(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0092119
(43) 공개일자 2020년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/355 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 36/342 (2006.01) *A61K 36/346* (2006.01)
A61K 36/752 (2006.01) *A61K 36/896* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/355 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0009276
(22) 출원일자 2019년01월24일
심사청구일자 2019년01월24일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(주)편강
서울시 서초구 서운로1길 21 (서초동)
(72) 발명자
이충재
서울특별시 서초구 남부순환로 2183 방배래미안타워, 202-601
(74) 대리인
신동인

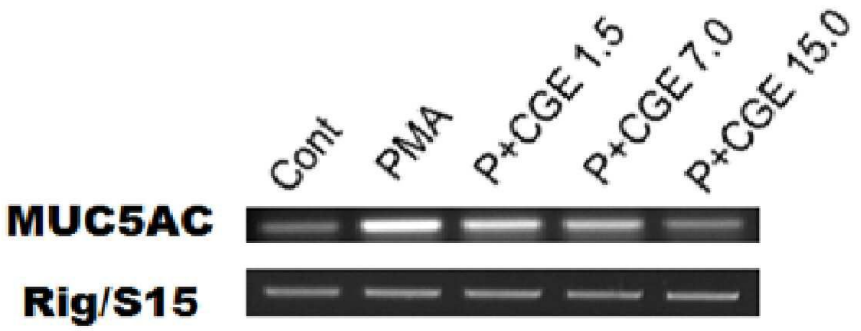
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **생약 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 조합 추출물은 호흡기성 염증 질환 치료 효과 평가실험에서 호흡기 염증 발생 시 과다하게 생성 및 분비되는 뮤신(점액, 객담의 가장 주된 생화학적 구성요소)의 유전자 발현 및 생성 (production)을 억제하였고, 그람음성세균이 함유하는 내독소(endotoxin)에 의해 유발된 호흡기 염증의 지표인 TNF-α의 과다 생성 및 분비를 억제하였고 in vivo 점액 과다분비를 억제하였으며, 이산화황(SO_2)의 흡입으로 유발된 호흡기 염증에 기인한 in vivo 점액 과다분비도 억제하는 강력한 호흡기성 염증 질환 치료효과를 나타냄을 확인함으로써, 호흡기성 염증 질환의 예방 및 치료용 약학조성물, 건강기능식품 및 식품첨가제로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 36/342 (2013.01)
A61K 36/346 (2013.01)
A61K 36/752 (2013.01)
A61K 36/896 (2013.01)
A61P 11/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/314 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 생약 조합은 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약의 중량 배합 조합비가 0.1 내지 20 중량부 (w/w): 0.1 내지 20 중량부 (w/w); 0.1 내지 20 중량부 (w/w); 0.1 내지 20 중량부 (w/w); 1 중량부 (w/w)임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 호흡기성 염증 질환은 천식, 급성 기관지염, 폐렴, 만성 기관지염, 기관지 확장증, 편도선염, 인후염, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 낭포성 섬유증, 또는 폐섬유화증임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 5

금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 생약 조합은 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약의 중량 배합 조합비가 0.1 내지 20 중량부 (w/w): 0.1 내지 20 중량부 (w/w); 0.1 내지 20 중량부 (w/w); 0.1 내지 20 중량부 (w/w); 1 중량부 (w/w)임을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 추출물은 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물임을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 8

제 5항에 있어서,

상기 호흡기성 염증 질환은 천식, 급성 기관지염, 폐렴, 만성 기관지염, 기관지 확장증, 편도선염, 인후염, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 낭포성 섬유증, 또는 폐섬유화증임을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 9

제 5항에 있어서,

상기 건강기능식품은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 티백제, 침출차, 건강 음료의 형태인 건강기능식품.

청구항 10

금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강보조식품.

청구항 11

금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환의 예방 또는 개선용 식품첨가물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CGE 생약 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] [문헌 1]Rogers DF, Barnes PJ. 2006. Treatment of airway mucus hypersecretion. AnnMed 38:116-125.

[0003] [문헌 2]Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus and sputum. 2009. Chest 135:505-512.

[0004] [문헌 3]Li JD, Dohrman AF, Gallup M, Miyata S, Gum JR, Kim YS, Nadel JA, Prince A, Basbaum CB. 1997. Transcriptional activation of mucin by Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Proc Natl Acad Sci USA 94: 967-972.

[0005] [문헌 4]Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, Agusti C, Lausier JA, Ueki IF, Grattan KM, Nadel JA. 1999. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. Proc Natl Acad Sci USA 96: 3081-3086.

[0006] [문헌 5]Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. 2003. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 100:11618-11623.

[0007] [문헌 6]Cohn L, Whittaker L, Niu N, Homer RJ. 2002. Cytokine regulation of mucus production in a model of allergic asthma. Novartis Found Symp 248:201-213.

[0008] [문헌 7]Evans CM, Koo JS. 2009. Airway mucus: the good, the bad, the sticky. Pharmacol Ther 121(3): 332-348.

[0009] [문헌 8]Hewson CA, Edbrooke MR, Johnston SL. 2004. PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells via PKC, EGF/TGF-alpha, Ras/Raf, MEK, REK and Sp1-dependent mechanisms. J Mol Biol 344:683-695.

[0010] [문헌 9]Hong DH, Petrovics G, Anderson WB, Forstner J, Forstner G. 1999. Induction of mucin gene expression in human colonic cell lines by PMA is dependent on PKC-epsilon. Am J Physiol 277:G1041-G1047.

[0011] [문헌 10]Pon DJ, van Staden CJ, Boulet L, Rodger IW. 1994. Hyperplastic effects of aerosolized sodium metabisulfite on rat airway mucus-secretory epithelial cells. Can J Physiol Pharmacol 72(9): 1025-1030.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 호흡기에 존재하는 점액(mucus)의 생리적 기능은 주로 점액성 당단백질 (mucous glycoprotein)인 뮤신(mucin)의 물리화학적 성질 때문인데 뮤신은 분자량 수백만 dalton의 당단백질(glycoprotein)로 그 탄수화물의 구조에 있어 상당한 다양성을 나타낸다(Rogers DF, Barnes PJ. 2006. Treatment of airway mucus hypersecretion. AnnMed 38:116-125). 뮤신은 정상 생리상태에서는 적정한 점도(viscosity)가 유지되어 섬모세포의 운반작용에 의해 배출이 용이하게 되어 있어 기도 및 폐내 이물질 제거, 폐의 윤활작용 등의 중요한 기능을 담당하고 있다(Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus and sputum. 2009. Chest 135:505-512). 섬모는 미세먼지, 화석연료의 연소에 의해 발생되는 대기오염 물질, 자극성 기체의 흡입이나, 감염, 흡연 등의 자극에 의해 그 길이가 단축되기도 하고 섬모운동 자체가 활발하지 못하게 되거나 정지하기도 한다. 배상세포(goblet cell)는 위에 언급한 자극들이나, 천식, 만성 기관지염 등의 질환으로 세포수가 증가하고 분비 점액을 증가시키며 증가된 점액은 객담(sputum)의 형태로 배출된다(Li JD, Dohrman AF, Gallup M, Miyata S, Gum JR, Kim YS, Nadel JA, Prince A, Basbaum CB. 1997. Transcriptional activation of mucin by Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Proc Natl Acad Sci USA 94: 967-972.).

[0013] 이와 같이, 정상 생리상태 혹은 호흡기 임상에서 일반적으로 가벼운 질환의 발생 시에는 기도점액의 생체방어적 역할이 요긴하지만 기도 뮤신의 양 혹은 질의 이상, 예를 들어, 천식, 낭포성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease)과 같은 질환 발생 시 수반되는 극심한 점액의 점도 증가 및 점액의 물리화학적 특성 변화에 기인한 점액전(mucus plug)의 형성은 기도 분비물의 배출을 오히려 방해하며 침착된 분비물에 의한 기관지 폐쇄, 감염 발생 시 배농 장애 등을 유발한다(Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, Agusti C, Lausier JA, Ueki IF, Grattan KM, Nadel JA. 1999. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. Proc Natl Acad Sci USA 96: 3081-3086., Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. 2003. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 100:11618-11623).

[0014] 따라서, 기도점액의 과다분비 혹은 점도의 변화로 큰 고통을 겪게되는 호흡기 질환 환자에 있어서는 기도점액 분비의 조절이 질환으로 인한 고통의 경감과 질환의 치료에 있어 대단히 중요하다(Cohn L, Whittaker L, Niu N, Homer RJ. 2002. Cytokine regulation of mucus production in a model of allergic asthma. Novartis Found Symp 248:201-213.).

