(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월06일
(11) 등록번호 10-2505790
(24) 등록일자 2023년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/04 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/04 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0129650
(22) 출원일자 2022년10월11일
심사청구일자 2022년10월11일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170042390 A*
JP2018002620 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
조선대학교 산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
김춘성
광주광역시 남구 서문대로678번길 7, 101동 1002호(진월동, 대주아파트)
이슬아
전라남도 목포시 연산백련로1번길 69, 102동 404호(연산동, 목포용해2지구모아엘가 에듀파크)
(74) 대리인
특허법인리채

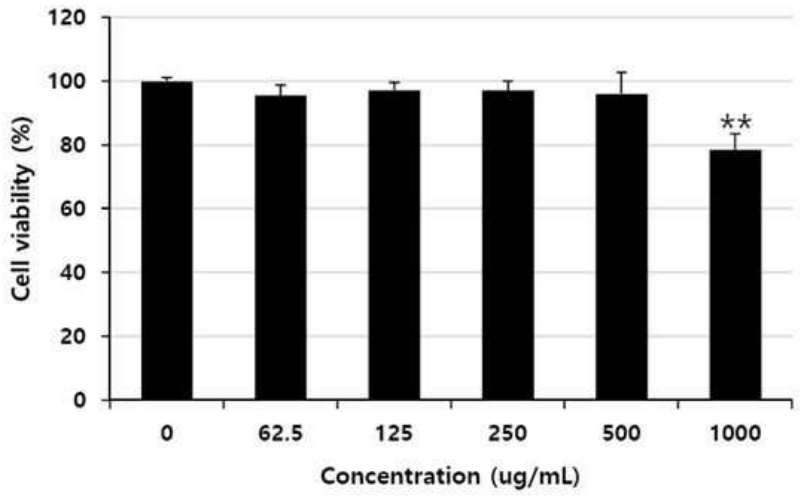
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 **방사무늬돌김 추출물을 포함하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 방사무늬김 추출물을 포함하는 골관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 조성물은 연골세포에 독성을 가지지 않으며, 항염증 효과가 있다. 본 발명의 조성물은 연골기질분해효소들(ADAMTS-4,5, MMP-1,3,13)의 발현을 억제시키고 염증으로 분해된 연골기질 구성 물질(collagen type Ⅱ, Aggrecan)의 발현을 촉진시켜 연골을 보호하는 효과가 우수하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 19/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23V 2250/202 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525012279
과제번호	202106562
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	빅데이터기반해양바이러스제어및마린바이오틱스
연구과제명	해조류 기반 바이오 헬스케어 유효성 소재 실증 지원
기 여 율	1/1
과제수행기관명	조선대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

방사무늬김의 20 내지 40 부피 % 주정 추출물을 포함하는 골관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 열수 추출물, 초음파 추출물, 증류 추출물 또는 환류 가열 추출물인, 골관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

방사무늬김의 20 내지 40 부피 % 주정 추출물을 포함하는 골관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 추출물은 열수 추출물, 초음파 추출물, 증류 추출물 또는 환류 가열 추출물인, 골관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 골관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 골관절염(Osteoarthritis: OA)은 노화로 인한 대표적인 퇴행성 질환으로서, 관절에 염증과 통증 스트레스를 유발한다. 무릎 속 연골의 노화나 무리한 무릎 관절 사용으로 인해 닳아 없어져 통증이 발생하는 골관절염은 노년층이 정형외과를 찾는 대표적인 질환으로, 무릎 통증 때문에 자연스럽게 활동량이 줄어들고 생활반경도 좁아지기 때문에 삶의 질을 현저히 떨어뜨린다.

