



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0059513
(43) 공개일자 2011년06월02일

(51) Int. Cl.

A61K 36/28 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0033965

(22) 출원일자 2010년04월13일

심사청구일자 없음

(30) 우선권주장

1020090116247 2009년11월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인

웅진코웨이주식회사

충청남도 공주시 유구읍 유구리 658번지

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

한창수

서울시 서대문구 홍제1동 현대아파트 101동 1308호

김원태

경기 군포시 산본동 가야아파트 507동 1003호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

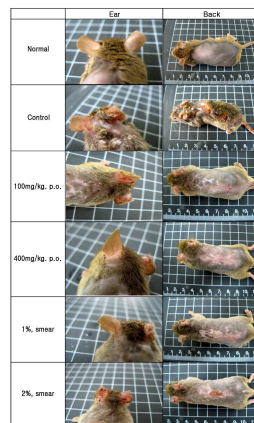
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 조성물

(57) 요약

야국(*Chrysanthemum boreale* Makino) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 염증 질환 특히, 아토피에 대한 예방 및 치료 효과를 가지며 약학 조성물로 이용될 수 있으며 이 외에 의약품, 화장품 조성물, 식품 및 연수기 등으로 다양한 용도로 이용될 수 있다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

최호영

서울시 성북구 석관동 레미안 석관아파트 109동
1301호

함인혜

서울시 서초구 서초2동 우성5차아파트 502동 1102
호

양갑식

서울시 양천구 목동

방찬성

경기도 화성시 능동 능동마을 705-2004

특허청구의 범위

청구항 1

야국(*Chrysanthemum boreale* Makino) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 야국 추출물은 야국의 메탄올 추출물인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 분획물은 클로로포름, 에탄올, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합 용매 중 어느 하나의 용매를 이용한 분획물인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 하기 특성 중 하나 이상을 가지는 조성물:

- 1) 홍반(erythema), 부종(Edema), 혈종(escoriation), 가려움(Pruritus), 피부건조증(Dry Skin), 깃무름(Erosion) 및 태선화(Lichenification)의 감소;
- 2) 귀 부종의 감소;
- 3) 긁는 행동(Scratching Behavior)의 감소;
- 4) 혈청 내 이뮤노글로불린 E(IgE; immunoglobulin E), 인터페론- γ (IFN- γ ; Interferon- γ) 또는 인터루킨-4(IL-4; Interleukin 4) 농도의 감소;
- 5) 세포 내 산화질소(NO) 발현양의 감소;
- 6) 세포 내 산화질소 합성제(iNOS; Nitric oxide synthases)의 발현양의 감소;
- 7) 세포 내 프로스타글란딘(PGE2; prostaglandin E2) 생성량의 감소;
- 8) 세포 내 COX-2 단백질 발현양의 감소;
- 9) I κ B의 인산화 억제 및 NF- κ B의 세포질로부터 핵으로의 이동 감소; 및
- 10) 조직 내 섬유아세포 증식의 억제, 콜라겐층 이상 증식의 억제, 궤양의 억제, 비만세포의 침윤의 감소 및 호중구와 림프구의 침윤에 의한 염증의 감소.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 염증 질환은 알러지성 염증 질환인 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 알러지성 염증 질환은 아토피 피부염인 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가지는 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 의약품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 증진제, 마스크, 연고제, 코팅제 및 필터 증진제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

청구항 14

제13항의 필터 증진제를 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 연수기.

명세서

기술분야

본 발명은 야국(*Chrysanthemum boreale* Makino) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 조성

[0001]

물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 사람의 피부는 노화가 진행됨에 따라 내적으로는 신진대사를 조절하는 각종 호르몬의 분비가 감소 되고 면역세포 및 피부 세포의 기능과 활성이 저하되어 생체에 필요한 면역 단백질 및 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되어 생기는 내인성 노화가 일어나고, 외적으로는 각종 오염물질과 자외선에 의한 주름이 증가하고, 탄력이 감소 되며 피부 건조증이 증가 될 뿐만 아니라 기미, 주근깨 및 검버섯 등이 증가하게 되어 피부 외관의 아름다움이 점차 상실된다. 그러나 현대인들은 젊고 아름다운 이른바 동안의 외모를 중시하기 때문에 내적 인자뿐만 아니라 자외선, 스트레스 등의 외적 인자에 의한 피부노화 현상을 예방 또는 해결하고자 하는 욕구가 크다.
- [0003] 피부 질환 중 하나인 아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)은 면역학적, 유전적, 약리 및 생리학적, 그리고 환경적 등 다인자적 요인에 의해 발병되는데 특히, 병인과 발병기전은 감염, 스트레스, 계절과 기후 변화, 자극 및 알러젠 등이 주요 원인이다. 아토피 피부염은 만성적인 염증성 피부질환으로 영유아부터 성인에까지 광범위하게 유발된다.
- [0004] 일반적으로 아토피 피부염 중 약 80% 정도가 IgE와 관련되어 있으며, IgE 매개 감작에 의한 외인성 형태와 비 IgE 매개 감작에 의한 내인성 형태 등 2가지 형태로 분류되는 것으로 알려졌다. 아토피 피부염에서는 IgE와 호산구가 증가하는데, 이는 IL-4, IL-5와 같은 Th2 사이토카인이 증가하고, Th1 사이토카인인 인터페론- γ (IFN- γ)의 분비가 감소하는 것과 관련이 있으며 이와 관련하여 피메크로리무스(pimecrolimus), 타크로리무스(tacrolimus) 등과 같은 여러 면역치료제들이 시도되고 있다. 특히, 최근 면역반응을 직접적으로 억제할 수 있는 CD4+ CD25+ 조절 T 림프구(regulatory T cells, Treg cells)의 존재가 알려졌는데, Treg 세포는 흉선에서 발생되고 다양한 T 림프구의 활동을 제어하는 능력을 갖고 있으며 대식세포나 B 세포와 같은 면역세포들에 대하여 Treg 세포가 세포 표면에 발현하는 CTLA4, GITR, CD25 그리고 LAG3 등을 통하여 면역 억제 신호를 전달하거나 면역 세포들 사이의 상호작용을 억제한다. 또한 기존에 잘 알려진 IL-10 외에 TGF- β , IL-35 등의 사이토카인을 통해서도 면역 억제 반응을 유도한다. 아토피 피부염은 Th2 세포의 편향된 발달에 의해 IL-4와 IL-5 등 Th2 사이토카인은 과량 생산하는 반면, IFN- γ 와 같은 Th1 사이토카인 생산은 억제 되는 것으로 알려졌다. 최근에 Th2 세포의 편향적 발달을 직접적으로 영향을 미치는 Th2 케모카인이 알려져 있는데, 그 대표적인 케모카인이 TARC/CCL17, MDC/CCL22, 그리고 CTACK/CCL2이다.
- [0005] 사이토카인은 다양한 세포에 의하여 만들어지며, 다양한 작용을 한다. 특히, 같은 사이토카인이라 하더라도 그 작용이 다양하게 나타나기 때문에 사이토카인을 특정한 부류로 분류하기는 매우 어렵다. T 세포가 대식세포가 제시한 항원을 인식하여 활성화되어 면역반응을 유도할 때에도 수많은 사이토카인들이 작용하는 것을 볼 수 있다. 자연면역과 획득면역의 각 단계 즉, 항원인식에서부터 작용단계에 이르기까지 다양한 사이토카인들이 관여하고 있으며, 일부의 사이토카인들은 림프구나 기타 혈구의 생성에도 관여하고 있다. 일부 중요한 사이토카인의 작용은 다음과 같다.
- [0006] IL-1 (interleukin 1)은 활성화된 단핵식균세포, 상피세포(epithelial cells), 혈관내피세포 (endothelial cell) 등에 의해 만들어져 염증반응을 매개하는 사이토카인이다. IL-1에는 IL-1 α 와 IL-1 β 의 두 가지 형이 있는데, 적은 양에서는 CD4-T 세포와 B 세포를 활성화하며, 염증세포를 자극할 수 있다. 그러나 IL-1이 과량 만들어지면 호르몬으로 작용하여 발열, 급성기반응(acute phases response) 등이 나타난다.
- [0007] IL-4 (interleukin 4)는 CD4 T 세포와 활성화된 비만세포에 의해 만들어지는 약 20kDa 크기의 단백질로서, B 세포 성장 인자의 작용을 한다. IL-4는 또한 B 세포의 면역글로불린의 클래스 스위치(class switch)에 관여하는 분화요소(differentiation factor)로 작용할 수 있으며, CD4 T 세포, 비만세포, 대식세포 등을 활성화하기도 한다.
- [0008] IL-12 (interleukin 10)는 활성화된 T cell에서 IL-2와 시너지 작용을 하며 CTLs로의 분화를 유도한다. 그리고 NK 세포와 LAK 세포, 활성화된 T 세포의 증식을 유도한다.
- [0009] IFN- γ (interferon- γ)는 II형 인터페론(type II interferon) 이라고도 부르며, CD4 T 세포나 CD8 T 세포에 의해 만들어져 면역 반응을 조절하기 때문에 면역 인터페론이라고도 부른다. IFN- γ 는 T 세포, B 세포, 호중성 NK 세포, 혈관 내피 세포에 작용하여 그들을 활성화시킬 수 있으며, 대식세포 활성화 인자(macrophage activating factor)로 작용하여 1종과 2종 MHC(Class I and II MHC)의 발현을 증가시키기도 한다. IFN- γ 도 다

른 인터페론처럼 바이러스의 증식을 억제할 수 있다.

- [0010] NO는 생리적 상태에서는 혈관확장 등의 역할을 하지만, 대식세포가 염증 사이토카인에 의해 자극이 된 상태에서 유도형 산화질소 합성제(iNOS)에 의해 생성된 NO는 병리적 상태에서 염증 반응을 일으켜, COX-2(cyclooxygenase-2)의 활성을 증강시켜 아라키돈산 캐스케이드(arachidonic acid cascade)를 통한 염증 반응을 증폭시킨다.
- [0011] COX-2는 아라키돈산 캐스케이드를 분해하여 프로스타글란딘(prostaglandins)을 생산하게 하는 중요 조절자(key modulator)이다. COX-2에 의해아라키돈산이 PGG2로 바뀌게 되고 이는 각각 작용하는 효소에 따라 PGE2, PGD2, PGF2, PGI2, TXA2 등으로 전환되고 이들은 체내에서 서로 다른 작용을 한다. 대표적인 COX-2 저해제로는 아스피린 등을 들 수 있다.
- [0012] 최근의 연구 경향을 살펴보면 면역조절을 통해 IgE 생산과 증가를 억제시키는 것과 관련한 연구들이 진행되고 있으며, 또한 임상에서 사용되는 한약이 아토피 피부염 환자의 면역 조절에 미치는 영향에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 그러나 야국의 아토피 피부염에 대한 효과에 대해서는 전혀 알려진 바 없었다.
- [0013] 이에, 본 발명자들은 야국(*Chrysanthemum boreale* Makino) 추출물 및 분획물에 혈청 중 IgE 농도 감소 효과를 비롯한 염증 질환에서 나타나는 염증관련 인자 억제 효과 등이 있으며, 이를 기초로 실험한 결과 상기 야국 추출물 및 분획물이 각종 염증 질환 특히, 아토피 피부염의 예방 및 치료에 탁월한 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 야국(*Chrysanthemum boreale* Makino) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 목적은 야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물과 염증 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물, 식품 조성물, 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 목적은 야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 필터 충전제를 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 연수기를 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 목적은 야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물을 처리하여 염증 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 목적을 달성하기 위한 일 양태로서, 본 발명은 야국(*Chrysanthemum boreale* Makino) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명자들은 야국, 포공영, 황백, 석창포, 호랑가시나무 및 왕벚나무의 추출물을 이용하여 염증 질환의 효과를 실험한 결과, 야국이 가장 우수한 효과를 보임을 확인하였다. 구체적인 실험예(실시예 1)에 따르면, 아토피 성 피부염 유발 모델에 야국, 포공영, 황백, 석창포, 호랑가시나무 및 왕벚나무의 추출물 처리한 결과, 관능 평가에서 통해 홍반(erythema), 부종(Edema), 혈종(escoriation), 가려움(Pruritus), 피부 건조증(Dry Skin), 깃 무름(Erosion) 및 태선화(Lichenification)에서 낮은 점수를 기록하였고(표 1 및 2 및 도 4 및 5) 혈중 이뮤노글로불린 E 농도가 다른 식물에 비하여 현저히 낮음을 확인할 수 있었다(표 3 및 도 6).
- [0020] 야국은 초롱꽃목에 속하는 국화과의 일종으로 속근성 다년초이며 한국, 일본, 중국 북부, 시베리아에 분포하고 주로 산골짜기나 들에서 볼 수 있다. 전체 높이는 1-1.5m이다. 잎은 호생하고 밑부분의 것은 꽃이 필 때 쓰러지

며 중앙부의 것은 긴 타원상 난형이고 길이 5-7mm, 폭 4-6cm로서 기부가 약간 심장저이거나 절저이며 우상으로 갈라지고 열편은 크기가 거의 비슷하며 긴 타원형이고 둔두이며 가장자리에 예리한 결각상의 톱니가 있고 엽병은 길이 1-2cm이다. 측열편은 2쌍으로서 열편 사이가 넓으며 표면에 털이 약간 있고, 뒷면에 중간에서 붙는 털이 있다. 꽃은 9-10월에 피며 지름 1.5cm로서 가지 끝과 원줄기 끝에 산형 비슷하게 달린다. 총포의 길이는 4mm, 직경이 8mm이며, 포편은 3-5줄로 배열되고, 외편은 선형 또는 긴 타원형으로서 겉에 털이 있으며, 내편은 긴 타원형이고 가장자리가 막질이다. 설상화관은 길이 5-7mm로서 황색이며 통상화관은 끝이 5개로 갈라진다. 수과는 도란형으로 길이 1mm 정도 되며, 5-6 줄이 있으며 관모가 없다. 10-11월에 결실한다. 줄기의 높이는 1-1.5m이고 가지가 많이 갈라지며 전체에 짧은 백색 털이 있다. 사방으로 많은 뿌리가 뻗어 있다. 토양은 가리지 않는 편이며 비옥한 곳에서 잘 자란다. 습한 곳보다는 건조한 곳을 좋아하는 식물이다.

[0021] 본 발명에서의 야국은 학명 *Chrysanthemum boreale* Makino을 말하며, 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 야국 추출물은 천연, 잡종, 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 뿌리, 줄기, 잎, 꽃, 열매의 몸통, 열매의 껍질뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터 추출 가능하나, 야국의 꽃에서 추출하는 것이 가장 바람직하다.

[0022] 본 발명에 따른 야국 추출물은 유기 용매 또는 이의 혼합용매를 이용하여 추출 함으로써 수득할 수 있고, 바람직하게는 일정 시간 건조시켜 분쇄한 야국을 냉침 추출, 가열 추출, 초음파 추출, 냉각 추출 등 다양한 추출법에 따라 당업계의 통상적인 추출방법으로 추출할 수 있다. 추출 방법은 특별히 제한되지 않고, 유효 성분이 파괴되지 않거나 최소화된 조건에서 실온 또는 가온하여 추출할 수 있다. 바람직하게는 세척 및 건조로 이물질이 제거된 야국을 분쇄하여 얻은 야국 건조물을 저급 C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 저급 C₁-C₄의 알코올로 추출한 추출물일 수 있고, 가장 바람직하게는 메탄올로 추출한 추출물일 수 있다.

[0023] 한편, 본 발명에서 야국 분획물은 상기 야국 추출물로부터 분획하여 얻을 수 있다. 분획물을 얻기 위하여, 당업계에 공지된 다양한 용매가 사용될 수 있으며 바람직하게는 유기용매가 사용될 수 있다. 예를 들어, 펜탄, 헥산, 2,2,4-트리메틸펜탄, 디케인, 사이클로헥산, 카본 디설파이드, 카본 테트라클로라이드, 클로로부탄, 디이소프로필에테르, 클로로포름, 아세톤, 니트로프로판, 부타논, 디클로로에탄, 피리딘, 프로판올, 메탄올, 에틸아세테이트 등이 포함된다. 상기 유기용매로는 비극성 유기 용매가 바람직하며, 특히 바람직한 것으로, 클로로포름, 에탄올, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합 용매 등이 있으나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 구체적인 실시예에서 클로로포름, 에탄올 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 각각의 분획물을 얻었으며, 모든 분획물이 활성을 나타냈으나 이 중 클로로포름 분획물이 가장 높은 항염증 활성을 나타내었다(표8, 9 및 10).

[0024] 본원에서의 용어, "항염증 활성"은 염증을 억제하는 것을 말하며, 상기 염증은 어떤 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 조직 변질, 순환장애와 삼출, 조직 증식의 세 가지를 병발하는 복잡한 병변을 말한다. 보다 구체적으로 염증은 선천성 면역의 일부이며 다른 동물에서처럼 인간의 선천성 면역은 병원체에 특이적으로 존재하는 세포 표면의 패턴을 인식한다. 식세포는 그런 표면을 가진 세포를 비자기로 인식하고 병원체를 공격한다. 만일 병원균이 신체의 물리적 장벽을 깨고 들어온다면 염증반응이 일어난다. 염증반응은 상처부위에 침입한 미생물들에 대한 적대 환경을 만드는 비특이적인 방어작용이다. 염증반응에서, 상처가 나거나 외부 감염체가 체내로 들어왔을 때, 초기단계 면역반응을 맡고 있는 백혈구들이 몰려들어 사이토카인을 발현한다. 따라서 세포 내 사이토카인의 발현양이 염증반응 활성화의 지표가 된다.

[0025] 본 발명자들은 야국을 대상으로 실험을 수행한 후 야국 추출물 및 이의 분획물에 항염증 활성이 있음을 발견하였다. 본 발명의 구체적인 실험예(실시예 3)에서, 본 발명자들은 야국 추출물 또는 이의 분획물을 처리한 후의 염증 질환 동물 모델에서 혈청 내 이뮤노글로불린 E(IgE; immunoglobulin E), 인터페론- γ (IFN- γ ; Interferon- γ), 인터루킨-4(IL-4; Interleukin 4)의 농도의 감소(각각 도 11, 12, 13); 세포 내 산화질소(NO)의 발현양의 감소(도 15); 유도형 산화질소 합성체(iNOS; induced Nitric oxide synthases) 발현의 감소(도 16); 세포 내 프로스타글란딘(PGE₂; prostaglandin E₂) 발현양 감소(도 17); 세포 내 COX-2 단백질 발현양의 감소(도 18); 및 I κ B의 인산화 억제, NF- κ B의 세포핵 내 이동의 감소(도 19, 도 20a, 도 20b)를 보임을 확인하였다. 이들 물질은 모두 염증 반응 또는 알러지 반응에서 특이적으로 발현양이 증가 되는 물질이므로 이들 물

질의 발현양 감소를 통해 야국 추출물이 항염증 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

- [0026] 특히, 국화과의 다년초로 높이 60~90cm이고 줄기는 보통 검붉은 빛을 띠며, 잎은 어긋맞게 나고 깃 모양으로 깊이 갈라져 있으며 10~11월에 가지 끝에 향기로운 노란 꽃이 피는 특성을 갖는 감국(학명: *Chrysanthemum indicum* L.)과 비교했을 때, 염증 질환 동물 모델의 세포 내 산화질소(NO)의 발현양을 조사한 결과 야국 추출물 5 μ g/ml의 농도에서 산화질소(NO) 생성이 대조군에 비해 메탄올(MeOH) 추출물, 클로로포름(CHCl_3) 분획물, 에틸 아세테이트(EtOAc) 분획물에서 각각 약 38%, 78%, 30% 감소하였다(실시예 3-2). 이에 반해, 감국 추출물의 경우 2.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도에서 메탄올 추출물에서는 각각 97.9%, 89.0%, 37.3%, 17.8%, 클로로포름 분획물에서는 각각 50.6%, 19.2%, 16.6%, 7.5%로 나타났다(표 14). 즉, 야국 추출물은 보다 소량으로 감국 추출물과 동등한 또는 상승된 효과를 보임을 알 수 있었다. 또한 유도형 산화질소 합성제(iNOS; induced Nitric oxide synthases) 발현의 감소(도 22); 세포 내 프로스타글란딘(PGE₂; prostaglandin E₂) 발현 양 감소(도 23); 세포 내 COX-2 단백질 발현양의 감소(도 24); 및 I κ B의 인산화 억제 및 NF- κ B의 세포질로부터 세포핵으로의 이동의 감소(도 25)를 비교하면, 야국 추출물 및 분획물이 감국 추출물 및 분획물에 비하여 적은 함량으로도 더 효과적임을 관찰하였다.
- [0027] 상기 산화질소(NO)는 생리적 상태에서는 혈관확장 등의 역할을 하지만, 매크로파지(macrophage)가 염증 사이토카인에 의해 자극이 된 상태에서 유도형 산화질소 합성제(induced NO synthase, iNOS)에 의해 생성된 산화질소는 병리적 상태에서 염증 반응을 일으켜, 싸이클로옥시게네이스-2(cyclooxygenase-2, COX-2)의 활성을 증강시켜 결과적으로 아라키돈산 캐스케이드(arachidonic acid cascade)를 통한 염증 반응을 증폭시킨다.
- [0028] 상기 IFN- γ 는 타입 II 인터페론(type II interferon)이라고도 부르며, CD4 T 세포이나 CD8 T 세포에 의해 만들어져 면역 반응을 조절하기 때문에 면역 인터페론(immune interferon)이라고도 부른다. IFN- γ 는 T 세포, B 세포, 호중성 NK 세포, 혈관 내피 세포에 작용하여 그들을 활성화 시킬 수 있으며, 매크로파지 활성화 인자(macrophage activating factor)로 작용하여 1종과 2종 MHC(Class I and II MHC) 발현을 증가시키기도 한다. IFN- γ 도 다른 인터페론처럼 바이러스의 증식을 억제할 수 있다.
- [0029] 상기 IL-4는 CD4 T 세포와 활성화된 비만세포(mast cell)에 의해 만들어지는 약 20kDa 크기의 단백질로서, B 세포 성장 인자의 작용을 한다. IL-4는 또한 B 세포의 이뮤노글로불린의 class switch에 관여하는 분화 인자로 작용할 수 있으며, CD4 T 세포, 비만 세포, 매크로파지 등을 활성화하기도 한다.
- [0030] 따라서, 본 발명에 따른 야국 추출물 또는 이의 분획물은 상기에서 살펴본 이유로 염증 질환, 특히 알러지성 염증 질환에 대한 우수한 예방 및 치료 활성을 갖는다.
- [0031] 상기 야국 추출물 및 이의 분획물은 인공적으로 합성된 화합물이 아니라 천연 추출물로부터 획득한 성분을 기초로 하므로 안전하고 독성, 부작용이 거의 없으므로 장기간의 복용이 가능하다는 장점이 있다. 또한, 상기 조성물은 인간뿐만 아니라, 염증 질환이 발생할 수 있는 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등의 동물에게 사용될 수도 있다.
- [0032] 따라서, 본 발명은 야국 추출물 또는 그의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 및 치료용 약학 조성물로 이용될 수 있으며, 이 조성물을 처리하여 염증 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물을 처리하여 염증 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0034] 상기 염증 질환은 알러지성 염증 질환일 수 있으며, 상기 알러지성 염증 질환에는 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD),

천식, 류마티스 관절염, 아토피 피부염 또는 염증성 장질환 같은 질병이 포함되나 염증 반응 및 알러지 반응에 의해 유도되는 질병이라면 제한 없이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 아토피 피부염이다.

