



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월12일
(11) 등록번호 10-1833667
(24) 등록일자 2018년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/05 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/05 (2013.01)

Y10S 514/825 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0020001

(22) 출원일자 2017년02월14일

심사청구일자 2017년02월14일

(56) 선행기술조사문헌

CN103622990 A*

서성호, “청각으로부터 류마티스성 관절염 억제 활성물질의 분리 및 특성”, 고려대학교 석사학위 논문, 2004

Journal of Life Science, 2007, 제17권, 제7호, 페이지 931-936

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사씨에스텍

광주광역시 북구 첨단벤처소로38번길 27-3 (월출동)

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

김춘성

광주광역시 남구 서문대로 678번길 7 대주1차아파트 101동 1002호

문성민

광주광역시 서구 풍암순환로 86 삼능남양아파트 102-1603

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최석진

전체 청구항 수 : 총 1 항

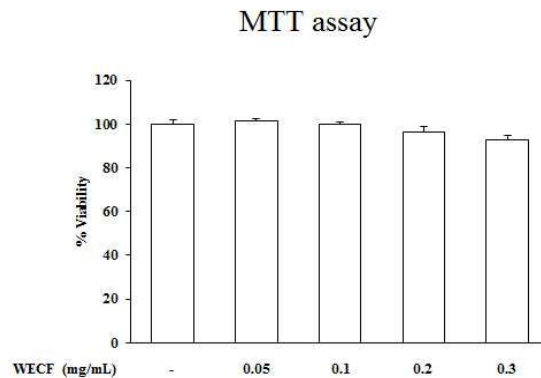
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 청각 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염골 보호 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 청각(*Codium fragile*)의 열수추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공함으로써 효과가 뛰어난 천연물 유래의 조성물을 제공할 수 있어, 관절염 개선의 효과를 기대하는 화장품, 음료, 기능성 식품 등에 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최윤희

광주광역시 서구 상무공원로 114 (치평동, 해광한
신아파트), 101동 1103호

한설희

광주광역시 광산구 풍영로101번길 22 (흑석동, 광
주 수완지구 이지 더원 아파트) 106동 103호

이슬아

광주광역시 서구 화정로 103 (쌍촌동, 빗고을파크
아파트) 202동 508호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0005657

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 (주)씨에스텍

연구사업명 지역특화산업육성(R&D) 기술 개발

연구과제명 해양수산자원을 이용한 건강기능성식품 및 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)씨에스텍

연구기간 2016.07.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

청각(*Codium fragile*)의 열수추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 청각(*Codium fragile*)의 열수추출물을 유효성분으로 포함하는 관절연골 보호 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 녹조류는 약리활성을 갖는 넓은 범위의 천연물을 공급하는 것으로 잘 알려져 있다. 녹조류에서 유래한 황산화 다당류(Sulfated polysaccharides; SPs)는 항염, 항통증 약물의 개발에 이용될 수 있는 대단한 잠재력이 있음을 보여 왔다. 청각(*Codium fragile*)은 Codiales 과에 속하는 식이 가능한 녹조류로, 동아시아, 오세아니아 및 북유럽의 해안을 따라 널리 분포하고 있다.

[0003] 한국에서 청각은 요리에 사용되는 익숙한 해조류 중 하나이며 동양의학에서 요충증, 부종 및 배뇨장애의 치료에 사용되어 왔다. 청각에서 분리한 피루빌 및 황산화 갈락탄은 유도성 일산화질소 합성 과정에서 inducible nitric oxide(iNOS)의 mRNA와 단백질 발현 수준을 감소시키는 것으로 알려져 있으며, 전염증성 사이토카인으로 알려져 있는 IL-1 β , IL-6, 및 TNF- α 의 mRNA 및 단백질의 발현을 억제한다는 보고가 있다.

[0004] 최근 몇몇 연구는 청각 추출물이 건강에 도움이 되며, 항암, 혈관신생 억제 및 항산화 효능이 있다고 보고하였다. 또한, 청각의 에탄올 또는 메탄올 추출물은 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에서 NF- κ B 활성을 저해하여 염증을 억제하는 보고가 있다.

[0005] 관절염은 관절에 염증 및 통증이 발생하여 생기는 질환으로서, 퇴행성 관절염(osteoarthritis), 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.

[0006] 퇴행성 관절염의 원인은 노화 현상이나 과다한 체중과 관계가 깊으며, 나이가 많아질수록 여성에서 많이 발병되고 있다. 초기 증상은 한개 또는 두개의 관절이 강직과 함께 쑤시는 듯한 동반 통증이 나타나며, 장기화되면 관절 주변에 골의 과잉형성 및 관절의 변형 등을 초래하게 된다. 퇴행성 관절염이 유발되는 기전으로는 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 생성이 증가하고 콜라게네이즈(collagenase), 스트로멜라이신(stromelysin) 등과 같은 MMPs의 분비가 증가되어 관절연골 기질의 손상을 유발한다.

