



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0087928
(43) 공개일자 2013년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7048 (2006.01) A61K 31/7042

(2006.01)

A61K 36/28 (2006.01) A61K 36/287 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0009195

(22) 출원일자 2012년01월30일

심사청구일자 2012년01월30일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

최재수

부산광역시 남구 오륙도로 85, 109동 204호(용호
동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)

정현아

부산광역시 해운대구 좌동순환로99번길 22, 경남
아파트 105-102 (좌동)

(74) 대리인

특허법인 신태양

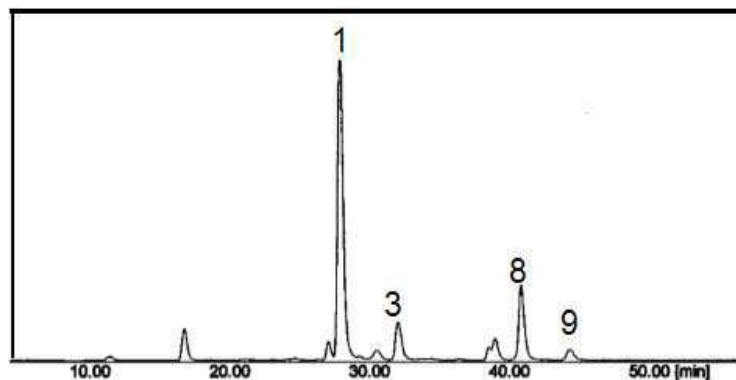
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **영경귀 추출물 또는 그로부터 분리한 루테올린 5-O-β-D-글루코피라노시드의 화합물을 함유한 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품**

(57) 요약

본 발명은 영경귀 조추출물, 비극성 용매 가용 추출물 또는 그로부터 분리된 루테올린 5-O-β-D-글루코피라노시드(luteolin 5-O-β-D-glucopyranoside)의 화합물을 함유하는 염증성 질환에 관한 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 이 유효성분이 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우측발 염증 억제활성을 갖는다. 따라서, 상기 추출물은 강력한 염증성 질환 예방 활성을 나타내고 천연약재로서 안전성이 확보되어 있으므로, 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물과 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1

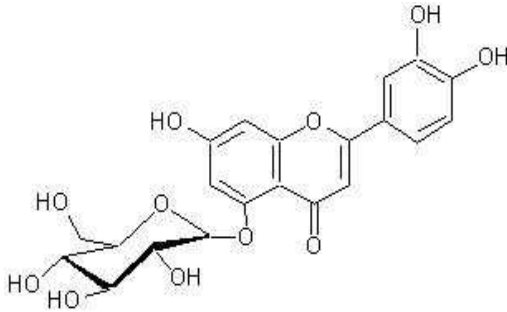


특허청구의 범위

청구항 1

아래 화학식 1로 표시되는 5-O-β-D-글루코피라노시드(leuteolin 5-O-β-D-glucopyranoside) 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

(화학식 1)



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 루테오린 5-O-β-D-글루코피라노시드 화합물은 엉겅퀴로부터 유래된 것을 특징으로 하는 당뇨병 또는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 루테오린 5-O-β-D-글루코피라노시드 화합물은 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우족발 염증 억제활성을 갖는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

엉겅퀴 조추출물 또는 비극성 용매 가용추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 엉겅퀴 조추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

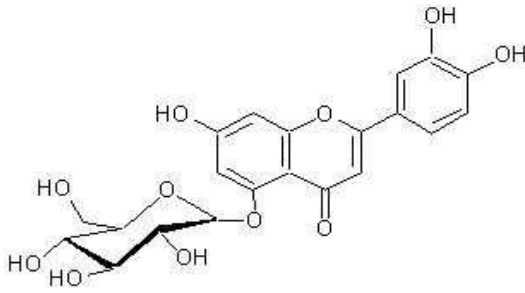
상기 비극성 용매 가용추출물은 디클로로메탄, 클로로포름 또는 에틸 아세테이트로 이루어진 군 중에서 선택된 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 추출물은 하기 화학식 1로 표시되는 루테오린 5-O-β-D-글루코피라노시드 화합물을 함유하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

(화학식 1)



청구항 8

제4항에 있어서,

상기 엉겅퀴 조추출물 또는 비극성용매 가용추출물은 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우족발 염증 억제활성을 갖는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 엉겅퀴 조추출물, 비극성 용매 가용 추출물 또는 그로부터 분리된 루테올린 5-O-β-D-글루코피라노사이드(luteolin 5-O-β-D-glucopyranoside)의 화합물을 함유하는 염증성 질환에 관한 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증은 외부로부터의 자극에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나로, 조직 변질, 순환장애, 그리고 조직 증식 등을 병발하는 복잡한 병변이다(비특허 문헌 1 참조). 이러한 염증반응 과정은 리포다당류(lipopolysaccharide, LPS)와 같은 외부 자극원 또는 아라키돈산(arachidonic acid) 대사체와 같은 내부 자극원들을 주요 매개로 하여 대식세포(macrophages), 과립구(granulocytes), 섬유아세포(fibroblasts)와 같은 염증성 세포의 염증부위로의 유입과 축적을 주요 특징으로 한다(비특허 문헌 2 참조). 특히 염증 부위의 활성화된 대식세포(macrophages)는 사이토카인(cytokines)뿐 아니라 아라키돈산(arachidonic acid) 대사체인 프로스타글란딘(prostaglandins, PGs)과 일산화질소(NO) 등을 다량 생성함으로써 염증 매개에 큰 역할을 한다.

