(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0065458
(43) 공개일자 2018년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/23 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/23 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0166356
(22) 출원일자 2016년12월08일
심사청구일자 2016년12월08일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
주식회사씨에스텍
광주광역시 북구 첨단벤처소로38번길 27-3 (월출동)
(72) 발명자
김춘성
광주광역시 남구 서문대로 678번길 7 대주1차아파트 101동 1002호
문성민
광주광역시 서구 풍암순환로 86 삼능남양아파트 102-1603
(74) 대리인
최석진

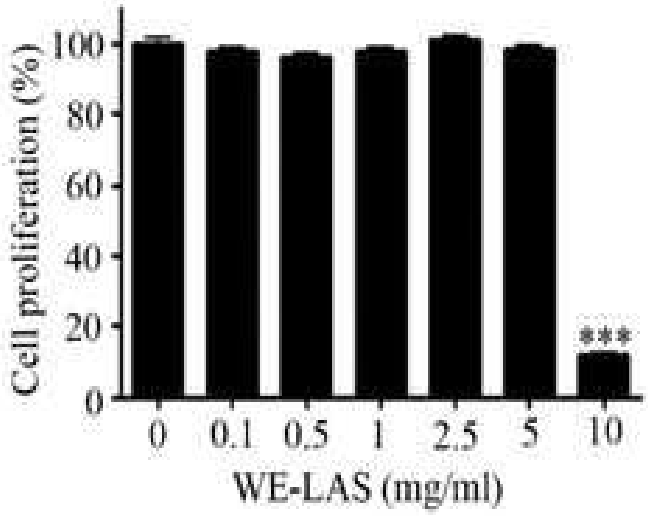
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 관절염 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 염증성 사이토카인 억제 및 관절 기질 물질 보호 효과를 가진 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물을 제공함으로써, 예방 및 치료가 용이하지 않았던 류마티스성 또는 퇴행성 관절염의 치료 및 예방에 부작용이 적고 효능이 뛰어난 기능성 조성물을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
Y10S 514/825 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

전호 잎 열수 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 0.1 내지 99.9 중량 %의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하며 상기 전호 잎 열수 추출물은 IL-1β로 염증 반응을 유도한 백서의 연골세포에서 염증성 사이토카인 IL-1b, TNF-a, IL-6의 발현을 감소시키는 작용을 갖는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하며 상기 전호 잎 열수 추출물은 염증발현 단백질 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시키는 작용을 갖는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하며 상기 전호 잎 열수 추출물은 PPAR-g의 발현을 증가시켜 염증인자인 NO나 PGE2의 생산을 감소시키는 작용을 갖는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 조성물.

청구항 6

전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하며 상기 전호 잎 열수 추출물은 Aggrecanase-1, Aggrecanase-2, MMP-3의 발현을 감소시켜 관절의 기질구성물질인 Aggrecan을 안정화 시키며, MMP-2, MMP-9의 발현을 감소시킴으로써 기저막 구성성분인 gelatin의 분해를 억제하는 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관절염은 류머티스성 또는 퇴행성 관절염인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 조성물.

청구항 8

전호 잎 열수 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조성물은 0.1 내지 99.9 중량 %의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 전호 잎 추출물(WE-LAS)이 백서의 연골 구성물질의 분해 억제 및 연골재생 효능을 나타내고, 염증성 싸이토카인 및 매개인자들의 억제에 탁월한 효과를 갖는 관절염 예방 및 치료용 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다

배 경 기 술

[0002] 관절염은 관절에 염증 및 통증이 발생되어 생기는 질환으로서, 퇴행성 관절염(osteoarthristis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 통풍, 건성 관절염이 있으며, 관절염 환자의 95%가 퇴행성 관절염을 앓고 있다. 퇴행성 관절염(degenerative arthritis)은 관절 연골이 닳아 없어지면서 국소적인 퇴행성 변화가 나타나는 질환으로서, 골관절염(osteoarthritis)이라고도 한다. 퇴행성 관절염은 노령화와 밀접한 연관을 갖는 대표적인 퇴행성 질환으로, 전 인구의 10~15% 정도가 앓고 있으며, 특히 65세 이상의 고령인구 중 60~80% 정도가 퇴행성 관절염을 앓고 있다.

[0003] 퇴행성 관절염의 원인은 노화 현상이나 과다한 체중과 관계가 깊으며, 나이가 많아질수록 여성에게서 더 많이, 그리고 더 심하게 나타난다. 초기 증상은 한개 또는 두개의 관절이 강직과 함께 쑤시는듯한 동반통증이 나타나며, 장기화되면 관절 주변에 골의 과잉형성 및 관절의 변형 등을 초래하게 된다. 퇴행성 관절염이 유발되는 기전으로는 TNF-α, IL-1β, IL-6와 같은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 생성이 증가하고 콜라게네이즈(collagenase), 스트로멜라이신(stromelysin) 등과 같은 MMPs의 분비가 증가되어 관절연골의 손상을 유발한다.

