(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0088151
(43) 공개일자 2009년08월19일

(51) Int. Cl.
A61K 36/28 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0013528
(22) 출원일자 2008년02월14일
심사청구일자 2008년02월14일

(71) 출원인
대한민국(관리부서:농촌진흥청)
경기 수원시 권선구 서둔동 250번지
(72) 발명자
김동현
서울 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 약학대학
김상욱
서울 서초구 서초동 1338-21번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
서원호

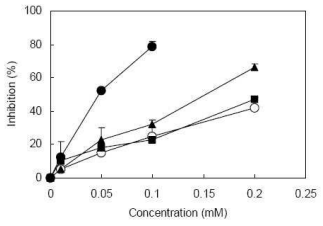
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 항알레르기 또는 항염증 물질로서의 머위 추출물 또는 머위발효물

(57) 요 약

본 발명은 항알레르기 또는 항염증 물질로서의 머위 추출물 또는 머위 발효물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 항알레르기 효과가 있으나 부작용은 거의 없는 생약성 항알레르기 또는 항염증 물질을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



Inhibitory effect of PJ (open circle), caffeic acid (closed triangle), chlorogenic acid (closed square) and azelastine (closed circle) against the degranulation of RBL-2H3 cells induced by IgE-antigen complex. RBL-2H3 cells, which were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and L-glutamine, were dispensed into 24 well plates, at a concentration of 5×10^5 cells per well, and sensitized using 0.5 μl /ml of mouse monoclonal IgE. They were then washed with 500 μl of siraganian buffer, exposed to 40 μl of various concentrations of test agentsfor 20 min, and treated with 20 μl of antigen (DNP HSA, 1 μl /ml) for 10 min at 37℃. The release of β hexosaminidase from RBL 2H3 cells was measured. Inhibition values indicate the mean ± S.D. (n=3).

(72) 발명자

장윤아

경기 수원시 장안구 이목동 원예연구소 채소과

윤형권

경기 수원시 장안구 이목동 원예연구소 채소과

서태철

부산 강서구 강동동 20번지 시설원예시험장

홍성식

경기 수원시 장안구 이목동 원예연구소 과수과

특허청구의 범위

청구항 1

항알레르기 또는 항염증 물질로서의 머위 추출물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 머위 추출은 알코올을 이용한 것임을 특징으로 하는 머위 추출물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 추출물은 감압 농축된 것임을 특징으로 하는 머위 추출물.

청구항 4

항알레르기 또는 항염증 물질로서, 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 머위 추출물과 유산균을 넣고 배양한 것을 특징으로 하는 머위 발효물.

청구항 5

항알레르기 또는 항염증 물질로서, 제 3 항에 따른 머위 추출물과 유산균을 넣고 배양한 것을 특징으로 하는 머위 발효물.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 유산균은 *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3168), *Bifidobacterium breve* (KCCM 10097) 또는 *Bifidobacterium longum* (KCCM 100493)인 것을 특징으로 하는 머위 발효물.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 유산균은 *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3168), *Bifidobacterium breve* (KCCM 10097) 또는 *Bifidobacterium longum* (KCCM 100493)인 것을 특징으로 하는 머위 발효물.

청구항 8

머위를 5% 소금물에 넣어 하룻밤 절이고, 물로 세척하고 2% 소금물에 넣어 충분히 적신 후 *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3168), *Bifidobacterium breve* (KCCM 10097) 또는 *Leuconostoc mesenteroides* (KCTC 1093) 균주를 넣어 4-15도에서 1- 15일간 발효시킨 후 이것에 다시 물 1ℓ를 넣어 90도에서 2시간 추출하고 감압농축하고 동결건조한 것을 특징으로 하는 머위 발효물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 항알레르기 또는 항염증 물질로서의 머위 추출물 또는 머위 발효물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 항알레르기 효과가 있으나 부작용은 거의 없는 생약성 항알레르기 또는 항염증 물질을 제공할 수 있다.

배 경 기 술

<2> 사회가 복잡해지고 산업과 문명의 발달로 인해 환경오염, 스트레스가 증가하고, 식생활이 변화되면서

알레르기성 환자들이 매년 증가하고 있다. 1980년에 아토피성 피부염을 비롯한 알레르기 환자는 1% 미만이었으나, 2000년대에는 5% 이상으로 급증하고 있으며 잠재적인 환자까지 포함하면 10%가 넘는 것으로 추정되고 있다.

