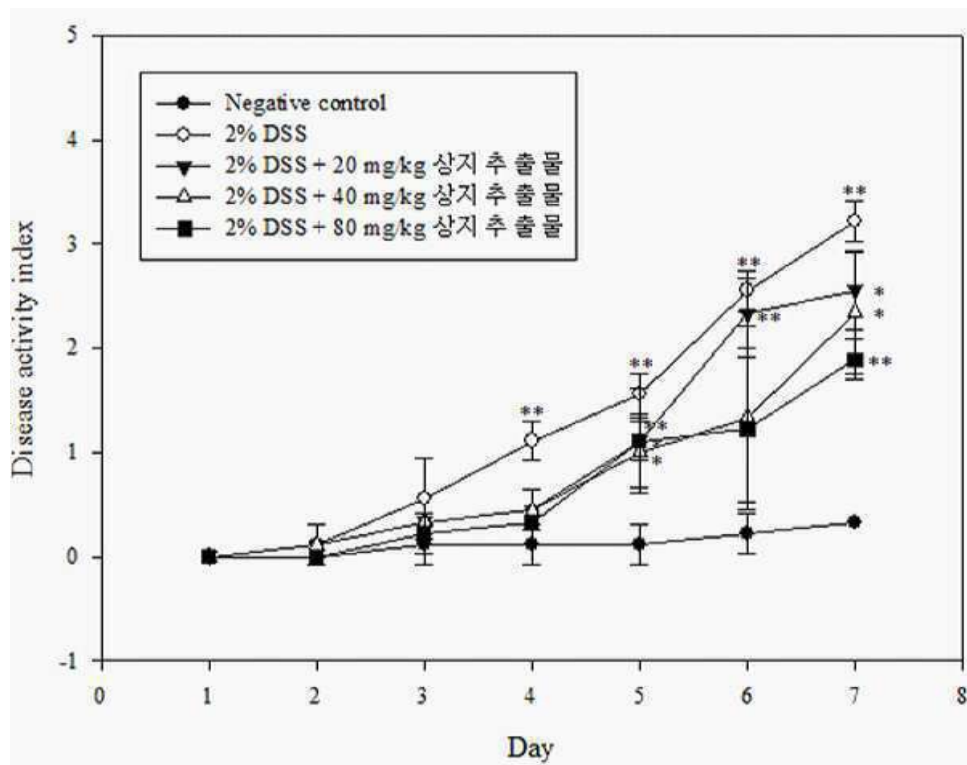
도면3



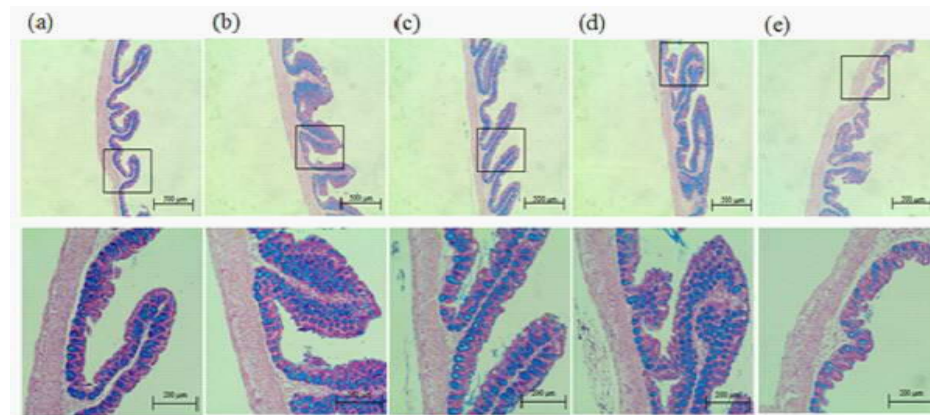
도면4



도면5



도면6



도면7

