



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0002941

(43) 공개일자 2015년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/045 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0074353

(22) 출원일자 2013년06월27일

심사청구일자 2013년06월27일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

박진서

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 1404호 (후평동, 동아아파트)

권동주

강원 춘천시 후석로 325, 104동 1006호 (후평동, 춘천더샵아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 2 항

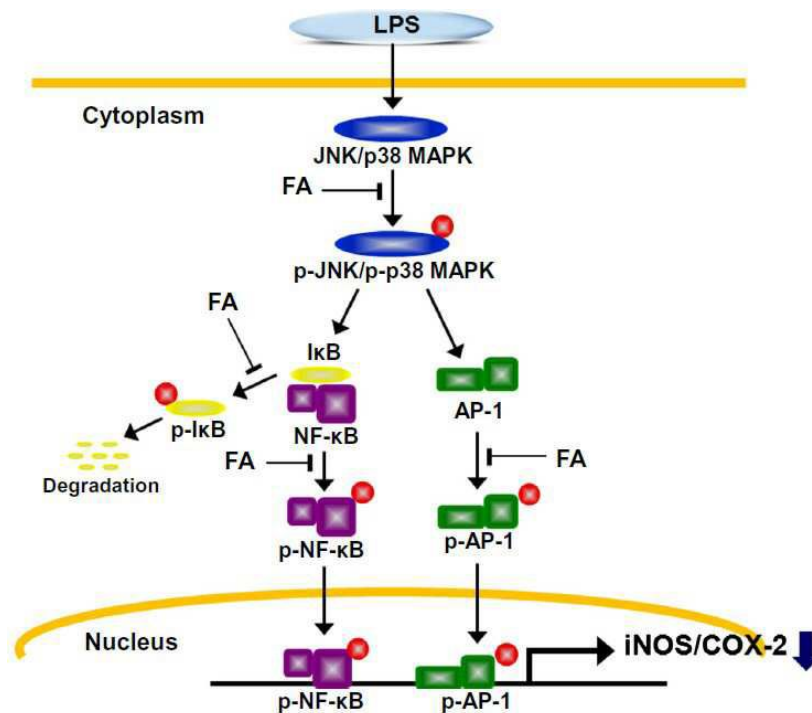
(54) 발명의 명칭 플라보카와인 A를 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 조성물

### (57) 요약

플라보카와인 A는 카바 추출물 유래 찰콘 중 주요 구성요소이며, 항암활성 등 다양한 생물학적 활성을 나타낸다. 본 발명자들은 쥐 대식세포에서 LPS로 유도되는 친염증성 매개자 발현 및 이들 활성을 책임지는 분자적 기작에 대한 플라보카와인 A의 억제효과를 시험하였다. 플라보카와인 A는 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 iNOS와

(뒷면에 계속)

대표도 - 도8



COX-2의 발현 및 뒤이은 NO와 PGE2의 생산을 현저히 억제하였다. 플라보카와인 A는 LPS로 유도되는 NF- $\kappa$ B와 AP-1 신호전달 경로 활성화를 현저히 저해하였다. 뿐만 아니라, 플라보카와인 A는 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 발현을 담당하는 JNK와 p38 MAPK 활성화를 저해하였다. 또한, 플라보카와인 A는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 친염증성 사이토카인 생산을 저해하였다. 이러한 결과들은 플라보카와인 A가 쥐 대식세포에서 NF- $\kappa$ B-AP-1-JNK/p38 MAPK 신호전달 경로를 차단함으로써 LPS로 유도되는 친염증성 매개자의 발현을 억제하여 항염증 반응을 나타냄을 제시한다.

(72) 발명자

**주성미**

강원도 삼척시 교동 31-8번지 201호

**최수영**

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한림대학교 연구지원팀

연구사업명 교육과학기술부 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환치료제 개발: 질환치료용 생리활성 고분자 신소재물질 탐색 및 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A4A01007173

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 중추신경계에서 HIV-1 Tat에 의해 유도되는 염증반응 제어 기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

플라보카와인 A를 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 염증질환은 피부염증임을 특징으로 하는, 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 플라보카와인 A를 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 플라보카와인 A는 친염증성 매개자의 발현을 억제함으로써 염증질환의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

### 배경기술

[0002] 염증은 단구 (monocyte)/ 대식세포 (macrophage)와 같은 다양한 면역세포의 활성화를 포함하는 복잡한 생물학적 과정이다. 염증성 면역반응의 조절장애는 암 (Ben-Neriah and Karin, 2011) 및 대사 증후군 (Donath and Shoelson, 2011)을 포함하여 다양한 병리학적 상태를 일으킨다. 대식세포는 사이토카인/케모카인 및 산화질소 (NO)와 프로스타글란딘 (PGs)과 같은 다양한 염증 매개자를 생산함으로써 염증 과정에 참여하는 주요한 타입의 세포이다 (Zhang and Mosser, 2008). iNOS (inducible NO synthase)는 NADPH와 산소분자를 이용하여 L-아르기닌으로부터 NO를 합성하는 효소이다 (Murakami and Ohigashi, 2007). COX-2 (Cyclooxygenase-2)는 아라키돈산을 PGE2와 같은 프로스타글란딘으로 전환한다 (Aoki and Narumiya, 2012). 대식세포 내에서 염증성 매개자의 저하 조절은 다양한 염증성 질환에 유용한 치료 물질 개발에 논리적 근거를 제공해준다 (Murakami and Ohigashi, 2007).

[0003] 다양한 전이인자들 및 세포신호전달경로가 대식세포의 친염증성 유전자 발현에 관여한다 (Guha and Mackman, 2001). 지다당 (lipopolysaccharides; LPS) 또는 사이토카인에 의한 자극 하에서, NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ B-카이네이즈 (IKK) 복합체의 활성화를 통해 활성화된다. IKK 복합체는 두 개의 카이네이즈 서브유닛 (IKK $\alpha$  및 IKK $\beta$ )과 조절 서브유닛 IKK $\gamma$  / NEMO로 이루어져 있다. IKK 복합체는 Ser32와 Ser36의 I $\kappa$ B $\alpha$ 를 인산화하여 유비퀴틴화하며 이어 프로테오솜 분해가 일어난다 (Gloire et al., 2006). 자유 NF- $\kappa$ B는 세포질 내의 I $\kappa$ B $\alpha$ 로부터 분리되어 핵 내로 이동하며, 핵에서 친염증성 유전자와 같은 타겟 유전자의 전사를 활성화한다.

[0004] AP-1은 염증성 면역반응을 담당하는 유전자의 발현에 중요한 역할을 수행하는 또다른 전사인자이다 (Guha and Mackman, 2001). AP-1은 다른 Jun (c-Jun, JunB와 JunD) 및 Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2 및 FosB) 서브패밀리로 이루어진 호모 다이머 또는 헤테로 다이머 단백질 복합체로 기능한다 (Hess et al., 2004). NF- $\kappa$ B와 유사하게, AP-1 복합체는 핵으로 이동하여 친염증성 유전자들의 전사를 자극한다.

[0005] p38, JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) 및 ERK (extracellular signal-regulated kinase)와 같은 MAPKs (mitogen-activated protein kinases)는 염증과정 동안 친염증성 유전자 발현에 관여한다 (Kaminska, 2005). LPS에 의한 자극 하에서, 인산화된 형태의 MAPKs 활성화는 활성화된 대식세포에서 일련의 신호전달과정을 매개하여 NF- $\kappa$ B 및 AP-1 활성화를 이끈다 (Guha and Mackman, 2001).

[0006] 카바 (*Piper methysticum*) 추출물은 태평양 군도에서 이완 효과를 갖는 의약품 음료로서 이용되어 왔다 (Singh, 1992). 최근 카바 추출물은 불안, 신경성 긴장 및 불안증과 같은 다양한 정신병 치료에 널리 이용되고 있다

(Singh and Singh, 2002; Bilia et al., 2002).