[0004] 이처럼 퇴행성 관절염은 만성적인 질환으로 근본적인 치료 요법이 없기 때문에 통증의 완화 및 연골손상 방지를 주된 치료 목적으로 하며, 현재는 관절경 수술, 경골 근위부 절골술, 관절부분 치환술, 슬관절 전치환술 등과 같은 외과적 치료에 의하거나 비스테로이드성 항염증제(NSAID), 진통제, 코르티코스테로이드, 관절강 내 하이알루론산 주사 등의 관절염 약물 치료제가 관절염의 치료에 사용되고 있다.

[0005] 약물 치료제 중 비스테로이드성 항염제는 통증을 감소시켜서 신경관절을 편안하게 하고 염증을 완화시키는 효과가 있으나, 위장장애가 나타나거나 복통을 유발하며, 스테로이드성 항염제는 그 효과에 비해 체중 증가나 고혈압 등의 부작용이 심각하고, 단순히 통증을 일시적으로 감소시켜 과잉 사용을 유도할 소지가 있으며, 이는 신경관절을 파괴하고 장애를 악화시키는 요인이 되기 때문에 사용에 주의를 요한다.

[0006] 따라서 관절염 등의 관절손상에 사용되는 종래의 치료법은 한정적인 유효성을 갖고, 명백한 유독성 부작용을 수반하며, 장기간 동안 지속적으로 사용할 수 없어 그 유효성이 제한되므로, 기존의 치료법이 갖는 단점을 극복한 새로운 신규 치료법 내지는 치료제가 절실히 요구되고 있는 실정이다

[0007] 류마티스 관절염은 다발성 관절염을 특징으로 하는 염증성 질환으로서, 자가면역현상이 주요 기전으로 알려져 있다. 증상을 살펴보면, 관절 활막(synovial membrane) 조직에 염증이 발생하여 대식세포, 수상세포 및 T 림프구, B 림프구 등이 활막 조직으로 이동하고, 그 결과 관절액(synovial fluid)이 증가하여 관절이 부으면서 통증이 나타나게 된다. 염증이 지속되면서 염증성 활막조직이 증생(hyperplasia)하게 되면 뼈와 연골을 파괴하여 관절 구조가 변형되고 운동 장애가 발생된다.

[0008] 류마티스 관절염에서도 TNF-α, IL-1β 등의 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 생성이 증가하여 MMPs의 분비가 증가됨으로써, 관절연골을 구성하는 콜라겐(collagen)과 프로테오글리칸(proteoglycan)을 파괴하여 관절연골을 손상시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 관절염 치료제를 천연물 소재로 개발하고 있는 것으로는 대부분 추출물을 이용하여 제품화하고 있어 정확한 작용기전이 밝혀져 있지 않으나, 대부분 경구제로서 복용이 용이하고 장기간 복용을 할 수 있어 그 개발이 활발하게 이루어지고 있다.

[0009] 현재까지 개발되고 있는 소재로는 관절액과 성분이 유사한 히알우론산을 주사하거나 건강보조식품으로 글루코사민, 콘드로이틴을 함께 복용하기도 하며, 생약등의 소재로 동의보감 등의 기성 한약서에 사용되고 있는 천연물을 이용하여 개발하고 있다.

[0010] 한편 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)는 다년생 초본으로 높이는 70-100cm 정도이며 개화기는 5~6월에 꽃이 피고 흰색이며 5~12개의 꽃 이삭가지가 있으며, 결실기는 7-8월이다. 뿌리는 방추형으로 길이는 3-10cm, 지름은 7-15cm로 겉은 흑갈색이고 꺾인 면은 회백색이며 맛이 조금 쓴 것이 특징이다.

[0011] 전호는 흑산도를 중심으로 경상도 및 전라도의 남부지역에서 많이 재배되고 있으며, 울릉도 지역에서도 재배되거나 자생되고 있으며, 일본, 중국, 시베리아, 동유럽에 분포되어 있다. 전호는 겨울 동안 눈 속에서 싹을 틔어 눈이 녹으면 가장 먼저 수확되는 울릉도의 대표적인 봄나물로써 뿌리부분은 한약재로 사용되고 있으며, 어린잎은 독특한 향과 쌉싸래한 맛이 있어 각광 받는 나물이다. 어린잎을 먹는 방법으로는 생채로 먹거나 데쳐서 나물로 먹기도 하며 요즘은 장아찌로 만들어 제품으로 판매되고 있다.

[0012] 전호는 한의학적으로 해열, 거담, 진해, 감기로 인한 기침, 천식, 두통을 치료하는 진통제로 사용되고 있으며, 알려진 성분으로는 anthricin, isoanthricin, podophyllotoxin, angeloyl podophyllotoxin, morelensin, yatein, 7-hydrxyyatein, anhydropodorhizol, arctigenin, bursehernin 등을 비롯한 lignan 계열의 물질, praeruptorinsA, B, C, E, qianth coumarin D, acetyl angeloyl khellactone, acetyl tigloyl khellactone, decursin, nodakenin 등의 coumarin 계열 물질 등이 있다. 특히 lignan 계열물질로 알려져 있는 anthricin은 다양한 암세포주에서 항암효과가 있을 뿐만 아니라 UV에 의한 피부색소 침착 또한 억제하는 것으로 알려져 있다.