- [0007] 현재 임상적으로 사용되고 있는 퇴행성 관절염의 치료로는, 진통제, 스테로이드제, 비스테로이드계 항염증제 등과 같은 약물 치료제나 히알루론산, 글루코사민, 콘드로이틴 등의 연골보호제를 이용하거나, 관절경 수술, 경골 근위부 절골술, 관절부분 치환술, 슬관절 전치환술 등의 외과적 치료에 의한다. 그러나 약물치료제의 경우는 통증이나 염증반응 자체를 비특이적으로 완화시키는 효과만을 가지고 있으며, 연골 보호제는 단지 연골세포에 영양을 공급해 주거나 충격을 완화시킴으로써 관절을 보호해 주는 역할을 할 뿐이다.
- [0008] 또한 스테로이드성 제제를 장기간 복용할 시, 칼슘의 손실로 골다공증, 고혈압, 당뇨병 등을 초래할 수 있는 부작용이 있으므로 약물치료는 대부분의 경우 통증을 감소시키는 목적으로만 사용되고 있고, 영구적인 인공관절 치환술이 주를 이루고 있고 근본적인 치료효과를 주는 약물이나 수술법은 현재까지 없는 실정이다.
- [0009] 류마티스 관절염은 다발성 관절염을 특징으로 하는 염증성 질환으로서, 자가면역 현상이 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.
- [0010] 염증이 지속되면서 염증성 활막 조직이 증생(hyperplasia)하게 되면 뼈와 연골을 파괴하여 관절 구조가 변형되고 운동 장애가 발생된다. 류마티스 관절염에서도 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.
- [0011] 염증은 생물학적, 화학적 및 물리학적 자극에 노출되면서 외부 병원 체, 손상 및 감염에 대해 인체 면역 시스템의 첫 번째 생물학적 복합반응이다. 박테리아 및 바이러스 감염에 맞서기 위해 인체는 염증이 필요하지만, 과도하거나 지속되는 염증은 염증성 관절염, 죽상경화증 및 천식 등의 만성질환 발병과 관련되어 있다. 염증과정은 일반적으로 백혈구와 대식세포가 모이는 것이 특징이다.
- [0012] 지질 다당류(Lipopolysaccharides;LPS)는 재빨리 대식세포를 활성화시켜 염증반응 매개체 인 NO 및 프로스타글란딘 E2(PGE2) 뿐만 아니라 전염증성 사이토카인의 생성을 자극한다. 특히, 염증유도에 중요한 COX-2는 대식세포에서 LPS 및 전염증성 사이토카인과 같은 인자에 반응하여 빨리 증가한다. 염증에 관련된 신호전달 기작으로 알려져 있는 Nuclear factor-kappa B(NF- κ B)는 여러 전염증성 사이토카인의 분비에 반응하여 COX-2의 발현을 조절하는 양성 조절자이며 염증, 산화 스트레스 및 세포자살을 포함하는 스트레스 반응 관련 유전자를 조절하는 이합체 전사조절자이다.
- [0013] 생리 조건에서 NF- κ B는 Rel A (p65)와 NF- κ B1 (p50)로 구성된 이형 이합체로, κ B 억제자(I κ B)에 결합된 비활성화된 형태로 세포질에 위치한다. 그러나 염증과정에서 NF- κ B는 인산화된 후, I κ B의 분해에 의해 활성화된다. 그 후, NF- κ B 이형 이합체는 핵 내로 재빨리 이동하여 iNOS, COX-2 및 전염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)의 유전자 발현을 활성화시킨다.
- [0014] 또 다른 염증관련 신호전달 기작으로 알려져 있는 MAPKs 경로는 세포증식, 분화 및 생존과 같이 여러 세포의 자극을 특이적 세포반응으로 전환시키는 것을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다. 세 종류의 주요 MAPK가 포유류에서 밝혀져 있는데, 이름은 세포외 신호조절 인산화효소 (extracellular signal-regulated kinases;ERK-1/2), c-Jun N-말단 인산화효소(c-Jun N-terminal kinase;JNK) 및 p38 이다. ERK, JNK 및 p38의 활성화로 MAPK 신호폭포는 인산화를 조정하여 AP-1 (cFos/cJun), ETS, RUNX-2, HIF-2 α 및 C/EBP β 와 같은 전사인자를 활성화시키고, 이들은 NF- κ B와 함께 이화 및 염증반응에 관련된 유전자의 발현을 조절한다. 몇몇 연구는 NF- κ B의 활성화에 MAPKs가 중요한 역할을 하고 있음을 보여주고 있다. 따라서 이들 경로를 차단하면 만성염증으로 인한 관절염 및 퇴행성 관절염 효과적으로 감소시킬 수 있다.
- [0015] 관절염 치료제를 천연물 소재로 개발하고 있는 것으로는 대부분 천연 추출물을 이용하여 제품화하고 있어 정확한 작용기전이 밝혀져 있지 않으나, 대부분 경구제로서 복용이 용이하고 장기간 복용을 할 수 있어 그 개발이 활발하게 이루어지고 있다. 현재까지 개발되고 있는 소재로는 관절액과 성분이 유사한 히알루론산을 주사하거나 건강보조식품으로 글루코사민, 콘드로이틴을 함께 복용하기도 하며, 생약등의 소재로 동의보감 등의 기성 한약서에 사용되고 있는 천연물을 이용하여 개발하고 있다.

특허문헌

- [0016] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-1571792호에서는 해조류 추출물을 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따르면 참모자반, 미역 및, 다시마의 수(水) 추출 혼합물을 함유하는 화장료 조성물이 제공되며, 본 발명에 따른 해조류 추출물을 함유하는 화장료 조성물은 우수한 항산화성, 항염성 및 항아토피성을 지니면서도, 자극성이 없어 안전한 해조류 추출물을 함유하는 화장료 조성물을 개시하고 있다.
- (특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-2012-0077267호에서는 해양생물인 청각으로부터 제조되는 화장료 조성물에 관한 기술로서, 항염증 효과, 각질 생성방지 효과, 항노화 효과 및 멜라닌 색소 형성 방지 효과를 가지는 화장료 조성물을 개시하고 있다.
- (특허문헌 0003) 대한민국 공개특허 10-2011-0108916호에서는 당뇨, 고지혈증, 비만 등 대사조절에 핵심적인 작용을 하는 핵수용체인 PPARs(peroxisome proliferator-activated receptors) 활성을 지닌 자생 청각 메탄올 추출물을 함유하는 조성물에 관한 것으로, 청각 추출물은 상대적으로 부작용 및 독성 발현율이 적고 생체 친화적이며 지질대사 및 당 대사 개선 효과가 있어 동맥경화증, 고지혈증, 당뇨병 등의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있는 PPAR 활성을 지닌 자생 청각 추출물을 함유하는 조성물을 개시하고 있다.
- (특허문헌 0004) 대한민국 공개특허 10-2015-0138565호에서는 해조류에서 추출된 생리활성물질로서의 효능을 갖고 해조류로부터 유효성분을 추출하기 위한 방법으로 2종 이상의 서로 다른 유기용매로 추출함으로써 높은 수율로 생리활성물질을 수득할 수 있는 것을 확인한 항산화 및 항염증 효과를 갖는 큰잎모자반 용매 추출물 및 이의 제조방법을 개시하고 있다. 그러나 상기 발명들은 청각의 열수추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 본 발명과 그 구성 및 효과에서 차이를 보인다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0017] 본 발명은 동아시아에서 요리의 양념으로 주로 사용되어 왔던 청각에서 염증 개선 및 관절연골 보호에 유효한 열수추출물을 수득하여 효과가 뛰어난 천연물 유래의 관절연골 보호 조성물을 제공하는 데에 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 청각의 열수추출물은 마우스 대식세포에서 일산화질소(NO)의 생성과 유도성 일산화 질소 합성효소(iNOS)의 발현을 억제하며, 싸이클로옥시게네이스-2(COX-2) 단백질 발현억제를 통해 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하며, 전 염증성 사이토카인으로 알려져 있는 IL-1 β , IL-6 그리고 TNF- α , 의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하고 있다. 또한 백서에 무릎에서 분리한 연골세포에서 일산화질소(NO)의 생성과 유도성 일산화 질소 합성효소(iNOS)의 단백질 발현을 억제하며, 관절연골 기질 분해효소로 알려져 있는 MMP-2, -9, -13, ADAMTS5의 단백질 발현을 억제하였으며 monosodium iodoacetate (MIA) 유도 관절염 유발동물에서 관절연골을 구성하는 proteoglycan의 합성이 증가함을 확인하였다.
- [0019] 본 발명의 청각 열수추출물은 I κ B- α 의 인산화와 분해를 저해하여 p65의 핵 내로의 이동을 억제함으로써 NF- κ B 신호전달 경로를 저해 및 MAPKs의 인산화를 억제함으로써 항염증 및 관절보호에 대한 특징으로 하는 관절연골 보호 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 청각 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 및 관절연골 보호에 관한 조성물을 이용함으로써 효과가 뛰어난 천연물 유래의 항염 및 관절연골 보호 조성물을 제공할 수 있어, 염증 개선 효과 및 관절연골 보호 효과를 기대하는 기능성 식품, 의약품, 음료 등에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 청각 열수추출물이 마우스 대식세포 RAW264.7 세포의 생존력에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 청각 열수추출물이 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 일산화 질소(NO) 및 유도성 일산화질소(iNOS)의 수준에 미치는 저해효과를 나타낸다.
- 도 3은 청각 열수추출물의 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 프로스타글란딘E₂(PGE₂) 및 싸이클로옥시게네이즈-2에 대한 저해효과를 나타낸다.
- 도 4는 청각 열수추출물의 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 전염증성 사이토카인에 대한 저해효과를 나타낸다.
- 도 5는 청각 열수추출물이 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 I κ B- α 인산화 및 NF- κ B의 핵으로의 이동 활성화에 미치는 효과를 나타낸다.
- 도 6은 청각 열수추출물이 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 MAPKs(ERK, JNK, p38)의 인산화에 미치는 효과를 나타낸다.
- 도 7은 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 생존력에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 8는 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도된 일산화 질소(NO) 및 유도성 일산화질소(iNOS)의 수준에 미치는 저해효과를 나타낸다.
- 도 9는 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도 후 연골 구성성분으로 알려져 있는 aggrecan의 단백질 발현 증가를 나타낸다.
- 도 10은 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도 후 관절연골 기질 분해 효소로 알려져 있는 ADAMTS 5의 단백질 발현억제를 나타낸다.
- 도 11은 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도 후 관절연골 기질 분해 효소로 알려져 있는 MMP-2, -9, -13의 단백질 발현 억제제를 나타낸다.
- 도 12는 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도 후 세포 배양액을 이용하여 gelatin zymography을 수행하여 MMP-2, -9 분해효소 억제를 나타낸다.
- 도 13은 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도 후 MAPKs(ERK, JNK, p38)의 인산화 억제에 미치는 효과를 나타낸다.
- 도 14는 백서를 이용한 monosodium iodoacetate (MIA) 골관절염 통증모델에서 proteoglycan 합성 증가 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 LPS로 자극시킨 RAW264.7 세포주에서 청각의 열수 추출물이 염증억제 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 백서의 무릎에서 분리한 연골세포에서 연골을 구성하는 aggrecan의 단백질 발현 증가를 확인하였으며, 연골기질 분해효소로 알려져 있는 MMP-2, -9, -13 그리고 ADMATS5의 단백질 발현 억제를 확인하였다.
- [0023] 또한 monosodium iodoacetate (MIA) 유도 관절염 유발 동물모델에서 관절을 구성하고 있는 proteoglycan의 발현이 증가함을 확인하였다. LPS로 자극한 마우스 대식세포 RAW264.7 세포주에서 NF- κ B의 활성화 및 MAPKs 인산화를 억제하여 전염증성 사이토카인 및 매개체의 생산을 억제 및 관절연골 기질 분해효소의 발현을 억제함을 확인하고, 이를 통하여 청각 열수추출물의 관절연골보호 조성물을 완성하였다. 이하 본 발명을 구체적인 실시예를 들어 자세히 설명한다.
- [0024] I. 재료 및 방법
- [0025] 1. 청각(C. fragile)의 수용성 황산화 다당류 추출물(water-soluble sulfated polysaccharides extract of C. fragile; WECF)의 준비
- [0026] 2016년 6월 완도 해변에서 수집한 신선한 청각을 수돗물에 3번 세척 하여 표면에 붙어있는 소금, 착생식물 및