[0007]

비록 카바 추출물이 효과가 있고 안전하다고 생각되고 있지만 (Bilia et al., 2002), 간독성 유발에 대한 최근의 관심은 카바 추출물 사용의 이로운 점과 해로운 영향에 대해 좀 더 연구가 필요함을 말해준다 (Clouatre, 2004; Teschke et al., 2003). 약리학적 활성을 담당하는 카바 추출물의 주요 활성요소로는 플라보카와인과 같은 찰콘과 카바라톤을 포함한다 (Dharmaratne et al., 2002). 플라보카와인 A는 카바 추출물 유래 주요 찰콘 구성요소인데 (Dharmaratne et al., 2002), 항암 활성을 가지는 것으로 나타났다 (Tang et al., 2008; Zi and Simoneau, 2005). 그러나, 플라보카와인 A의 항염증 활성은 밝혀진바 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008]

본 발명은 플라보카와인 A의 항염증 효과를 밝히고, 이를 포함하는 항염증 조성물을 제공하려는 것을 목표로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0009]

본 발명자들은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 플라보카와인 A의 효과를 시험하였다. 그 결과 플라보카와인 A가 LPS로 유도되는 iNOS 및 COX-2 mRNA와 단백질 발현을 억제하며, 뿐만 아니라, 뒤이은 NO 및 PGE2의 생성도 억제함을 관찰하였다. 플라보카와인 A는 LPS로 유도되는 NF- $\kappa$ B, AP-1 및 JNK/p38 MAPK 신호전달경로 활성화를 현저히 저해하였다. 뿐만 아니라, 플라보카와인 A는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 LPS로 유도되는 친염증성 사이토카인을 억제하였다.

[0010]

iNOS 및 COX-2와 같은 다양한 친염증성 유전자의 장기간 조절장애는 암을 포함하는 질병의 원인이 되는 만성 염증을 일으킨다 (Murakami and Ohigashi, 2007). 그러므로, 대식세포에서 친염증성 매개자의 조절은 다양한 염증성 질환에 대한 치료화합물을 개발하는 전략 중 하나로 생각된다. 본 발명자들은 플라보카와인 A가 쥐 대식세포에서 LPS로 유도되는 iNOS 및 COX-2 발현을 억제하고 뒤이은 NO와 PGE2의 생산을 억제하는 항염증 효과를 나타냄을 밝혔다. 뿐만 아니라, 플라보카와인 A는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 친염증성 사이토카인 발현을 저해하였다. 염증성 면역반응에 대한 플라보카와인 A의 보호효과는 NF- $\kappa$ B-AP-1-JNK/p38 MAPK 신호전달 경로를 차단함으로써 매개되었다 (도 8).

[0011]

염증과정은 NF- $\kappa$ B 및 AP-1과 같은 다양한 전사인자들에 의해 엄격하게 조절된다. 자극을 주면 세포질 NF- $\kappa$ B 및 AP-1은 세포핵 내로 이동하는데, 거기에서 이들은 많은 친염증성 유전자 발현을 매개한다. 선행 논문들은 NF- $\kappa$ B 및 AP-1 활성화를 유도하는 신호전달경로가 LPS로 자극한 대식세포에서 iNOS와 COX-2의 발현에 관여함을 밝혔다 (Guha and Mackman, 2001). iNOS와 COX-2 유전자의 프로모터는 모두 NF- $\kappa$ B 및 AP-1 결합부위를 보유하며 (Murakami and Ohigashi, 2007; Pautz et al., 2010), 이는 이들 전사인자들이 iNOS와 COX-2 조절에 관여하며, 이어 NO와 PGE2 생산에도 관여함을 말해준다. LPS는 iNOS와 COX-2를 포함하는 NF- $\kappa$ B와 AP-1-의존적 친염증성 유전자의 발현을 증대시키는데, 이는 플라보카와인 A의 선처리로 현저히 약해졌다. 본 발명자들은 NF- $\kappa$ B와 AP-1 활성화를 유도하는 일련의 신호전달경로에 미치는 플라보카와인 A의 효과를 평가하는 실험을 수행하였다. 도 3 및 도 4와 같이, 플라보카와인 A는 NF- $\kappa$ B와 AP-1 모두의 활성화를 유도하는 신호전달경로를 저해하였다. 플라보카와인 A는 LPS로 유도되는 I $\kappa$ B $\alpha$  분해와 p65 인산화를 억제하였다 (도 3A 및 B). 또한, 플라보카와인 A는 LPS로 자극한 세포에서 프로모터 활성뿐만 아니라 NF- $\kappa$ B와 AP-1-DNA 결합활성을 저해하였다 (도 3, 도 4). 알피니아 프리세이 (Alpinia pricei)에서 분리한 플라보카와인 B는 LPS로 자극한 대식세포에서 NO 및 PGE2와 같은 친염증성 매개자 생산을 억제하였다 (Lin et al., 2009). 뿐만 아니라, 플라보카와인 B는 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로를 억제함으로써 LPS로 유도되는 iNOS와 COX-2의 발현을 저해하였다 (Lin et al., 2009). 종합하면, 이러한 데이터들은 찰콘의 일종인 플라보카와인이 NF- $\kappa$ B와 AP-1 의존적 친염증성 유전자 발현을 억제함으로써 항염증 효과를 발휘함을 제시한다.

[0012]

p38, JNK 및 ERK와 같은 MAPKs는 다양한 자극 하에서 친염증성 매개자 발현을 유도하는 신호전달경로에서 주요 요소들이다. NF- $\kappa$ B 및 AP-1과 함께, MAPKs는 염증반응 루프를 증폭하는데 참여하는데, MAPK 활성 조절은 염증

성 질환에 대한 치료제 개발에 논리적 근거를 제공한다. 많은 연구에서 LPS는 단구세포 (monocyte)/대식세포에서 세 개의 MAPKs 모두를 활성화하였다 (Reviewed in Guha and Mackman, 2001). LPS로 자극한 대식세포에서 다른 MAPKs가 친염증성 유전자의 상향조절에 중요한 역할을 수행할 수 있다. 선행 연구에 따르면 JNK와 p38 MAPK는 대식세포에서 LPS로 유도되는 iNOS와 COX-2의 발현에 우선적으로 관여하였다 (Chen et al., 1999; Lai et al., 2009; Zhou et al., 2008). 본 발명자들이 얻은 데이터 또한 JNK와 p38 MAPK 저해제가 LPS로 유도되는 iNOS와 COX-2 발현을 현저히 억제한 반면, ERK 저해제는 최소한의 효과만 나타내었다 (도 5). 도 6과 같이, 플라보카와인 A는 LPS에 의한 JNK와 p38 MAPK의 증가된 인산화 수준을 약화시킨 반면, ERK 활성화에는 영향을 미치지 않았다. 종합하면, 이 결과들은 플라보카와인 A가 LPS로 자극한 대식세포에서 JNK와 p38 MAPK 활성화를 저해함으로써 iNOS와 COX-2의 증가를 억제함을 말해준다.

[0013] LPS와 그 수용체 TLR4 (toll-like receptor 4) 간의 상호작용은 NF- $\kappa$ B 및 AP-1과 같은 전사인자뿐만 아니라 MAPK의 활성화를 유도하는 세포내 신호전달경로를 개시한다 (Guha and Mackman, 2001). LPS가 세포에 결합하는 것에 대한 플라보카와인 A의 저해효과를 시험하기 위해 RAW 264.7 세포에 플라보카와인 A를 가하거나 가하지 않고 FITC가 결합된 LPS를 넣고 배양한 후 염색된 세포를 분석하였다. RAW 264.7 세포와 LPS의 결합은 플라보카와인 A에 의해 현저히 저해되지 않았다 (도 9). 이러한 결과는 RAW 264.7 세포에서 LPS와 TLR4 간의 상호작용에 플라보카와인 A가 영향을 미치지 않음을 말해준다.

[0014] 완전한 구강 섭취 및 이론적 혈액량이 6 l 라고 가정하고, 120 mg의 플라보카와인 A를 구강투여하면 이론적 혈액 내 농도가 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $\sim 60 \mu\text{M}$ )가 된다 (Anke and Ramzan, 2004; Schmidt, 2003). 플라보카와인 A에 관한 인간 데이터가 없기 때문에 구강섭취하였을 때 인체에서 혈액 내 플라보카와인 A의 농도를 결정하기 위한 연구가 필요하다.

[0015] 결론적으로, 본 발명자들은 쥐 대식세포 내에서 LPS로 유도되는 iNOS 및 COX-2 발현과 뒤이은 NO 및 PGE2의 생산에 저해효과를 나타낸다는 증거들을 제시하였다. 뿐만 아니라, 플라보카와인 A는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 친염증성 사이토카인 생산을 저해하였다. 플라보카와인 A의 항염증 활성은 NF- $\kappa$ B, AP-1 활성화 및 JNK와 p38 MAPK의 인산화를 차단함으로써 매개된다.