[0013] 또한 전호로부터 분리된 화합물의 미백효과 연구에서 IBMX 자극에 의한 B-16 mouse melanoma cell lines 에서의 melanin 생성억제 활성을 보였으며, 자외선에 의해 영향을 받는 광노화보다는 노화에 의해 콜라겐 생합성율이 감소되는 내인성 노화에 훨씬 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0014] 그러나 이러한 전호의 약용성분이 효과를 발휘하는 기작과 범위는 아직 구명되고 있지 않아 이러한 전호의 약용성분을 특정하고 그 약리기작을 구명한다면 우리나라 자생 약용식물인 전호의 약학적 적용범위를 넓혀 현대인의 질병퇴치와 예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-0840723호에는 전통적으로 동양에서 사용해 온 약용식물인 감수(Euphorbiae kansui), 전호 (Anthriscus sylvestris), 파두 (Croton Tiglium), 천오(Aconitum carmichaeli), 팥꽃나무 (Daphne genkwa), 갯메꽃 (Calystegia soldanella), 사람주나무 (Sapium japonicum)로부터 베타2 수용체의 활성을 촉진하여 천식 질환의 증상인 기도관 수축을 완하시킬 수 있는 활성 추출물과 이를 효율적으로 추출하는 방법, 그리고 그 추출물들을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 및 치료의 원료, 건강식품, 생약제에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허공보 제10-1429197호에는 전호 (Anthriscus sylvestris) 추출물 및 이로부터 분리한 팔카린디올 (falcarindiol) 또는 디옥시포도필로톡신 (deoxypodophyllotoxin)을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물에 관한 것으로, 전호 추출물 및 이로부터 분리한 팔카린디올 (falcarindiol) 및 디옥시포도필로톡신(deoxypodophyllotoxin)은 헬리코박터 파이로리균, 황색포도상구균 및 대장균에 대한 강한 항균활성을 나타냄으로써, 병원성 세균에 의해 발생하는 질병의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 전호 추출물을 포함하는 항균 조성물에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허공보 제10-0500642호에는 Umbelliferae) 추출물, 정력자(Lepidium apetalum Wild.) 추출물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하여 부작용 없이 피부색소침착을 억제하는 피부 미백용 화장료 조성물에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0004) 대한민국 공개특허공보 제10-2005-0084724호에는 항염증 및 항알러지 활성을 갖는 전호(Anthriscus sylvestris Hoffm.)로부터 분리된 안스리신을 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 상세하게는 본 발명의 안스리신은 각종 염증 및 알러지 질환의 원인이 되는 PAF의 생성을 억제하며, 시클로옥시게나제-2 및 리폭

시게나제(5-LO)의 활성을 저해하여 에이코사노이드(eicosanoid)의 생성을 방지함과 동시에 비만세포로부터 히스타민(histamin)의 방출을 억제하므로, 본 발명의 전호로부터 분리된 안스리신을 포함하는 조성물은 각종 염증 또는 알러지성 질환의 예방 및 치료를 위한 의약품 또는 건강기능식품에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0005) 그러나 상기 선행기술들은 본 발명에서 목적으로 하는 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물과는 발명의 구성과 효과에서 차이가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 최근 각종 질병의 예방 및 치료용 천연생리활성 물질을 약용식물에서 찾고자 하는 노력이 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 새로운 천연생리활성 물질의 탐색 및 활용을 위한 연구개발 노력이 급격히 증대되고 있는 가운데, 최근 기침, 천식 및 후두염 등의 치료제로 안전하게 사용될 뿐만 아니라 항암, 항균 미치 면역유도물질 등 약학적 기능이 속속 밝혀지고 있는 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)의 약용성분을 확인하고 그 기작을 구명하여 약용식물로서의 전호의 이용을 확대하여 현대인의 질병퇴치와 예방 및 치료 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물을 제공하는데 목적이 있으며, 상기 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 염증성 사이토카인을 억제 및 관절 기질물질 보호와 관련된 것으로, 전호 잎 추출물(WE-LAS)이 IL-1β로 염증 반응을 유도한 백서의 연골세포에서 염증성 사이토카인 IL-1b, TNF-a, IL-6와 염증발현 단백질(iNOS 및 COX-2)의 발현을 감소시키고, PPAR-g의 발현을 증가시켜 염증인자인 NO나 PGE2의 생산을 감소시킨다.

[0018] 또한 Aggrecanase-1, Aggrecanase-2, MMP-3의 발현을 감소시켜 관절의 기질구성물질인 Aggrecan을 안정화 시키고, MMP-2, MMP-9의 발현을 감소시킴으로써, 기저막 구성성분인 gelatin의 분해를 억제하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 또다른 실시예로서 전호 잎 열수 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품조성물을 제공한다. 상기 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 관절염 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품조성물은 0.1 내지 99.9 중량 %의 양으로 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물을 이용하여 원인파악 및 치료가 용이하지 않았던 류마티스성 또는 퇴행성 관절염의 예방 및 치료에 부작용을 줄이면서 아울러 효율적인 기능을 수행할 수 있는 기능성 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 백서로부터 연골세포를 수득하여 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 농도 별로 처리한 뒤, 세포의 독성을 확인한 그래프이다.

