



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0036238
(43) 공개일자 2009년04월14일

(51) Int. Cl.

A61K 36/03 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0101294

(22) 출원일자 2007년10월09일

심사청구일자 2007년10월09일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

김문무

부산 수영구 망미2동 1136번지 수영강변3차 이편
한세상아파트301동 401호

이상훈

부산 해운대구 반여1동 롯데낙천대2차 207동 240
1호

김세권

부산 부산진구 연지동 353-1번지
세동한신아파트105동 304호

(74) 대리인

이덕록

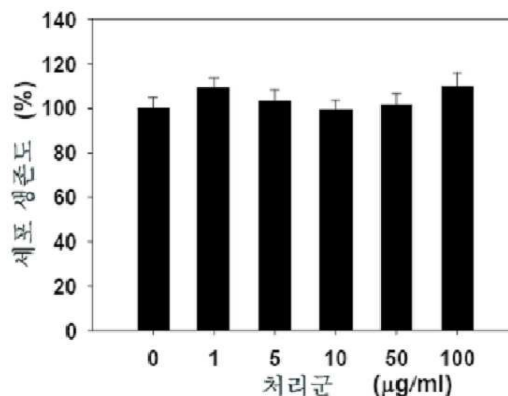
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 항-염증성 활성을 갖는 이시게 오카무라에 추출물

(57) 요약

본 발명은 항-염증 활성을 갖는 이시게 오카무라에(*Ishige okamurae*) 추출물에 관한 것으로, 이는 RAW 246.7 세포에서 NF- κ B의 전사 활성을 억제하고, 염증 매개체인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂의 생성을 억제하여 염증성 질환의 치료에 효과가 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

RAW 246.7 세포에서 NF- κ B의 전사 활성을 억제하고, 염증 매개체인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂의 생성을 억제하여 항-염증 활성을 갖는 이시게 오키무라에(*Ishige okamurae*) 추출물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물이 에탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 이시게 오키무라에 추출물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 이시게 오키무라에 추출물을 유효성분으로 함유하는 항-염증성 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 이시게 오키무라에 추출물이 1 내지 1000mg/mL로 함유되는 것을 특징으로 하는 항-염증성 약제학적 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 항-염증 활성을 갖는 이시게 오키무라에 추출물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 RAW 246.7 세포 (Abelson murine leukemia virus-induced tumor, a macrophage cell line) 세포에서 NF- κ B의 전사 활성을 억제하고, 염증 매개체인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂의 생성을 억제하여 항-염증 활성을 갖는 이시게 오키무라에(*Ishige okamurae*)에 추출물에 관한 것이다.

배 경 기 술

- <2> 염증은 생물학적, 화학적 또는 물리적 자극과 관련된 상체에 대한 유기체의 반응이다. 급성 염증에 있어, 이러한 반응은 침입 유기체를 비활동성(inactivate)으로 만들거나 박멸하고, 자극물을 제거하며, 최종적으로 조직 재건을 위한 상태로 만들기 위한 것이다. 그러나, 만성 염증에 있어서는, 이러한 반응은 치주 질환(periodontal disease), 대장염(colitis), 관절염(arthritis), 동맥경화증(atherosclerosis), 알츠하이머 질환(Alzheimer), 천식(asthma), 다발성 경화증(multiple sclerosis) 및 염증성 내장 질환(inflammatory bowel disease)과 같은 다발성 질환에서 수반된다(Balkwill et al., 2004).
- <3> NF- κ B가 면역계에서 가장 중요한 역할을 한다고 알려진 바 있다(Li and Verma, 2002). NF- κ B는 종양 괴사 인자- α (tumor necrosis factor- α), 인터류킨, 사이클로옥시게나아제, 산화 질소 신타아제(nitric oxide synthase)를 포함한 염증에 수반되는 사이토카인과 같은 염증성 매개체 및 작동체 효소의 발현을 조절한다고 보고되었다(Bonizzi et al., 2004). 종래의 문헌에는 염증성 매개체들 중 상기와 같은 사이토카인이 콜라겐 및 피브로넥틴과 같은 세포외 매트릭스를 퇴화시키는 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)를 유도한다는 사실이 나타나 있다(Lark et al., 1997).
- <4> 또한, NF- κ B는 면역계 외부에서 유전자의 발현을 조절함으로써, 통상의 생리기능 및 질환시의 생리기능의 다양한 측면에서 영향을 끼칠 수 있다. NF- κ B는 핵에서 활성이며, κ B 억제제(I κ B)에 의해 세포질에서 제거(sequestration)됨으로써 억제된다. NF- κ B는 일단 I κ B로부터 방출되면 활성화된다. I κ B 키나아제(IKK)에 의한 I κ B의 인산화는 ubiquitrylation 및 프로테아좀(proteasome)에 의한 퇴화를 일으킨다. 인터류킨-1 및 종양 괴사 인자- α 와 같은 사이토카인은 I κ B의 인산화에 의해 NF- κ B를 활성화시킨다.
- <5> 유리화된 NF- κ B 다이머는 핵으로 전좌되어, 염증에서 중요한 역할을 하는 목적 유전자의 프로모터 또는 인핸서 중의 특정 서열에 결합한다(Karin et al., 2000).
- <6> 최근 들어, 2 종의 염증-관련 암의 마우스 모델이 유전자-전사 인자 NF- κ B 및 종양 괴사 인자- α 로 알려진 염증 매개체를 암 진행과 관련지어졌다(Pikarsky et al., 2004; Greten et al., 2004). 상기 문헌의 간 암의 염

증-관련 모델에 있어서, NF- κ B의 활성화가 종양 발달의 초기 단계에서는 중요하지 않으나, 악성으로 전환단계에서는 치명적이라는 사실이 밝혀졌다. 이에, 임의의 항-염증 치료법이 암 발달의 초기 단계 동안 가장 효과적일 수 있다.