[0004] 미국의 질병관리본부에 따르면 골관절염은 25세 이상 성인의 13.9% 및 65세 이상 성인의 33.6%(12.4 백만명)에 영향을 주고, 병리학적 증상은 윤활막 관절(synovial joints)에서 관절 연골 소실의 국소적인 부위를 특징으로 하며, 이는 뼈의 비대(hypertrophy) 및 관절 캡슐(joint capsule)의 비후(thickening)와 연관 된다. 골관절염

의 원인은 세포와 사이토카인, 성장인자, 염증매개자, 메탈로프로티나아제(MMPs), 및 연골분해성(chondrodegradative) 효소와 같은 수용성 매개자들과의 복합 상호작용을 포함하는 것으로 생각된다.

[0005] 골관절염의 치료법으로 일차 약제는 대증 작용에 의한 비스테로이드성 항염증제(non-steroidal antiinflammatory drugs: NSAIDs)이고, 고전적인 항염증제인 고용량 아스피린에서부터 최신 세대에 이르기까지, 장기적으로 복용하게 될 경우 위장 장애, 위장관 출혈, 간 손상, 심장 및 혈관에서 부작용을 수반하는 것으로 보고되었다.

[0006] 따라서, 기존 골관절염 치료 약물의 부작용 문제로 인하여 부작용 위험이 적은 약물 개발에 대한 수요가 높으며, 천연물 유래 약물이 상기한 부작용 문제에 대한 우려를 해소시킬 수 있는 유망한 후보로 여겨지고 있다.

[0007] 이에, 다양한 천연물 유래 소재들이 제시되고 있으나, 현재까지 골관절염 개선용으로 개발된 건강기능식품 소재들의 효능에 대해서는 충분하지 못한 것으로 인식되고 있어, 여전히 향상된 효능의 천연물 유래 소재 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 제 2338416호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 골관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 골관절염 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 1. 방사무늬김 추출물을 포함하는 골관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0014] 2. 위 1에 있어서, 상기 추출물은 물, C1 내지 C4 알코올 또는 이들의 혼합 용매 추출물인, 골관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0015] 3. 위 2에 있어서, 상기 추출물은 20 내지 40부피% 주정 추출물인, 골관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0016] 4. 위 1에 있어서, 상기 추출물은 열수 추출, 초음파 추출, 증류 추출 또는 환류 가열 추출물인, 골관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0017] 5. 방사무늬김 추출물을 포함하는 골관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[0018] 6. 위 5에 있어서, 상기 추출물은 물, C1 내지 C4 알코올 또는 이들의 혼합 용매 추출물인, 골관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[0019] 7. 위 6에 있어서, 상기 추출물은 20 내지 40부피% 주정 추출물인, 골관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[0020] 8. 위 5에 있어서, 상기 추출물은 열수 추출, 초음파 추출, 증류 추출 또는 환류 가열 추출물인, 골관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 효과

[0022] 본 발명 약학 조성물 및 건강기능식품은 연골세포에 항염증 효과가 있다.

[0023] 본 발명 약학 조성물은 골관절염의 예방 또는 치료 효과가 있다.

[0024] 본 발명 건강기능식품은 골관절염의 예방 또는 개선 효과가 있다.

[0025] 본 발명 약학 조성물 및 건강기능식품은 연골보호효과가 있다.

[0026] 본 발명 약학 조성물 및 건강기능식품은 연골기질 분해효소들의 발현을 억제시키는 효과가 있다.

[0027] 본 발명 약학 조성물 및 건강기능식품은 염증으로 분해된 연골기질 구성성분의 발현을 촉진시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 방사무늬김 주정추출물의 마우스 대식세포 RAW264.7에 대한 독성효능 평가인 MTT assay 결과를 나타낸 자료이다.

도 2는 방사무늬김 주정추출물의 마우스 대식세포 RAW264.7에 대한 Nitric Oxide assay 결과를 나타낸 자료이다.

도 3은 방사무늬김 주정추출물의 마우스 대식세포 RAW264.7에 대한 항염증 효과를 보여주는 자료로, iNOS, COX-2 및 TNF-α에 대한 Western Blot 결과를 나타낸 자료이다.

도 4는 방사무늬김 주정추출물의 RC(Rat Chondrocyte)에 대한 PGE_2 assay 결과를 나타낸 자료이다.