[0035] 본원에서의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0036] 본원에서의 용어, "치료"는 본 발명에 따른 야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.

[0037] 본 발명의 구체적인 실험예(실시에 2)에 따르면, 본 발명자들은 야국 추출물을 처리한 후의 염증 질환 동물 모델에서 1) 홍반(erythema), 부종(Edema), 혈중(escoriation), 가려움(Pruritus), 건조 피부(Dry Skin), 깃무름(Erosion) 및 태선화(Lichenification)의 감소(도 7 및 도 8); 2) 귀 부종 감소(도 13); 3) 긁는 행동(Scratching Behavior) 감소(도 9) 및 4) 조직 내 섬유아세포 증식의 억제, 콜라겐층 이상 증식의 억제, 궤양의 억제, 비만세포의 침윤의 감소 및 호중구와 림프구의 침윤에 의한 염증 감소(도 14)가 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 염증 질환 특히, 아토피 피부염이 치료되고 있음을 보여주는 것이다.

[0038] 본 발명에 따른 야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 염증 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 쥐, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있고, 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의하여 투여될 수 있고, 피부 등에 도포할 수 있으며, 경구 투여가 가장 바람직하다.

[0039] 본 발명에서 사용되는 염증 질환 예방 및 치료용 약학 조성물의 처리량은 약학적으로 유효한 양이어야 한다. 본원에서의 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 증정도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 이때, 상기 유효한 양은 당업자에게 인식되어 있듯이 처리의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다.

[0040] 본 발명의 염증 질환 예방 및 치료용 조성물의 약학적 처리 형태는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 병용하여 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 염증 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 약학적 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 활성 성분을 담체와 함께 혼합 또는 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시키는 것이 바람직하다.

[0042] 따라서, 본 발명의 염증 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있고, 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0043] 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 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. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

- [0044] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들어, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0045] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되고, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들어 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0046] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0047] 또한, 다른 양태로서, 본 발명은 야국 추출물 또는 그의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0049] 본 발명의 식품 조성물에서 포함할 수 있는 필수 성분으로서 상기 야국 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 조성물 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0050] 상기 식품 조성물은 야국, 포공영, 황백, 석창포, 호랑가시나무, 왕벚나무 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 생약 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 또한, 식품보조첨가제를 추가로 포함할 수 있는데 식품보조첨가제는 당업계에 통상적으로 사용되는, 향미제, 풍미제, 착색제, 충진제, 안정화제 등을 포함한다.
- [0052] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0053] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제(치즈, 초콜릿 등), 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 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0055] 또 다른 양태로서, 본 발명은 야국 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 화장료 조성물에는 pH 조절제, 향료, 유화제, 방부제 등을 필요에 따라 부가하여 통상의 화장료 제조 방법으로 화장수, 젼, 수용성 파우더, 지용성 파우더, 수용성 리퀴드, 크림 또는 에센스 등으로 제형화될 수 있다.
- [0056] 또 다른 양태로서, 본 발명은 야국 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 의약

외품 조성물에 관한 것이다.

[0057] 즉, 본 발명의 조성물은 염증 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 의약품 조성물에 첨가될 수 있다. 본 발명의 야국 추출물, 분획물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물, 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 바람직하게는, 상기 의약품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제, 코팅제 또는 필터충진제의 제조에 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 코팅제가 코팅된 필터는 다양한 영역에 사용될 수 있다.

[0058] 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 필터 충전제를 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 연수기를 제공한다. 본원에서 용어 "연수기"는 경수에 들어 있는 칼슘과 마그네슘 같은 양이온을 제거하여 연수를 만드는 기구로, 경수 연화기라고도 말하는 것으로 연수제조기능 외에 공기청정기능, 정수기능 등을 포함할 수 있다. 본 연수기는 야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 필터 충전제를 포함하므로 염증질환, 특히 아토피 피부염 예방 및 개선에 효과적이다. 본 연수기는 그 목적에 따라 야국 추출물 또는 이의 분획물 외에 한약재를 포함한 다양한 성분을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0059] 본 발명에 따른 조성물은 항염증 활성을 가지므로 아토피 피부염과 같은 염증질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있으며, 이 외에도 의약품, 화장품 및 식품 등 다양한 용도로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 야국 추출물과 분획물 수득과정을 나타낸 것이다.

도 2는 DNCB 처리된 NC/Nga mice의 감각 스케줄 과정을 나타낸 것이다.

도 3은 NC/Nga 마우스 모델의 약물 처리 전 및 약물 처리 후의 스코어에 따른 마우스 모델의 변화 과정을 보여주는 사진이다.

도 4는 야국, 포공영, 황백, 석창포, 호랑가시나무, 왕벚나무 추출물 처리 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 긁는 행동 변동값을 나타내는 것이다.

도 5는 야국, 포공영, 황백, 석창포, 호랑가시나무, 왕벚나무 추출물 처리 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 관능 평가(Clinical scoring) 결과를 나타내는 것이다.

도 6은 야국, 포공영, 황백, 석창포, 호랑가시나무, 왕벚나무 추출물 처리 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 혈청 중 IgE 농도 변화를 나타낸 것이다.

도 7은 NC/Nga 마우스 모델의 약물 처리 전 및 야국 추출물 처리 후의 스코어에 따른 마우스 모델 아토피 증상의 변화 과정을 보여주는 사진이다.

도 8은 야국 추출물 처리 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 관능 평가(Clinical scoring) 결과를 나타내는 것이다.

도 9는 야국 추출물 처리 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 긁는 행동(Scratching behavior) 결과를 나타내는 것이다.

도 10a는 야국 추출물 처리 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 귀두께를 길이(mm)로 측정한 결과를 나타내는 것이다.

도 10b는 야국 추출물 처리 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 귀두께를 부피(%)로 측정한 결과를 나타내는 것이다.

도 11a는 야국 추출물의 경구 투여 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 혈청 중 IgE 농도를 측정

한 것이다.

도 11b는 야국 추출물의 피부 도포 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 혈청 중 IgE 농도를 측정
한 것이다.

도 12는 야국 추출물 처리 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 혈청 중 IFN- γ 농도를 측정
한 것이다.

도 13은 야국 추출물 처리 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 혈청 중 IL-4 농도를 측정
한 것이다.

도 14는 야국 추출물 처리 후 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 귀 조직 단면을 촬영한
것이다.

도 15는 야국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 산화질소 발생량을 측정
한 것이다.

도 16은 야국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 유도형 산화질소 합성제(iNOS) 발생
량을 측정한 것이다.

도 17은 야국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 PGE2 발생량을 측정
한 것이다.

도 18은 야국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 COX-2 발생량을 측정
한 것이다.

도 19는 야국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 I κ B 발생량을 측정
한 것이다.

도 20a는 야국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 P50 발생량을 측정
한 것이다.

도 20b는 야국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 P65 발생량을 측정
한 것이다.

도 21은 감국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 산화질소 발생량을 측정
한 것이다.

도 22는 감국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 유도형 산화질소 합성제(iNOS) 발생
량을 측정한 것이다.

도 23는 감국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 PGE2 발생량을 측정
한 것이다.

도 24는 감국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 COX-2 발생량을 측정
한 것이다.

도 25는 감국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 I κ B 발생량을 측정
한 것이다.

도 26는 감국 추출물의 분획물 처리 후 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 P65 발생량을 측정
한 것이다.

도 27은 MTS 분석 방법에 의한 야국 추출물 및 분획물의 세포 독성을 측정
한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0062] 실시예 1. 시료 추출 및 스크리닝

[0063] (1) 후보약제 시료 추출

[0064] 야국, 포공영, 황백, 석창포, 호랑가시나무, 왕벚나무를 각각 100g을 100% 메탄올(MeOH)을 용매로 하여 110℃ 추출기에서 3회 반복 추출하고 회전감압농축증발기(rotary evaporator)를 이용하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 각각의 100% 메탄올 추출물을 얻었다.

[0065] (2) NC/Nga 마우스 모델 도입

[0066] NC/Nga 마우스는 자발적 아토피성 피부염 유발 모델로 잘 알려져 있다. 그 분자적 원인은 JAK3 키나제(kinase)의 과인산화로 인한 IgE의 생성의 향진으로 보고된 바 있다. 최근엔 IgE와 Th2 사이토카인 생성에 필수적인

STAT6 녹아웃 NC/Nga 마우스를 만들어 시험한 결과 피부염이 여전히 자발적으로 유도되었는데, 이는 흔히 예상한 기전 이외에 다른 기전으로 피부염이 유도되는 것으로 예상하고 있다(J.I. 1999, 162: 1056-63). 이러한 장점에도 불구하고 자발적인 피부염 유도비율이 낮고, 유도된 피부염의 심각성에도 차이가 심해 평가를 위해 신뢰할만한 모델 수준은 되지 못하고 있는 것이 사실이다. 이에, 일본에서는 햅텐(hapten) 형성 물질인 피크릴 클로라이드(picryl chloride)를 이용하여 피부염을 인위적으로 유도하여 이러한 문제를 해결하고 있다. 그러나 피크릴 클로라이드의 경우 국내 반입이 금지되어 이용할 수 없음에 여기에선 구조적으로 피크릴 클로라이드와 유사하여 같은 기전으로 작용하는 DNCB(1-chloro 2,4-dinitrobenzene, Sigma 23732-9)을 이용하여 시험을 진행하여 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

[0067] 이 모델에 의하면 아토피성 피부염의 주된 증상들(가려움, IgE 증가, 피부 염증)을 모두 관찰할 수 있고, 더 나아가 아토피성 피부염의 치료제로 잘 알려진 국소 스테로이드나 경구용 사이클로스포린에 의해 증상이 완전히 치유되는 현상을 관찰할 수 있었다. 이에 아토피성 피부염 치료제의 효능을 평가하기 위한 인 비보 모델(in vivo model)로 NC/nga 마우스 모델을 도입하였다.

[0068] (3) NC/Nga 마우스를 이용한 스크리닝 방법

[0069] 자발적 아토피성 피부염 유발 모델로 알려진 NC/Nga 마우스를 이용하여 아토피를 유발하고 다음과 같은 방법으로 평가하여 가장 유용한 약제를 선정하였다. 약제 선정을 위한 실험은 DNCB 용액을 도포하지 않은 아토피성 피부염이 유발되지 않은 정상군, DNCB 용액을 도포하여 아토피성 피부염을 유발시킨 대조군, 약국 추출물 경구투여군(100mg/kg, 400mg/kg)과 약국 추출물 200 μ l 피부도포군(1% 희석, 2% 희석)을 실험군으로 하여 수행하였다.

[0070] 가. 관능 평가

[0071] 관능평가는 DNCB(Sigma 23732-9) 처리가 끝날 때, 그리고 치료 약물(약국, 호랑가시, 황백, 포공영, 석창포, 왕벚나무 각 100mg/kg, 400mg/kg)의 처리가 끝날 때, 각각 2번 실시하였다. 관능 평가에 의한 피부염의 스코어 측정은 실험 유경험자 2인 이상이 각각 실시하고 협의하여 결정하였다. 특히, 약물 처치가 종료된 다음에는 사진을 찍어 보관하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다. 평가항목은 홍반(erythema), 가려움과 피부 건조증(Pruritus & Dry Skin), 부종과 혈종(Edema & escoriation), 짓무름(Erosion), 그리고 태선화(Lichenification)로 나누고 이 각각의 항목을 없음(0), 약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 채점하였다. 따라서, 최소 0점에서, 최고 15점 사이의 점수를 얻을 수 있다. 약물 처리 전의 스코어와 처리 후의 스코어를 비교하여 감소한 비율을 구한 다음, 용매(Vehicle)를 처리한 군의 감소비율과 비교하여 유의성을 검증하였다.

[0072] 나. 긁는 행동 평가(Scratching Behavior)

[0073] 소양증을 의미하는 긁는 행동(scratching behavior)을 약물 투여 후 즉시 30분 동안 관찰하였다. 뒷다리로 긁는 행동은 scratching behavior 1회로 기록하였고 1초안에 빠르게 여러 번 긁는 행동은 1회로 기록하였다.

[0074] 다. 혈중 IgE 농도

[0075] 혈중 IgE 농도는 ELISA 방법을 이용하여 DNCB(Sigma 23732-9) 처리하여 피부염증을 유발한 후 치료 약물(약국, 호랑가시, 황백, 포공영, 석창포, 왕벚나무 각 100mg/kg, 400mg/kg)의 처리가 끝날 때에 실시하였다. 결과 처리는 약물 처리 전의 혈중 IgE 농도와 처리 후의 혈중 IgE 농도를 비교하여 감소한 비율을 구한 다음, 과립(Vehicle)를 처리한 군의 감소비율과 비교하여 유의성을 검증하였다.

[0076] A. 약물처리군: [처리 전 IgE(drug)-처리 후 IgE(drug)] / 처리 전 IgE(drug)

[0077] B. Vehicle 처리군: [처리 전 IgE(Vehicle)-처리 후 IgE(Vehicle)] / 처리 전 IgE(vehicle)

(3) 결과

가. 관능 평가 결과

관능 평가(Clinical scoring) 결과, 야국은 다른 약제에 비하여 낮은 스코어를 기록하였으며, 정상군에 근접하였다. 또한, 표 1은 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 관능 평가(Clinical scoring)를 나타낸 것이다.

표 1

(mg/kg)	1일	5일	8일	15일	22일	25일	27일
정상군	0 ± 0	0 ± 0	0.3 ± 0.5	0.8 ± 1.3	1.0 ± 1.5	1.0 ± 1.5	1.0 ± 1.5
대조군	0 ± 0	6.2 ± 0.8	11.3 ± 1.5	11.3 ± 0.8	8.3 ± 0.8	7.3 ± 0.8	7.3 ± 0.8
야국 100 처리군	0 ± 0	5.5 ± 2.1	10.0 ± 3.3	9.8 ± 2.4	6.8 ± 1.2	5.5 ± 2.3	4.2 ± 1.8
야국 400 처리군	0 ± 0	5.5 ± 1.1	10.7 ± 2.1	10.2 ± 1.7	7.8 ± 1.5	4.7 ± 1.0	3.4 ± 2.1
호랑가시 100 처리군	0 ± 0	5.1 ± 1.5	9.6 ± 2.7	9.1 ± 2.2	7.5 ± 1.6	6.3 ± 0.5	3.8 ± 1.5
호랑가시 400 처리군	0 ± 0	5.1 ± 1.2	10.0 ± 2.5	9.6 ± 1.8	7.1 ± 1.7	5.0 ± 2.1	4.0 ± 1.6
황백 100 처리군	0 ± 0	5.5 ± 1.6	10.5 ± 3.1	10.6 ± 2.9	6.8 ± 1.8	5.5 ± 2.2	4.1 ± 1.8
황백 400 처리군	0 ± 0	6.0 ± 1.6	11.3 ± 3.1	11.6 ± 2.9	8.5 ± 1.8	7.0 ± 2.2	3.3 ± 1.8
포공영 100 처리군	0 ± 0	5.6 ± 1.0	10.6 ± 2.6	10.6 ± 1.9	8.3 ± 0.8	6.5 ± 0.8	4.3 ± 1.2
포공영 400 처리군	0 ± 0	6.5 ± 0.5	12.3 ± 0.8	12.3 ± 0.8	9.5 ± 0.5	6.5 ± 0.5	5.0 ± 0.6
석창포 100 처리군	0 ± 0	5.1 ± 0.9	10.3 ± 1.9	10.3 ± 1.2	7.5 ± 1.5	4.5 ± 2.0	3.6 ± 1.6
석창포 400 처리군	0 ± 0	5.5 ± 1.3	10.3 ± 2.8	10.1 ± 2.4	8.3 ± 1.8	6.3 ± 1.0	5.1 ± 1.6
왕벚나무 100 처리군	0 ± 0	4.7 ± 0.5	9.2 ± 0.9	8.7 ± 1.2	6.7 ± 1.2	5.0 ± 1.6	3.7 ± 1.2

나. 긁는 행동 평가(Scratching Behavior) 결과

표 2는 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 긁는 행동(Scratching behavior)변동값을 나타낸 것이다. 소양증을 의미하는 긁는 행동을 보이는지 조사한 결과, 각각 야국 100(mg/kg) 및 야국 400(mg/kg)을 처리하였을 때, 30.4±1.1(점), 21.8±2.8(점)을 보였는바 다른 약제와 비교하여 현저히 낮은 스코어를 기록하였다.

표 2

(mg/kg)	긁는행동(회)
정상군	32.2 ± 1.4
대조군	63.0 ± 2.9
야국 100 처리군	30.4 ± 1.1
야국 400 처리군	21.8 ± 2.8
호랑가시 100 처리군	48.4 ± 2.1
호랑가시 400 처리군	38.0 ± 3.4
황백 100 처리군	60.4 ± 2.7
황백 400 처리군	61.8 ± 1.5
포공영 100 처리군	59.6 ± 3.1
포공영 400 처리군	54.8 ± 3.1
석창포 100 처리군	52.6 ± 2.4
석창포 400 처리군	68.2 ± 2.4
왕벚나무 100 처리군	29.0 ± 1.9

다. 혈중 IgE 농도 측정 결과

야국을 처리한 경우의 혈중 IgE 농도는 다른 약제에 비하여 적은 스코어를 나타냈으며, 각각 야국 100(mg/kg) 및 야국 400(mg/kg)을 처리하였을 때 63.46 ± 16.92 (ng/ml), 46.99 ± 8.88 (ng/ml)을 나타냈다. 표 3은 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 혈청 중 IgE 농도 변화를 나타낸 것이다.

표 3

(mg/kg)	IgE(ng/ml)
정상군	77.35 ± 6.62
대조군	106.82 ± 13.36
야국 100 처리군	63.46 ± 16.92
야국 400 처리군	46.99 ± 8.88
호랑가시 100 처리군	87.91 ± 10.97
호랑가시 400 처리군	71.42 ± 12.83
황백 100 처리군	98.08 ± 11.42
황백 400 처리군	101.13 ± 23.74
포공영 100 처리군	97.73 ± 18.07
포공영 400 처리군	91.75 ± 6.65
석창포 100 처리군	92.88 ± 7.79
석창포 400 처리군	113.83 ± 12.91
왕벚나무 100 처리군	60.68 ± 9.44

결과적으로 대상 약제 중 NC/Nga 마우스를 이용한 아토피 피부염 실험에서 관능 평가, 긁는 행동 평가와 혈중 IgE 농도 결과에 따르면, 야국이 가장 유의미한 효과를 보였다. 따라서, 상기 결과를 토대로 하여 야국을 대상으로 추가 실험을 수행하였는바 자세한 실험 방법 및 실험 결과는 하기와 같다.

