(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0118882
(43) 공개일자 2014년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/284 (2006.01) *A61K 36/75* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0035773
(22) 출원일자 2014년03월27일
심사청구일자 2014년03월27일
(30) 우선권주장
1020130034397 2013년03월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
김호철
서울특별시 동대문구 천장산로11길 17, 204동 1103호 (이문동, 이문삼성래미안아파트)
박주연
경기도 남양주시 진건읍 진건오남로 86번길 58, 103동 1202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 8 항

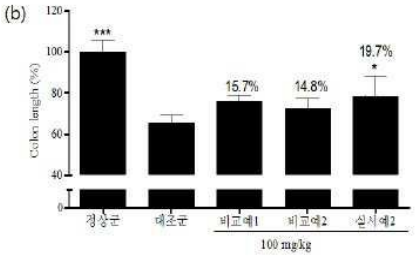
(54) 발명의 명칭 **백출 속 및 탱자를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 백출 및 탱자 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 염증성 장질환에 대한 염증 억제 및 치료 효과를 가짐으로써 염증성 장질환 예방 또는 치료에 우수한 효과를 보인다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이성현

경기도 남양주시 퇴계원면 도제원로 22, 103동 1303호 (성원아파트)

이동헌

서울특별시 양천구 목동서로 38, 114동 403호 (목동, 목동신시가지아파트1단지)

특허청구의 범위

청구항 1

백출 및 탱자 혼합추출물을 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 백출 및 탱자 혼합추출물은 백출 추출물과 탱자 추출물의 혼합 추출물인 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 백출 및 탱자 혼합추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합물 중에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것인 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 백출 및 탱자 혼합추출물의 혼합 건조 중량비는 1:2 내지 2:1인 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 백출은 큰꽃삽주(*Atractylodes macrocephala*)인 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 탱자는 탱자(*Poncirus trifoliata*)인 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 백출 및 탱자 혼합추출물을 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 80 중량% 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

백출 및 탱자 혼합추출물을 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 백출 및 탱자를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 백출은 비위(脾胃)의 기능이 허약해서 소식하거나 권태감이 생기고 얼굴빛이 황색이며 대변을 묽게 보거나 설사를 하는 사람에게 좋으며 수분이 정체되어 전신이 붓고 소화가 안 될 때 수분 배설을 돕는다. 비(脾)에 수(水)와 습(濕)이 쌓여 담음(痰飮)을 인한 가슴 뛰, 기침, 맑은 가래 등에도 쓰며, 비기(脾氣) 허약으로 피부에 땀이 저절로 날 때, 임신 구토에도 사용한다. 위장 장애가 있는 감기, 사지동통에도 쓴다. 약리적으로 생쥐의 체중 증가와 지구력 증가, 탐식 능력을 증가, 세포 면역 기능 촉진이 보고되었다. 또한 장관(腸管) 억제 작용과 흥분 작용을 조절, 항궤양 및 간 기능 보호 작용, 면역 기능 항진작용, 혈관 확장 작용, 이뇨 작용 및 혈당 강하 작용, 항암 작용 등이 보고되었다.

[0003] 탱자는 탱자나무 열매로 겉은 녹색, 속은 백색을 띠며 독특한 향기를 가진다. 탱자가 덜 익었을 때 두세 조각으로 잘라서 말린 것을 지실(枳實)이라 하고, 껍질만 말린 것을 지각(枳殼)이라 하며 한방에서 약재로 이용한다. 지실은 습진 치료제로 쓰고, 지각은 설사 치료제와 관장에 사용한다. 이밖에 건위제나 소화불량·자궁하수·내

장이완 등에도 사용한다. 꽃에는 리모넨(limonen)·리나룰(linalool) 등의 정유가 함유되어 있고, 열매에는 나린긴(naringin)·폰시린(poncirin) 등의 정유가 들어 있다

[0004] 장질환의 종류에는 여러 가지가 있다. 예를 들어, 기능적 장애에 의한 질환으로 여겨지고 있는 과민성 대장 증후군(irritable bowel syndrome)은 대장 내시경이나 엑스선 검사로 원인이 되는 기질적 질환이 확인되지 않지만 식사나 가벼운 스트레스 후 복통, 복부 팽만감과 같은 불쾌한 소화기 증상이 반복되며, 설사 혹은 변비 등의 배변장애 증상을 가져오는 만성적인 질환이다. 질환의 약물 치료를 위해서는 일반적으로 진경제, 완하제 및 약간의 신경안정제 등이 사용되고 있다.