[0016] 본 발명은 플라보카와인 A를 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 염증질환이 아토피 피부염을 포함하는 피부염증임을 특징으로 하는, 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0018] 플라보카와인 A를 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 주사형태, 경구투여, 도포제 형태 등으로 제형화할 수 있다. 예를 들면 액제, 시럽제, 캡슐제, 과립제, 분말, 연고, 에멀전, 젤, 크림 등으로 제제화할 수 있으며, 이를 여러 경로로 투여할 수 있다. 여러 가지 제형 중 예컨대, 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체에는 유당, 포도당, 자당, 소르비톨, 마니톨, 전분, 검 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미세결정 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 미네랄 오일 등이 포함된다. 상기 조성물에는 또한 윤활제, 웨팅제, 풍미제, 유화제 및 방부제 등이 더 포함될 수 있다. 본 발명의 조성물은 과립제, 산제, 액제, 정제, 캡셀제 또는 건조시럽제 등의 경구용 제제 또는 주사제 등의 비경구용 제형으로 제제화할 수 있으나, 이러한 제형에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 피하 투여, 근육 투여 또는 경구투여, 정맥 투여, 피부 도포 등으로 투여할 수 있으며, 용량은 일일 투여량이 0.001 $\mu\text{g}$ ~100mg/kg의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0020] 구체적으로, 본 발명은 플라보카와인 A를 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 염증 질환 치료, 예방 목적의 약학 조성물에 관한 것이다.

## 발명의 효과

[0021] 본 발명에 따르면 플라보카와인 A를 포함하는 조성물은 염증이 유도된 세포에서 친염증성 매개자의 발현을 억제하며, 친염증성 매개자의 활성화를 억제한다.

[0022] 따라서, 본 발명에 따르면 플라보카와인 A는 염증질환의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

[0023]

## 도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 RAW 264.7 대식세포의 세포 생존율에 대한 플라보카와인 A의 효과를 나타낸다. (A) 플라보카와인 A (FKA)의 화학구조, (B) 세포를 다양한 농도의 플라보카와인 A와 함께 24시간 및 48시간 동안 배양한 후 세포 생존율을 MTT 분석법으로 결정하였다. 결과는 세 번의 독립 실험에 대한 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 대조군과 비교하여  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ .

도 2는 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도한 iNOS 및 COX-2 발현과 NO 및 PGE2 생산에 대한 플라보카와인 A의 효과를 나타낸다. (A) 세포를 세 시간 동안 플라보카와인 A로 선처리하고, LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )로 네 시간 자극하였다. 총 RNA를 추출하였다. iNOS, COX-2 및  $\beta$ -액틴은 특이적 프라이머를 이용한 Rt-PCR로 분석하였다. (B) 세포를 세 시간 동안 플라보카와인 A로 선처리한 후 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )로 18 시간 동안 자극하였다. 총 세포용균액은 iNOS, COX-2 및  $\beta$ -액틴에 대한 각각의 항체로 웨스턴 블랏 분석하였다. 상대적 mRNA 및 단백질 농도는 밀도계를 스캐닝하여 정량하였고,  $\beta$ -액틴 mRNA와 단백질로 정상화하였다. 배양배지 내의 NO 농도 (C) 및 PGE2 농도 (D)는 각각 Griess 반응 및 ELISA로 결정하였다. 데이터는 세 번의 실험에 대하여 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ 는 LPS 단독과 비교한 값이다.

도 3은 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 플라보카와인 A의 영향을 나타낸다. 세포는 플라보카와인 A로 세 시간 동안 선처리한 후 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )로 20분간 자극하였다. (A) 세포의 핵 추출물 내에서 NF- $\kappa$ B의 DNA-결합활성을 EMSA로 측정하였다. (B) 세포에서 추출한 세포질 또는 핵 추출물을 LPS로 처리한 다음 NF- $\kappa$ B 활성화로 유도하는 신호전달분자의 농도를 웨스턴 블랏으로 분석하였다. 상대적인 단백질 양은 밀도계로 스캐닝하여 정량하였고, 대조군 단백질 양으로 정상화하였다. (C) 세포를 NF- $\kappa$ B 프로모터-루시페레이스 구축물과  $\beta$ -갈락토시데이즈 구축물 (pCMV-lacZ)로 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후, 트랜스펙션된 세포는 세 시간 동안 플라보카와인 A로 미리 처리한 후 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )로 24시간 동안 자극하고, 루시페레이스 활성을 측정하였다. NF- $\kappa$ B 루시페레이스 활성은  $\beta$ -갈락토시데이즈 루시페레이스 활성으로 정상화하였고, 대조군에 대한 배수 증가로 나타내었다. RLA= 상대적 루시페레이스 활성. 데이터는 세 번 실험의 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ 은 LPS만 처리한 군과 비교한 것이다.

도 4는 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 AP-1 활성화에 대한 플라보카와인 A의 효과를 나타낸다. 세포는 세 시간 동안 플라보카와인 A로 선처리한 후 20분간 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )로 자극하였다. (A) 핵 AP-1의 DNA 결합활성은 EMSA로 분석하였다. (B) AP-1 서브유닛 (c-Jun 및 c-Fos) 탐지는 특이적 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅으로 수행하였다. 상대적인 단백질 양은 밀도계로 스캐닝하여 정량하였고, 대조군 단백질 양으로 정상화하였다. (C) AP-1 프로모터 루시페레이스 구축물 또는  $\beta$ -갈락토시데이즈 구축물로 트랜스펙션한 후 세포를 먼저 플라보카와인 A로 처리한 다음 LPS로 자극하였고, 24시간 더 배양하였다. AP-1 루시페레이스 활성은  $\beta$ -갈락토시데이즈 루시페레이스 활성으로 정상화하고 대조군에 대한 증가배수로 나타내었다. RLA= 상대적 루시페레이스 활성. 데이터는 세 번 실험의 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ 은 LPS만 처리한 군과 비교한 것이다.

도 5는 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 발현에 대한 MAPKs의 역할을 나타낸 것이다. 세포는 MAPKs 저해제로 한 시간 동안 선처리한 후 4시간 (mRNA용) 또는 18시간 (단백질 용) 동안 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )로 자극하였다. 총 RNA 및 단백질을 세포로부터 제조하고, iNOS, COX-2 및  $\beta$ -액틴 mRNA와 단백질 발현을 각각 RT-PCR (A) 및 웨스턴 블랏팅 (B)으로 분석하였다. 상대적 mRNA 및 단백질 수준은 밀도계로 스캐닝하여 정량하였고, 대조군 단백질 수준으로 정상화하였다. 데이터는 세 번 실험의 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ 은 LPS만 처리한 군과 비교한 것이다.

도 6은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 MAPKs 활성화에 대한 플라보카와인 A의 효과를 나타낸다. 세포는 세 시간 동안 플라보카와인 A로 선처리한 후 20분간 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )로 자극하였다. ERK, p38 및 JNK MAPKs의 인산화와



총 단백질 발현은 특이적 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅으로 탐지하였다. 상대적 단백질 수준은 밀도계로 스캔하여 정량하였고, 대조군 단백질 수준으로 정상화하였다. 데이터는 세 번 실험의 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ 은 LPS만 처리한 군과 비교한 것이다.

도 7은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도되는 친염증성 사이토카인 발현에 대한 플라보카와인 A의 효과를 나타낸다. 세포는 플라보카와인 A로 세 시간 동안 선처리하고, 4시간 (mRNA용) 또는 24시간 (단백질 용) 동안 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )로 자극하였다. (A) 배양배지에서 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  생성은 ELISA로 결정하였다. (B) 총 RNA를 모아 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  및  $\beta$ -액틴 mRNA는 특이적 프라이머를 이용한 RT-PCR로 분석하였다. 상대적 mRNA 수준은 밀도계로 스캔하여 정량하였고,  $\beta$ -액틴 mRNA 수준으로 정상화하였다. 데이터는 세 번 실험의 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ 은 LPS만 처리한 군과 비교한 것이다.

도 8은 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 플라보카와인 A (FA)가 항염증 효과를 발휘하는 분자적 기작에 관한 제안 모델이다. LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 친염증성 매개자 발현에 대한 플라보카와인 A의 저해효과는 JNK/p38 MAPK 경로를 통하여 NF- $\kappa$ B 및 AP-1 활성화를 차단함으로써 매개하는 것으로 보인다.