도 2는 연골세포에 염증 반응을 유도하여 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 염증 반응 감소 효과를 확인한 그래프이다.

도 3은 연골세포에 염증 반응을 유도하여 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 염증 반응 인자를 확인한 그래프이다.

도 4는 연골세포에 염증 반응을 유도하여 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 관절염 관련 인자를 확인한 그래프이다.

도 5은 연골세포에 염증 반응을 유도하여 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 gelatinase의 활성을 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 전호 잎 추출물(WE-LAS)이 IL-1β로 염증 반응을 유도한 백서의 연골세포에서 염증성 사이토카인 IL-1b, TNF-a, IL-6와 염증발현 단백질(iNOS 및 COX-2)의 발현을 감소시키고, PPAR-g의 발현을 증가시켜 염증인자인 NO나 PGE2의 생산을 감소시키며, 또한 Aggrecanase-1, Aggrecanase-2, MMP-3의 발현을 감소시켜 관절의 기질구성물질인 Aggrecan을 안정화 시키고, MMP-2, MMP-9의 발현을 감소시킴으로써 기저막 구성성분인 gelatin의 분해를 억제하는 효과를 확인하였다. 본 발명의 실험에 앞서, 구체적인 재료 준비 및 방법을 상세히 설명한다.

[0023] **Ⅰ. 실험 재료 준비 및 방법**

[0024] 1. 전호 잎 열수추출물의 제조

[0025] 전호(*Anthriscus sylvestris Hoffmann*) 잎을 준비한다. 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 희석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 물일 수 있다. 상기 추출과정은 예를 들어, 50℃ 내지 150℃, 또는 75℃ 내지 120℃, 또는 90℃ 내지 110℃ 에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간, 또는 30분 내지 6시간, 또는 2시간 내지 4시간일 수 있다.

[0026] 본 발명의 전호 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 열수추출법을 포함한 열 추출법, 냉침 추출법, 온침추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파 분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다.

[0027] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일 예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[0028] 2. 초대 연골세포 분리 및 세포배양

[0029] 실험을 위한 chondrocytes는 rat의 primary culture를 통해 얻었고, primary culture의 진행은 다음과 같다. 연골 채취를 위한 실험동물은 ㈜ DBL 로부터 공급받은 생후 5일령 male Sprague-Dawley rat을 안락사 시킨 후, 피부를 소독하여 절개하고 관절연골을 채취한다. 채취한 연골조직은 phosphate buffer saline(PBS)용액으로 3번 세척하고 1% collagenase, 0.1% Trypsin EDTA와 DEME/F12 배지에 넣고 1시간 동안 37℃, 5% CO_2인큐베이터에 배양시킨다. 조금 더 정밀하게 연골조직만 분리하여 PBS로 3번 세척한 후 1% collagenase와 DEME/F12 배지에 넣고 6시간 동안 37℃, 5% CO_2인큐베이터에 배양시킨다. 40 uM cell strainer로 필터한 후 연골세포 수를 측정하여 10 % 혈청, 1% penicillin-Streptomycin 및 Ascobic acid가 포함된 DMEM/F12 배양배지에 넣고 초대 배양하였다.

[0030] 3. 세포성장 억제의 평가

[0031] 백서의 초대 연골세포를 24 well에 5 X 10^5세포를 분주하여 24시간 배양한 후, 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 다양한 농도 (0.1 ~ 10 mg/ml)로 24시간 처리한 후, 3-(4,5 dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)용액을 사용하여 세포독성 실험을 수행하였다. 간략하게 말하면, 마우스의 비장세포에 갯방풍 추출물을 24시간 동안 반응시킨 후, MTT stock solution(5 mg/mL)을 더해 37℃, 5% CO2 인큐베이터에서 4시간 동안 반응시키고, Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 넣어 녹인 후 560 nm에서 살아있는 세포에 대한 반응을 확인하였다.

[0032] 4. NO assay

[0033] 연골세포를 24 well에 5 X 10^5세포를 분주하여 24시간 배양한 후 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 처리하고 1시간 후 IL-1b (10 ng/ml) 처리하여 24시간 배양 후에 상층액 100 ul를 새로운 96 well plate에 넣고 Griess reagent 100 ul/well 첨가 후 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

[0034] 5. PGE2 ELISA

[0035] 연골세포를 24 well에 5 X 10^5세포를 분주하여 24시간 배양한 후 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 처리하고 1시간 후 IL-1b (10 ng/ml) 처리하여 24시간 배양 후에 상층액 100 ul를 R&D ELISA kit (prostaglandin E2; KGE004B)를 이용하여 R&D Systems의 General ELISA Protocol을 따라서 실험을 진행하였다.

