(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0051918
(43) 공개일자 2017년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/23 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/23 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0153618
(22) 출원일자 2015년11월03일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
김춘성
광주광역시 남구 서문대로678번길 7 대주1차아파트 101-1002
문성민
광주광역시 서구 풍암순환로 86 (풍암동, 삼능남양아파트) 102-1603
(74) 대리인
최석진

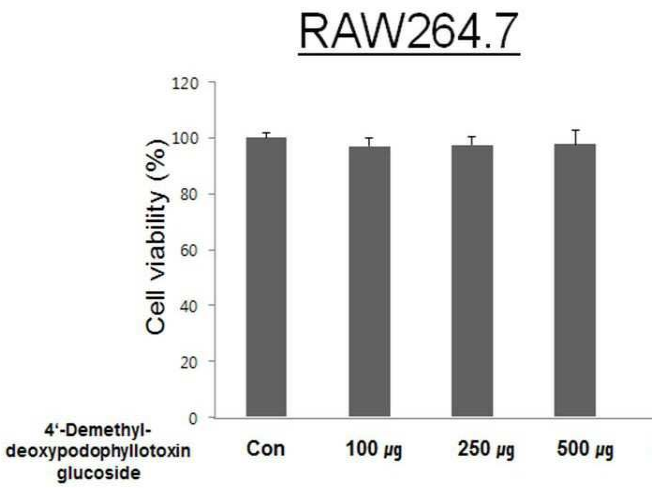
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **전호(Anthriscus sylvestris Hoffmann) 뿌리(아삼) 추출물을 포함하는 관절염의 치료용 또는 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)의 열수추출물, 특히 전호뿌리 유래의 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxy podophyllotoxin glucoside)를 유효성분으로 하는 조성물을 이용하여 관절염의 치료용 또는 예방용 조성물을 제공함으로써, 예방 및 치료가 용이하지 않았던 류마티스성 또는 퇴행성 관절염의 치료 및 예방에 부작용이 적고 효능이 뛰어난 기능성 조성물을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/70 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/60 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)뿌리 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염의 치료용 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서 상기 전호 뿌리 추출물은 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxy podophyllotoxin glucoside)를 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염의 치료용 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드는 iNOS(inducible Nitric Oxide Synthethase), COX-2(Cyclooxygenase-2), TNF-α(tumor-necrosis factor-α), MMP-2(matrix metalloproteinase-2;type IV collagenases) 또는 MMP-9(matrix metalloproteinase-9) 중 하나 이상의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 관절염의 치료용 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드는 proteoglycan 또는 collagen type II 중 하나 이상의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 관절염의 치료용 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관절염은 류머티스성 또는 퇴행성 관절염인 것을 특징으로 하는 관절염의 치료용 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 6

전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)뿌리 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염의 예방 기능성 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 전호 뿌리 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 사용하여 추출한 것을 특징으로 하는 관절염의 예방 기능성 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 추출용매를 사용하여 추출한 전호 뿌리 추출물에 비극성가용 용매로서 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 분획용매로 사용하여 분획

한 것을 특징으로 하는 관절염의 예방 기능성 식품 조성물.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물은 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxy podophyllotoxin glucoside)를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염의 예방 기능성 식품 조성물.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 예방 기능성 식품.

청구항 11

제10항에 있어서 퇴행성관절염 예방 기능성 식품에는 전호 뿌리 추출물이 전체 조성물의 0.01 내지 95 중량%의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 관절염의 예방 기능성 식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann) 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxy podophyllotoxin glucoside)를 유효성분으로 하는 전호 뿌리 추출물을 포함하는 관절염의 치료용 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 관절염은 관절에 염증 및 통증이 발생되어 생기는 질환으로서, 퇴행성 관절염(osteoarthristis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 통풍, 건성 관절염이 있으며, 관절염 환자의 95%가 퇴행성 관절염을 앓고 있다. 퇴행성 관절염(degenerative arthritis)은 관절 연골이 닳아 없어지면서 국소적인 퇴행성 변화가 나타나는 질환으로서, 골관절염(osteoarthritis)이라고도 한다. 퇴행성 관절염은 노령화와 밀접한 연관을 갖는 대표적인 퇴행성 질환으로, 전 인구의 10~15% 정도가 앓고 있으며, 특히 65세 이상의 고령인구 중 60~80% 정도가 퇴행성 관절염을 앓고 있다.

[0003] 퇴행성 관절염의 원인은 노화 현상이나 과다한 체중과 관계가 깊으며, 나이가 많아질수록 여성에게서 더 많이 그리고 더 심하게 나타난다. 초기 증상은 한개 또는 두개의 관절이 강직과 함께 쑤시는듯한 동반통증이 나타나며, 장기화되면 관절 주변에 골의 과잉형성 및 관절의 변형 등을 초래하게 된다. 퇴행성 관절염이 유발되는 기전으로는 TNF-α, IL-1β, IL-6와 같은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 생성이 증가하고 콜라게네이즈(collagenase), 스트로멜라이신(stromelysin) 등과 같은 MMPs의 분비가 증가되어 관절연골의 손상을 유발한다.

[0004] 현재 임상적으로 사용되고 있는 퇴행성 관절염의 치료로는, 진통제, 스테로이드제, 비스테로이드계 항염증제 등과 같은 약물 치료제나 히알루론산, 글루코사민, 콘드로이틴 등의 연골보호제를 이용하거나, 관절경 수술, 경골 근위부 절골술, 관절부분 치환술, 슬관절 전치환술 등의 외과적 치료에 의한다. 그러나 약물치료제의 경우는 통증이나 염증반응 자체를 비특이적으로 완화시키는 효과만을 가지고 있으고, 연골 보호제는 단지 연골세포에 영양을 공급해 주거나 충격을 완화시킴으로써 관절을 보호해 주는 역할을 할 뿐이다. 또한 스테로이드성 제제를 장기간 복용할 시, 칼슘의 손실로 골다공증, 고혈압, 당뇨병 등을 초래할 수 있는 부작용이 있다. 따라서 약물치료는 대부분의 경우 통증을 감소시키는 목적으로만 사용되고 있고, 영구적인 인공관절 치환술이 주를 이루고 있지만 근본적인 치료효과를 주는 약물이나 수술법은 현재까지 없는 실정이다.

