

|                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                                                                              | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)                                                                                                                                                                                                                                                | (11) 공개번호 10-2012-0064218<br>(43) 공개일자 2012년06월19일 |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>A61K 36/896 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)<br>A23L 1/29 (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2010-0125343<br>(22) 출원일자 2010년12월09일<br>심사청구일자 없음 | (71) 출원인<br>경희대학교 산학협력단<br>경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)<br>(72) 발명자<br>김지영<br>경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 생명과학대학 309호 (서천동, 경희대학교)<br>이태훈<br>경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 생명과학대학 309호 (서천동, 경희대학교)<br>김지영<br>경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 생명과학대학 309호 (서천동, 경희대학교) |                                                    |

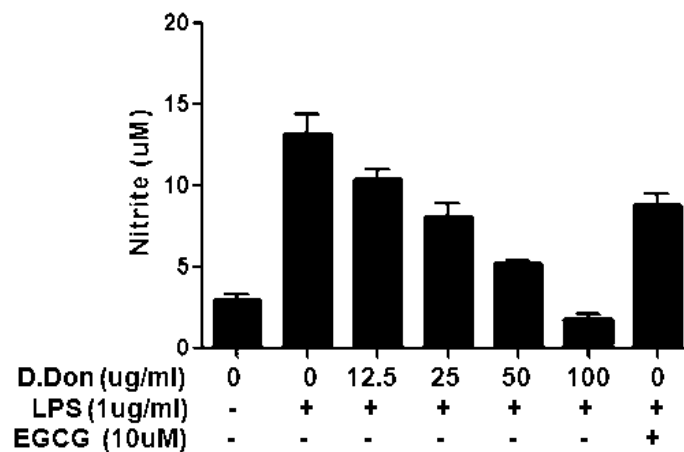
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **항염활성을 나타내는 윤판나물 추출물**

#### (57) 요약

본 발명은 항염증 활성을 나타내는 윤판나물 추출물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 백합과 식물인 윤판나물의 지상부를 메탄올을 용매로 사용해 추출하여 윤판나물 추출물을 유효성분으로 함유하는 항염증 조성물에 관한 것으로, 마우스 대식세포에 처리되었을 때 산화 질소의 양을 현저히 감소시키고, 또한 산화질소의 발생을 조절하는 유전자인 iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)의 발현 역시 감소시키는 것을 확인하였다. 따라서 윤판나물 추출물은 염증 유발 물질에 의한 염증을 억제할 수 있는 항염증 조성물, 가공식품, 기능성 식품, 또는 식품 첨가제로 제공될 수 있는 효과를 지니고 있다.

#### 대표도



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

윤판나물 (*Disporum sessile* D.Don)에서 추출하는 것에 의해 얻어진 추출물을 유효 성분으로 항염증 활성을 가지는 추출물

### 청구항 2

제 1항의 상기추출물이 용매 추출물임을 특징으로 하는 추출물

### 청구항 3

상기 항염증 조성물이 가공식품, 기능성 식품, 식품첨가제, 기능성 음료, 또는 음료첨가제인 항염증 조성물

### 청구항 4

항염증 효과를 갖는 윤판나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 관련 질환 예방 및 개선용 건강기능식품

## 명세서

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 항염증 활성을 나타내는 윤판나물 추출물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 백합과 식물인 윤판나물의 지상부를 메탄올을 용매로 사용해 추출하여 윤판나물 추출물을 유효성분으로 함유하는 항염증 조성물에 관한 것으로, 염증 유발 물질에 의한 염증을 억제할 수 있는 항염증 조성물, 가공식품, 기능성 식품, 또는 식품첨가제를 제공하는 것이다.

### 배경 기술

[0002] 본 발명은 항염증 효과를 갖는 윤판나물 추출물에 관한 것으로서, 특히, 윤판나물 추출물을 이용하여 건강 증진용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0003]

[0004] 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이다.