[0003] 염증의 발생 원인으로는 다양한 생화학적 현상이 관여하고 있으나, 특히 NO를 생성하는 효소인 일산화질소 생성 효소(nitric oxide synthase, NOS)와 다양한 PGs의 생합성을 매개하는 효소인 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)가 염증반응을 조절하는 중요한 매개체로 알려져 있다(비특허 문헌 3, 4, 5 참조).

[0004] NO는 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 cNOS(constitutive nitric oxide synthase)와 iNOS(inducible nitric oxide synthase)에 의해 생성되는데, cNOS는 일정하게 발현되어 생리적 기능(physiological functions)을 매개하는 NO를 낮은 수준으로 생성하는 반면, iNOS는 LPS와 사이토카인(cytokines) 같은 자극에 의해 급격하게 유도되어 과량의 NO를 생성한다(비특허 문헌 6 참조). 따라서 염증 반응에서의 NO 생성은 대부분 iNOS에 의한 것이라 할 수 있다(비특허 문헌 7 참조). 한편 PGs은 COX-1(constitutive cyclooxygenase)과 유도성 사이클로옥시게나제(inducible cyclooxygenase, cyclooxygenase-2, COX-2)에 의해 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 생성된다.

[0005] COX-1은 cNOS의 경우와 마찬가지로 일정하게 발현되어 생리적 기능(physiological function)을 조절하는 반면, COX-2는 염증 자극원에 의해 대식세포(macrophages), 과립구(granulocytes), 섬유아세포(fibroblasts)와 같은 염증성 세포에서 유도되며(비특허 문헌 8 참조), 역시 염증반응에서의 PGs은 대부분 COX-2에 의해 생성된다(비

특허 문헌 9 참조).

[0006] 대식세포(Macrophages)는 백혈구(neutrophils), 자연살해세포(natural killer cells)와 더불어 외부의 병원균에 대해서 생체방어(host defence)의 제1선에서 중요한 역할을 한다. 감염과 염증이 생성되면, L-아르기닌(L-arginine)은 iNOS에 의해 NO로 생산되는데, 활성화된 대식세포(macrophages)는 NO와 전구염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)을 분비하여 다른 면역세포와 조직에 영향을 준다(비특허 문헌 10 참조). 그런데 이와 같은 염증반응이 과도한 경우에는 패혈성 쇼크 혹은 류마티스 관절염과 같은 염증질환의 원인이 되며, 이 과정에서 NO와 PGs의 과도한 생성이 중요한 역할을 담당한다는 사실들이 보고되어 있다(비특허 문헌 11 참조). 이에 따라, NO와 PGs의 과도한 생성과 이들의 생성에 관여하는 효소의 발현을 억제할 수 있는 물질이 염증질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다. 특히 식품으로부터 분리 정제된 성분은 비교적 독성이 적어 의약품에 비해 장기간 섭취하여도 안전하다는 점 때문에 각종 염증질환의 치료제 및 치료보조제로 각광을 받고 있다. 슈퍼옥사이드(Superoxide, O_2^-), 하이드로젠 퍼옥사이드(hydrogen peroxide, H_2O_2), 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical, OH), 단일항 산소(singlet oxygen, 1O_2), 알콕실 라디칼(alkoxyl radical, $RO\cdot$), 퍼옥실 라디칼(peroxyl radical, $ROO\cdot$) 그리고 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite, $ONOO^-$)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 대식세포(macrophages) 등의 염증성 세포로부터 생성된다. 이들 ROS와 RNS는 지질, 단백질, 핵산, 그리고 DNA와 같이 우리 몸을 구성하는 성분에 손상을 주는 강력한 산화 및 질화 요소로 작용하며, 이로 인해 염증 및 노화와 관련된 만성 질환이 야기된다(비특허 문헌 12, 13 참조).

[0007] 그리고 ROS 및 RNS는 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase)와 리포키시게나제(lipoxygenase)에 의한 아라키돈산(arrachidonic acid)에서 염증성 매개체로의 전환에 영향을 주며, 대식세포(macrophages)에 의한 염증 과정 동안 자유 라디칼(free radical)이 생성된다. 따라서 자유 라디칼(free radicals)을 소거할 수 있는 항산화제가 염증 및 산화적 스트레스로 인한 질환을 예방하고 치료할 수 있을 것으로 기대할 수 있다(비특허 문헌 14 참조).