<7> 또한, 다양한 형태의 암에 대한 주요한 위험 인자로서 만성 전염증 및 염증을 확인한 유행병학 연구로부터 염증과 암 사이에 어떠한 관련성이 존재한다는 사실이 보고된 바 있다(Balkwill et al., 2001; Coussens et al., 2007). NF- κ B 전사 인자가 염증 및 선천적 면역에서 주요한 역할을 한다는 사실은 널리 알려져 있다. 종래의 연구는 염증에 있어서 NF- κ B가 최종적으로 성장 신호로서 작용할 뿐만 아니라 아폽토시스의 회피, 무제한 복제 잠재력 및 전이(metastasis)에 영향을 끼친다는 사실이 보고된 바 있다(Garten et al., 2004; Hanaha et al., 2000; Garber et al., 2004).

<8> 따라서, NF- κ B 전사 인자의 활성화를 억제할 수 있는 치료제가 개발된다면, 이러한 치료제가 암 발달 뿐만 아니라 염증 또한 억제할 수 있다고 예상된다. 근래에 이르기까지 다양한 천연 화합물이 잠재적인 항-염증제로서 사용될 수 있다고 보고된 바 있다(Calzado et al., 2007).

<9> 이시게 오카무라에(*Ishige okamurae*, IO; 패)는 좁은 잎과, 두꺼운 외피층, 뽕죽한 정점 및 거친 표면 배열을 갖는다. 이러한 해조는 갈조류이며, 스테아르산, 메틸 미리스테이트 및 팔미트산, (2S)-0-팔미토일-2-0-미리스토일-3-0-(6-술포-알파-D-퀴노보피라노실) 글리세롤 및 그의 유도체를 포함한다고 보고되었다(Zhongguo et al., 2002). 그러나, 항-염증성에 대한 IO 추출물의 효과에 대한 어떠한 정보도 현재까지 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<10> 따라서, 본 발명은 NF- κ B의 활성화를 억제할 수 있는 작용제가 암의 발달을 예방할 수 있다는 점에 착안된 것으로, 본 발명자들은 RAW 246.7 세포에서 NF- κ B 전사 인자를 통해 항-염증성에 대한 IO 추출물의 효과에 대한 연구를 상세하게 수행하여 본 발명에 이르게 되었으며, 이를 통해 NF- κ B의 활성화를 억제할 수 있는 해양 조류를 스크리닝하고, 이시게 오카무라에(*Ishige okamurae*, IO)가 NF- κ B의 활성화를 억제하여 항-염증 효과를 가져온다는 사실을 밝혀냈다.

과제 해결수단

<11> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는 RAW 246.7 세포에서 NF- κ B의 전사 활성을 억제하고, 염증 매개체인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂의 생성을 억제하여 항-염증 활성을 갖는 이시게 오카무라에(*Ishige okamurae*) 추출물(이하 본 발명에서는 IO 추출물이라 칭한다) 제공한다.

<12> 상기 이시게 오카무라에 추출물은 바람직하게는 에탄올 추출물이다.

<13> 또한, 본 발명에서는 이시게 오카무라에 추출물을 유효성분으로 함유하는 항-염증성 조성물을 제공한다.

<14> 본 발명에서는 해양 공급원으로부터 마크로파지에서 항-염증 효과를 갖는 해양 조류를 스크리닝하고, IO 추출물이 마크로파지에서 NF- κ B 전사 인자의 불활성화를 통해 염증 매개체의 생산을 억제할 수 있다는 사실을 최초로 밝혀냈다.

<15> 본 발명에서는 RAW 246.7 세포에서 세포 성장에 대한 IO 추출물의 억제 효과를 평가하였다. IO 추출물은 마크로파지에 대해 어떠한 세포 독성도 나타내지 않았다. 이는 IO가 한국에서 전통 식품으로 오랜 동안 사용되어 왔다는 사실로부터 지지된다. 또한, IO의 에틸 아세테이트 분획이 바이알 효소의 효소 활성을 현저하게 억제하였다는 사실이 보도된 바 있다(Ahn et al., 2002).

<16> 종래의 연구는 IO가 조류(藻類) 조직 성장, 포자 정착, 접합자 형성 및 생식계열의 성장을 강하게 억제하고, 또한 족부 상반(foot repulsion)을 증가시키며, 근육의 미숙한 정착을 억제한다는 사실을 보여주고 있다(Cho et al., 2001). 따라서, IO는 한국에서 식용 해조로 사용되어 왔을 뿐만 아니라 마크로파지에서의 항-염증 효과를 갖기 때문에 만성 염증의 예방 또는 치료하는데 치료적 잠재력을 가질 수 있다.

<17> 본 발명에서는 IO가 만성 염증을 억제할 수 있는지 여부를 조사하기 위하여, 시클로옥시게나아제-2에 의해 합성된 사이토카인 및 PGE₂와 같은 주 염증 매개체의 수준을 만성 염증 반응의 주요 요소(player)인 마크로파지에서 면역분석을 이용하여 측정하였다.