[0005] 류마티스 관절염은 다발성 관절염을 특징으로 하는 염증성 질환으로서, 자가면역현상이 주요 기전으로 알려져

있다. 증상을 살펴보면, 관절 활막(synovial membrane) 조직에 염증이 발생하여 대식세포, 수상세포 및 T 림프구, B 림프구 등이 활막 조직으로 이동하고, 그 결과 관절액(synovial fluid)이 증가하여 관절이 부으면서 통증이 나타나게 된다. 염증이 지속되면서 염증성 활막조직이 증생(hyperplasia)하게 되면 뼈와 연골을 파괴하여 관절 구조가 변형되고 운동 장애가 발생된다.

[0006] 류마티스 관절염에서도 TNF-α, IL-1β 등의 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 생성이 증가하여 MMPs의 분비가 증가됨으로써, 관절연골을 구성하는 콜라겐(collagen)과 프로테오글리칸(proteoglycan)을 파괴하여 관절연골을 손상시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 관절염 치료제를 천연물 소재로 개발하고 있는 것으로는 대부분 추출물을 이용하여 제품화하고 있어 정확한 작용기전이 밝혀져 있지 않으나, 대부분 경구제로서 복용이 용이하고 장기간 복용을 할 수 있어 그 개발이 활발하게 이루어지고 있다.

[0007] 현재까지 개발되고 있는 소재로는 관절액과 성분이 유사한 히알우론산을 주사하거나 건강보조식품으로 글루코사민, 콘드로이틴을 함께 복용하기도 하며, 생약등의 소재로 동의보감 등의 기성 한약서에 사용되고 있는 천연물을 이용하여 개발하고 있다.

[0008] 한편 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)는 다년생 초본으로 높이는 70-100cm 정도이며 개화기는 5~6월에 꽃이 피고 흰색이며 5~12개의 꽃 이삭가지가 있으며, 결실기는 7-8월이다. 뿌리는 방추형으로 길이는 3-10cm, 지름은 7-15cm로 겉은 흑갈색이고 껍인 면은 회백색이며 맛이 조금 쓴 것이 특징이다.

[0009] 전호는 흑산도를 중심으로 경상도 및 전라도의 남부지역에서 많이 재배되고 있으며, 울릉도 지역에서도 재배되거나 자생되고 있으며, 일본, 중국, 시베리아, 동유럽에 분포되어 있다. 전호는 겨울 동안 눈 속에서 싹을 틔어 눈이 녹으면 가장 먼저 수확되는 울릉도의 대표적인 봄나물로써 뿌리부분은 한약재로 사용되고 있으며, 어린잎은 독특한 향과 쌉싸래한 맛이 있어 각광 받는 나물이다. 어린잎을 먹는 방법으로는 생채로 먹거나 데쳐서 나물로 먹기도 하며 요즘은 장아찌로 만들어 제품으로 판매되고 있다.

[0010] 전호는 한의학적으로 해열, 거담, 진해, 감기로 인한 기침, 천식, 두통을 치료하는 진통제로 사용되고 있으며, 알려진 성분으로는 anthricin, isoanthricin, podophyllotoxin, angeloyl podophyllotoxin, morelensin, yatein, 7-hydrxyyatein, anhydropodorhizol, arctigenin, bursehernin 등을 비롯한 lignan 계열의 물질, praeruptorinsA, B, C, E, qianth coumarin D, acetyl angeloyl khellactone, acetyl tigloyl khellactone, decursin, nodakenin 등의 coumarin 계열 물질 등이 있다. 특히 lignan 계열물질로 알려져 있는 anthricin은 다양한 암세포주에서 항암효과가 있을 뿐만 아니라 UV에 의한 피부색소 침착 또한 억제하는 것으로 알려져 있다.

[0011] 전호로부터 분리된 화합물의 미백효과 연구에서 IBMX 자극에 의한 B-16 mouse melanoma cell lines 에서의 melanin 생성억제 활성을 보였으며, 자외선에 의해 영향을 받는 광노화보다는 노화에 의해 콜라겐 생합성율이 감소되는 내인성 노화에 훨씬 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0012] 그러나 이러한 전호의 약용성분이 효과를 발휘하는 기작과 범위는 아직 구명되고 있지 않아 이러한 전호의 약용성분을 특정하고 그 약리기작을 구명한다면 우리나라 자생 약용식물인 전호의 약학적 적용범위를 넓혀 현대인의 질병퇴치와 예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-0840723호에는 전통적으로 동양에서 사용해 온 약용식물인 감수(Euphorbiae kansui), 전호 (Anthriscus sylvestris), 파두 (Croton Tiglium), 천오(Aconitum carmichaeli), 팥꽃나무 (Daphne genkwa), 갯메꽃 (Calystegia soldanella), 사람주나무 (Sapium japonicum)로부터 베타2 수용체의 활성을 촉진하여 천식 질환의 증상인 기도관 수축을 완하시킬 수 있는 활성 추출물과 이를 효율적으로 추출하는 방법, 그리고 그 추출물들을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 및 치료의 원료, 건강식품, 생약제에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허공보 제10-1429197호에는 전호 (Anthriscus sylvestris) 추출물 및 이로부터 분리한 팔카린디올 (falcarindiol) 또는 디옥시포도필로톡신 (deoxypodophyllotoxin)을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물에 관한 것으로, 전호 추출물 및 이로부터 분리한 팔카린디올 (falcarindiol) 및 디옥시포도필로