<3> 알레르기란 생체 밖에서 생체 내로 들어온 외래물질(항원, Allergen)에 대해 지금까지 생기지않던 특이하고 변형된 반응을 나타내게 되는 현상을 말한다. 이때 아낙필락시스, 천식, 염증 등과 같은 증상을 일으키는 외래물질을 알레르겐(Allergen)이라 하고 그 결과 생긴 질병을 알레르기 질환 또는 과민반응이라고 한다. 알레르기의 발생원인은 항원항체반응의 결과로 나타나는 생체의 과도한 면역반응이며, 반응시간 및 보체 관여의 유무에 따라 1 ~ 4형으로 분류하고 있다.

<4> 제 1 형 반응은 주로 IgE 항체가 항원과 결합하여 비만세포(mast cells)나 혈액 중의 호염기구(basiophils)의 세포막의 수용체에 결합하여 탈과립되면서 히스타민(histamine), 사이토카인 등의 화학전달물질이 세포 밖으로 유리되어 평활근수축, 모세혈관 투과성 항진, 위산분비 등을 일으킨다. 이때 항원의 체내 침입경로에 따라 전신성 또는 국소성 반응을 일으킨다. 예들 들면, 아나필락시스 쇼크, 기관지천식, 두드러기, 화분증 등의 증상 차이가 나타난다. 이 제 1 형 반응으로 일어나는 질환은 유전적 원인이 밀접한 관계를 지니고 있으며 아토피성 질환이라고도 한다. 이 1 형 반응은 항원이 체내로 침입한 뒤에 증상이 빨리 나타난다. 그래서 즉시형 알레르기라고도 한다.

<5> 제 2 형 반응은 감염증, 약물, 유전적 특징 등으로 인해 생체 내 세포막이 항원이 되어 항체와 결합하여 보체에 의한 세포의 용해반응이 진행되는 알레르기 반응을 일으킨다. 예를 들면, Rh(-) 혈액형인 어머니가 Rh(+) 혈액형인 아기의 임신, 부적합수혈, 자가 면역성 용혈성 빈혈, 약제에 의한 용혈성 빈혈, 과립구 감소증, 혈소판감소성 자반병 등이 있다.

<6> 제 3 형 반응은 항원-항체반응에 의해 형성되는 항원-항체결합물이 혈관벽이나 조직에 침착되어 보체반응과 염증반응이 활성화되어 혈관이나 조직에 장애가 일어나는 알레르기 반응이다. 예를 들면, 홍반, 림프선종창, 관절통, 관절염, 신염, 연쇄구균감염 뒤의 급성사구체신염 등이 있다.

<7> 제 4 형 반응은 만성염증성 질환이며, 반응 생기는 것이 48시간이 지나서 더 심해지기 때문에 지연형 알레르기 반응이라고도 한다. 제 4 형 반응은 감작 T림프구와 항원이 반응하여 감작 T림프구에서 유리되는 여러 가지 활성 인자에 의해 생긴다. 예를 들면, 만성 염증 등이 있다.

<8> 이와 같은 알레르기 질환 중 가장 흔한 과민 반응은 아토피, 천식과 같은 제 1 형 과민반응과 만성 염증과 같은 제 4 형 과민반응이다. 예를 들면 아토피 알레르기 피부염 환자의 80% ~ 90%는 혈청 IgE가 증가하며 호흡기 아토피(알레르기성 비염이나 천식)가 동반하는 경우에는 특히 혈청 IgE가 높다. 약 85% 아토피 피부염 환자에게서 피부반응검사 혹은 RAST (radioallergosorbent test) 검사에서 음식물과 흡입 알레르겐에 대한 IgE가 양성으로 관찰된다. 만약 혈청 IgE가 증가한 경우, 제 1 형 과민 반응인 아토피 질환이 그치지 않고 만성 피부염을 일으키는 등 제 4 형 과민 반응을 일으키는 것으로 밝혀지고 있다. 그러므로 제 1 형 및 제 4 형 과민반응은 아주 밀접한 알레르기 반응이면서 알레르기 질환을 치료하는 중요한 열쇠가 되고 있다.