[0015] 지금까지, 호흡기 질환의 임상에서 점액분비 및 조절 이상의 치료에는, (1) 점액성 분비물의 점도를 낮추어 분비물의 배출을 용이하게 하는 방법, (2) 분비물의 배출을 더욱 자극하여 분비물을 용이하게 다량 배출시키려는 방법 등이 시도되어 왔으며 점액성 분비물의 점도를 낮추기 위해서는 점액용해제 (mucolytics) 를 사용해 왔으나, 이같은 약물의 사용으로 점액의 점도 감소가 지나칠 경우에는 오히려 점액이 원위 기관지로 흘러 들어가, 기관지 경축(bronchospasm)등으로 기관지 폐쇄가 더욱 악화된다(Evans CM, Koo JS. 2009. Airway mucus: the good, the bad, the sticky. Pharmacol Ther 121(3): 332-348.).

[0016] 또한, 점도 저하 후의 기도점액의 물리적 흡인법은 기도 벽의 자극을 유발하고, 반사기전에 의해 점액 분비를 오히려 자극하게 되며 마취 하에서 그런 방법이 시도된다고 해도 점액의 제거는 피드백 기전(feedback mechanism)을 통해 점액의 생성과 분비를 더욱더 자극하므로 물리적 방법은 점액 과다분비로 고생하는 환자의 치료에 큰 도움이 되지 못했다. 따라서, 현재 호흡기 질환의 임상에서 원칙적으로 권장되는 방법은, 충분한 수분의 섭취를 통해 환자 본인이 기침을 하여 점액(객담)이 잘 배출될 정도로 점도를 조절하는 방법인데 아직 기존 의약품으로는 불가능하다고 보고 있다(Rogers DF, Barnes PJ. 2006. Treatment of airway mucus hypersecretion. AnnMed 38:116-125.).

[0017] 그러나 상기 문헌의 어디에도 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물의 호흡기성 염증질환 치료제로서의 효능이 교시되거나 개시된 바는 없다.

[0018] 인동덩굴 꽃(금은화)은 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동덩굴(Lonicera japonica Thunberg)의 꽃봉오리로서, 꽃에는 루테올린 (luteolin), 이노시톨(inositol), 이소클로로겐산 (isochlrorogenic acid), 클로로겐산 (chlorogenic acid) 등을 함유하며, 항균작용 등이 알려져 있다(정보섭외, 도해 향약대사전, 영림사, p939-940, 1998년).

[0019] 맥문동은 백합과(liliaceae)에 속하는 맥문동 (iriope platyphylla Wang et Tang)의 괴경으로서, 시토스테롤(sitosterol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 스테로이드 사포닌(steroid saponin) 등을 함유하며, 혈당강하 작용, 항균작용 등이 알려져 있다(정보섭외, 도해 향약대사전, 영림사, p177-178, 1998년).

[0020] 사삼은 초롱꽃과 (Campanulaceae)에 속하는 사삼 (Adenophora tryphilla var. japonica Hara)의 뿌리로서, 트리테르페노이드 사포닌 (triterpenoid saponin) 등을 함유하며, 강심작용, 항진경작용, 등이 알려져 있다(정보섭외, 도해 향약대사전, 영림사, p1086-1087, 1998년).

[0021] 길경은 초롱꽃과 (Campanulaceae)에 속하는 도라지 (Platycodum grandiflorum A. DC)의 뿌리로서, 폴리갈라식산(polygalacic acid), 플라티코디게닌(platycodigenin), 플라티코도닌(platycodonin), 이눌린(inulin) 등을 함유하며, 거담작용, 배농작용, 등이 알려져 있다(정보섭외, 도해 향약대사전, 영림사, p1089-1090, 1998년).

[0022] 지실(Ponciri Fructus)은 탱자나무(*Poncirius trifoliata*)의 익지 않은 열매를 말린 것으로, 대부분 반구형이고, 바깥 면은 진한 녹색에서 갈색을 띠며 거칠고 유실(油室)에 의한 오목한 작은 점이 많다. 특이한 냄새가 있고 맛은 쓰며, 방향성 고미건위약에 쓰인다 (한약 규격집 주해서, 한국메디칼인덱스사, p.604, 1988).

[0023] 본원 발명자들은 본 발명의 조합 추출물을 대상으로 호흡기성 염증 질환 치료 효과 평가실험을 시행한 결과, 호흡기 염증 발생 시 과다하게 생성 및 분비되는 뮤신(점액, 객담의 가장 주된 생화학적 구성요소)의 유전자 발현 및 생성 (production)을 억제하였고, 그람음성세균이 함유하는 내독소(endotoxin)에 의해 유발된 호흡기 염증의 지표인 TNF-α의 과다 생성 및 분비를 억제하였고, in vivo 점액 과다분비를 억제하였으며, 이산화황(SO_2)의 흡입으로 유발된 호흡기 염증에 기인한 in vivo 점액 과다분비도 억제하는 강력한 호흡기성 염증 질환 치료효과를 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

과제의 해결 수단

[0024] 따라서 본 발명의 목적은 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 포함하는 호흡기성 염증 질환 예방 및 치료용 약학조성물, 건강기능식품 및 식품첨가제를 제공하는데 있다.

[0025] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0026] 본원에서 정의되는 생약 조합은 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약의 중량 배합 조합비가 바람직하게는 0.1 내지 20 중량부 (w/w): 0.1 내지 20 중량부 (w/w); 0.1 내지 20 중량부 (w/w); 0.1 내지 20 중량부 (w/w); 1 중량부 (w/w)인 조합, 보다 바람직하게는, 0.5 내지 10 중량부 (w/w): 0.5 내지 10 중량부 (w/w); 0.1 내지 10 중량부 (w/w); 0.1 내지 10 중량부 (w/w); 1 중량부 (w/w), 보다 더 바람직하게는, 1 내지 8 중량부 (w/w): 1 내지 8 중량부 (w/w); 1 내지 8 중량부 (w/w); 1 내지 8 중량부 (w/w); 1 중량부 (w/w)로 배합된 생약 조합을 포함한다.

[0027] 본원에서 정의되는 추출물은 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물, 주정, 에탄올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 10 내지 90% 에탄올 또는 주정, 보다 바람직하게는 물 또는 10 내지 50% 에탄올 또는 주정에 가용한 추출물을 포함한다.

[0028] 본원에서 정의되는 “호흡기성 염증 질환”은 천식, 급성 기관지염, 폐렴, 만성 기관지염, 기관지 확장증, 편도선염, 인후염, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 낭포성 섬유증, 폐섬유화증, 바람직하게는, 천식, 낭포성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 보다 바람직하게는, 미세먼지로 기인한 천식, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease)을 포함한다.

[0029] 이하, 본 발명의 생약 추출물을 수득하는 방법을 상세히 설명한다.

[0030] 먼저, 건조 상태의 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 배합된 생약 조합에 추출용매로서 정제수를 포함한 물, C_1 내지 C_4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 10 내지 90% 에탄올, 보다 바람직하게는 물 또는 10 내지 50% 에탄올을 시료 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 10 내지 14배 부피 양(w/v)을 넣어, 20 내지 160℃, 바람직하게는 80 내지 120℃에서 약 1 시간 내지 48시간, 바람직하게는 2시간 내지 24시간 동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 가열추출 등, 바람직하게는 환류냉각 추출법으로 추출하고, 동결건조 및 분쇄하여 본 발명의 조합 추출물을 얻을 수 있다.

[0031] 따라서 본 발명은 상기 제조방법으로 얻어진 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무,알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물 및 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 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, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다.

[0033] 상기한 제제에는 비수성용제, 현탁제로는 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, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 추출물을 포함하는 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 정제물을 포함하는 약학조성물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(Intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0037] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0038] 본 발명의 목적 질환의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 정제물을 0.01 내지 95%, 바람직하게는 1 내지 80% 중량백분율로 포함한다.

[0039] 또한, 목적 질환의 예방 또는 개선을 위한 목적으로 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등의 약학 투여형태 또는 티백제, 침출차, 건강 음료 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.

[0040] 또한, 본 발명은 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강보조식품을 제공한다.

[0041] 또한, 본 발명은 금은화, 맥문동, 사삼, 길경 및 지실로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기성 염증 질환의 예방 또는 개선용 식품 또는 식품첨가물을 제공한다.