[0005] 즉, 생체가 병원균에 감염이 되거나 어떤 원인에 의해서 면역체계가 항진된 경우 대식세포(macrophages)가 작용을 한다. 대식세포는 병원균과 면역세포인 T-세포의 활성 물질의 도움으로 병원균에 대항해서 숙주를 방어하는 중요한 역할을 하며, 이러한 활성은 몇 개의 매개체에 의해 조절된다. 그 중에서 특히 대식세포의 산화질소 합성 효소(nitric oxide synthase, 이하 NOS라 칭한다.)에 의한 산화질소(NO)의 생성은 박테리아, 곰팡이 및 기생세균을 사멸시키거나 성장을 억제하는 중요한 매개체로 작용한다.

[0006] 최근 연구에 따르면, NO는 세 가지 주요한 NOS 이성질체(isoform)인 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS), inducible NOS(iNOS)에 의해 아르기닌(arginine)으로부터 생성되는 자유라디칼이다. nNOS와 eNOS는  $Ca^{2+}$ /칼모듈린(calmodulin)에 의해 조절되지만, iNOS는 인터루킨(interleukin), 인터페론(interferon), LPS와 같은 염증성 자극에 의해 전사 수준에서 조절된다. nNOS나 eNOS에 의해 수초 내에 소량 생성된 NO는 혈관확장, 신경전달, 병원체에 대한 세포파괴 등과 같은 정상적인 생리기능을 담당하지만, 대식세포에서 iNOS에 의해 과다 생성된 NO는 슈퍼옥사이드(superoxide)와 반응하여 퍼옥시니트라이트(peroxynitrite)를 형성하고 이는 강력한 산화제로 작용하여 세포에 손상을 입히고, 염증성 자극에 의해 활성화된 대식세포에서 NF- $\kappa$ B

를 활성화시켜 염증반응, 암, 동맥경화 등 만성질환에 관련하는 것으로 알려져 있다. (Korhonen. Et al., *Current Drugs target.*, 4, pp471-479, 2005; T.J. GUZIK Et al., *JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY.*, 4, pp469-487, 2003)

[0007] NO는 염증과 암을 포함한 다양한 병리생리학적 과정에서 iNOS에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. NOS는 염증, 혈관 확장, 신경전달, 종양세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-아르기닌(L-arginine) 으로부터 NO를 생성하며, 염증 상태에서는 대식세포에서 iNOS에 의해 NO를 다량 생성하여 여러 만성질환을 일으키는 것으로 알려져 있다. iNOS의 발현은 NF $\kappa$ B 활성화로 유도되며 이는 대식세포에서 LPS나 사이토카인(cytokine)에 의해 염증성 매개물들이 과잉 생산되는 중요한 매커니즘이 된다.

[0008] 지금까지 윤판나물을 주성분으로 한 물질이나 제품이 없는 실정이다. 또한, 과학적인 기초자료를 토대로 한 일반 건강식품의 효능 중에서 항염 활성을 보는 자료가 많지 않으므로, 천연추출물을 이용하여 안전하게 섭취할 수 있으며, 염증 반응을 억제할 수 있고, 용이하게 식품에 이용할 수 있는 물질에 대한 연구가 필요한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 염증성 질환 예방에 유용한 윤판나물을 대중적으로 보급하기 위한 것으로, 윤판나물의 약리 활성을 나타내면서도 가공 음료를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 항염 활성이 우수한 윤판나물 추출물이 첨가된 음료 조성물, 식품첨가제 등을 제공하는데 그 목적이 있다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 윤판나물 추출물은, 윤판나물(*Disporum sessile* D.Don)을 흐르는 물에 세척하여 이물질을 제거한 후, 양지에서 건조하고, 분쇄하여 분말로 만들어 80% 메탄올에 침적하고, 이 메탄올 침적물을 초음파를 이용하여 30분씩 3회 추출한 다음, 추출액의 상층액을 회수하여 감압 농축하고, 이 농축물을 물에 현탁시킨 후, 현탁액을 동결 건조한 뒤, DMSO에 추출하여 윤판나물 추출물을 제조하는 것으로 구성된다. 이 윤판나물 추출물의 NO 생성저해 활성과 iNOS mRNA 발현 저해 효과를 확인하여, 윤판나물의 추출물의 식품 첨가제 및 음료 조성물로 이용될 수 있는 추출물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0012] 본 발명은 염증 반응에 의한 급성 염증억제, 염증 유발 물질의 발현 정도 및 인산화된 NF $\kappa$ B 단백질 발현양 억제 등의 효과가 우수한 물질로서 염증 반응 조절을 통하여 염증 질환 완화활성을 갖는 건강 기능성 식품을 제조할 수 있다.