톡신(deoxypodophyllotoxin)은 헬리코박터 파이로리균, 황색포도상구균 및 대장균에 대한 강한 항균활성을 나타냄으로써, 병원성 세균에 의해 발생하는 질병의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 전호 추출물을 포함하는 항균 조성물에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허공보 제10-0500642호에는 Umbelliferae) 추출물, 정력자(Lepidium apetalum Wild.) 추출물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하여 부작용없이 피부색소침착을 억제하는 피부 미백용 화장료 조성물에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0004) 대한민국 공개특허공보 제10-2005-0084724호에는 항염증 및 항알러지 활성을 갖는 전호(Anthriscus sylvestris Hoffm.)로부터 분리된 안스리신을 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 상세하게는 본 발명의 안스리신은 각종 염증 및 알러지 질환의 원인이 되는 PAF의 생성을 억제하며, 시클로옥시게나제-2 및 리폭시게나제(5-LO)의 활성을 저해하여 에이코사노이드(eicosanoid)의 생성을 방지함과 동시에 비만세포로부터 히스타민(histamin)의 방출을 억제하므로, 본 발명의 전호로부터 분리된 안스리신을 포함하는 조성물은 각종 염증 또는 알러지성 질환의 예방 및 치료를 위한 의약품 또는 건강기능식품에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0005) 그러나 이와 같은 선행기술은 전호(Anthriscus sylvestris Hoffmann) 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxy podophyllotoxin glucoside)를 유효성분으로 하는 전호 뿌리 추출물을 포함하는 관절염의 치료용 또는 예방용 조성물에 관한 것은 개시되지 않아 그 구성 및 효과에서 차이를 보인다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 최근 각종 질병의 예방 및 치료용 천연생리활성 물질을 약용식물에서 찾고자 하는 노력이 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 새로운 천연생리활성 물질의 탐색 및 활용을 위한 연구개발 노력이 급격히 증대되고 있는 가운데, 최근 기침, 천식 및 후두염 등의 치료제로 안전하게 사용될 뿐만 아니라 항암, 항균 미치 면역유도물질 등 약학적 기능이 속속 밝혀지고 있는 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)의 약용성분을 확인하고 그 기작을 구명하여 약용식물로서의 전호의 이용을 확대하여 현대인의 질병퇴치와 예방 및 치료 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기의 목적을 위하여 본 발명은 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)의 열수추출물 특히 전호뿌리 유래의 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxy podophyllotoxin glucoside)를 유효성분으로 포함하는 관절염의 치료용 또는 예방용 조성물을 제공하며, 상기 전호 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드는 iNOS(inducible Nitric Oxide Synthethase), COX-2(Cyclooxygenase-2), 또는 TNF-α(tumor-necrosis factor-α), MMP-2(matrix metalloproteinase-2;type IV collagenases) 또는 MMP-9(matrix metalloproteinase-9)중 하나 이상의 발현을 억제시키고, proteoglycan 또는 collagen type II 중 하나 이상의 발현을 증가시키는 류머티스성 또는 퇴행성 관절염의 치료용 또는 예방용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann) 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxy podophyllotoxin glucoside)를 유효성분으로 하는 전호 뿌리 추출물을 포함하는 관절염의 치료용 또는 예방용 조성물을 이용하여 원인파악 및 치료가 용이하지 않았던 류마티스성 또는 퇴행성 관절염의 치료 및 예방에 부작용을 줄이면서 아울러 효율적인 기능을 수행할 수 있는 기능성 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 도 1은 마우스 RAW264.7 대식세포에서 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드에 대한 생물학적 안정성을 분석한 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 마우스 RAW264.7 대식세포의 iNOS 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. A는 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드를 100, 250 및 500 ㎍/㎖로 처리한 군에서 NO 활성에 대한 효과를 나타낸 그래프이다. B는 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드의 각 농도에 따른 iNOS 발현량을 나타낸 전기영동 사진이다.

도 3은 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 마우스 RAW264.7 대식세포의 TNF-α 발현에 미치는 영향을 나타낸 전기영동사진이다.

도 4는 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 마우스 RAW264.7 대식세포의 COX-2 발현에 미치는 영향을 나타낸 전기영동사진이다.

도 5은 SD 렛트 유래 초대 배양 연골세포에서 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드에 대한 생물학적 안정성을 분석한 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 SD 초대배양 연골세포에 미치는 영향을 나타낸 것이다. A는 IL-β로 염증을 유발시킨 SD 초대배양 연골세포에 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드를 500 ㎍/㎖로 처리했을 때 NO 활성에 대한 효과를 나타낸 그래프이다. B는 IL-β로 염증을 유발시킨 SD 초대배양 연골세포에 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드를 500 ㎍/㎖로 처리했을 때 MMP-2, MMP-9 및 TNF-α의 발현을 나타낸 전기영동 사진이다.

도 7은 레트 연골세포의 proteoglycan에 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드 유효성분을 포함한 전호 추출물이 미치는 영향을 나타낸 현미경 사진이다.

도 8은 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 SD 초대배양 연골세포에서 Aggrecan과 collagen type II의 발현에 미치는 영향을 나타낸 전기영동 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명에서는 자생식물 전호를 메탄올을 이용하여 추출한 추출물을 이용하여 caspase계 단백질을 활성화시켜 미토콘드리아 의존성 기작에 의한 구강암 세포사멸로 세포성장을 억제시킬 수 있는 전호 추출물을 함유하는 항암세포 사멸 활성조성물이 제공된다.

[0019] 본 발명의 목적을 달성하기 위해 사용된 전호 추출물을 함유하는 항암세포 사멸 활성 조성물이 구강암세포에 끼치는 효과를 검증하는 실험과 분석방법은 다음과 같다.

[0020] **A. 실험 재료의 준비 및 방법**

[0021] **1. 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann) 열수추출물의 제조**

[0022] *Anthriscus sylvestris*를 준비하여 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 희석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 물일 수 있다.

[0023] 상기 추출과정은 일 예로, 50℃ 내지 150℃, 또는 75℃ 내지 120℃, 또는 90℃ 내지 110℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간, 또는 30분 내지 6시간, 또는 2시간 내지 4시간일 수 있다. 본 발명의 전호 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 열수추출법을 포함한 열 추출법, 냉침 추출법, 온침추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.

[0024] 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다. 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[0025] **2. 전호의 열수추출물에서 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드 분리**

[0026] 전호의 열수추출물 건조엑스 10 g을 증류수에 녹인 후 25㎛ 필터로 여과 하여 HPLC 분석 샘플을 준비하였다. Agilent Midi Prep HPLC 분석기기에 CAPCELL pack C18 (5 ㎛, 10 ㎜ I.D ㅧ250 ㎜)를 장착하여 물 98%에서 2%로 메탄올 2%에서 98%로 한 시간 반응하여 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside) 유효성분을 분리 정제한다.

[0027] **B. 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드의 관절염에 대한 효과**

[0028] **<실험예 1> 마우스 RAW264.7 대식세포에서 세포독성 확인**

[0029] 마우스 RAW264.7 대식세포를 12 well plate에 5ㅧ10^5 세포를 24시간 배양 후, 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside)를 유효성분으로 함유한 전호 추출물를 다양한 농도(100, 250, 500 ㎍/㎖)로 24 시간 처리한 후 MTT 용액을 사용하여 세포독성 실험을 수행하였다.

[0030] 도 1은 마우스 RAW264.7 대식세포에서 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드에 대한 생물학적 안정성을 분석한 실험 결과를 나타낸 것이다. 전호 추출물의 각 농도(100, 250, 500,㎍/㎖)에서 정상군(Con)과 비교하였을 때 세포활성은 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드를 투여하지 않은 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 따라서4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드는 세포활성에 독성을 나타내지 않은 안전한 화학물질로 평가할 수 있었다.