도 9는 LPS와 RAW 264.7 세포 간의 상호작용에 대한 플라보카와인 A의 효과를 나타낸다. RAW 264.7 세포는 FITC와 결합한 LPS ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ )와 함께 한 시간 동안 플라보카와인 A를 가하거나 또는 가하지 않고 배양하였다. 배양 후 세포는 4% 포름알데하이드와 3% 수크로스로 20분간 고정시켰다. 염색된 세포는 플로우사이토메트리로 분석하였다.

도 10은 쥐 소교세포 (murine microglial cell) BV-2 (A) 및 CRT-MG 악성신경교종 (glioma) 세포 생존율에 대한 플라보카와인 A의 효과를 나타낸다. 세포는 다양한 농도의 플라보카와인 A와 함께 24시간 및 48시간 동안 배양하였고 MTT 분석법으로 세포생존율을 평가하였다. 결과는 세 번 실험의 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다.  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 은 대조군과 비교한 것이다.

도 11은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도되는 iNOS와 COX-2 mRNA 및 단백질 발현 동역학 (kinetics)을 나타낸다. (A) 시간을 달리 하여 세포에 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )로 자극하고 총 RNA를 추출하였다. iNOS, COX-2 및  $\beta$ -액틴에 특이적인 프라이머를 이용하여 RT-PCR로 분석하였다. (B) 세포에 시간을 달리 하여 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )로 자극하고 총 세포 용균액을 iNOS, COX-2 및  $\beta$ -액틴에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블랏 분석하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0026]

<시약>

[0027]

플라보카와인 A (Flavokawain A; FKA)는 Extrasynthese (Genay, France)에서 구입하고, DMSO (dimethyl sulfoxide)에 25 mM로 용해하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. DMEM (Dulbeccos modified Eagles medium) 배지와 항생제는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. FBS는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. FBS (Fetal bovine serum)는 Lonza (Basel, Switzerland)에서 구입하였다. COX-2, p65, 라민(Lamin) B 및  $\beta$ -액틴에 대한 일차항체 (Santa Cruz, CA, USA) 및 iNOS, I $\kappa$ B $\alpha$ , 인산화-p65, 인산화-c-Jun, c-Jun, c-Fos, 인산화-ERK, ERK, 인산화-p38, p38, 인산화-JNK 및 JNK에 대한 일차항체 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)는 구입하였다. HRP-결합된 항-토끼 또는 항-염소 항체와 LPS (Escherichia coli 0127:B8), FITC-결합된 LPS, PD98059, SB203580 및 SP600125는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. TransIT-2020 트랜스펙션제는 Mirus (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 루시퍼레이즈 분석용 키트는 Promega (Madison, WI, USA) 제품이다. iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  및  $\beta$ -액틴 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Bioneer (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

[0028]

<세포배양>

[0029]

쥐 대식세포주 RAW 264.7은 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 10%

FBS와 항생제 (100 U/ml 페니실린 G, 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신)이 함유된 DMEM에서 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기가 함유된 습식 배양기에서 37 °C로 배양하였다.

[0030] <세포 생존율 측정>

[0031] 세포 생존율은 Vian 등 (1995)의 방법을 변형하여 측정하였다. 간단히 설명하면, RAW 264.7 세포를 6-웰 플레이트의 각 웰에  $1 \times 10^6$  세포 밀도로 깔았다. 플라보카와인 A 농도를 달리 하여 무혈청 배지에서 24시간 및 48시간 배양하였고, MTT {3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide}를 각 웰에 가하여 최종 농도 1 mg/ml가 되게 한 후 37 °C로 두 시간 동안 배양하였다. MTT 배지를 제거한 후 0.5 ml의 아이소프로판올을 각 웰에 가하여 청색 포마잔 결정을 용해하였다. 마이크로플레이트 판독기 상에서 570 nm 흡광도를 측정하였다.

[0032] <아질산염 및 PGE2 측정>

[0033] 대조군과 시험군의 배지를 모아 원심분리하고 사용 전까지 -80°C에 보관하였다. Griess 반응 (Promega, Madison, WI, USA)에 따라 산화질소 생성 지시약으로서 배양배지 내의 아질산염 농도를 측정하였다 (Lee et al., 2010). 배양배지로 방출된 PGE2 농도는 PGE2 ELISA 분석 키트 (R&D System, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 측정하였다 (Song et al., 2008).

[0034] <웨스턴 블랏 분석>

[0035] 세포 추출물, 핵 추출물 및 세포질 추출물 내의 총 단백질은 프래드포드 단백질 분석 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 동량의 단백질 (20-30  $\mu$ g)을 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 분리하였다. 전기영동 후 겔은 습식 전이장치를 이용하여 100 V에서 한 시간 동안 나이트로셀룰로스 막으로 전이시켰다. 막은 10% 탈지분유를 함유한 TBST (137 mM NaCl, 20 mM TrisHCl, pH 7.6, 0.1% Tween 20)로 한 시간 동안 블로킹한 다음 4 °C에서 오버나잇하여 일차항체 (1:1000 희석)와 함께 배양하였다. TBST로 세 번 세척한 후 막은 HRP-결합된 항-토끼 또는 항-염소 IgG (1:1000 희석)와 함께 두 시간 동안 상온에서 배양하였다. 막을 세척한 후 단백질은 화학형광 시스템 (Amersham Life Sciences)으로 탐지하였다 (Kim et al., 2011).

[0036] <RT-PCR 분석>

[0037] Trizol 시약 키트 (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 RAW 264.7 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. RNA 농도는 분광광도계에서 260 nm 흡광도를 측정하여 결정하였다. 각 시료에서 분리한 총 RNA 중 2  $\mu$ g씩에 10,000 U의 역전사효소 및 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l의 올리고 (dT)<sub>15</sub> 프라이머 (Promega, Madison, WI, USA)로 역전사하여 cDNA를 제조하였다 (Lee et al., 2010; Song et al., 2008). PCR을 이용한 cDNA 증폭은 다음의 센스 및 안티센스 프라이머 (5'→3')를 이용하여 수행하였다: iNOS sense, CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C; iNOS antisense, GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G; COX-2 sense, ACT CAC TCA GTT TGT TGA GTC ATT C; COX-2 antisense, TTT GAT TAG TAC TGT AGG GTT AAT G; TNF- $\alpha$  sense, ACA AGC CTG TAG CCC ACG; TNF- $\alpha$  antisense, TCC AAA GTA GAC CTG CCC; IL-6 sense, CAA GAA AGA CAA AGC CAG AGT CCT T; IL-6 antisense, TGG ATG GTC TTG GTC CTT AGC C; IL-1 $\beta$  sense, TGC AGA GTT CCC CAA CTG GTA CAT C; IL-1 $\beta$  antisense, GTG CTG CCT AAT GTC CCC TTG AAT C;  $\beta$ -actin sense, AGT GTG ACG TTG ACA TCC GTA AAG A; and  $\beta$ -actin anti-sense, GGA CAG TGA GGC CAG GAT GG. PCR 증폭 조건은 다음과 같다: iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 및  $\beta$ -액틴, 94 °C, 1분, 55 °C, 1분, 72 °C, 1분을 총 32 사이클 진행하고, IL-1 $\beta$ , 94 °C, 30초, 64 °C, 30초, 72 °C, 1분을 총 30 사이클 진행한다. PCR 산물은 1% 아가로스 겔에서 분리하여 에티뮴 브로마이드로 염색한 후 UV 하에서 시각화하였다.

[0038] <ELISA>

[0039] RAW 264.7 세포를 세 시간 동안 플라보카와인 A로 처리한 후 1  $\mu$ g/ml의 LPS로 24시간 동안 자극하였다. 상층액



은 모아 제조자의 지시대로 ELISA 키트 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)로 사이토카인 생성을 분석하였다 (Song et al., 2008).

[0040] <EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)>

[0041] RAW 264.7 세포는 세 시간 동안 플라보카와인 A로 처리한 후 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS로 20분간 자극하였다. 핵 추출물을 준비하고, EMSA를 수행하였다 (Song et al., 2011). 핵 추출물 (10  $\mu\text{g}$ )을 말단이  $^{32}\text{P}$ 로 표지된 이중가닥 NF- $\kappa\text{B}$  올리고뉴클레오타이드 (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'; Promega) 및 AP-1 올리고뉴클레오타이드 (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3'; Promega)와 함께 결합 완충액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 75 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10% 글리세롤, 0.25 mM DTT 및 1  $\mu\text{g}$ 의 poly dI/dC)에서 30분간 배양하였다. 이 DNA-단백질 복합체들은 TBE 완충액 (89 mM Tris-HCl, 89 mM boric acid, and 2 mM EDTA) 내의 6% 비변성 (native) 폴리 아크릴아마이드 젤 상에서 전기영동으로 분석하였다. 그런 다음, 젤은 건조하여 자기방사법으로 시험하였다.