[0008] 엉겅퀴(*Cirsium maackii*)는 국화과(Asteraceae)의 다년생 초본으로서 우리나라 전국 각처의 산과 들에서 자생한다. 약재로서는 대계라고 불리며 엉겅퀴의 전초를 건조한 것이며 양혈지혈(涼血止血) 및 활혈해독(活血解毒), 소염 효능이 있다(비특허 문헌 15, 16 참조). 뿌리는 가을에, 잎과 줄기는 꽃이 필 때에 채취하여 햇볕에 말려 사용 전 잘게 썬다. 엉겅퀴는 높이 1 m안팎이고 전체에 백색털과 더불어 거미줄같은 털이 있으며 가지가 갈라진다. 근생엽은 꽃이 필때까지 남아 있고 경생엽보다 크며 타원형 또는 피침상 타원형이고 길이 15~30 cm, 너비 6~15 cm로서 밑부분이 좁으며 6~7쌍의 우상으로 갈라지고 양면에 털이 나있으며 가장자리에 결각상의 톱니와 더불어 가지가 있고 경생엽은 피침상 타원형이며 원줄기를 감싸고 우상으로 갈라진 가장자리가 다시 갈라진다. 6~8월에 꽃이 피고 꽃은 자주색 또는 홍색이며 지름이 3~5 cm로서 가지끝과 원줄기 끝에 달리고 총포는 둥글며 길이 18~20 mm, 지름이 25~35 mm이고 포편은 7~8줄로 배열되며 겉에서 안으로 약간씩 길어지고 끝이 뾰족한 선형이며 화관의 길이는 19~24 mm이다. 8월에 열매가 성숙되고 수과의 길이는 3.5~4 mm이며, 관모는 길이 16~19 mm이다. 전국에 분포하며 산과 들에서 자란다. 엉겅퀴(대계)에는 지혈작용이 있다고 보고되고 있으며 지혈작용을 나타내는 주성분은 펙토리나닌(pectolinarin)이라고 알려져 있는데 마우스를 이용한 실험에서 용량 의존적으로 출혈시간의 단축이 관찰된다(비특허 문헌 17 참조). 대계는 심장혈관계에 대한 활성을 가지는데 추출물 수준에서 혈압의 저하를 나타내는 것으로 보고되고 있다(비특허 문헌 18 참조). 한편, 근육주사나 정맥 주사 시에 혈압의 상승이 관찰되지만 경구 투여시에는 혈압상승의 효과가 관찰되지 않는다(비특허 문헌 19 참조). 대계 물 추출물을 적출 랫드 흉부대동맥에 처리하였을 때 히스타민 H1(histamine H1) 수용체를 경유한 혈관 확장작용이 관찰되었다(비특허 문헌 20 참조). 대계에 함유된 플라본(flavone) 성분 중 펙토리나닌(pectolinarin), 5,7-디히드록시-6,4-디메톡시플라본(5,7-dihydroxy-6,4-dimethoxyflavone)을, S180, H22 종양을 각각 이식시킨 마우스에 투여한 결과, 두 가지 종양 모두 증식이 억제되었고 림프구의 증식이 관찰됨은 물론 NK 세포의 활성이 증가되었다는 점에서 항암 및 면역 증강 작용을 가지고 있을 것으로 여겨진다(비특허 문헌 21 참조). 대계의 경우 항균작용이 있으며 분리된 폴리아세틸렌(polyacetylene)의 경우 PC12h cell 및 Neuro2a cell에서 신경돌기의 분화를 촉진하며, 아울러 마우스에서 스코폴라민(scopolamine)으로 유도되는 기억력 장애가 현저히 개선된다고 보고되어 있다(비특허 문헌 22 참조). 대계의 물추출물은 여성 호르몬인 에스트로젠(estrogen)과 유사한 작용을 가져 에스트로젠(estrogen) 수용체를 활성화시키고 프로게스테론(progesterone)과 pS2 유전자의 발현을 증가시킨다고 알려져 있다(비특허 문헌 23 참조). 해열, 지혈, 소종 등의 효능을 가지고 있으며 감기, 백일해, 고혈압, 장염, 신장염, 토혈, 혈뇨, 혈변, 산후에 출혈이 멎지 않을 때나 대하증, 종기의 치료에 사용된다(비특허 문헌

24, 25 참조). 특히 엉겅퀴는 밀크 시슬(milk thistle)로 알려져 있는 실리븀 마리아눔(*Silybum marianum*)과 유사한 활성과 동종에 속하는 약초로서 특히 간보호효과에 대한 탁월한 효과가 있는 것으로 보고 되고있으며 현재 간보호제로서 사용되고 있다.(비특허 문헌 26, 27 참조). 뿐만아니라, 향균(비특허 문헌 28 참조), 항당뇨(비특허 문헌 29 참조), 항산화(비특허 문헌 30 참조), 항염증(비특허 문헌 31 참조), 혈관이완(비특허 문헌 32 참조), 항암활성(비특허 문헌 33 참조), 항당뇨 합병증이 보고되었다.

[0009] 지금까지 밝혀진 성분으로는 정유와 트리테르펜(triterpene) 화합물이 주로 함유되어 있는데, 정유로서 아플로탁센(aplotaxene), 디하이드로아플로탁센(dihydroaplotaxene), 테트라하이드로아플로탁센(tetrahydroaplotaxene), 헥사하이드로아플로탁센(hexahydroaplotaxene), 사이페린(cyperene), 카리오필렌(caryophyllene), 쓰요푸센(thujopsene), 알파-히마칼렌(α -himachalene) 등이 분리되어 있고, 트리테르펜(triterpene) 화합물로서 알파-아미린(α -amyrin) 및 베타-아미린(β -amyrin) 등이 분리되어 있으며(비특허 문헌 34 참조), 또한 최근에 폴리아세틸렌(polyacetylene) 화합물이 분리되어 있다(비특허 문헌 22 참조). 엉겅퀴로부터 분리된 혹은 확인된 화합물로서 플라보노이드(flavonoids), 페놀산(phenolic acids), 리그난(lignans), 폴리아세틸렌(polyacetylenes), 아세틸렌(acetylenes), 스테롤(sterols), 트리테르펜(triterpenes), 세스퀴테르펜 락톤(sesquiterpene lactones), 그리고 알칼로이드(alkaloids)(비특허 문헌 35, 36, 37, 38 참조)가 있으며 이들이 여러 가지 생리활성에 관련될 것으로 여겨진다. 특히 자생하는 엉겅퀴에서는 항산화에 관련하는 다양한 플라보노이드(flavonoid)가 상당량 포함되어 있음이 보고되었다(비특허 문헌 30 참조).