<9> 알레르기 반응은 항원의 종류, 항체의 종류, 개인의 체질에 따라 일정하지 않고 유전적 소인이 높은 것으로 알려져 있다. 그리고 알레르기 발증은 유전적 요인에 더하여 기후, 대기오염, 감염, 스트레스 등의 후천적 요인도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

<10> 알레르기질 질환을 개선하기 위해 샤워나 목욕 등을 하여 피부에 묻은 있는 알레르겐 (집 먼지, 진드기 등)을 제거하고, 알레르겐의 섭취를 하지 않도록 하는 것이 좋다. 그럼에도, 불구 알레르기 질환이 발생했을 때는 약물요법을 사용한다. 부신피질 호르몬제로서 항염증 효과 등이 우수한 스테로이드, 항히스타민제, 면역 억제제 등을 사용한다. 이 중 스테로이드는 피부위축, 혈관확장, 탈색, 자반 등의 부작용을 초래할 수 있고, 항히타민제는 졸림, 일과성 효과, 면역억제제는 신부전 등의 부작용이 발생하기 쉽다. 그외에도 탈감작, 또는 인터페론이 치료에 이용되기도 한다.

<11> 이와 같이 최근 알레르기성 질환의 증가와 급진적인 면역학의 발전으로 알레르기성 질환의 원인 규명 및 치료에 많은 진보가 있었음에도 불구하고, 아직까지 충분히 알레르기성 질환을 치료할 수 있는 약물의 개발이 이루어져 있지 않고 있다. 지금까지 개발된 약물 중에 알레르기를 완치할 수 있는 약물은 없으며 증상개선을 기대하고 있으나 부작용이 크다는 문제점이 있다.

<12> 따라서 항알레르기 효과가 있으나 부작용은 거의 없는 생약성 물질의 개발이 시급한 실정이다.

<13> 한편, 우리나라에서 자생하는 머위(*Petasites japonicus*, Japanese butterbur)는 봄과 초여름에 이용

되는 계절 채소로 이 역시 쓴맛이 강하므로 요리에 앞서 물에 담가두어 쓴맛을 제거한 후 사용된다. 그러나 갈변 물질인 폴리페놀화합물이 다량하고 있으며, 항염 및 항뇌허혈 효과 등이 보고되어 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<14> 본 발명은 상기와 같은 과제를 해결하기 위한 것으로서 생약성 물질인 머위를 이용하여 항알레르기 효과가 우수한 물질을 제공하고자 하는 것이다.

과제 해결수단

<15> 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 항알레르기 또는 항염증 물질로서의 머위 추출물을 제공한다.

<16> 또한, 본 발명은 항알레르기 또는 항염증 물질로서, 머위 추출물과 유산균을 넣고 배양한 것을 특징으로 하는 머위 발효물을 제공한다.

<17> 또한, 머위를 5% 소금물에 넣어 하룻밤 절이고, 물로 세척하고 2% 소금물에 넣어 충분히 적신 후 *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3168), *Bifidobacterium breve* (KCCM 10097) 또는 *Leuconostoc mesenteroides* (KCTC 1093) 균주를 넣어 4-15도에서 1- 15일간 발효시킨 후 이것에 다시 물 1ℓ를 넣어 90도에서 2시간 추출하고 감압농축하고 동결건조한 것을 특징으로 하는 머위 발효물을 제공한다.

효 과

<18> 본 발명에 따르면 항알레르기 효과가 있으나 부작용은 거의 없는 생약성 항알레르기 또는 항염증 물질을 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<19> [시료의 제조]

<20> 1. 머위 추출물 제조

<21> 머위 500g을 물 또는 알코올(에탄올 또는 메탄올) 2.5ℓ에 넣어 90도에서 2시간 추출하고 감압 농축하였다.

<22> 2. 머위 발효물 제조법(1)

<23> 증류수 100㎖에 머위 추출물 0.1 -10g (바람직하게는 1g)과 유산균인 *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3168), *Bifidobacterium breve* (KCCM 10097) 또는 *Bifidobacterium longum* (KCCM 100493) 습중량 1g을 넣어 3일(1- 7일 가능) 37℃(15-40℃ 적합)에서 배양하고 동결건조하였다.