[0005] 한편, 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 궤양성 대장염·크론병·베체트병 등의 질환을 포함하는 질환으로, 염증 세포의 활성화가 중요한 병인인 것으로 알려져 있고 항염증제, 면역 억제제 등으로 염증 세포의 활성화 억제 등을 통한 치료가 필요하다.

[0006] 즉, 장질환이라고 하더라도 그 구체적 병인 등에 따라 치료방법이 달리되어야 하며, 특히 염증성 장질환의 경우 염증 관련 증상에 대한 억제 및 완화 방안의 마련이 질환 치료에 가장 중요한 인자이다.

[0007] 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.

[0008] 침윤되고 활성화된 호중구는 활성산소질소종의 중요한 원인이 되며, 이러한 활성종은 세포독성 물질로서 가교단백질, 지질 및 핵산에 의해 세포성 산화 스트레스를 유도하고 상피성 기능장애 및 손상을 초래한다.

[0009] 염증성 장 질환이 있으면 장관의 점막에서 다양한 염증성 사이토카인들이 분비된다. TNF-α는 궤양성 대장염 환자의 대장 루멘과 대장 상피세포에서 높게 나타나며, 최근 연구에 의하면, TNF-α는 궤양성 대장염의 병인으로 중요한 역할을 한다고 알려졌다. 항-TNF-α 항체인 인플릭시맵(infliximab)은 종기의 치료 뿐 아니라, 기존에 치료되지 않던 크론병의 치료에 효과적이라고 알려졌다. 그러나, 이러한 치료법은 비용이 많이 들고, 일부 환자에게서는 수액 반응 또는 전염성 합병증과 같은 부작용이 야기된다.

[0010] 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.

[0011] 설파살라진은 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.

[0012] 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.

[0013] 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.

[0014] 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.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 한국특허공개공보 제10-2008-0062432호, 2008. 07. 03

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1088004호, 2011. 12. 01

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 백출 및 탱자를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명자들은 염증성 장 질환 예방 및 치료 효과를 가지는 천연물 의약품을 개발하고자 예의 연구한 결과, 백출 및 탱자 혼합추출물이 염증성 장 질환 예방 및 치료에 뛰어난 효과를 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 백출 및 탱자를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 백출 및 탱자 혼합추출물은 염증성 장질환의 염증 반응을 억제함으로써 염증성 장질환의 예방 및 치료 효과를 가진다.

[0020] 백출 및 탱자를 혼합하여 사용하는 것이 백출 추출물 또는 탱자 추출물 각각을 사용하는 것보다 염증 억제 및 치료에 있어 더욱 우수한 효과를 가진다. 즉, 백출 및 탱자 혼합추출물이, 각각의 추출물보다 우수한 염증성 장질환의 예방 및 치료 효과가 있다.

[0021] 본 발명에서 백출은 한국, 중국, 일본 등의 국내외 시장에서 구입하여 사용할 수 있다. 본 발명의 백출은 *Atractylodes japonica*, *Atractylodes macrocephala*, *Atractylodes ovata* 등을 포함하며, 바람직하게는 염증성 장질환에 대한 예방 및 치료 활성이 다른 백출보다 뛰어난 큰꽃삽주(*Atractylodes macrocephala*)이다. *Atractylodes macrocephala*는 탱자와 혼합추출물로 사용될 때 염증성 장질환에 현저한 예방 및 치료 효과를 가진다.

