



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0058710
(43) 공개일자 2017년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/899 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/899 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0162647
(22) 출원일자 2015년11월19일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김유리
서울특별시 종로구 통일로18길 9, 107동 403호 (무악동, 인왕산I-PARK아파트)
염이슬
서울특별시 서대문구 연대동문1길 30, 이화빌 302호 (대신동)
(74) 대리인
안소영

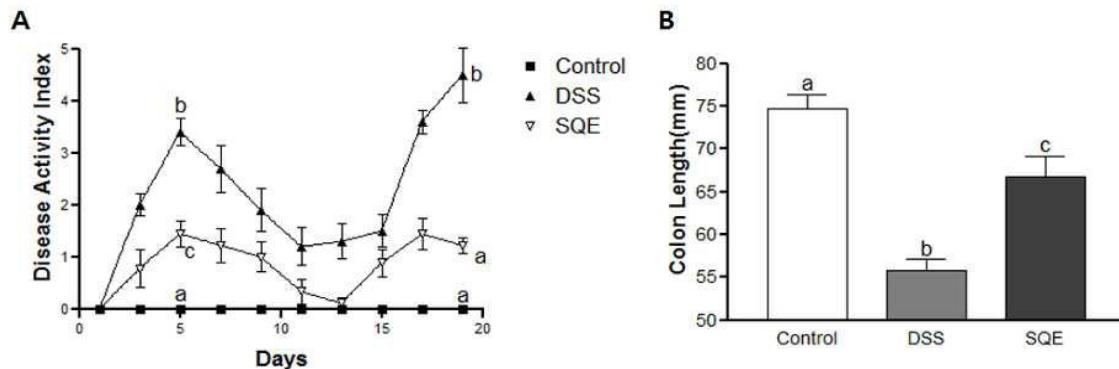
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 제주조릿대 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009777012015

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 공동연구사업-국책기술개발사업

연구과제명 제주조릿대의 대장건강개선 기능성 규명 및 효능 평가

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.01 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

제주조릿대 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 만성 대장염인 약학적 조성물.

청구항 3

제주조릿대 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 개체의 장내 미생물 군집 정상화용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 개체는 만성 대장염을 앓고 있는 개체인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은 상기 만성 대장염을 앓고 있는 개체의 장내 미생물 다양성 및 장내 미생물 종류를 만성 대장염을 앓고 있지 않은 개체의 수준과 동일 또는 유사하게 변화시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 제주조릿대 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 대장 및 소장의 점막에 만성적인 염증 또는 궤양이 야기되어, 장기적으로 설사, 혈변이 계속되고, 재발을 반복하는 난치병이다.

[0003] 염증성 장질환은 위장관의 만성적인 염증성 질환으로 개발도상국에서 이환율이 증가하고 있다(Molodecky, Soon, Rabi, Ghali, Ferris, Chernoff, et al., Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review, Gastroenterology, 142(1), 46-54 e42; quiz e30, 2012).

[0004] 염증성 장질환은 환경적 인자, 유전적 및 면역의 인자에 의해 유발될 수 있으며(Kitahora, T., Familial prevalence of inflammatory bowel disease, Nihon Rinsho, 70 Suppl 1, 44-47, 2012, Lowe, A. M., Roy, P. O., M, B. P., Michel, P., Bitton, A., St-Onge, L., & Brassard, P. Epidemiology of Crohn's disease in Quebec, Canada. Inflamm Bowel Dis, 15(3), 429-435, 2009), 염증성 장질환의 정확한 병인(etiology) 불명확한 것으로 남아있다(Toumi, R., Abdelouhab, K., Raza, H., Soufli, I., Raissi-Kerboua, D., Djeraba, Z., & Touil-Boukoffa, C. (2013). Beneficial role of the probiotic mixture Ultrabiotique on maintaining the integrity of intestinal mucosal barrier in DSS-induced experimental colitis. Immunopharmacol Immunotoxicol, 35(3), 403-409).

[0005] 염증성 장질환은 임상적으로 유사하면서도 조직학적 소견과 내시경 및 면역학적 측면에서 서로 다른 궤양성 대장염 및 크론병의 두 가지 질환으로 분류되며, 이러한 염증성 장질환은 염증성 매개 인자와 면역세포의 활성화가 중요한 병인인 것으로 알려져 있다.

[0006] 장면역계의 지속적이거나 부적절한 활성화는 만성 점막성 염증의 병리생리에서 중요한 역할을 하며, 특히 호중구, 대식세포, 림프구 및 비만세포의 침윤에 의해 결국 점막 파괴 및 궤양을 초래한다.