모래를 제거한 후, 50℃에서 에어건조기를 이용하여 48 시간 동안 건조시켰다. 건조된 시료는 분쇄기로 분쇄 후 20배 부피의 증류수를 넣고 95℃에서 1 시간 동안 추출하였다. 이후, 3M paper로 추출액을 여과 후 동결건조 하였다. 건조된 추출 분말은 100 mg/ml로 증류수에 용해시킨 후 0.2- μ m 주사기 필터로 여과하여 본 실험을 수행 하였다.

2. 발명에 사용된 시약

LPS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), sulfanilamide, N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, 및 phosphoric acid 는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)/F12 및 penicillin-streptomycin solution은 WelGene (Deagu, Republic of Korea)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)은 Corning (Corning, NY)에서, anti-iNOS에 대한 항체는 Abcam(Cambridge, MA)에서, anti-iNOS를 제외한 1차 및 2차 항체는 Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

3. 세포 배양 및 세포 생존력 측정

마우스 대식세포 세포주인 RAW264.7 세포주는 한국생명공학연구원 (KRIBB, Daejeon, Republic of Korea)에서 분양받아 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium) 배지로 습도가 조절되는 5% 이산화탄소 배양기 안에서 37℃에서 배양하였다. 생후 3일된 백서의 무릎에서 배양한 연골 세포는 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)/F12 배 지로 습도가 조절되는 5% 이산화탄소 배양기 안에서 37℃에서 배양하였다. 세포 생존력 분석을 위하여 1×10^5 cells/ml로 세포를 6 well plate에 6 시간 동안 배양 후 상기에서 제조한 WECF를 다양한 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 정각 추출물 처리 후, MTT assay를 이용하여 세포 생존력을 측정하였다.

4. 일산화 질소 (NO)의 측정

마우스 대식세포 RAW264.7과 백서 초대배양 연골세포를 1×10^5 cells/ml 로 6 well plate에 배양하였다. 각각 세포에 WECF를 다양한 농도로 처리한 다음 1시간 동안 처리한 다음, 이어서 LPS(0.2 μ g/ml)와 IL-1 β (20 ng/ml)을 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 배양액 내에 축적된 아질산염을 Griess 반응에 기초하여 NO 생성의 지표로 측정하였다. 간단히 설명하면, WECF 다양한 농도로 처리한 플레이트의 상층액을 각 100 μ L 취하여 동량의 Griess 시약(1% [w/v] sulfanilamide in 5% [v/v] phosphoric acid and 0.1% [w/v] naphthylethylenediamine)을 암실에서 10분간 혼합하였다. 그 다음, 마이크로플레이트 리더(Epoch Biotech; Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)로 540 nm에서 의 흡광도를 측정하였다. 아질산염의 농도는 아질산나트륨의 표준곡선과 비교하여 결정하였다.

5. Total RNA 분리 및 역전사 효소 중합연쇄반응(Reverse-transcriptase PCR)

Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 각각세포로부터 total RNA를 분리하였다. Prime Script™ 1 st strand cDNA 합성 키트(Takara Bio Inc., Otsu, Japan)를 이용하여 1 μ g 의 전체 RNA로부터 cDNA를 합성 후 다양한 primer 을 이용하여 RNA 발현을 확인하였다.

6. 핵 단백질과 세포질 단백질 분리

RAW264.7 세포에 WECF를 1시간 처리한 다음, 이어서 LPS(0.2 μ g/ml)와 IL-1 β (20 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 상기 세포를 회수한 후, 차가운 PBS로 2번 세척하였다. 세포는 NEPER™ 핵 및 세포질 추출 시약키 트(Thermo Scientific, IL, USA)를 사용하여 제품설명서에 따라 세포를 용해시켰다. 간단히 설명하면, 시약으로 재 현탁 시킨 세포를 4℃에서 15,000 g로 5 분간 원심분리 하였으며, 세포질 분획을 포함하는 상층액은 깨끗한 튜브로 옮겼다. 이어서 핵을 포함한 펠렛은 세포질 등의 오염물을 제거하고, NER 시약에 재 현탁하여 4℃에서 15,000 g로 10 분간 원심분리 하였으며, 그 상층액을 핵 분획으로 사용하였다. 각 추출물의 단백질농도는 BCA

단백질 측정 키트(Pierce, Thermo Scientific, IL, USA)를 이용하여 정량하였다.