[0031] **<실험예 2> 마우스 RAW264.7에서 nitrite oxide (NO) 활성 억제와 염증관련 iNOS (inducible nitric oxide synthase)의 발현 억제 확인**

[0032] iNOS는 NO를 형성하는 효소로써 염증반응과 조직손상에 관련하여 발현이 증가된다. 대식 세포에서 NO의 생성은 iNOS의 발현과 연관성이 있고, LPS(lipopolysaccharide)와 같은 그람(gram) 음성균의 세포벽 물질이나 사이토카인(cytokine)에 자극을 받아 유도된다.

[0033] 따라서 전호 추출물의 iNOS 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 LPS 1 ㎍/㎖을 처리한 마우스 RAW264.7 대식세포에서 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드) 유효성분을 포함한 전호 추출물을 각각의 농도(100, 250, 500 ㎍/㎖)로 처리 후 NO 활성을 측정하였다. 전호 추출물을 24시간 처리한 후에 상층액를 모아 griess 시약(1% sulphanilamide, 2% H3P04 and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride)으로 10분간 반응시킨 다음, ELISA reader에서 540 nm에서 흡광도로 측정하였다. LPS만 첨가한 군에서 생성된 NO의 양을 100%로 하여 시료가 첨가된 경우에 측정된 흡광도를 환산하여 표기하였다.

[0034] 또한 Trizol 시약을 사용하여 total RNA를 분리한 다음, MMLV 역전사 효소를 사용하여 상보적인 DNA을 합성 후 iNOS 특이적인 프라이머를 사용하여 실험을 수행하였다.

[0035] 도 2는 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 마우스 RAW264.7 대식세포의 iNOS 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. A는 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드를 100, 250 및 500 ㎍/㎖로 처리한 군에서 NO 활성에 대한 효과를 나타낸 그래프이며, B는 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드의 각 농도에 따른 iNOS 발현량을 나타낸 전기영동 사진이다.

[0036] LPS를 처리한 군에서 NO 활성을 100%을 환산하였을 때 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside) 유효성분을 포함한 전호 추출물을 100 ㎍/㎖에서 NO 활성이 약 10% 감소하였으며, 500 ㎍/㎖에서는 약 50% 감소함을 확인하였다. 또한 iNOS mRNA 발현을 확인한 결과, 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드 500 ㎍/㎖ 처리한 군에서 iNOS mRNA 발현이 감소함을 확인하였다.

[0037] **<실험예 3> 마우스 RAW264.7 대식세포에서 염증매개 인자로 알려져 있는 TNF-α 발현 억제 확인**

[0038] LPS 자극에 의해 형성되는 pro-inflammatory cytokine (전염증성 사이토카인)으로는 TNF-α, IL-1β, IL-6가 있다. 전호 추출물의 TNF-α 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에 LPS 1 ㎍

/㎖을 처리한 다음, 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신글루코사이드(4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside)를 각각 농도(100, 250, 500 ㎍/㎖)로 처리한 후, 24시간 후에 세포에서 Trizol 시약을 사용하여 total RNA을 분리하여 MMLV 역전사 효소를 사용하여 상보적인 DNA을 합성 후, TNF-α 특이적인 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.

[0039] 도 3은 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 마우스 RAW264.7 대식세포의 TNF-α 발현에 미치는 영향을 나타낸 전기영동사진이다. LPS를 처리하였을 때 처리하지 않은 군에 비하여 TNF-α mRNA 발현이 현저하게 증가하였으나 LPS 처리 후, 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside) 유효성분을 포함한 전호 추출물 100 ㎍/㎖를 처리한 군에서부터 TNF-α mRNA 발현이 현저하게 감소하였으며 500 ㎍/㎖ 처리한 군에서는 LPS을 처리하지 않은 정상군의 mRNA 발현수준으로 감소함을 확인하였다.

[0040] **<실험예 4> 마우스 RAW264.7 대식세포에서 COX-2 발현 억제 확인**

[0041] COX-2(Cyclooxygenase-2)는 염증관련인자인 prostaglandin E2(PGE_2)를 생성하는데 관여하는 효소이다. 전호 추출물의 COX-2 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 RAW264.7 대식세포에서 LPS로 염증을 유도한 다음, 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl -deoxypodophyllotoxin glucoside) 유효성분을 포함한 전호 추출물을 처리한 후, 24 시간 경과 후에 각각의 세포를 모아 Trizol 시약을 사용하여 total RNA 을 분리하여 MMLV 역전사 효소를 사용하여 상보적인 DNA을 합성 후 COX-2 특이적인 프라이머를 사용하여 실험을 수행하였다.

[0042] 도 4는 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 마우스 RAW264.7 대식세포의 COX-2 발현에 미치는 영향을 나타낸 전기영동사진이다. 정상군과 LPS 단독 처리한 군에 비교하였을 때, 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxypodophyllo toxin glucoside) 유효성분을 포함한 전호 추출물을 각각의 농도(100, 250, 500 ㎍/㎖)을 처리한 군에서 COX-2 mRNA발현이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.

[0043] **<실험예 5> SD 렛트 유래 초대 배양 연골세포에서 세포독성 확인**

[0044] 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 연골세포에서의 제작용을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. Collagenase 및 pronase에 의한 효소적 조직 분해 방법을 적용하여 생후 5일된 Rat의 무릎 연골로부터 연골세포를 분리한 후, 10% 혈청 및 Ascobic Acid가 포함된 DMEM/F12 (High glucose) 배양배지를 이용하여 SD 렛트 유래 연골세포를 초대 배양하였다.

[0045] 상기 SD 렛트 초대 배양 유래 연골세포에 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드에 의한 세포독성 검사를 하였다. SD 렛트 연골에서 초대 연골세포를 24시간 배양 후 4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside 유효성분을 포함한 전호 추출물을 다양한 농도(100, 250, 500, 1000 ug/ml)로 24시간 처리한 후 MTT 용액을 사용하여 세포독성을 확인을 수행하였다.

[0046] 도 5은 SD 렛트 유래 초대 배양 연골세포에서 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드에 대한 생물학적 안정성을 분석한 실험 결과를 나타낸 그래프이다. 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신글루코사이드 유효성분을 포함한 전호 추출물의 세포독성을 확인한 결과, 처리한 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드의 모든 농도에서 렛트 유래 초대 배양 연골세포에 대한 세포독성이 보이지 않았다.