실시예 2. 아토피 피부염증 실험: NC/Nga 마우스 실험

2-1. 실험 방법

(1) NC/Nga 마우스 모델 도입

NC/Nga 마우스를 이용하여 아토피성 피부염의 주된 증상들(가려움, IgE 증가 등)에 대한 야국 추출물 및 분획물의 효과를 시험하였다.

(2) 야국의 추출 및 분획

야국 100g을 100% 메탄올(MeOH)을 용매로 하여 110℃ 추출기에서 3회 반복 추출하고 회전감압농축증발기(rotary evaporator)를 이용하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 각각의 100% 메탄올 추출물을 얻었다. 위에서 얻은 야국의 100% 메탄올 추출물 중 32.3g을 열수에 녹인 후 클로로포름과 에틸아세테이트를 이용하여 분획한 후 각 층을 농축하여 물 분획물 4.3g, 클로로포름 분획물 2.7g, 에틸아세테이트 분획물 0.56g을 각각 얻었다(도 1).

(3) 시약 및 기기

1) 시약

- DNCB (Sigma 23732-9)

- 올리브 오일(Shinyo Chemical 912193)

- [0099] - NC/Nga 마우스 (Central Lab. animal Inc., Korea)
- [0100] - 마우스 IgE 마우스용 ELISA 키트 (SHIBAYAGI Co., Ltd, Japan)
- [0101] - IL-4 (R&D systems, Quantikine Immunoassay Kit, MN. USA)
- [0102] - IFN- γ (R&D systems, Quantikine Immunoassay Kit, MN. USA)
- [0103] - 퇴행성 염색(Harris' hematoxylin, MUTO, Japan)
- [0104] - 에오신(MUTO, Japan)
- [0105] - 캐나다 발삼(JUNSEI, Japan)

[0106] 2) 기기

- [0107] - ELISA 플레이트 리더(ELISA Plate Reader) : Versamax (Molecular Devices Co., U.S.A.)
- [0108] - 플레이트 셰이커(Plate shaker) : REO ROTOR (Hoefer Pharmacia Biotech Inc.)
- [0109] - 마이크로미터(IP65 coolant proof, #293-240, mitutoyo, Japan)
- [0110] - 마이크로톱(Microm-HM325)
- [0111] - 클리퍼(Clipper, JC-4005, JOAS Elec. CO., Korea)

[0112] (4) 피부염 유도 및 치료처리

[0113] 1) 실험동물

[0114] 이 실험에 사용한 실험동물은 5주령 된 NC/Nga mice로 중앙실험동물(주)에서 공급받아 실험동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 무게를 측정 ($22 \pm 3g$)한 후 1군당 6~8 마리를 실험에 사용하였다. 실험기간 중 고형사료와 물은 자유로이 섭취시켰으며, 사육실의 온도 ($21 \pm 1^{\circ}C$), 습도 ($50 \pm 5\%$) 는 일정하게 유지하였다. 실험 시작 일 하루 전 실험동물의 귀 하단부분부터 꼬리 상단 부분까지 등부위 전체를 마우스 제모용 클리퍼 (JC-4005, JOAS Elec. CO., Korea)로 깨끗하게 털을 제거하였다. 이 동물실험은 경희대학교 실험동물 윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 수행되었다.

[0115] 2) 아토피 피부염의 유발 및 치료처리

[0116] Nc/Nga 마우스의 아토피 유발을 위해 마우스의 등 부위를 제모한 후, 24시간 뒤에 면역화를 위해 0.5% DNCB(Sigma 23732-9) 용액(아세톤:올리브오일=3:1) 200 μ l를 2주간 매일 등 부위에 도포하였으며, 시료투여 개시 후 3주째부터는 1주일에 3회씩 0.5% DNCB용액 200 μ l를 등 부위에 도포하여 아토피 피부염을 유발하였다. 마우스의 등 부위를 제모하고 2주 동안 DNCB 처리하여 아토피를 유발시킨 후, 시료 투여(경구와 피부 도포)를 시작하여 4주 동안 매일 처리하였다. 경구로는 100mg/kg과 400mg/kg을 각각 투여하였고, 외용으로는 1%와 2%로 희석하여 200 μ l씩을 각각 도포하였다. DNCB 처리된 NC/Nga mice를 이용한 아토피 피부염의 유발 및 치료처리 실험의 과정은 도 2에 도시하였다.

[0117] (5) 평가 방법

[0118] 가. 관능 평가

[0119] NC/Nga 마우스의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 관능평가는 DNBC 처리 직전, 처리 중간, 약물투여 직전, 약물투여 중간과 약물투여가 끝날 때 각각 실시하였다. 관능평가에 의한 피부염의 점수는 실험 유경험자 2인 이상이 각각 실시하여 협의하여 결정하였다. 특히 약물처치가 종료된 다음에는 사진을 찍어 보관하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다. 평가항목은 홍반(erythema), 가려움과 피부 건조증(Pruritus & Dry Skin), 부종과 혈종(Edema & escoriation), 깃무름(Erosion), 그리고 태선화(Lichenification)로 나누어진다. 이 각각의 항목은 없음(0),

약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 채점된다. 따라서 최소 0점에서, 최고 15점 사이의 점수를 얻을 수 있다. 피부염의 스코어링은 실험 유경험자 2인 이상이 각각 실시하여 협의하여 결정하였다. 특히 약물 처치가 종료된 후에는 사진을 찍어 보관하였다.

[0120] 나. 긁는 행동(Scratching Behavior) 평가

[0121] 소양증을 의미하는 긁는 행동 평가를 약물 투여 후 즉시 30분 동안 관찰하였다. 뒷다리로 긁는 행동은 긁는 행동 1회로 기록하였고 1초 안에 빠르게 여러 번 긁는 행동도 1회로 기록하였다.

[0122] 다. 귀두께 측정

[0123] 마이크로미터(IP65 coolant proof, #293-240, mitutoyo, Japan)를 이용하여 우측 귀 중앙의 두께를 측정하였다.

[0124] 라. 혈청 중 IgE, IFN- γ , IL-4의 정량

[0125] 실험 종료일에 마우스의 심장에서 채혈한 후 5,000 rpm, 4°C에서 3분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 실험에 사용하기 전까지 -70°C 냉동고에서 보관하였다가 녹여서 실험에 사용하였다. Nc/Nga mice의 혈청 IgE, IL-4, IFN- γ 의 농도는 각각 마우스용 ELISA 키트 (SHIBAYAGI Co., Ltd, Japan), IL-4 (R&D systems, Quantikine Immunoassay Kit, MN. USA), IFN- γ (R&D systems, Quantikine Immunoassay Kit, MN. USA)을 사용하여 측정하였다.

[0126] IgE 는 IgE 마우스용 ELISA 키트 (SHIBAYAGI Co., Ltd, Japan)의 방법에 따라 정량하였다. 모든 시약은 상온으로 맞추어 준비 후 즉시 사용하였다.

[0127] 세척 버퍼로 3회 플레이트를 씻어낸 후 IgE 표준 용액이나 샘플 용액(sample 5 μ l + buffer 45 μ l)을 50 μ l씩 각 웰에 분주하고 마이크로플레이트 셰이커(microplate shaker)로 가볍게 섞은 후, 두 시간 동안 실온(20-25°C)에서 배양시켜 반응시킨 후 완충용액으로 플레이트를 3회 세척하였다. 비오틴-컨쥬게이트된 항-IgE 항체 50 μ l를 각 웰에 분주하고 마이크로플레이트 셰이커(microplate shaker)로 가볍게 섞은 후, 두 시간 동안 실온에서 배양시켜 반응시킨 후 세척버퍼(washing buffer)로 플레이트를 3회 세척하고, 각 웰에 HRP-아비딘 용액 50 μ l를 넣고 마이크로플레이트 셰이커(microplate shaker)로 가볍게 섞은 후 한 시간동안 실온에서 배양시켜 반응시키고, 크로마제닉 기질 용액(chromagenic substrate solution) 50 μ l를 넣고 마이크로플레이트 셰이커(microplate shaker)로 가볍게 섞은 후 20분 동안 실온에서 배양시켜 반응시킨 후, 각 웰에 반응 중단제(reaction stopper) 50 μ l를 넣어 변색이 멈추게 잘 섞어 준 후 30분 안에 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0128] IL-4와 IFN- γ 의 측정은 IL-4 (R&D systems, Quantikine Immunoassay Kit, MN. USA)와 IFN- γ (R&D systems, Quantikine Immunoassay Kit, MN. USA)의 방법에 따라 정량하였다.

[0129] 지시대로 시약과 샘플을 준비한 후 모든 시약 용액(reagent solutions)은 상온으로 맞추어 사용하였으며 두 번 반복 실험하였다. 각 웰에 Assay Diluent RD1-18 (IL-4) 또는 RD1-21 (IFN- γ) 50 μ l를 넣었다. 정상군, 대조군 및 샘플을 각 웰 당 50 μ l씩 넣고, 1분 동안 음역을 천천히 가볍게 두드려서 섞은 후 플레이트를 덮고 두시간 동안 실온에서 배양하고 각 웰의 용액을 아스피레이터(aspirator)로 완벽히 제거하고 세척하기를 5회 반복하였다. IL-4(마우스 IL-4 컨쥬게이트) 또는 IFN- γ (IFN- γ Conjugate) 100 μ l를 각 웰에 넣고 새로운 접착 커버로 덮어 2시간 동안 상온에서 배양한 후 다시 5회 반복하여 세척하고 각 웰에 기질 용액(Substrate Solution) 100 μ l를 넣고 차광상태로 30분 동안 상온에서 배양한 후 종결용액(Stop Solution) 100 μ l를 각 웰에 넣고 플레이트를 가볍게 두드려 완전하게 섞어준 후 30분 안에 각 웰을 450nm에서 측정한 값을 540nm (또는 570nm)으로 측정한 값으로 빼서 보정해 주었다.

[0130] 마. 조직 염색 및 평가

[0131] 실험 종료 후 마우스를 희생시킨 다음 등과 귀 조직을 떼어내어 10% 중성 포르말린으로 고정시켰다. 그 조직을 파라핀으로 포매하여 파라핀 블록을 제작하였다. 조직의 박절은 마이크로톰(Microm-HM325)을 이용하여 Trimming

의 박절 두께를 10 μ m정도로 파라핀 블록을 다듬어 준 후, 절단시 3~4 μ m 두께로 조직 절편을 얻어낸다. 얻어진 조직절편은 크실렌(Xylene)으로 탈 파라핀화(deparaffin)시키고 함수단계[100% 알코올(3분)→ 90% 알코올(3분)→ 80% 알코올(3분)→ 70% 알코올(3분)→D.W (3분)]를 거쳐 염색[Harris' hematoxylin (4분)→세척→1% HCl 알코올(1회)→ 세척(10분)→에오신(10-20초)]을 시킨 후 탈수단계[70% 알코올 (dipping) → 80% 알코올 (dipping)→ 95% 알코올(dipping)→ 100% 알코올 (dipping)→ 100% 알코올 (dipping)]와 투명단계[크실렌(3분)→크실렌(3분)]를 거쳐 캐나다 발삼(Canada balsam)을 사용하여 봉입하여 관찰하였다.

[0132] 또한 유발조직 표피의 두께, 비만세포 침윤(infiltration), 호산구(eosinophil) 침윤, 호중구와(neutrophils)와 림프구(lymphocyte) 침윤, 그리고, 섬유아세포 증식(fibroblast proliferation)과 콜라겐층 이상 증식(collagen layer hyperplasia)으로 염증정도를 평가하는 조직학 실험을 수행하였다. 조직 중의 비만세포(mast cell)는 알시안 블루(alcian blue)로 염색하여 관찰하였다.

[0133] 바. 통계 분석

[0134] 측정 결과는 실험 전후의 평균을 비교할 때 paired t-test 로 검정하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 즉, 5% 미만으로 하였다.

[0135] 2-2. 실험 결과

[0136] 가. 관능 평가(Clinical scoring) 결과

[0137] 정상군, DNCB 용액을 도포하여 아토피를 유발시킨 대조군, 야국 추출물 경구투여군 (100 mg/mL, 400 mg/mL), 야국 추출물 200 μ l 피부도포군 (1%, 2%)의 총 6군에서 마우스 등피부와 귀에서 나타난 아토피 증상을 일주일 간격으로 총 5회 반복 관찰하였다. 관능 평가에서는 도 3를 참고 인덱스(Reference index)로 하였다.

[0138] 정상군의 피부는 깨끗하였고, 대조군에서는 홍반, 부종, 이설, 가피, 태선화등 다양한 아토피 증상이 뚜렷하게 나타났으며, 시료 경구투여군과 피부도포군에서 모두 대조군에 비해 아토피 증상이 현저히 억제됨을 확인할 수 있었으나, 경구투여군이 피부도포군보다 육안적 관찰시 빠르게 피부염 개선증세를 나타냄을 관찰할 수 있었다 (도 7).

[0139] 아토피 유발 1주일 후의 관능평가 스코어는 대조군에서 6.2 ± 0.8 , 야국 경구투여 100 mg/kg 과 400 mg/kg에서 각각 5.5 ± 2.1 , 5.5 ± 1.1 였으며, 야국 피부도포군 1%와 2%에서 각각 5.2 ± 1.0 , 5.5 ± 1.4 로 나타나 모두 아토피 피부염이 유발되고 있음을 확인할 수 있었다.

[0140] 아토피 유발 후 2주째에서는 대조군에서 11.3 ± 1.5 , 야국 경구투여 100 mg/kg 과 400 mg/kg에서 각각 10.0 ± 3.3 , 10.7 ± 2.1 로 나타났으며, 야국 피부도포 1%와 2%에서 각각 10.3 ± 2.0 , 10.3 ± 2.8 로 나타나 아직 야국 추출물의 효과가 발휘되지 않음을 확인할 수 있었다.

[0141] 아토피 유발 후 4주째 즉 약물을 2주간 투여한 후에 대조군은 7.3 ± 0.8 이었으며, 야국 경구투여 100 mg/kg 과 400 mg/kg에서 각각 4.7 ± 1.3 , 5.2 ± 1.3 으로 나타나 야국 추출물의 효과가 발휘되기 시작하여 아토피 피부염이 개선되고 있음이 유의하게 인정되었으나, 야국 피부도포군 1%와 2%에서는 각각 7.5 ± 0.8 , 8.3 ± 1.9 로 아토피 피부염이 개선이 인정되지 않았다.

[0142] 아토피 유발 후 6주째 즉 약물을 4주간 투여한 후 대조군은 7.3 ± 0.8 이었으며, 야국 경구투여 100 mg/kg 과 400 mg/kg는 각각 3.4 ± 2.1 , 3.3 ± 0.5 , 피부도포군 1%와 2%은 각각 4.5 ± 2.1 , 6.3 ± 1.0 으로 나타나 야국 추출물의 피부염 개선 효과가 나타났다.

[0143] 본 실험 결과를 통해, 정상군의 피부는 깨끗하였고, 아토피 유발 대조군에서는 홍반, 부종, 이설, 가피, 태선화 등 다양한 아토피 증상이 뚜렷하게 나타났으며 시료 경구 투여군과 시료 피부 도포군에서 모두 아토피 유발 대조군에 비해 아토피 증상이 현저히 억제됨을 확인할 수 있었으나, 경구투여군의 아토피 피부염 개선효과는 4주째 부터 발휘되고 피부도포군은 6주째 부터 효과가 발휘되어 경구투여군의 아토피 피부염 개선효과가 피부도포군보다 빠르게 나타남을 알 수 있었다(도 8). 시료 경구 투여군이 시료 피부 도포군보다 피부염 개선증세를 나타냄을 관찰할 수 있었다.

[0144] 하기 표의 NOR은 정상군, CON은 대조군, CBP1은 야국추출물 경구투여군(100mg/kg), CBP4은 야국추출물 경구투여

군(400mg/kg), CBS1은 야국추출물 200 μ l 피부도포군(1% 희석), CBS2는 야국추출물 200 μ l 피부도포군 (2% 희석)를 의미한다. 표 4는 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 관능평가 결과를 나타낸것이다.

표 4

관능평가 스코어	복용량	0 일	7 일	14일	28일	42 일
NOR		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 1.3	1.0 $\pm$ 1.6
CON		0.0 $\pm$ 0.0	6.2 $\pm$ 0.8 ^{##}	11.3 $\pm$ 1.5 ^{##}	7.3 $\pm$ 0.8 ^{##}	7.3 $\pm$ 0.8 ^{##}
CBP1	경구투여 100 mg/kg	0.0 $\pm$ 0.0	5.5 $\pm$ 2.1	10.0 $\pm$ 3.3	4.7 $\pm$ 1.3 ^{**}	3.4 $\pm$ 2.1 ^{**}
CBP4	경구투여 400 mg/kg	0.0 $\pm$ 0.0	5.5 $\pm$ 1.1	10.7 $\pm$ 2.1	5.2 $\pm$ 1.3 ^{**}	3.3 $\pm$ 0.5 ^{**}
CBS1	도포 1 %	0.0 $\pm$ 0.0	5.2 $\pm$ 1.0	10.3 $\pm$ 2.0	7.5 $\pm$ 1.5	4.5 $\pm$ 2.1 ^{**}
CBS2	도포 2 %	0.0 $\pm$ 0.0	5.5 $\pm$ 1.4	10.3 $\pm$ 2.8	8.3 $\pm$ 1.9	6.3 $\pm$ 1.0 [*]

본 데이터는 평균 $\pm$ SD (N=5)로 표현되었다.

: p<0.01, 정상군과 비교

* : p<0.05, ** : p<0.01, 대조군과 비교

나. 긁는 행동(Scratching Behavior)

마우스의 긁는 행위(Scratching Behavior)를 관찰한 결과 대조군에서는 30분당 63.0 $\pm$ 2.9회로 관찰되었으며, 야국 경구투여 100 mg/kg과 400 mg/kg 에서 각각 30분당 30.4 $\pm$ 1.4회와 21.8 $\pm$ 2.9 회, 피부 도포 1%와 2%에서 각각 45.4 $\pm$ 2.7회와 45.0 $\pm$ 3.4회의 긁는 행위가 관찰되었다.

즉, 시료 처치군 모두에서 긁는 행위의 감소가 관찰되었으며, 대조군에 비하여 경구투여군이 약 51~65%, 피부도포군이 약 28~29%정도의 억제하는 결과를 나타내었다(도 9). 표 5는 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 긁는 행동 측정 결과를 나타낸 것이다.

표 5

	복용량	긁는행동 (회) (times)
Normal	-	32.2 $\pm$ 1.5
Control	-	63.0 $\pm$ 2.9 ^{##}
CBP1	경구투여 100 mg/kg	30.4 $\pm$ 1.4 ^{**}
CBP4	경구투여 400 mg/kg	21.8 $\pm$ 2.9 ^{**}
CBS1	도포 1 %	45.4 $\pm$ 2.74 ^{**}
CBS2	도포 2 %	45.0 $\pm$ 3.4 ^{**}

본 데이터는 평균 $\pm$ SD (N=5)로 표현되었다.

: p<0.01, 정상군과 비교

[0155] * : p<0.05, ** : p<0.01, 대조군과 비교

[0156] 다. 아토피 유발 조직 표피 두께 측정 결과- 귀부종에 대한 효과

[0157] 부종을 측정하기 위한 척도로 마우스의 귀두께를 실험시작부터 종료까지 매주 측정하였다. 정상군의 귀두께는 변화가 없었으나 아토피 유발 대조군은 귀두께가 현저히 증가하였고, 시료 투여군에서는 야국의 경구 투여군과 피부 도포군 모두에서 귀부종이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 야국의 경구 투여군에서 현저한 억제가 관찰되었다. 표 6의 상단 및 표 6의 하단은 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스 모델의 귀두께를 측정한 결과를 나타낸 것이다(도 10a, 10b).

[0158]

표 6

귀두께	복용량	0 일 (mm)	7 일 (mm)	14 일 (mm)	28 일 (mm)	42 일 (mm)
NOR		0.22 ±0.02	0.23 ±0.02	0.24 ±0.02	0.25 ±0.03	0.26 ±0.01
CON		0.22 ±0.02	0.31 ±0.03 ^{##}	0.80 ±0.01 ^{##}	0.97 ±0.06 ^{##}	1.16 ±0.06 ^{##}
CBP1	경구투여 100 mg/kg	0.22 ±0.03	0.27 ±0.02 [*]	0.59 ±0.03 ^{**}	0.68 ±0.04 ^{**}	0.80 ±0.05 ^{**}
CBP4	경구투여 400 mg/kg	0.22 ±0.03	0.29 ±0.03	0.55 ±0.02 ^{**}	0.64 ±0.04 ^{**}	0.78± 0.05 ^{**}
CBS1	도포 1 %	0.20 ±0.02	0.29 ±0.03	0.74 ±0.08	0.85 ±0.05 ^{**}	0.92 ±0.04 ^{**}
CBS2	도포 2 %	0.21 ±0.02	0.29 ±0.03	0.74 ±0.07	0.85 ±0.07 [*]	0.93± 0.04 ^{**}

귀두께	복용량	0 일 (%)	7 일 (%)	14 일 (%)	28 일 (%)	42 일 (%)
NOR		19.0± 1.9	19.9± 1.9	20.8 ±1.6	21.4 ±2.3	22.1 ±0.9
CON		19.0 ± 1.4	27.2± 2.2 ^{##}	69.4 ±1.1 ^{##}	83.9 ±5.3 ^{##}	100.0 ±5.1 ^{##}
CBP1	경구투여 100 mg/kg	19.0 ± 2.2	23.5 ± 1.7 [*]	50.9 ±3.3 ^{**}	58.7 ±3.5 ^{**}	69.6 ±4.0 ^{**}
CBP4	경구투여 400 mg/kg	19.4 ± 2.3	24.7 ± 2.5	47.8 ±2.1 ^{**}	55.4 ±3.6 ^{**}	67.3 ± 4.5 ^{**}
CBS1	도포 1 %	17.3 ± 1.4	25.4 ± 2.6	64.4 ±6.7	73.9 ±4.4 ^{**}	79.6 ±3.5 ^{**}
CBS2	도포 2 %	18.0 ± 1.4	25.1 ± 2.9	63.8 ±6.1	73.5 ±6.0 [*]	80.4 ± 3.3 ^{**}

[0159]

[0160] 본 데이터는 평균± SD (N=5)로 표현되었다.