<24> 3. 머위 발효물 제조법(2)

<25> 머위(잎) 500g을 물로 세척하고 5% 소금물에 넣어 하룻밤 절이고, 물로 세척하고 2% 소금물로 넣어 충분히 적신다. 여기에 유산균 *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3168), *Bifidobacterium breve* (KCCM 10097) 또는 *Leuconostoc mesenteroides* (KCTC 1093) 균주를 습중량 1g을 넣어 4-15도에서 1- 15일간 (바람직하게는 3일) 발효시킨다. 이것에 다시 물 1ℓ를 넣어 90도에서 2시간 추출하고 감압농축하고 동결건조하였다.

<26> [효과의 측정]

<27> (1) RBL-2H3 세포의 탈과립억제 효과 (항알레르기효과) 측정

<28> RBL-2H3 세포(Rat mast cell line)를 1% 어린 소 혈청(fetal bovine serum)과 L-글루타민(glutamine)을 포함하는 둘베코(Dulbeccos)에 의해 수정된 이글(Eagle)의 배지(Dubeccos' modified Eagle's medium, 이하 DMEM라 칭함)를 이용하여 37℃, 수분이 있는 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하며, 고착성을 갖는 세포를 트립신-EDTA 용액을 사용하여 부유시키며 이를 분리, 회수하여 실험에 사용하였다. RBL-2H3 세포를 24 웰에 각각 5×10^5 cell/well씩 분주한 후 쥐의 단일세포의 인(monoclonal)에 IgE 0.5㎍/㎖를 넣어 12시간 인큐베이터에서 배양시키면서 증감시켰다. 세포를 0.5㎖의 시라가니안(siraganian) 완충제(119mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM $MgCl_2$, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH7.2)로 씻어준 후 0.16㎖의 시라가니안 완충제(5.6mM 글루코즈(glucose), 1mM

$CaCl_2$, 0.1% BSA를 첨가)를 넣은 다음 37℃에서 10분간 인큐베이터에서 배양시켰다. 그 후, 본 발명에 따른 머위 추출물 및 머위 발효물을 각각 0.04㎖를 가한 다음 20분 경과한 후에 0.02㎖의 antigen(DNP-BSA(dinitrophenol-bovine serum albumin) 1㎍/㎖)으로 37℃에서 10분간 세포를 활성화한 후 2000rpm에서 10분간 원심 분리하여, 0.025㎖의 상등액을 96웰(well)로 옮겼다. 여기에 0.1M citrate 완충제 pH 4.5에 p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide를 넣어 만든 p-NAG 0.025㎖의 기질액 1mM 가한 후 37℃에서 60분간 배양시킨 다음 0.1M Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 0.2㎖를 가하여 반응을 정지시킨 후 405nm에서 엘리사 관측기(ELISA reader)로 흡광도를 측정하였다.

<29> (2) Passive cutaneous anaphylaxis 모델

<30> Dinitrophenol-bovine serum albumin (DNP-BSA)에 대한 IgE 혈청을 생리식염수로 희석한 10㎍을 에테르로 마취시킨 생쥐 (수컷 20-25g)의 등에 주사하고 수동감작시키고, 본 발명에 따른 머위 추출물 및 머위 발효물을 생리식염수에 용해 또는 현탁하여 경구 또는 복강으로 항원투여 한 시간 전에 투여하였다. 48시간 후 DNP-HSA 0.2mg과 evans blue 1.6mg을 함유한 생리식염수 0.2ml를 꼬리정맥에 주사하고, 30분 후 경부 탈골로 치사시켜 등에 누출된 evans blue 색소량을 측정하였다.

<31> 생쥐 등의 IgE 투여 부위 (1x1 cm)를 잘라 시험관에 넣고 1N-KOH 0.7ml을 넣고 37℃에서 하룻밤 동안 배양하고, 이 시험관에 0.6N 인산. 아세톤 혼합액 (5:13) 4㎖를 가한 다음 진탕하고 여과하여 추출된 색소를 620 nm에서 측정한다.

<32> (3) 소양 모델동물

<33> BALB/c 마우스(소양유도제 compound 48/80)와 ICR 마우스(Histamine실험용)를 경부 배면의 털을 제거하고 한군을 5마리로 하여 관찰 상자(24x22x24cm)에 10분간 방치하고, 시료를 생리식염수에 용해 또는 현탁하여 소양 유도제 주사 1시간 전에 복강 주사하거나, 6시간 전에 경구투여 하였다. 소양 유도제 (50㎍의 compound 48/80)을 피중주사 하고, 관찰 상자에 한 마리씩 격리시킨 뒤 무인조건 하에서 8-mm video (SV-K80, Samsung)로 1시간 녹화하고 소양행동을 계수하였다. 단, 소양행동은 뒷발로 주사부위를 긁는 행위를 인정하며 그 이외 부분은 인정하지 않는다.