[0037] **7. 단백질 발현 확인**

[0038] 상기 세포를 단백질 추출 시약에 얼음 위에서 30분간 세포용해 시켰 다. 4℃에서 12,000 g로 15 분간 원심분리 (Sorvall centrifuge, Bad Homburg, Germany)한 후, 그 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 단백질 농도는 BCA 단백질 측정 키트(Pierce, Thermo Scientific, IL, USA)를 이용하여 BSA 기준 곡선으로 정량하였다.

[0039] 각 세포 용해물로부터 약 30 µg 의 단백질을 Laemmli 샘플버퍼에 녹인 후, 3- 8% 또는 4-20% SDS-PAGE 젤 (Invitrogen Life Technologies)에 로딩 하였다. 단백질은 120 V에서 90 분간 전기영동 후 분리된 단백질은 polyvinylidene difluoride (Amomedi, Gwangju, Korea)을 포함하는 나노섬유 멤브레인에 옮겼다.

[0040] 멤브레인은 실온에서 5% BSA로 1 시간 동안 블로킹한 후, anti- IL-1β, anti- IL- 6, anti- TNF-α, anti- iNOS, anti- COX-2, anti-total MAPKs(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 및 anti-β-actin (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 1 차 항체와 함께 15 시간 반응하였다. 그 후, TBS-T (0.1% Tween-20, 50 µM Tris-HCl pH 7.5, 150 µM NaCl)로 3회 세척 후 멤브레인을 2 차 항체와 1 시간 동안 배양 하고, 다시 TBS-T로 3회 세척하였다. 그 다음, WestSave Up ECL 키트 (AB Frontier, Seoul, Korea)를 이용하여 단백질을 검출하고, Microchemi 4.2 device (DNR Bioimaging Systems, Jerusalem, Israel) 를 이용하여 이를 가시화하였다.

[0041] **8. 통계분석**

[0042] 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 일원분산분석(One-way ANOVA)후, GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., CA, USA)을 이용하여 Dunnett's t-test로 다중비교를 실시하였다. 통계적 의의는 p < 0.05 일 때 *, p< 0.01 일 때, **, p < 0.001 일 때, ***로 표시하였다.

[0043] **II. 실험결과**

[0044] 도 1은 청각 열수추출물이 마우스 대식세포 RAW264.7 세포의 생존력에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다. RAW264.7 세포들은 여러 농도(0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml)의 WECF로 24시간 처리하였다. 세포 생존력은 MTT 분석으로 결정 하였다. 결과는 대조구에 대한 백분율로 나타내었다. 각 결과값은 독립적인 3반복 실험의 평균 ± 표준편차로 나타내었다(** p < 0.01).

[0045] 도 2는 청각 열수추출물이 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 일산화 질소(NO) 및 유도성 일산화질소(iNOS)의 수준에 미치는 저해효과를 나타낸다. (A) RAW264.7 세포에서 WECF는 LPS로 자극된 NO 수준 을 저해하였다. RAW264.7 세포에 WECF(0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml)를 1 시간 동안 전처리 후 LPS (0.2 mg/ml)로 24 시간 자극시켰다. 세포 배양액 내의 NO 생산량은 Griess시약을 사용하여 측정하였다. (B) WECF는 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 iNOS의 단백질 발현 수준을 저해하였다. iNOS의 단백질 발현은 western blot analysis로 확인하였으며 대조구로는 β-actin을 사용하였다. 단백질 발현의 정량은 J-software를 사용하였다. 결과는 독립적인 3반복 실험의 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 통계 분석은 Dunnett's t-test로 결정하였다(* Compared with the LPS, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

[0046] 도 3은 청각 열수추출물의 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 프로스타글란딘E₂(PGE₂) 및 싸이클로옥시게네이즈-2에 대한 저해효과를 나타낸다. (A) WECF는 RAW264.7 세포주에서 LPS에 의해 유도된 프로 스타글란딘 E₂(PGE₂)를 저해하였다. 세포들을 WECF(0.5, 0.1, 0.2 mg/ml)로 1시간 동안 전처리 후 LPS (0.2 mg/ml)로 24시간 자극시켰다. 세포배양액 내의 PGE₂ 생성은 ELISA assay을 수행하여 확인하였다. (B) WECF는 RAW264.7 세포주에서 LPS에 의해 유도된 cyclooxygenase (COX)-2의 단백질 발현 수준을 저해하였다. RAW264.7 세포들은 WECF (0.1, 0.2 mg/ml)로 1 시간 전처리 후, LPS (0.2 mg/ml)로 24시간 자극시켰다. COX-2의 단백질 발현은 western blot analysis로 확인하였으며 대조구로는 β-actin을 사용하였다. 단백질 발현의 정량은 J-software를 사용하였다. 결과는 독립적인 3 반복 실험의 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 통계 분석은 Dunnett's t-test로 결정하였다(* Compared with the LPS, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

[0047] 도 4는 청각 열수추출물의 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 전염증성 싸이토카인에 대한

저해효과를 나타낸다. WECF는 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 단백질 수준을 저해하였다. 세포들은 WECF (0.1, 0.2 mg/ml) 로 1 시간 전처리 후, LPS (0.2 mg/ml)로 24시간 동안 자극시켰다. 대조구로는 β -actin을 사용하였다. (B, C, D, F, G, H) A 및 E의 결과를 이미지 J software를 이용하여 정량 분석하여 독립적인 3반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. *표는 LPS 처리군과의 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(*** p < 0.001).

[0048] 도 5는 청각 열수추출물이 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 I κ B- α 인산화 및 NF- κ B의 핵으로의 이동 활성화에 미치는 효과를 나타낸다. (A) WECF는 LPS에 의해 유도된 I κ B- α 인산화를 저해하였다. I κ B- α 및 p-I κ B- α 의 단백질 발현은 western blot analysis로 확인하였다. A의 결과를 이미지 J software를 이용하여 정량 분석하였다. (B) WECF는 LPS에 의해 유도된 NF- κ B의 핵내로의 이동을 저해하였다. 세포들은 WECF (0.1, 0.2 mg/ml) 로 1 시간 전처리 후, LPS (0.2 mg/ml)로 12시간 동안 자극시켰다. 핵 및 세포질에서 분리한 단백질의 NF- κ B (p65)의 발현 수준은 western blot analysis로 확인하였다. β -actin 및 Lamin B1을 세포질 및 핵단백질의 대조구로 사용되었다. 모든 결과의 이미지는 J software를 이용하여 정량 분석하였다. 결과는 독립적인 3반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. *표는 LPS 처리군과의 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(** p < 0.01, *** p < 0.001).

[0049] 도 6은 청각 열수추출물이 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 MAPKs(ERK, JNK, p38)의 인산화에 미치는 효과를 나타낸다. WECF는 LPS로 유도된 ERK, JNK 및 p38의 인산화를 저해하였다. 세포들은 WECF (0.1, 0.2 mg/ml) 로 1 시간 전처리 후, LPS (0.2 mg/ml)로 24시간 동안 자극시켰다. ERK, JNK 및 p38는 특이적 항체를 이용하여 western blot analysis로 확인하였다. A의 결과를 이미지 J software를 이용하여 정량 분석하였다. 결과는 독립적인 3반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. *표는 LPS 처리군과의 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(** p < 0.01, *** p < 0.001).

