



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0077131
(43) 공개일자 2011년07월07일

(51) Int. Cl.

A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0133597

(22) 출원일자 2009년12월30일

심사청구일자 2009년12월30일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구 달서구 신당동 1000번지

(72) 발명자

양선아

대구 수성구 범어4동 서한두레맨션 102동 1002호

이은정

대구광역시 서구 평리4동 1354-1번지 동서3차 나
동 603호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

권혁철

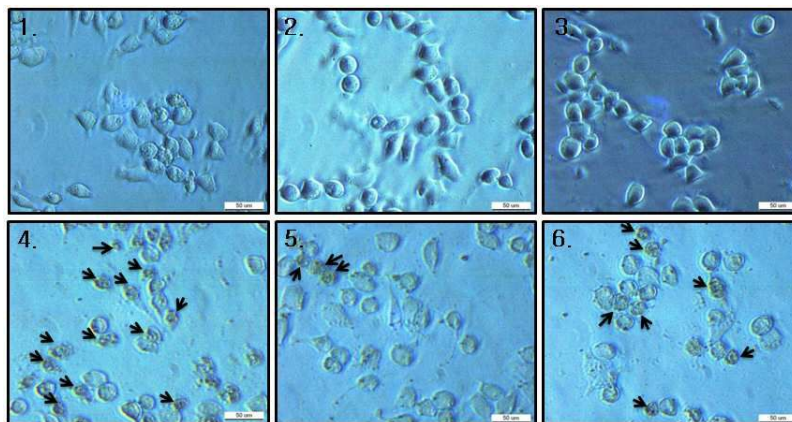
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 고장초 추출물을 함유하는 알러지 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 고장초추출물을 유효성분으로 함유하는 알러지 개선용 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로는 고장초 추출물, 보다 바람직하게는 고장초추출물의 비극성 용매 가용 분획물을 유효성분으로 포함하는 알러지 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 고장초추출물은 매우 안전할 뿐만 아니라, 염증과 알러지 반응에 관련된 사이토카인 활성 억제 및 비만세포로부터의 베타-헥소사미니다이스(β -hexosaminidase) 방출을 억제하는 등의 효과가 있어 알러지 증상을 개선하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최준혁

대구광역시 남구 대명5동 1692-6 나원하이츠 501호

채인경

대구광역시 북구 노원동2가 157-4번지

유미희

대구광역시 달성군 다사읍 죽곡리 대실역e편한세상
아파트 101-1810

이인선

대구 수성구 황금동 368번지 롯데화성캐슬골드파크
1416동 1803호

이삼빈

대구 달서구 이곡동 무지개타운 102-306

특허청구의 범위

청구항 1

고장초추출물을 유효성분으로 함유하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고장초추출물은 비극성 용매 가용 분획물인 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 고장초추출물은 헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform, CHCl_3) 및 에틸아세테이트(ethylacetate, EtOAc)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 분획하여 수득한 분획물인 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 고장초추출물은 고장초추출물의 클로로포름 분획물인 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 고장초추출물은 전 조성물 중량에 대하여 0.02~30중량% 포함되는 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 알러지 개선용 조성물은 화장료인 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 알러지 개선용 조성물은 피부 외용제인 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 알러지 개선용 조성물은 알러지 개선용 건강기능성 식품인 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 9

고장초를 준비하는 단계; 상기 고장초를 저급 알코올로 추출하여 고장초 추출물을 얻는 단계; 상기 고장초 추출물을 비극성용매로 분배 추출하는 단계를 포함하는 고장초 추출물의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 70% 에탄올인 것을 특징으로 하는 고장초 추출물의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 비극성용매는 헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform, CHCl_3) 및 에틸아세테이트(ethylacetate, EtOAc)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매인 것을 특징으로 하는 고장초 추출물의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고장초추출물을 유효성분으로 함유하는 알러지 개선용 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로는 고장초

추출물, 보다 바람직하게는 고장초추출물의 비극성 용매 가용 분획물을 유효성분으로 포함하는 알러지 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 알러지 질환은 현대의 환경오염, 식생활의 변화와 유전적 영향 등의 복합적인 영향으로 급증하고 있으며, 우리나라의 경우 알러지 질환 환자의 수가 예전에 비해 꾸준히 증가하고 있는 실정이다. 알러지 반응은 시간적 경과와 초기의 주요한 양상에 따라 즉시형, 면역 복합체형 및 지연형 반응 등 크게 4가지 유형(I~IV)으로 나뉘는데 통상 알러지라 함은 일정한 항원에 대하여 이미 감작된 개체에 부착되어 있는 항체에 항원이 결합한 후 수분 내에 일어나는 즉시형 반응인 제 1형 알러지 반응을 뜻하며, 알러지성 비염, 아토피성 피부염 및 기관지 천식 등의 알러지 질환들이 제 1형 알러지 반응(type I allergic reaction)에 속한다.
- [0003] 비만세포는 급 만성 염증 및 즉시형 알러지 과민반응에 관여하는 필수적인 세포로 알려져 있다. 비만세포 표면에 발현하고 있는 고친화성 IgE 수용체인 FcεRI이 IgE 및 특이적 알레르겐(allergen)과 결합함으로써, 세포질 내 칼슘농도가 상승하고 탈과립이 일어나 히스타민이나 헤파린, 가수분해효소 그리고 interleukin-4(IL-4), IL-6, IL-13, TNF-α와 같은 여러 가지 사이토카인을 분비하게 되며, 분비된 염증 매개인자들은 혈관을 이완시키고, 혈관투과도를 증가시키며, 기관지를 수축시키게 된다. 비만세포의 활성화는 이러한 알레르겐과 IgE를 통한 면역학적 자극 이외에 비면역학적 자극 물질인 compound 48/80, protein kinase C(PKC) activator인 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), calcium ionophore(A23187) 등에 의해서도 야기되는 것으로 보고되어 있다. Rat 유래의 RBL-2H3 세포는 막의 표면에 수십만 개의 IgE 수용체를 포함하며, IgE로 감작된 후에 항체에 반응하여 히스타민을 유리하므로, 항알러지 효능검색에 RBL-2H3 세포가 모델세포주로 많이 이용되고 있다.
- [0004] 면역학적 또는 비면역학적 과민반응은 항히스타민 약물에 의해 증상이 일시적으로 경감되지만 완전히 치료되지는 않는다. 따라서, 알러지 매개물질인 히스타민이 방출되는 것을 예방하는 소재의 개발이 요구되며, 천연물 유래의 소재는 장기간 복용이 가능하고 부작용의 위험이 적으므로 다양한 천연식물을 이용한 효능 검색이 활발하게 이루어지고 있는 실정이다. 현재 잘 알려진 천연물 유래의 항알러지 시료로는 단삼, 구절초, 자근, 도라지, 등골나무 등이 있다.
- [0005] 대한민국 공개특허 제2004-97026호에는 생솔잎, 느릅나무 유피, 생오가피 등의 각종 천연물을 이용한 아토피성 피부염 예방 및 치료에 관한 조성물이 알려져 있으며, 대한민국 공개특허 제2005-9172호에도 역시 숙지황(熟地黃), 산약, 산수유 등의 생약 추출물을 이용한 아토피성 피부질환 환자의 체질개선 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 공개특허 제2005-22586호에는 질경이 추출물을 이용한 아토피성 피부염 치료제가 개시되어 있다. 또한 대한민국 공개특허 제2005-0072378호에는 지부자, 용규, 명아주로부터 추출한 식물추출물을 함유하는 아토피 피부용 화장료 조성물이 개시되어 있다.
- [0006] 본 발명자들은 항알러지 활성이 예상되는 천연물에 대한 연구를 하던 중 고장초추출물, 보다 바람직하게는 고장초추출물의 비극성 용매 가용분획물이 우수한 알러지 증상 억제활성을 가지는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0007] 따라서, 본 발명은 고장초추출물을 유효성분으로 함유하여 안전하면서도, 알러지 개선 효과가 뛰어난 알러지 개선용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 안전하면서도 알러지 개선 효과가 우수한 고장초추출물의 제조방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제 해결수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따르면, 고장초추출물을 유효성분으로 함유하는 알러지 개선용 조성물이 제공된다. 상기 고장초추출물은 비극성용매 가용 분획추출물인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 상기 고장초추출물은 헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform, CHCl₃) 및 에틸아세테이트(ethylacetate, EtOAc)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 분획하여 수득한 분획물이다.
- [0010] 상기 알러지 개선용 조성물에는 활성성분으로서의 고장초추출물이 전 조성물 중량 기준으로 0.02 ~ 30 중량%