[0161] ## : p<0.01, 정상군과 비교

[0162] * : p<0.05, ** : p<0.01, 대조군과 비교

[0163] 라. 혈청 IgE, IFN-γ, IL-4 측정 결과

[0164] 표 7은 DNCB 감작과 공격에 의해 아토피를 유발시킨 마우스에서 생성된 혈청 중에서 IgE, IFN-γ, IL-4의 농도

를 ELISA로 측정하였다.

① 혈청 중 IgE 농도 측정 결과

경구투여 실험에서 대조군의 혈청 중 IgE의 농도는 106.8 ± 13.4 ng/ml이었고, 약국 경구투여군 100mg/kg과 400mg/kg에서는 각각 63.5 ± 16.9 ng/ml와 47.6 ± 8.9 ng/ml로 모두 유의하게 감소하였다($P \leq 0.001$)(도 11a). 피부도포 실험에서 대조군은 61.6 ± 9.3 ng/ml이었으며, 피부도포군 1%와 2%에서는 각각 37.2 ± 6.6 ng/ml와 46.7 ± 7.1 ng/ml로 감소하였다(도 11b).

② 혈청 중 IFN- γ 농도 측정 결과

혈청 중 IFN- γ 농도는 대조군에서는 46.7 ± 21.5 ng/ml이었고, 약국 경구투여 100 mg/kg과 400 mg/kg에서는 각각 3.3 ± 0.4 ng/ml와 3.5 ± 0.5 ng/ml, 피부도포군 1%와 2%에서는 각각 3.5 ± 0.4 ng/ml와 3.6 ± 0.4 ng/ml로 모든 시료처리군에서 유의하게 감소하였다(도 12).

③ 혈청 중 IL-4 농도 측정 결과

혈청 중 IL-4 농도는 대조군에서는 5.4 ± 0.7 ng/ml이었고, 약국 경구투여 100 mg/kg과 400 mg/kg에서는 각각 1.8 ± 1.0 ng/ml와 2.3 ± 1.0 ng/ml, 피부도포 1%와 2%에서는 1.7 ± 0.5 ng/ml와 1.8 ± 1.1 ng/ml로 모든 시료처리군에서 유의하게 감소하였다(도 13). 표 7은 혈청 중 IgE, IFN- γ , IL-4의 농도 측정 결과를 나타낸 것이다.

표 7

복용량			IgE (ng/mL)		IL-4 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
Normal	-	-	77.4 $\pm$ 6.6	24.6 $\pm$ 6.6	0.0 $\pm$ 0.9	3.4 $\pm$ 0.5
Control	-	-	106.8 $\pm$ 13.4 ^{##}	61.6 $\pm$ 9.3 ^{##}	5.4 $\pm$ 0.7 ^{##}	46.7 $\pm$ 21.5 [#]
CBP1	100 mg/kg	경구투여	63.5 $\pm$ 16.9 ^{**}	-	1.8 $\pm$ 1.0 ^{**}	3.3 $\pm$ 0.4 [*]
CBP4	400 mg/kg	경구투여	47.6 $\pm$ 8.9 ^{**}	-	2.3 $\pm$ 1.0 ^{**}	3.5 $\pm$ 0.5 [*]
CBS1	1 %	도포	-	37.2 $\pm$ 6.6 ^{**}	1.7 $\pm$ 0.5 ^{**}	3.5 $\pm$ 0.4 [*]
CBS2	2 %	도포	-	46.7 $\pm$ 7.1 [*]	1.8 $\pm$ 1.1 ^{**}	3.6 $\pm$ 0.4 [*]

본 데이터는 평균 $\pm$ SD (N=5)로 표현되었다.

: p<0.01, 정상군과 비교

* : p<0.05, ** : p<0.01, 대조군과 비교

마. 조직의 관찰

실험에 사용된 마우스는 실험 종료 후 희생시킨 다음 귀 조직을 떼어내어 10% 포르말린 용액에서 고정시켰다. 그 조직을 파라핀 포매하고, 3~4 μ m 두께로 절단하여, H&E(Hematoxylin & Eosin) 염색법으로 염색하여 궤양의 정도, 유발조직 표피의 두께, 비만세포 침윤, 호산구 침윤, 호중구와 림프구 침윤, 그리고 섬유아세포 증식과 콜라겐층 이상 증식을 관찰하였다.

정상군은 귀 조직사진에서 귀 연골조직(Ear cartilage)이 균일하게 배열되어 있고 피하세포층(subcutaneous), 피부(dermis), 표피(epidermis) 모두 균일하게 배열되어 있음이 관찰되었으며, 궤양(ulceration), 출혈(hemorrhage) 또는 염증(inflammation) 소견은 관찰되지 않았다(도 14).

- [0178] 대조군은 귀 조직 사진에서 심각한 중증의 궤양(ulceration)과 출혈이 보이며 호중구와 침윤(neutrophils infiltration)에 의한 염증이 조직에 산재되어 있으며, 귀 연골조직은 호중구와 침윤에 의한 염증으로 인하여 일부가 파괴되었고, 피부까지 호중구와 침윤에 의한 염증이 확산되어 있음이 관찰되었다. 심각한 중증의 섬유아세포 증식(fibroblast proliferation)과 콜라겐층 이상증식(collagen layer hyperplasia)도 관찰되었으며 박테리아 군집(bacteria colony)에 의한 화농성 염증도 관찰되었다(도 14).
- [0179] 야국 1% 피부 도포군은 귀 조직사진에서 경미한 출혈과 경미하게 피부까지 확산된 호중구와 침윤에 의한 염증이 보이며 콜라겐층 이상증식도 관찰되었으나 대조군에 비하여는 호전된 양상을 나타내었다(도 14).
- [0180] 야국 2% 피부 도포군의 귀 조직사진에서 경미한 호중구와 침윤이 관찰되었으며, 일부 개체에서는 경미한 궤양과 출혈이 관찰되었으나 대조군에 비하여서는 호전된 양상을 나타내었다(도 14).
- [0181] 야국 100 mg/kg 경구 투여군은 귀 조직사진에서 궤양과 출혈 소견이 보이지 않았고 일부 개체에서 피부층의 염증과 콜라겐층의 이상증식에 의한 섬유아세포 증식 소견을 보였으나, 대조군에 비하여서는 호전된 양상을 나타내었다(도 14).
- [0182] 야국 400 mg/kg 경구 투여군은 귀 조직사진에서 궤양 및 출혈과 염증소견과 콜라겐층의 이상증식에 의한 섬유아세포 증식소견이 보이지 않아 대조군에 비하여 상당히 호전된 양상을 나타내었다(도 14).
- [0183] 결론적으로 정상군에서는 궤양의 소견이 보이지 않았으나, 대조군에서는 심각한 중증의 궤양의 소견이 관찰되었다. 야국 100 mg/kg 과 400 mg/kg 경구투여군과 1%와 2% 피부도포군의 대부분에서는 궤양이 관찰되지 않았다.
- [0184] 호중구와와 림프구 침윤은 정상군에서는 관찰할 수 없었으며, 대조군에서는 심한 호중구와와 림프구의 침윤이 관찰되었다. 야국 100 mg/kg 과 400 mg/kg 경구투여군과 1%와 2% 피부도포군의 대부분에서는 경미한 호중구와와 림프구의 침윤이 관찰되었으나 대조군에 비하여는 호전된 양상을 나타내었다.
- [0185] 섬유아세포 증식과 콜라겐층 이상 증식은 정상군에서는 관찰할 수 없었으나, 대조군에서는 심각한 중증의 섬유아세포 증식과 콜라겐층 이상 증식이 관찰되었다. 야국 400 mg/kg 경구투여군과 2% 피부도포군에서는 섬유아세포 증식과 콜라겐층 증식이 확인되지 않았고, 100 mg/kg 경구투여군과 1% 피부 도포군의 일부 개체에서는 다양한 상태의 섬유아세포 증식과 콜라겐층 이상 증식상태가 관찰되었으나 대조군에 비하여는 호전된 양상을 나타내었다.
- [0186] 또한, 400배 비율로 현미경 한 시야 안에 들어온 비만세포 개수를 확인 한 결과 정상군에서는 2.35개가 관찰되었고 아토피군에서는 7.65개가 관찰되어 대조군에서 비만세포의 수가 증가하였음을 확인하였다. 야국의 1% 피부도포군에서는 8.5개, 야국 2% 피부도포군에서는 8.85개, 야국 100 mg/kg 경구투여군에서는 7.15개, 야국 400 mg/kg 경구투여군에서는 62.65개가 관찰되어 야국 400 mg/kg 경구투여군서 비만세포의 수가 대조군보다 호전되는 양상을 나타내었다.

[0187]

[0188] **실시예 3. 세포성 염증 인자의 측정**

[0189] **3-1. 실험 방법**

[0190] **(1) 실험 방법**

[0191] **가. 세포의 배양**

[0192] 본 실험에서는 뮤린 매크로파지 RAW 264.7 (murine macrophage RAW 264.7) 세포를 한국 세포주 은행 (Korean 세포 Line Bank, Korea)에서 분양받아 실험을 수행하였다. RAW 264.7의 세포 성장을 위한 기본 배지로는 DMEM을 사용하였다. RAW 264.7 세포는 2×10^5 세포/ml의 농도로 T-플라스크에 접종하여 습한 CO₂ 배양기(humidified CO₂ incubator) (5% CO₂, 95% air)에서 37℃의 조건으로 24시간 배양하였다. 그 후 FBS가 들어있지 않은 배지에 LPS를 10μg/ml의 농도로 희석하여 세포에 24시간 처리한 후, FBS가 들어있지 않은 배지에 1mg/ml의 농도를 약물을 희석하여 세포에 처리하고 24시간 후 세포를 취하여 실험에 사용하였다.

[0193] 나. 아질산염(Nitrite)의 측정

[0194] 산화질소(NO)의 생성량을 측정함으로써 유도형 산화질소 합성제(iNOS)의 활성을 측정하였다. Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 질산염/아질산염 색도분석법 키트(Nitrate/Nitrite Colorimetric assay kit)를 이용하여 세포질에 존재하는 NO₂⁻의 형태로써 측정하였으며, 실험 방법은 그리스(Griess) 용액을 이용하여 Cayman Chemical Company의 지시에 따라 정량하였다.

[0195] 다. 유도형 산화질소 합성제(iNOS) 발현 측정 결과(Western blot)

[0196] 웨스턴 블랏팅을 통해 야국 추출물 및 분획물이 Raw 264.7 세포에서 유도형 산화질소 합성제(iNOS) 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하였다

[0197] 야국 추출물 및 분획물을 처리한 세포 및 대조군을 채취하여 PBS로 2번 씻어낸 후 Pro-prep™ (Intron, Korea) 시약 100 μl를 가하여 -20℃에서 10분간 방치한 뒤 4℃에서 12,000 rpm으로 10분 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 세포 내 단백질 용액을 Pro-measure™ (Intron, Korea) 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하고 50 μg의 단백질을 취하여 샘플버퍼와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열한 후 -20℃에서 보관하였다. 완성된 샘플을 12%의 SDS-아크릴아미드 겔에 전기영동 시킨 후 PVDF 막으로 단백질을 이동시켰다. 이동이 끝난 막을 5%의 스킵 밀크(skim milk)용액에 실온에서 1시간 블로킹 시킨 후, iNOS 1차 항체를 5% 스킵 밀크(skim milk) 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4℃에서 하룻밤을 두었다. 다음 날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 항-마우스 2차 항체(anti-mouse secondary antibody)를 1시간 동안 상온에서 배양시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 ECL Western Substrate (PIERCE, #3216) 용액과 1분간 반응시킨 후 X-선 필름 (Kodak)으로 현상하였다.

[0198] 라. COX-2 억제 (Western blot) 실험

[0199] PGE2를 생성하는 COX-2의 단백질 발현양에 미치는 야국 추출물 및 분획물의 영향을 조사하기 위해 웨스턴 블랏팅을 실시하였다. 야국 추출물을 처리한 세포 및 대조군을 채취하여 PBS로 2번 씻어낸 후 Pro-prep™ 시약 100 μl를 가하여 -20℃에서 10분간 방치한 뒤 4℃에서 12000rpm으로 10분 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 세포 내 단백질 용액을 Pro-measure™ 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하고 50μg의 단백질을 취하여 샘플버퍼와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열한 후 -20℃에서 보관하였다. 완성된 샘플은 12%의 SDS-아크릴아미드 겔에 전기영동 시킨 후 PVDF 막으로 단백질을 트랜스퍼시켰다. 트랜스퍼가 끝난 막을 5%의 스킵 밀크(skim milk) 용액에 실온에서 1시간 블로킹 시킨 후, COX-2 1차 항체를 5% 스킵 밀크(skim milk) 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4℃에서 밤새 배양하였다. 다음날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 마우스와 고트 2차 항체(goat secondary antibody)를 1시간 동안 상온에서 배양시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 ECL Western Substrate (PIERCE, #3216)용액과 1분간 반응시킨 후 X-선 필름(Kodak)에 노출시켜 현상하였다.

[0200] 마. PGE2 생성량 측정

[0201] 야국 추출물 및 분획물에 의한 COX-2의 활성을 조사하기 위해 세포 내 PGE2의 양을 정량하였다. 실험은 아질산염 분석법(NO assay)과 동일한 방법으로 세포질 용액을 취하여 유리된 PGE2의 양을 PGE2 EIA system (Amersham, RPN222)의 프로토콜에 따라 측정하였다

[0202] 바. IκB 단백질의 인산화 및 분해 (Western blot)

[0203] LPS에 의한 IκB 단백질의 인산화 및 분해 정도에 미치는 야국 추출물 및 분획물의 영향을 조사하기 위해 western blotting을 실시하였다.

[0204] 각각의 시료를 처리한 세포 및 대조군을 채취하여 PBS로 2번 씻어낸 후 Pro-prep™ (Intron) 시약 100 μl를 가하여 -20℃에서 10분간 방치한 뒤 4℃에서 12,000rpm으로 10분 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 세포 내

단백질 용액을 Pro-measure™ 시약 (Intron)을 사용해 단백질 농도를 정량하고 50 μ g의 단백질을 취하여 샘플버퍼와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열한 후 -20℃에서 보관하였다. 완성된 샘플을 12%의 SDS-아크릴아미드 겔에 전기영동 시킨 후 PVDF 막으로 단백질을 이동시켰다. 이동이 끝난 막을 5%의 스킵 밀크(skim milk) 용액에 실온에서 1시간 블로킹 시킨 후, 1 κ B α 일차 항체를 5% 스킵 밀크(skim milk) 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4℃에서 하룻밤을 두었다. 다음 날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 항-마우스 2차 항체를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 BCIP-NBT 용액 (Nakanai Tesque, Japan)으로 발색시켰다.

[0205] 사. 세포질 및 핵내의 NF- κ B 단백질 발현

[0206] LPS에 의한 NF- κ B 단백질의 핵 내 이동에 있어서 야국 추출물 및 분획물의 영향을 조사하기 위해 세포질 및 핵 내 NF- κ B 단백질을 분리(p50, p65)하여 western blotting을 실시하였다.

[0207] 각각의 시료를 처리한 실험군 및 대조군을 채취하여 PBS로 두 번 씻어낸 후 0.4 ml 세포 용해(cell lysis) 버퍼 (10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2.0 μ g/ μ l 아프로티닌(aprotinin))를 첨가하였다. 15분 동안 4℃에 방치한 후, 25 μ l 10% NP40을 첨가한 다음 vortex로 10초간 격렬하게 흔들고, 반응액을 4℃에서 1,300 rpm으로 2분간 원심 분리하여 세포질 내 단백질인 상등액을 얻었다. 다시 상등액을 제거한 침전물에 50 μ l 아이스-콜드 뉴클리어 익스트랙션 버퍼(ice-cold nuclear extraction buffer) (20 mM HEPES (pH 7.9), 0.4M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2.0 μ g/ μ l 류펩틴(leupeptin) 그리고 2.0 μ g/ μ l 아프로티닌(aprotinin)함유)를 첨가하여 간헐적으로 흔들어 주면서 15분 동안 4℃에 방치한 후, 반응액을 4℃에서 1,300 rpm으로 2분간 원심 분리하여 핵단백질인 상등액을 얻었다. 얻어진 세포질 및 핵단백질 용액을 Pro-measure™ 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하고 30 μ g의 단백질을 취하여 샘플버퍼와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열한 후 -20℃에서 보관하였다. 완성된 샘플을 12%의 SDS-아크릴아미드 겔에 전기영동 시킨 후 PVDF 막으로 단백질을 이동시켰다. 이동이 끝난 후 막을 5%의 스킵 밀크(skim milk) 용액에 실온에서 1시간 블로킹 시킨 후, NF- κ B p65 일차 항체를 5% 스킵 밀크(skim milk) 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4℃에서 하룻밤을 두었다. 다음 날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 항-마우스 2차 항체를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 BCIP-NBT 용액 (Nakanai Tesque, Japan)으로 발색시켰다.

[0208] (2) 시약 및 기기

[0209] -DMEM medium (Gibco BRL Co., U.S.A.)

[0210] -RPMI 1604 medium (Gibco BRL Co., U.S.A.)

[0211] -소태아혈청 (Fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL Co., U.S.A.)

[0212] -페니실린 (Gibco BRL Co., U.S.A.)

[0213] -스트렙토마이신 (Gibco BRL Co., U.S.A.)

[0214] -질산염/아질산염 색도분석법 키 트(Nitrate/Nitrite Colorimetric assay kit, Cayman Chemical Co., U.S.A.)

[0215] -지질 다당류 (Lipopolysaccharide, Sigma Co., U.S.A.)

[0216] -Pro-prep™ protein extraction solution (Intron Biotechnology Co., Korea)

[0217] -Pro-measure™ protein measurement solution (Intron Biotechnology Co., Korea)

[0218] -COX-2 단일클론항체 (Santa Cruz Biotechnology Co., U.S.A.)

[0219] -안티-고트 항체 (Anti-goat antibody, Zymed Co., U.S.A.)

[0220] -메탄올(MeOH) (덕산공업(주), Korea)

[0221] -클로로포름 (덕산공업(주), Korea)

[0222] -ELISA 리더(ELISA reader) : Versamax (Molecular Devices Co., U.S.A.)

[0223] -FT-03 (Grass, U.S.A.)