도 5는 방사무늬김 주정추출물의 연골보호효과를 보여주는 자료로, 연골기질(ECM)을 분해하는 이화효소 및 연골기질 구성요소의 발현을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0031] 본 발명은 골관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 방사무늬김 추출물을 포함함으로써, 골관절염에 대한 항염증 효과를 나타낼 수 있다.

[0032] 방사무늬 돌김(*Pyropia yezoensis*)은 홍조식물문 김파래홍조강 김파래목 보라털과 돌김속에 속하는 바닷말이다. 한국과 일본에 주로 서식한다.

[0033] 추출용매는 공지의 추출용매라면 제한 없이 사용 가능하다. 예를 들어 물, C1 내지 C4 알코올 또는 이들의 혼합용매가 될 수 있고, 바람직하게는 주정이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어 추출용매가 주정인 경우, 주정의 농도(예를 들어 부피%)는 20 내지 40%, 22.5 내지 37.5%, 25 내지 35%, 27.5 내지 32.5%가 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 추출방법은 공지의 추출방법이라면 제한 없이 사용 가능하다. 예를 들어 열수 추출, 초음파 추출, 냉침 추출, 증류 추출, 또는 환류 가열 추출 등의 추출방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 추출물은 방사무늬김 원물에 주정을 첨가하고 일정 온도에서 일정 시간 동안 추출하여 얻어진 용질을 건조하여 얻을 수 있다. 상기 주정의 농도는 원물 대비 무게가 10 내지 30배수, 12 내지 28배수, 14 내지 26배수 및 16 내지 24배수가 될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 추출 온도는 70 내지 100℃, 75 내지 98℃, 80 내지 96℃ 및 85 내지 94℃가 될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 추출 시간은 60 내지 180분, 80 내지 160분, 100 내지 140분 및 110 내지 130분이 될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] "추출물(extract)"은 액체 혼합물 또는 고체 혼합물로부터 용매에 의해 분리된 물질을 말한다.

[0037] 추출물은 용액, 농축물 또는 분말 상태일 수 있다.

[0038] "예방"이란 조성물 및/또는 건강기능식품의 투여로 골관절염 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0039] "치료" 또는 "개선"이란 본원 조성물 및/또는 건강기능식품의 투여로 대사 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0040] 본 발명의 조성물에는 약학적으로 허용 가능한 담체가 포함될 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 신체의 한 기관 또는 부분으로부터 신체의 다른 기관 또는 부분으로 활성 성분을 수송하는 역할을 하는 액체 또는 고체 충진제, 희석제, 부형제 또는 용매와 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 운반체(vehicle)를 의미한다. 본 발명의 조성물은 방사무늬김 추출물과 함께 추가로 약학적으로 허용되는 1종 이상의 담체를 첨가하여 약제로 제조할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용 가능한'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될

때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다. 상기 담체로는 식염수, 완충 식염수, 물, 글리세롤 및 에탄올 등이 있으나 이에 한정되지 않으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.

[0041] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 투여 대상에게 본 발명의 약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다.

[0043] 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다.

[0044] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다.

[0045] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명의 제제는 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다. 특정 대상에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 대상의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 전술한 사항을 고려하여 결정할 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물은 골관절염의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용하거나, 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 대상은 이러한 질환이 발생할 수 있는 임의의 동물일 수 있으며, 상기 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

[0050] 또한, 본 발명은 방사무늬김 추출물을 포함하는 골관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0051] 상기 건강기능식품은 골관절 통증 개선, 골관절 기능 개선, 골관절 염증 부종의 감소, 및 골관절염 예방 또는 개선에 도움이 된다.

[0052] 상기 추출물의 추출용매 또는 추출방법에 대해서는 상기 설명과 같다.

[0053] 본 발명의 건강기능식품은 상기 추출물을 포함한 음료 (알콜성 음료 포함), 과실 및 그의 가공식품 (예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품 (예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류 (예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품 (예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등일 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 액제 제형 등으로 제형화된 것일 수도 있다. 이들은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 제형화될 수 있다.