함유되는 것이 바람직하다.

[0011] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따르면, 고장초를 준비하는 단계; 상기 고장초를 저급 알코올로 추출하여 고장초 조추출물을 얻는 단계; 상기 고장초 조추출물을 비극성용매로 분배 추출하는 단계를 포함하는 고장초 추출물의 제조방법을 제공한다.

[0012] 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 70% 에탄올인 것이 바람직하다. 상기 비극성용매는 헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform, CHCl_3) 및 에틸아세테이트(ethylacetate, EtOAc)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 클로로포름이다.

효 과

[0013] 본 발명에 따른 알리지 개선용 조성물은 천연물인 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하므로 안전하면서도, 염증과 알리지 반응에 관련된 사이토카인 활성 억제 및 비만세포로부터의 베타-헥소사미니데이즈(β -hexosaminidase) 방출을 효율적으로 억제하는 등 효과적으로 알리지를 개선한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 이하 본 발명을 자세히 설명한다.

[0015] 고장초(*Zizania latifolia*)는 못이나 도랑, 강가의 얇은 물 속에서 무리지어 자라는 벼과에 속하는 여러해살이 풀로, 줄 또는 줄풀이라고도 불린다. 고장초는 당뇨병, 고혈압, 중풍, 심장병, 변비, 비만, 동맥경화 등 여러 가지 질병에 뛰어난 효과가 있으며, 인체의 면역력을 키우는 데에도 뛰어난 효과가 있다고 알려지고 있다. 또한, 농약중독이나 식중독, 화학약품 중독 같은 여러 가지 중독에도 줄풀 뿌리를 달이거나 생즙으로 마시면 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나 이러한 고장초의 효능은 단지 민간에서만 인식되어 왔으며 과학적인 근거는 거의 없는 실정이나, 최근 들어 그 효능과 식품에의 응용에 관심이 증가되고 있다. 신경세포에 산화적 손상을 유발시켜 줄풀 뿌리 추출물을 처리하여 세포생존율, DNA fragmentation 및 세포고사와 관련된 유전자들의 활성을 분석한 결과 유의한 결과를 얻었다는 보고가 있으며, 고장초와 발효고장초가 각각 신체적 지구력의 향상과 항피로효과를 가진다는 연구결과가 보고되었다.(Park WH, Cha YY. Inhibiton effect of *zizania latifolia* on apoptosis induced by H_2O_2 in Neuro2A cell. Korean J. Oriental Physiology&Pathology. 19(4): 1062-1067 (2005), Song YH. Anti-fatigue effect of *Zizania caudiflora*(Turczaninow) Nakai the forced swimming test in ICR mice. Graduate school of Kyung-Hee university, Seoul, Korea. (2009))

[0016] 본 발명은 고장초 추출물이 염증과 알리지 반응에 관련된 여러 사이토카인의 활성을 억제하며, 비만세포로부터의 베타-헥소사미니데이즈(β -hexosaminidase) 방출을 효율적으로 억제하는 등 알리지 증상 개선에 유용하다는 사실에 기초하여 고장초 추출물을 유효성분으로 함유하는 알리지 개선용 조성물을 제공하는 것에 특징이 있다.

[0017] 상기 고장초 추출물은 통상적인 용매추출방법으로 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올, 클로로포름, 디클로로메탄, 헥산, 에틸아세테이트 등의 사용 가능한 용매를 이용하여 추출하거나, 초임계 이산화탄소 추출법을 통해서도 얻을 수 있으며, 또한 추출하여 얻어진 것을 다시 정제함으로써 더욱 고순도로 정제할 수도 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 고장초추출물이 고장초조추출물의 비극성용매 가용 분획물인 경우에 통상의 조추출물 보다 월등히 우수한 알리지 개선효과를 가진다는 사실에 기초하는 것이므로, 본 발명 알리지 개선용 조성물은 유효성분으로 고장초 조추출물의 비극성 용매 가용 분획물을 함유하는 것이 더욱 바람직하다.

[0019] 상기 유효성분으로서의 비극성용매 가용 분획물은 고장초를 준비하는 단계; 상기 고장초를 저급 알코올로 추출하여 고장초 조추출물을 얻는 단계; 및 상기 고장초 조추출물을 비극성용매로 분배추출하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

[0020] 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 70% 에탄올일 수 있다. 예를 들어 고장초 건조중량을 기준으로 10~40배(w/v)의 메탄올 또는 70% 에탄올로 1 ~ 2일 정치추출하고 이를 3 ~ 4회 반복한 후, 여과, 농축 및 동결 건조하여 고장초 조추출물을 얻을 수 있다.