[0042] 또한 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안정청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0043] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀롤로오스, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨

가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0044] 본 발명의 추출물이 포함된 기능성 식품으로는 빵, 떡류, 건과류, 캔디류, 초콜릿류, 츄잉껌, 쨈류와 같은 과자류 아이스크림류, 빙과류, 아이스크림 분말류와 같은 아이스크림 제품류 우유류, 저지방 우유류, 유당분해우유, 가공유류, 산양유, 발효유류, 버터유류, 농축유류, 유크림류, 버터유, 자연치즈, 가공치즈, 분유류, 유청류와 같은 유가공품류 식육가공품, 알가공품, 햄버거와 같은 식육제품류 어묵, 햄, 소세지, 베이컨 등의 어육가공품과 같은 어육제품류 라면류, 건면류, 생면류, 유탕면류, 호화건면류, 개량숙면류, 냉동면류, 파스타류와 같은 면류 과실음료, 채소류음료, 탄산음료, 두유류, 요구르트 등의 유산균음료, 혼합음료와 같은 음료 간장, 된장, 고추장, 춘장, 청국장, 혼합장, 식초, 소스류, 토마토케첩, 카레, 드레싱과 같은 조미식품 마가린, 쇼트닝 및 피자를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 정제물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, (예를 들어, 포도당, 과당 등); 디사카라이드, (예를 들어 말토스, 슈크로스 등); 및 폴리사카라이드, (예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등)과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖ 당 일반적으로 약 1~20g, 바람직하게는 약 5~12g 이다.

[0046] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0047] 또한, 본 발명의 추출물은 목적 질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출 정제물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100㎖ 을 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g 의 비율로 가할 수 있다.

[0048] 상기 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 정제물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

발명의 효과

[0049] 본 발명에 따른 조합 추출물은 호흡기성 염증 질환 치료 효과 평가실험에서 호흡기 염증 발생 시 과다하게 생성 및 분비되는 뮤신(점액, 객담의 가장 주된 생화학적 구성요소)의 유전자 발현 및 생성 (production)을 억제하였고, 그람음성세균이 함유하는 내독소(endotoxin)에 의해 유발된 호흡기 염증의 지표인 TNF-α의 과다 생성 및 분비를 억제하였고, in vivo 점액 과다분비를 억제하였으며, 이산화황(SO_2)의 흡입으로 유발된 호흡기 염증에 기인한 in vivo 점액 과다분비도 억제하는 강력한 호흡기성 염증 질환 치료효과를 나타냄을 확인함으로써, 호흡기성 염증 질환의 예방 및 치료용 약학조성물, 건강기능식품 및 식품첨가제로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 시료의 NCI-H292 세포에서의 PMA-유도 MUC5AC 유전자 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (NCI-H292 세포에 다양한 농도의 시료를 30분간 처치하고 24시간 동안 PMA (10ng/㎖)로 자극시켰으며 MUC5AC 유전자 발현을 RT-PCR로 측정하고 정량적 대조군으로서 구조적으로 발현되는 housekeeping gene 중 하나로 small ribosomal subunit protein을 코딩하는 Rig/S15 rRNA를 이용하였고, 3개의 독립적 실험을 수행하고 대표적인 데이터를 표기함; 여기에서 cont: control, concentration unit은 mg/㎖임);

도 2는 시료의 NCI-H292 세포에서의 PMA-유도 MUC5AC 뮤신 생성에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (NCI-H292 세포에 다양한 농도의 시료를 30분간 처치하고 24시간 동안 PMA (10ng/㎖)로 자극시켰으며 ELISA로 MUC5AC 뮤신 생성 정도의 측정을 위하여 세포 용해물을 회수하였고 3개의 독립적 실험을 수행하고 대표적인 데이터를 표기하였고 개개 바(bar)는 대조군을 100 %로 환산했을 때 3개 배양 웰의 평균과 평균의 표준오차 (mean ±S.E.M.)로 표기하였음. * 는 대조군 대비 유의적으로 상이함 ($p<0.05$); + 는 PMA 단독군과 유의적으로 상이함 ($p<0.05$)을

의미함. 여기에서 cont: control, concentration unit은 mg/mℓ임);

도 3은 그람음성세균 유래 엔도톡신(lipopolysaccharides, LPS)에 노출된 흰쥐에서 in vivo TNF-alpha의 생성 및 분비에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (흰쥐를 lipopolysaccharides에 노출시키고 흰쥐로부터 in vivo TNF-alpha의 생성 및 분비량을 측정하였으며, 개개 바(bar)는 5마리의 흰쥐에서의 평균과 평균의 표준오차 (mean ±S.E.M.)로 표기하였음. * 는 대조군 대비 유의적으로 상이함 ($p<0.05$); + 는 LPS 단독군과 유의적으로 상이함 ($p<0.05$)을 의미함. 여기에서 cont: control, Dexa: dexamethasone, LPS: lipopolysaccharides, concentration unit은 mg/kg임)

도 4는 그람음성세균 유래 엔도톡신(lipopolysaccharides, LPS)에 노출된 흰쥐에서 in vivo 기도 뮤신의 생성 및 분비에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (흰쥐를 lipopolysaccharides에 노출시키고 흰쥐로부터 in vivo 뮤신의 생성 및 분비량을 측정하였으며, 개개 바(bar)는 5마리의 흰쥐에서의 평균과 평균의 표준오차 (mean ±S.E.M.)로 표기하였음. * 는 대조군 대비 유의적으로 상이함 ($p<0.05$); + 는 LPS 단독군과 유의적으로 상이함 ($p<0.05$)을 의미함. 여기에서 cont: control, Dexa: dexamethasone, LPS: lipopolysaccharides, concentration unit은 mg/kg임);

도 5는 이산화황에 노출된 흰쥐에서 in vivo 기도 뮤신의 생성 및 분비에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (흰쥐를 이산화황에 노출시키고 흰쥐로부터 in vivo 기도 뮤신의 생성 및 분비량을 측정하였으며, 개개 바(bar)는 5마리의 흰쥐에서의 평균과 평균의 표준오차 (mean ±S.E.M.)로 표기하였음. * 는 대조군 대비 유의적으로 상이함 ($p<0.05$); + 는 이산화황(SO_2) 단독군과 유의적으로 상이함 ($p<0.05$)을 의미함. 여기에서 cont: control, Dexa: dexamethasone, SO_2: sulfur dioxide, concentration unit은 mg/kg임)

도 6은 이산화황에 노출된 흰쥐에서 in vivo 기도 상피 배상세포 내의 점액 함유량 증가 및 배상세포 과다증식에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (흰쥐를 이산화황에 노출시키고 흰쥐에서 기도 상피 배상세포 내의 점액 함유량 증가 및 배상세포 과다증식 정도를 조직병리학적으로 검증하였으며, Hematoxylin-eosin 및 Periodic Acid Schiff (PAS)-Alcian Blue staining을 실시한 후 200 X배 배율로 관찰, 사진 촬영한 결과임. Dark purple - black 으로 나타난 부분이 뮤신을 의미함)

도 7은 시료의 경구 투여후 흰쥐의 체중 증가에 미치는 영향을 나타낸 도이다 (시료를 2주간 투여하고 대조군 및 시료 투여군의 체중을 측정하고 개개 바(bar)는 5마리 흰쥐에서의 평균과 평균의 표준오차 (mean ±S.E.M.)로 표기하였음.

도 8은 시료의 경구 투여후 흰쥐의 혈중 GOT 및 GPT 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다 (시료를 2주간 투여하고 대조군 및 시료 투여군의 혈중 GOT 및 GPT 활성을 측정하고 개개 바(bar)는 5마리 흰쥐에서의 평균과 평균의 표준오차 (mean ±S.E.M.)로 표기하였음.

도 9는 시료의 경구투여후 흰쥐의 혈중 BUN 및 creatinine 농도에 미치는 영향을 나타낸 도이다 (시료를 2주간 투여하고 대조군 및 시료 투여군의 혈중 BUN 및 creatinine 농도를 측정하고 개개 바(bar)는 5마리 흰쥐에서의 평균과 평균의 표준오차 (mean ±S.E.M.)로 표기하였음.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 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.

[0052] 실시예 1. 조합 추출물 (CGE) 의 제조

[0053] 경동 한약방(대한민국 대전)에서 구매하여 경희대학교 약학대학 표본실에 보관중인 건조된 (1) 맥문동 (Liriope platyphylla Wang et Tang, Liliaceae, KHU- OPS 2017-21) 10g (2) 사삼 (Adenophora tryphilla var. japonica Hara, Campanulaceae, KHU-OPS 2017-22) 40g (3) 길경 (Platycodum grandiflorum A. DC), Campanulaceae,, KHUOPS 2017-23) 40g (4) 지실 (*Poncirius trifoliata*, KHUOPS 2017-24) 60g (5) 금은화 (Lonicera japonica Thunberg, Caprifoliaceae, KHUOPS 2017-25) 10g로 배합한 조합 생약 160g을 두 번 증류한 탈이온수에 1,600mℓ로 100 ℃에서 3시간 동안 추출하고 여과하여 여과액을 얻었다. 이 여과액을 회전식 진공 증발건조기(Eyela, Freeze Dryer FDU-540)에서 감압 농축하여 동결건조하여 건조상태의 조합예 추출물 32g을 얻어 -70 ℃에서 보관하였다(수율: 20%). 이를 하기 실험예에 시료로 사용하였다 (이하, "CGE"라 함, 수득율: 20%).