[0050] 도 7은 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 생존력에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다. 초대배양 연골세포 세포들은 여러 농도(0.5, 1, 2, 3 mg/ml)의 WECF로 24시간 처리하였다. 세포 생존력은 MTT 분석으로 결정하였다. 결과는 대조구에 대한 백분율로 나타내었다. 각 결과값은 독립적인 3반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다(** p < 0.01).

[0051] 도 8는 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도된 일산화 질소(NO) 및 유도성 일산화질소(iNOS)의 수준에 미치는 저해효과를 나타낸다. (A) 연골세포에서 WECF는 IL-1 β (20 ng/ml)로 자극된 NO 수준을 저해하였다. 연골세포에 WECF(0.5, 1, 2, 3 mg/ml)를 한시간 동안 전처리 후, IL-1 β (20 ng/ml)로 24 시간 자극시켰다. 세포 배양액 내의 NO 생산량은 Griess시약을 사용하여 측정하였다. (B) WECF는 IL-1 β (20 ng/ml)로 자극된 연골세포에서 iNOS의 단백질 발현 수준을 저해하였다. iNOS의 단백질 발현은 western blot analysis로 확인하였으며 대조구로는 β -actin을 사용하였다. 단백질 발현의 정량은 J-software를 사용하였다. 결과는 독립적인 3반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 통계 분석은 Dunnett's t-test로 결정하였다(* Compared with the LPS, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

[0052] 도 9는 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도 후 연골 구성성분으로 알려져 있는 aggrecan의 단백질 발현 증가를 나타낸다. 연골세포에 WECF(0.5, 1, 2, 3 mg/ml) 로 1 시간 전처리 후, IL-1 β (20 ng/ml)로 24시간 동안 자극시켰다. 염증유도인자로 알려져 있는 IL-1 β (20 ng/ml)만 처리하였을 때 aggrecan의 단백질 발현이 약간 감소하였으나 WECF(0.5, 1, 2, 3 mg/ml)을 처리한 군에서는 aggrecan의 단백질 발현이 증가함을 확인하였으며, 대조구로는 β -actin을 사용하였다. 이미지 J software를 이용하여 정량 분석하여 독립적인 3 반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. *표는 IL-1 β (20 ng/ml) 처리군과의 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(*** p < 0.001).

[0053] 도 10은 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도 후 관절연골 기질 분해효소로 알려져 있는 ADAMTS 5의 단백질 발현억제를 나타낸다. 연골세포에 WECF(0.5, 1, 2, 3 mg/ml) 로 1 시간 전처리 후, IL-1 β (20 ng/ml)로 24시간 동안 자극시켰다. 염증유도인자로 알려져 있는 IL-1 β (20 ng/ml)만 처리하였을 때 ADAMTS5의 단백질 발현이 현저히 증가하다가 WECF(0.5, 1, 2, 3 mg/ml)을 처리한 연골세포에서는 ADAMTS5의 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 대조구로는 β -actin을 사용하였다. 이미지 J software를 이용하여 정량 분석하여 독립적인 3반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. *표는 IL-1 β (20 ng/ml) 처리군과의 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(*** p < 0.001).

[0054] 도 11은 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도 후 관절연골 기질 분해효소로 알려져 있는 MMP-2,-9,-13의 단백질 발현 억제를 나타낸다. 연골세포에 WECF(0.5, 1, 2, 3 mg/ml) 로 1

시간 전처리 후, IL-1 β (20 ng/ml)로 24시간 동안 자극시켰다. 염증유도인자로 알려져 있는 IL-1 β (20 ng/ml)만 처리하였을 때 MMP-2, -9, -13의 단백질 발현이 현저히 증가하다가 WECF(0.5, 1, 2, 3 mg/ml)을 처리한 연골세포에서는 MMP-2, -9, -13의 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 대조구로는 β -actin을 사용하였다. 이미지 J software를 이용하여 정량 분석하여 독립적인 3반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. *표는 IL-1 β (20 ng/ml) 처리군과의 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(*** p < 0.001).

[0055] 도 12는 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도 후 세포 배양액을 이용하여 gelatin zymography을 수행하여 MMP-2, -9 분해효소 억제를 나타낸다. 연골세포에 WECF(0.5, 1, 2, 3 mg/ml)로 1 시간 전처리 후, IL-1 β (20 ng/ml)로 24시간 동안 자극시켰다. 염증유도인자로 알려져 있는 IL-1 β (20 ng/ml)만 처리하였을 때 MMP-2, -9단백질 분해효소가 현저히 증가하다가 WECF(0.5, 1, 2, 3 mg/ml)을 처리한 연골세포에서는 MMP-2, -9 단백질 분해효소가 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.

[0056] 도 13은 청각 열수추출물이 백서 초대배양 연골세포에서 IL-1 β (20 ng/ml) 의해 유도 후 MAPKs(ERK, JNK, p38)의 인산화 억제에 미치는 효과를 나타낸다. WECF는 IL-1 β (20 ng/ml)로 유도된 ERK, JNK 및 p38의 인산화를 저해하였다. 연골세포에 WECF(0.5, 1, 2, 3 mg/ml)로 1 시간 전처리 후, IL-1 β (20 ng/ml)로 24시간 동안 자극시켰다. ERK, JNK 및 p38는 특이적 항체를 이용하여 western blot analysis로 확인하였다. (B, C, D) A의 결과를 이미지 J software를 이용하여 정량 분석하였다. 결과는 독립적인 3반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. *표는 LPS 처리군과의 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(** p < 0.01, *** p < 0.001).

[0057] 도 14는 백서를 이용한 monosodium iodoacetate (MIA) 골관절염 통증모델에서 proteoglycan 합성 증가 효과를 나타낸다. 백서 오른쪽 무릎관절에 monosodium iodoacetate (MIA)을 주사용 saline에 10 mg/ml 농도로 용해하여 주사기로 직접 주입하여 골관절염 통증모델을 만든 후 대조군으로 멸균수 200 μ l, 실험군으로 청각 열수추출물 (50 mg/kg)을 존대를 이용하여 30일 동안 매일 경구 투여 후 각각의 관절을 적출하여 4주 동안 관절을 탈회하였다. 탈회된 각각의 관절조직을 microtome을 이용하여 10 μ m 두께로 조직을 자른 후 관절의 구성성분으로 알려져 있는 proteoglycan을 염색하는 safranin O 염색과 뼈를 염색하는 fast-green 염색을 수행하여 청각 열수추출물의 관절보호 효과를 확인하였다