[0224] **3-2. 실험 결과**

[0225] **가. 아질산염(Nitrite)의 측정 결과**

[0226] LPS에 의해 RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 질산염/아질산염 색도분석법 키트(Nitrate/Nitrite Colorimetric assay kit)를 이용하여 세포질에 존재하는 아질산염(Nitrite)의 형태로서 측정하였으며, 실험 방법은 그리스(Griess) 시약을 사용하여 Cayman Chemical Company의 실험법에 따라 정량하였다. 그 결과 5 µg/ml의 농도에서 아질산염(Nitrite) 생성이 대조군에 비해 메탄올(MeOH) 추출물, 클로로포름(CHCl₃) 분획물, 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물에서 각각 약 38%, 78%, 30%감소하였다(도 15, 16). 표 8은 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 아질산염 생성량에 미치는 약국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 8

샘플	농도 (µg/ml)	생성(%)
정상군		16.7 ± 0.2
대조군		100.0 ± 1.5
MeOH 추출물	1.25	83.1 ± 0.6
	2.5	82.3 ± 0.3
	5	62.1 ± 0.5
	10	52.0 ± 1.1
	20	21.8 ± 0.2
CHCl ₃ 분획물	1.25	49.2 ± 0.4
	2.5	34.5 ± 0.2
	5	21.8 ± 0.6
	10	11.7 ± 0.0
	20	13.8 ± 0.3
EtOAc 분획물	1.25	73.6 ± 0.8
	2.5	73.9 ± 1.1
	5	69.8 ± 0.7
	10	49.7 ± 3.0
	20	15.6 ± 0.3

[0227]

[0228] **나. 유도형 산화질소 합성제(iNOS) 발현 측정 결과(Western blot)**

[0229] 웨스턴 블랏팅을 통해 약국이 RAW 264.7 세포에서 유도형 산화질소 합성제(iNOS) 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 유도형 산화질소 합성제(iNOS) 발현양이 대조군에 비해 메탄올(MeOH) 추출물에서 약 19%, 클로로포름(CHCl₃) 분획물에서 약 98%, 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물에서 약 0.5%가 감소하였다(도 16). 표 9는 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 유도형 산화질소 합성제(iNOS) 발생량에 미치는 약국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 9

샘플	샘플 농도 (µg/ml)	iNOS의 발현양 (%/Con)
정상군		1.0
대조군		100.0
MeOH 추출물	5	80.7
CHCl ₃ 분획물	5	1.9
EtOAc 분획물	5	99.5

[0230]

[0231] **다. PGE2 발현양 측정 결과**

[0232] 약국 추출물에 의한 COX-2의 활성을 조사하기 위해 세포 내 PGE₂의 양을 정량하였다. 그 결과, PGE₂의 생성이 대조군에 비해 메탄올 추출물에서 약 24%, 클로로포름(CHCl₃) 분획물에서 약 88%, 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물에서 10% 감소하였다(도 17). 표 10은 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 PGE₂ 발현양에 미치는 약국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 10

샘플	샘플 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PGE ₂ 의 발현양 (pg/ml)
정상군		1.0 $\pm$ 1.2
대조군		3603.9 $\pm$ 180.6
MeOH 추출물	5	2750.0 $\pm$ 130.9
CHCl ₃ 분획물	5	423.3 $\pm$ 86.3
EtOAc 분획물	5	3167.3 $\pm$ 41.2

[0233]

[0234] 라. COX-2 발현 측정(Western blot) 결과

[0235] Western blotting을 통해 약국 추출물이 RAW 264.7 cell에서 COX-2 단백질의 발현에 미치는 변화를 확인하였다. 그 결과, COX-2의 발현량이 대조군에 비해 CHCl₃ 분획물에서 약 37%가 감소하였고, EtOAc 분획물에서 23%가 감소하였다. 그러나 MeOH 추출물에서는 약 26% 증가하였다(도 18).

[0236] 표 11은 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 COX-2 발현양에 미치는 약국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 11

샘플	샘플농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	COX-2 발현양 (%/Con)
정상군		0.3
대조군		100.0
MeOH 추출물	5	126.1
CHCl ₃ 분획물	5	62.9
EtOAc 분획물	5	76.9

[0237]

[0238] 마. I κ B 발현 측정(Western blot) 결과

[0239] 약국 추출물에 의한 P50, P65의 활성을 조사하기 위해 P50, P65의 억제인자인 I κ B의 양을 정량하였다. 그 결과 대조군에 비하여 MeOH 추출물에서는 약 61%, CHCl₃ 분획물에서는 약 65%, EtOAc 분획물에서는 약 39.6%의 발현 증가로 나타났다(도 19). 표 12는 RAW 264.7 세포 내 LPS-유도된 I κ B 발현양에 미치는 약국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 12

샘플	샘플농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	I κ B 발현 (%/Con)
정상군		100.0
대조군		60.8
MeOH 추출물	5	98.1
CHCl ₃ 분획물	5	100.6
EtOAc 분획물	5	84.9

[0240]

[0241] 바. NF- κ B (P50, P65) 발현 측정(Western blot)

[0242] 야국 추출물이 P50, P65의 활성에 미치는 변화를 확인하였다. 그 결과 P50의 발현량은 대조군에 비해 MeOH 추출물에서, 28%, CHCl₃ 분획물에서 42%, EtOAc 분획물에서 36%가 감소하였고(도 20a), P65의 발현량은 대조군에 비해 MeOH 추출물에서, 18%, CHCl₃ 분획물에서 22%, EtOAc 분획물에서 20%가 각각 감소하였다. 표 13는 LPS-유도된 RAW 264.7 세포의 NF- κ B (P50, P65) 발현양에 미치는 야국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 13

샘플	샘플농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	발현 p50 (%/Con)	p65 발현양 (%/Con)
정상군		40.9	50.7
대조군		100.0	100.0
MeOH 추출물	5	72.2	82.4
CHCl ₃ 분획물	5	58.5	78.4
EtOAc 분획물	5	63.8	80.3

[0243]

[0244] 3-3. 비교예-감국

[0245] (1) 시료의 추출

[0246] 1) 재료

[0247] 본 실험에서 사용된 감국(학명: *Chrysanthemum indicum* L.)은 경상북도 영천에서 설국 황국 금국이라는 이름으로 재배되는 소국류의 꽃으로, 2007년 10월 3일에 채취하였다. 시료로 쓰인 약재의 일부는 경희대학교 한의과대학 본초학교실에 보관하였다.

[0248] 2) 시료의 추출과 분획

[0249] ① 시료의 추출

[0250] 감국 100 g을 100% 메탄올(MeOH)을 용매로 하여 110 °C 추출기에서 3시간씩 3회 반복 추출하고, 회전농축증발기를 이용하여 감압 농축하여 100% 메탄올 추출물 32.5 g을 얻었다.

[0251] ② 분획

[0252] 위에서 얻은 감국 메탄올 추출물 32.5g을 증류수에 녹인 후 클로로포름 (CHCl_3)을 이용하여 분획하여, 물(H_2O) 분획물 12.9 g과 클로로포름 분획물 2.9 g을 얻었다.

[0253] 3) 시약 및 기기

[0254] -DMEM medium (Hyclone, U.S.A.)

[0255] -소태아혈청 (Fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL Co., U.S.A.)

[0256] -페니실린 (Gibco BRL Co., U.S.A.)

[0257] -스트렙토마이신 (Gibco BRL Co., U.S.A.)

[0258] -세포 Titer 96 (Promega Co., U.S.A.)

[0259] -질산염/아질산염 색도분석법 키트 (Nitrate/Nitrite Colorimetric assay kit) (Cayman Chemical Co., U.S.A.)

[0260] -지질다당류 (Lipopolysaccharide, Sigma Co., U.S.A.)

[0261] -Pro-prepTM protein extraction solution (Intron Biotechnology Co., Korea)

[0262] -Pro-measureTM protein measurement solution (Intron Biotechnology Co., Korea)

[0263] -COX-2 단일클론항체 (BD Bioscience Pharmingen Co., U.S.A.)

[0264] -iNOS 단일클론항체 (BD Bioscience Pharmingen Co., U.S.A.)

[0265] -안티-마우스 안티바디 (Anti-마우스 antibody, cell Signalling Co., U.S.A.)

[0266] -프로스타글란딘 E_2 biotak ELISA system (BD Bioscience Pharmingen Co., U.S.A.)

[0267] -ECL Western Substrate (PIERCE, #3216, Rockford, U.S.A.)

[0268] -RayBio 마우스 Inflammation Antibody Array I (AAM-INF-1-8, RayBiotech, Norcross, GA, U.S.A.)

[0269] -ELISA 리더 (ELISAreader) : Versamax (Molecular Devices Co., U.S.A.)

[0270] -UV/VIS 스펙트로포토미터 (Spectrophotometer, Gilson Co., U.S.A.)

[0271] (2) 실험방법

[0272] 1) 아질산염(Nitrite)의 측정

[0273] 산화질소(NO)의 발현양을 측정함으로써 유도형 산화질소 합성제(iNOS)의 활성을 측정하였다. Raw 264.7 세포로부터 생성된 산화질소의 양은 질산염/아질산염 색도분석법 키트(Nitrate/Nitrite Colorimetric assay kit)를 이용하여 세포질에 존재하는 아질산염의 형태로서 측정하였으며, 실험 방법은 Cayman Chemical Company의 실험법에 따라 정량하였다. 모든 측정치는 평균±표준편차로 표시되었다. 유의성 판정을 위해 스튜던트 T-테스트(Student T-test)를 사용하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 실험하였다.

[0274] 2) iNOS 발현 측정

[0275] NO의 생성을 유도하는 효소인 iNOS 발현에 미치는 감국 추출물 및 분획물의 영향을 조사하기 위해 Western blotting을 실시하였다.

[0276] 감국 추출물을 처리한 세포 및 대조군을 채취하여 PBS로 2번 씻어낸 후 Pro-prepTM (Intron, Korea) 시약 100 μl 를 가하여 -20 °C에서 10분간 방치한 뒤 4°C에서 12,000 rpm으로 10분 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어

진 세포 내 단백질 용액을 Pro-measure™ (Intron, Korea) 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하고 50 μ g의 단백질을 취하여 샘플버퍼와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열한 후 -20℃에서 보관하였다. 완성된 샘플을 12%의 SDS-아크릴아미드 겔에 전기영동 시킨 후 PVDF 막으로 단백질을 이동시켰다. 이동이 끝난 막을 5%의 스킵 밀크(skim milk)용액에 실온에서 1시간 블로킹 시킨 후, iNOS 일차 항체를 5% 스킵 밀크(skim milk) 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4℃에서 하룻밤을 두었다. 다음 날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 항-마우스 2차 항체를 1시간 동안 상온에서 배양시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 ECL Western Substrate (PIERCE, #3216)용액과 1분간 반응시킨 후 X-선 필름 (Kodak)으로 현상하였다.

[0277] 2) PGE2 생성량 측정

[0278] 감국 추출물 및 분획물에 의한 COX-2의 활성을 조사하기 위해 세포 내 프로스타글란딘 E2 (PGE2)의 양을 정량하였다. 실험은 nitrite (NO) assay와 동일한 방법으로 세포질 용액을 취하여 유리된 PGE2의 양을 Prostaglandin E2 Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) system (Amersham, RPN222)의 실험법에 따라 정량하였다.

[0279] 3) COX-2 발현 측정

[0280] PGE2를 생성하는 COX-2의 발현에 미치는 감국 추출물 및 분획물의 영향을 조사하기 위해 Western blotting을 실시하였다.

[0281] 각각의 시료를 처리한 세포 및 대조군을 채취하여 PBS로 2번 씻어낸 후 Pro-prep™ 시약 100 μ l를 가하여 -20℃에서 10분간 방치한 뒤 4℃에서 12,000 rpm으로 10분 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 세포 내 단백질을 Pro-measure™ 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하고 50 μ g의 단백질을 취하여 샘플버퍼와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열한 후 -20℃에서 보관하였다. 완성된 샘플을 12%의 SDS-아크릴아미드 겔에 전기영동 시킨 후 PVDF 막으로 단백질을 이동시켰다. 이동이 끝난 막을 5%의 스킵 밀크(skim milk) 용액에 실온에서 1시간 블로킹 시킨 후, COX-2 일차 항체를 5% 스킵 밀크(skim milk) 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4℃에서 하룻밤을 두었다. 다음 날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 항-마우스 2차 항체를 1시간 동안 상온에서 배양시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 ECL Western Substrate (PIERCE, #3216)용액과 1분간 반응시킨 후 X-선 필름 (Kodak)으로 현상하였다.

[0282] 4) I κ B 단백질의 인산화 및 분해 측정

[0283] LPS에 의한 I κ B 단백질의 인산화 및 분해 정도에 미치는 감국 추출물 및 분획물의 영향을 조사하기 위해 western blotting을 실시하였다.

[0284] 각각의 시료를 처리한 세포 및 대조군을 채취하여 PBS로 2번 씻어낸 후 Pro-prep™ (Intron) 시약 100 μ l를 가하여 -20℃에서 10분간 방치한 뒤 4℃에서 12,000rpm으로 10분 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 세포 내 단백질을 Pro-measure™ 시약 (Intron)을 사용해 단백질 농도를 정량하고 50 μ g의 단백질을 취하여 샘플버퍼와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열한 후 -20℃에서 보관하였다. 완성된 샘플을 12%의 SDS-아크릴아미드 겔에 전기영동 시킨 후 PVDF 막으로 단백질을 이동시켰다. 이동이 끝난 막을 5%의 스킵 밀크(skim milk) 용액에 실온에서 1시간 블로킹 시킨 후, I κ B α 일차 항체를 5% skim 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4℃에서 하룻밤을 두었다. 다음 날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 항-마우스 2차 항체를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 BCIP-NBT 용액 (Nakanai Tesque, Japan)으로 발색시켰다.

[0285] 5) 세포질 및 핵내의 NF- κ B 단백질 발현 측정

[0286] LPS에 의한 NF- κ B 단백질의 핵 내 이동에 있어서 감국 추출물 및 분획물의 영향을 조사하기 위해 세포질 및 핵 단백질을 분리하여 western blotting을 실시하였다.

[0287] 각각의 시료를 처리한 실험군 및 대조군을 채취하여 PBS로 두 번 씻어낸 후 0.4 ml 세포 용해(cell lysis) 버퍼 (10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2.0 μ g/ μ l aprotinin)를 첨가하였다. 15분 동안 4℃에 방치한 후, 25 μ l 10% NP40을 첨가한 다음 voltex로 10초간 격렬하

게 흔들고, 반응액을 4℃에서 1,300 rpm으로 2분간 원심 분리하여 세포질 내 단백질인 상등액을 얻었다. 다시 상등액을 제거한 침전물에 50 μ l 아이스-콜드 뉴클리어 익스트랙션 버퍼(ice-cold nuclear extraction buffer) (20 mM HEPES (pH 7.9), 0.4M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2.0 μ g/ μ l 류펩틴 (leupeptin) 그리고 2.0 μ g/ μ l 아프로티닌(aprotinin)함유)를 첨가하여 간헐적으로 흔들어 주면서 15분 동안 4℃에 방치한 후, 반응액을 4℃에서 1,300 rpm으로 2분간 원심 분리하여 핵단백질인 상등액을 얻었다. 얻어진 세포질 및 핵단백질 용액을 Pro-measure™ 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하고 30 μ g의 단백질을 취하여 샘플 버퍼와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열한 후 -20℃에서 보관하였다. 완성된 샘플을 12%의 SDS-아크릴아미드 겔에 전기영동 시킨 후 PVDF 막으로 단백질을 이동시켰다. 이동이 끝난 후 막을 5%의 스킵 밀크(skim milk) 용액에 실온에서 1시간 블로킹 시킨 후, NF- κ B p65 일차 항체를 5% 스킵 밀크(skim milk) 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4℃에서 하룻밤을 두었다. 다음 날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 항-마우스 2차 항체를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 BCIP-NBT 용액 (Nakanai Tesque, Japan)으로 발색시켰다.

[0288] (3) 실험결과

[0289] 1) 아질산염(Nitrite)의 측정 결과

[0290] 아질산염 발현량을 측정한 결과, 시료 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 메탄올 추출물에서는 각각 97.9%, 89.0%, 37.3%, 17.8%, 클로로포름 분획물에서는 각각 50.6%, 19.2%, 16.6%, 7.5%로 나타났다. 즉, 메탄올 분획물 50 μ g/ml 이상과 클로로포름 분획물 25 μ g/ml이상의 농도에서 50%이상 아질산염 생성을 억제하는 것을 알 수 있다. 표 14는 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 아질산염 생성량에 미치는 감국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다(도 21).

표 14

샘플	샘플 농도 (μ g/ml)	NO 생성량 (%)
정상군		10.3 $\pm$ 0.7
대조군		100.0 $\pm$ 5.7 [#]
MeOH 추출물	12.5	97.9 $\pm$ 1.9
	25	89.0 $\pm$ 0.9
	50	37.3 $\pm$ 1.0 ^{**}
	100	17.8 $\pm$ 0.8 ^{**}
CHCl ₃ 분획물	12.5	50.6 $\pm$ 2.1 ^{**}
	25	19.2 $\pm$ 0.5 ^{**}
	50	16.6 $\pm$ 0.5 ^{**}
	100	7.5 $\pm$ 0.1 ^{**}
Water 분획물	12.5	107.6 $\pm$ 1.5
	25	92.8 $\pm$ 14.5
	50	85.2 $\pm$ 2.3 [*]
	100	53.2 $\pm$ 1.5 ^{**}

[0291] # : p<0.05, 정상군과 비교

[0292] * : p<0.05, ** : p<0.01, 대조군과 비교

[0293] 본 데이터는 평균 $\pm$ SD (N=3)로 표현되었다.

[0294] 본 실험 결과, 감국 추출물의 경우 메탄올 추출물 50 μ g/ml 이상과 클로로포름 분획물 25 μ g/ml이상의 농도에서 50%이상 아질산염 생성을 억제하나 야국 추출물의 경우(실시예 3-2) 메탄올 추출물 10 μ g/ml 이상, 클로로포름 분획물 1.25 μ g/ml 이상 및 에틸아세테이트 분획물 10 μ g/ml 이상의 농도에서 50%이상 아질산염 생성을 억제하였는바, 감국 추출물 및 분획물과 비교하여 현저히 낮은 농도의 야국 추출물 및 분획물이 감국 추출물 및 분획물

과 동등하거나 그 이상의 아질산염 생성 억제 효과를 발휘함을 알 수 있었다.

[0296] 2) iNOS 발현 측정 결과

[0297] 감국 추출물 및 분획물의 세포독성결과와 아질산염 생성 결과를 참고하여 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 iNOS 발현을 측정하였다. iNOS 단백질의 발현은 Western blotting을 통하여 RAW 264.7 cell에서 확인하였다.

[0298] iNOS 발현양이 대조군에 비해 메탄올 추출물에서는 74.9%로 나타나 25.1% 감소하였고, 클로로포름 분획물에서는 0.0%로 나타나 100.0% 감소하였으며, 물 분획물에서는 69.7%로 나타나 30.3% 감소하였다(도 22). 표 15는 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 iNOS 발현량에 미치는 감국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 15

샘플	농도 ($\mu\text{g/ml}$)	iNOS 발현량 (%/Con)
정상군		0.1
대조군		100.0
MeOH 추출물	25	74.9
CHCl_3 분획물	25	0.0
Water 분획물	25	69.7

[0299]

[0300] 2) PGE2 생성량 측정 결과

[0301] 감국 추출물에 의한 COX-2의 활성을 조사하기 위해 세포내 PGE2의 양을 정량하였다.

[0302] 시료 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 PGE2의 생성은 대조군의 $3425.1 \pm 239.6 \text{ pg/ml}$ 에 비해 메탄올 추출물에서는 $3250.3 \pm 22.8 \text{ pg/ml}$ 로 5.1% 감소하였고, 물 분획물에서는 $3439.5 \pm 159.3 \text{ pg/ml}$ 로 나타났다. 그러나 클로로포름 분획물에서는 $612.0 \pm 85.4 \text{ pg/ml}$ 로 82.1% 감소하였다(도 23). 표 16은 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 PGE2 발현량에 미치는 감국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 16

샘플	농도 ($\mu\text{g/ml}$)	PGE2 발현량 (pg/ml)	생성률 (%)
정상군		0.0	0.0
대조군		3425.1 ± 239.6	100.0
MeOH 추출물	25	3250.3 ± 22.8	94.9
CHCl_3 분획물	25	612.0 ± 85.4	17.9
Water 분획물	25	3439.5 ± 159.3	100.4

[0303]

[0304] 3) COX-2 발현 측정 결과

[0305] Western blotting을 통해 감국 추출물이 RAW 264.7 cell에서 COX-2 단백질의 발현에 미치는 변화를 확인하였다. 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 감국 추출물에서 실험한 결과, COX-2의 발현량이 대조군에 비해 메탄올 추출물에서는 127.0%로 나타나 27.0% 증가하였고, 클로로포름 분획물에서는 94.7%로 나타나 5.3% 감소하였고, 물 분획물에서는 136.3%로 나타나 36.3% 증가하였다(도 24). 표 17은 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 COX-2 발현량에 미치는 감국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 17

샘플	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	발현량 COX-2 (%/Con)
정상군		23.2
대조군		100.0
MeOH 추출물	25	127.0
CHCl_3 분획물	25	94.7
Water 분획물	25	136.3

[0306]

[0307] 4) I κ B 단백질의 인산화 및 분해 측정 결과

[0308] RAW 264.7 대식세포주에서 LPS로 유도된 I κ B 단백질의 인산화 및 분해에 있어서 감국 추출물의 I κ B 단백질의 인산화 및 분해의 억제 효과를 확인하였다. 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 감국 추출물에서 실험한 결과, I κ B의 발현양이 메탄올 추출물에서는 12.6%로 나타나 87.4% 감소하였고, 클로로포름 분획물에서는 49.6%로 나타나 50.4% 감소하였으며, 물 분획물에서는 28.9%로 나타나 71.1% 감소하였다. 그러므로 LPS로 유도된 I κ B 단백질의 인산화 및 분해에 있어서 감국 추출물의 I κ B 단백질의 인산화 및 분해의 억제 효과를 확인할 수 있었다(도 25). 표 18은 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 I κ B 단백질의 인산화 및 분해에 미치는 감국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 18

샘플	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	I κ B의 발현 (%)
정상군		100.0
대조군		0.0
MeOH 추출물	25	12.6
CHCl_3 분획물	25	49.6
Water 분획물	25	28.9

[0309]

[0310] 5) 세포질 및 핵 내에서의 NF- κ B 단백질 발현

[0311] RAW 264.7 대식세포주에서 LPS에 의해 I κ B 단백질로부터 유리되어 세포질에서 핵 내로 NF- κ B 단백질의 이동을

감국 추출물이 억제하였는지 확인하였다.