[0055] 본 발명의 건강기능식품에 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충진제(치즈, 초콜렛 등), 팩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다.

[0056] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 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. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일 쥬스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0057] 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘, 미네랄 오일 및 이들의 혼합물 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0058] 상술한 제형 내 유효성분으로서의 본 발명의 건강기능식품의 함량은 사용 형태 및 목적, 사용자 상태, 증상의 종류 및 경중 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 고형분 중량 기준으로 0.001 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0060] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0062] **제조예: 방사무늬김 추출물의 제조**

[0063] 원물 대비 20배수(무게)의 30부피% 주정을 첨가한 후 90℃에서 2시간 추출 수행 후 여과지로 용질과 용매를 분리, 이 후 회전감압농축기로 용매를 증발시키고 동결건조하였다. 실험수행을 위해 추출분말을 탈이온수에 100mg/mL로 용해시킨 후 필터하여 실험에 이용하였다.

[0065] **실시예: 방사무늬김 추출물의 골관절염 치료 및 개선 효과 확인**

[0066] 1. 방사무늬김 주정추출물의 대식세포 독성효능 평가(MTT assay)

[0067] 마우스 대식세포 RAW264.7 세포를 12-well plate에 1×10^6 cell/mL로 접종한 후 2시간 뒤 추출물을 각 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/mL 농도로 처리하였다. 24시간 반응한 뒤, MTT stock solution (5mg/mL)을 각 웰 당 100ul씩 접종시켰다. 3시간 동안 반응한 후, EP-tube에 수집하여 cell pellet만 남긴 뒤, DMSO를 1mL씩 첨가하여 형성된 formazan을 녹였다. 96-well plate에 200ul씩 duplicate로 분주한 후 590nm에서 흡광도를 측정하였다(도 1).

[0069] 2. 방사무늬김 주정추출물의 대식세포 항염증 평가 1(Nitirc Oxide assay)

[0070] 마우스 대식세포 RAW264.7 세포를 6-well plate에 1×10^6 cell/mL로 접종한 후 2시간 뒤 추출물을 각 0, 125, 250, 500 μg/mL 농도로 처리하였다. 1시간 뒤 LPS를 처리하고 24시간 동안 반응시켰다. 배지로 분비되어 축적된 아질산염을 측정하기 위해 sup.과 griess reagent를 1:1로 혼합하여 540 nm에서 흡광도 측정하였다. Standard curve를 위해 Na_2NO_3를 이용하여 계산하였다.

[0071] 실험 결과, LPS만 처리한 군에서 산화질소의 축적이 유의적으로 증가한 반면, 추출물을 처리한 군에서는 농도의존적으로 산화질소의 축적이 감소함을 확인하였다(도 2).

[0072] 방사무늬김 추출물이 아질산염의 생성을 억제시킴으로써 항염증 효과를 나타냄을 확인 할 수 있었다.

[0074] 3. 방사무늬김 주정추출물의 대식세포 항염증 평가 2(Western Blot)

[0075] 마우스 대식세포 RAW264.7 세포를 6-well plate에 1×10^6 cell/mL 로 접종한 후 2시간 뒤 추출물을 각 0, 125, 250, 500 μg/mL 농도로 처리하였다. 1시간 뒤 LPS를 처리하고 24시간 동안 반응시켰다. 단백질을 추출하기 위해 PRO-PREP을 이용하여 세포를 용해시켜 단백질을 얻은 후, BCA assay를 통해 정량화하였다. 8% 또는 15% SDS-PAGE에 동량의 단백질을 전기영동하여 크기별로 분리한 후 PVDF membrane에 trans blot을 수행하였다. 특정 1차 항체 반응은 4℃에서 overnight 반응하였으며 2차 항체 반응은 실온에서 1시간 반응하였다. 단백질 밴드 검출을 위해 발색에는 ECL solution을 이용하였으며 가시화를 위해선 MICRO CHEMI 4.2 system을 이용하였다.