<34> (4) RT-PCR을 이용한 생화학적 분석

<35> RBL-2H3 세포를 Tri reagent(Qiagen 사, 미국)을 넣고 실온에서 5분간 방치한 후, chloroform을 넣고 10분간 방치하였다. 7,500rpm에서 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 그 상등액에 isopropyl alcohol을 넣고 14,000rpm에서 원심분리를 한 후 상등액을 제거하였다. 70% ethanol로 세척하고 상등액을 제거하고 실온에서 20분간 말렸다. DEPC처리한 물을 넣고 260nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 1은 RNA 40 mg/ml로 하여 RNA량을 계산하였다.

<36> Pre-mixture와 reverse primer를 0.1% DEPC처리한 멸균 튜브에 넣고 72℃에서 5분간 반응시킨 후 즉시 얼음 위로 옮기고, AccuPower RT-PCR Premix tube에 forward primer와 0.1% DEPC 처리한 증류수를 넣고 42℃에서 60분간 cDNA합성 반응을 시키고, 94도에서 5분간 reverse transcriptase를 불활성화한 후 아래의 표 PCR조건에 따라 PCR을 실시하였다. 사용된 primer는 20pmol이며 최종 농도가 1pmol이 되도록 하였다.

<37> PCR 산물은 ethidium bromide(EtBr)이 첨가된 agarose gel 전기영동을 이용하여 확인하였다. Agarose gel은 1.5% gel이며, 완충액은 0.5xTBE를 사용하였다.

<38> [표1] PR-PCR 반응조건

	Primer	Reaction temperature (도)				
		denaturation	Annealing	Extension	cycle	Size
TNF-a	5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3' 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	64도 30초	60도 30초	72도 30초	35	402 bp
IL-4	5'-ATCGCAAAGAGGAAGTGAGC-3' 5'-TGTGGGCTATTAGTGTAG94GTGG-3'	94도 30초	58도 30초	72도 30초	30	409
β-actin	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	94도 60초	60도 40초	72도 60초	30	452

<39>

<40> (5) TNF-a와 IL-4의 측정

<41> RBL-2H3 cells (3×10^6 cells)을 DMEM을 이용하여 37℃, 수분이 있는 5% CO^2 인큐베이터에서 배양하며, 고착성을 갖는 세포를 트립신(trypsin)-EDTA 용액을 사용하여 부유시키며 이를 분리, 회수하여 실험에 사용하였다. RBL-2H3 세포를 24 웰(well)에 각각 5×10^5cell/well씩 분주한 후 쥐의 단일세포의 인(monoclonal)에 IgE 0.5㎍/㎖를 넣어 12시간 인큐베이터에서 배양시키면서 증감하였다. 세포를 0.5㎖의 시라가니안 완충제(119mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM $MgCl_2$, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH7.2)로 씻어준 후 0.16㎖의 시라가니안 완충제(5.6mM 글루코즈(glucose), 1mM $CaCl_2$, 0.1% BSA를 첨가)를 넣은 다음 37℃에서 10분간 인큐베이터에서 배양시켰다. 그 후, 본 발명에 따른 머위 추출물 및 머위 발효물을 각각 0.04㎖를 가한 다음 20분 경과한 후에 0.02㎖의 antigen (DNP-BSA(dinitrophenol-bovine serum albumin) 1㎍/㎖)으로 37℃에서 40분간 세포를 활성화한 다음 2,000rpm에서 10분간 원심 분리하여, 0.025㎖의 상등액을 96웰(well)로 옮겼고, Endogen Elisa kit (미국)로 IL-4 와 TNF-a를 측정하였다.