[0021] 상기 단계에서 얻어진 고장초 조추출물을 비극성용매, 바람직하게는 헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform, CHCl_3) 및 에틸아세테이트(ethylacetate, EtOAc)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매, 더욱 바람직하게는 클로로포름으로 분배 추출하여 비극성용매 가용 분획물을 얻을 수 있다.

- [0022] 예를 들어 동결 건조한 상기 70% 에탄올 추출물을 10~40배(w/v)의 증류수에 녹인 후 n-헥산, 클로로포름 또는 에틸아세테이트를 순차적으로 3회 반복 추출하여 각 용매별로 계통적 분획을 한 후 감압 농축하여 비극성용매 가용 분획물을 얻을 수 있다.
- [0023] 상기 고장초추출물, 즉 에탄올 추출물과, 여러 분획물이 β -hexosaminidase의 방출에 미치는 영향을 조사한 결과, 고장초 에탄올 추출물의 경우 10 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL의 농도에서 각각 101.4%, 71.1%, 45.5%로 효소의 방출을 농도 의존적으로 억제시켰으며, 분획물의 경우 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도인 50 μ g/mL 이하의 농도에서 활성을 비교하였는데, 50 μ g/mL에서의 β -hexosaminidase 활성은 헥산 분획물(hexane fraction), 클로로포름 분획물(chloroform fraction), 에틸아세테이트 분획물(ethyl acetate fraction)에서 각각 73.98%, 15.23%, 51.84%를 나타내어 클로로포름 분획물(chloroform fraction)에서 억제 효과가 가장 크다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0024] 또한, 고장초 추출물이 활성화된 비만세포로부터 분비되는 염증사이토카인인 TNF- α 의 생성 억제활성을 가지는지에 대하여 조사한 결과, 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 TNF- α 의 분비를 억제시켜주는 것을 확인할 수 있었으며, 분획물 중에서는 클로로포름 분획물의 경우 특히 우수한 억제활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0025] 본 발명의 알리지 개선용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 고장초 추출물을 0.02 ~ 30 중량%로, 더욱 바람직하게는 1~10중량%로 포함하는 것이 바람직하다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알리지 개선용 조성물은 바디클렌저, 샴푸, 토닉, 카밍워터 등의 제형을 가지는 화장료로 적용될 수 있다. 본 발명의 알리지 개선용 조성물은 상기 생약복합 추출물에 추가로 지방, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차 단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소나 또는 외용제에 통상 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 알리지 개선용 조성물은 분사형 액제, 연고, 패취 또는 분무제 등의 제형을 가지는 피부외용제로 적용될 수 있다.
- [0028] 또한 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 알리지 개선용 조성물은 알리지 개선용 건강기능식품으로 적용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 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 조성물은 1일 0.1 ~ 500mg/kg으로, 바람직하게는 1 ~ 200 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.
- [0030] [실시예]
- [0031] 이하, 하기의 실시예와 시험예들을 통하여 본 발명을 상세하게 설명하지만, 본 발명이 이 예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0032] **제조예 1: 고장초 추출물의 제조**
- [0033] 고장초(*Zizania latifolia*)는 경상북도 경산시 하양읍에서 건조 상태인 것을 구입하였다. 건조된 시료 100g에 30배(W/V)의 메탄올을 첨가하여 24시간 동안 정치추출 하고, 이를 3회 반복하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 3, Maidstone, England)로 여과한 다음 rotary vacuum evaporator(UT-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축한 후 동결건조하여 15.4g의 추출물을 얻었으며, -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.
- [0034] **시험예 1: RBL-2H3 세포의 탈과립 관찰**
- [0035] **세포주 배양**
- [0036] 본 발명의 시험에 사용한 RBL-2H3(KCLB No. 22256)세포는 Rat 유래의 호염기성 세포주로 Korea Cell Line

Bank(Seoul, Korea)로부터 분양받았으며, 10% fetal bovine serum과 1% streptomycin/penicillin이 함유된 MEM 배지를 배양액으로 하여 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

[0037] RBL-2H3 세포를 24-well plate(2×10^5 cells/well)에 4시간 배양한 후, 200 μ L의 incubation buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.2)를 넣고 10분간 배양하였다. 0.1% DMSO 용액이나 상기 제조에 1의 농도별 시료 25 μ L를 각각 넣어 37℃에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, compound 48/80(Sigma) 용액 25 μ L를 첨가하여 40분간 반응시켰다. 반응 후, 비만세포주의 형태를 도립현미경(DM IRE2, Leica, Wetzlar, Germany)으로 600배의 배율 하에서 관찰하였다. 200배의 배율 하에서 전체적인 탈과립 정도를 확인하였으며, 3회 실험으로 재현성을 확인하였다.

[0038] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0039] Compound 48/80은 formaldehyde에 의하여 cross-linked된 phenethylamine의 mixed polymer로 비만세포의 막수 용체에 작용하여 세포 외의 칼슘을 세포 내로 유입시켜 세포 내 자유칼슘의 양을 증가시켜 비만세포의 탈과립을 유도한다. 도 1에서 확인되는 바와 같이 Compound 48/80을 처리하지 않은(도 1의 1, 2 및 3) 정상 비만세포주의 형태는 원형 또는 난원형으로 세포 윤곽이 뚜렷하고, 매끄러운 표면을 갖는 반면, compound 48/80 처리로(도 1의 4, 5 및 6) 활성화되어 탈과립이 일어난 세포의 형태는 화살표로 표시된 바와 같이 세포 윤곽이 불분명하고 크기가 작으며, 세포질 내 과립들이 돌출되거나 세포주위에 흩어져 있는 것을 볼 수 있다. Compound 48/80으로 처리하지 않고 시료만 처리한 경우(도 1의 2 및 3), 탈과립은 일어나지 않아 세포의 형태에 변화가 없었으며, compound 48/80만 처리한 경우(도 1의 4) 수분 이내에 세포의 가장자리가 불규칙하게 되면서 일부 과립들이 세포표면으로 돌출되는 모습을 관찰할 수 있었다. 또한, 50 μ g/mL의 고장초 추출물을 미리 처리한 경우(도 1의 3 및 6) 또는 100 μ g/mL의 고장초 추출물을 미리 처리한 경우(도 1의 2 및 5)에는 compound 48/80에 의한 세포의 탈과립이 농도 의존적으로 현저하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0040] 시험예 2: β -Hexosaminidase 방출에 대한 고장초 추출물의 억제 효과