[0058] III. 실험 결과의 관절염 예방 또는 치료용 조성물로서 이용가능성

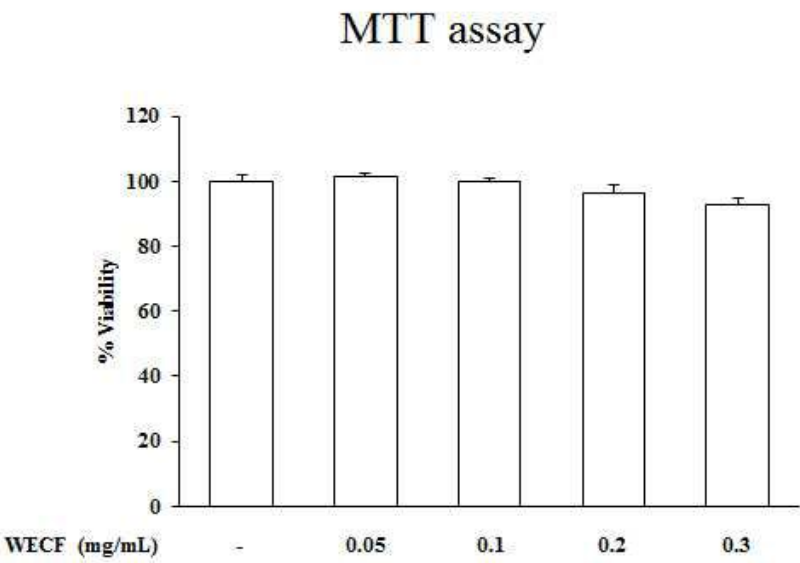
[0059] 실험 결과를 종합하면 청각 열수추출물은 생물학적으로 안전하며, NO 활성을 억제하며, 염증반응과 조직손상에 관여하는 효소인 iNOS, 염증관련인자인 PGE₂ 생성에 관여하는 COX-2, 전염증성 사이토카인으로 알려져 있는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 과 같은 관절연골 퇴행성유도 물질의 발현을 억제하고, 관절연골 기질 분해효소로 알려져 있는 MMP-2, -9, -13 및 ADAMTS5의 단백질 발현을 억제하였다. monosodium iodoacetate(MIA) 유도 관절염 모델에서 관절연골을 구성하는 proteoglycan 단백질 발현이 증가하였으며, 퇴행성 및 류마티스 관절염의 치료와 예방 효과를 확인하였다. 따라서 청각 열수추출물을 포함하는 건강기능성 식품을 제조할 수 있으며, 이의 복용을 통하여 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염의 치료와 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

산업상 이용가능성

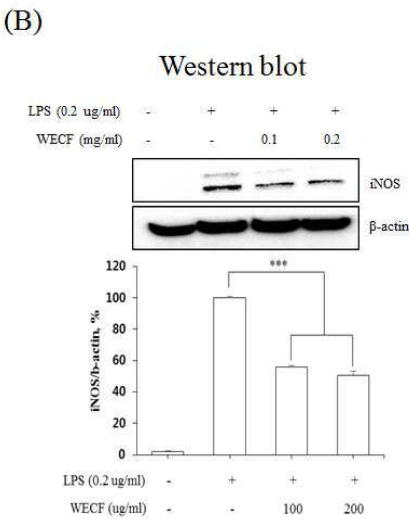
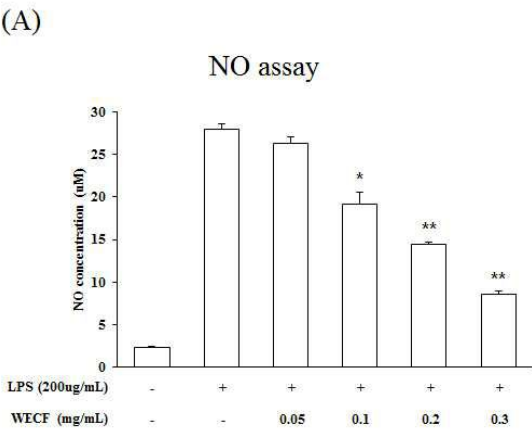
[0060] 본 발명은 국내에 자생하는 청각 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 완화 및 관절연골 보호에 의한 퇴행성 관절염에 예방 효과가 있는 기능성식품 및 의약품 조성물을 제공함으로써 현대 발병 원인을 찾기 어렵고 이에 따라 효율적인 임상 치료제가 마땅치 않아 물리치료와 통증경감 등에 의존하며 근본적인 치료에 어려움을 겪는 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염의 치료와 예방을 도모하여 현대인의 질병 퇴치와 예방 및 건강 증진에 도움을 줄 수 있다.