[0047] **<실험예 6> SD 렛트 초대배양 연골세포에서 NO 활성, 관절연골기질 분해효소 및 염증매개 인자 발현 억제 확인**

[0048] 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)으로 알려져 있는 IL-1β (interleukin-1β)는 대표적인 퇴행성관절염 유도하는 물질로 알려져 있다. 특히 식품의약품안전청 건강기능식품 기능성평가 가이드 "뼈/관절 건강에 도움" 편 (발간등록번호 11-1470000-002751-01)에는 대표적인 염증유도 인자로 알려져 있는 COX-2 및 iNOS의 발현을 증가시킴으로 염증 반응 및 통증을 수반한다고 기술되어 있다. 따라서 Rat 무릎연골 유래 SD 초대배양 연골세포 대식세포에서 IL-β로 염증을 유발 후, 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드 유효성분을 포함한 전호 추출물 처리하여 NO 활성 및 관절연골기질 분해효소 및 염증매개인자의 발현을 확인하였다.

[0049] 도 6은 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 SD 초대배양 연골세포에 미치는 영향을 나타낸 것이다. A는 IL-β로 염증을 유발시킨 SD 초대배양 연골세포에 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드를 500 ㎍/㎖로 처리했을 때 NO 활성에 대한 효과를 나타낸 그래프이다. B는 IL-β로 염증을 유발시킨 SD 초대배양 연골세포에 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드를 500 ㎍/㎖로 처리했을 때 MMP-2, MMP-9 및 TNF-α의 발현을 나타낸 전기영동 사진이다.

[0050] 실험 결과, IL-β를 처리하였을 때 NO 활성 및 관절연골기질 분해효소(MMP-2;matrix metalloproteinase-2;type IV collagenases, MMP-9;matrix metalloproteinase-9), 그리고 염증매개인자(TNF-α)의 발현이 현저하게 증가하였으나 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드 유효성분을 포함한 전호 추출물을 500 ㎍/㎖을 처리한 군에서 NO 활성 및 MMP-2, MMP-9, TNF-α 발현이 현저하게 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 관절연골의 기질분해효소 및 염증매개인자의 발현을 감소시킴으로서 관절염 치료 및 예방에 도움을 줄 수 있음을 제시하고 있다.

[0051] **<실험예 7> ex vivo SD 렛트 무릎관절 연골에서 proteoglycan의 손실 억제를 확인**

[0052] 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드를 유효성분을 포함한 전호 추출물이 관절연골 구성물질에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 실험동물의 무릎관절로부터 분리된 관절연골조직에 IL-1β로 염증을 유도한 후, 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드 유효성분을 포함한 전호 추출물을 투여하여 7일 동안 반응 시킨 다음, H&E(hematocylin & eosin) 염색법 및 사프라닌-O 패스트 그린 염색법으로 조직학적 분석을 수행하였다.

[0053] 도 7은 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드 유효성분을 포함한 전호 추출물이 레트 연골세포의 proteoglycan에 미치는 영향을 나타낸 사진이다. 대조군에서는 관절연골을 구성하는 인자로 알려져 있는 proteoglycan과 반응된 사프라닌-O에 의해 진한 붉은 색으로 조직이 염색된 반면, IL-1β가 투여된 관절연골조직은 IL-1β에 의해 과발현된 관절연골퇴행성효소로 인한 proteoglycan의 손실로 분홍색으로 염색되었다. 그러나 IL-1β와 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드 유효성분을 포함한 전호 추출물을 동시 투여된 관절연골 조직은 proteoglycan의 손실이 억제됨을 확인하였다.

[0054] 이러한 결과는 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드 유효성분을 포함한 전호 추출물이 염증성 사이토카인 IL-1β에 의해 매개되는 관절연골의 퇴행을 억제 시켜 관절연골 보호를 통한 퇴행성관절염 예방 및 치료효과가 있음을 확인하였다.

[0055] **<실험예 8> SD 렛트 초대배양 연골세포에 관절연골 구성물질 발현유도를 확인**

[0056] 관절연골은 aggrecan을 포함하는 proteoglycan 및 collagen type II로 구성되어 있다. 따라서 이들 관절연골을 구성하는 물질의 발현을 유도하여 관절연골을 재생함으로서 관절건강에 도움을 줄 수 있는지 확인하기 위하여 실험을 수행하였다.

[0057] SD 렛트 초대배양 연골세포에 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드) 유효성분을 포함한 전호 추출물를 각각 100, 500, 1000 ㎍/㎖로 처리 후 24 시간 동안 반응시킨 다음, 각각 처리한 세포에서 total RNA를 분리하여 역전사 효소를 이용하여 상보적인 DNA를 합성 후 aggrecan, collagen type II에 특이적인 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.

[0058] 도 8은 전호 추출물 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드가 SD 초대배양 연골세포에서 aggrecan과 collagen type II의 발현에 미치는 영향을 나타낸 전기영동 사진이다. Aggrecan 및 collagen type II mRNA 발현을 확인한 결과, 농도 의존적으로 aggrecan 및 collagen type II mRNA의 발현이 증가함을 확인하였다. 따라서 이러한 결과는 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl -deoxy podophyllotoxin glucoside) 유효성분을 함유한 전호 추출물이 SD 초대배양 연골세포에서 관절연골 구성물질의 발현을 증가시킴으로써 관절 관절건강에 도움을 줄 수 있는 건강 기능성 제품으로서 활용이 가능함을 확인하였다.

[0059] 이상의 실험 결과, 전호 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신글루코사이드(4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside)는 생물학적으로 안전하며, NO 활성을 억제하며, 염증반응과 조직손상에 관여하는 효소인 iNOS, 염증관련인자인 PGE2 생성에 관여하는 COX-2, 전염증성 사이토카인인 TNF-α과 같은 관절연골퇴행성유도 물질의 발현을 억제하고, 관절연골퇴행성효소인 MMP-2 및 MMP-2의 발현을 억제하였다. 또한 관절연골을 구성하는 물질인

aggrecan을 포함하는 proteoglycan 및 collagen type II의 발현을 유도함으로써 전호 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신글루코사이드가 퇴행성 및 류머티스 관절염의 치료와 예방 효과를 확인하였다.