[0022] 본 발명에서 탱자는 한국, 중국, 일본 등의 국내외 시장에서 구입하여 사용할 수 있다. 본 발명의 탱자는 *Poncirus trifoliata*이 바람직하며, *Poncirus trifoliata*는 백출과 혼합추출물로 사용될 때 염증성 장질환에 현저한 예방 및 치료 효과를 가진다.

[0023] 가장 바람직하게는 *Atractylodes macrocephala* 및 *Poncirus trifoliata*의 혼합 추출물이 염증성 장질환에 현저한 예방 및 치료 효과를 가진다.

[0024] 본 발명에서 백출 및 탱자 혼합추출물은 백출 및 탱자를 먼저 혼합한 후 추출한 추출물이거나, 백출 및 탱자를 각각 추출한 후 이를 혼합한 혼합 추출물일 수 있다. 본 발명에서 백출 및 탱자 혼합추출물은 농축된 액상일 수도 있고, 동결건조된 분말형태일 수도 있다.

[0025] 본 발명의 백출 및 탱자 혼합추출물은 백출 또는 탱자의 건조 중량의 1~30배 부피량의 증류수, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜 및 이들의 혼합용매(예를 들어, 함수알코올, 함수글리세린, 함수에틸렌글리콜, 함수프로필렌글리콜, 함수 부틸렌글리콜) 중에서 선택된 용매로 추출될 수 있으며, 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 무수알코올 또는 함수알코올에서 선택된 용매로 추출할 수 있으며, 보다 바람직하게는 물을 사용한다. 백출 또는 탱자 추출물은 30~120℃에서 1~48시간 동안 가열 추출할 수 있으며, 1 내지 5회 반복하여 추출이 가능하다. 마지막으로 추출 용매를 감압농축기로 농축하여 수득될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 백출 및 탱자 혼합추출물은 백출 및 탱자를 혼합한 후 상기 방법으로 제조하여 수득할 수도 있다.

[0027] 또한, 위에서 열거한 추출용매에 공지된 초음파 추출법 등을 이용하여 제조할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 백출 및 탱자 혼합추출물의 혼합 중량비는 다양하게 변할 수 있으나, 건조 중량비로 1:2 내지 2:1로 혼합된 것이 바람직하며, 백출 및 탱자 혼합추출물의 혼합 건조 중량비는 1:1로 혼합된 것이 보다 더 바람직하다.

[0029] 본 발명에서 백출 및 탱자 혼합추출물은 조성물의 총 중량에 대하여 분말형태 또는 액상 형태로 0.1 ~ 80 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0030] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용

가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 백출 및 탱자 혼합추출물 100중량부에 대해 0.1 ~ 90중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 백출 및 탱자 혼합추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calciumcarbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0034] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 백출 및 탱자 혼합추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 200 ㎎/㎏으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량이 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0035] 아울러, 본 발명은 백출 및 탱자 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0036] 본 발명의 백출 및 탱자 혼합추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0037] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 백출 및 탱자 혼합추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 면류, 껌류, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0038] 상기 외에 본 발명의 백출 및 탱자 혼합추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 백출 및 탱자 혼합추출물은 천연과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 백출 및 탱자 혼합추출물을 포함하는 조성물은 염증성 장질환에 있어 염증 억제 효과를 가짐으로써, 염증성 장질환의 예방 또는 치료에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 궤양성 대장염 동물 모델에 백출 및 탱자 혼합 추출물 투여에 따른 대장 길이 변화를 측정한 결과이다.

도 2는 궤양성 대장염 동물 모델에 백출 및 탱자 혼합 추출물 투여에 따른 조직학적 변화를 확인한 결과이다.

도 3은 궤양성 대장염 동물 모델에서 백출 및 탱자 혼합 추출물 투여에 따른 질병 활성 지수를 측정한

결과이다.

도 4는 궤양성 대장염 동물 모델에서 백출 및 탱자 혼합 추출물 투여에 따른 미엘로퍼옥시다아제 활성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0042] **<실시예> 백출 및 탱자 혼합추출물의 제조**

[0043] 백출(*Atractylodes macrocephala*) 50g(원산지:중국, 대우 약업사로부터 구매)에 10배 중량의 물을 넣고 100℃에서 3시간 동안 2회 반복 추출하였다. 상기 추출물의 여과액을 40 brix로 감압농축 후 동결건조하여 분말상태로 백출 추출물 19.4g(수율 38.8%)을 제조하였다.