[0036] 6. RT-PCR

[0037] 연골세포에 TRIzol reagent 를 처리하여 RNA를 분리하고, 1 ㎍의 총 RNA에 대한 역전사(reverse transcripti o)는 oligo(dT)18 프라이머, dNTP(10mM), 0.1 M 디티오트레이톨 (DTT, dithiotreitol), 역전사효소 RNase 저해제가 포함된 완충액을 첨가하여 42℃ 에서 60분간 수행하였다. 상기에서 합성된 각각의 cDNA로 하기 표 1 및 서열번호 1 내지 16에 기재된 프라이머 들을 이용한 중합효소 연쇄반응(PCR; Polymerase Chain Reaction)은 각각의 cDNA 1 ㎍, 2.5 unit의 Taq 중합효소(Enzynomics), 1.5 mM dNTP, 1x 완충액과 각 프라이머쌍 20 pmol씩을 섞고 증류수로 총 부피를 20 ㎕로 맞춘 다음 PCR 기계(SimpliAMP, Applied biosystems)를 이용하여 하기의 과정으로 PCR을 실시하였다.

[0038] 94℃에서 5분간의 열변성 (denaturation) 후, 94℃에서 30초, 55~65℃에서 60초, 72℃에서 60초를 1회로 하여 25~35회 반응시켰고, 최종 증폭(last extension)은 72℃에서 5분간 수행하였다. PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% 아가로스 겔에 Staining Star를 첨가하여 전기영동 하고 UV 하에서 특정 밴드(band)를 확인하였다.

표 1

[0039] RT-PCR용 primer 서열

유전자	프라이머의 서열 (5 - 3)	
	정방향	역방향
GAPDH	TGGTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC	AGACAACCTGGTCCTCAGTGTAGC
IL-1b	TCGTGCTGTCTGACCCATGT	TGCTCTGCTTGAGAGGTGCT
TNF-a	CCCAGACCCTCACACTCAGAT	TTGTCCCTTGAAGAGAACCTG
IL-6	CTCTGGTCTTCTGGAGTTCCGT	TGGTCCTTAGCCACTCCTTCTG
COX-2	CCCTTCCTCCTGTGGCTGAT	CCCAGGTCCTCGCTTCTGAT
PPAR-g	TGCTGGCCTCCCTGATGAAT	CAGTAGCTGCACGTGCTCTG
iNOS	GCATCGGCAGGATTCAGTGG	TAGCCAGCGTACCGGATGAG
Aggrecan	ACAGTGAGCTCAGGCTTGCCTGTA	GTGACATCCTCTACACCTGAAGCA
Aggrecanase-1	GGTGCTTTGGCCACCTCAAT	ACCACCTCCACAAGTCCTGG
Aggrecanase-2	ACACCTGCGTATTTGGGAACCCA	GTGTCTGACCAAGAAGTTGCCTGC
MMP-3	TCCTACCCATTGCATGGCAGTGAA	GCATGAGCCAAGACCATTCCAGG
MMP-2	TGACGGCTTCCTCTGGTGTT	TAATCCTCGGTGGTGCCACA
MMP-9	GGAGGGAAGGCTCTGCTGAT	TGGTTCACCCGGTTGTGGAA

[0040] 7. Western blot

[0041] 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 처리한 연골세포를 PBS로 세척한 후, 용해버퍼 (50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 ㎍/㎖ aprotinin, 25 ㎍/㎖ leupeptin)를 첨가하여 30분간 4℃에서 용해시킨 후, 4℃ 및 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다.

[0042] Pierce BCA protein assay kit(Thermo Fisher Scientific)을 이용한 단백질 농도를 정량하여 20 ㎍를 10% mini gel SDS-PAGE에 로딩하고 변성 분리하여, 이를 nitrocellulose 멤브레인(membrane, BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 350 mA 조건에서 1시간 동안 이동(transfer)시켰다. 상기 단백질을 이동시킨 멤브레인(membrane)의

blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(0.1% Tween 20 + TBS)용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다.

[0043] 1차 항체로는 anti-iNOS, Aggrecanase-2, MMP-3는 Santa Cruz에서 구입하였고, GAPDH는 Abcam에서 구입하여 1:1000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBS-T로 5회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP가 결합된 anti-rabbit IgG(Abcam)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBS-T로 3번 세정하였다. ECL 기질(amersham Biosciences)과 30초간 반응 후 화학발광이미지 시스템(Microchemi 4.2, DNR Bio-imaging systems)을 이용하여 발연 양을 측정하였다.

[0044] 8. Gelatin zymography

[0045] MMPs 활성을 조사하기 위하여 연골세포에 전호 잎 처리 후, conditioned medium을 0.2% 젤라틴이 포함된 SDS-PAGE에서 전기 영동한 후, renaturing buffer(2.5% Triton X-100)로 30분씩 2번 씻은 뒤, 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 0.15 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl2, 0.02% Brij35를 포함하는 developing buffer로 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 젤은 0.25% coomassie brilliant blue solution으로 2시간 동안 염색을 한 후, 탈색하여 젤라틴의 분해 정도를 관찰하였다.

[0046] 9. 통계적 유의성 평가

[0047] 실험결과는 평균 표준편차로 표기하였고, 그 결과들은 차이를 분석하기 위하여 GraphPad Prism을 이용하여 Tukey's Multiple Comparison test를 이용한 variance(1 way ANOVA)로 분석하였다. p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

[0048] **Ⅱ. 실험결과**

[0049] 1. 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 농도별 세포 독성 확인 실험 결과

[0050] 생후 4일 된 백서의 관절에서 분리한 연골세포에 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 처리하여 세포독성을 확인하였다. 전호 잎 추출물(WE-LAS)은 0.1 - 10 mg/mL 농도로 세포독성 실험을 진행하였으며, 10 mg/ml 농도에서만 세포 독성이 나타나는 것을 확인할 수 있다.