[0041] RBL-2H3 세포(2×10^5 cells/well)를 450 ng/mL의 IgE와 함께 CO₂ incubator에서 12시간 배양하여 세포를 감작시켰다. 감작시킨 세포를 siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2)로 세척한 후, 각 well당 160 μ L의 siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.2)를 넣고 20분간 배양하였다. 상기 제조에 1의 각 농도별 시료와 5 μ M의 wortmannin(Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)을 넣어 10분간 반응시키고, 10 μ g/mL의 DNP-BSA(Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX78244, USA)를 첨가한 후 다시 10분간 배양하여 세포를 활성화시켰으며 Ice bath에서 반응을 정지시켰다. 상층액 25 μ L를 96-well plate에 옮기고, substrate buffer(p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 1 mM in Citrate buffer 0.1 M, pH4.5) 25 μ L를 넣은 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 후, 각 well에 stop solution(0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 10) 200 μ L를 첨가하여 반응을 정지시키고, ELISA reader(Spectra MAX 340 pc, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0042] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0043] 비만세포가 함유하고 있는 과립에는 히스타민 및 tryptase 등 다양한 알러지 증상을 유발하는 매개체들이 함유되어 있어 항원에 의한 이러한 매개체들의 분비를 확인하는 것은 매우 중요하다. β -Hexosaminidase는 비만세포가 면역학적으로 활성화될 때 히스타민과 함께 부수적으로 분비되므로 비만세포 탈과립의 표지인자로 널리 사용되고 있다.

[0044] 이에 따라 RBL-2H3 세포에서 분비되는 β -hexosaminidase의 활성을 측정하여, 고장초 추출물에 의한 β -hexosaminidase 방출 억제 효과를 검색하였다. 10, 20, 50, 100 μ g/mL 농도의 고장초 추출물이 처리된 세포에서 유리되는 β -hexosaminidase의 활성은 대조군에 비해 각각 97%, 77%, 58%, 37%를 나타내어, 농도 의존적으로 감

소함을 확인할 수 있었으며, IC_{50} 값은 $73.8 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 또한, 양성 대조군으로 사용된 $5 \mu\text{M}$ 의 wortmannin은 29%를 나타내어 β -hexosaminidase의 방출을 강하게 억제시켜주는 것을 확인할 수 있었다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

[0045] **시험예 3: TNF- α 분비 억제 효과**

[0046] RBL-2H3 세포를 24-well plate (2×10^5 cells/well)에 분주한 후 12시간 배양하였다. 새로운 MEM 배지에 상기 제조예 1의 고장초 추출물 시료를 농도별로 처리하고, A23187($1 \mu\text{M}$)과 PMA(50 ng/ml)를 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 상층액을 분리하여 -70°C 에 보관하였다가 TNF- α ELISA kit(Invitrogen Corporation, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. ELISA reader(Spectra MAX 340 pc, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 TNF- α 의 양을 계산하였다.

[0047] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0048] TNF- α 는 비만세포와 대식세포 등에서 생성되어 많은 염증반응을 유발하는 인자로, 국소적인 알러지 염증반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 고장초 추출물이 활성화된 비만세포로부터 분비되는 염증사이토카인인 TNF- α 의 생성을 억제시켜줄 수 있는지 ELISA 방법으로 조사하였다. RBL-2H3 세포에서 분비된 TNF- α 의 양은 아무런 처리를 하지 않은 경우 5.06 pg/ml 로 매우 낮았으며, A23187와 PMA를 처리한 경우 87.14 pg/ml 로 현저히 증가되는 것을 확인하였다. 반면 10, 50, $100 \mu\text{g/ml}$ 의 고장초 추출물을 처리한 경우 각각 79.76, 65.38, 53.4 pg/ml 로 측정되어, A23187와 PMA만 처리한 대조군에 비해 각각 91.5, 75, 61.3%로 감소되어 농도 의존적으로 TNF- α 의 분비를 억제하는 것을 알 수 있다. 또한, 양성 대조군으로 사용된 $1.43 \mu\text{g/ml}$ 의 luteolin 처리군의 경우 TNF- α 의 양이 32.5 pg/ml 로 나타나 대조군에 비해 37.3% 억제됨을 확인할 수 있었다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

[0049] **시험예 4: 독성시험**

[0050] IgE로 감작된 세포에 대한 고장초 추출물의 독성은 MTT assay 방법으로 측정하였다. 먼저 RBL-2H3 세포(3×10^4 cells/well)에 450 ng/ml 의 DNP-specific IgE(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 37°C , 5% CO_2 조건에서 하룻밤 배양한 후 여러 농도($10 \sim 100 \mu\text{g/ml}$)의 고장초 추출물을 세포에 처리하였다. 12시간 후 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 $10 \mu\text{L}$ 씩 첨가하고 다시 4시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고 $100 \mu\text{L}$ 의 DMSO로 well에 생성된 formazan 결정을 완전히 용해시켜 ELISA reader (Spectra MAX 340 pc, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

[0051] IgE로 감작된 RBL-2H3 세포에 대한 고장초 추출물의 독성 정도를 조사하기 위해 MTT assay를 수행하였으며, 그 결과는 도 4에 나타내었다. 세포생존율은 대조군에 대한 실험군의 세포 생존율을 백분율로 나타내었다. 고장초 추출물은 실험에 사용된 $0 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 12시간 동안 어떠한 세포독성도 나타내지 않았다.

[0052] **제조예 2: 고장초 추출물의 제조**

[0053] 고장초(*Zizania latifolia*)는 경상북도 경산시 하양읍에서 건조된 것을 구입하였으며, 전초를 사용하였다. 건조 중량의 30배(w/v)의 70% ethanol을 넣어 3회 추출, 여과(No. 3 filter paper, Whatman, Maidstone, UK)하고 rotary evaporator로 농축한 후 동결건조하여 -70°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다. 고장초를 70% 에탄올로 추출하여 농축, 동결건조한 후 고형분의 수율을 측정한 결과 15.1%로 나타났다.

[0054] **실시예 1 ~ 5: 고장초 분획추출물의 제조**

[0055] 동결 건조한 상기 제조예 2의 70% 에탄올 추출물을 30배 (w/v)의 증류수에 녹인 후 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate와 *n*-butanol을 순차적으로 3회 반복 추출하여 각 용매별로 계통적 분획을 하였고, 남은 수용성 층은 water 분획으로 감압 농축하여 남은 유기용매를 휘발시킨 뒤 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 이때 각각의 분획물의 수율은 0.94%, 0.55%, 0.23%, 1.21%, 10.43%로 나타났다.