[0312] 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 감국 추출물에서 p65 발현양을 관찰한 결과, 대조군에 비해서 메탄올 추출물에서는 71.6%로 나타나 28.4% 감소하였고, 클로로포름 분획물에서는 87.9%로 나타나 12.1% 감소하였으며, 물 분획물에서는 86.1%로 나타나 13.9% 감소하였다. 이와 같이 감국 추출물의 NF- κ B 단백질의 핵 내 이동에 있어서 억제 효과가 나타났다. 즉 NF- κ B 단백질의 핵 내 이동 정도가 뚜렷하게 감소하였다(도 26). 표 19는 LPS-유도된 RAW 264.7 세포 내 세포질 및 핵 내에서의 NF- κ B 단백질 발현량에 미치는 감국 추출물 및 이의 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

표 19

샘플	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	p65 발현 (%)
정상군		58.5
대조군		100.0
MeOH 추출물	25	71.6
CHCl_3 분획물	25	87.9
Water 분획물	25	86.1

[0313]

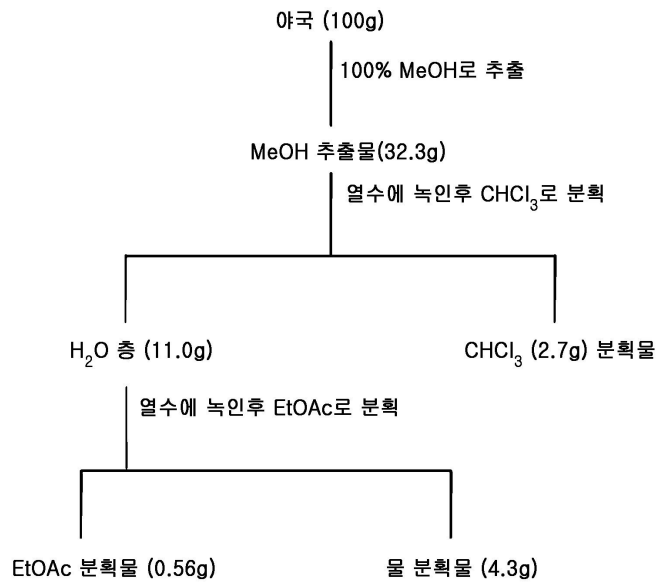
[0314] **실시예 4. 세포 독성 측정 (MTS assay)결과**

[0315] 야국에서 추출된 추출물 및 분획물의 세포 독성 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에서 MTS/PMS (Cell Titer 96TM Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Cat. G5421-Promega)를 이용하여 MTS 분석을 수행하였다. RAW 264.7 세포를 96 웰 플레이트에 5×10^4 세포/mL로 접종하고 24시간 배양 후, 야국 추출물 을 혈청이 첨가되지 않은 DMEM 배지에 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 24시간 후 MTS와 PMS를 20:1의 비율로 잘 혼합하여 처리하고 3시간 배양한 후, ELISA Reader (Versamax, Molecular Devices Co., U.S.A.)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

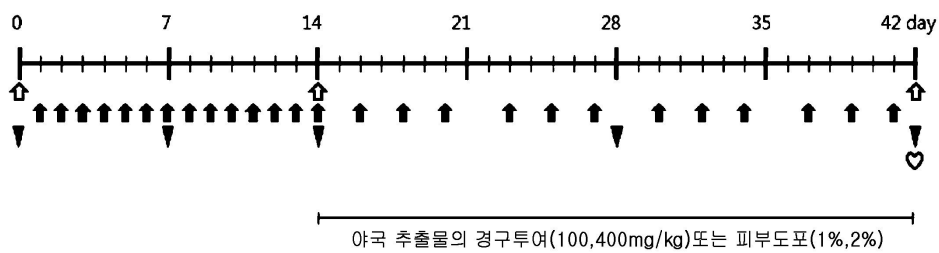
[0316] 실험결과, 도 27에 나타난 바와 같이 메탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물, 클로로포름 분획물은 모든 농도에 서 RAW 264.7의 세포 생존율에는 거의 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 야국의 추출물 및 분획물은 세포독성이 없는 것으로 확인하였다(도 27).

도면

도면1

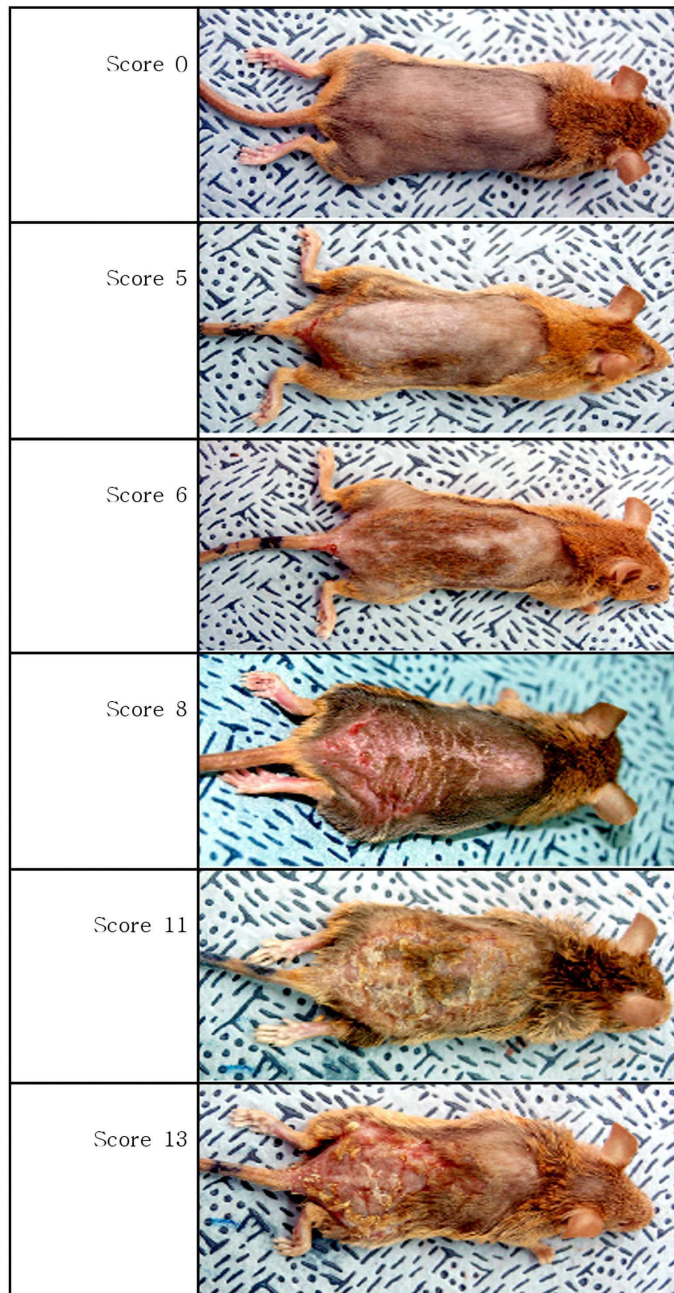


도면2

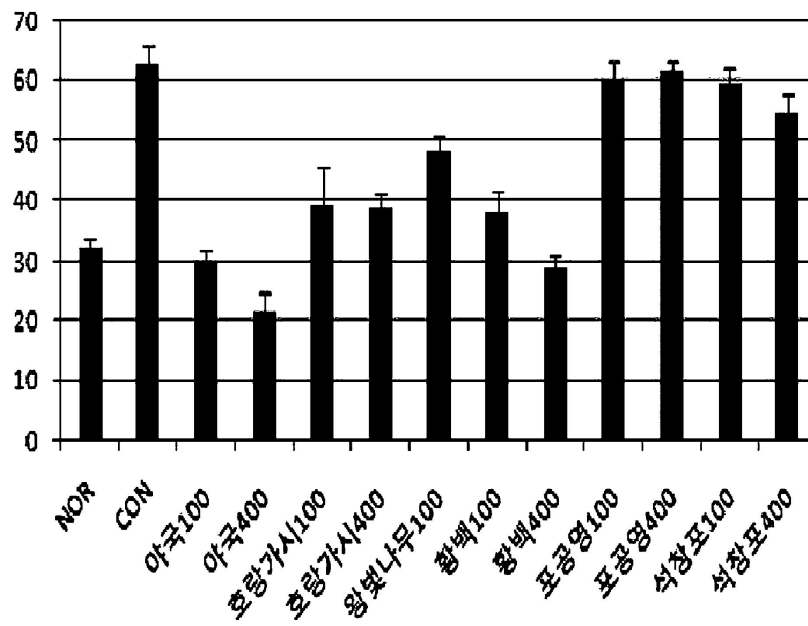


- ↑ 등 부위의 제모
- ↑ 6주령 된 수컷 NC/Nga mice를 Aoo에 녹인 0.5% DNCB 200μl를 등부위에 배포
- ▼ 관능평가, 귀두께 측정
- ♥ 혈액과 조직수집