[0010] 그리하여 플라보노이드, 탄닌, 쿠마린, 정유 성분 등이 세포, 소나 흰쥐 또는 사람에게 활성에 대한 억제 효과가 있음이 보고되었다. 그러나 지금까지 엉겅퀴 추출물의 염증성 질환에 대한 예방 및 보호효과는 보고되지 않았으며, 단지 Lim 등에 의한 정영엉겅퀴(*Cirsium chanroenicum*)에서 분리한 펙토리나린(pectolinarin)과 펙토리나리제닌(pectolinarigenin)의 항염증 효과(비특허 문헌 39 참조)만이 알려져 있고(비특허 문헌 31 참조) 루테올린과 루테올린 7-글루코시드(비특허 문헌 39 참조)가 알려져 있을 뿐이다. 따라서 본 발명자는 엉겅퀴에서 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우측발 염증 억제활성을 갖는 염증성 질환 예방 및 치료용 새로운 추출물 및 루테올린 5- α - β -D-glucopyranoside의 화합물을 분리, 동정한 후 그 염증 억제효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다. 또한 이 화합물의 항염증 활성은 아직 밝혀지지 않았으므로 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현, 그리고 t-BHP로 유도된 ROS 생성 억제에 관해서는 자세히 연구된 바가 없어 이들의 항염증 활성에 대한 연구를 진행하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) 비특허 문헌 1 : Tizard, I. R., Immunology: An introduction inflammation. 2nd ed. Saunders College Pub. Co. New York, 423-441, 1986.
- (비특허문헌 0002) 비특허 문헌 2 : Trowbridge, H. O. and Emling, R. C., Inflammation: a review of the process, 5th ed. Quintessence Pub. Co. Chicago, 3-9, 1997.
- (비특허문헌 0003) 비특허 문헌 3 : Lawrence, T., Willoughby, D. A. and Gilroy, D. W., Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation, Nat. Rev. Immunol., 2, 787-795, 2002.
- (비특허문헌 0004) 비특허 문헌 4 : Higuchi, M., Hisgahi, N., Taki, H., Osawa, T., Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and l-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages, J. Immunol., 144, 1425-1431, 1990.
- (비특허문헌 0005) 비특허 문헌 5 : Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T., Huez, G., Tumor necrosis factor- α production induced by viruses and by lipopolysaccharide in macrophages: similarities and differences. J. Inflamm. 1996; 46(1):1-12.
- (비특허문헌 0006) 비특허 문헌 6 : Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F., Lin, J. K., Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages, 20, 1945-1952, 1999.

- (비특허문헌 0007) 비특허 문헌 7 : Huang, Y. C., Guh, J. H., Cheng, Z. J., Chang, Y. L., Hwang, T. L., Liao, C. H., Tzeng, C. C., Teng, C. M., Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives: involvement of Ikappa B-alpha stabilization, 418, 133-139, 2001.
- (비특허문헌 0008) 비특허 문헌 8 : Herschman, H. R., Prostaglandin synthase 2, Biochim. Biophys. Acta., 1299, 125-140, 1996.
- (비특허문헌 0009) 비특허 문헌 9 : Reddy, S. T. and Herschman, H. R., Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages, 269, 15473-15480, 1994.
- (비특허문헌 0010) 비특허 문헌 10 : Nathan, C. and Xie, Q. W., Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls, Cell, 78, 915, 1994.
- (비특허문헌 0011) 비특허 문헌 11 : Higgs, G. A., Moncada, S. and Vane, J. R., Eicosanoids in inflammation, 16, 287-99, 1984.
- (비특허문헌 0012) 비특허 문헌 12: (12)8 Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A., Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 1620-1624, 1990.
- (비특허문헌 0013) 비특허 문헌 13 : Vallyathan, V., Shi, X., The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases, Environ. Health Perspect., 105, 165-177, 1997.
- (비특허문헌 0014) 비특허 문헌 14 : Backhouse, N., Delporte, C., Givernau, M., Cassels, B. K., Valenzuela, A., Speisky, H., Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine, AgentsActions., 42, 114-117, 1994.
- (비특허문헌 0015) 비특허 문헌 15 : 육창수, 김성만, 정진모, 정명숙, 김정화, 김승배. 한약의 약리·성분·임상응용. 계축문화사. 1998. pp594-595.
- (비특허문헌 0016) 비특허 문헌 16 : 박종희, 이정규. 상용약용식물도감. 신일상사. 2000. pp274-276.
- (비특허문헌 0017) 비특허 문헌 17 : Ishida H, Umino T, Tsuji K, Kosuge T. Studies on antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VII. On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum* DC. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1987; 35: 861-864.
- (비특허문헌 0018) 비특허 문헌 18 : Zhu YP. Chinese Materia Medica Chemistry, Pharmacology and Applications. Harwood Academic Publishers, The Netherlands, pp405-406, 1998a.
- (비특허문헌 0019) 비특허 문헌 19 : Zhu YP. Chinese Materia Medica Chemistry, Pharmacology and Applications. Harwood Academic Publishers, The Netherlands, pp403-405, 1998b.
- (비특허문헌 0020) 비특허 문헌 20 : Kim EY, Jho HK, Kim DI, Rhyu MR. *Cirsium japonicum* elicits endothelium-dependent relaxation via histamine H(1)-receptor in rat thoracic aorta. J Ethnopharmacol. 2008; 116: 223-227.
- (비특허문헌 0021) 비특허 문헌 21 : Liu S, Zhang J, Li D, Liu W, Luo X, Zhang R, Li L, Zhao J. Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. Nat Prod Res. 2007; 21: 915-922.
- (비특허문헌 0022) 비특허 문헌 22 : Yamazaki M, Hirakura K, Miyaichi Y, Imakura K, Kita M, Chiba K, Mohri T. Effect of polyacetylenes on the neurite outgrowth of neuronal culture cells and scopolamine-induced memory impairment in mice. Biol Pharm Bull. 2001; 24: 1434-1436.
- (비특허문헌 0023) 비특허 문헌 23 : Park MK, Rhyu MR, Yoon BK, Kwon H, Jang S, Lee YJ. Modulation of the genomic estrogen receptor pathway by water extracts of *Cirsium japonicum*. Arch Pharm Res. 2008; 31: 225-230.