<42> (6) Immunoblot

<43> RBL-2H3 cells (3×10^6 cells)을 DMEM을 이용하여 37℃, 수분이 있는 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하며, 고착성을 갖는 세포를 트립신(trypsin)-EDTA 용액을 사용하여 부유시키며 이를 분리, 회수하여 실험에 사용하였다. RBL-2H3 세포를 24 웰(well)에 각각 5×10^5cell/well씩 분주한 후 쥐의 단일세포의 인(monoclonal)에 IgE 0.5㎍/㎖를 넣어 12시간 인큐베이터에서 배양시키면서 증감하였다. 세포를 0.5㎖의 시라가니안(siraganian) 완충제(119mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM $MgCl_2$, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH7.2)로 씻어준 후 0.16㎖의 시라가니안 완충제(5.6mM 글루코즈(glucose), 1mM $CaCl_2$, 0.1% BSA를 첨가)를 넣은 다음 37℃에서 10분간 인큐베이터에서 배양시켰다. 그 후, 본 발명에 따른 머위 추출물 및 머위 발효물 각각 0.04㎖를 가한 다음 20분 경과한 후에 0.02 ㎖의 antigen (DNP-BSA(dinitrophenol-bovine serum albumin) 1㎍/㎖)으로 37℃에서 40분간 세포를 활성화한 다음 2,000rpm에서 10분간 원심 분리하여, hypotonic buffer(10mM Tris-HCl, 1.5mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 0.1% NP-40, pepstatin 5㎍/ml, aprotinin 5㎍/ml) 0.1ml을 가해 현탁 후 15분간 얼음 위에서 방치하였다. 그리고 4℃, 12,000rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액인 cytosol fraction을 취하고 다시 침전에 extraction buffer (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 300mM NaCl, 1mM DTT, pepstatin 5㎍/ml, aprotinin 5㎍/ml) 0.1ml을 가해 현탁 후 30분간 얼음 위에서 방치하고, 그리고 4℃, 12,000rpm에서 30분간 원심분리 후 상등액인 nuclear fraction을 취하였다. Cell lysate(40㎍)를 10% SDS polyacrylamide gel상에서 전기영동 한 후 PVDF (Millipore) membrane에 transfer한 후 membrane은 PBS에 녹인 2% skim milk용액으로 상온에서 1시간 동안 blocking하고, 다시 1% skim milk 용액에 1:500으로 희석한 primary antibody를 2시간 동안 담가 천천히 진탕하였다. Primary antibody 희석용액을 버리고 세척 용액 (0.05% PBS-tween)으로 10분씩 두 번 세척 후 다시 1% skim milk 용액에 1:5000으로 희석한 secondary antibody를 1시간 동안 담가 천천히 진탕하였다. 위와 같이 secondary antibody 희석용액을 버리고 세척 용액으로 10분씩 세 번 세척하고 enhanced chemilluminescence system

(PIERCE)을 이용하여 검출하였다.

<44> <실험결과>

<45> 머위 추출물(PJ) 및 머위 발효물(FPJ)에 대해 아낙필라시스 및 소양작용에 대해 억제하는 효과를 측정하였다(표2).

<46> 본 발명에 따른 머위 추출물 및 머위 발효물 모두 아낙필라시스 및 소양효과를 억제하는 효과를 보였다. 그러나 이를 머위 발효물은 머위 추출물보다 더 우수한 항 소양효과 및 항아낙필락시스 효과를 보였다.

<47> [표2]

Agent	Dose (mg/kg)	Inhibition (%)		
		아낙필락시스 PCA reaction[a)]	소양반응 Scratching behavior [b)]	혈관투과성 Vascular permeability[c)]
PJ	50	11 ± 3	18 ± 2	18 ± 2
	100	15 ± 3	23 ± 2	31 ± 4
FPJ	50	17 ± 2	15 ± 1	32 ± 6
	100	32 ± 3	40 ± 6	40 ± 8
Azelastine	10	73 ± 10	67 ± 10	71 ± 4

a) The amounts of Evan blue extravasated from the dorsal skin (1 x 1 cm) of the control stimulated with the IgE antigen complex and vehicle treated groups were 24 ± 4 μg and 11 ± 3 μg, respectively.

b) The scratching behavior of the normal control, which was treated with saline alone, and the control group, which was treated with compound 48/80 and saline instead of the test agents, was counted for 1 h. The scratching behavior counted for the normal and control groups was 3 ± 2 and 245 ± 23, respectively.

c) The amounts of Evan blue extravasated from the dorsal skin (1 x 1 cm) of the control stimulated with the IgE-antigen complexand vehicle-treated groups were 18 ± 4 μg and 7 ± 3 μg, respectively.

Inhibition values indicate the mean ± S.D. (n=6).