[0044] 탱자(*Poncirus trifoliata*) 추출물 (원산지:한국, 대우 약업사로부터 구매) 역시 백출과 동일한 방법으로 제조하였으며, 50g의 탱자를 사용하여 13.3g(수율 26.6%)의 탱자 추출물을 제조하였다.

[0045] 제조된 백출 추출물과 탱자 추출물을 하기 표 1과 같은 구성과 중량비가 되도록 혼합하여 혼합 추출물을 제조하였다.

[0046] [표 1]

[0047]

		백출	탱자
실시예	중량(mg)	50	50
	중량비	1	1

[0048] **<비교예 1> 백출 추출물의 제조**

[0049] 백출(*Atractylodes macrocephala*) 50g 에 10배 중량의 물을 넣고 100℃에서 3시간 동안 2회 반복 추출하였다. 상기 추출물의 여과액을 40 brix로 감압농축 후 동결건조하여 분말상태로 백출 추출물 19.4g(수율 38.8%)을 제조하였다.

[0050] **<비교예 2> 탱자 추출물의 제조**

[0051] 탱자(*Poncirus trifoliata*) 50g 에 10배 중량의 물을 넣고 100℃에서 3시간 동안 2회 반복 추출하였다. 상기 추출물의 여과액을 40 brix로 감압농축 후 동결건조하여 분말상태로 탱자 추출물 13.3g(수율 26.6%)을 제조하였다.

[0052] **<실험예 1> 백출 및 탱자 혼합추출물 투여에 따른 장 길이 변화 확인**

[0053] 8주령 웅성 생쥐(C57BL/6, (주) 샘타코 BIO Korea)에 5% Dextran Sulfate Sodium(DSS)의 수용액을 7일간 자유음수시킴으로써 궤양성 대장염을 유발하였다.

[0054] DSS 투여에 따라, 궤양성 대장염을 유발한 후에, 백출 및 탱자 혼합추출물 투여에 따른 염증성 장질환 치료 효과를 확인하였으며, 실험군 및 각 실험군 별 투여 추출물은 하기 표 2와 같이 설정하였다.

[0055] [표 2]

[0056]

실험군	투여 추출물
정상군	2차 증류수 투여
대조군	DSS + 2차 증류수 투여
비교예 1(백출 추출물 투여군)	DSS + <비교예1> 백출 추출물 100mg/kg 투여
비교예 2(탱자 추출물 투여군)	DSS + <비교예2> 탱자 추출물 100mg/kg 투여
실시예 1(혼합추출물 투여군)	DSS + <실시예> 혼합추출물 30mg/kg 투여
실시예 2(혼합추출물 투여군)	DSS + <실시예> 혼합추출물 100mg/kg 투여

[0057] 약물 투여는 1일 2회 경구투여로 7일간 진행하였으며, 마우스의 생존 환경은 온도 22 ± 2℃, 상대습도 50 ± 10%, 명암 싸이클(07:00 점등 - 19:00 소등)로 조절하였다. 모든 실험군을 희생하여 대장의 길이를 측정하여 대장 길이(cm)를 백분율(%)로 환산하여 분석하였다.

[0058] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0059] 도 1은 백출 및 탱자 혼합 추출물 투여에 따른 염증 치료 효과를 보여주는 결과이다. DSS 투여에 따른 염증 반응에 의해 대장 길이가 줄어들게 되는 바, 대장 길이의 변화를 확인함으로써 백출 및 탱자 혼합 추출물의 치료 효과를 확인할 수 있다.