[0055] 실험예 1: 세포주 실험을 이용한 기도점액(뮤신) 생성 및 유전자 발현 억제 활성실험

[0056] 상기 실시예에서 수득한 시료들의 세포주 실험을 이용한 기도점액(뮤신) 생성 및 유전자 발현 억제 활성을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Hewson CA, Edbrooke MR, Johnston SL. 2004. PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells via PKC, EGF/TGF-alpha, Ras/Raf, MEK, REK and Sp1-dependent mechanisms. J Mol Biol 344:683-695; Hong DH, Petrovics G, Anderson WB, Forstner J, Forstner G. 1999. Induction of mucin gene expression in human colonic cell lines by PMA is dependent on PKC-epsilon. Am J Physiol 277:G1041-G1047).

[0058] 1-1. NCI-H292 세포 배양 및 CGE의 처리

[0059] 24시간의 CGE 처리(투여) 기간 동안, CGE가 인간 기도 상피세포인 NCI-H292 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신의 생성 및 유전자(mRNA)의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 NCI-H292 세포를 문헌에 기재된 방법으로 하기와 같이 배양하였다.

[0060] 인간 기도 상피세포인 NCI-H292 세포(ATCC, Manassas, VA, U.S.A.)는 습도가 충분히 유지되며 95% 공기, 5% CO_2를 함유하는 37℃ 조건에서 HEPES (25mM), penicillin G (100U/㎖), streptomycin (100㎍/㎖), FBS (10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A., 이하 배양액으로 약칭) 에서 배양되었는데, 1주에 2회의 빈도로 계대배양(subculture) 하였다.

[0061] 뮤신 생성 및 그 유전자 발현에 대한 약물의 작용을 검증하기 위하여, 뮤신 생성량 검증을 위해서는 24 웰 배양 플레이트(well culture plate)를 기준으로 웰(well) 당 2.0 x 104 cells/well 의 밀도로, 뮤신 유전자 발현 정도의 검증을 위해서는 6 웰 배양 플레이트(well culture plate)를 기준으로 웰(well) 당 5.0 x 104 cells/well 의 밀도로 각각 세포를 도포하고 배양하였다. 세포가 다 자라면, FBS의 농도를 0.2%로 감소시킨 배양액을 주고 24 시간 동안 배양하고, 이후, 혈청(serum)을 첨가하지 않은 배양액 (serum-free medium)으로 세포를 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에 다양한 농도의 CGE를 함유하는 배양액 200㎕를 웰(well) (24 well plate 기준) 마다 가하고, 30분이 지난 시점에 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 10 ng/ml을 각 웰(well)마다 투여한 후 37℃에서 24 시간동안 배양하였다.

[0063] 1-2. NCI-H292 세포에서의 MUC5AC 뮤신 생성량 측정

[0064] 24 시간의 배양이 종료된 시점에 세포 용해용 완충액(20mM Tris, 0.5% NP-40, 250mM NaCl, 3mM EDTA, 3mM EGTA, protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 을 가하여 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신을 추출한 후 이후의 실험에 사용하였다. 즉, 수거된 세포 용해 추출액 (cell lysate) 을 PBS로 1/10 배 희석하고 희석된 각 시료(sample)를 ELISA 전용의 96-well plate 에 각각 100㎕ 씩 분포시킨 후, 42℃에서 완전히 건조될 때까지 배양(incubation)하였다. 그 후 PBS-Tween 20 (0.05%, PBS-T) 용액 200㎕/well 을 이용, 각 웰(well) 당 3회씩 세척하였다. 세척 후 PBS-T 에 용해된 2% BSA 용액 200㎕ 를 각 well 당 가하고, 다시 1시간 동안 배양하였다. 1시간 후 PBS-T 200㎕ 로 3회 세척하고 MUC5AC에 대한 단일클론 항체(monoclonal antibody)인 mouse anti-MUC5AC clone 45M1 (NeoMarkers, CA, U.S.A.)를 2% BSA에 1: 200 의 비율로 희석한 후에 각 웰(well)당 100㎕ 씩 첨가하고 1시간 동안 배양(incubation)하였다. 1시간 후 PBS-T 로 3회 세척하고, 2차 항체인 Horse radish peroxidase (HRP)-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate (Calbiochem, Carlsbad, CA, U.S.A.) 를 2% BSA에 1: 3,000의 비율로 희석한 후, 각 웰(well)당 100㎕씩 첨가하고 1시간 동안 배양(incubation) 하였다.

[0065] PBS-T로 다시 3회 세척 후, 3,3',5,5'- tetramethyl-benzidine peroxide (TMB) 용액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 100㎕ 를 각 well 에 첨가하고, 5분 후 1N H_2SO_4 50㎕ 를 첨가, 반응을 정지시켰다. 450nm 에서 각 well 의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 약물 처리군 간의 MUC5AC 를 정량, 비교하였다.

[0067] 통계처리

[0068] 모든 측정 결과는 Mean±으로 환산한 후, 약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타내었다. 통계 처리는 One-way ANOVA로 하고 post-hoc test는 Holm-Sidak test로 하며, $p<0.05$인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0070] 1-3.실험 결과

[0071] 1-3-1. NCI-H292 세포에서 PMA로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 CGE의 영향

[0072] CGE는 24 시간의 처리 기간 동안 PMA로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 감소시키는 경향을 보여주었다 (도 1).

[0074] 1-3-2. CGE가 인간 호흡기 상피세포 (NCI-H292세포)에서 PMA로 자극된 MUC5AC 뮤신 과다생성에 미치는 영향

[0075] 상기 실험 결과, CGE는 PMA로 자극된 뮤신 과다생성을 152 % 저해율 (최고 처리농도 기준)로 억제하였다 (도 2 및 표 1 참조).

표 1

[0076] 뮤신 과다생성 억제효과

	뮤신함량의 평균	뮤신함량의 표준 오차	과다생성 저해율(%)
대조군	100	10	
PMA 단독 처리군	254	6	
PMA+CGE 1.5mg/kg	200	15	50
PMA+CGE 7.0	106	7	148
PMA+CGE 15.0	98	8	152

[0078] 1-4. NCI-H292 세포 내에 존재하는 total RNA의 분리

[0079] 24 시간 동안 약물 처리한 세포를 냉각된 PBS 로 2회 세척하였다. 세포에 trypsin-EDTA 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)을 처리하여 배양 용기 바닥으로부터 분리하고, 세포들의 혼합물을 1.5㎖ 용량의 microtube 에 옮겨 원심 분리함으로써 세포들만 수거하였다. 이어서, total RNA를 분리하고자 INTRON biotechnology 사의 Easy-Blue RNA extraction kit (total RNA isolation reagent (INTRON biotechnology, Inc. Kyung-gi-do, Korea) 를 이용해 (0.5㎖/4x10^5 cells) 세포를 lysis 시키고, 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시, microtube 에 chloroform 을 첨가, 15초간 볼텍싱(vortexing) 하고 상온에 2-3분간 방치한 후 4℃, 13,000 rpm (Hanil centrifuge, MICRO 17 R) 에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층 액 400㎕ 를 새 microtube 에 옮겼다. 상층 액에 동량의 isopropanol 을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4℃, 13,000 rpm 에서 10분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다.

[0080] 이 침전물에 diethylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 가 함유된 75% ethanol 을 가하고 4℃, 10,000 rpm 에서 10분간 원심 분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 5분간 대기 중에서 건조시킨 후, 20㎕ 의 RNase-free water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 로 부유시키고, spectrophotometer (Beckman, DU-650) 를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA 의 농도를 측정한 후 실험에 사용하였다 (1.0A260=single strand RNA 40 ㎍/㎖).

[0082] 1-5. PCR (Polymerase Chain Reaction) 을 위한 primer 제조

[0083] PCR에 사용된 primer 는 전문 제조회사인 Genotec (주)(Daejeon, Korea) 에 주문, 합성하였다. NCI-H292 세포에서의 human MUC5AC 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer 의 염기서열은 5'-TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT-3', antisense primer의 염기서열은 5'-CCG AGC TCA GAG GAC ATA TGG G-3' 이었다. 정량적 대조 유전자로

사용된 Rig/S15 유전자 primer의 염기서열은 (sense primer) 5'-TTC CGC AAG TTC ACC TAC C-3' 및 (antisense primer) 5'-CGG GCC GGC CAT GCT TTA CG-3'이었다.(표 2 참조)

표 2

[0085] PCR primer

연번	종류		염기서열	Sequence I.D.
1	human MUC5AC 유전자 합성	sense primer	5'-TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT-3'	1
2		antisense primer	5'-CCG AGC TCA GAG GAC ATA TGG G-3'	2
3	Rig/S15 유전자 primer	sense primer	5'-TTC CGC AAG TTC ACC TAC C-3'	3
4		antisense primer	5'-CGG GCC GGC CAT GCT TTA CG-3'	4

[0087] 1-6. RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

[0088] 수거된 total RNA를 이용, 역전사 반응 (Reverse Transcription) 으로 cDNA 를 만들고, 이를 중합효소 연쇄반응 (PCR) 으로 증폭시켰다. 즉, 얻어진 total RNA 1㎍ 을 75℃ 에서 5분간 가열함으로써 변성(denaturation) 시키고, 이를 얼음에 담가 급냉 시킨 후 RT premix kit (BIONEER Corporation, Daejeon, Korea) 의 사용자 설명서에 따라 역전사 반응을 진행시켰다. MUC5AC 유전자에 대한 PCR 은, 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 2㎕ 를 PCR premix kit 의 사용자 설명서에 따라 진행시켰다. 증폭반응을 위하여, PCR을 40회 실시하였으며, 변성(denaturation)은 94℃ 에서 30초, 아닐링(annealing)은 60℃ 에서 30초, 연장(extension)은 72℃ 에서 30초 간 각각 시행하였다.