[0076] 실험 결과, LPS만 처리한 군에서 iNOS, COX-2, 및 TNF-a의 단백 발현이 모두 현저히 증가하였으나, 추출물을 처리한 군에서 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 3).

[0077] 방사무늬김 추출물이 염증매개체(iNOS, COX-2) 및 전염증성 사이토카인(TNF-a)의 발현을 억제시킴으로써 항염증

효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0079] 4. 방사무늬김 주정추출물의 연골세포 항염증 평가(PGE_2 assay)

[0080] 쥐의 연골세포RC(Rat Chondrocyte)를 6-well plate에 1×10^6 cell/mL 로 접종하였다. Overnight후, 추출물을 처리하고, 1시간 뒤 IL-1b를 처리하여 24시간 동안 반응시켰다. 배지로 분비되어 축적된 prostaglandie E_2(PGE_2)을 측정하기 위해 PGE_2 ELISA KIT를 이용하여 분석하였다.

[0081] 실험 결과, IL-1b만 처리한 군에서 PGE_2의 축적이 유의적으로 증가한 반면 추출물을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 PGE_2의 축적이 감소함을 확인하였다(도 4).

[0082] 방사무늬김 추출물이 PGE_2의 생성을 억제시킴으로써 항염증 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0084] 5. 방사무늬김 주정추출물의 연골보호효과 확인실험

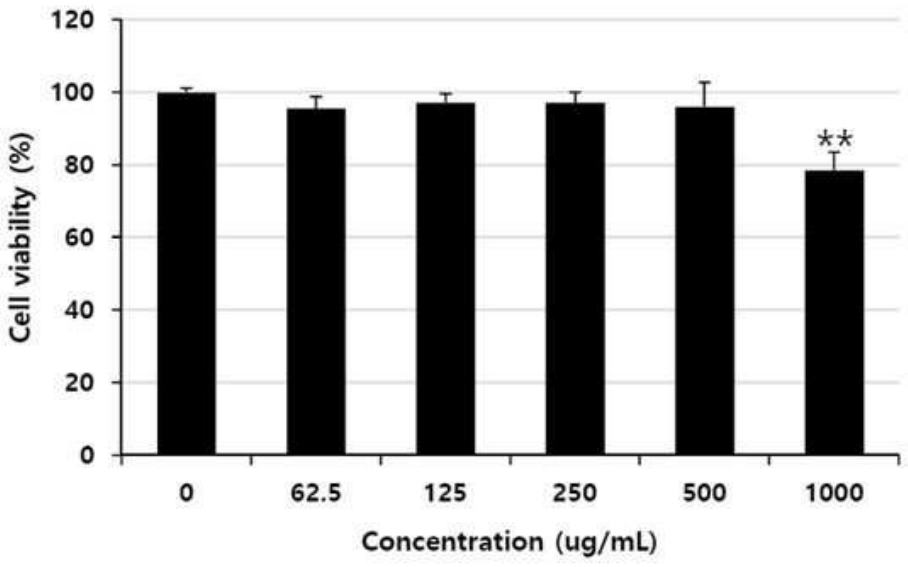
[0085] RC를 12-well plate에 1×10^6 cell/mL로 seeding하였다. overnight 후 추출물을 각 0, 250, 500, 1000 μg/mL로 1시간 처리한 후 IL-1β 10μg/mL를 처리하여 24시간 반응시켰다. 반응액 제거 후, protein extraction buffer를 이용하여 total protein을 추출 및 정량하였다. 동량의 단백질로 western blot을 수행 후 각각 일차 항체를 부착하여 그 발현을 분석하였다(도 5).