[0013] 또한 식물이기 때문에 식품 첨가제로 사용되어, 섭취하는 것도 가능하다. 이에 따라 본 발명은 식품에 첨가하여 항염증 효과를 나타낼 수 있으며, 예방제로 염증 질환 완화에 사용될 수 있다.

[0014] 본 발명의 방법에 의해 제조된, 윤판나물 추출물을 포함하는 건강개선용 음료 조성물을 섭취할 경우, 암, 박테리아, 염증, 당뇨 등에 대한 우리 몸의 방어능력 향상에 크게 도움이 될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명에 따른 윤판나물 추출물에 대하여 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성 저해효과를 나타내는 결과

그래프.

도 2는 본 발명에 따른 윤판나물 추출물에 대하여 RAW 264.7 세포에서 iNOS mRNA 발현 저해효과를 나타내는 RT-PCR 결과 그래프.

도 3은 본 발명에 따른 윤판나물 추출물에 대하여 RAW 264.7 세포에서 COX-2 mRNA 발현 저해효과를 나타내는 RT-PCR 결과 그래프.

도 4는 본 발명에 따른 윤판나물 추출물에 대하여 RAW 264.7 세포에서 TNF- $\alpha$  mRNA 발현 저해효과를 나타내는 RT-PCR 결과 그래프.

도 5는 본 발명에 따른 윤판나물 추출물에 대하여 RAW 264.7 세포에서 IL-6 mRNA 발현 저해효과를 나타내는 RT-PCR 결과 그래프.

도 6은 본 발명에 따른 윤판나물 추출물에 대하여 RAW 264.7 세포에서 단백질 수준에서 iNOS의 발현 저해효과를 나타내는 웨스턴 블랏 결과 사진.

도 7은 본 발명에 따른 윤판나물 추출물에 대하여 RAW 264.7 세포에서 단백질 수준에서 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현 저해효과를 나타내는 웨스턴 블랏 결과 사진.

도 8은 본 발명에 따른 윤판나물 추출물에 대하여 RAW 264.7 세포에서 단백질 수준에서 핵 내로 이동하는 NF $\kappa$ B의 발현 저해효과를 나타내는 웨스턴 블랏 결과 사진.

도 9는 본 발명에 따른 윤판나물 추출물에 대하여 RAW 264.7 세포에서 핵 내의 target DNA에 결합하는 활성 저해효과를 나타내는 EMSA 결과 사진.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 실시예에서는 윤판나물에서 항염증 활성을 밝혀내기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0017] 실시예 1. 윤판나물 추출물의 제조방법

[0018] 윤판나물의 줄기, 가지를 건조하고 분쇄한 윤판나물 300g을 80% 메탄올 1.2L로 3회 추출하고, 얻은 추출액은 회전식 감압증발기를 이용하여 농축한 다음 동결건조하여 80% 메탄올 추출물을 얻었다.

[0019] 실시예 2. 산화질소(nitric oxide, NO) 생성 측정

[0020] 96-웰 플레이트에서 대식세포 RAW 264.7 ( $1 \times 10^4$  cells/ml)에 10% FBS, 페니실린(100 unit/ml), 스트렙토마이신(100  $\mu$ g/ml)가 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% 이산화탄소의 환경에서 배양하였으며, 추출물(100, 50, 25, 12.5, 0  $\mu$ g/ml)을 처리한 후, LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포 배지 100  $\mu$ l를 Griess 시약(5%(v/v), 인산 및 0.1% (w/v) 나프틸에틸렌디아민-염산에 용해된 동량의 1% (w/v) 설펜아미드) 100  $\mu$ l에 혼합한 후, 실온에서 10 분 동안 배양하였으며, 그 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 신선한 배지는 모든 실험에서 무처리군으로 사용하였다. 시료에서의 산화질소의 양은 배지에서 준비된 소듐 니트라이트(sodium nitrite) 표준 곡선으로부터 계산되었다.