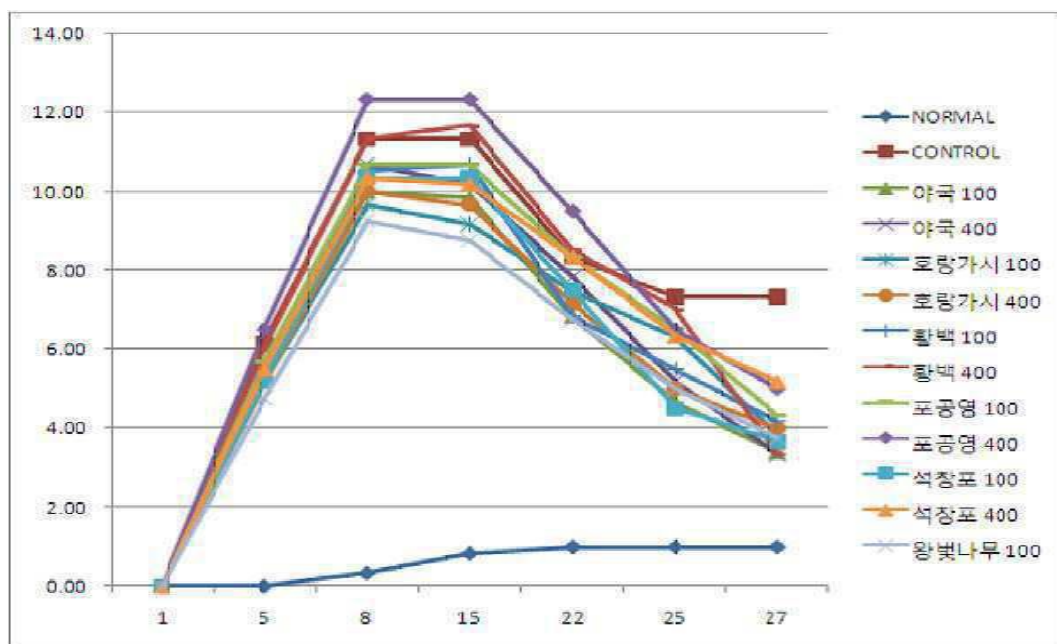
도면3



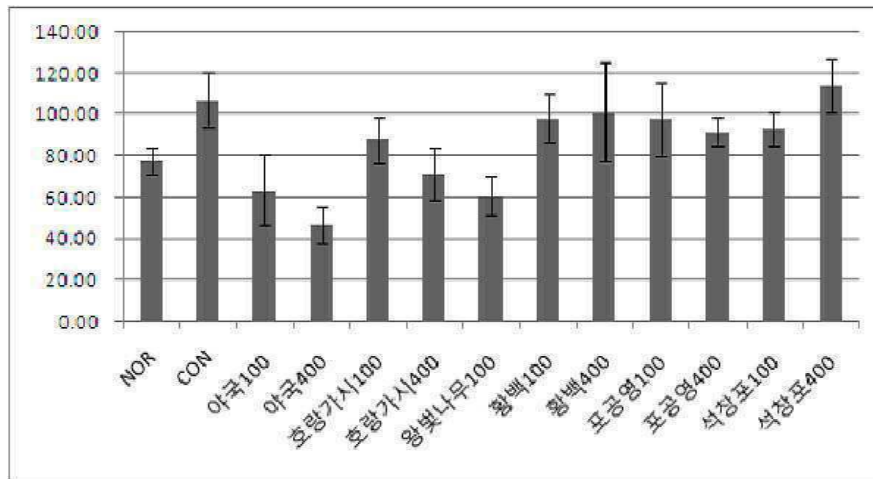
도면4



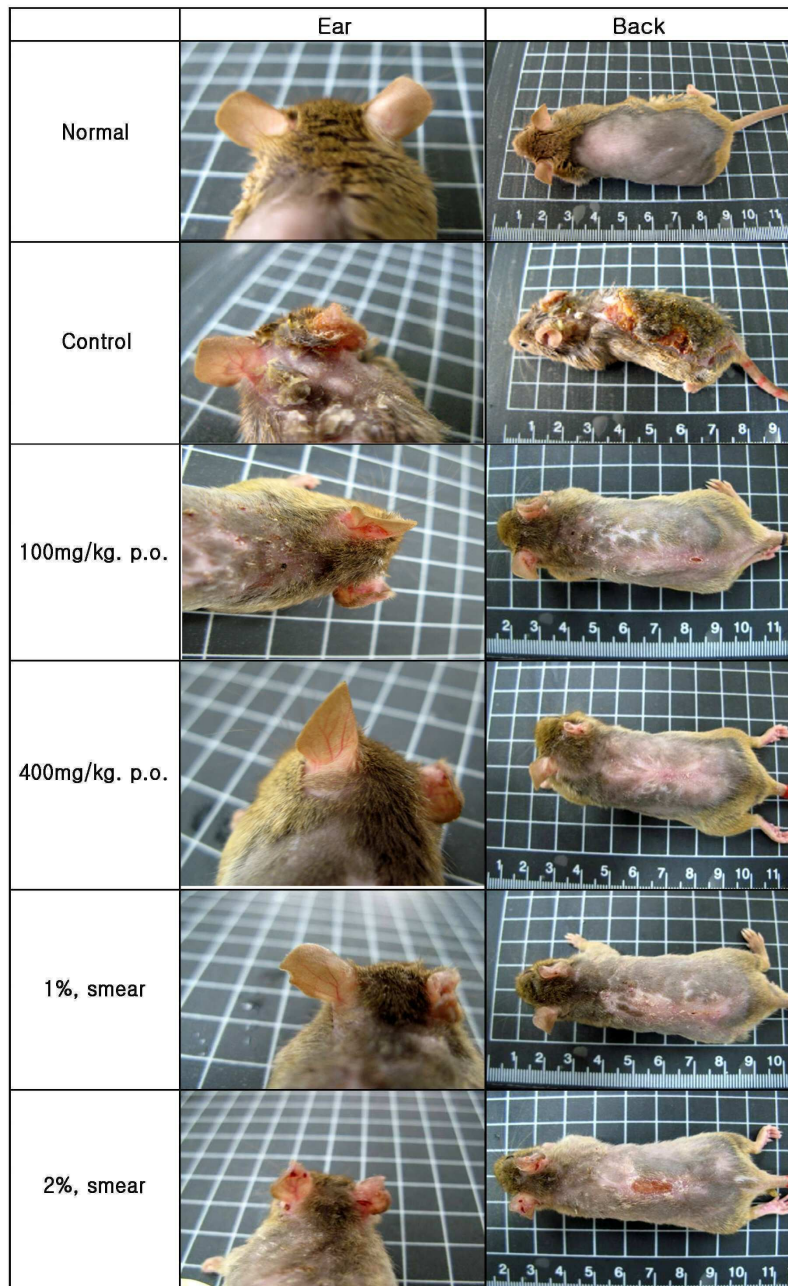
도면5



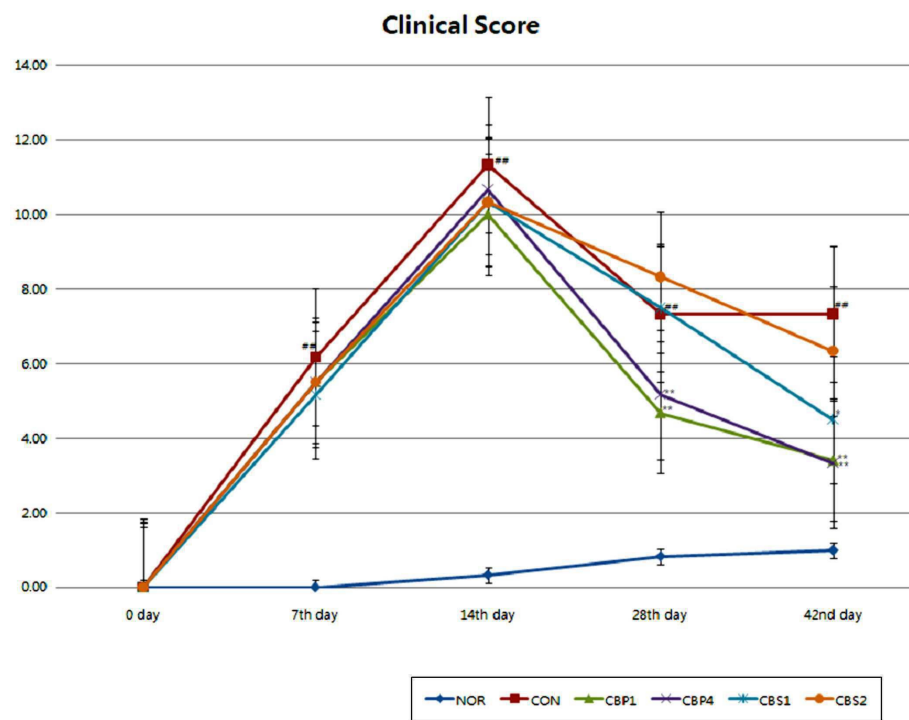
도면6



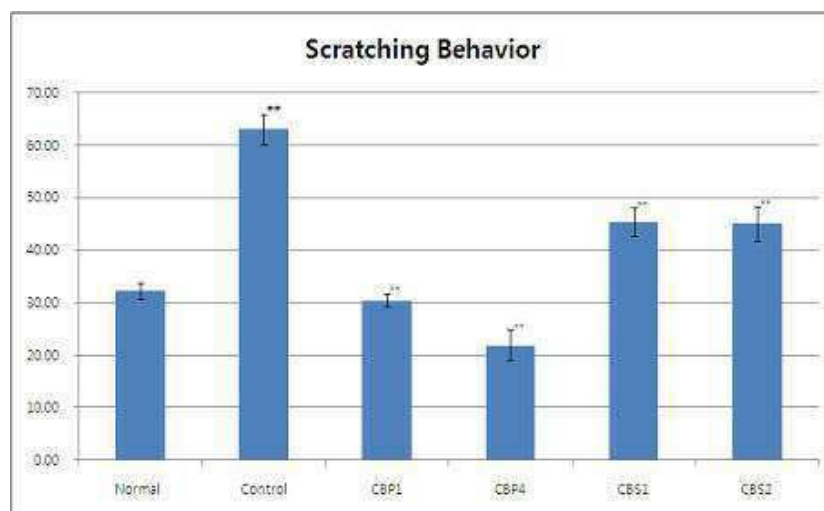
도면7



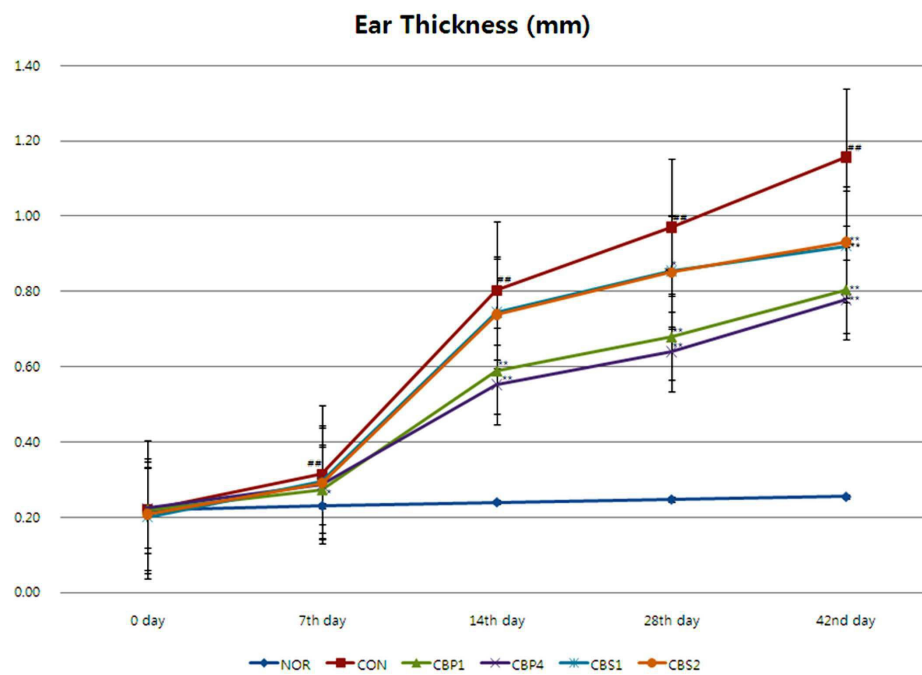
도면8



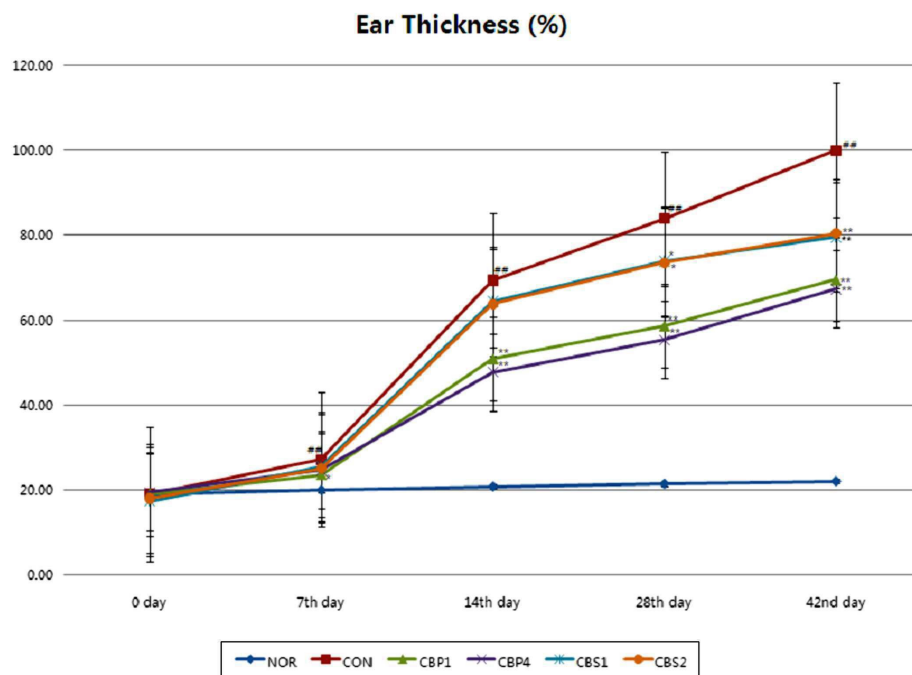
도면9



도면10a

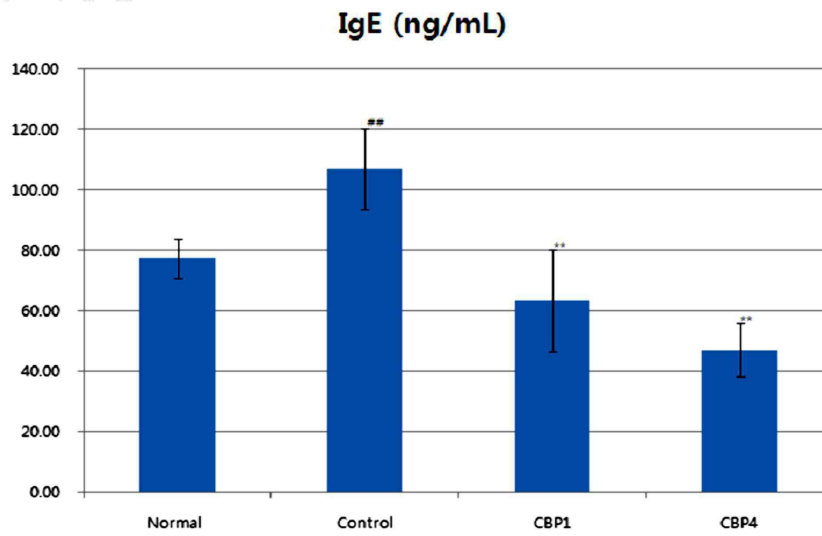


도면10b

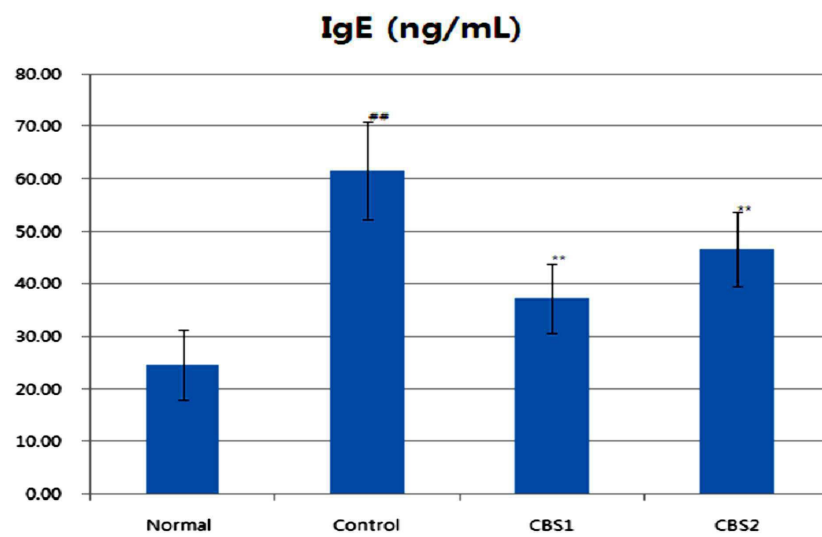


도면11

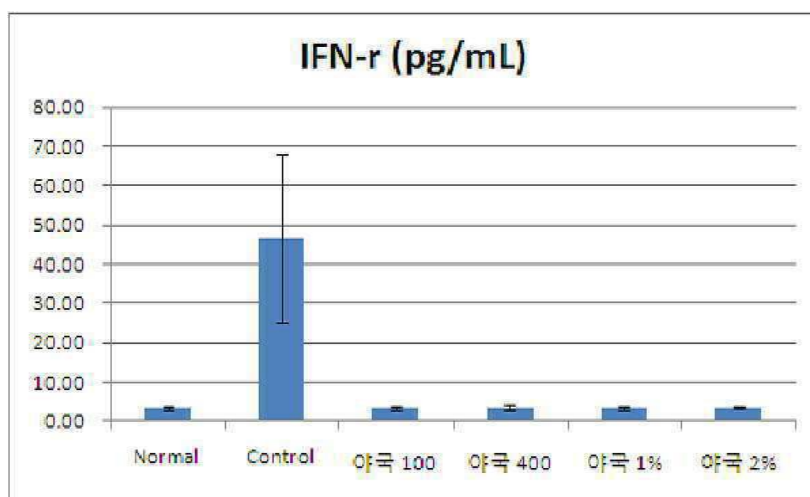
(a) p.o. (mg/kg)



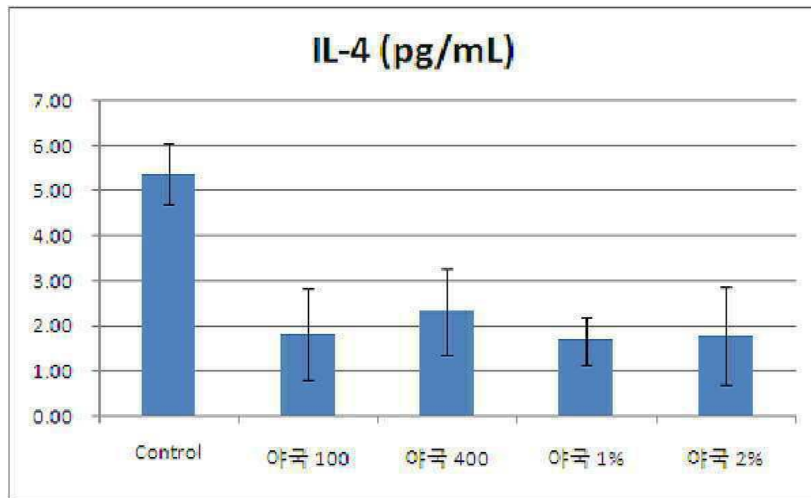
(b) smear (%)