- <18> 또한, 본 발명에서는 IO 추출물이 리포폴리사카라이드에 의해 촉진된 RAW 246.7 세포에서 TNF- α , IL-1 β 및 PGE₂의 발현 수준을 감소시켰고, 이는 마크로파지에서의 만성 염증이 IO 추출물에 의해 억제될 수 있다는 사실을 지시한다. 이는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 염증전 사이토카인이 직장암의 사망률을 50% 이하로 감소시키는 것과 관련된 COX-2의 가장 강력한 유도체였다는 종래의 보고(Marnett et al., 2002)에 의해 지지된다.
- <19> NK- κ B는 다양한 염증의 조절 뿐만 아니라, 정상 및 악성 세포의 아포토시스성 세포 사멸을 조절하는데 있어 절대적인 역할을 한다. 따라서, 이는 항암 및 항염증 전략을 위한 매력적인 목표이다.
- <20> 특히, 아주 다양한 박테리아 및 바이러스가 그를 활성화시킬 수 있기 때문에 이는 종종 면역 반응의 중추 매개체로서 기술되고 있다. NF- κ B의 활성화는 염증 사이토카인, 케모카인, 면역 수용체, 및 세포 표면 유착 분자를 발현시킨다. 위장 악성종양의 발생 및 성장에 있어 염증의 역할을 지지하는 추가의 증거가 NF- κ B의 구성적 발현이 간암(hepatocellular carcinoma) 및 결장암(colorectal cancer)을 포함하는 다수의 위장 악성종양에서 확인되었다는 사실로부터 확인된다(Hoffmann et al., 2007).
- <21> 따라서, IO 추출물이 RAW 246.7 세포에서 NF- κ B의 전사 활성화에 영향을 끼칠 수 있는지 여부를 조사하기 위하여, NF- κ B 결합 위치-루시페라아제를 포함하는 리포터 구조체를 이용한 리포터 유전자 분석을 수행하였다.
- <22> 이로부터 IO 추출물-처리 세포가 TNF- α 처리에 의해 증진된 NF- κ B의 전사 활성을 억제하였다는 사실을 밝혀냈다. 이러한 결과는 염증 매개체의 생성에 대한 IO 추출물의 억제 효과가 마크로파지에서의 염증에 결정적인 역할을 하는 NF- κ B 전사 인자의 불활성화에 의해 얻어진다는 사실을 제안한다. 이는 만성 염증과 NF- κ B 사이의 상관성이 만성 간염(liver inflammation)에서 관찰되었다는 연구(Oakley et al., 2005)에 따른 것이다. 이러한 관찰은 IO 추출물이 만성 염증에 수반되는 NF- κ B 전사 인자의 발현 수준을 감소시킬 수 있다는 사실의 발견에 의해 추가로 확인될 수 있다.
- <23> 핵에서의 NF- κ B의 발현 수준은 농도 의존적 방식으로 현저하게 감소되었다. 이러한 결과는 염증 매개체 수준의 감소가 마크로파지중의 NF- κ B의 불활성화에 기인한 것이었다. 또한, 종래의 연구는 NF- κ B의 활성화가 염증 매개체의 생성에 의한 만성 염증(Sebban et al., 2006) 뿐만 아니라 결장암(Yu et al., 2004)에서도 중요한 역할을 한다는 사실을 보여주었다.
- <24> 골관절염과 같은 만성 염증에 있어, 염증전 사이토카인이 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)를 유도하고, 이는 연골성 세포의 매트릭스(cartilage extracellular matrix)를 방출한다(Dinarello and Moldawer, 1999). 따라서, MMP 발현 및 활성화에 대한 IO 추출물의 억제 효과를 HT1080 세포로부터 조절된 배지중에서 추가로 분석하였다. 종래, 섬유육종(fibrosarcoma) HT1080 세포가 IV형 콜라게나아제, MMP-2 및 MMP-9를 분비하고, 이들 효소가 암 전이에서 주요 역할을 한다는 사실이 보고된 바 있다(Nagase et al., 1998; Yoon et al., 2001).
- <25> IO 추출물은 각각 MMP-2 및 MMP-9 활성화에 대해 용량 의존적 억제 효과를 나타내었다. MMP-9의 젤라티나아제 활성화에 반하여, MMP-2는 각각 젤라틴과 섬유성(fibrillar) 콜라겐을 분해시킬 수 있어, MMP-2를 세포 전이(cellular invasion) 동안 콜라겐의 완전한 소화에 보다 중요하게 한다(Aimes et al., 1995). 따라서, IO 추출물이 암 세포의 전이를 억제하는 탁월한 효과를 갖는다는 사실을 예상할 수 있다.

효 과

- <26> 본 발명의 결과는 IO가 마크로파지에서 NF- κ B 전사 인자의 불활성화를 통해 항-염증 효과를 부여할 수 있다는 최초의 실험적 증거를 제공한다. IO로부터 정제된 단일 활성 성분이 NF- κ B 전사 인자의 활성화를 보다 낮은 농도로 억제하고, 만성 염증 뿐만 아니라 in vivo 모델에서의 전이의 발생빈도를 감소시킬 수 있다는 점을 추가의 연구를 통해 밝혀낸다면 이러한 결과는 귀중한 가치가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <27> 이하에서는 본 발명의 실시를 위한 바람직한 실시예에 대하여 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

<실시예 1>

<29> IO 추출물의 제조

- <30> 갈조류인 이시게 오카무라에(*Ishige okamurae*)를 대한민국 제주도 해안에서 2004년 10월부터 2005년 3월에 걸쳐

수집하였다. 신선한 IO를 수돗물로 3회 세척하여 시료의 표면에 부착되어 있는 염분, 착생식물 및 모래를 제거하고, -20℃로 저장하였다. 냉동 시료를 냉동건조하고, 그라인더로 균질화한 후, 추출하였다. 건조된 IO 분말 1kg을 95% EtOH(1:10 w:v)로 추출하고, 진공에서 증발시켰다. 농축된 IO 추출물을 DMSO에 용해시킨 후 사용하였다.

<31> <실시예 2>

<32> 세포 배양

<33> 세포주를 T-75 조직 배양 플라스크(Nunc, Denmark)로 5% CO₂ 및 37℃ 습윤 환경에서 10% 우태혈청, 2mM 글루타민 및 10μg/mL 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 적절한 배지를 이용하여 단층으로 개별 배양하였다. DMEM을 RAW 264.7 세포용 배양 배지로 사용하였다. 세포를 스크레이퍼(scraper)로 처리하여 주 당 3회 통과시키고, 5회 통과시킨 후 실험에 사용하였다.