<48>

<49> 머위의 물 추출물과 알코올 추출물을 비교할 때 폴리페놀 등의 추출율이 높은 알코올 추출물에서 아낙필라시스 및 소양작용을 억제하는 효과가 더 우수했다(표3). 이 알코올 추출물로부터 활성성분을 검색하여 caffeic acid 및 chlorogenic acid를 분리하였다. HPLC 분석에 의해 chlorogenic acid가 머위에 0.7%와 caffeic acid가 0.3% 함유하고 있었다. 이 chlorogenic acid 및 caffeic acid 모두 소양작용 및 PCA 반응을 억제하는 효과를 보였다(표3).

<50> [표3]

Agent	Dose (mg/kg)	Inhibition (%)		
		아나필락시스 PCA reaction[a]	소양반응 Scratching behavior[b]	혈관투과성 Vascular permeability[c]
PJ EtOH extract	50	22 ± 3	19 ± 2	31 ± 3
	100	43 ± 3	30 ± 4	58 ± 4
Chlorogenic acid	10	34 ± 5	20 ± 3	28 ± 4
	25	49 ± 10	29 ± 3	48 ± 3
Caffeic acid	10	56 ± 11	32 ± 5	37 ± 5
	25	67 ± 12	50 ± 5	66 ± 6
Azelastine	10	78 ± 11	73 ± 4	74 ±15

a) The amounts of Evan blue extravasated from the dorsal skin (1 x 1 cm) of the control stimulated with the IgE antigen complex and vehicle treated groups were 24 ± 4 μg and 11 ± 3 μg, respectively.

b) The scratching behavior of the normal control, which was treated with saline alone, and the control group, which was treated with compound 48/80 and saline instead of the test agents, was counted for 1 h. The scratching behavior counted for the normal and control groups was 3 ± 2 and 245 ± 23, respectively.

c) The amounts of Evan blue extravasated from the dorsal skin (1 x 1 cm) of the control stimulated with the IgE-antigen complexand vehicle-treated groups were 18 ± 4 μg and 7 ± 3 μg, respectively.

Inhibition values indicate the mean ± S.D. (n=6).

<51>

<52> 머위의 항알레르기 작용기전을 규명하기 위해 RBL-2H3 세포의 탈 과립 억제효과를 측정하였다. 그 결과 물 추출물보다 알코올추출물이 더 우수한 탈 과립 억제 효과를 보였다. 아울러 caffeic acid chlorogenic acid 도 탈 과립을 억제하였다. 이 중에서는 caffeic acid가 가장 우수한 효과를 보였다.

<53> 또한, 본 발명에 따른 머위 추출물, 머위 발효물 및 그 분리 성분들에 대해 RBL-2H3 세포에서 염증성 사이토카인 및 IgE 생산 유도 사이토카인의 생산성에 미치는 효과를 측정하였다. 머위 발효물은 2g/kg을 생쥐에 투여하여도 설사, 행동이상, 장기 이상 등 급격한 부작용을 관찰할 수 없었다(도 1, 도 2).

<54> 또한, 머위 알코올 추출물 및 그 주성분의 항염증 효과를 carragenan으로 생쥐에 등에 유도한 염증에 미치는 효과를 측정하였다(도 3). 염증성 지표인 air pouch에 백혈구 등의 세포의 수가 carragenan으로 유도한 염증에서 이 추출물과 함유성분인 caffeic acid와 chlorogenic acid 모두 저해효과를 보였다. 아울러, 단백질, PGE2 및 염증성 사이토카인인 TNF-a의 생산을 억제함을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

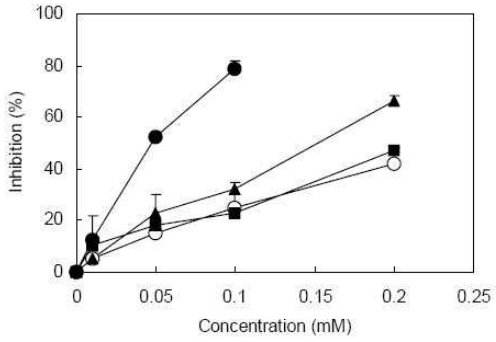
<55> 도 1은 본 발명에 따른 머위 추출물, 머위 발효물 및 그 분리 성분들에 대해 RBL-2H3 세포에서 염증성 사이토카인 및 IgE 생산 유도 사이토카인의 생산성에 미치는 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

<56> 도 2는 본 발명에 따른 머위 추출물, 머위 발효물 및 그 분리 성분들에 대해 TNF-α 및 IL-4의 단백질 발현 관여도를 나타낸 그래프이다.