[0021] 실시예 3. 윤판나물 추출물의 세포독성 실험

[0022] 윤판나물 추출물의 세포독성 실험은 MTT 분석법으로 측정되었다. 세포독성 실험 배양액은 배양실험 종료 3시간 전에 MTT 용액 (인산완충용액-살린 속에 10 mg/ml, pH 7.4) 5  $\mu$ l를 첨가하고, 세포는 반응 종료까지 계속 배양시켰다. 배양은 포르마잔의 용해성을 증가시키기 위해 DMSO를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 540 nm에서 광학 밀도(OD)는 ELISA 마이크로플레이트 리더를 사용하여 측정하였다.

[0023] 실시예 4. iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 mRNA 생성 또는 발현 측정

[0024] 윤판나물 추출물은 DMSO를 이용해 100 mg/ml를 만들어, 농도별로 희석하여 RAW 264.7 세포에 처리한 후, LPS

를 처리하고 24시간 배양한 뒤 세포에서 RNA 전체를 분리하고 각각의 유전자에 대한 시발체(primer)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0025] 실시예 5. iNOS의 단백질 생성 또는 발현 측정

[0026] 윤판나물 추출물이 iNOS의 단백질 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RAW 264.7 무린(murine) 대식 세포에 윤판나물 추출물을 농도별로 처리하고 동시에 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하고 24시간 동안 키운 뒤 세포를 용해(Lysis)시켜 모은 총 단백질(total protein)들을 전기영동과 전환(transfer)한 다음, iNOS 항체를 가지고 웨스턴 블랏을 이용하여 측정하였다.

[0027] 실시예 6. I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화 및 분해 정도 측정

[0028] 윤판나물 추출물이 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화 및 분해에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RAW 264.7 무린(murine) 대식 세포에 윤판나물 추출물을 농도별로 처리하고 동시에 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하고 2시간 동안 키운 뒤 세포를 용해(Lysis)시켜 모은 총 단백질(total protein)들을 전기영동과 전환(transfer)한 다음, p-I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 I $\kappa$ B- $\alpha$  항체를 가지고 웨스턴 블랏을 이용하여 측정하였다.

[0029] 실시예 7. p65 단백질의 핵 내 이동량 측정

[0030] 윤판나물 추출물이 핵 내로 이동하는 p65 단백질에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RAW 264.7 무린(murine) 대식 세포에 윤판나물 추출물을 농도별로 처리하고 동시에 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하고 2시간 동안 키운 뒤 세포를 용해(Lysis)시켜 모은 핵 내 단백질(nuclear protein)들을 전기영동과 전환(transfer)한 다음, p65와 PCNA 항체를 가지고 웨스턴 블랏을 이용하여 측정하였다.

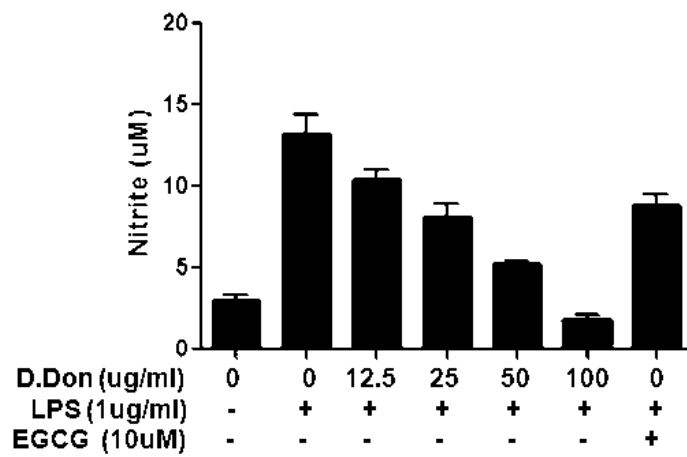
[0031] 실시예 8. NF- $\kappa$ B 단백질의 핵 내 DNA에 결합하는 활성 정도 측정

[0032] 윤판나물 추출물이 핵 내에서 DNA에 결합하는 NF- $\kappa$ B 단백질의 결합 활성도를 측정하기 위해 RAW 264.7 무린(murine) 대식 세포에 윤판나물 추출물을 농도별로 처리하고 동시에 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하고 2시간 동안 키운 뒤 세포를 용해하여 핵 추출물을 제조하였다. 핵 추출물 ( $5 \mu\text{g}$ )을 이중-스트랜드 NF- $\kappa$ B 올리고뉴클레오타이드와 혼합하고, [ $\gamma$ - $^{32}$ P] dATP로 말단을 라벨화하였다.