도면

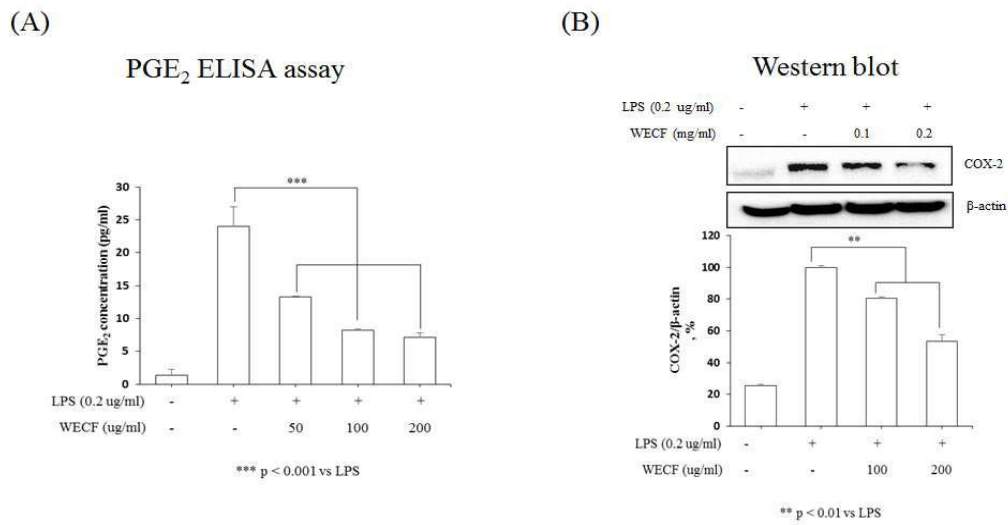
도면1



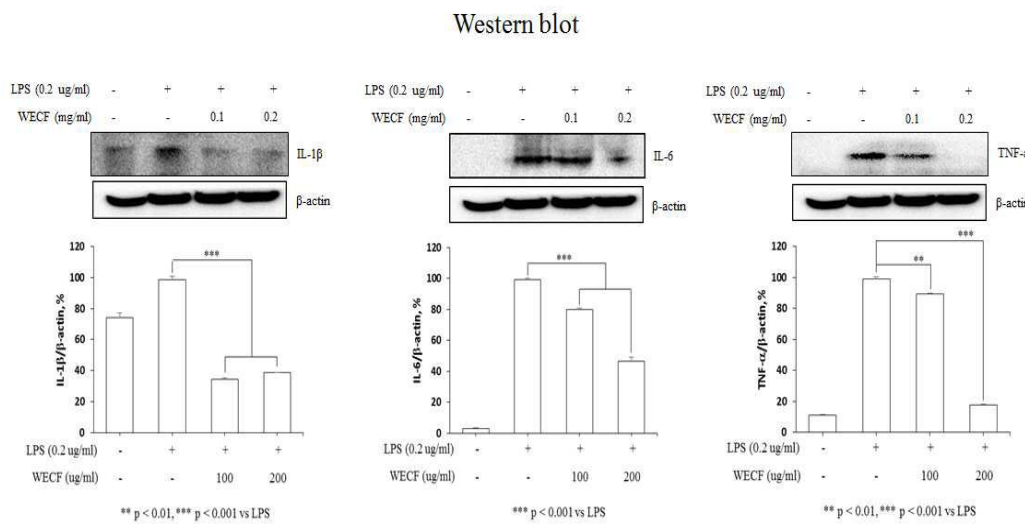
도면2



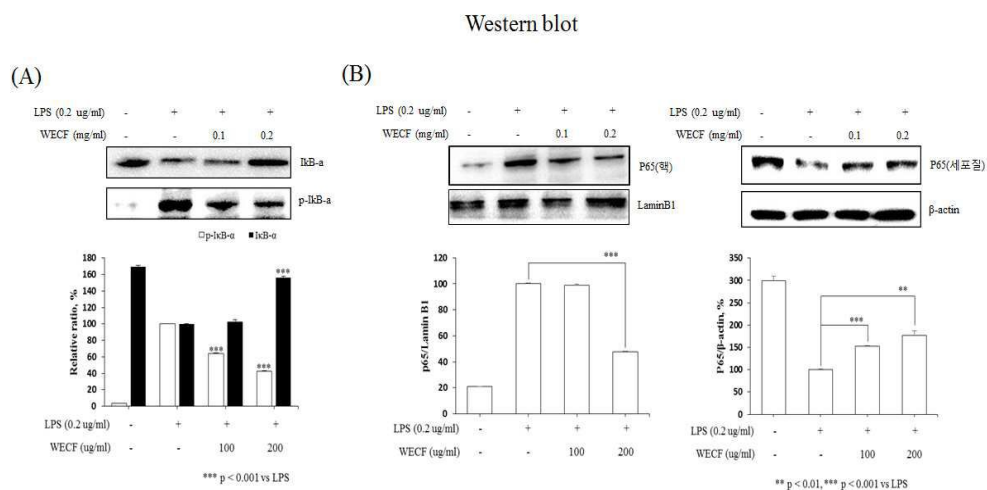
도면3



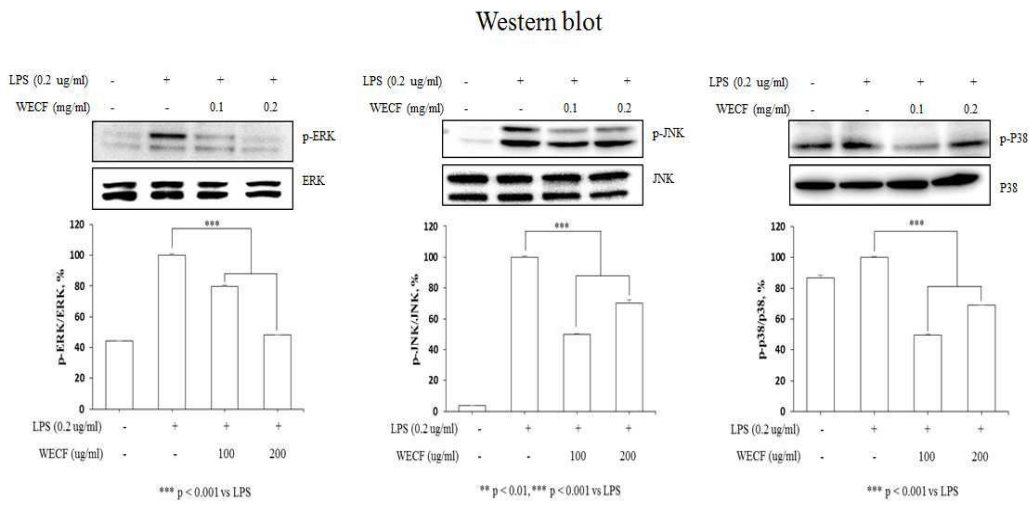
도면4



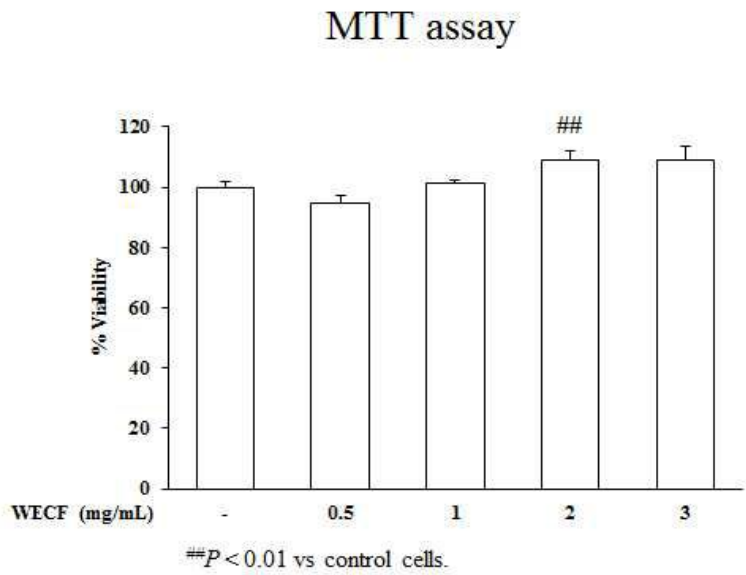
도면5



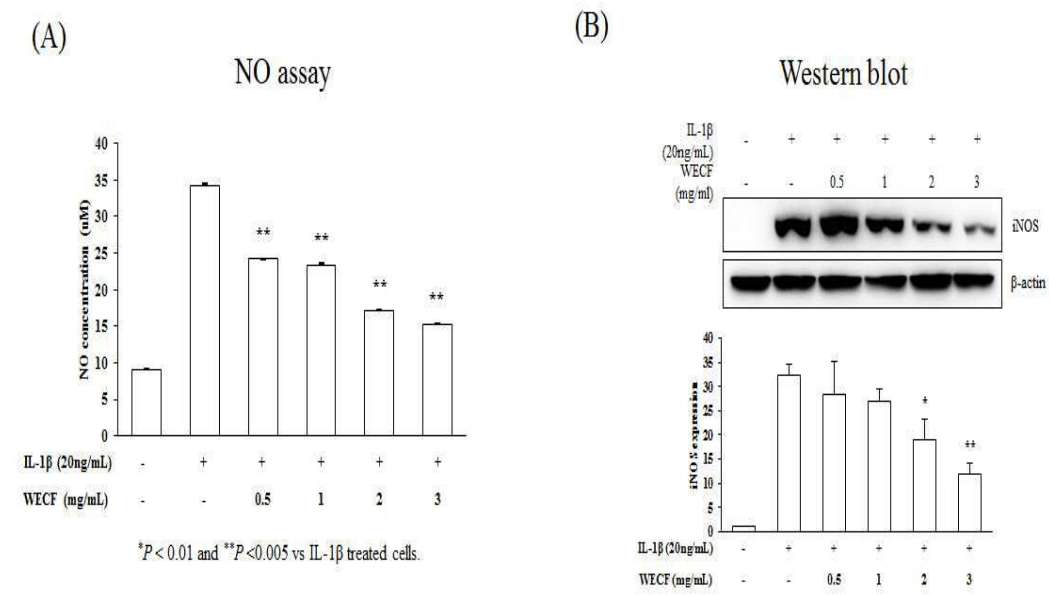