- (비특허문헌 0024) 비특허 문헌 24 : Lee, Y. N. Flora of Korea. Kyo-Hak-Sa: Korea; 2002, pp 844.
- (비특허문헌 0025) 비특허 문헌 25 : Kim, J. G. Illustrated Natural Drugs Encyclopedia (color edition). Namsandang: Korea; 1997, Vol. 1; pp 37.
- (비특허문헌 0026) 비특허 문헌 26 : Park, J. C.; Hur, J. M.; Park, J. G.; Kim, S. C.; Park, J. R.; Choi, S. H.; Choi, J. W. Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother. Res.* 2004, 18, 19–24.
- (비특허문헌 0027) 비특허 문헌 27 : Ku, K. L.; Tsai, C. T.; Chang, W. M.; Shen, M. L.; Wu, C. T.; Liao, H. F. Hepatoprotective effect of *Cirsium arisanense* Kitamura in taurine-treated hepatoma Hep 3B cells and C57BL mice. *Am. J. Chin. Med.* 2008, 36, 355–368.
- (비특허문헌 0028) 비특허 문헌 28 : Nazaruk, J.; Jakoniuk P. Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. Flowers. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 102, 208–212.
- (비특허문헌 0029) 비특허 문헌 29 : Perez G., R. M.; Ramirez, L. M. E.; Vargas, S. R. Effect of *Cirsium pascuarens* on blood glucose levels of normoglycaemic and alloxan-diabetic mice. *Phytother. Res.* 2001, 15, 552–554.
- (비특허문헌 0030) 비특허 문헌 30 : Jeong, da M.; Jung, H. A.; Choi, J. S. Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of some selected Korean thistles. *Arch. Pharm. Res.* 2008, 31, 28–33.
- (비특허문헌 0031) 비특허 문헌 31 : Lim, H.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Bae, K.; Kang, S. S.; Kim, H. P. Anti-inflammatory activity of pectolinarigenin and pectolinarin isolated from *Cirsium chanroenicum*. *Biol. Pharm. Bull.* 2008, 31, 2063–2067.
- (비특허문헌 0032) 비특허 문헌 32 : Kim, E. Y.; Jho, H. K.; Kim, D. I.; Rhyu, M. R. *Cirsium japonicum* elicits endothelium-dependent relaxation via histamine H(1)-receptor in rat thoracic aorta. *J. Ethnopharmacol.* 2008, 116, 223–227.
- (비특허문헌 0033) 비특허 문헌 33 : Liu, S.; Zhang, J.; Li, D.; Liu, W.; Luo, X.; Zhang, R.; Li, L.; Zhao, J. Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. *Nat. Prod. Res.* 2007, 21, 915–922.
- (비특허문헌 0034) 비특허 문헌 34 : Sung CK. International Collation of Traditional and Folk Medicine. Kimura (Ed). vol.1, pp171-172, World Scietific Publishers, Singapore, 1996.
- (비특허문헌 0035) 비특허 문헌 35 : Jordon-Thaden, I. E.; Louda, S. M. Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: a role in ecological risk assessment for biological control of weeds? *Biochem. Syst. Ecol.* 2001, 31, 1353–1396
- (비특허문헌 0036) 비특허 문헌 36 : Lee, B. L.; Kwan, J. H.; Zee, O. P.; Yoo, S. J. Flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Arch. Pharm. Res.* 1994, 17, 273–277.
- (비특허문헌 0037) 비특허 문헌 37 : Yim, S. H.; Kim, H. J.; Lee, I. S. A polyacetylene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Arch. Pharm. Res.* 2003, 26, 128–131.
- (비특허문헌 0038) 비특허 문헌 38 : Chung, A. K.; Kwon, H. C.; Choi, S. Z.; Min, Y. D.; Lee, S. O.; Lee, W. B.; Yang, M. C.; Lee, K. H.; Nam, J. H.; Kwak, J. H.; Lee, K. R. Norisoprenoids from *Cirsium rhinoceros*. *Kor. J. Pharmacogn.* 2002, 33, 81–84.
- (비특허문헌 0039) 비특허 문헌 39 : Hu, C., Kitts, D. D., Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 265, 107–113 (2004).

발명의 내용

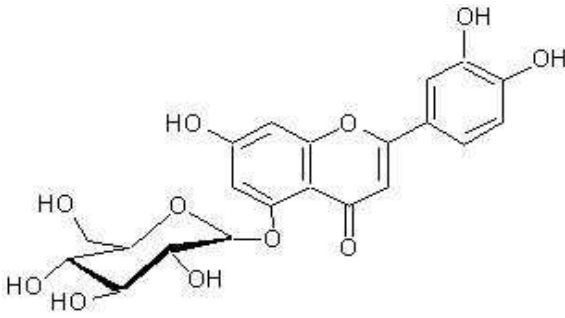
해결하려는 과제

- [0012] 상기의 문제점을 해결하기 위한 본 발명은 엉겅퀴 조추출물 또는 그로부터 분리한 루테올린 5- β -D-글루코피라노시드(luteolin 5- β -D-glucopyranoside)의 화합물을 유효성분으로 함유하고, 이 유효성분이 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우측발 염증 억제활성을 갖는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품을 제공함을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기의 과제를 달성하기 위한 본 발명은 아래 화학식 1로 표시되는 5- β -D-글루코피라노시드(luteolin 5- β -D-glucopyranoside) 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 과제 해결 수단으로 한다.