- [0007] 또한, 침윤되고 활성화된 호중구는 활성산소질소종의 중요한 원인이 되며, 이러한 활성종은 세포독성 물질로서 가고 단백질, 지질 및 핵산에 의해 세포성 산화 스트레스를 유도하고 상피성 기능장애 및 손상을 초래한다.
- [0008] 염증성 장질환 치료제로는 통상의 설사 치료제 등은 유효하지 않으며, 현재 염증성 장질환 치료제로는 프로스타글란딘(prostaglandins)의 생성을 차단하는 5-아미노살리실산(5-aminosalicylic acid; 5-ASA) 계통 약물 예를 들어, 설파살라진 등을 이용하거나 스테로이드류의 면역억제제를 사용하고 있다.
- [0009] 설파살라진(sulfasalazine)은 복부허실(fullness), 두통, 발진, 간질환, 백혈구 감소증, 무과립구증, 남성 불임 등과 같은 부작용 또는 역효과를 일으키기 쉽다. 또한, 설파살라진이 장의 환부를 절개한 환자 또는 차도가 있는 환자에게 충분한 재발 억제 효과가 있는지는 불분명하다.
- [0010] 스테로이드류의 면역억제제는 부신피질 스테로이드로서, 단기적인 효과는 인정받고 있지만, 장기적인 예후를 향상시킬 수는 없으며, 유도된 감염성 질환, 2차 부신피질 부전증, 소화성 궤양, 당뇨병, 정신장애, 스테로이드성 신장병 등과 같은 부작용의 측면에서 단지 급성인 경우에만 사용되어야 하는 한계가 있다.
- [0011] 한편, 천연 추출물 및 이를 이용한 제형들이 기침, 감기에서부터 기생충 감염 및 염증에 이르는 다양한 질환을 완화하고 치료하는데 사용되어 왔다. 오늘날 시장에서 이용되는 항암제의 60% 이상 그리고 감염성 질환의 75% 이상이 천연물에서 기원하고 있다. 이는 천연물이 매우 다양하며 높은 특이적인 생리적 활성을 제공하기 때문이다.
- [0012] 그러나, 염증성 장질환에 대해 아직까지 신뢰할 만한 치료요법은 없으며 이러한 질환에 대해 효과적인 치료제의 개발이 요구되고 있고, 이를 위하여 염증성 장질환에 유용한 천연 추출물이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 제주조릿대 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [0014] 또한, 본 발명의 목적은 제주조릿대 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 개체의 장내 미생물 군집 정상화용 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 제주조릿대 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 제주조릿대(*Sasa quelpaertensis Nakai*)는 한라산 일대에서만 제한적으로 분포하는 지역 고유종으로 분포지 내에서 대규모의 군락을 이루어 생육하고 있으며, 내륙 지방의 조릿대와는 형태상의 특징으로 구별된다.
- [0017] 상기 제주조릿대는 속씨식물, 외떡잎식물, 벼목에 속하며, 녹색의 줄기는 털이 없고 마디가 자주색으로 도드라진다. 장타원형의 잎은 길이 7~20cm, 폭 15~20cm 정도이다. 털이 없는 표면은 연녹색을 띄고 뒷면은 회록색으로 약간의 털이 있다. 꽃은 원추화서로 달리는데 6~7년 주기로 핀다. 열매는 열과로 먹을 수 있다. 가지가 갈라지지 않고 마디가 공처럼 둥글며 털이 없는 것이 조릿대와 다르다.
- [0018] 본 발명에서 제주조릿대는 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에서 추출물이란 제주조릿대로부터 분리하여 얻은 물질을 의미하며, 구체적으로는 당업계에 공지된 통상적인 추출용매, 예를 들어 물, C₁₋₄ 알코올(예: 메탄올, 에탄올, 부탄올 등), 또는 상기 알코올과 물과의 혼합용매 등을 사용하여 분리하여 얻은 물질을 의미한다.
- [0020] 바람직하게, 본 발명의 제주조릿대 추출물은 제주조릿대 잎의 수 또는 C₁-C₄ 알코올 추출물이고, 보다 바람직하게는 에탄올 추출물이다.
- [0021] 본 발명에서 염증이란 외부 감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발 물질)의 침입에 의하여 형성되는 농양의 병리적 상태를 의미한다. 구체적으로 상기 염증은 염증이 발생한 상태, 질환을 의미하는 것이다.