[0060] DSS로 유발된 대조군은 정상군에 비해 조직의 손상으로 인해 대장 길이(%)가 크게 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 이와 함께 백출 및 탱자 혼합 추출물 처리시 회복 효과를 보이는 것을 육안상으로 확인할 수 있었다. 실제 대장 길이 변화를 백분율로 환산한 결과 역시, 백출 및 탱자 혼합추출물 투여군에서 대조군과 대비하여 유의적으로 19.7% (65.5 ± 3.6 % vs 78.4 ± 10.1 %, P<0.01) 증가했으며, 백출 추출물 또는 탱자 추출물 각각을 사용하는 것보다 월등히 우수한 효과를 보였다. 이는 백출 추출물 또는 탱자 추출물 각각을 사용하는 것보다 혼합추출물을 사용하는 것이 염증성 장질환 치료에 효과가 현저함을 보여주는 결과이다.

[0061] **<실험예 2> 백출 및 탱자 혼합추출물 투여에 따른 장의 조직학적 변화 확인**

[0062] 상기 실험예 1에서 취한 대장을 이용하여 대장 조직의 조직 변화를 확인하였다.

[0063] 실험동물을 희생시키고, 결장 조직을 적출하여 PBS로 세척하고 4% 완충 포르말린에 고정시킨 후 에탄올 탈수 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하고, 절편하여 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색 후 현미경으로 관찰하였다.

[0064] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 대조군에서는 상피 점막층 여러 곳에서 선와 부위와 술잔 세포가 파괴되어 대장 조직이 선명하지 않았으나 실시예 1 또는 실시예 2의 백출 및 탱자 혼합 추출물 투여군은 대조군에 비하여 대장의 조직의 구조가 선명하게 나타났으며 정상군의 대장조직과 비슷한 수준의 조직 형태를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0065] **<실험예 3> 백출 및 탱자 혼합추출물 투여에 따른 질병 활성 지수 확인**

[0066] 상기 실험예 1의 궤양성 대장염 모델에서 질병활성 지수를 분석하였다. 질병 활성 지수 (Disease activity index)는 행동, 입모 정도, 설사 및 출혈, 및 대장 적출 후 결장부종을 하기 표 3의 기준과 같이 측정하여 분석하였다. 행동, 입모정도, 설사 및 출혈은 시료투여 7일간 매일 측정하였으며, 대장의 결장 부종은 희생 후 바로 측정하였다.

[0067] **[표 3] 질병 활성 지수**

1. Behavior Test	Score
Motion(---) with hunched(+++)	4
Motion(--) + hunched(++)	3
Motion(-) + hunched(+)	2
Motion(+) + hunched(-)	1
Motion(+)	0
2. Piloerection + pilo color	
Yellow(brown)(+++) + piloerection(+++)	4
Yellow(++) + piloerection(++)	3
Yellow(light)(+) + piloerection(+)	2
White yellow + piloerection(-)	1
Whith(0) + No piloerection(-)	0
3. Cleaning of anus	
Watery Diarrhea(+++) + anal prolapsed +bleeding(+++)	4
Loose feces(++) + bleeding(++)	3
Slightly loose feces(+) + bleeding(+)	2
Bleeding(-)	1
Health state	0
4. Gross anatomy	
Edema(+++, 0.35 mm)	4
Edema(++, 0.3~0.35 mm)	3
Edema(+, 0.25~0.30 mm)	2
Edema(+-, 0.2~0.25mm)	1
Normal(0.1~0.2mm in colon thickness)	0

[0068]

[0069] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 농도 의존적으로 질병 활성 지수가 감소하는 것을 확

인할 수 있었으며, 대조군과 대비하여 실시예 1의 30 mg/kg 또는 실시예 2의 100 mg/kg 투여군에서 각각 2.78 ± 2.31 또는 3.50 ± 1.96으로 유의하게 감소하였다.