[0051] 2. 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 염증 반응 실험 결과

[0052] 연골세포에서 전호 잎 추출물(WE-LAS) 처리에 의한 염증 반응 감소 효과를 규명하기 위해, 연골세포에 IL-1b 처리하여 염증반응에 대한 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 반응을 확인하였다. 연골세포에 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 처리하고 1시간 후, IL-1b를 처리하여 염증반응 유도하고 24시간 후 배양액을 사용하였다. (A)는 연골세포가 생산한 일산화질소 (NO)값을 Griess reagent를 이용하여 확인하였다. (B)는 연골세포가 분비한 PEG2를 ELISA를 이용하여 측정하였다. 이처럼 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 처리하면, IL-1b에 의해 증가한 (NO)값과 PGE2가 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있다.

[0053]

[0054] 3. 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 염증 반응 인자 확인 실험 결과

[0055] (NO)는 Nitric oxide synthases(NOSs)에 의해 생성되는데, 이중 inducible NOS(iNOS)는 염증성 싸이토카인 등 다양한 인자의 자극에 의해 발현 조절되는데, 연골세포에 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 처리하고 1시간 후 IL-1b를 처리하여 24시간 반응시킨 후 RNA 및 protein을 분리하여 (A) 염증성 싸이토카인 IL-1b, TNF-a, IL-6, 염증발현 단백질 COX-2, 그리고 항염증 효과를 나타내는 PPAR-g의 발현을 RT-PCR로 확인하였다. (B) iNOS의 발현을 RT-PCR과 Western blot으로 확인하였다. 전호 잎 추출물(WE-LAS)은 IL-1b, TNF-a, IL-6와 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시키고, PPAR-g의 발현은 농도 의존적으로 증가시키는데, 그 결과 iNOS의 mRNA 및 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있다.

[0056] 4. 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 관절염 관련 인자 확인 실험 결과

[0057] 관절의 기질 구성물질인 Aggrecan(proteoglycan)과 기질을 분해하는 Aggrecanase-1(ADAMTS-4), Aggrecanase-2(ADAMTS-5) 및 MMP-3의 발현 정도를 확인하는 실험을 진행하였다. 연골세포에 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 처리하고 1시간 후, IL-1b를 처리하여 24시간 반응시킨 후, RNA 및 protein을 분리하여 (A) 기질 구성성분인 Aggrecan 및 이러한 기질을 분해하는 효소인 Aggrecanase-1, Aggrecanase-2, MMP-3의 발현을 RT-PCR로 확인하였다. (B) Aggrecanase-2, MMP-3의 발현을 Western blot으로 확인하였다. 전호 잎 추출물(WE-LAS)은 Aggrecanase-1, Aggrecanase-2, MMP-3의 mRNA 및 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시키고 그 결과로 Aggrecan의 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있다.

[0058] 5. 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 gelatinase 활성 확인 실험 결과

[0059] 기저막(Basement membrane)의 주요성분은 gelatin이며, MMP-2, MMP-9은 기저막을 분해하는 gelatinase로서, 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 기저막 분해 억제 효능을 확인하였다. 연골세포에 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 처리하고 1시간 후, IL-1b를 처리하여 24시간 반응시킨 후, RNA를 분리하여 (A) MMP-2, MMP-9 의 발현을 RT-PCR로 확인하였다. (B) 연골세포 배양액을 젤라틴 자이모그래피(gelatin zymography) 기법을 이용하여 전호 잎 추출물(WE-LAS)의 효과를 확인하였다. IL-1b에 의해 발현이 증가하는 MMP-2, MMP-9는 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 처리하면 mRNA 발현이 감소하고 젤라틴 자이모그래피에서 젤라틴 분해능이 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있다.

[0060] 이상의 실험 결과를 통하여, 전호 잎 추출물(WE-LAS)은 생물학적으로 안전하며, NO 활성을 억제하며, 염증반응과 조직손상에 관여하는 효소인 iNOS, 염증관련인자인 PGE2 생성에 관여하는 COX-2, 전염증성 사이토카인인 TNF-α과 같은 관절연골퇴행성유도 물질의 발현을 억제하고, 관절연골퇴행성효소인 MMP-2 및 MMP-2의 발현을 억제한다는 것을 밝혔다. 또한 관절연골을 구성하는 물질인 aggrecan을 포함하는 proteoglycan 및 collagen type II의 발현을 유도함으로써, 전호 잎 추출물(WE-LAS)이 퇴행성 및 류머티스 관절염의 치료와 예방 효과를 확인하였다.