<34> <실시예 3>

<35> MTT 분석

<36> IO 추출물의 RAW 246.7 세포에 대한 독성 수준을 문헌[Hansen et al., 1989]에 기재된 방법에 따라 MTT [3-(4,5-디메틸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드] 방법을 이용하여 측정하였다.

<37> 세포를 96-웰 플레이트에서 5×10^3 cell/well의 밀도로 배양하였다. 24 시간 후, 세포를 신선한 배지로 세척하고, 상이한 농도의 IO 추출물로 처리하였다. 48 시간 배양한 후, 세포를 재세척하고, MTT(5mg/mL) 20μl를 가하고, 4 시간 동안 배양하였다. 최종적으로, DMSO(150μl)를 가하여 형성된 포르마잔 염을 용해시키고, GENios(상표명) 마이크로플레이트 리더(Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 540 nm에서 OD를 측정하여 포르마잔 염의 양을 측정하였다. 상대 세포 생존력을 포르마잔 염으로 전환된 MTT의 양에 의해 측정하였다. 세포의 생존력을 대조군에 대한 %로 정량화하고(처리된 세포의 OD - 블랭크의 OD/ 대조군의 OD - 블랭크의 OD × 100), 용량 반응 곡선을 발생시켰다. 데이터를 3 회 이상의 실험으로부터의 평균으로 나타내었으며, P<0.05가 현저한 것으로 여겨졌다.

<38> <실시예 4>

<39> TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 효소 면역분석

<40> TNF-α, IL-1β 및 IL-6와 같은 염증 매개체를 사전의 추출 및 정제 없이 제조자의 프로토콜에 따른 고상 샌드위치 효소면역법[solid phase sandwich Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay(ELISA)](Code RPN 2751, RPN 2718 and RPN 2708, Amersham Pharmacia Oiosciences, NJ, USA)에 의해 측정하였다. 각각 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 농도를 측정하기 위하여 10.24-400, 50-2450 및 51-2000 pg/mL로부터의 표준 곡선을 사용하였다. 결과를 4-파라미터 로지스틱 모델(four-parameters logistic model)의 선형 회귀를 이용하여 계산하였다.

<41> <실시예 5>

<42> PGE₂의 효소 면역분석

<43> 제조자의 프로토콜에 따라 사전의 추출 및 정제없이 효소 면역분석에 의해 PGE₂를 측정하였다(Code RPN 222, Amersham Pharmacia Oiosciences, NJ, USA). 2.5 내지 320 pg/well 범위의 농도를 사용하여 표준 곡선을 생성시켰다. 시료내의 PGE₂ 농도를 4-파라미터 로지스틱 모델의 선형 회귀를 이용하여 계산하였다.

<44> <실시예 6>

<45> 트랜스펙션 및 리포터 유전자 분석

<46> RAW 246.7 세포를 24-웰 플레이트에 식재하고, 37℃에서 배양하였다. 약 70-80% 유착도에서, 세포를 DMEM으로 세척하고, 혈청 및 항생물질 없이 DMEM으로 5 시간 동안 배양하였다.

<47> 이어서, 세포를 NF-κB 결합 위치 서열을 포함한 리포터 구조체 1 μg과 제조자의 지시에 따라 리포펙타민(Lipofectamine)(상표명) 시약(Invitrogen, USA)에 의해 웰 당 DNA의 총량이 조절되는 pcDNA 3.1 300 ng을 함유한 DNA 혼합물로 트랜스펙션시켰다.

<48> 72 시간 배양한 후, 세포를 용리시키고, 루미노미터(luminometer)(Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여

루시페라아제 활성을 측정하였다. 루시페라아제 활성을, 기질로서 o-니트로페닐 β-갈락토피라노사이드를 이용하여 β-갈락토시다아제 활성에 의한 트랜스펙션 효율로 표준화하였다. 문헌(Lin et al.)에 기재된 바와 같은 방법에 의해 β-갈락토시다아제 염색을 수행하였다. 데이터를 평균±표준편차(n=3)로서 나타내었다.

<49> <실시예 7>

<50> 핵 단백질의 추출

<51> 세포를 TNF-α의 부재 또는 존재하에 IO 추출물로 처리하고, 핵 단백질을 추출하였다. 간략하게 설명하면, 세포를 1 mL의 빙냉 PBS로 수확하고, 4℃, 5000 rpm에서 1 분 동안 원심분리하였다. 세포 펠렛을 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM 디티오프레이톨(DTT) 및 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF)를 함유한 0.4 mL 완충액 A로 15 분 동안 얼음위에서 용리시켰다.

<52> 이어서, 10% 노니데트 P-40 용액 25 mL를 가하고, 시료를 15 초 동안 볼텍싱한 후 15000 rpm에서 5 분 동안 4℃로 원심분리하였다. 펠렛을 0.5 mL 완충액 A로 재차 세척하고, 20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT 및 1 mM PMSF를 포함한 완충액 B 5 mL에 재현탁시켰다.

<53> 용리된 핵을 얼음위에 30 분동 정치시킨 후, 15000 rpm에서 5 분 동안 4℃로 원심분리하였다. DC 단백질 분석(Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.)에 의해 핵 단백질 농도를 측정하였다. 핵 추출물을 사용할 때까지-80℃에서 보관하였다.

<54> <실시예 8>

<55> 웨스턴 블롯 분석

<56> 표준 공정에 따라 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 간략하게 설명하면, RAW 264.7 세포를 4℃에서 30 분 동안 50 mM 트리스-HCl, pH 7.5 0.4% 노니데트 P-40, 120 mM NaCl, 2 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 80 μg/mL 류페틴, 3 mM NaF 및 1 mM DTT를 함유한 용리 완충액에 용리시켰다.