<57> 도 3은 본 발명에 따른 머위 알코올 추출물 및 그 주성분의 항염증 효과를 carragenan으로 생쥐에 등에 유도한 염증에 미치는 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

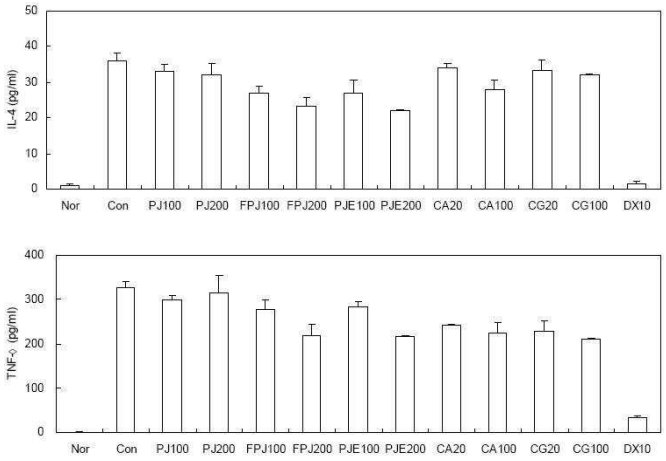
도면

도면1



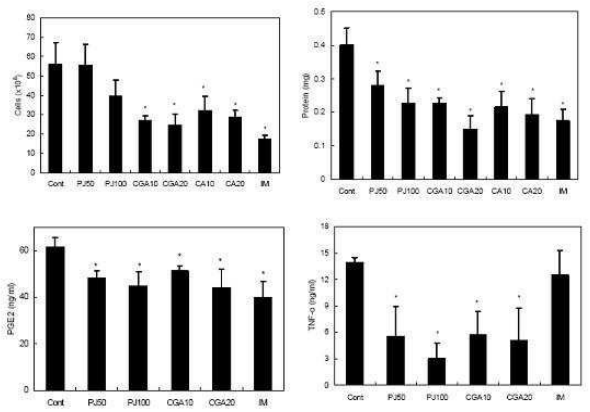
Inhibitory effect of PJ (open circle), caffeic acid (closed triangle), chlorogenic acid (closed square) and azelastine (closed circle) against the degranulation of RBL-2H3 cells induced by IgE-antigen complex. RBL-2H3 cells, which were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and L-glutamine, were dispensed into 24 well plates, at a concentration of $5x10^5$ cells per well, and sensitized using 0.5 μ /ml of mouse monoclonal IgE. They were then washed with 500 μ of siraganian buffer, exposed to 40 μ of various concentrations of test agentsfor 20 min, and treated with 20 μ of antigen (DNP HSA, 1 μ /ml) for 10 min at 37°C. The release of β hexosaminidase from RBL 2H3 cells was measured. Inhibition values indicate the mean ± S.D. (n=3).

도면2



The effects of PJ (머위), FPJ (머위 발효물), PJE (70% 에탄올 머위 추출물) and caffeic acid (CA), chlorogenic acid (CG) on the protein expression of TNF-α and IL-4 in RBL-2H3 cells induced by the IgE-antigen complex. RBL-2H3 cells (5 x 105 cells) were treated with 0.5 μg/mL of mouse monoclonal IgE for 1 h, and then exposed to 0.2 mL of the test agents (Nor, normal; Con, vehicle alone; 100, 100 μg/ml; 200, 200 μg/ml) for 20 min, followed by treatment with 0.2 mL dinitrophenol-human serum albumin (DNP-HSA, 1 μg/mL) for 1 h (RT-PCR) or 4 h (for ELISA) at 37oC, and then ELISA for TNF-α and IL-4 were performed. Normal (Nor) was treated with vehicle alone control group (Con) was with vehicle and IgE-antigen complex. Values represent the mean ± S.D. for duplicate experiments. Inhibition values indicate the mean ± S.D. (n=3)

도면3



Inhibitory effect of PJ 70% ethanol extract, caffeic acid (CA), chlorogenic acid (CGA) and indomethasin (IM) on carragenan-induced inflammation in mice.