- [0022] 본 발명의 염증성 장질환은 장에 염증이거나 궤양이 생기는 만성 염증 질환을 의미하며, 예컨대 궤양성 대장염, 크론병, 베체트병, 만성 대장염 등일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0023] 바람직하게, 본 발명의 염증성 장질환은 만성 대장염이다.
- [0024] 본 발명에서 예방은 상기 제주조릿대 잎 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 염증을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 치료란 상기 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0025] 구체적인 일 실시예에서 제주조릿대 잎 추출물을 주 3회에 걸쳐 DSS (Dextran Sulfate Sodium)로 대장염을 유도한 마우스 모델에 투여하고 임상적 염증 척도를 분석하였고, 그 결과, 제주조릿대 잎 추출물은 염증 정도가 DSS 처리 대조군에 비하여 완화되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0026] 또한 본 발명에서 제주조릿대 잎 추출물은 염증성 장질환, 예컨대 만성 대장염을 앓고 있는 개체의 장내 미생물 군집을 정상화시킴으로써, 염증성 장질환을 예방, 개선 및 치료 효과를 가진다.
- [0027] 따라서, 다른 하나의 양태로 본 발명은 제주조릿대 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 개체의 장내 미생물 군집 정상화용 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명에서 개체란 염증성 장질환이 이미 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.
- [0029] 이 때 상기 개체는 바람직하게 만성 염증성 장질환, 바람직하게는 만성 대장염을 앓고 있는 개체이나, 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 본 발명에 따른 제주조릿대 잎 추출물을 포함하는 조성물은 만성 염증성 장질환(특히 만성 대장염)을 앓고 있는 개체의 장내 미생물 다양성 및 장내 미생물 종류를 만성 염증성 장질환(특히 만성 대장염)을 앓고 있지 않은 개체의 수준과 동일 또는 유사하게 변화시키는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 구체적인 일 실시예에서, DSS로 대장염을 유도한 마우스 모델에 19일 동안 제주조릿대 잎 추출물을 투여한 후, 장내 미생물 군집의 다양성과 그 종류를 분석한 결과, 제주조릿대 잎 추출물은 종, 속, 과, 강, 문 수준에서 대장염 동물모델의 장내 미생물 군집을 정상 대조군과 동일 또는 유사한 수준으로 변화시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 약학적으로 유효한 양이란 의학적 치료에 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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.
- [0034] 본 발명의 상기 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 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 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 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 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위탐술, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 상기 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간 에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0036] 본 발명에 따른 제주조릿대 잎 추출물은 장내 미생물 군집의 정상화를 통하여 염증 반응을 억제하는 효과를 가지므로, 궁극적으로 염증성 장질환, 특히 만성 대장염의 예방 또는 치료제로 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 임상적 염증척도(DAI) 및 대장 길이 평가 결과 그래프이다.
 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 동물모델의 변에서 피로시퀀싱(pyrosequencing)으로 분석한 β -diversity 결과이다. (각 동물모델 군별로 6마리)
 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 동물모델의 변에서 피로시퀀싱(pyrosequencing)으로 분석한 Phylum level의 박테리아 구성을 나타낸 그래프이다. (그래프의 바는 각 샘플의 abundances를 나타냄, n=6)
 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 동물모델의 변에서 피로시퀀싱(pyrosequencing)으로 분석한 Class level의 박테리아 구성을 나타낸 그래프이다. (컷오프 값은 5%로 설정함)
 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 동물모델의 변에서 피로시퀀싱(pyrosequencing)으로 분석한 Family level의 박테리아 구성을 나타낸 그래프이다. (그래프의 바는 각 샘플의 abundances를 나타냄, n=6)
 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 동물모델의 변에서 피로시퀀싱(pyrosequencing)으로 분석한 Class/Species level의 박테리아 구성을 나타낸 그래프이다. (A=Control, B=DSS, C=SQE)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0040] 참고예: 만성염증 장질환이 유도된 마우스 모델의 제작

[0041] C57BL/6 mouse (5주령)을 구입하여 정상대조군, 만성염증성 장질환 대조군, 및 장질환 유도 후 제주조릿대 잎 추출물 투여군 (300 mg/kg b.w)의 세 군으로 구분하였다. 만성염증성 장질환을 유도하기 위하여, Dextran sulphate sodium (DSS)를 사용하였으며, 구체적으로는 2.5% DSS를 물에 섞어 7일 동안 먹인 후 7일 동안 일반 물을 먹인 뒤 7일 동안에 다시 2.5%의 DSS를 먹임으로써 만성염증 장질환을 유도하였다.