[0056] **시험예 5: β -Hexosaminidase 방출 억제효과 측정**

[0057] 상기 시험예 2에서와 같은 방법으로 상기 제조예 2의 고장초 에탄올 추출물과 상기 실시예 1~5의 분획물이 β -hexosaminidase의 방출에 미치는 영향을 조사하였다.

[0058] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0059] 고장초 에탄올 추출물의 경우 10 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL의 농도에서 각각 101.4%, 71.1%, 45.5%의 억제율을 나타내어, 상기 제조예 1의 메탄올 추출물보다는 약하지만 유사한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 상기 실시예 1 ~ 5의 분획물의 경우 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도인 50 μ g/mL 이하의 농도에서 활성을 비교하였는데, 가장 높은 농도인 50 μ g/mL의 hexane fraction, chloroform fraction, ethyl acetate fraction, butanol fraction, water fraction은 각각 β -hexosaminidase 활성을 대조군에 비해 73.98%, 15.23%, 51.84%, 81.31%, 71.86%로 감소시켜 chloroform fraction이 억제 효과가 가장 좋음을 확인할 수 있었다 (* p < 0.05, ** p < 0.01). 이로 인해 고장초에서 알리지 억제 효과를 나타내는 성분들이 비극성 부분에 존재한다는 것을 확인할 수 있다.

[0060] **시험예 6: TNF- α 분비 억제 효과**

[0061] 상기 시험예 3에서와 같은 방법으로 β -Hexosaminidase 방출 억제능이 가장 좋았던 클로로포름 분획물을 선택하여 TNF- α 분비 억제 효과를 측정하였다.

[0062] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0063] 아무런 처리를 하지 않은 경우 RBL-2H3 세포에서 분비되는 TNF- α 의 양은 거의 0 pg/mL이었으나, A23187과 PMA를 처리하였을 때에는 101.4 pg/mL로 현저하게 증가하였다. 그러나 5, 10, 25, 50 μ g/mL의 클로로포름 분획물을 처리하였을 때에는 각각 100.7, 73.4, 43.6, 22.4 pg/mL로 나타나 대조군에 비해 각각 99.3, 72.3, 42.9, 22.1%로 TNF- α 의 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(** p < 0.01).

[0064] **시험예: Western blot을 이용한 알리지 억제 기전 확인**

[0065] RBL-2H3 세포(1×10^6 cells/well)를 6-well plate에 450 ng/mL의 IgE와 함께 CO₂ incubator에서 12시간 배양한 뒤 다양한 농도의 시료를 처리하여 30분 배양한 다음 항원을 처리하여 15분 또는 4시간 배양하였다. 각 세포에 lysis buffer(1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 1% Triton X-100, 100 mM PMSF)를 첨가하여 lysis 시킨 후 BCA(Bicinchoninic acid) kit로 단백질을 정량하였다. 단백질 농도를 20 μ g으로 조정하여 10% SDS-polyacrylamide에 loading하여 125 V로 전기영동 하였다. 전기영동하여 분리한 단백질은 Immobilon-P transfer membrane과 transfer buffer (20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 350 mA에서 120분간 transfer시키고 5% non-fat skim milk solution으로 blocking하였다. TTBS 용액에 1:1000으로 희석한 일차 항체(COX-2, p-ERK, p-JNK, p-P38, p-AKT)와 4℃에서 12시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하고, 1:2000으로 희석된 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase(HRP) 이차 항체와 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 세척하였다. 항체 반응이 끝난 membrane에 ECL 진단 kit를 처리하고 X-ray film에 노출하여 현상한 후 band를 확인하였다.

[0066] **시험예 7: cyclooxygenase-2(COX-2) 발현에 미치는 영향**

[0067] 비만세포 내의 COX-2는 arachidonic acid로부터 염증과 알리지 증상 유발 물질이며 eicosanoids의 일종인 프로스타글란딘류의 생합성을 매개하는 효소로써 여러 종류의 자극에 의해 유도된다.

[0068] 이에 따라 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)이 COX-2 단백질의 활성을 조절할 수 있는지 알아보기 위해 상기의 western blot을 실시하여 비만세포 내에 발현된 COX-2의 양을 확인하였다.

[0069] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0070] 자극을 주지 않은 경우에 비해 자극을 주었을 때 COX-2의 발현이 증가하였으며 5~50 $\mu\text{g/mL}$ 의 클로로포름 분획물(chloroform fraction)을 처리하였을 경우 농도 의존적으로 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)은 COX-2의 발현 저해를 통해 프로스타글란딘류의 생성을 억제시켜 알러지 염증반응을 감소시켜주는 것으로 판단된다.

[0071] 시험예 8: mitogen activated protein kinase(MAPK)의 인산화에 미치는 영향

[0072] MAPK는 반응하는 기질에 따라 ERK, JNK 및 p38 MAPK의 세 가지 그룹으로 구분된다. MAPK 분자들은 세포의 증식과 분화 및 그 외의 다양한 생물학적 기능을 조절하며, 특히 외부 감염에 의해 활성화됨으로써 사이토카인 및 지질매개물질 등의 염증매개물질의 생성을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 시험예에서는 활성화된 비만세포에서 발생하는 MAPK 분자들의 인산화에 대한 고장초 chloroform fraction의 억제효과를 조사하였다.

[0073] 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0074] 자극을 주지 않은 경우에 비해 자극을 주었을 때 MAPK 분자들의 인산화가 증가하였으며 5~50 $\mu\text{g/mL}$ 의 고장초 chloroform fraction을 처리하였을 때 농도 의존적으로 이들의 인산화가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 고장초 chloroform fraction은 MAPK 분자들의 인산화 감소를 통해 염증매개물질의 생성을 감소시켜 알러지 반응을 억제시키는 것으로 판단된다.

[0075] 시험예 9: protein kinase B (Akt)의 인산화에 미치는 영향

[0076] 비만세포의 증식과 사이토카인의 생성에 중요한 역할을 하며, PI3-K 활성화의 지표물질인 Akt의 인산화에 미치는 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)의 영향을 조사하였다.

[0077] 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0078] 자극을 주지 않은 경우에 비해 자극을 주었을 때 Akt의 인산화가 증가하였으며 5~50 $\mu\text{g/mL}$ 의 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)을 처리하였을 때 인산화가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)은 Akt 인산화의 억제를 통해 비만세포의 증식을 조절하고 사이토카인 생성 유전자의 발현을 억제시켜줄 것으로 판단된다.