<57> 세포 용리물(10μg)을 4-20% 노벡스(Novex)(상표명) 그라디언트 겔(gradient gel)(Invitrogen, USA) 상에 용해시키고, 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 전기이동시키고, 10% 탈지유로 블로킹시켰다. 제조자의 지시에 따라 케미루미네스cent ECL 키트(Amersham Pharmacia Biosciences, NJ, USA)로 p50 모노클로날 항체(Cat. No. sc-8414, Santa cruz Biotechnology, Inc., USA)를 사용하여 p50을 검출하였다. 웨스턴 블롯을 이미지마스터(ImageMaster) 소프트웨어(Amersham Pharmacia Biosciences, NJ, USA)로 정량화하였다.

<58> <실시예 9>

<59> 젤라틴 자이모그래피

<60> 상기에서 기술한 바와 같이 IO 추출물의 부재 또는 존재하에 자이모그래피에 의해 MMP-2 및 MMP-9 활성을 측정하였다. 각각 HT1080 세포를 10 ng/mL PMA로 처리하기 전에 세포를 다양한 농도의 IO 추출물에 1 시간 동안 노출시킨 후, 무-FBS 배지에서 3 일 동안 배양을 지속하였다. 50μg의 총 단백질(또는 다양한 농도의 IO 추출물과 활성 MMP-2의 반응 생성물)을 함유한 조절 배지를 비등시키지 않으면서 시료 완충액(125 mL 트리스-HCl, pH 6.8 3% SDS, 40% 글리세롤, 0.02% 브로모페놀 블루)에 재현탁시키고, 비환원 조건하에서 1.5 mg/mL 젤라틴을 함유한 10% 폴리아크릴아미드 겔상에 전기이동시켰다.

<61> 전기이동 후, 겔을 2.5% 트리톤 X-100을 함유한 50mM 트리스-HCl(pH 7.5)로 2 회 세척하고, 10 mL CaCl₂, 50 mL 트리스-HCl 및 150 mL NaCl을 함유한 전개 완충액중에서 37℃로 밤새도록 배양하였다. 겔을 30% 메탄올 및 10% 아세트산 중에서 0.25% 쿠마씨 블루(Coomassie Blue) R-250으로 염색하고, 동일한 용액중에서 쿠마씨 블루 염료 없이 탈색시켰다. 젤라틴용해성(gelatinolytic) 밴드가 청색 배경에 대하여 청정 대역으로서 관찰되었고, 밴드의 강도를 이미지마스터 소프트웨어(Amersham Pharmacia Biotect, Sweden)를 이용하여 측정하였다.

<62> <실시예 10>

<63> 통계적 분석

<64> 양측검정 독립적 스튜던츠 t-테스트를 이용하여 모든 데이터를 비교하였다. 0.05 미만의 P 값이 통계적으로 현저한 것으로 여겨졌다. 데이터를 평균±SE로 나타내었다.

<65> <실시예 11>

<66> **RAW 246.7 세포의 증식에 대한 IO 추출물의 효과**

<67> 본 발명의 목적은 염증에 대한 IO 추출물의 억제 효과를 시험하는 것이기 때문에, 우선 RAW 246.7 세포의 생존력에 대한 DMSO에 용해된 IOE의 효과를 MTT 분석으로 측정하였다.

<68> 도 1은 FBS의 존재하에 RAW 246.7 세포의 생존력에 대한 IO 추출물의 효과를 나타낸 도로서, 세포를 지시된 농도의 IO 추출물로 처리하고, 24 시간 후 세포 생존력을 MTT 분석에 의해 측정하고, 데이터를 3회 실험으로부터 평균±SD로 나타내었다.

<69> 도 1에 도시한 바와 같이, IO 추출물은 최고 시험 농도 (100 µg/mL)로 24 시간 처리된 경우에도 세포 생존력에 대한 어떠한 세포 독성 효과도 나타내지 않았다. 따라서, 1 내지 10 µg/mL 범위의 IO 추출물 농도를 선택하여 항-염증 효과에 대한 연구를 수행하였다.

<70> **<실시예 12>**

<71> **염증 매개체의 생성에 대한 IO 추출물의 억제 효과**

<72> 염증 매개체의 생성에 대한 IO 추출물의 억제 효과를 밝히기 위하여, TNF-α, IL-1β, IL-6 및 PGE₂에 대한 면역분석을 수행하였다. 이를 위하여, RAW 246.7 세포를 상이한 농도의 IO 추출물로 1 시간 동안 처리한 후, 리포폴리사카라이드 1 µg/mL로 처리하여 염증을 촉진시켰다. 1일 동안 배양한 후, 조절 배지를 수집하고, 이러한 염증 매개체의 수준을 측정하였다.

<73> 도 2는 RAW 246.7 세포에서 염증 매개체의 생성에 대한 IO 추출물의 억제 효과를 나타낸 도로서, 세포를 상이한 농도의 IO 추출물로 처리한 후, 1 µg/mL의 폴리리포사카라이드로 처리하여 염증을 촉진시켰다. 1일 동안 배양한 후, 조절된 배지를 수집하고, TNF-α (패널 A), IL-1β (패널 B), IL-6 (패널 C) 및 PGE₂ (패널 D)에 대한 면역분석을 수행하였다. 1 µM의 텍사메타손 및 10 µM의 아스피린을 각각 사이토카인 및 PGE₂에서 대조군으로 사용하였다. 데이터를 3회 실험으로부터 평균±SD로 나타내었다.

<74> 도 2에 도시한 바와 같이, IO 추출물은 모든 염증 매개체의 생성에 대하여 용량 의존적 억제 효과를 나타내었다. 10 µg/mL의 IO 추출물로 처리함으로써 TNF-α 수준은 블랭크 군과 비교하여 30% 감소하였다(도 2A 참조). 1 µM의 텍사메타손으로 처리한 군과 약 5 µg/mL의 IO 추출물로 처리한 군 사이에는 TNF-α의 생성에 대한 억제효과에 있어 현저한 차이를 발견할 수 없었다.