[0090] 1-7. 전기영동에 의한 중합효소 연쇄반응 산물의 확인

[0091] RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현 변동 여부를 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10㎕ 를 10×loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 50% glycerol) 와 잘 혼합한 다음, Tris-acetate-EDTA buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 용액 및 1㎍/㎖ 의 ethidium bromide 가 포함된 1.0% agarose gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 에서 전기 영동하였다. Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band 는 자외선 투사기 (ultraviolet transilluminator (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) 를 이용하여 관찰하고, 사진 촬영하였다.

[0093] 1-8. 실험결과

[0094] CGE는 인간 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에서, 호흡기 염증 발생 시 과다하게 생성 및 분비되는 뮤신(점액, 객담의 가장 주된 생화학적 구성요소)의 유전자 발현 및 생성 (production)을 억제하였다.

[0096] 실험예 2: 기관지 염 유도 동물모델을 이용한 호흡기 염증인자 및 기도점액 과다 분비에 대한 억제 활성

[0097] 상기 실시예에서 수득한 시료들의 흰쥐 기관지염 모델에서 호흡기 염증인자 및 기도점액 과다 분비에 대한 억제 활성을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Pon DJ, van Staden CJ, Boulet L, Rodger IW. 1994. Hyperplastic effects of aerosolized sodium metabisulfite on rat airway mucus-secretory epithelial cells. Can J Physiol Pharmacol 72(9): 1025-1030).

[0099] 2-1. 실험 동물

[0100] 병원체에 감염되지 않은 SD 수컷 흰쥐((Pathogen-free male Sprague-Dawrley, SD rat, 몸무게 200~220g,

5주령, Daehan Biolink, Seoul, Korea)를 케이지에 5마리씩 보관하였으며 정제수와 음식은 무제한으로 제공되었다. 생육 온도는 일정하게 22.5℃, 습도는 55%였으며 낮밤주기는 12시간이었다(빛 쏘이는 시간 08:00-20:00). 실험 동물들은 실험 내내 국립 충남대학교의 실험동물관리 및 이용 규칙에 따라 관리되었다.

[0102] 2-2. 실험 설계

[0103] 그람음성 세균의 내독소 흡입에 의한 호흡기 염증성 점액 과다분비 동물모델의 제작 및 CGE의 경구투여

[0104] 흰쥐 체중 kg 당 내독소(lipopolysaccharides from e-coli O111:B4) (List biological laboratories, INC., Campbell, CA, U.S.A.) 를 5mg 씩 1mg/㎖ 농도로 탈이온 이차증류수에 현탁하여 흡입 투여시켰다. CGE가 생약의 복합추출 조성물임을 고려하여 내독소 투여로 호흡기 염증이 유발되기 7일 전부터 총 10일간 CGE를 경구 투여했는데, 체중 70kg 성인이 복용하는 용량을 기준으로 환산된 체중 350g의 흰쥐에의 투여용량을 적절히 산출하여 경구 투여용 주사바늘을 이용하여 투여하였다.

[0106] 2-3. CGE가 내독소 흡입에 의한 흰쥐 호흡기 in vivo 뮤신 분비에 미치는 영향 측정

[0107] 흡입된 내독소가 호흡기에 염증을 유발하는 데 걸리는 기간인 72 시간(만 3일)이 지난 시점에 대조군, 내독소 흡입 투여군, 내독소 흡입 및 CGE 경구 투여군에 배당된 실험동물을 마취한 후 기관지-폐포 세척술(bronchoalveolar lavage, BAL)을 문헌에 기재된 방법에 따라 하기와 같이 시행하였다 (Pon et al., 1994).

[0108] 좌폐로 분지되는 부위를 결찰한 후 기관-기관지를 통하여 우폐 내부까지 5㎖의 멸균 인산완충 생리식염수를 주입하고 5회의 세척 조작을 같은 강도와 시간 간격을 두고 실시한 후 4㎖의 최종 세척액을 수거하였다. 수거된 세척액은 -20℃ 조건에 보관해 두고 즉시 혹은 차후에 점액(뮤신)의 함량을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였고 (구체적 실험방법은 NCI-H292 세포에서의 MUC5AC 뮤신 생성량 측정 항목과 동일함) 대조군, 내독소 흡입 투여군, 내독소 흡입 및 CGE 경구 투여군 간 점액 함량을 비교, 분석하였다. 각 군당 동물의 수효는 최소한 5마리로 하였으며 대조군은 전 실험 기간 동안 내독소에 노출되는 과정 및 CGE 투여 과정만 제외하고 동일한 조건에서 사육되었다.

[0110] 2-4. CGE가 내독소 흡입에 의한 흰쥐 호흡기 염증 지표인 TNF-alpha 생성 및 분비량에 미치는 영향 측정

[0111] 수거된 기관지-폐포 세척액 (BALF, bronchoalveolar lavage fluid)을 PBS로 1/10 배 희석하고 희석된 각 시료를 ELISA 전용의 96-well plate 에 각각 100㎕ 씩 분포시켰다. 그 후 PBS-Tween 20 (0.05%, PBS-T (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 용액 200㎕/well 을 이용, 각 well 당 3회씩 세척하였다. 세척 후 PBS-T 에 용해된 2% BSA 용액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 200㎕ 를 각 well 당 가하고, 다시 1시간 동안 배양(incubation) 하였다. 1시간 후, PBS-T 200㎕ 로 3회 세척하고, TNF-alpha에 대한 단일클론 항체 (monoclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) 를 2% BSA에 1: 1,000 의 비율로 희석한 후에, 각 well당 100㎕ 씩 첨가하고, 1시간 동안 배양하였다. 1시간 후 PBS-T 로 3회 세척하고, 2차 항체인 Horse radish peroxidase (HRP)-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate (Calbiochem, Carlsbad, CA, U.S.A.) 를 2% BSA에 1: 2,000의 비율로 희석한 후, 각 웰(well) 당 100㎕씩 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. PBS-T로 다시 3회 세척 후, 3,3',5,5'- tetramethyl-benzidine peroxide (TMB) 용액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 100㎕ 를 각 웰(well) 에 첨가하고, 5분 후 1N H_2SO_4 50㎕ 를 첨가, 반응을 정지시켰다. 450nm 에서 각 well 의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 CGE 처리군 간의 TNF-alpha를 정량, 비교하였다.

[0113] 2-5. 이산화황 흡입에 의한 호흡기 염증성 점액 과다분비 동물모델의 제작

[0114] 직육면체 형태의 상자(200cm x 60cm x 30cm, 아크릴 수지 재질)의 한 면에 출입구를 설치하고, 그 면을 기준으로 좌우 양 측면에 각각 구멍을 뚫어 직경 10cm의 경질 폴리에틸렌 튜브를 연결하였다. 한쪽 측면의 폴리에틸렌 튜브는 초음파 가습기에 연결하여 아황산가스(이산화황, SO_2)가 공급되도록 하였고 반대쪽은 배기펌프에 연결해 두었다.

[0115] 10% (V/V) 의 Sodium metabisulfite (MBS) 수용액((Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)을 초음파 가습기에

주입하고 스위치를 작동시켰다. 3분 이내에 아크릴 상자의 내부는 이산화황 증기(아황산가스)로 충만하게 되며 아황산가스의 농도는 노출 종료시점까지 130 - 150 ppm 으로 유지되도록 하였다. 무작위로 동물들을 선택하여 대조군, 3주간 아황산가스 노출군, 1주간 아황산가스 노출 후 2주간 CGE 경구 투여 및 아황산가스 노출군으로 구분하고 각 군당 동물의 수효는 최소한 5마리로 하였다. 노출 기간은 1일 3시간, 1주 5일, 총 3주간으로 하였다. 대조군은 전 실험기간 동안 아황산가스에 1일 3시간 노출되는 과정만 제외하고 동일한 조건에서 사육되었다.