[0079] 시험예 10: T 림프구의 면역반응 조절 효과 검색

[0080] 세포배양

[0081] T 세포주인 MOLT-4는 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양받아 사용하였다. MOLT-4 세포의 배양에는 15% FBS와 1% antibiotics를 함유한 RPMI1640배지를 사용하였다. MOLT-4는 5% CO_2 가 존재하는 37°C incubator에서 배양하였으며 1주일에 3~4회 계대 배양하였다.

[0082] MOLT-4 세포의 배양액 내에 분비된 IFN- γ 와 IL-4의 측정은 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 먼저 MOLT-4 세포(5×10^5 cells/well)를 6-well plate에 분주하여 30분 간 배양한 후, 클로로포름 분획물의 농도별 시료를 처리하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 후 원심분리 하여 상층액을 분리하였으며, 상층액은 -70°C에 보관하였다가 사용하였다.

[0083] 비만세포 뿐만 아니라 T 세포 또한 면역반응 조절에 중요한 역할을 하는데, 이들은 생성하는 단백질에 따라 1형(Th1)과 2형(Th2)으로 나눌 수 있다. Th1 세포가 분비하는 IFN- γ , IL-2, IL-12 등의 물질은 자가면역질환의

유발 성향을 높이며, Th2 세포가 분비하는 IL-4와 IL-5 등의 물질은 알러지 질환의 유발 성향을 높이기 때문에 이들의 균형을 맞추어주는 것 또한 알러지 질환에서는 중요하다고 할 수 있다.

[0084] 이에 따라 사람의 T 세포주인 MOLT-4를 이용하여 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)이 T 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다. 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)은 Th1 세포가 분비하는 사이토카인은 증가시켜주고 Th2 세포가 분비하는 사이토카인은 감소시켜줄 것으로 예상하고 실험을 진행하였으나, 고장초 클로로포름 분획물은 T 세포의 사이토카인 분비에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)은 T 세포의 면역 반응에는 영향을 미치지 않고 비만세포에만 선택적으로 영향을 미치는 것으로 판단된다.

[0085] 시험예 11: 독성시험

[0086] 상기 시험예 4와 동일한 방법으로 제조예 2의 고장초 70% 에탄올 추출물과 실시예 1~5의 각 분획물의 세포독성을 측정하였으며 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0087] 10~100 µg/mL 사이의 농도에서 세포독성을 측정한 결과 70% 에탄올 추출물과 hexane fraction, ethyl acetate fraction, butanol fraction 및 water fraction은 사용된 농도에서 어떠한 세포독성도 나타내지 않았으나, chloroform fraction은 100 µg/mL의 농도에서 약 77.3%의 세포생존율을 나타내었다.

[0088] 제형 실시예 1: 바디로션

[0089] 하기의 표 1과 같은 조성을 가지는 바디로션을 제조하였다.

표 1

성 분	함량(중량%)
고장초 추출물(실시예 2)	20
C14~22 알코올/C12~20 알킬글루코시드	1.5
베헤닐 알코올	1.0
스쿠알란	8.5
1,3-부틸렌글리콜	4.0
향, 색소	미량
정제수	잔량
합계	100

[0091] 제형 실시예 2: 샴푸

[0092] 하기의 표 2와 같은 조성을 가지는 샴푸를 제조하였다.

표 2

성 분	함량(중량%)
암모늄 라우레스 설페이트	12.0
암모늄 라우릴 설페이트	4.0
코카미도프로필 베타인	7.0
알킬폴리글리코사이드	1.5
폴리쿼터늄 10	0.5
글리세린	1.5
고장초 추출물(제조예 2)	20.0
향료	0.2

정제수	잔 량
합계	100

[0094] 제형 실시예 3: 건강 기능성음료

[0095] 하기의 표 3과 같은 조성을 가지는 건강 기능성 음료를 제조하였다.

표 3

[0096]

성 분	함량
고장초 추출물(제조예 2)	1000mg
구연산	1000mg
올리고당	100g
타우린	1g
정제수	잔량
합계	900ml

도면의 간단한 설명

[0097]

도 1은 본 발명 고장초 메탄올추출물의 탈과립활성 억제효과를 나타내는 사진도이다.

[0098]

도 2는 본 발명 고장초 메탄올추출물의 베타-헥소사미니데이즈(β -hexosaminidase) 방출 억제효과를 나타내는 그래프이다.

[0099]

도 3은 본 발명 고장초 메탄올추출물의 사이토카인 활성 억제효과를 나타내는 그래프이다.

[0100]

도 4는 Rat 유래의 비만세포주인 RBL-2H3 cell에 대한 본 발명 고장초 메탄올추출물의 독성시험결과를 나타내는 그래프이다.

[0101]

도 5는 본 발명 고장초 에탄올 추출물 및 분획물의 베타-헥소사미니데이즈(β -hexosaminidase) 방출 억제효과를 나타내는 그래프이다.

[0102]

도 6은 본 발명 고장초 에탄올 추출물 및 분획물의 사이토카인 활성 억제효과를 나타내는 그래프이다.

[0103]

도 7은 본 발명 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)의 COX-2 발현 저해활성을 나타내는 그래프이다.

[0104]

도 8은 본 발명 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)의 비만세포에서 발생하는 MAPK 분자들의 인산화에 대한 억제활성을 나타내는 그래프이다.

[0105]

도 9는 본 발명 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)의 Akt(protein kinase B) 인산화 억제활성을 나타내는 그래프이다.

[0106]

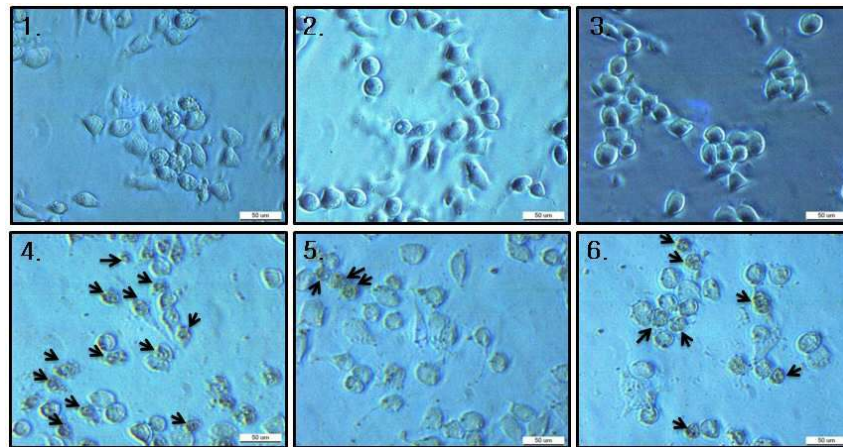
도 10은 사람의 T 세포주인 MOLT-4를 이용하여 본 발명 고장초 클로로포름 분획물(chloroform fraction)이 T 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