<75> 도 2B에 도시한 바와 같이, IL-1β의 생성에 대한 IO 추출물의 억제 효과가 다른 사이토카인의 생성에 대한 억제 효과와 비교하여 현저하였다. 10 µM의 IO 추출물이 IL-1β의 생성에 대하여 80%의 억제효과를 보여주었다. 10 µM의 IO 추출물의 존재 하에 IL-6의 수준은 텍사메타손 1 µM의 존재하의 수준과 유사하였다(도 2C). PGE₂의 생성에 대한 IO 추출물의 억제 효과는 다른 사이토카인에 대한 것들 보다 높았다(도 2D).

<76> 특히, 1 µg/mL의 IO 추출물로 처리함으로써 PGE₂의 수준을 60% 감소시켰고, 이는 양성 대조군으로서 사용된 아스피린 10 µM로 처리한 경우의 수준과 유사하였다. PGE₂ 수준에 대한 IO 추출물의 억제 효과가 사이토카인들의 수준에 따라 다소 상이하였음에도 불구하고, IO 추출물의 농도가 증가함에 따라 억제 효과의 추세는 처리군 중에서 유사하였다.

<77> **<실시예 13>**

<78> **RAW 246.7 세포에서 NF-κB의 전사 활성화에 대한 IO 추출물의 효과**

<79> RAW 246.7 세포에서 NF-κB의 전사 활성화가 IO 추출물에 의해 영향을 받는지 여부를 NF-κB 결합 DNA 서열-루시페라아제 유전자를 포함한 리포터 구조체를 이용하여 추가로 연구하였다.

<80> 도 3은 RAW 246.7 세포에서 NF-κB의 전사 활성화에 대한 IO 추출물의 효과를 나타낸 도로서, 세포를 상이한 농도의 IO 추출물로 1 시간 동안 처리한 후, 10 ng/mL의 TNF-α로 처리하여 NF-κB를 활성화시켰다.

<81> (A) pcDNA 3.1 벡터를 공감염시켜 모든 처리군에 대한 루시페라아제 활성을 표준화시키고, 감염된 세포를 β-갈락토시다아제로 염색하였다. (B) NF-κB 리포터 벡터와 pcDNA 3.1 벡터로 공감염시킨 후 NF-κB의 전사 활성을 루시페라아제 분석에 의해 측정하였다. 데이터를 3 회 이상의 실험으로 평균±S.E.으로 나타내었다. 스튜던츠 t-테스트를 이용하여 현저성 수준을 만족할만하게 확인하였다(P<0.01).

<82> 도 3A에 도시한 바와 같이, RAW 246.7 세포를 NF- κ B의 리포터 벡터와 약 40%의 SA- β gal 양성 세포를 나타내는 pcDNA 3.1 벡터로 공감염시켰다. 도 3B에 도시한 바와 같이, IO 추출물로 처리된 세포에서 NF- κ B의 전사 활성화는 미처리 블랭크 군과 비교하여 용량 의존적 방식으로 현저하게 감소하였다($P<0.01$).

<83> 10 ng/mL TNF- α 처리에 의한 NF- κ B의 전사 활성화는 미처리 블랭크 군과 비교하여 500% 증진되었다. 1 및 5 μ g/mL의 IO 추출물로 처리함으로써 각각 NF- κ B의 전사 활성을 미처리 블랭크 군과 비교하여 약 5 및 2 배 감소시켰다. 이러한 결과는 IO 추출물이 RAW 246.7 세포에서 NF- κ B의 전사 활성을 억제함으로써 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂와 같은 염증 매개체의 생성을 억제할 수 있다는 사실을 보여준다.

<84> <실시예 14>

<85> RAW 246.7 세포에서 p50의 단백질 발현에 대한 IO 추출물의 효과

<86> 염증에 관여하는 NF- κ B 전사 인자의 활성화에 대한 IO 추출물의 억제 효과를 직접적으로 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 IO 추출물의 존재하에 NF- κ B 전사 인자의 일부인 p50의 발현 수준을 시험하였다.

<87> 도 4는 IO 추출물로 처리한 후 RAW 246.7 세포에서 p50의 단백질 발현의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 도로서, 지시된 바와 같이 세포 용리물의 웨스턴 블롯 분석을 p50 모노클로날 항체를 사용하여 수행하였다. 하부 패널은 개별적인 상대 단백질 발현도 %를 나타낸다. 하기의 식을 이용하여 수치를 상대 단백질 발현도로서 나타내었다. 상대 단백질 발현도(%) = (밴드의 강도/ 블랭크 밴드의 강도) X 100. β -액틴 단백질의 발현을 p50 단백질의 표준화를 위한 대조군으로 사용하였다.

<88> 도 4에 도시한 바와 같이, TNF- α 촉진 군과 1 μ g/mL IO 추출물로 처리된 군 사이에는 현저한 차이가 없었다. 그러나, 약 5 μ g/mL의 IO 추출물로 처리한 경우에는 TNF- α 촉진 군과 비교하여 핵 중의 p50의 발현 수준이 현저하게 감소하였다($P<0.01$). 더욱이, p50의 발현 수준은 IO 추출물의 농도 증가에 따라 증가하였다. 이러한 결과는 염증 매개체의 생성에 대한 IO 추출물의 억제 효과가 RAW 246.7 세포에서 NF- κ B 전사 인자의 불활성화에 기인할 수 있다는 사실을 보여준다.

<89> <실시예 15>

<90> HT1080 세포에서 MMP에 대한 IO 추출물의 억제 효과

<91> 상기와 같은 결과를 바탕으로 하여, IO 추출물이 만성 염증에 관여하는 MMP의 발현 및 활성을 억제할 수 있는지에 대하여 추가의 연구를 수행하였다. IO 추출물로 처리된 HT1080 세포의 조절 배지를 젤라틴 자이모그래피에 사용하였다.