[0117] 2-6.이산화황 흡입에 의한 호흡기 염증성 점액 과다분비 모델 흰쥐에 CGE의 경구투여

[0118] 이산화황 1주 처리 후 최종 2주간 이산화황 처리 및 CGE 경구 투여 군에 배당된 실험동물을 대상으로, 체중 70kg 성인이 복용하는 용량을 기준으로 환산된 투여용량을 적절히 산출하여 경구 투여용 주사바늘을 이용하여 투여하였다.

[0119] 즉, 총 3주간의 이산화황 노출 기간 중 마지막 2주간 (총10일) 매일 반복적으로 추출물을 투여하는데 투여는 오전 10시에서 11시 사이에, 이산화황 흡입은 오후 1시에서 4시까지, 각각 실시하였다.

[0121] 2-7.CGE가 이산화황 흡입에 의한 흰쥐 호흡기 in vivo 뮤신 분비 및 배상세포 내 점액 함유량에 미치는 영향 측정

[0122] CGE가 흰쥐 호흡기에서의 in vivo 뮤신 분비 및 배상세포 내 점액 함유량에 미치는 영향을 측정하기 위하여 먼저, 대조군, 이산화황 흡입 투여군, 이산화황 흡입 및 CGE 경구 투여군에 소속된 해당 실험동물을 마취한 후 기관지-폐포 세척술을 시행 하였는데, 좌폐로 분지되는 부위를 결찰한 후 기관-기관지를 통하여 우폐 내부까지 5 ㎖의 멸균 인산완충 생리식염수를 주입하고 5회의 세척 조작을 같은 강도와 시간 간격을 두고 실시한 후 4㎖의 최종 세척액을 수거하였다.

[0123] 수거된 세척액은 -20℃ 조건에 보관해 두고 즉시 혹은 차후에 점액(뮤신)의 함량을 ELISA 방법을 이용하여 측정하고(구체적 실험방법은 NCI-H292 세포에서의 MUC5AC 뮤신 생성량 측정 항목과 동일함), 대조군, 이산화황 흡입 투여군, 이산화황 흡입 및 CGE 경구 투여군 간 점액 함량을 비교, 분석하였다. 동시에, 기관을 분리하여 기관내강 상피세포층에 대한 병리조직학적 검사를 실시하였다.

[0124] 즉, 기관지-폐포 세척술을 시행한 후 기관을 분리하고 냉각된 10% formalin in PBS (pH 7.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 에 넣어 24 시간동안 고정하였다. 고정한 조직을 파라핀으로 포매 (包埋; embedding) 하였다. Microtome (Leica Biosystems Inc., IL, U.S.A.) 을 이용하여 5㎛ 두께로 잘라 조직절편을 제작하였다. 탈 파라핀 과정을 거치고 Hematoxylin-eosin 염색 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 과 Periodic Acid Schiff (PAS) - Alcian Blue (pH 2.5) 염색 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 을 실시한 후 광학현미경 하에서 관찰하고 200 배 배율에서 사진기 (Leica Biosystems Inc., IL, U.S.A.) 로 사진 촬영하였다. 대조군, 이산화황 흡입 투여군, 이산화황 흡입 및 CGE 경구 투여군의 배상세포 내 점액 함유량을 비교함으로써 CGE가 배상세포 내 점액 함유 정도에 미치는 영향을 판정하였다.

[0126] 통계처리

[0127] 모든 측정 결과는 Mean±으로 환산한 후, 약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타내었다. 통계처리는 One-way ANOVA로 하고 post-hoc test는 Holm-Sidak test로 하며, $p<0.05$인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0129] 2-8. 실험 결과

[0130] CGE가 흰쥐에서 내독소 흡입으로 유발된 호흡기 염증의 지표인 TNF-alpha 생성 및 분비에 미치는 영향

[0131] CGE는 내독소 흡입으로 유발된 호흡기 염증의 지표인 TNF-alpha 생성을 억제(감소)하였다. 양성 대조약물인 dexamethasone 0.5mg/kg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 투여군 역시 통계적으로 유의한 감소 현상을 나타내었다(도 3 및 표 3).

표 3

[0132] 내독소 흡입으로 유발된 TNF-alpha 생성 억제효과

	TNF 함량의 평균	TNF 함량의 표준 오차	과다생성 저해율(%)
대조군	100	26	
LPS 단독 처리군	984	106	
LPS+CGE 160 mg/kg	705	92	279
LPS+CGE 320mg/kg	523	87	461
LPS+CGE 800mg/kg	398	132	586
LPS+Dexa	400	101	584

[0134] CGE가 내독소 흡입으로 유발된 염증성 기도 점액 분비에 미치는 영향

[0135] 흰쥐에게 경구 투여 시, CGE는 내독소 흡입으로 유발된 염증성 기도 점액의 분비를 억제(감소)하였다 (도 4 및 표 4).

표 4

[0137] 내독소 흡입으로 유발된 염증성 기도 점액 분비 억제효과

	뮤신함량의 평균	뮤신함량의 표준 오차	과다분비 저해율(%)
대조군	100	8	
LPS 단독 처리군	213	7	
LPS+CGE 160 mg/kg	176	10	37
LPS+CGE 320mg/kg	121	11	92
LPS+CGE 800mg/kg	105	9	108
LPS+Dexa	116	12	97

[0139] CGE가 이산화황 흡입으로 유발된 기도 점액분비에 미치는 영향

[0140] 흰쥐에게 경구 투여 시, CGE는 이산화황 흡입으로 유발된 기도 점액의 분비를 억제(감소)하였다 (도 5 및 표 5).

표 5

[0141] 이산화황 흡입으로 유발된 염증성 기도 점액 분비 억제효과

	뮤신함량의 평균	뮤신함량의 표준 오차	과다분비 저해율(%)
대조군	100	17	
SO_2 단독 처리군	406	36	
SO_2+CGE 160 mg/kg	251	47	155
SO_2+CGE 320mg/kg	216	39	190
SO_2+CGE 800mg/kg	150	28	256
SO_2+Dexa	252	32	154

[0143] CGE가 이산화황 흡입으로 유발된 기도 상피 배상세포 내의 점액 함유량 증가에 미치는 영향

[0144] CGE는 흰쥐에서 이산화황 흡입으로 유발된 기도 상피 배상세포 내의 점액 함유량 증가 및 배상세포 과다증식을 억제(감소)시키는 경향을 보여주었다. 즉, 기도 상피세포층에 Hematoxylin-eosin 염색과 Periodic Acid Schiff

(PAS) - Alcian Blue 염색을 실시한 후 광학 현미경 하에서 관찰해 보면 이산화황에 3주간 노출된 흰쥐의 배상세포 내에 검은 보라색으로 염색된 뮤신(점액)의 양이 증가되어 있음에 비하여, 이산화황 1주 노출 후 2주간 약물 동시 경구 투여군에서는 배상세포 내에 뮤신(점액)의 양이 감소된 것을 알 수 있었다 (도 6).

[0146] 실험예 3: 동물모델을 이용한 독성실험

[0147] 상기 실시예에서 수득한 시료들의 동물모델을 이용한 독성을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Pon DJ, van Staden CJ, Boulet L, Rodger IW. 1994. Hyperplastic effects of aerosolized sodium metabisulfite on rat airway mucus-secretory epithelial cells. Can J Physiol Pharmacol 72(9): 1025-1030).

[0149] 3-1. 실험 동물

[0150] 병원체에 감염되지 않은 SD 수컷 흰쥐((Pathogen-free male Sprague-Dawrley, SD rat, 몸무게 200~220g, 5주령, Daehan Biolink, Seoul, Korea)를 케이지에 5마리씩 보관하였으며 정제수와 음식은 무제한으로 제공되었다. 생육 온도는 일정하게 22.5℃, 습도는 55%였으며 낮밤주기는 12시간이었다(빛 쏘이는 시간 08:00-20:00). 실험 동물들은 실험 내내 국립 충남대학교의 실험동물관리 및 이용 규칙에 따라 관리되었다.

[0152] 3-2. 흰쥐에게 CGE의 경구 투여 시 체중 증가 정도에 미치는 영향

[0153] 2주간의 약물 경구 투여 기간을 포함한 전체 3주간의 실험 기간 동안 각 실험동물의 체중 변화를 측정한 결과, 대조군과 약물 투여군 간에 유의한 차이를 보이지 않음으로써 CGE가 실험동물의 영양 섭취 및 대사 상태에 유의한 독성을 유발하지 않을 가능성을 확인하였다 (도 7).

[0155] 3-3. 흰쥐에게 CGE의 경구 투여 시 간 기능에 미치는 영향

[0156] 간독성의 지표로는 트랜스아미나제인 GOT, GPT의 혈청 중 활성을 선정하였으며, 2주간의 CGE 경구 투여 후 GOT, GPT의 혈청 중 활성을 측정한 결과 대조군과 약물 투여군 간에 유의한 차이를 보이지 않음으로써 CGE가 실험동물에서 간독성을 유발하지 않음을 보여주었다 (도 8).