- [0014] (화학식 1)



- [0015]
- [0016] 그리고 본 발명은 엉겅퀴 조추출물 또는 비극성 용매 가용추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 과제 해결 수단으로 한다.
- [0017] 또한 본 발명의 상기에서 설명한 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 또 다른 과제 해결 수단으로 한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명은 엉겅퀴 조추출물, 비극성 용매 가용 추출물 또는 그로부터 분리된 루테올린 5- β -D-글루코피라노시드(luteolin 5- β -D-glucopyranoside)의 화합물은 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우측발 염증 억제활성을 갖는다. 따라서, 상기 추출물은 강력한 염증성 질환 예방 활성을 나타내고 천연약제로서 안전성이 확보되어 있으므로, 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물과 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 엉겅퀴 메탄올 조추출물에 대한 HPLC 크로마토그램 그래프이고,
 도 2는 웨스턴 블랏(Western blot) 방법에 의해 엉겅퀴 전초로부터 분리된 루테올린 5- β -D-글루코피라노시드 화합물의 RAW 264.7 세포의 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향을 측정된 사진에 관한 것이다.

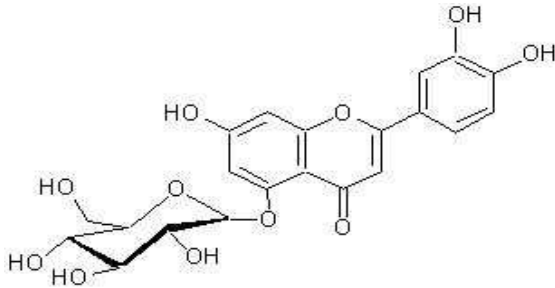
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 상기의 과제를 달성하기 위한 본 발명은 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 조추출물 또는 비극성 용매 가용추출물을 유효성분으로 하여 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우측발 염증 억제활성을 갖는 염증성 질환에 관한 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.
- [0021] 상기 엉겅퀴 조추출물은 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올과 같은 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 메탄올에 가용한 추출물을 포함한다.
- [0022] 상기 엉겅퀴 비극성 용매 가용추출물은 디클로로메탄, 클로로포름 또는 에틸아세테이트로부터 선택된 비극성 용매로, 바람직하게는 디클로로메탄과 에틸아세테이트로 추출한 것을 포함한다.

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명하면 아래의 내용과 같다.

[0024] 본 발명의 엉겅퀴로부터 조추출물, 비극성 용매 가용추출물 및 이로부터 분리되는 아래 화학식 1의 구조를 갖는 루테오린 5-*O*-β-D-글루코피라노사이드(luteolin 5-*O*-β-D-glucopyranoside)(이하, '루테오린 5-글루코피라노사이드'라 한다) 화합물은 아래의 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0025] (화학식 1)



[0026]

[0027] 본 발명의 엉겅퀴 조추출물은 엉겅퀴를 마쇄하여 분말화 한 후, 엉겅퀴 건조 중량의 약 3 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 및 부탄올과 같은 저급 알콜 또는 이들의 약 1 : 0.1 내지 1 : 10의 혼합비를 갖는 혼합용매로, 바람직하게는 메탄올로 20 내지 100℃, 바람직하게는 20 내지 70℃의 추출 온도에서 약 0.5시간 내지 2일, 바람직하게는 1시간 내지 1일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법으로 1회 내지 5회, 바람직하게는 3회 연속 추출하여 수득한 후, 감압여과하고 여액을 진공회전농축기로 20 내지 100℃, 바람직하게는 40 내지 70℃에서 감압농축하여 물, 저급알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 엉겅퀴 조추출물을 수득할 수 있다.

[0028] 상기 엉겅퀴 조추출물은 물에 현탁한 후, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, *n*-부탄올 순으로 용매를 이용하여 추출하여 본 발명의 엉겅퀴 비극성 용매 가용 추출물, 바람직하게는 디클로로메탄 가용성 분획물을 수득할 수 있고, 더욱 구체적으로는 엉겅퀴 조추출물 즉, 엉겅퀴 메탄올추출물에 디클로로메탄 : 물 : 메탄올을 일정 비율, 바람직하게는 10 : 9 : 1로 혼합하여 디클로로메탄 가용성 분획물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있고, 다시 상기 수가용성 분획물을 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 가용성 분획물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있었으며, 마지막으로 상기 수가용성 분획물을 부탄올로 추출하여 부탄올 가용성 분획물과 수가용성 분획물을 수득할 수 있다.

[0029] 상기 비극성 용매 에틸아세테이트 분획물에 대하여 디클로로메탄 : 메탄올의 혼합용매, 바람직하게는 디클로로메탄 : 메탄올 1 : 1의 혼합용매로 시간당 일정용량, 바람직하게는 1000 ml의 속도로 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피와 재결정법을 수행하여 루테오린 5-글루코피라노사이드 화합물을 수득할 수 있다.

[0030] 본 발명은 엉겅퀴로부터 조추출물, 비극성 용매 가용추출물 및 이로부터 분리되는 루테오린 5-글루코피라노사이드 화합물을 분리, 정제할 수 있다.

[0031] 본 발명은 상기에서 수득된 엉겅퀴 추출물 및 그로부터 분리된 상기 루테오린 5-글루코피라노사이드의 화합물을 함유하는 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우족발 염증 억제활성을 가지는 건강기능식품을 제공한다.