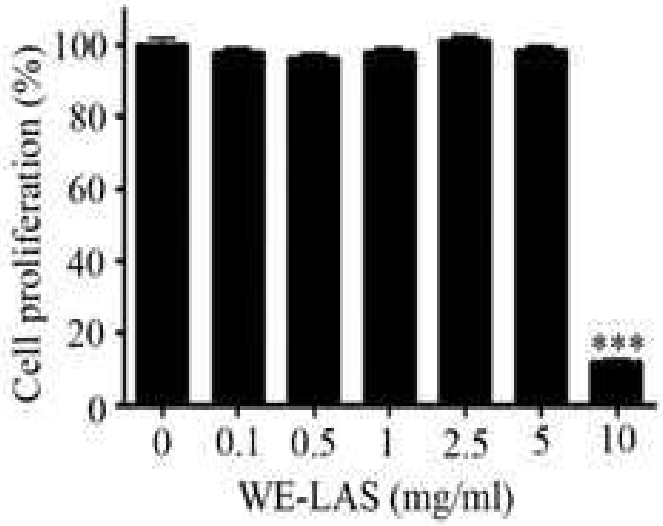
[0061] 따라서 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물 및 건강 기능성 식품으로 제조할 수 있으며, 이의 복용을 통하여 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염의 치료와 예방에 효과가 있을 것으로 판단된다.

산업상 이용가능성

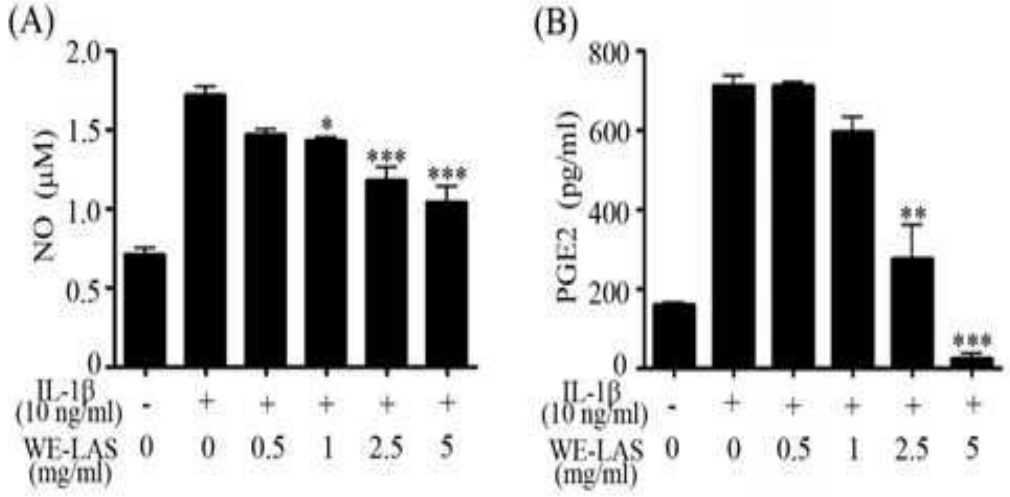
[0062] 본 발명은 국내 전지역에 자생하는 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)에서 유래한 전호 잎 추출물(WE-LAS)을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물을 이용하여 퇴행서관절염에 예방 효과가 있는 식품 조성물을 제공함으로써 현대 발병원인을 찾기 어렵고 이에 따라 효율적인 임상 치료제가 마땅치 않아 물리치료와 통증경감 등에 의존하며 근본적인 치료에 어려움을 겪는 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염의 치료와 예방을 도모하여 현대인의 질병 퇴치와 예방 및 건강 증진에 도움을 줄 수 있다.

도면

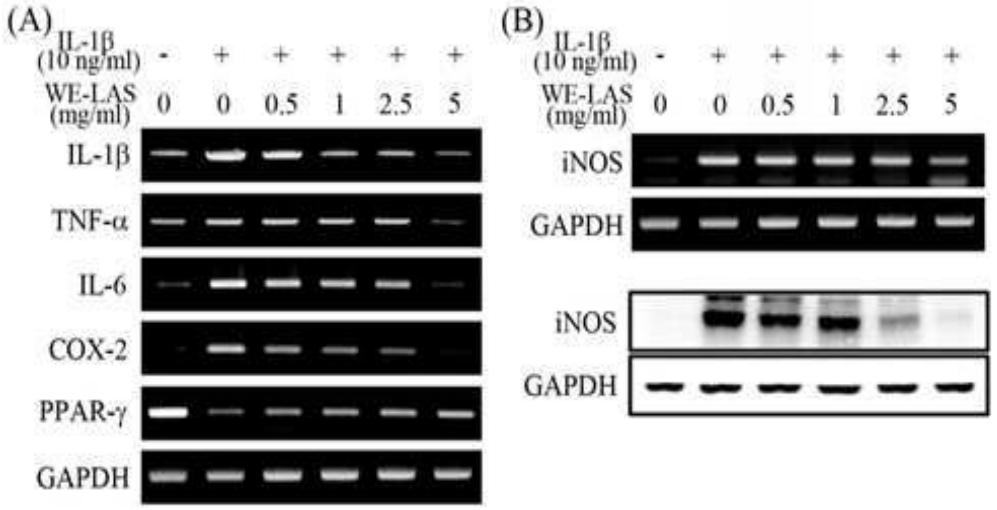
도면1


Cell proliferation (%)
100
80
60
40
20
0
***
0
0.1
0.5
1
2.5
5
10
WE-LAS (mg/ml)