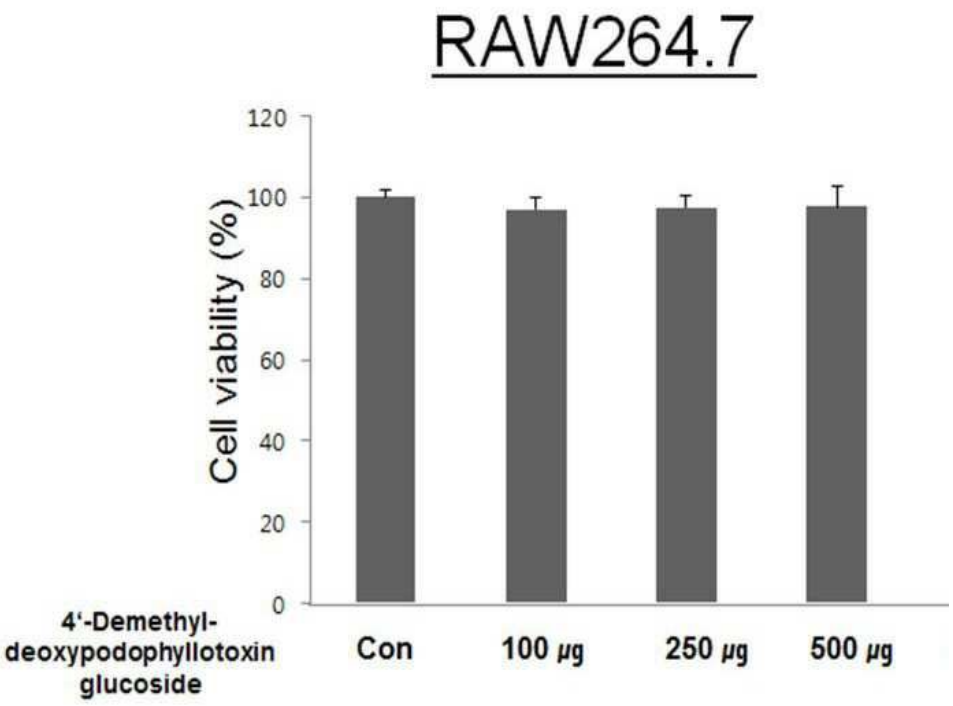
[0060] 따라서 전호 유래 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신글루코사이드나 이의 염을 유효성분으로 포함하는 건강 기능식품을 제조할 수 있으며, 이의 복용을 통하여 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염의 치료와 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

산업상 이용가능성

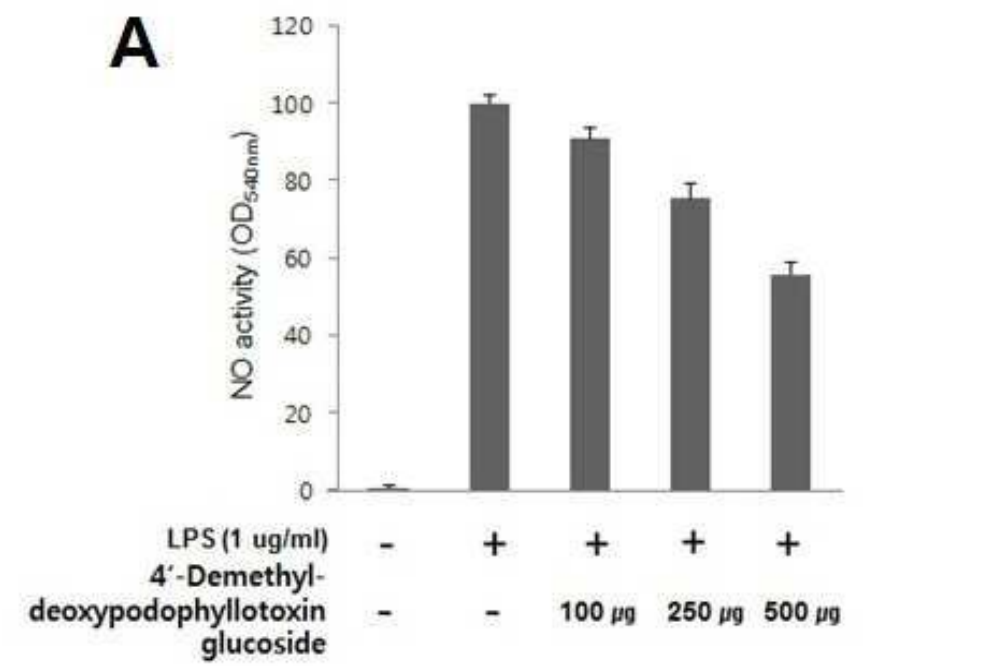
[0061] 본 발명은 국내 전지역에 자생하는 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)의 열수추출물, 특히 전호뿌리 유래의 4'-디메틸-디옥시포도필로톡신 글루코사이드(4'-Demethyl-deoxy podophyllotoxin glucoside)를 유효성분으로 하는 조성물을 이용하여 퇴행서관절염에 예방 효과가 있는 식품 조성물을 제공함으로써 현대 발병원인을 찾기 어렵고 이에 따라 효율적인 임상 치료제가 마땅치 않아 물리치료와 통증경감 등에 의존하며 근본적인 치료에 어려움을 겪는 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염의 치료와 예방을 도모하여 현대인의 질병 퇴치와 예방 및 건강증진에 도움을 줄 수 있다.