[0032] 상기에서 수득된 엉겅퀴 추출물 및 그로부터 분리된 상기 루테오린 5-글루코피라노사이드 화합물의 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우족발 염증 억제활성을 나타내는 약학조성물 및 식품조성물 조성물로서의 효능을 조사하기 위하여, 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우족발 염증 억제활성을 이용하여 엉겅퀴에서 분리된 루테오린 5-글루코피라노사이드에 대한 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우족발 염증 억제활성을 측정된 결과, 본 발명에 따른 엉겅퀴 추출물 또는 그로부터 분리된 루테오린 루테오린 5-글루코피라노사이드 화합물이 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우족발 염증 억제활성을 나타냄을 확인하였다.

- [0033] 본 발명의 엉겅퀴 추출물 또는 그로부터 분리된 루테오린 5-글루코피라노시드 화합물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0034] 또한 본 발명은 상기 제조방법으로 수득된 엉겅퀴 추출물 또는 그로부터 분리된 루테오린 5-글루코피라노시드 화합물을 유효성분으로 하는 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우족발 염증 억제활성을 나타내는 건강기능식품을 제공한다.
- [0035] 또한 본 발명의 엉겅퀴 추출물 또는 그로부터 분리된 루테오린 5-글루코피라노시드 화합물은 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우족발 염증 억제활성을 나타내는 약학조성물 및 건강기능식품 조성물로서 사용이 가능하다.
- [0036] 이때 건강기능식품첨가제는 식품에 침지, 분무 또는 혼합하여 상기 건강기능식품에 첨가할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 0.01%-10%의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0037] 상기 건강기능식품은 과일, 야채, 과일이나 야채의 건조제품이나 절단제품, 과일주스, 야채주스, 이들의 혼합주스이거나 또는 칩류, 면류, 축산가공식품, 수산가공식품, 유가공식품, 발효유식품, 곡류식품, 미생물발효식품, 제과제빵, 양념류, 육가공류, 산성음료수, 감초류, 허브류 중 어느 하나 이상을 포함한다.
- [0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 아래의 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 아래의 실시예 및 실험예에 의해 반드시 한정되는 것은 아니다.

[0039] **실시예 1. 엉겅퀴 전초 조추출물의 제조**

- [0040] 본 발명에 사용한 엉겅퀴 전초는 경북 울산 간절곶에서 채집하여 사용하였다. 엉겅퀴 전초는 음건하였으며, 마쇄하여 조추출물을 얻고자 하였다. 마쇄한 엉겅퀴 전초의 분말 2.0 kg을 메탄올 2.5 ℓ를 넣고 70 ℃에서 일정 시간 간격(12h, 6h, 3h)으로 3회 반복하여 환류냉각추출한 후 여지(와트만사, 미국)로 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로 40 ℃에서 메탄올을 제거한 후 추출된 잔사로서 엉겅퀴 조추출물 450.0 g을 수득하였으며, 이 중 2 g을 취하여 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성과 카라게난 유도 생쥐의 우족발 염증 억제활성을 위한 시료로 사용하였다.

[0041] **실시예 2. 엉겅퀴 전초의 디클로로메탄 가용 추출물의 제조**

- [0042] 상기 실시예 1에서 얻은 엉겅퀴 전초의 수가용성 분획물 2 ℓ에 디클로로메탄 2 ℓ를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 ℓ 및 디클로로메탄 가용성 분획물 2 ℓ를 얻은 후, 이 디클로로메탄 가용성 분획물을 건조하여 디클로로메탄 가용 추출물 125.0 g을 수득하여 시료로 사용하였으며, 이 중 1 g을 취하여 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성 억제활성 검색을 위한 시료로 사용하였다.

[0043] **실시예 3. 엉겅퀴 전초 에틸아세테이트 가용 추출물의 제조**

- [0044] 상기 실시예 2에서 얻은 엉겅퀴 전초의 수가용성 분획물 2 ℓ에 에틸아세테이트 2 ℓ를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 ℓ 및 에틸아세테이트 가용성 분획물 2 ℓ를 얻은 후, 이 에틸아세테이트 분획물을 건조하여 에틸아세테이트 가용 추출물 72.0 g을 수득하여 시료로 사용하였으며, 이 중 1 g을 취하여 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성 억제활성 검색을 위한 시료로 사용하였다.

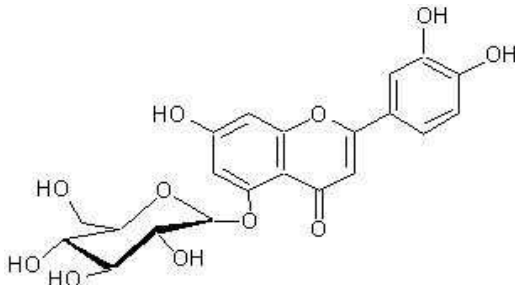
[0045] **실시예 4. 엉겅퀴 *n*-부탄올 가용 추출물의 제조**

- [0046] 상기 실시예 3에서 얻은 엉겅퀴 전초의 수가용성 분획물 2 ℓ에 부탄올 2 ℓ를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 ℓ 및 부탄올 가용성 분획물 2 ℓ를 얻은 후, 수가용성 분획물 및 *n*-부탄올 가용성 분획물을 건조하여 수가용 추출물 및 *n*-부탄올 가용 추출물 58.5 g을 수득하여 시료로 사용하였으며, 이 중 1 g을 취하여 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성 억제활성 검색을 위한 시료로 사용하였다.