[0042] <일시적 트랜스펙션 및 루시퍼레이스 분석법>

[0043] RAW 264.7 세포를 12-웰 플레이트에서 배양한 후 TransIT-2020 시약을 이용하여 제조자의 지시대로 pNF- $\kappa\text{B}$ -luc 및 pAP-1-luc 벡터 (Stratagene, La Jolla, CA, USA), 그리고 대조군 (pCMV- $\beta$ -갈락토시데이즈) 플라스미드로 일시적 코트랜스펙션하였다 (Kwon et al., 2011). 24시간 트랜스펙션 후, 세포를 세 시간 동안 플라보카와인 A로 선처리한 후 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 24시간 동안 자극하였다. 세포 용균액을 제조하여 루시퍼레이스 및  $\beta$ -갈락토시데이즈 활성을 측정하였다. 각 시료의 루시퍼레이스 활성은  $\beta$ -갈락토시데이즈 활성으로 정상화되었고, 그 결과는 유전자 발현 증가 배수 (fold transactivation)로 나타내었다.

[0044] <통계분석>

[0045] 결과는 최소한 3번의 독립적인 실험으로부터 얻은 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 값은 ANOVA (one-way analysis of variance)로 평가하였고, 그 후 GraphPad Prism 4.0 소프트웨어 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 던칸의 다중범위시험을 수행하였다. 오차는  $P < 0.05$ 의 경우 유의한 것으로 판단하였다.

[0046] **결과 1: LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 플라보카와인 A는 iNOS 및 COX-2 발현을 저해하고 이어 NO 및 PGE2 생성을 저해한다.**

[0047] 본 발명자들은 염증 모델로서 RAW 264.7 대식세포를 이용하였다 (Kim et al., 2011). 플라보카와인 A의 세포독성이 항염증 효과를 나타낼 가능성을 배제하기 위하여, RAW 264.7 세포에 대한 플라보카와인 A의 세포독성 (도 1A)을 MTT 분석법으로 평가하였다. 도 1B와 같이, 플라보카와인 A는 20  $\mu\text{M}$ 로 24시간 처리에도 세포독성을 전혀 나타내지 않았다. 그러나, 플라보카와인 A의 세포독성 효과는 투여량 의존적으로 48시간에 관찰되었다. 그리하여, 본 발명자들은 이후 실험에서 0~20  $\mu\text{M}$  농도에서 24시간 이내로 플라보카와인 A를 사용하였다. iNOS와 COX-2 발현에 미치는 플라보카와인 A의 저해효과를 시험하기 위하여 세포는 세 시간 동안 다양한 농도의 플라보카와인 A (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  및 20  $\mu\text{M}$ )로 선처리한 후 LPS로 자극하고, iNOS와 COX-2의 mRNA와 단백질 수준을 각각 RT-PCR 및 웨스턴 블랏팅으로 측정하였다. LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 mRNA와 단백질 발현 역학에 기초하여 (도 11), 세포의 mRNA 및 단백질 발현 분석을 위해 각각 4시간 및 18시간 동안 LPS로 자극하였다. 도 2A 및 2B와 같이, 플라보카와인 A는 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 mRNA와 단백질 발현을 투여량 의존적으로 현저히 억제하였다. NO와 PGE2는 각각 iNOS 및 COX-2의 효소활성에 의해 생성되므로 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 NO와 PGE2 생성에 미치는 플라보카와인 A의 영향을 평가하였다. 세 시간 동안 플라보카와인 A로 선처리한 세포를 18시간 동안 LPS로 자극하였다. 세포 상층액에서 NO와 PGE2의 농도는 각각 그리스 분석법 (Griess assay) 및 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에서 NO와 PGE2 생성은 LPS로 자극하면 현저히 증가하였고, 플라보카와인 A는 NO와 PGE2 생성 증가를 투여량 의존적으로 억제하였다 (도 2C 및 2D).

[0048] **결과 2: RAW 264.7 세포에서 플라보카와인 A는 LPS로 유도되는 NF- $\kappa$ B 활성화를 저해한다.**

[0049] NF- $\kappa$ B는 LPS에 대한 염증반응 중 활성화되는 주요 전사인자중 하나이다. NF- $\kappa$ B 활성화는 친염증성 효소인 iNOS 및 COX-2를 포함하여 염증과 관련된 수많은 유전자의 전사를 매개한다 (Gloire et al., 2006). 플라보카와인 A가 신호전달경로에 영향을 주어 NF- $\kappa$ B 활성화를 일으키는지를 알아보기 위해 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포로부터 핵 추출물을 제조하고 EMSA를 이용하여 분석하였다. 도 3A와 같이, 플라보카와인 A 선처리된 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 투여량 의존적으로 NF- $\kappa$ B DNA 결합활성을 감소시켰다. 다음으로, 본 발명자들은 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 플라보카와인 A가 NF- $\kappa$ B p65의 핵으로의 이동 및 인산화를 저해하는지를 시험하였다. 도 3B와 같이, 플라보카와인 A는 LPS로 유도되는 NF- $\kappa$ B p65의 핵으로의 이동 및 인산화를 투여량 의존적으로 억제하였다. 뿐만 아니라, 플라보카와인 A는 LPS로 유도되는 I $\kappa$ B $\alpha$  분해를 현저히 저해하였다. 본 발명자들은 NF- $\kappa$ B 프로모터 활성에 대한 플라보카와인 A의 효과를 평가하였다. RAW 264.7 세포는 NF- $\kappa$ B 프로모터 루시퍼레이스 구축물로 일시적으로 트랜스펙션시키고 플라보카와인 A를 가하거나 가하지 않은 상태로 24시간 동안 LPS로 자극하였다. LPS 자극은 NF- $\kappa$ B 루시퍼레이스 활성을 약 4.2배로 현저히 강화한 반면, 플라보카와인 A는 투여량 의존적으로 NF- $\kappa$ B 루시퍼레이스 활성을 감소시켰다 (도 3C). 이러한 결과는 플라보카와인 A가 NF- $\kappa$ B 활성화 저해를 통해 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 발현을 저해함을 제시한다.

[0050] **결과 3: RAW 264.7 세포에서 플라보카와인 A는 LPS로 유도되는 AP-1 활성화를 저해한다.**

[0051] NF- $\kappa$ B와 더불어, 전사인자 AP-1도 염증반응의 전사조절에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Zhang and Mosser, 2008). 따라서, LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 AP-1 DNA 결합활성에 미치는 플라보카와인 A의 영향을 시험하였다. 도 4A와 같이, 플라보카와인 A는 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도되는 AP-1 DNA 결합활성을 현저히 저해하였다. 다음으로, c-Jun/c-Fos의 전이 및 c-Jun의 인산화와 같은 LPS로 유도되는 일련의 신호전달에 의한 AP-1 활성화에 미치는 플라보카와인 A의 영향을 시험하였다. 도 4B와 같이, LPS로 유도되는 c-Jun/c-Fos의 전이 및 c-Jun의 인산화는 플라보카와인 A를 처리하자 투여량 의존적으로 저해되었다. 뿐만 아니라, AP-1 리포터 플라스미드를 이용한 일시적 트랜스펙션 분석은 플라보카와인 A가 LPS로 유도되는 AP-1 프로모터 활성을 억제하였음을 보여준다 (도 4C). 이러한 결과는 LPS로 유도되는 iNOS 및 COX-2 발현에 대한 플라보카와인 A의 억제가 AP-1 활성화를 차단함으로써 인한 것임을 제시한다.