[0107]

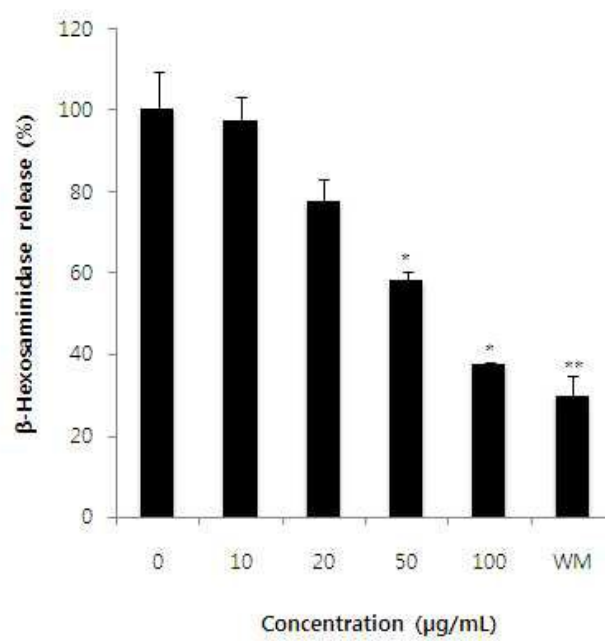
도 11은 Rat 유래의 비만세포주인 RBL-2H3 cell에 대한 본 발명 에탄올 추출물 및 분획물의 독성시험결과를 나타내는 그래프이다.