<92> 도 5는 HT1080 세포부터 MMP-2 및 MMP-9의 활성화에 대한 IO 추출물의 효과를 나타낸 도로서, 세포를 무혈청 조건 하에서 10 ng/mL의 PMA로 처리하여 MMP 발현을 유도시켰다. 3일 동안 배양한 후, 조절 배지를 다양한 농도의 IO 추출물로 1 시간 동안 반응시킨 후, 젤라틴 자이모그래피를 수행하였다. 하부 패널은 각각 블랭크 군의 %로서 상대 효소 활성을 나타낸다.

<93> 도 5에 도시한 바와 같이, PMA로 처리함으로써 블랭크 군과 비교하여 MMP-2 및 MMP-9의 발현 수준 및 활성을 증가시켰다. 5 μ g/mL 이상의 IO 추출물이 MMP-2 및 MMP-9의 발현 수준 및 활성에 대해 용량 의존적 억제 효과를 나타내었다($P<0.01$). IO 추출물 10 μ g/mL로 처리된 처리군에서 MMP-9의 발현 수준은 1 ng/mL의 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA)로 처리된 군과 비교하여 8 배 감소되었다. 1 μ g/mL의 IO 추출물 처리군과 PMA 처리군 사이에는 현저한 차이가 없었다. 그러나, 각각 MMP-2 및 MMP-9 발현에 대한 현저한 억제 효과가 5 μ g/mL 이상의 IO 추출물 농도에서 관찰되었다($P<0.01$).

산업이용 가능성

<94> 본 발명에 따른 이시게 오카무라에 추출물은 RAW 246.7 세포에서 NF- κ B의 전사 활성을 억제하고, 염증 매개체인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂의 생성을 억제하여 항-염증 활성을 갖기 때문에 의약산업에서 천연 항-염증제의 개발에 있어 매우 유용한 발명이다.

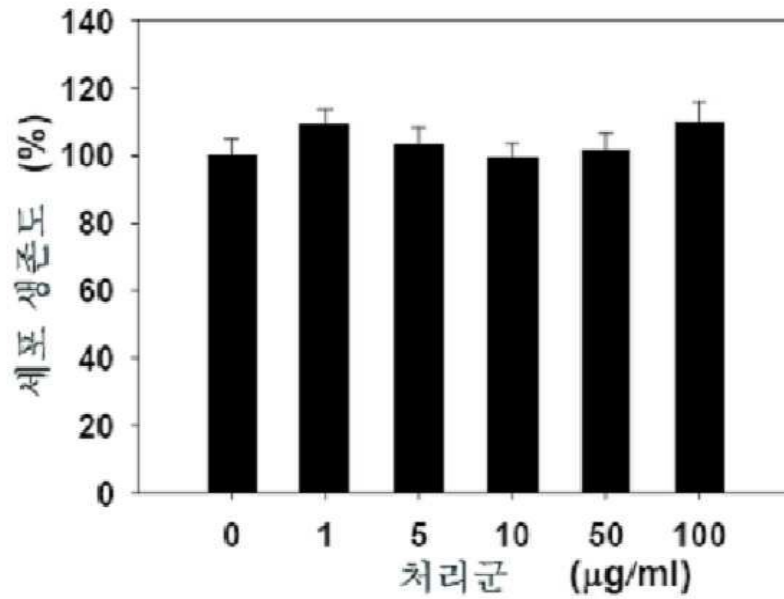
도면의 간단한 설명

<95> 도 1은 FBS의 존재하에 RAW 246.7 세포의 생존력에 대한 IO 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

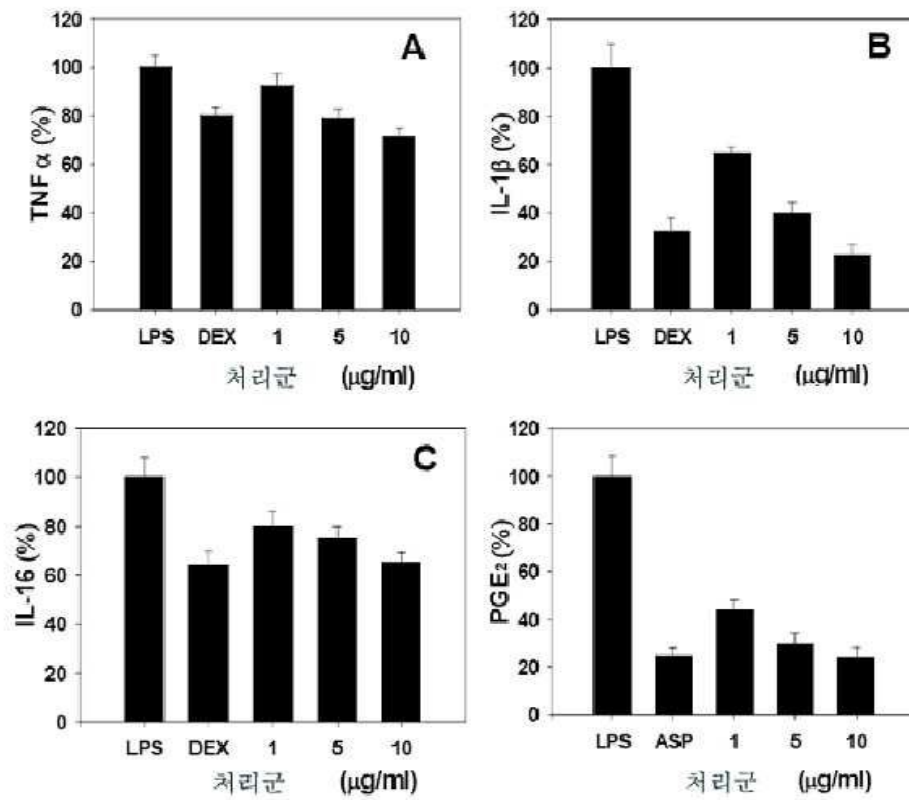
- <96> 도 2는 RAW 246.7 세포에서 염증 매개체의 생성에 대한 IO 추출물의 억제 효과를 나타낸 도이다.
- <97> 도 3은 RAW 246.7 세포에서 NF- κ B의 전사 활성화에 대한 IO 추출물의 효과를 나타낸 도이다.
- <98> 도 4는 IO 추출물로 처리한 후 RAW 246.7 세포에서 p50의 단백질 발현의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 도이다.
- <99> 도 5는 HT1080 세포부터 MMP-2 및 MMP-9의 활성화에 대한 IO 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