[0043] 실시예 1: 만성염증성 장질환 동물모델의 임상적 염증척도 및 대장길이 평가

[0044] (1) 임상적 염증척도 (Disease Activity Index, DAI score) 평가
 [0045] 실험기간 동안 주3회에 걸쳐 대장 염증의 척도로 여겨지는 실험동물의 혈변 여부, 변의 농도와 몸무게 변화를 측정하여 이를 수치화한 DAI score를 통계적으로 분석하였다.
 [0046] 그 결과 도 1A에서 확인할 수 있듯이 정상대조군(control)은 DAI score가 0점이었고, 만성염증성 장질환 대조군(DSS)은 유의적으로 DAI score가 높았다. 반면, 제주조릿대 잎 추출물 300 mg/kg b.w.을 경구투여한 군(SQE)에서는 염증 정도가 완화되는 결과를 얻을 수 있었다.
 [0047] (2) 대장 길이 평가
 [0048] 도 1B에 나타난 바와 같이 만성염증성 장질환 대조군(DSS)의 경우 정상대조군(control)에 비해서 대장의 길이가

짧았다. 그런데 제주조릿대 잎 추출물 300 mg/kg b.w.을 경구투여한 군(SQE)의 경우 대장 길이가 정상대조군(control)과 유사한 정도로 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 2: 장내 미생물 군집 분석

제주조릿대 잎 추출물이 만성염증성 장질환 동물모델의 장내 미생물 군집의 다양성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, DSS로 만성 염증성 장질환을 유도한 마우스 모델에서 DSS처리 후 19일차의 마우스 변을 수집하여 genomic DNA를 뽑아낸 뒤, PCR을 통해 증폭시킨 후 피로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하였다. 정상대조군(Control), 만성 염증성 장질환 대조군(DSS) 및 제주조릿대 잎 투여군(SQE) 3그룹의 microbial α -diversity를 분석한 결과는 표 1에 나타내었으며, Community sample간의 차이를 통계를 통해 비교 분석하여 각각 그룹의 유사도, 거리를 파악할 수 있는 β -diversity를 분석한 결과는 도 2에 나타내었다.

[표 1]

	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
Number of OTUs	444.83 $\pm$ 66.84 ^a	256.33 $\pm$ 65.64 ^b	404.17 $\pm$ 178.21 ^{ab}
Chao-1 estimators	657.94 $\pm$ 91.98 ^a	366.26 $\pm$ 109.76 ^b	594.05 $\pm$ 259.98 ^a
Shannon's diversity index	4.75 $\pm$ 0.19 ^a	3.96 $\pm$ 0.31 ^b	4.52 $\pm$ 0.69 ^a
Goods Lib. Coverage	0.97 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.01

Values are mean $\pm$ SD

상기 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이 진화 계통 분류에서 가장 끝 분지가 되는 개체로 분류의 대상이 되는 생물체 수를 나타내는 Operational Taxonomic Units (OTUs)의 수가 Control 군에 비해 DSS 군에서 유의적으로 낮았고 SQE 군에서 다시 증가하는 경향이 나타났다. 또한 Evenness와 richness의 다양성을 나타내는 지표인 Chao-1, Shannon diversity index가 Control 군에 비해 DSS 군에서 유의적으로 감소하고 SQE 군에서 유의적으로 증가하였다. 샘플링을 통해 얼마나 많은 population을 나타내고 있는지를 보여주는 지표인 Goods Lib. coverage는 세 그룹에서 모두 차이를 보이지 않아 유사한 coverage 수에서 분석되었음을 알 수 있었다. 즉 Microbial diversity는 Host의 질환에 의해 감소하거나 영향을 받으며 이러한 감소가 제주조릿대 잎 추출물 처리에 의해 다시 증가할 수 있음이 증명되었다.

또한, 도 2에 나타나듯이 PC01, PC02 2개의 축을 구성하였을 때 각각의 거리는 PC01=18.478%, PC02=42.369%로 나타났고 Control 군 내에서 샘플간의 유사성을 확인할 수 있었다. 또한 Control 군과 DSS 군 간의 거리는 차이를 보이며, 축의 반대방향으로 구성되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 반면 SQE 군은 DSS 군보다는 Control 군과 가까운 거리를 가지고 유사한 구성을 나타내었다. 이로써 만성 염증성 장질환이 유도된 동물모델에 제주조릿대 잎 추출물을 투여하는 경우 장내 미생물 군집의 다양성을 Control 군과 유사하게 변화시킴을 확인할 수 있었다.

실시예 3: 장내 미생물 군집의 구성 변화 평가

제주조릿대 잎 추출물이 만성염증성 장질환 동물모델의 장내 미생물 군집의 구성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, DSS로 만성 염증성 장질환을 유도한 마우스 모델에서 DSS처리 후 19일차의 마우스 변을 수집하여 genomic DNA를 뽑아낸 뒤, PCR을 통해 증폭시킨 후 피로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하였다. 그리고 그 결과를 도 3 내지 도 6 및 표 2 내지 6에 나타내었다.

Phylum level의 분석결과는 도 3 및 하기 표 2에 나타난 바와 같다.