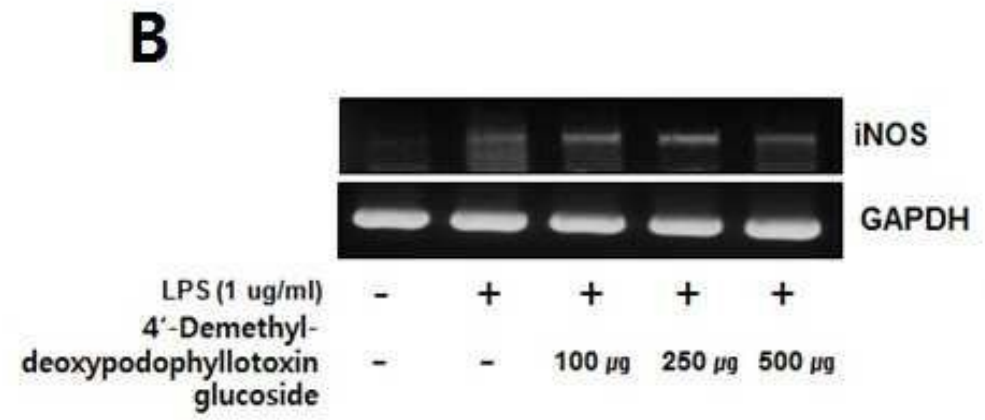
도면

도면1

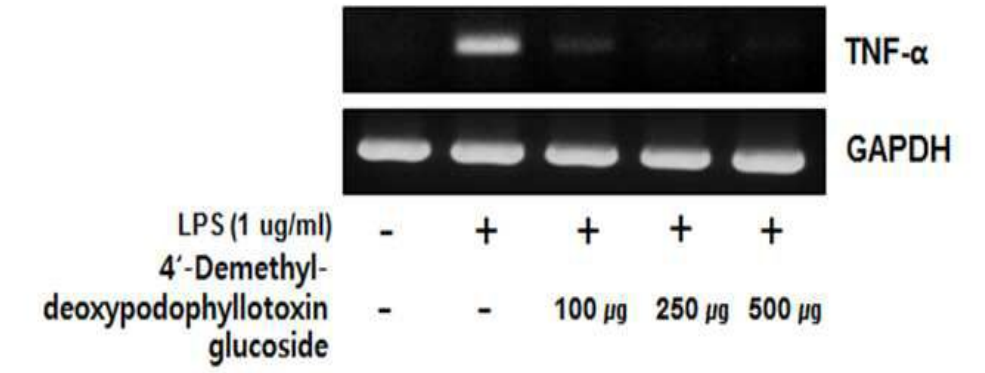


도면2

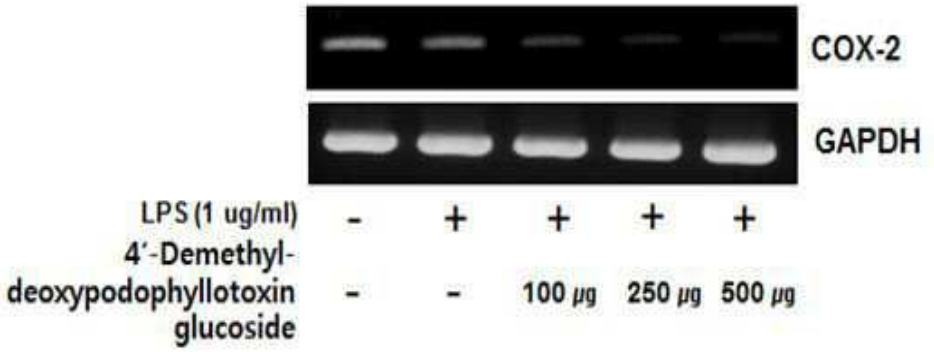

A
120
100
80
60
40
20
0
NO activity (OD540nm)
LPS (1 ug/ml) - + + + +
4′-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside - - 100 μg 250 μg 500 μg


B
iNOS
GAPDH
LPS (1 ug/ml) - + + + +
4′-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside - - 100 μg 250 μg 500 μg

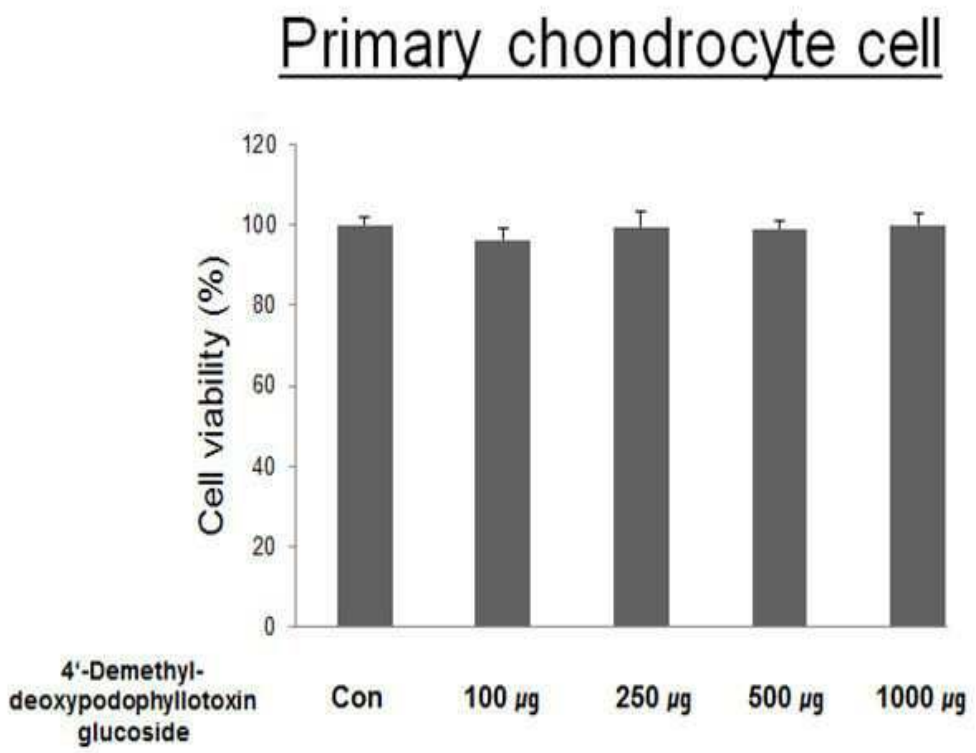
도면3


TNF-α
GAPDH
LPS (1 ug/ml) - + + + +
4′-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside - - 100 μg 250 μg 500 μg