[0158] 3-4. 흰쥐에게 CGE의 경구 투여 시 신장 기능에 미치는 영향

[0159] 신장독성의 지표로는 Blood Urea Nitrogen (BUN) 및 creatinine의 혈청 중 농도를 선정하였으며, 2주간의 약물 경구 투여 후 Blood Urea Nitrogen (BUN) 및 creatinine의 혈청 중 농도를 측정한 결과, 대조군과 약물 투여군 간에 유의한 차이를 보이지 않음으로써 CGE가 실험동물에서 신장독성도 유발하지 않음을 보여주었다 (도 9).

[0161] 상기 실험 결과,

[0162] 1. CGE는 인간 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에서, 호흡기 염증 발생 시 과다하게 생성 및 분비되는 뮤신(점액, 객담의 가장 주된 생화학적 구성요소)의 유전자 발현 및 생성 (production)을 억제하였다.

[0163] 2. CGE는 흰쥐에서, 그람음성세균이 함유하는 내독소(endotoxin)에 의해 유발된 호흡기 염증의 지표인 TNF-α의 과다 생성 및 분비를 억제하였다.

[0164] 3. CGE는 흰쥐에서, 그람음성세균이 함유하는 내독소(endotoxin)에 의해 유발된 호흡기 염증에 기인한 in vivo 점액 과다분비를 억제하였다.

[0165] 4. CGE는 흰쥐에서, 화석 연료의 연소 후 발생되는 대표적 대기오염물질인 이산화황(SO_2)의 흡입으로 유발된 호흡기 염증에 기인한 in vivo 점액 과다분비도 억제하였다.

[0166] 5. CGE는 흰쥐에서, 약물투여 전 기간 동안 간독성, 신독성을 유발하지 않았으며, 체중 증가에 대해서도 억제적

영향을 미치지 않음으로써, 영양 및 대사과정에 유해한 영향을 주지 않았다.

[0167] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0169] 제제예 1. 산제의 제조

[0170] CGE 추출물 ---------- 20 mg

[0171] 유당 ---------- 100 mg

[0172] 탈크 ---------- 10 mg

[0173] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0175] 제제예 2. 정제의 제조

[0176] CGE 추출물 ---------- 10 mg

[0177] 옥수수전분 ---------- 100 mg

[0178] 유당 ---------- 100 mg

[0179] 스테아린산 마그네슘 ---------- 2 mg

[0180] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0182] 제제예 3. 캡슐제의 제조

[0183] CGE 추출물 ---------- 10 mg

[0184] 결정성 셀룰로오스 ---------- 3 mg

[0185] 락토오스 ---------- 14.8 mg

[0186] 마그네슘 스테아레이트 ---------- 0.2 mg

[0187] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충진하여 캡슐제를 제조한다.

[0189] 제제예 4. 주사제의 제조

[0190] CGE 추출물 ---------- 10 mg

[0191] 만니톨 ---------- 180 mg

[0192] 주사용 멸균 증류수 ---------- 2974 mg

[0193] $Na_2HPO_412H_2O$ ---------- 26 mg

[0194] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0196] 제제예 5. 액제의 제조

[0197] CGE 추출물 ---------- 10 mg

[0198] 이성화당 ---------- 10 g

[0199] 만니톨 ---------- 5 g

[0200] 정제수 ---------- 적량

[0201] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 100 로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0203] 제제예 6. 건강 식품의 제조

[0204] CGE 추출물 ---------- 1000 mg

[0205] 비타민 혼합물 ---------- 적량

[0206] 비타민 A 아세테이트 ---------- 70 ug

[0207] 비타민 E ---------- 1.0 mg

[0208] 비타민 B1 ---------- 0.13 mg

[0209] 비타민 B2 ---------- 0.15 mg

[0210] 비타민 B6 ---------- 0.5 mg

[0211] 비타민 B12 ---------- 0.2 ug

[0212] 비타민 C ---------- 10 mg

[0213] 비오틴 ---------- 10 ug

[0214] 니코틴산아미드 ---------- 1.7 mg

[0215] 엽산 ---------- 50 ug

[0216] 판토텐산 칼슘 ---------- 0.5 mg

[0217] 무기질 혼합물 ---------- 적량

[0218] 황산제1철 ---------- 1.75 mg

[0219] 산화아연 ---------- 0.82 mg

[0220] 탄산마그네슘 ---------- 25.3 mg

[0221] 제1인산칼륨 ---------- 15 mg

[0222] 제2인산칼슘 ---------- 55 mg

[0223] 구연산칼륨 ---------- 90 mg

[0224] 탄산칼슘 ---------- 100 mg

[0225] 염화마그네슘 ---------- 24.8 mg

[0226] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0228] 제제예 7. 건강 음료의 제조

[0229] CGE 추출물 ---------- 1000 mg

[0230] 구연산 ---------- 1000 mg

[0231] 올리고당 ---------- 100 g

[0232] 매실농축액 ---------- 2 g

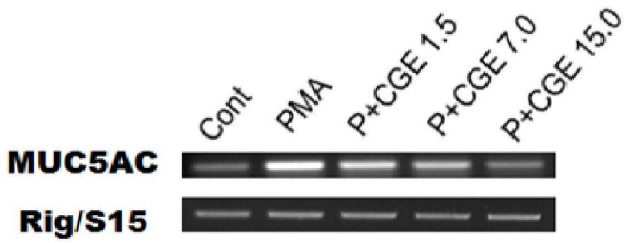
[0233] 타우린 ---------- 1 g

[0234] 정제수를 가하여 ---------- 전체 900 ㎖

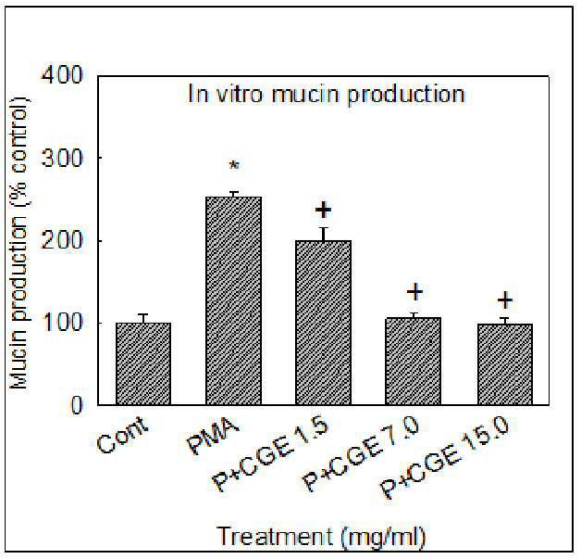
[0235] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