[0060] [표 2]

Group	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
Bacteria			
Firmicutes	58.67 ± 4.00 ^a	38.51 ± 10.82 ^b	63.08 ± 11.87 ^a
Bacteroidetes	34.75 ± 3.69 ^a	50.34 ± 13.27 ^b	28.14 ± 6.98 ^a
Proteobacteria	5.01 ± 5.77	8.04 ± 6.87	3.26 ± 3.58
Deferribacteres	1.39 ± 1.68	1.64 ± 1.56	2.72 ± 3.00
Verrucomicrobia	0 ± 0	1.25 ± 1.85	2.52 ± 4.25
Actinobacteria	0.14 ± 0.09	0.20 ± 0.16	0.26 ± 0.22
Bacteroidetes/ Firmicutes	0.59 ± 0.02 ^a	1.44 ± 0.28 ^b	0.47 ± 0.08 ^a

[0061]

[0062] 먼저 각 그룹에서 동물 Fecal 샘플이 나타내는 박테리아의 상대적인 abundance를 확인하였을 때, Bacteroidetes와 Firmicutes가 가장 많은 비율을 차지하고 있었다. 또한 대장 내에서 Short Chain Fatty Acid를 발효대사에 이용하면서 대장건강에 영향을 미치는 Firmicutes의 비율이 Control 군에 비해 DSS 군에서 감소하고 SQE 군에서 유의한 수준으로 그 비율이 증가하였다. 그리고 비만이나 염증과 관련이 있는 Bacteroidetes의 비율은 DSS 군이 Control 군에 비해 증가하고 SQE 군에서 유의적으로 감소하였다. 만성 염증성 장질환 모델의 대장에서 변화되는 Bacteroidetes/Firmicutes 비율 역시 Control 군에 비해 DSS 군에서 증가하였고 SQE 군에서 유의한 수준으로 그 비율이 감소함을 확인하였다. 이로써, DSS로 만성 염증성 장질환을 유도한 동물모델에서는 장내 미생물 군집의 Dysbiosis가 관찰되는데, 상기 Dysbiosis가 제주조릿대 잎 추출물의 투여로 개선됨을 알 수 있었다.

[0063] Class level의 분석결과는 도 4 및 하기 표 3에 나타난 바와 같다.

[0064] [표 3]

Group	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
Bacteria			
Clostridia	54.7 ± 4.7 ^a	20.7 ± 7.3 ^b	45.0 ± 22.1 ^a
Bacteroidia	34.7 ± 3.7 ^a	50.3 ± 13.3 ^b	28.1 ± 7.0 ^a
Erysipelotrichi	3.1 ± 4.5 ^a	16.2 ± 12.0 ^{ab}	17.8 ± 17.9 ^b
Deltaproteobacteria	4.9 ± 5.7	2.1 ± 3.0	3.0 ± 3.7
Deferribacteres_c	1.4 ± 1.7	1.6 ± 1.6	2.7 ± 3.0
Gammaproteobacteria	0.1 ± 0.1 ^a	4.1 ± 7.4 ^b	0.2 ± 0.3 ^a
Verrucomicrobiae	0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.8	2.5 ± 4.2
Bacilli	0.9 ± 0.0	1.6 ± 1.7	0.3 ± 0.1
Betaproteobacteria	0.0 ± 0.0	1.8 ± 3.6	0.1 ± 0.1

[0065]

[0066] Class level은 Phylum level과 유사하게 박테리아 구성이 변화하였으며, 특히 SQE 군은 상대적으로 Control 군과 유사한 구성을 보여주었다. 가장 큰 변화가 관찰된 군은 Clostridia의 비율로 DSS 군에서 감소하고 SQE 군에서 유의적으로 증가하였다. 이는 대장에서 항염증 조절 작용과 T cell 생산에 관련되어 있는 Clostridia가 DSS로 유도된 만성 염증성 장질환의 발병 및 발전에 영향을 미칠 수 있음을 암시하는 결과이다. 반면, Bacteroidia의 비율은 Control 군에 비해 DSS 군에서 유의적으로 증가하였고 SQE 군에서 유의적으로 감소하였다. 또한, Phylum level에서 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 proteobactreria의 하위 level에 속하는 Gammaproteobacteria의 비율이 염증 환경에 의해 DSS 군에서 유의적으로 증가하였고 SQE 군에서는 Control 군과 유사한 비율을 나타내었다.

[0067] Family level의 분석결과는 도 5 및 하기 표 4에 나타난 바와 같다.