도면

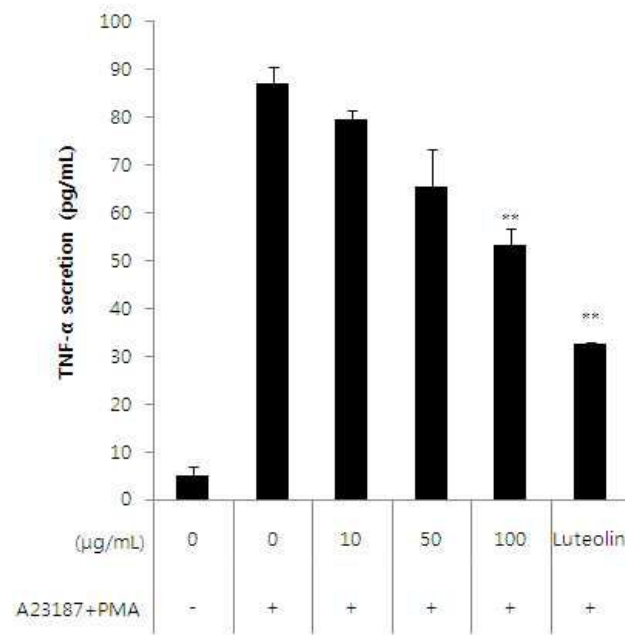
도면1



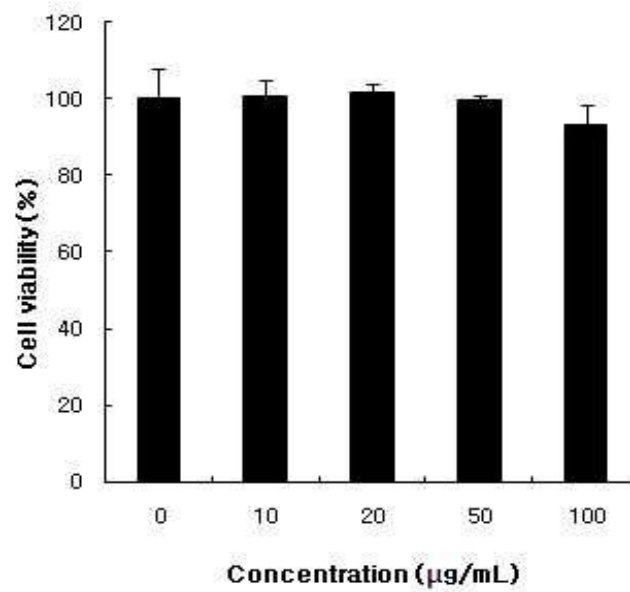
도면2



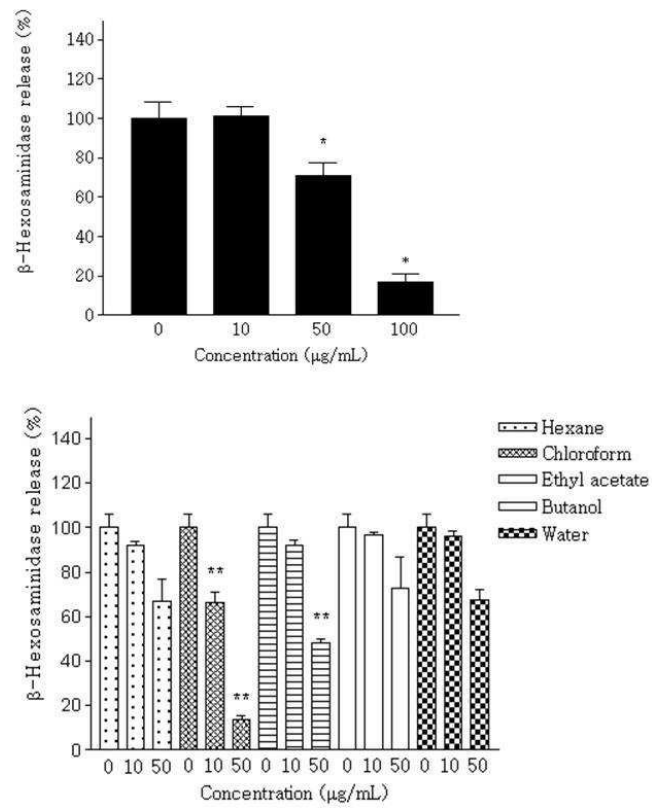
도면3



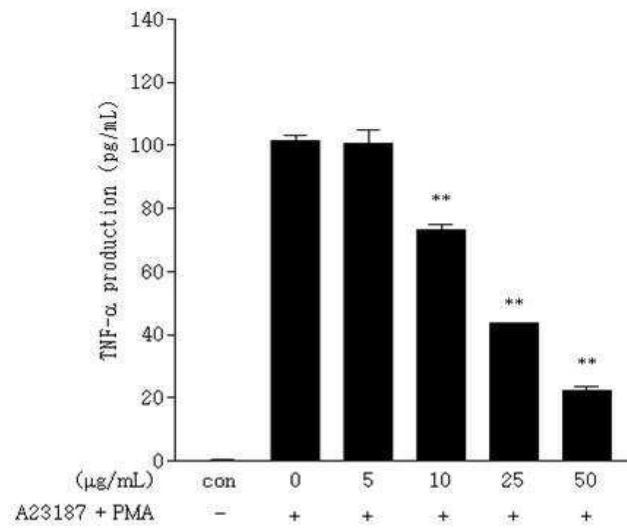
도면4



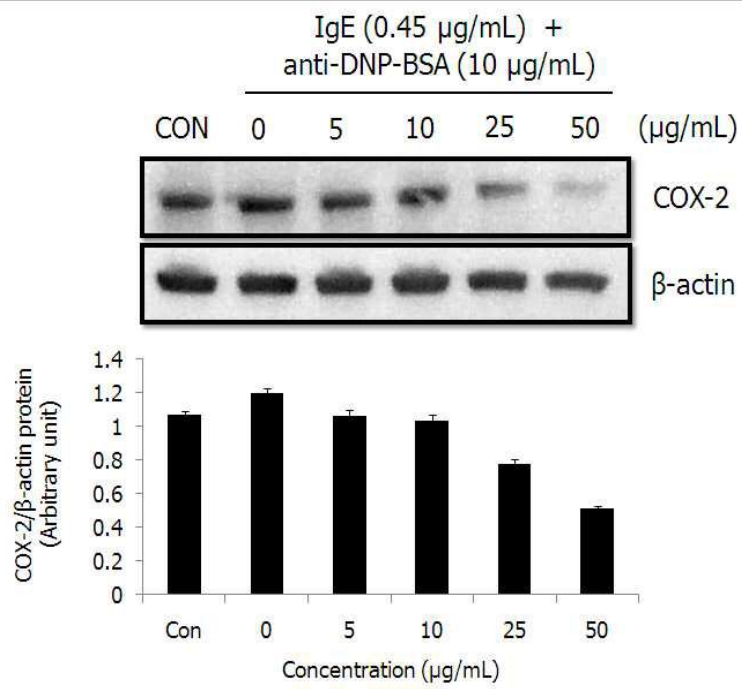
도면5



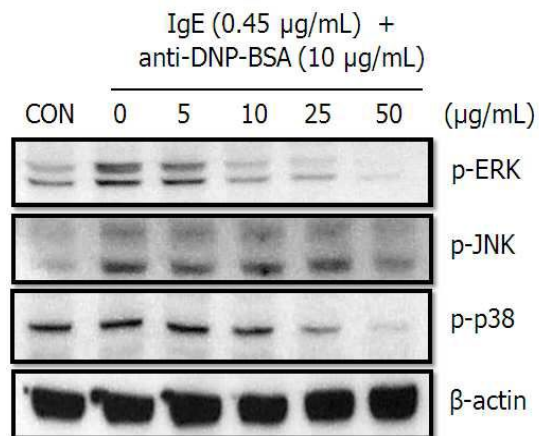
도면6



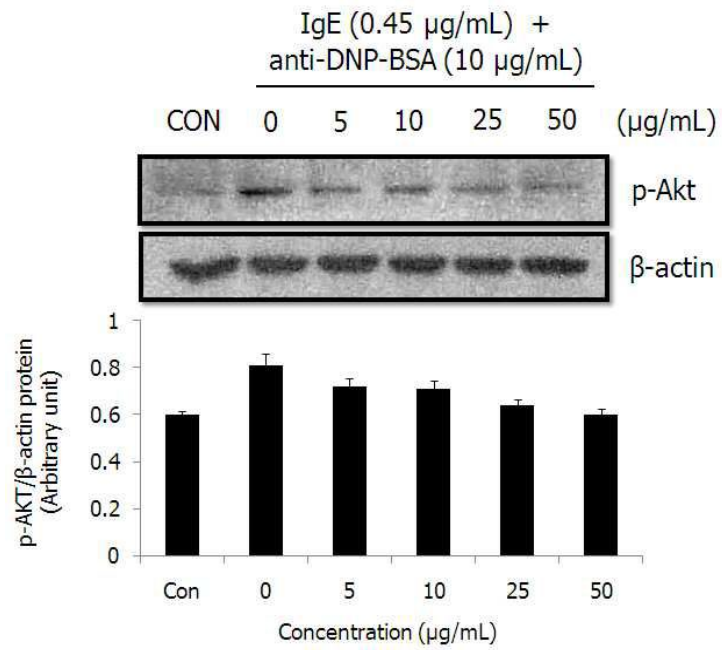
도면7



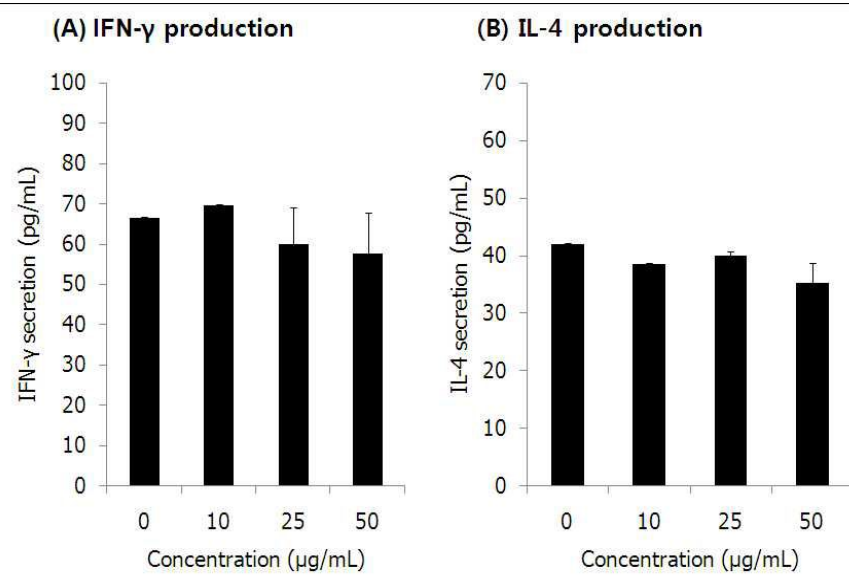
도면8



도면9



도면10



도면11