도면6



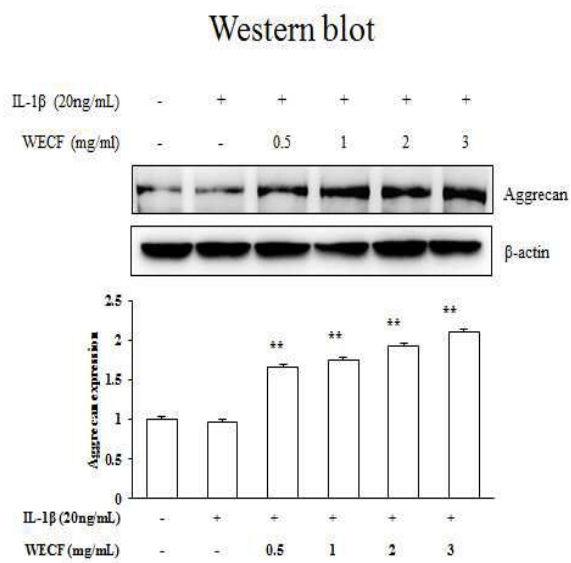
도면7



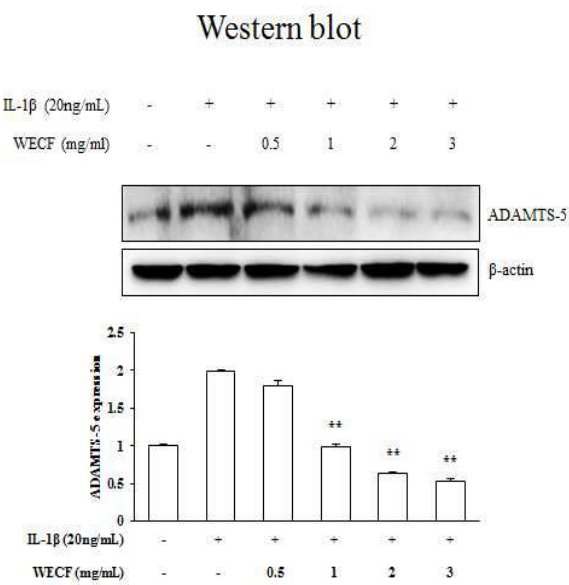
도면8



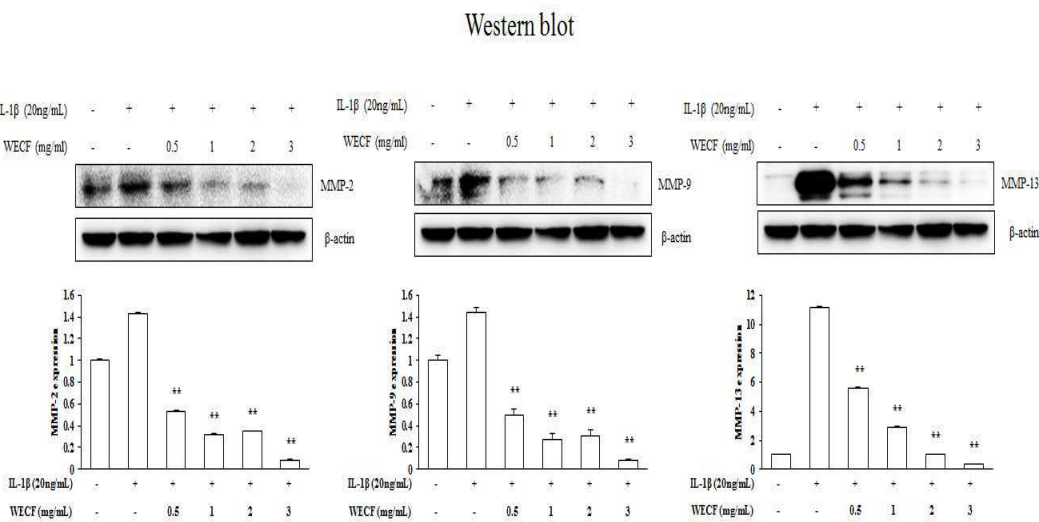
도면9



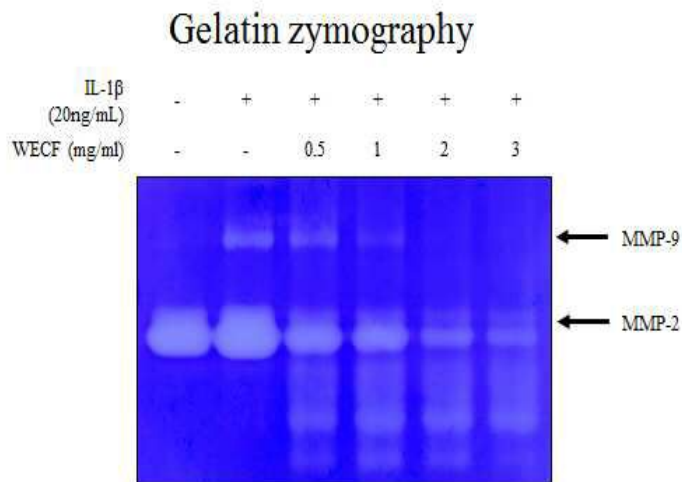
도면10



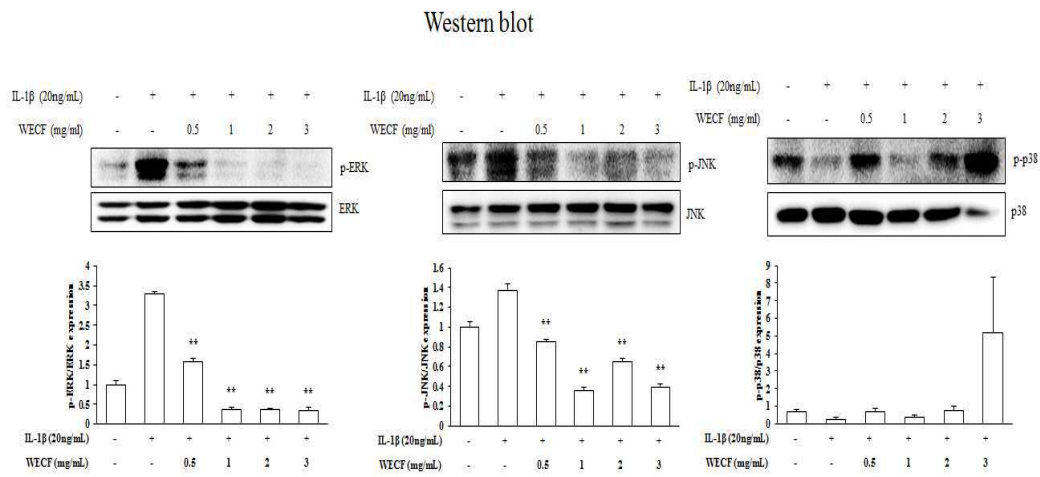
도면11



도면12



도면13



도면14