[0068] [표 4]

Family	Group	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
Lachnospiraceae		40.98 ± 2.97 ^a	12.95 ± 7.52 ^b	29.19 ± 16.54 ^a
Bacteroidaceae		20.33 ± 6.54 ^a	42.24 ± 8.75 ^b	20.29 ± 6.46 ^a
Ruminococcaceae		12.77 ± 2.87 ^a	5.39 ± 1.60 ^b	12.52 ± 7.76 ^a
Coprobacillus_f		0.17 ± 0.13 ^a	9.50 ± 3.86 ^b	3.75 ± 4.24 ^a
Prevotellaceae		4.08 ± 3.38	2.25 ± 2.84	3.23 ± 3.64
Enterobacteriaceae		0.07 ± 0.07 ^a	4.13 ± 7.36 ^b	0.18 ± 0.34 ^a
Streptococcaceae		0.57 ± 0.41	1.05 ± 1.39	0.17 ± 0.10
Lactobacillaceae		0.30 ± 0.17 ^a	0.14 ± 0.06 ^{ab}	0.05 ± 0.05 ^b

[0069]

[0070]

Family level의 박테리아 구성은 Control 군에 비해 DSS 군에서 변화가 관찰되었으며, SQE 군은 상대적으로 Control 군과 유사한 구성을 보여주었다. 그 중 short chain fatty acid의 발효 및 대사와 탄수화물 대사에 관여하면서 acetyl-CoA의 pathway에 관여하는 박테리아인 Lachnospiraceae, Ruminococcaceae의 비율이 DSS 군에서 유의적으로 감소하고 SQE 군에서 유의적으로 증가하였다. 반면 염증 반응에 의해 발생하는 산물로 인해 호흡이 증가하는 Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae 등은 DSS 군에서 유의적으로 증가하여 장내 미생물 군집의 Dysbiosis를 유도하였다. 한편 DSS 군에서 유의적으로 증가한 Enterobacteriaceae는 Toll like receptor 4 (TLR4)와 연관되어 장염증과 밀접한 관련이 있는데, SQE 군에서는 상기 Enterobacteriaceae의 비율이 Control 군과 유사한 것으로 나타났다.

[0071]

Genus level의 분석결과는 하기 표 5에 나타난 바와 같다.

[0072]

[표 5]

Phylum	Genus	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
Firmicutes	Pseudoflavonifractor	4.83 ± 0.82	2.71 ± 1.32	6.19 ± 3.93
	Clostridium_g6	0.17 ± 0.13 ^a	9.49 ± 3.85 ^b	3.75 ± 4.23 ^a
	Acetatifactor	1.48 ± 1.42	1.31 ± 1.30	4.78 ± 3.55
	Oscillibacter	1.68 ± 0.75 ^a	1.12 ± 0.76 ^a	4.44 ± 2.68 ^b
	Hungatella	3.56 ± 1.07 ^a	0.82 ± 0.69 ^b	1.50 ± 1.28 ^b
	Turicibacter	1.72 ± 3.57	1.61 ± 1.73	1.73 ± 2.48
	Clostridium_g21	1.51 ± 0.59	0.75 ± 0.44	1.78 ± 1.44
	Romboutsia	0 ± 0	1.20 ± 2.93	2.09 ± 4.35
	Lachnospiraceae_uc	1.41 ± 0.47	0.25 ± 0.29	1.47 ± 1.75
	Roseburia	0.17 ± 0.08	0.11 ± 0.07	0.24 ± 0.17
	Bacteroides	20.23 ± 6.55 ^a	41.64 ± 8.25 ^b	20.10 ± 6.43 ^a
Bacteroidetes	Alloprevotella	4.07 ± 3.37	2.20 ± 2.76	3.19 ± 3.61
	Alistipes	3.11 ± 1.12 ^a	0.31 ± 0.23 ^b	0.30 ± 0.16 ^b
Proteobacteria	Enterobacter	0.02 ± 0.03 ^a	3.94 ± 7.40 ^b	0.04 ± 0.05 ^a
	Parasutterella	0.01 0.01	1.78 ± 3.55	0.04 ± 0.06
Deferribacteres	Mucispirillum	1.38 ± 1.66	1.64 ± 1.56	2.72 ± 3.00
Verrucomicrobia	Akkermansia	0 ± 0	1.25 ± 1.85	2.52 ± 4.25

[0073]

[0074]

Genus level에서는 박테리아 구성이 Control 군에 비해 DSS 군에서 변화가 관찰되었으며, SQE 군은 상대적으로 Control 군과 유사한 구성을 보여주었다. 특히 지질대사와 담즙산 recycling에 관여하고 염증에 의해 변화되는 박테리아인 Enterobacter, Bacteriodes, Clostridium의 비율이 DSS 군에서 유의적으로 증가하였고 SQE 군에서는 유의적으로 감소하였다. 이로써 염증성 장질환 발병 시 장내 미생물 군집의 대사가 변화하고, 대사 변화에 의해 장내 환경이 변화할 수 있음이 증명되었으며, 나아가 제주조릿대 잎 추출물의 처리로 장내 미생물 군집의 Dysbiosis가 억제됨을 알 수 있었다.

[0075]

Species level의 분석결과는 도 6 및 하기 표 6에 나타난 바와 같다.