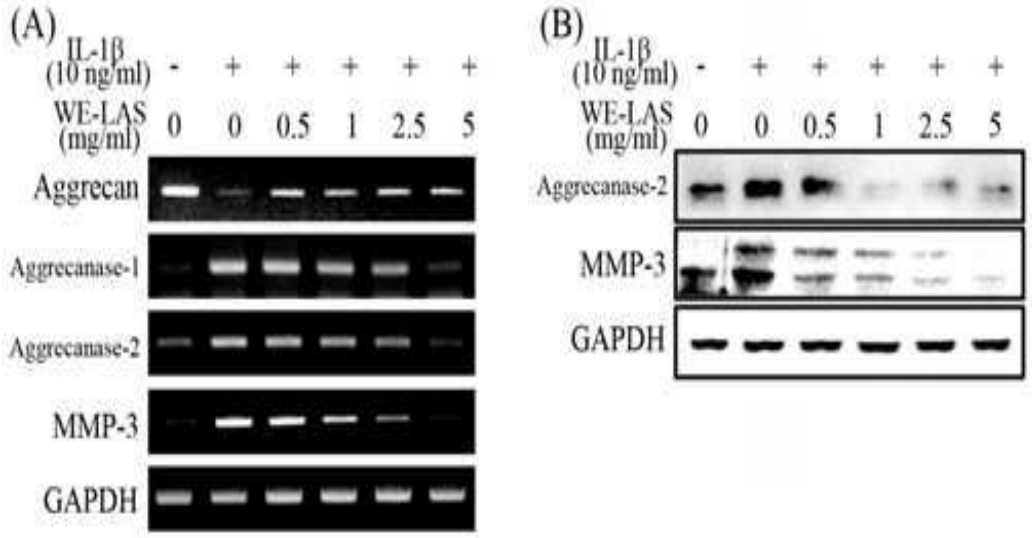
도면2


(A)
NO (μM)
2.0
1.5
1.0
0.5
0
*
***
***
IL-1β (10 ng/ml) - + + + + +
WE-LAS (mg/ml) 0 0 0.5 1 2.5 5
(B)
PGE2 (pg/ml)
800
600
400
200
0
**
***
IL-1β (10 ng/ml) - + + + + +
WE-LAS (mg/ml) 0 0 0.5 1 2.5 5

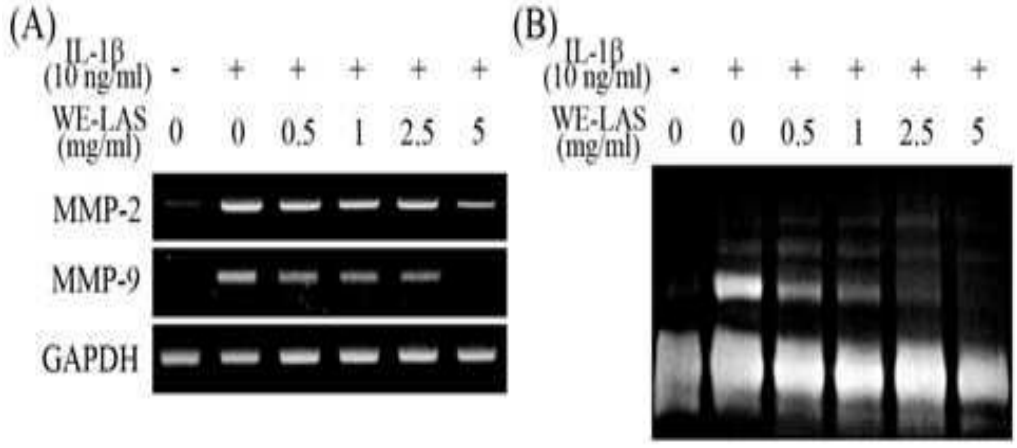
도면3


(A)
IL-1β (10 ng/ml) - + + + + +
WE-LAS (mg/ml) 0 0 0.5 1 2.5 5
IL-1β
TNF-α
IL-6
COX-2
PPAR-γ
GAPDH
(B)
IL-1β (10 ng/ml) - + + + + +
WE-LAS (mg/ml) 0 0 0.5 1 2.5 5
iNOS
GAPDH
iNOS
GAPDH

도면4


(A)
IL-1β (10 ng/ml) - + + + + +
WE-LAS (mg/ml) 0 0 0.5 1 2.5 5
Aggrecan
Aggrecanase-1
Aggrecanase-2
MMP-3
GAPDH
(B)
IL-1β (10 ng/ml) - + + + + +
WE-LAS (mg/ml) 0 0 0.5 1 2.5 5
Aggrecanase-2
MMP-3
GAPDH

도면5


(A)
IL-1β (10 ng/ml) - + + + + +
WE-LAS (mg/ml) 0 0 0.5 1 2.5 5
MMP-2
MMP-9
GAPDH
(B)
IL-1β (10 ng/ml) - + + + + +
WE-LAS (mg/ml) 0 0 0.5 1 2.5 5