[0070] **<실험예 4> 백출 및 탱자 혼합추출물 투여에 따른 미엘로퍼옥시다아제 활성 변화 확인**

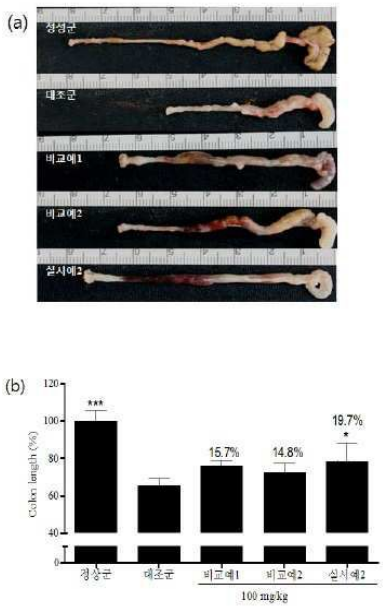
[0071] 다형핵백혈구의 침착정도를 확인하기 위하여 미엘로퍼옥시다아제 활성 변화를 상기 실험예 1에서 적출된 대장 조직을 이용하여 확인하였다.

[0072] 미엘로퍼옥시다아제 활성 측정을 위해 결장 조직을 0.5% 헥사-데실-트리메틸-암모늄브로마이드(hexa-decyl-trimethyl-ammonium bromide,HETAB)를 함유한 50 mM 인산칼륨 완충용액(Potassium phosphate buffer, pH 6.5)에 현탁하여 균질화하고, 동결-해동 및 초음파 처리를 3회 반복한 후 20,000 rpm에서 30 분간 4 ℃에서 원심분리하여 상등액을 얻고, 이를 효소액으로 사용하였다. 제조된 효소액 10㎕을 O-디아니시딘(O-dianisidine) 및 과산화수소(H_2O_2) 함유 190 ㎕의 50 mM의 인산 칼륨 완충 용액(pH 6.0)에 넣고 3분간 반응시킨 후 470nm에서 ELISA microplate reader (SpectraMax Plus384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 흡광도를 측정하였다. 결과는 조직 1 mg 당 미엘로퍼옥시다아제(MPO) unit 으로 나타내었으며, 1 unit은 1 ㎛ol의 과산화수소를 물로 환원시킬 수 있는 활성으로 정의된다.

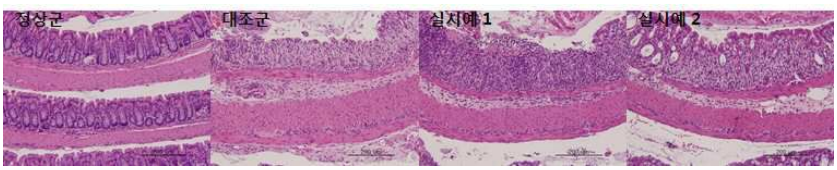
[0073] 본 실험 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 미엘로퍼옥시다아제 활성은 대조군과 대비하여 실시예 1의 30 mg/kg 또는 실시예 2의 100 mg/kg 투여군에서 각각 7.18 ± 4.36 또는 4.41 ± 3.60로 유의하게 감소하였다.

도면

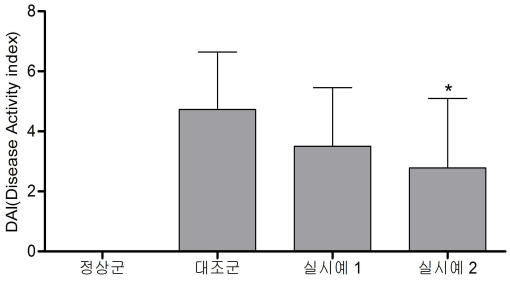
도면1



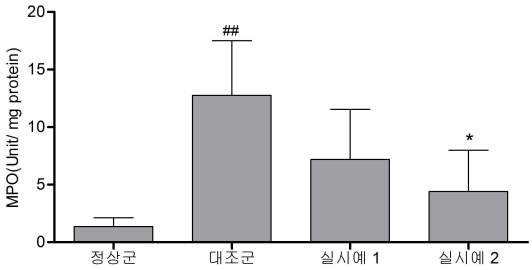
도면2



도면3


DAI(Disease Activity index)
8
6
4
2
0
*
정상군
대조군
실시예 1
실시예 2

도면4


MPO(Unit/ mg protein)
20
15
10
5
0
##
*
정상군
대조군
실시예 1
실시예 2