[0086] 연골기질을 분해하는 이화효소들의 발현이 적을수록 연골기질의 분해가 억제되어 연골 보호효과가 있다고 간주되며, 실험 결과 방사무늬김 추출물이 연골기질을 분해하는 대표적인 이화효소(ADAMTS-4,5, MMP-1,3,13)들의 발현을 억제시킴으로써 연골보호효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

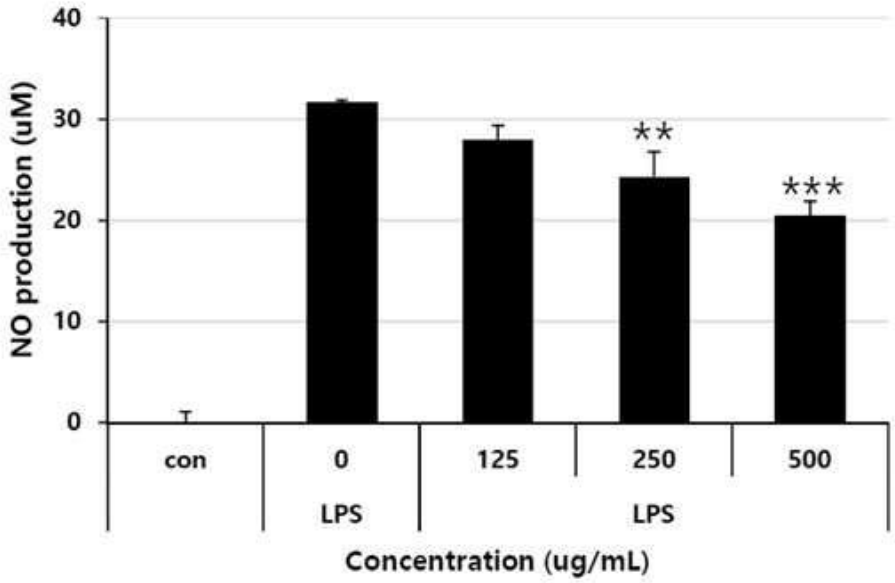
[0087] 염증에 의해 분해된 연골기질을 구성하는 물질들의 발현이 회복될수록 연골보호효과가 있다고 간주되며, 실험 결과 방사무늬김 추출물이 연골기질을 구성하는 대표적인 구성성분(collagen typeⅡ, Aggrecan)의 발현을 회복시킴으로써 연골보호효과가 있는 것을 확인 할 수 있었다.