도면12

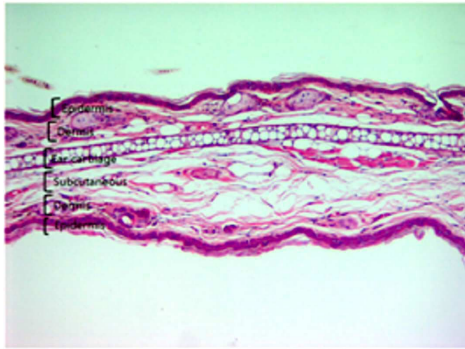


도면13

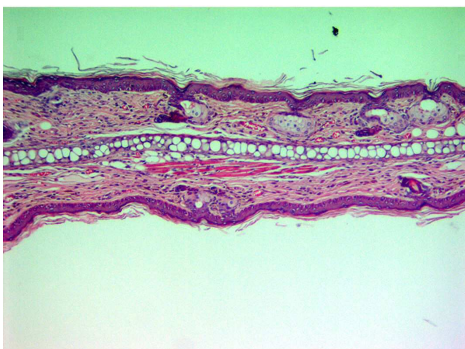


도면14

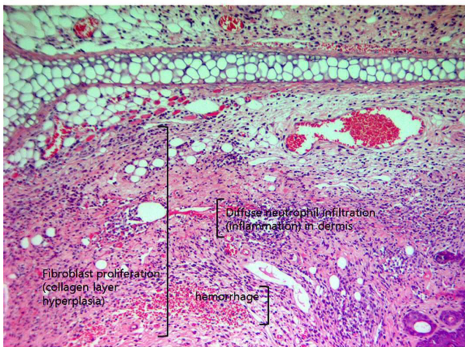
Normal



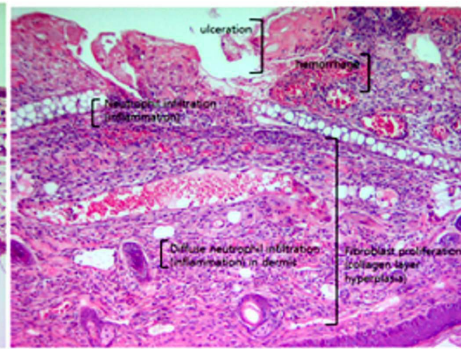
p.o. 100 mg/kg



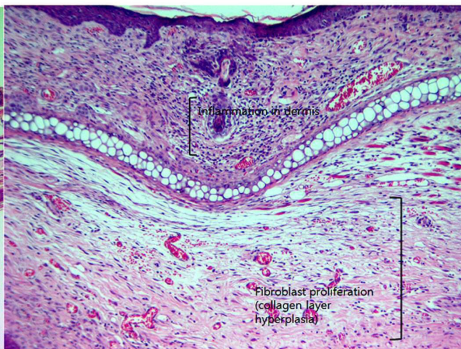
Smear 1%



Control



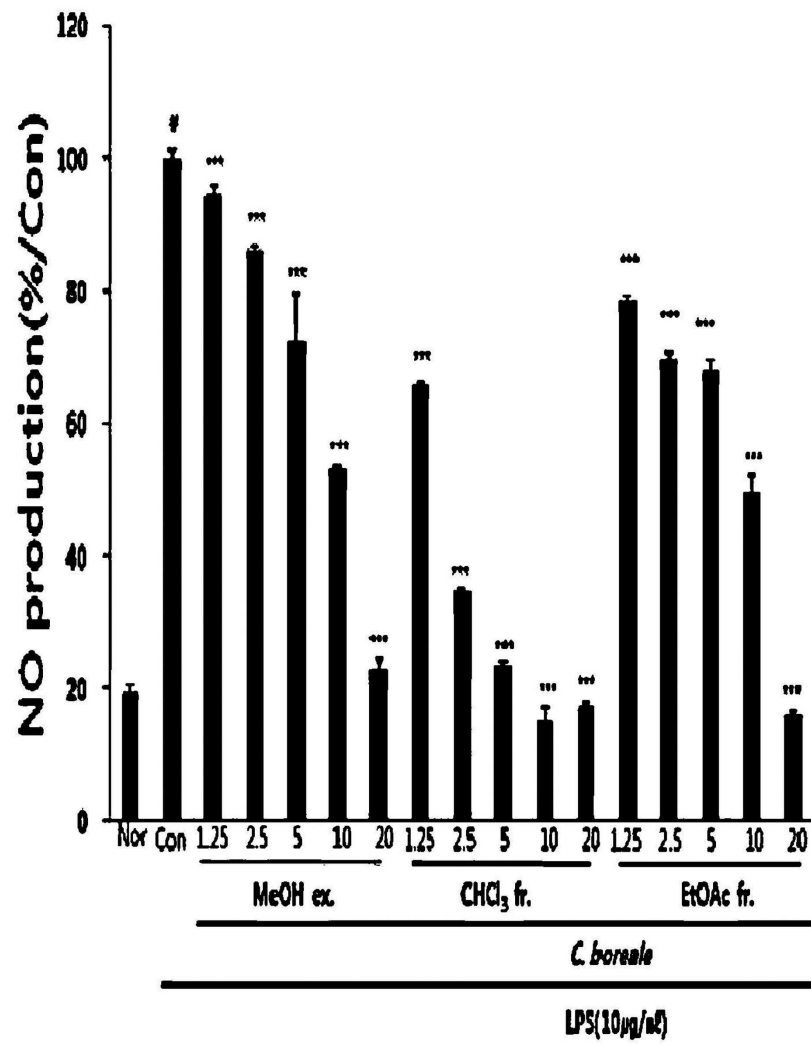
p.o. 400 mg/kg



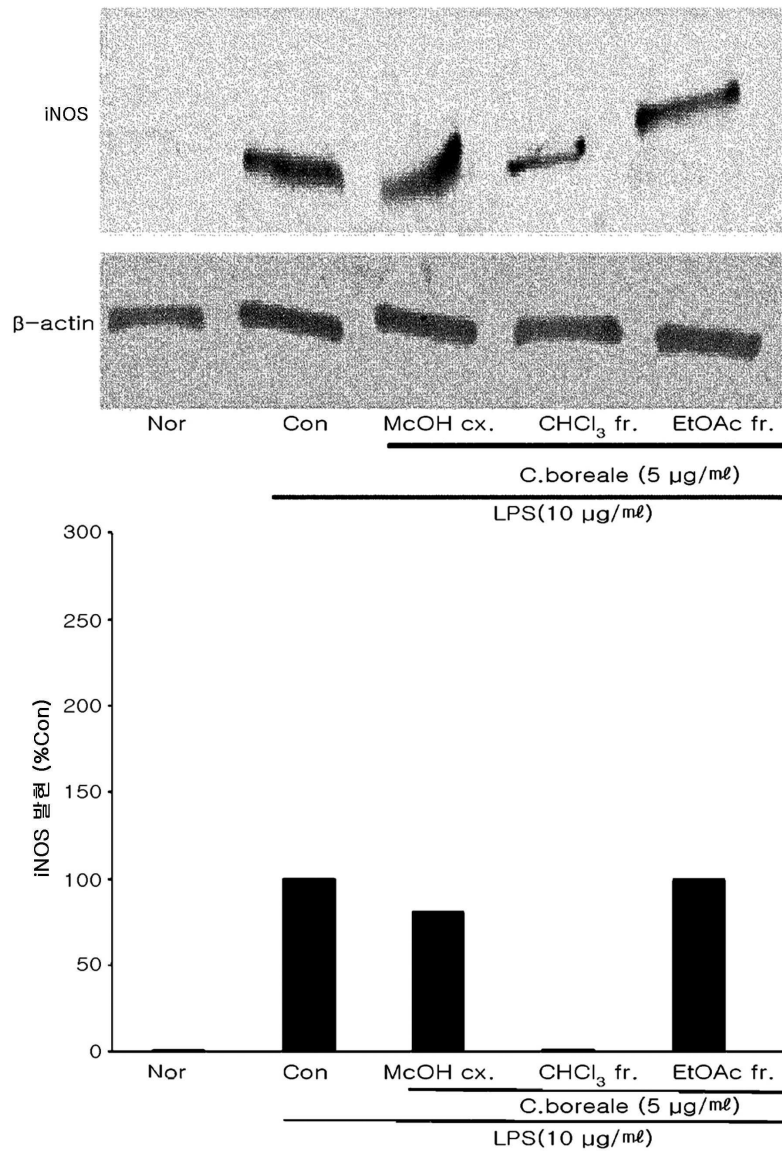
Smear 2%



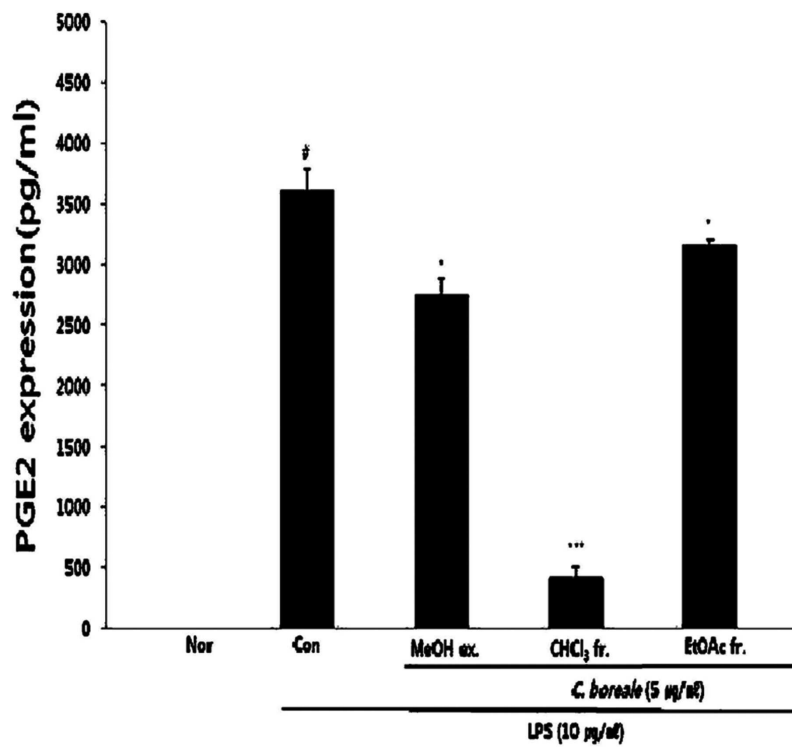
도면15



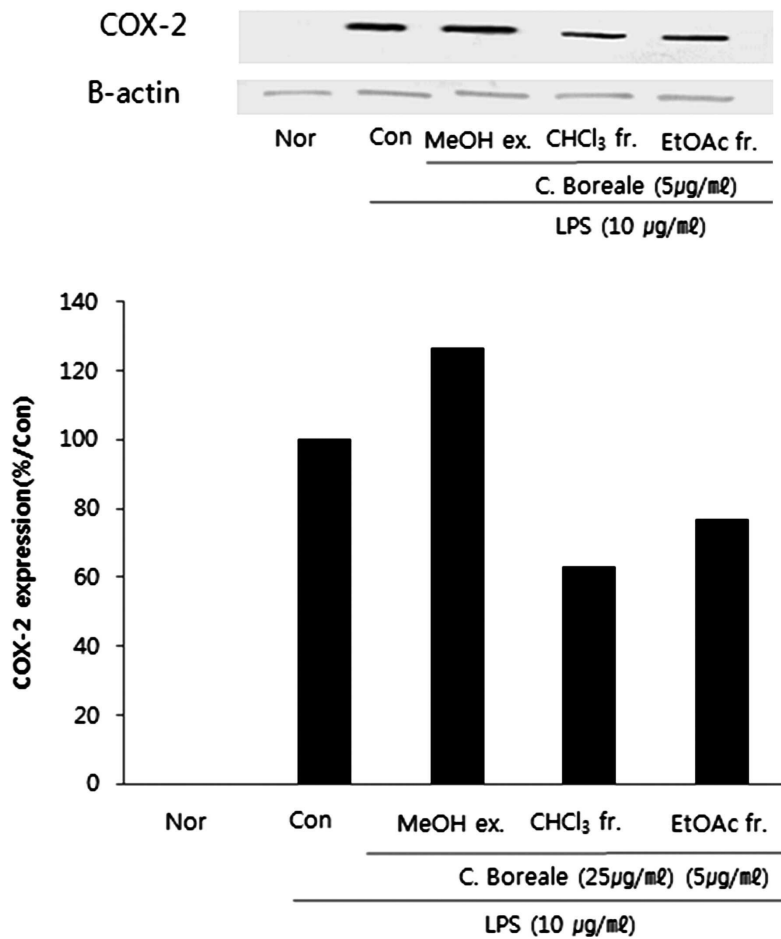
도면16



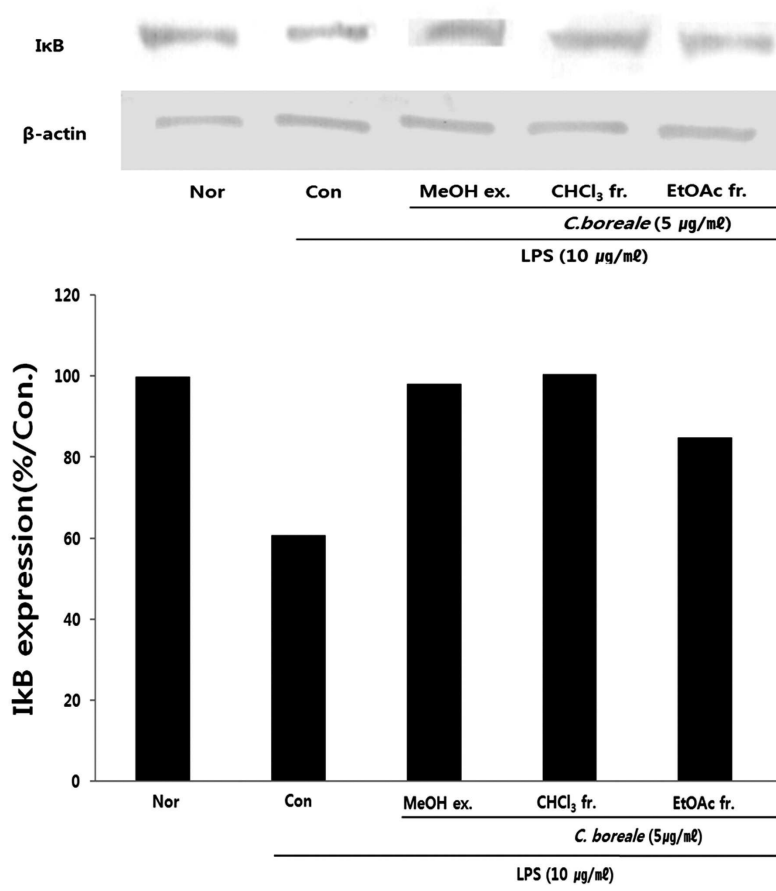
도면17



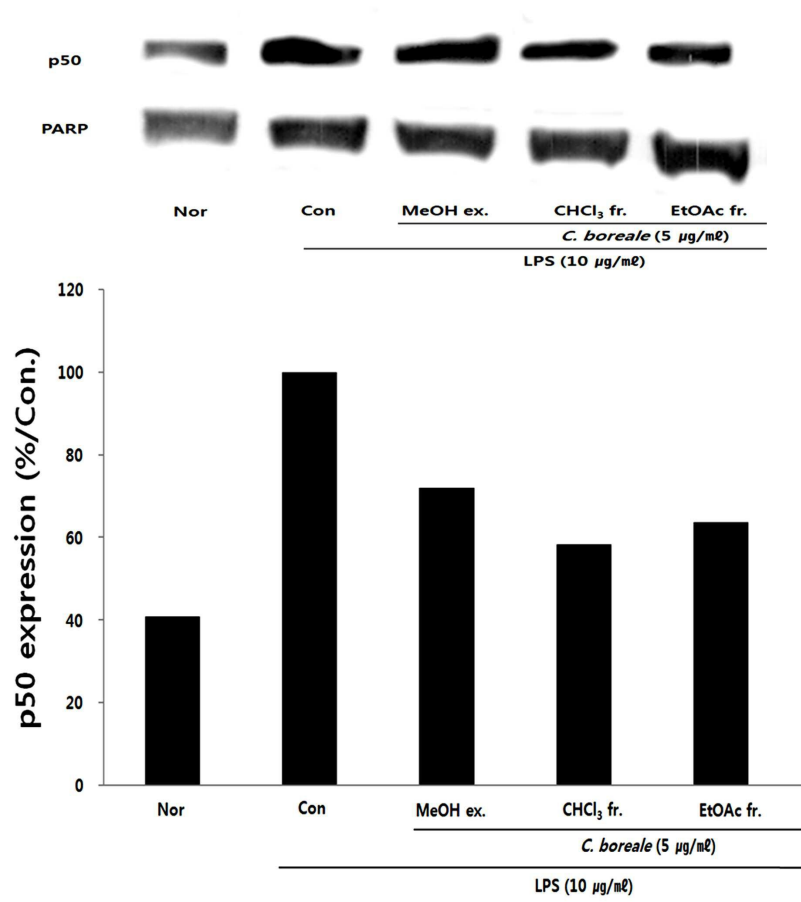
도면18



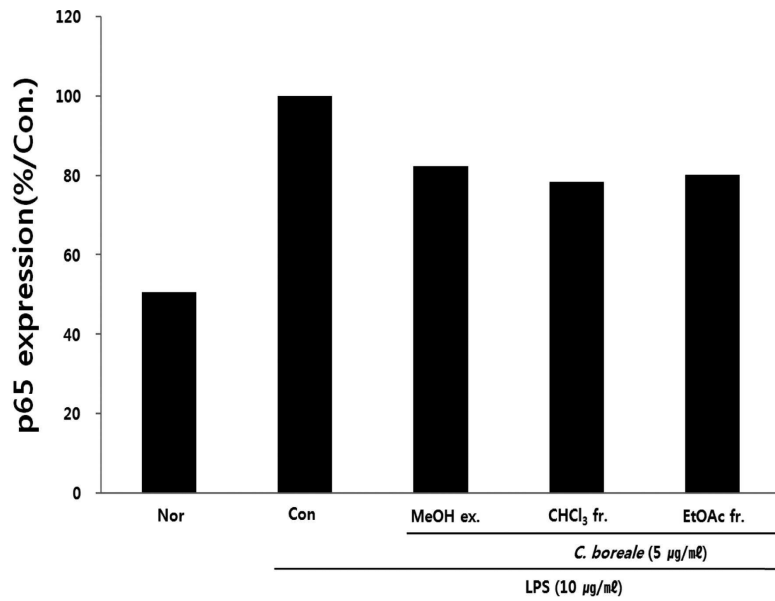
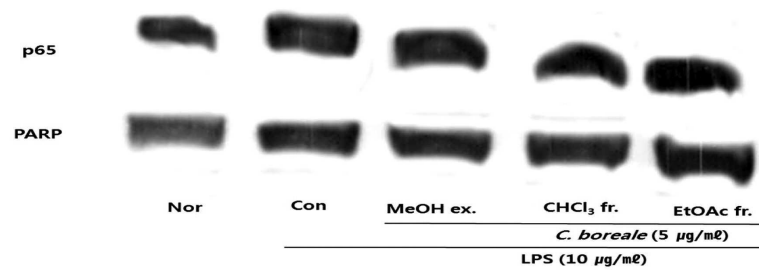
도면19



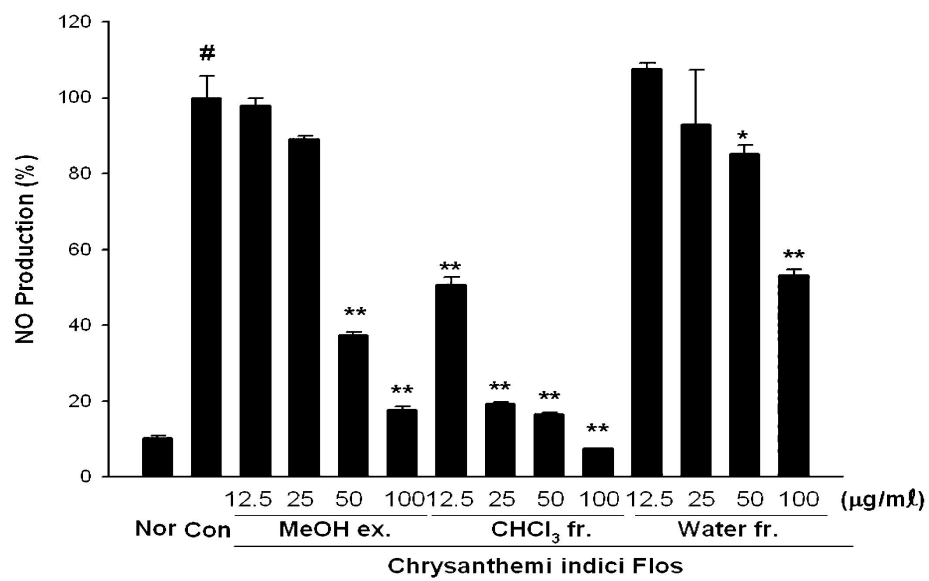
도면20a



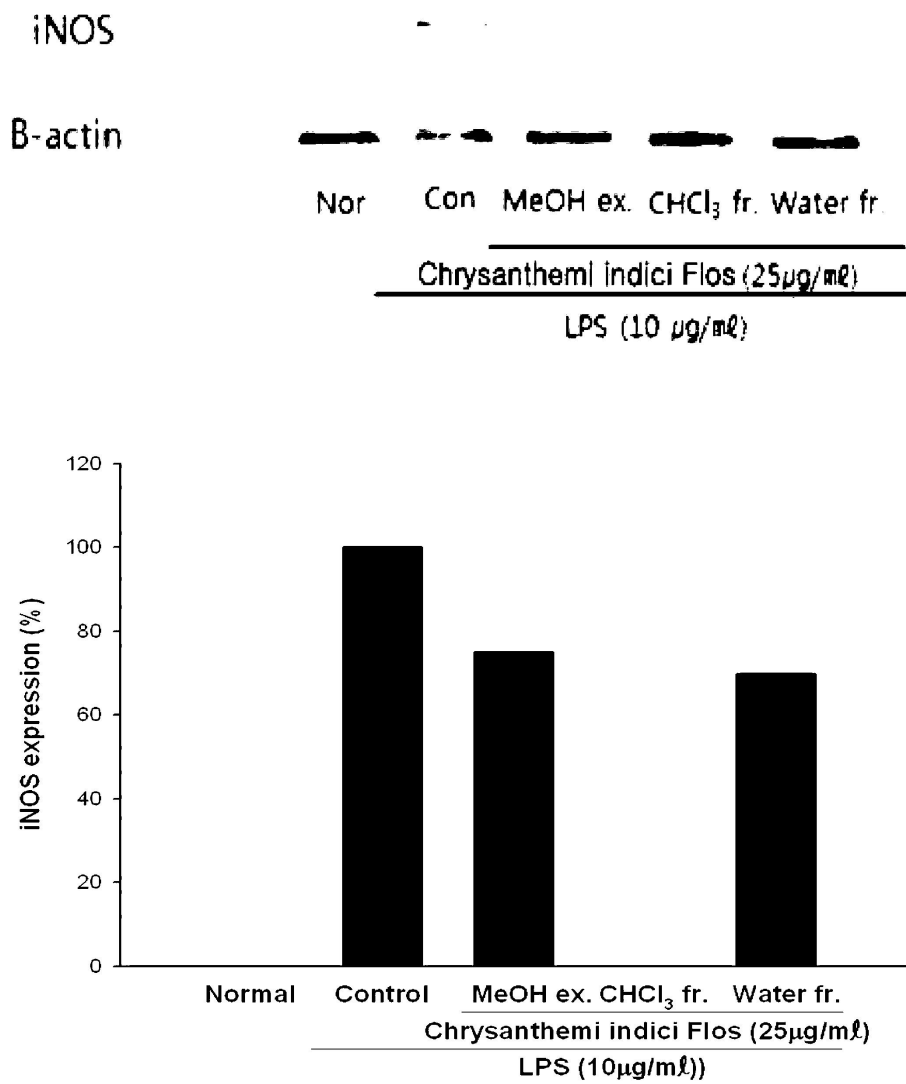
도면20b



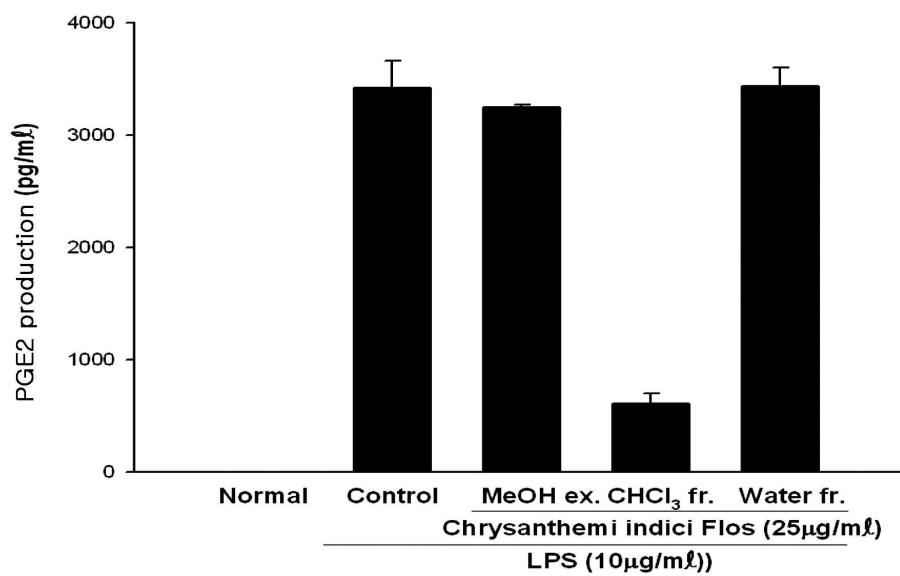
도면21



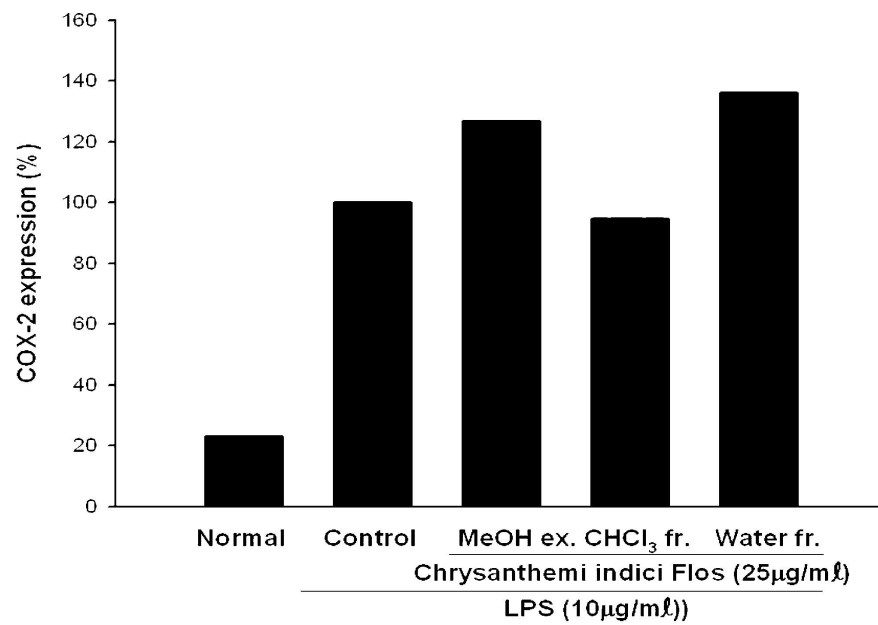
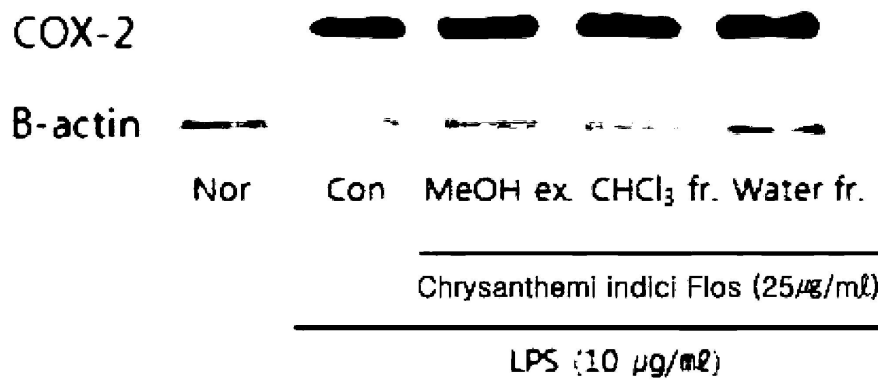
도면22



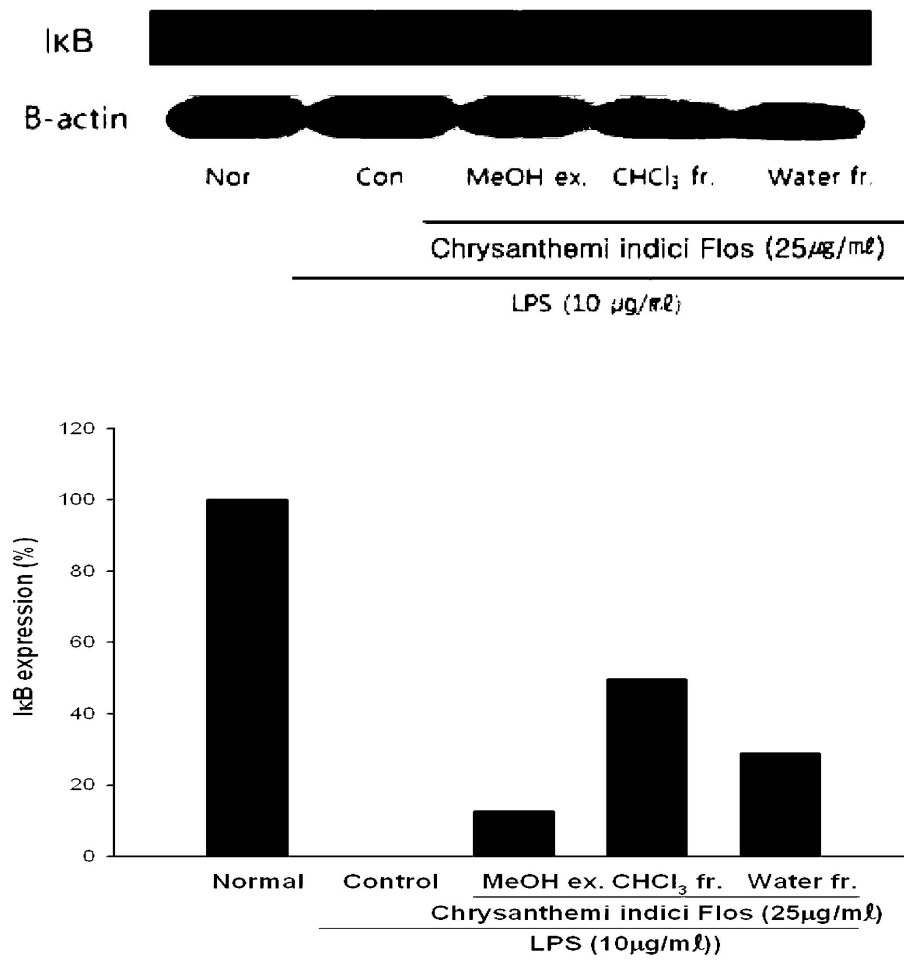
도면23



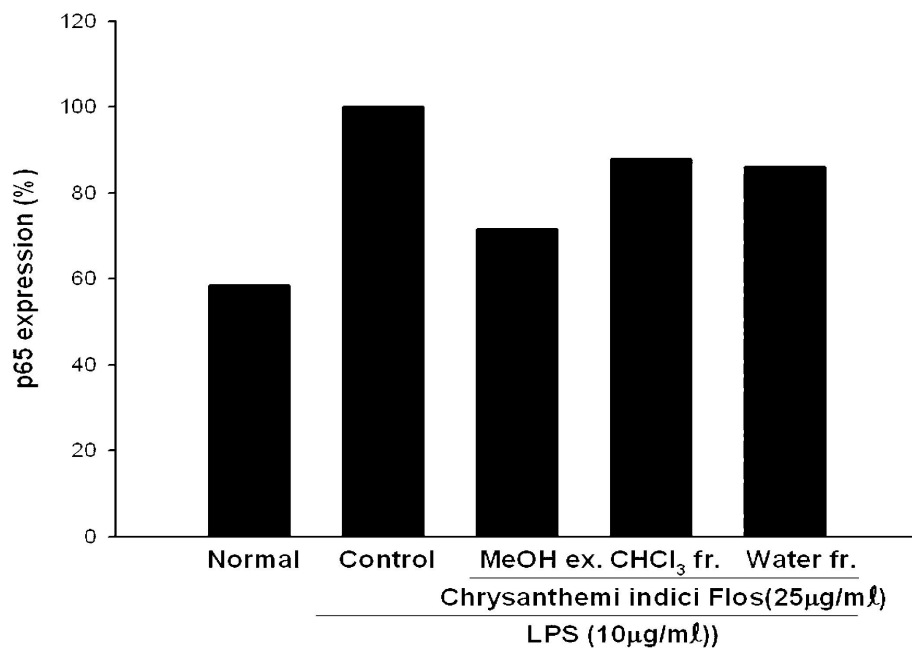
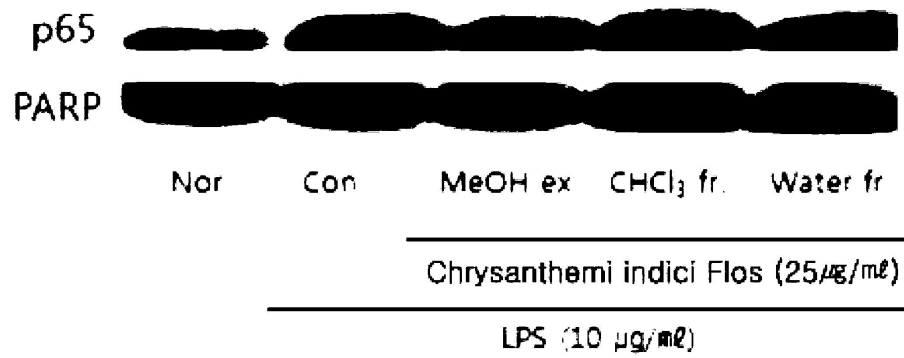
도면24



도면25



도면26



도면27