[0076] [표 6]

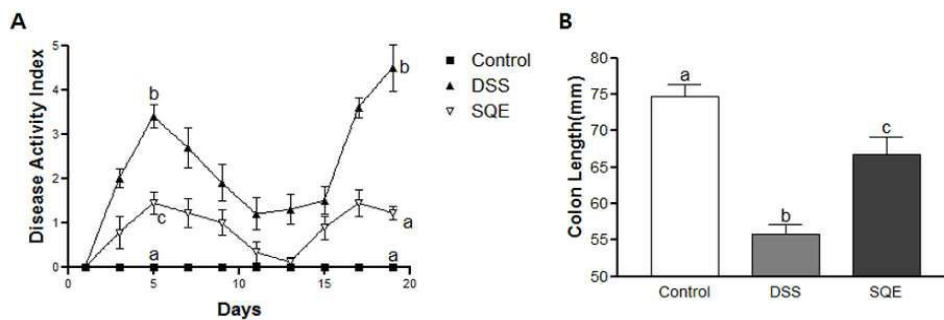
Species	Group	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
<i>Bacteroides acidifaciens</i>		0.48 ± 0.41 ^a	18.54 ± 9.75 ^b	9.53 ± 6.55 ^a
<i>Bacteroides sartorii</i>		7.03 ± 10.51	6.22 ± 8.79	0.19 ± 0.19
<i>Clostridium cocleatum</i>		0.17 ± 0.13	9.43 ± 3.84	3.73 ± 4.21
<i>Mucispirillum schaedleri</i>		1.38 ± 1.66	1.64 ± 1.56	2.72 ± 2.98
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>		0.01 ± 0.02	3.38 ± 6.37	0.04 ± 0.05
<i>Akkermansia muciniphila</i>		0 ± 0	1.24 ± 1.84	2.51 ± 4.24
<i>Romboutsia ilealis</i>		0 ± 0	1.17 ± 2.87	2.08 ± 4.32
<i>Lachnospiraceae_uc_s</i>		1.41 ± 0.47 ^{ab}	0.25 ± 0.29 ^b	1.47 ± 1.75 ^a
<i>Bacteroides_uc</i>		0.30 ± 0.09	1.85 ± 1.18	0.73 ± 0.38
<i>Butyricimonas virosa</i>		0.45 ± 0.17	0.47 ± 0.30	0.38 ± 0.19
<i>Ruminococcaceae_uc_s</i>		0.54 ± 0.49	0.07 ± 0.06	0.27 ± 0.23
<i>Lactococcus lactis</i> subsp		0.41 ± 0.32	0.23 ± 0.19	0.15 ± 0.11

[0077]

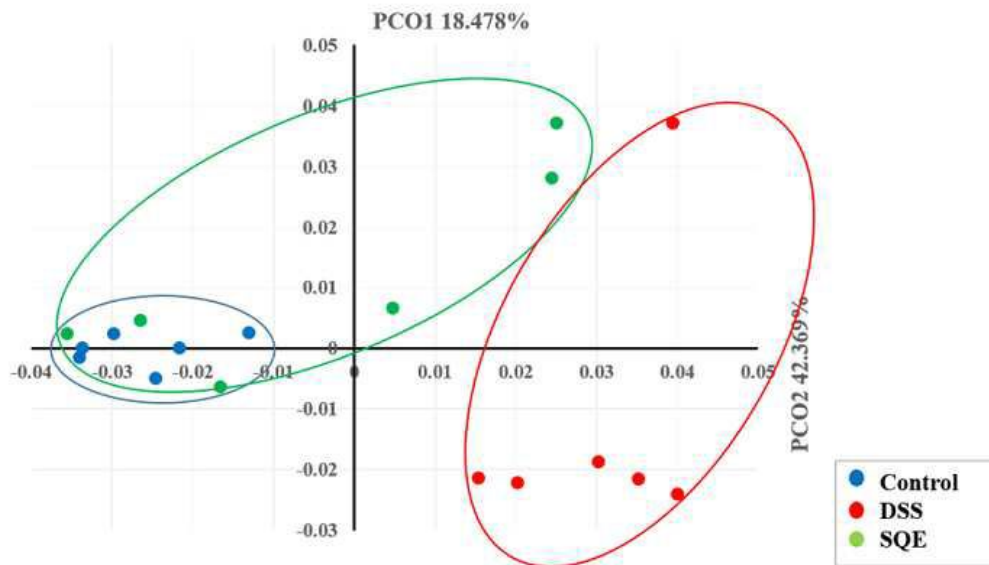
[0078] Species level에서는 박테리아 구성이 Control 군에 비해 DSS 군에서 변화가 관찰되었으며, SQE 군은 상대적으로 Control 군과 유사한 구성을 보여주었다. 특히 *Bacteroides acidifaciens*의 비율이 DSS 군에서 유의적으로 증가하고 SQE 군에서 유의적으로 감소됨을 확인하였다.