[0052] **결과 4: RAW 264.7 세포에서 플라보카와인 A는 JNK와 p38 MAPK 인산화를 저해함으로써 LPS로 유도되는 iNOS 및 COX-2 발현을 억제한다.**

[0053] 앞선 연구 결과, 대식세포에서 MAPKs 활성화는 LPS로 유도되는 NF- $\kappa$ B와 AP-1 활성화 및 이어지는 친염증성 매개자들의 활성화에 결정적인 것으로 보고된바 있다 (Kaminska, 2005). 본 발명자들은 MAPK에 특이적인 약학적 저해제를 이용함으로써 MAPK 경로 활성화가 LPS로 유도되는 iNOS 및 COX-2 발현과 관련되어 있는지를 결정하였다. 도 5A와 같이, JNK 및 p38 MAPK 저해제 (SP600125 및 SB203580)로 선처리한 경우 LPS로 유도되는 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현이 억제되는 반면, ERK 저해제 (PD98059)는 거의 효과를 나타내지 않았다. mRNA 결과와 일치하게, JNK와 p38 MAPK 저해제는 iNOS 및 COX-2 단백질 수준을 감소시켰고 (도 5B), 이는 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 JNK와 p38 MAPK 둘다 iNOS 및 COX-2의 발현을 매개함을 가리킨다. 플라보카와인 A에 의한 iNOS 및 COX-2 발현 저해가 MAPKs 경로를 통해 매개되는지를 조사하기 위해, 본 발명자들은 LPS로 유도되는 ERK, JNK 및 p38 MAPK 인산화에 대한 플라보카와인 A의 효과를 인산-특이적 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅으로 시험하였다. 도 6과 같이, 플라보카와인 A는 투여량 의존적으로 LPS로 유도되는 JNK 및 p38 MAPK 인산화를 저해한 반면, ERK 인산화에는 영향을 미치지 않았다. 종합하면, 이러한 결과들은 RAW 264.7 세포에서 플라보카와인 A가 JNK 및 p38 MAPK 인산화를 저해함으로써 LPS로 유도되는 iNOS 및 COX-2 발현을 억제함을 제시한다.

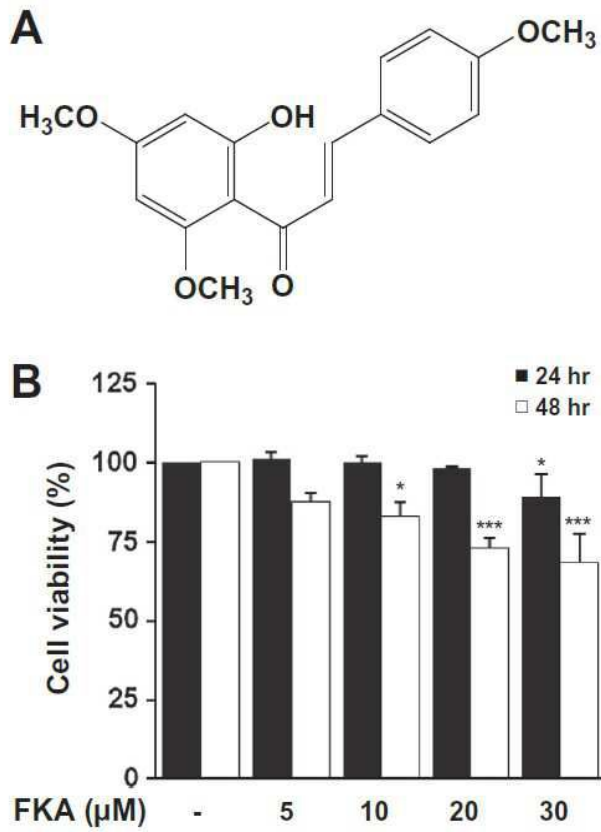
[0054] **결과 5: LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 플라보카와인 A는 친염증성 사이토카인 생성을 저해한다.**

[0055] TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL- $\beta$ 와 같은 친염증성 사이토카인들은 염증성 질병 발병 동안 증가하며 면역 및 염증 반응에서 중요한 역할을 수행한다. 본 발명자들은 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL- $\beta$ 와 같은 친염증성 사이토카인 생성에 미치는 플라보카와인 A의 효과를 연구하였다. 세포를 플라보카와인 A로 세 시간 동안 선처리한 후 LPS로 24시간 동안 자극한 다음, 배양 상층액은 ELISA 및 RT-PCR로 사이토카인 수준을 분석하였

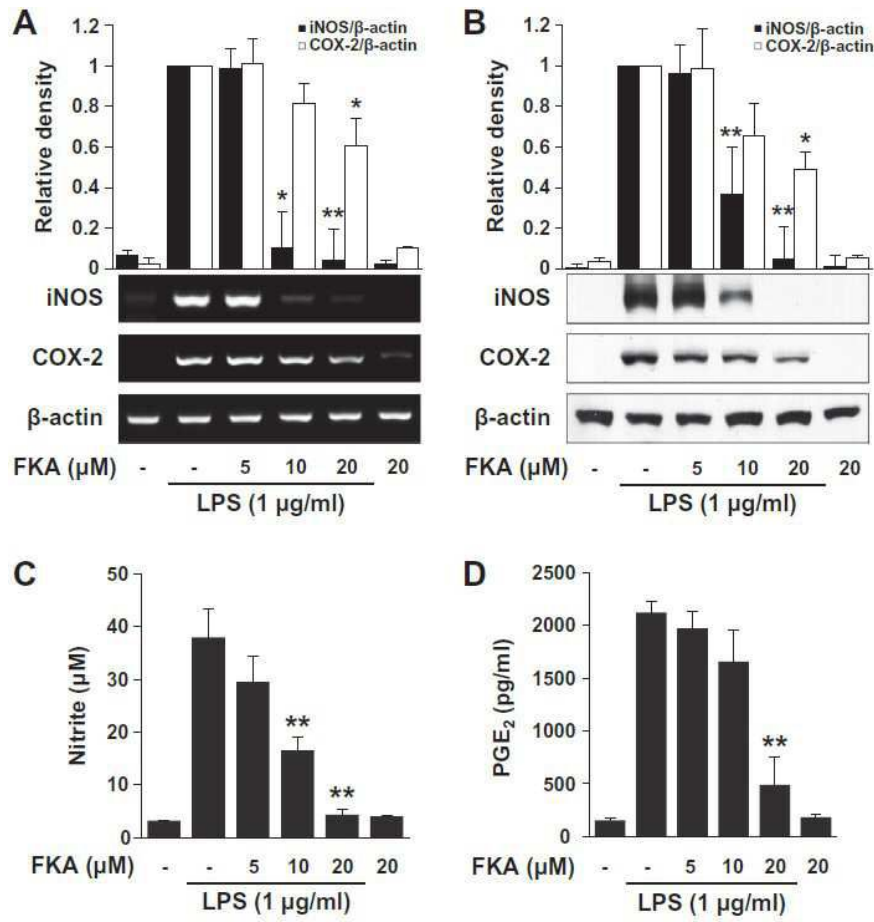
다. 플라보카와인 A는 LPS로 유도되는 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL- $\beta$  단백질 발현 (도 7A) 및 mRNA 발현 (도 7B)을 투여량 의존적으로 현저히 감소시켰다.