도면

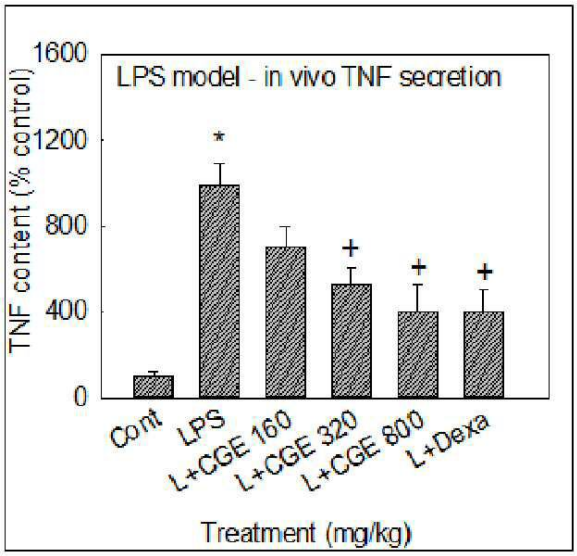
도면1



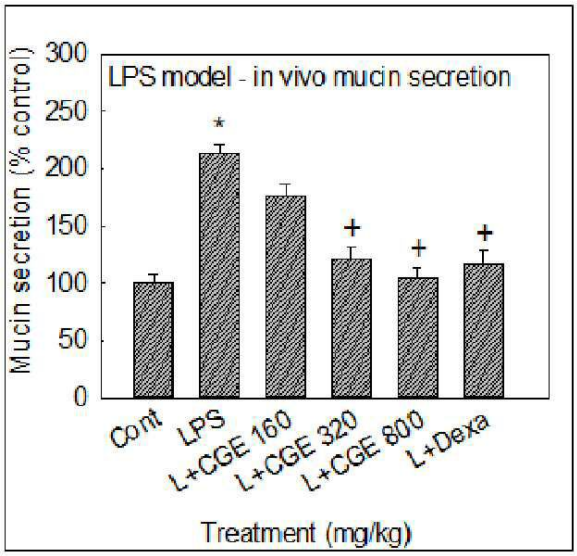
도면2



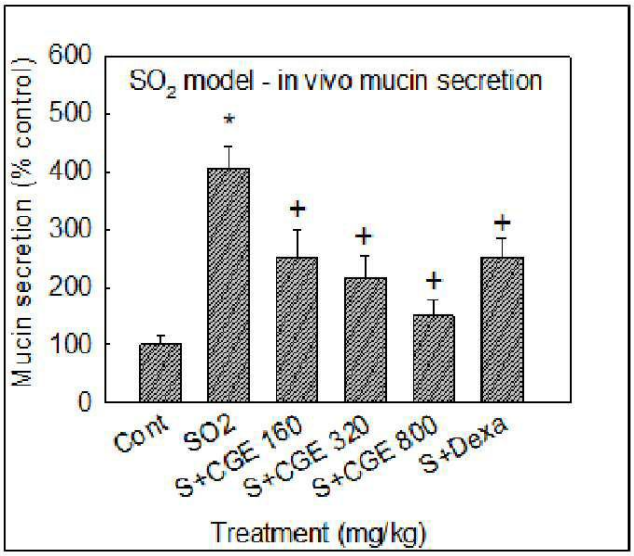
도면3


LPS model - in vivo TNF secretion
TNF content (% control)
1600
1200
800
400
0
*
+
+
+
Cont
LPS
L+CGE 160
L+CGE 320
L+CGE 800
L+Dexa
Treatment (mg/kg)

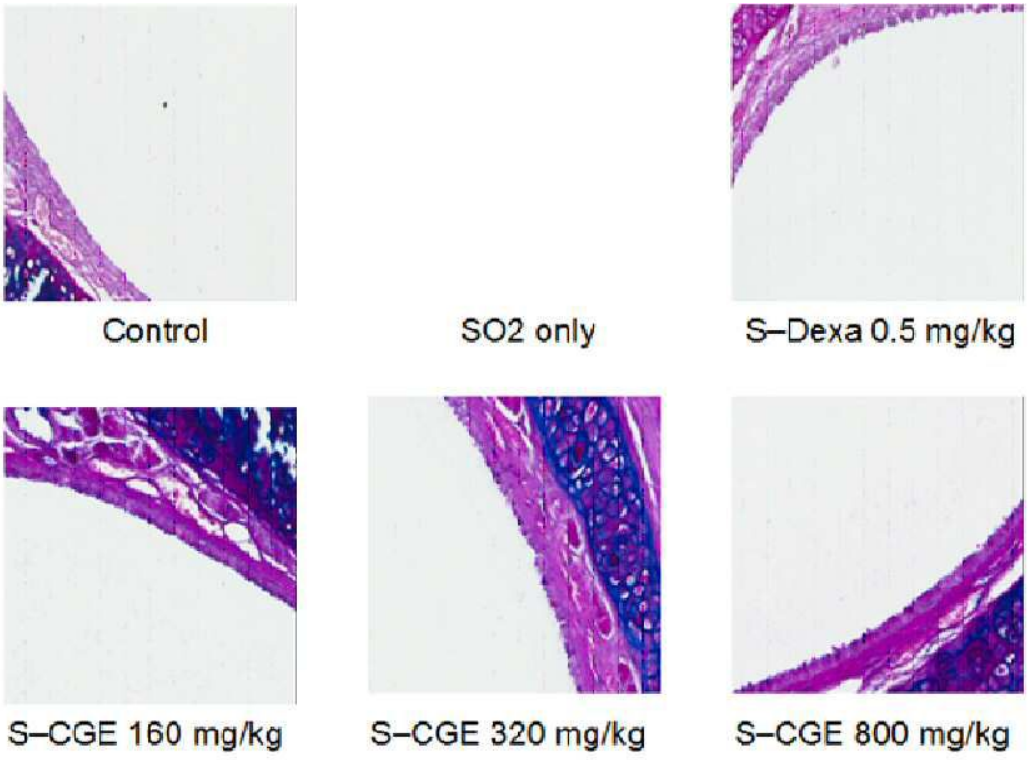
도면4


LPS model - in vivo mucin secretion
Mucin secretion (% control)
300
250
200
150
100
50
0
*
+
+
+
Cont
LPS
L+CGE 160
L+CGE 320
L+CGE 800
L+Dexa
Treatment (mg/kg)

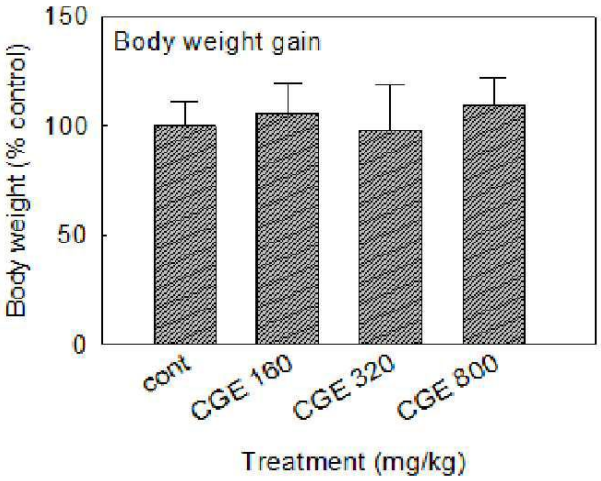
도면5


SO2 model - in vivo mucin secretion
Mucin secretion (% control)
600
500
400
300
200
100
0
*
+
+
+
+
Cont
SO2
S+CGE 160
S+CGE 320
S+CGE 800
S+Dexa
Treatment (mg/kg)

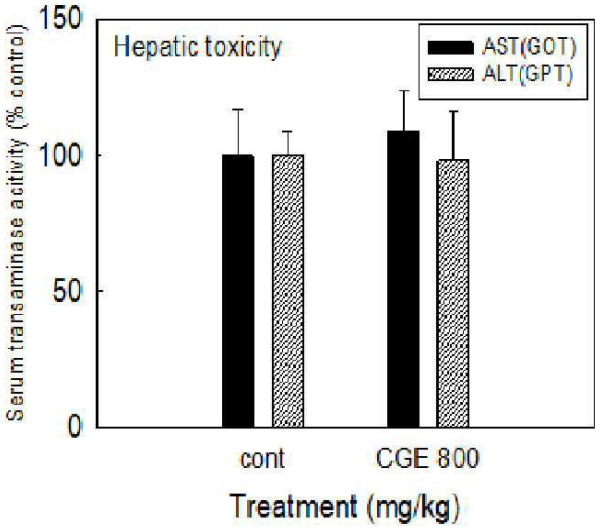
도면6


Control
SO2 only
S–Dexa 0.5 mg/kg
S–CGE 160 mg/kg
S–CGE 320 mg/kg
S–CGE 800 mg/kg

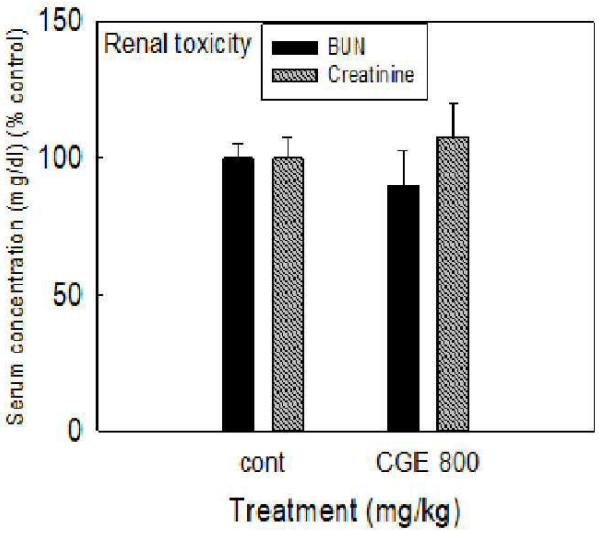
도면7


Body weight gain
Body weight (% control)
150
100
50
0
cont
CGE 160
CGE 320
CGE 800
Treatment (mg/kg)

도면8


Hepatic toxicity
AST(GOT)
ALT(GPT)
Serum transaminase activity (% control)
150
100
50
0
cont
CGE 800
Treatment (mg/kg)

도면9



서 열 목 록

<110> PYUNGANG CORPORATION/

INDUSTRIAL COOPERATION FOUNDATION CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY.

<120> Composition of the extract of combined herb CGE for preventing and treating respiratory inflammation

<130> DIFI190102EK

<150>

<151>

<160> 4

<170> KoPatentIn

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400>

TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213>

Homo Sapiens

<400>

CCG AGC TCA GAG GAC ATA TGG G 20

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400>

TTC CGC AAG TTC ACC TAC C 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400>

CGG GCC GGC CAT GCT TTA CG 20