도면

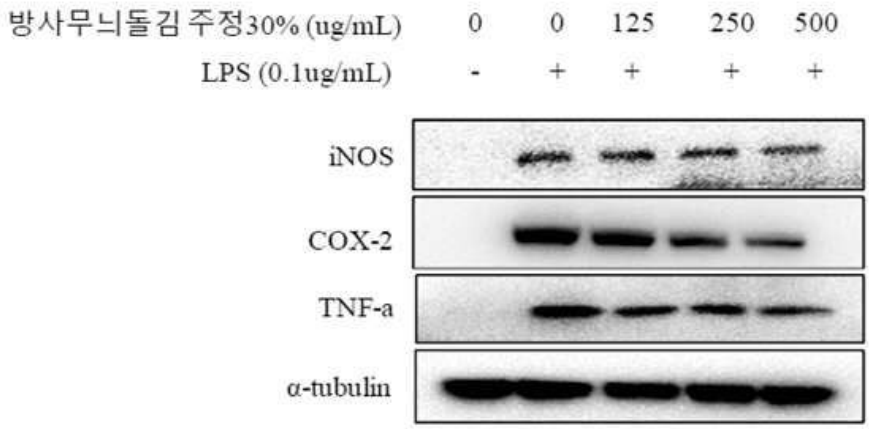
도면1



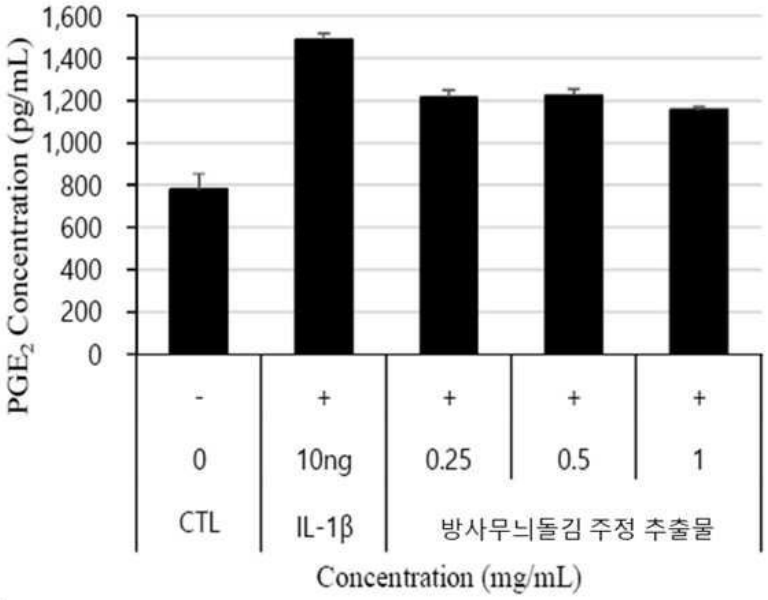
도면2


NO production (uM)
40
30
20
10
0
**
***
con
0
125
250
500
LPS
LPS
Concentration (ug/mL)

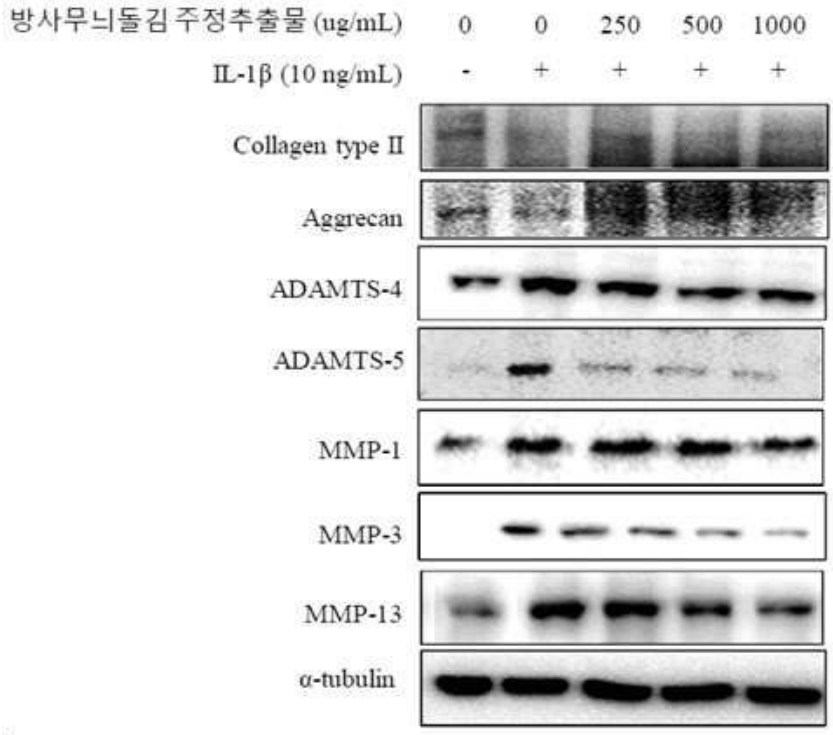
도면3


방사무늬돌김 주정30% (ug/mL) 0 0 125 250 500
LPS (0.1ug/mL) - + + + +
iNOS
COX-2
TNF-a
α-tubulin

도면4


1,600
1,400
1,200
1,000
800
600
400
200
0
PGE2 Concentration (pg/mL)
-
+
+
+
+
0
10ng
0.25
0.5
1
CTL
IL-1β
방사무늬돌김 주정 추출물
Concentration (mg/mL)

도면5


방사무늬돌김 주정추출물 (ug/mL)
0
0
250
500
1000
IL-1β (10 ng/mL)
-
+
+
+
+
Collagen type II
Aggrecan
ADAMTS-4
ADAMTS-5
MMP-1
MMP-3
MMP-13
α-tubulin