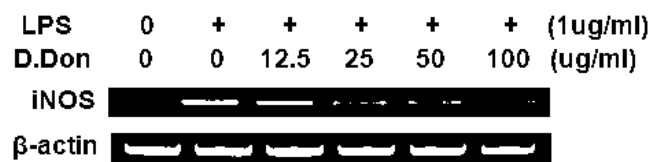
[0033] 결합 반응을 실온에서 30분간 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.42 M KCl, 6 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20% glycerol, 0.5 mM PMSF, 0.75 mM Spermidine, 0.15 mM Spermine 및 10% Sucrose가 포함된 반응 버퍼 40  $\mu\text{L}$ 에서 수행하였다. NF- $\kappa$ B의 p65 서브유닛에 대한 항체를 방사선라벨화된 프로브를 첨가하기에 앞서 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응혼합물 내 핵 추출물로 공동 배양하였다. 10, 50 배 라벨화되지 않은 올리고뉴클레오타이드와 경쟁하여 결합 특이성을 검사하였다. 반응 물질을 0.5 % Tris boric acid EDTA (TBE) 버퍼 내에서 6 % polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. Gel을 80  $^{\circ}\text{C}$ 에서 한 시간 동안 말린 뒤, -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 X 선 필름에 노출하였다.

도면

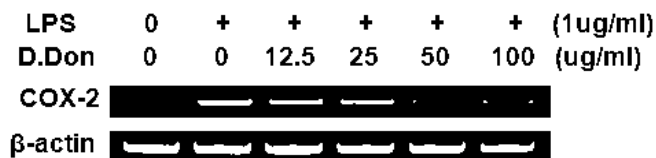
도면1



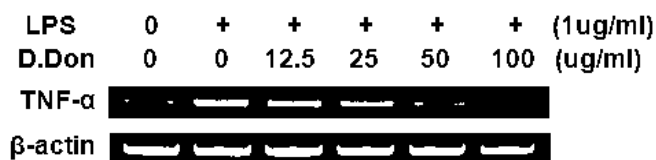
도면2



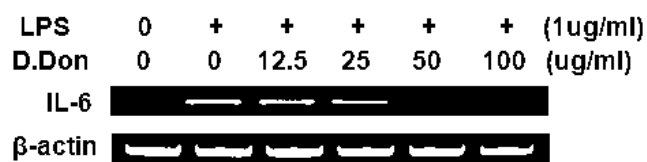
도면3



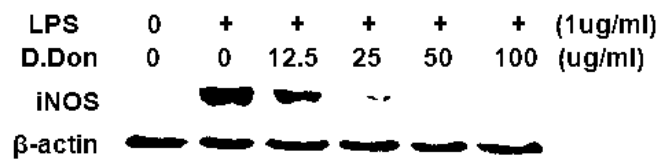
도면4



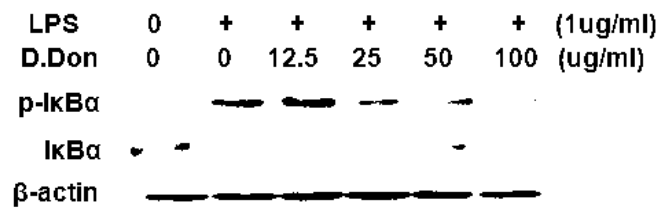
도면5



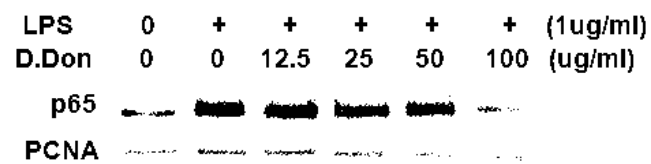
도면6



도면7



도면8



도면9