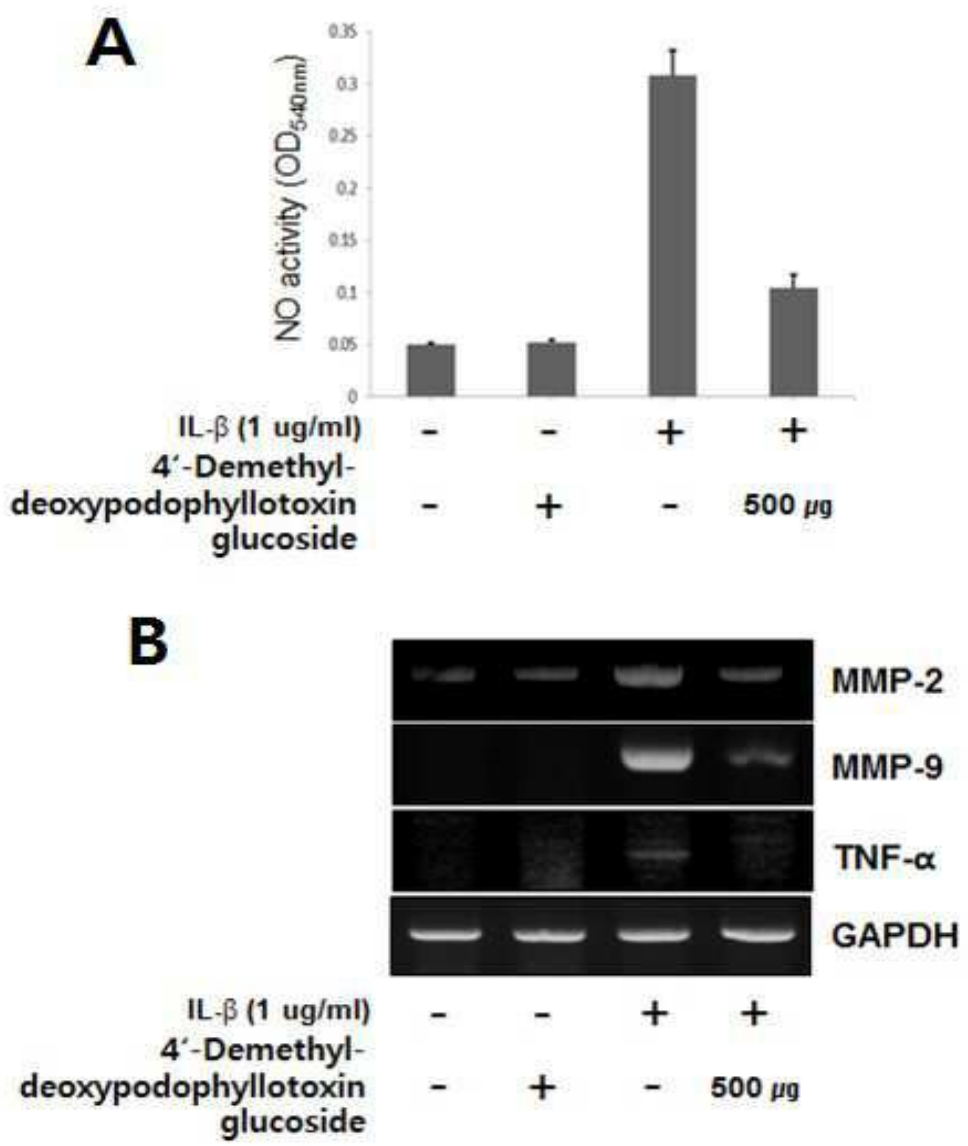
도면4


COX-2
GAPDH
LPS (1 ug/ml) - + + + +
4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside - - 100 μg 250 μg 500 μg

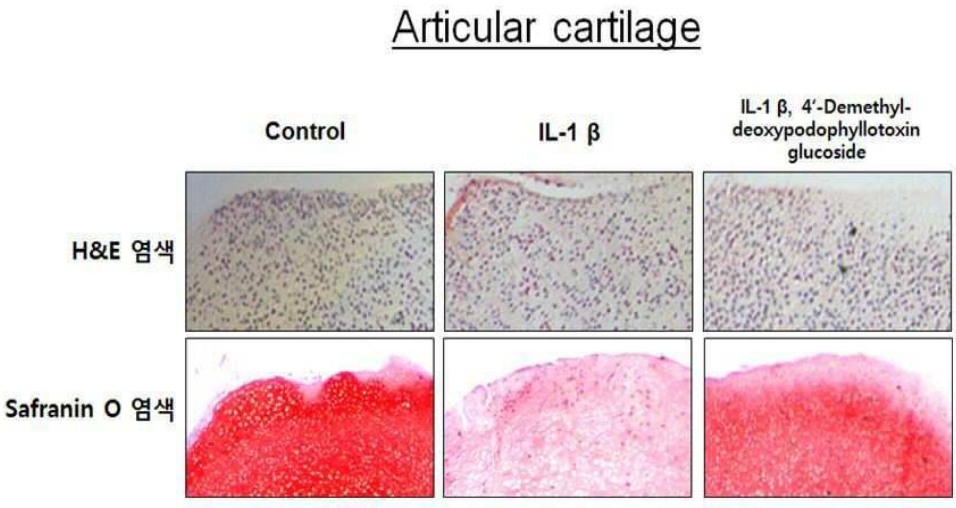
도면5


Primary chondrocyte cell
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside
Con
100 μg
250 μg
500 μg
1000 μg

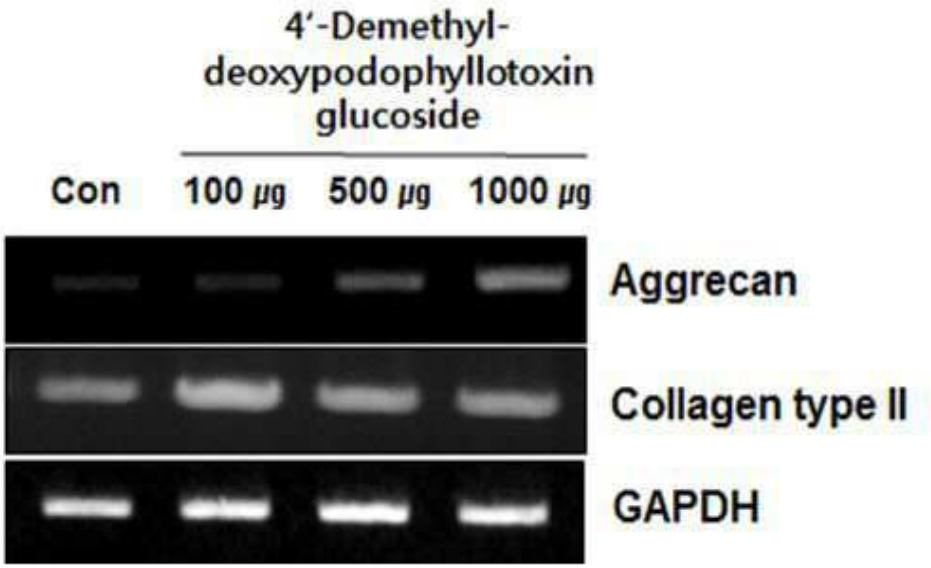
도면6


A
NO activity (OD540nm)
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
IL-β (1 ug/ml) - - + +
4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside - + - 500 μg
B
MMP-2
MMP-9
TNF-α
GAPDH
IL-β (1 ug/ml) - - + +
4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside - + - 500 μg

도면7


Articular cartilage
Control
IL-1 β
IL-1 β, 4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside
H&E 염색
Safranin O 염색

도면8


4'-Demethyl-
deoxypodophyllotoxin
glucoside
Con
100 μg
500 μg
1000 μg
Aggrecan
Collagen type II
GAPDH