도면

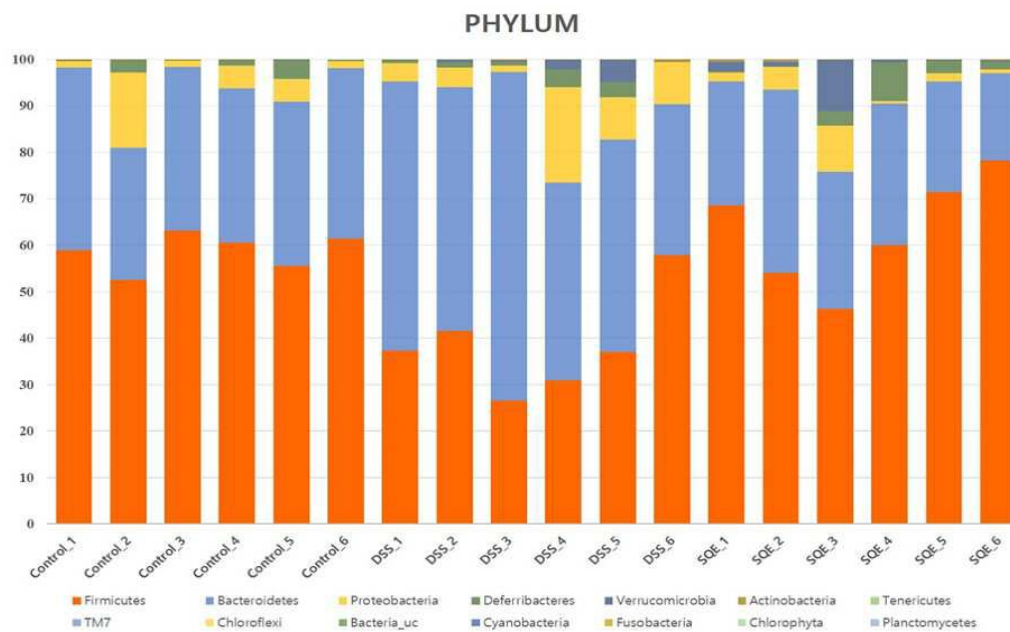
도면1



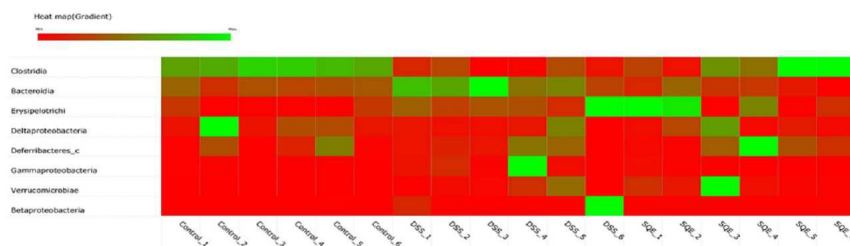
도면2



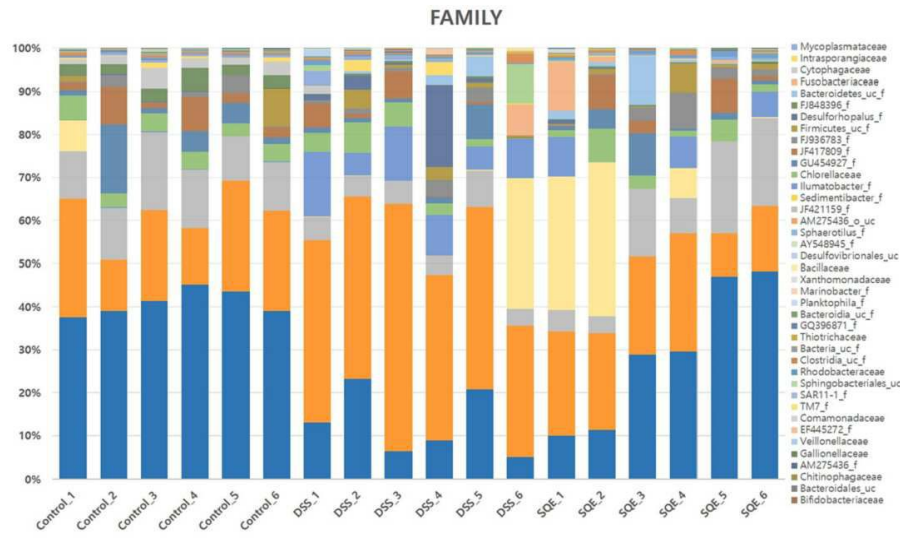
도면3



도면4



도면5



도면6