도면

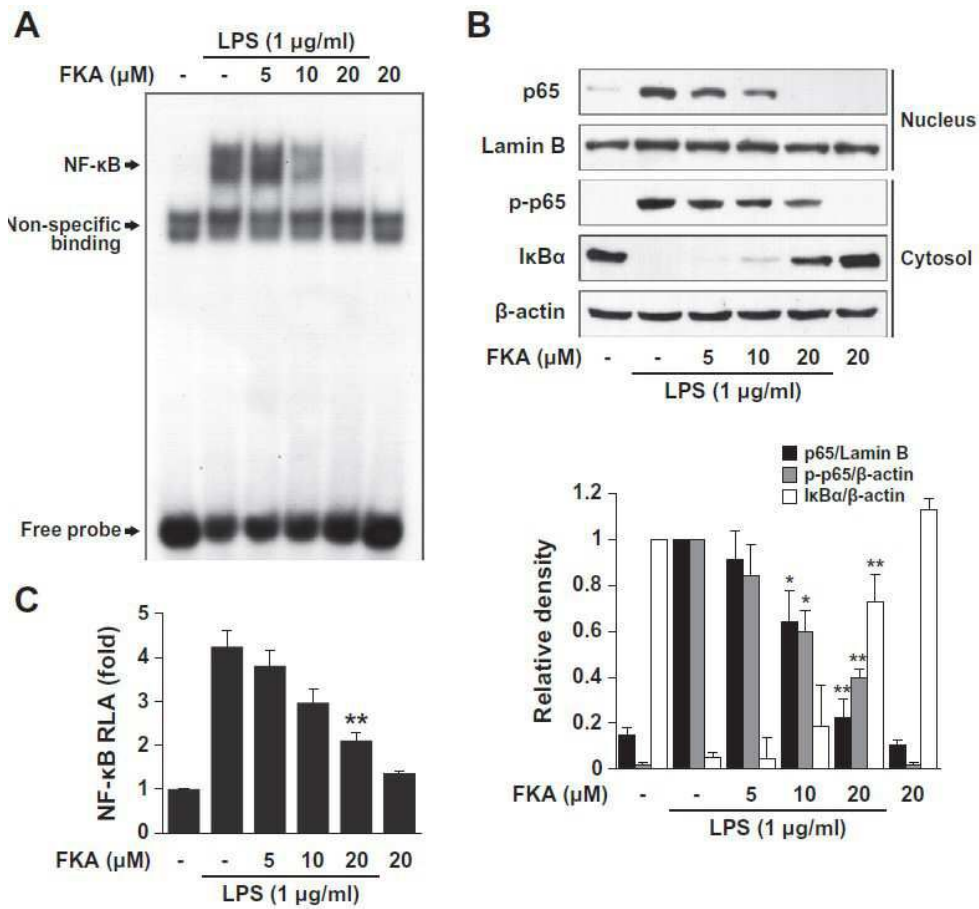
도면1



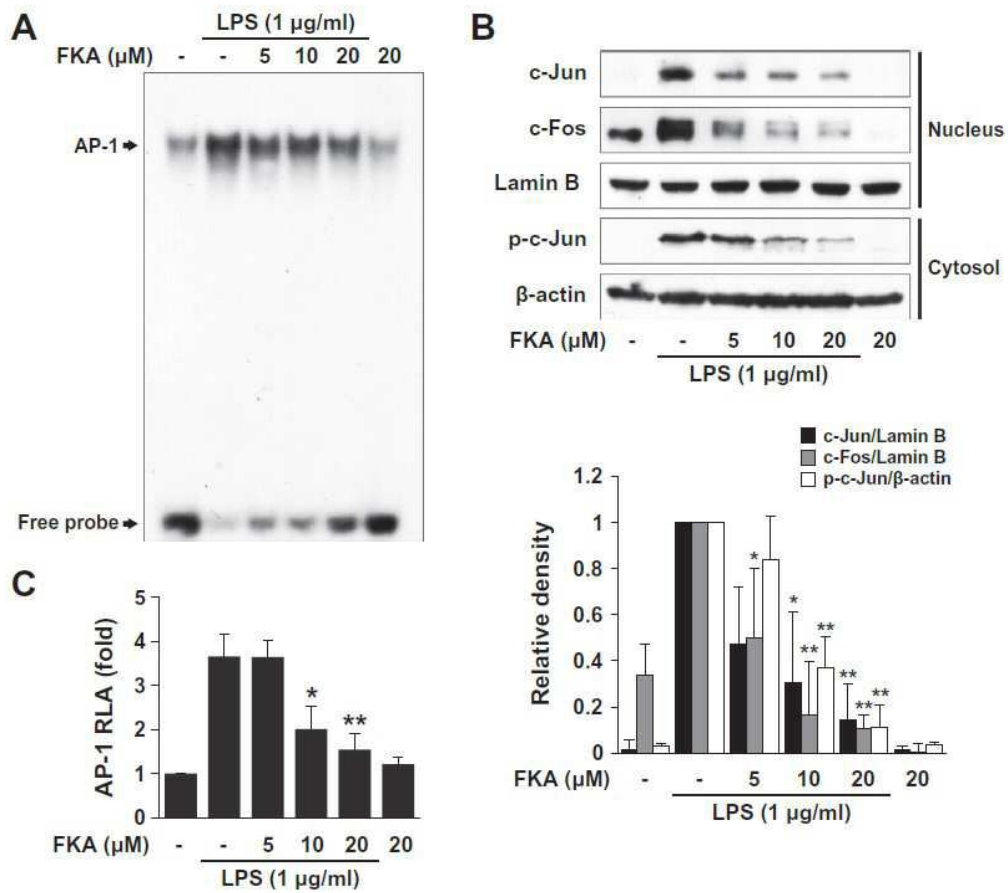
도면2



도면3

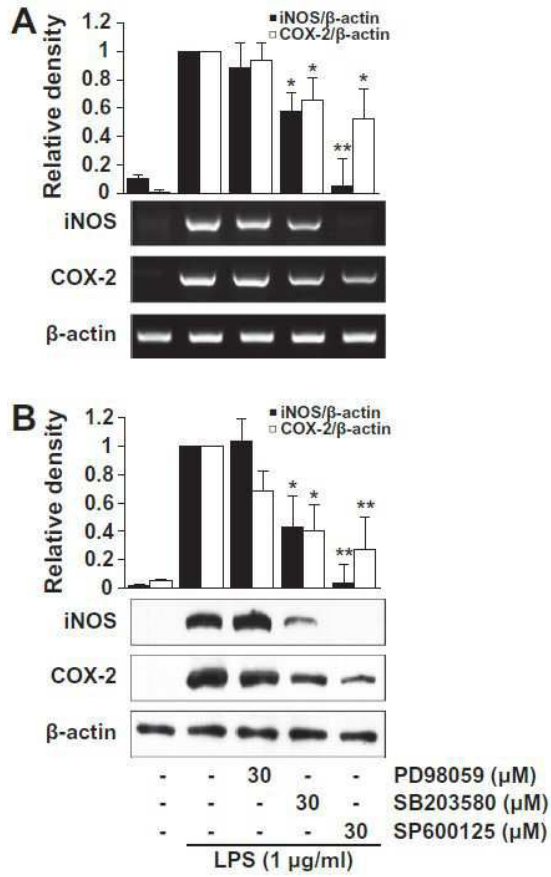


도면4

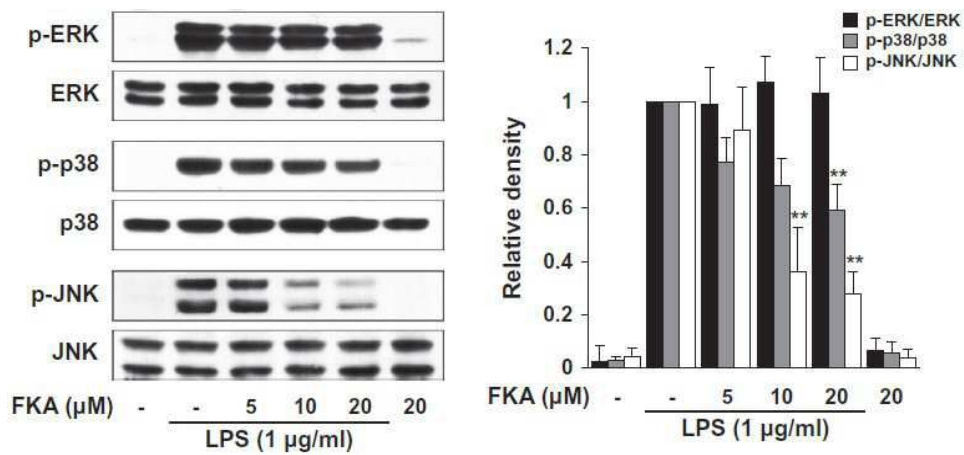




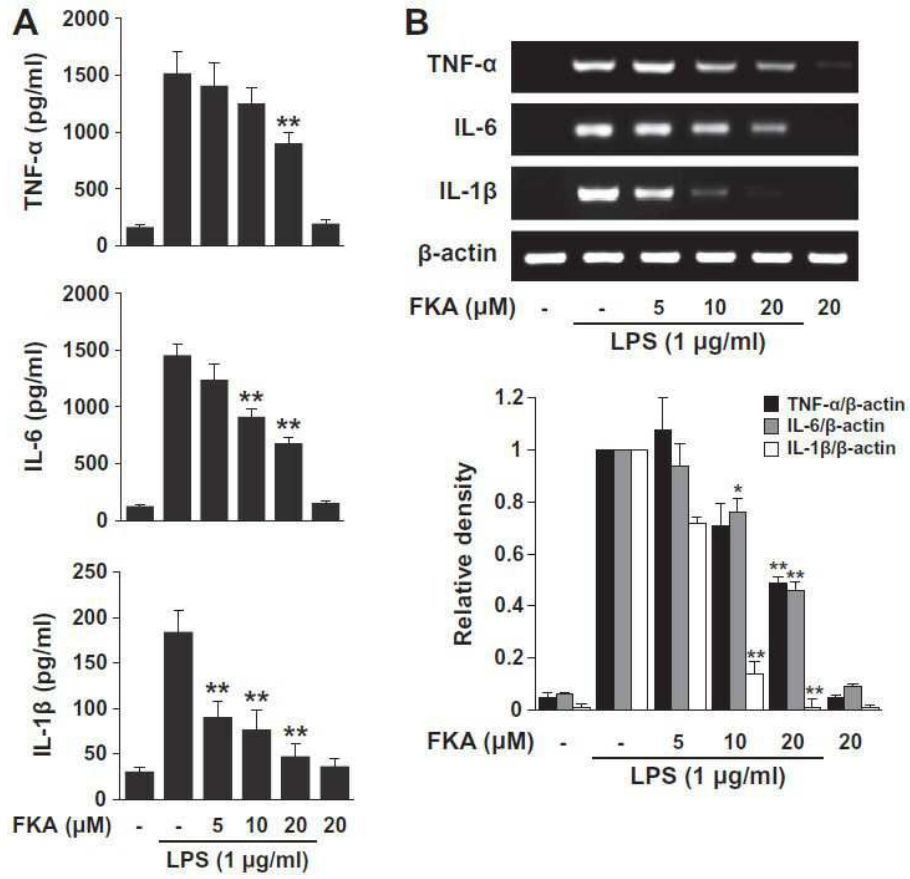
도면5



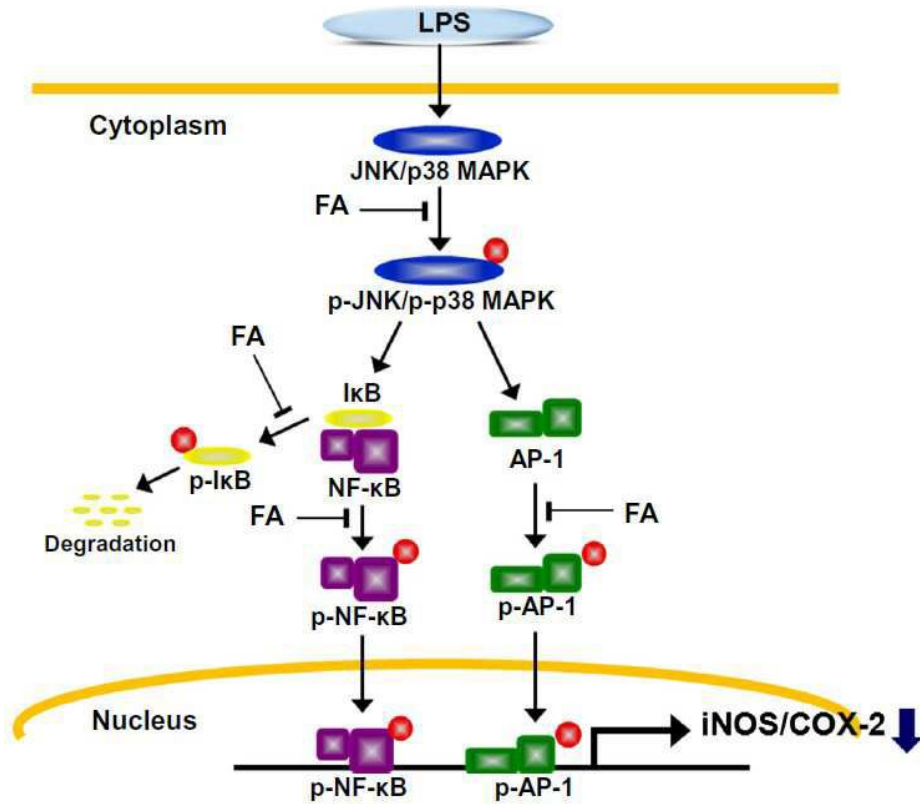
도면6



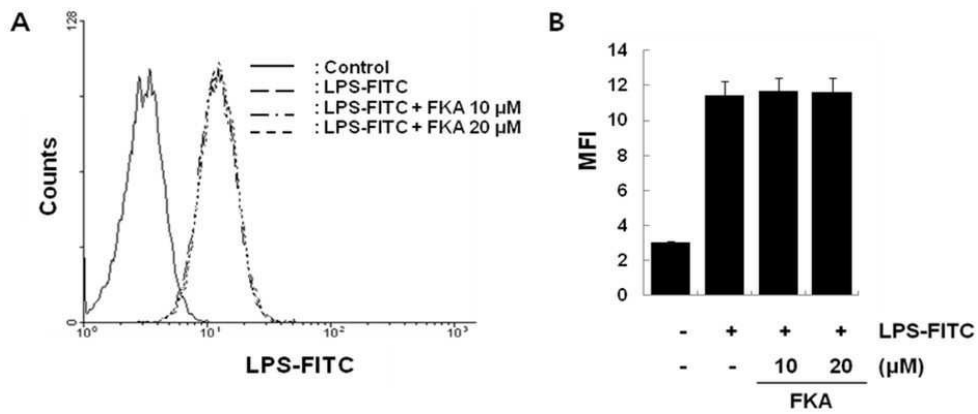
도면7



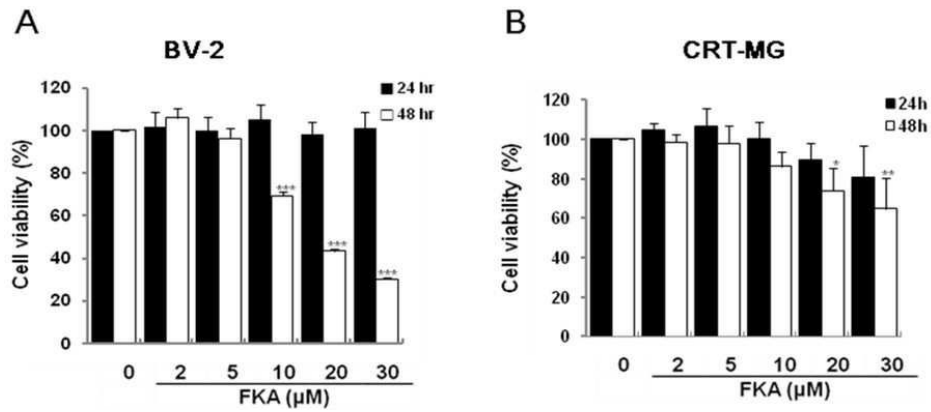
도면8



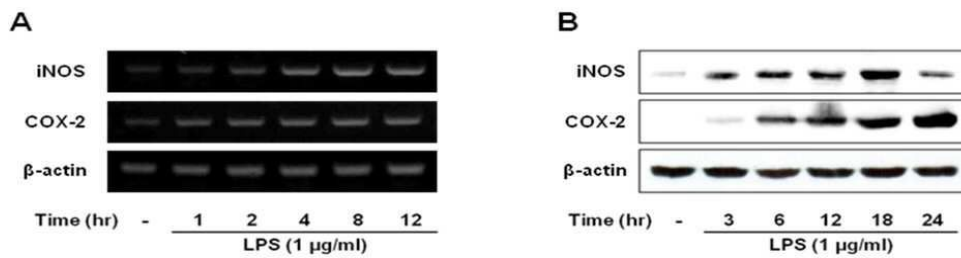
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Composition containing flavokawain A for preventing and treating inflammatory disease
- <130> Hallym-JSPARK-flavokawainA
- <160> 12
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> sense primer of iNOS
- <400> 1
- cccttcgaa gtttctggca gcagc
- <210> 2
- <211> 25
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of iNOS

<400> 2

ggctgtcaga gcctcgtggc tttgg

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of COX-2

<400> 3

actcactcag tttgttgagt cattc

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of COX-2

<400> 4

tttgattagt actgtagggt taatg

25

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of TNF- $\alpha$

<400> 5

acaagcctgt agcccacg

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of TNF- $\alpha$

<400> 6

tccaaagtag acctgccc

18

<210> 7

<211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> sense primer of IL-6  
  
 <400> 7  
 caagaaagac aaagccagag tcctt 25  
 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> antisense primer of IL-6  
 <400> 8  
 tggatggtct tggtccttag cc 22  
 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> sense primer of IL-1b  
 <400> 9  
 tgcagagttc cccaactggt acatc 25  
 <210> 10  
  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> antisense primer of IL-1b  
 <400> 10  
 gtgctgccta atgtcccctt gaatc 25  
 <210> 11  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> sense primer of b-actin  
 <400> 11



agtgtgacgt tgacatccgt aaaga

25

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of b-actin

<400> 12

ggacagtgag gccaggatgg

20