도면

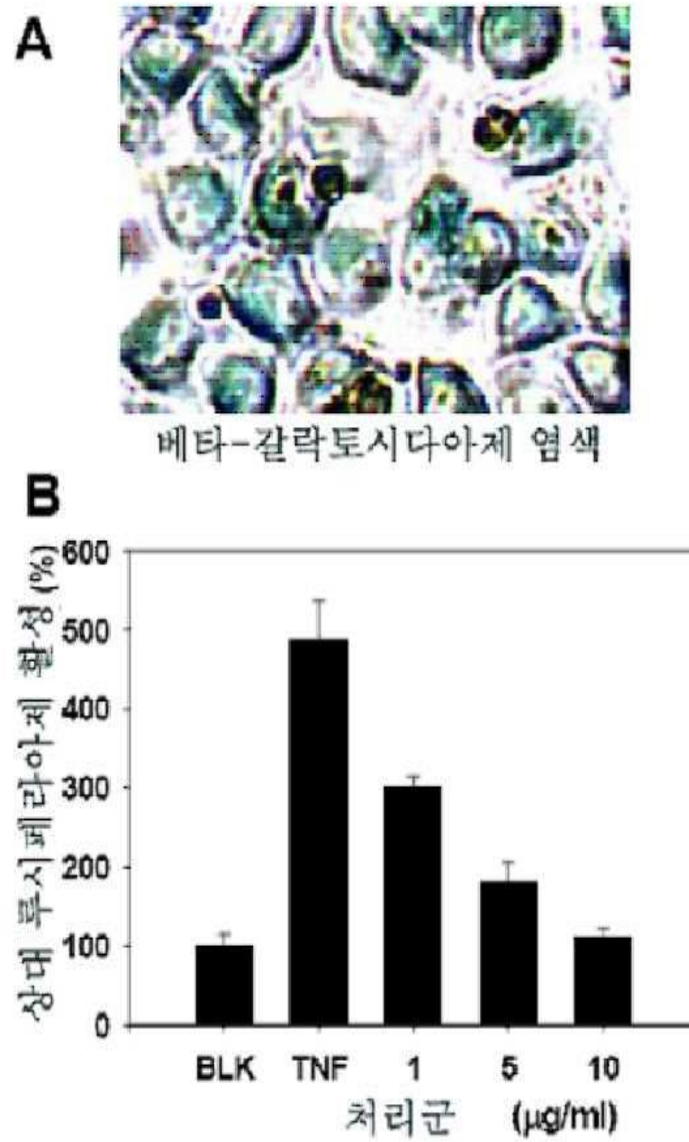
도면1



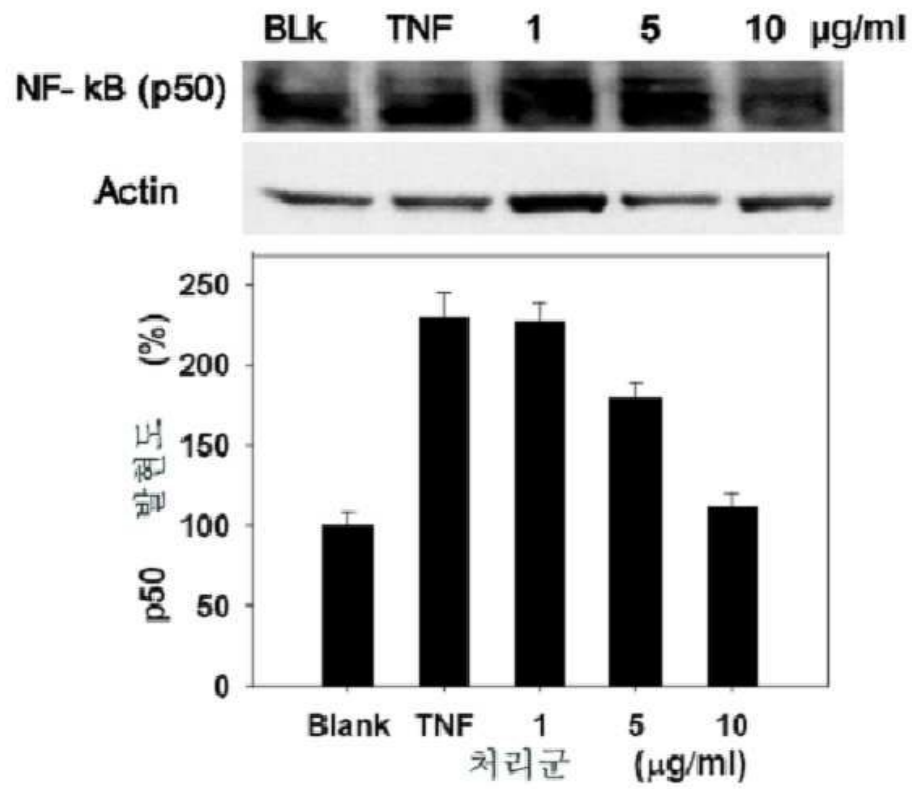
도면2



도면3



도면4



도면5