[0047] **실시예 5. 루테오린 5-글루코피라노시드의 화합물의 분리**

[0048] 상기 실시예 3의 엉겅퀴 전초의 에틸아세테이트 가용 추출물 71.0 g을 전개용매로서 디클로로메탄 : 메탄올의 20:1 → 1:1의 혼합용매를 사용하여 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피와 재결정법을 수행하여 분리한 화합물을 NMR 및 MS 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과 아래 화학식 1의 구조를 갖는 루테오린 5-글루코피라노시드 화합물임을 확인할 수 있었다.

[0049] (화학식 1)



[0050]

[0051]

[0052] 물질의 성상: 노란색의 분말

[0053] 물질의 분자식: $C_{21}H_{20}O_{11}$

[0054] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.97(1H, s), 9.83(1H, s), 9.39(1H, s), 7.38(1H, dd, $J=9.0, 2.0$ Hz), 7.36(1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.88(1H, d, $J=9.0$ Hz), 6.79(1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.70(1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.55(1H, s), 5.75(1H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 176.95, 162.59, 161.37, 158.68, 158.32, 149.26, 145.69, 121.52, 118.56, 116.01, 113.12, 108.25, 105.70, 104.52, 104.33, 98.20, 77.56, 75.62, 73.65, 69.70, 60.86.

[0055] **실험예 1. 엉겅퀴 조추출물과 분획물의 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성 억제활성**

[0056] 가. 세포독성 측정

[0057] 엉겅퀴 부분별 조추출물과 분획물의 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식세포의 산화질소 생성억제활성을 측정하기 위하여 먼저 세포독성을 검토하였다. RAW 264.7 세포에 대한 독성 측정은 MTT 에세이(assay) 방법으로 분석하였다. RAW 264.7 세포를 96-웰 플레이트(well plate)에 웰(well) 당 1.0×10^4 세포가 되도록 분주한 후 24시간 배양하고, FBS-free DMEM으로 교환한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후, 100 μl 의 MTT 용액(0.5 mg/ml in PBS)을 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 100 μl 의 DMSO를 첨가하여 생성된 결정을 용해시키고 마이크로플레이트 판독 스펙트로포토메터(Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군을 100%로 하여 상대적인 세포 독성을 평가하였으며, 결과는 평균 $\pm$ 표준편차($n=3$)로 나타내었다.

[0058]

[0059] 나. LPS로 유도된 NO 측정

[0060] RAW 264.7 세포를 24-웰 플레이트(well plate)에 웰(well) 당 1.0×10^5 세포가 되도록 분주한 후 24시간 배양하였다. FBS-free DMEM으로 교환하고, 다양한 농도의 시료를 2시간 동안 전처리한 후, LPS(1.0 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. NO는 그리스 시약(Griess reagent)을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2 의 형태로 측정하였다. 세포 배양 상등액 100 μl 를 취하여 96-웰 플레이트(well plate)로 옮긴 후 그리스 시약

(Griess reagent) 100 μ l를 첨가하여 마이크로플레이트 판독 스펙트로포토메터(Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산나트륨(Sodium nitrite)으로 표준검량곡선을 작성하여 아질산염(nitrite)의 농도를 계산하고, iNOS 억제제인 AMT를 대조군으로 사용하였다. 결과는 평균 $\pm$ 표준편차 ($n=3$)으로 나타내었다.

아래 표 1에서 보는 바와 같이, 여러 가지 농도의 엉겅퀴 메탄올 엑스를 LPS-유도 RAW 264.7 세포에 처리하면 높은 NO 생성 억제 활성을 나타내었다($IC_{50} = 28.18 \mu g/mL$). 메탄올 추출물에서 용매 분획한 분획물에서는 에틸 아세테이트(EtOAc) 분획물이 다른 분획물에 비하여 10 $\mu g/mL$ 농도에서 59.51%로서 가장 높은 억제활성을 나타내었다. 10 $\mu g/mL$ 농도에서 각 분획물의 NO 생성 억제 활성은 에틸아세테이트 > 디클로로메탄 > *n*-부탄 > 물 분획물의 순서로 나타났으며 이들의 IC_{50} 치는 다음과 같다: 3.93 ± 0.38 , 9.97 ± 0.25 , 11.19 ± 1.77 와 $30.55 \pm 1.74 \mu g/mL$.

표 1

시료	$IC_{50}(\mu g/ml)$
엉겅퀴 전초 조추출물	28.18 ± 1.36
엉겅퀴 전초 디클로로메탄 가용성 분획물	9.97 ± 0.25
엉겅퀴 전초에틸아세테이트 가용성 분획물	3.93 ± 0.38
엉겅퀴 전초 부탄올 가용성 분획물	11.19 ± 1.77
엉겅퀴 전초 수가용성 분획물	30.55 ± 1.74
대조약물(AMT)	1.04 ± 0.02

실험예 2. 엉겅퀴로부터 분리된 루테올린 5-글루코피라노시드 화합물의 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성 억제

상기 실시예 5에서 수득된 루테올린 5-글루코피라노시드 화합물의 지질 다당체 유도 RAW 264.7 대식 세포의 산화질소 생성 억제활성을 상기 실험예 1과 같은 방법으로 실시하여, 그 결과를 아래 표 2에 나타내었다.

아래 표 2에 나타난 바와 같이 루테올린 5-글루코피라노시드 화합물은 IC_{50} 값이 $64.36 \pm 0.05 \mu M$ 로 나타났으며 대조 화합물인 AMT 는 IC_{50} 가 $0.08 \pm 0.00 \mu M$ 로 나타났다.

표 2

연번	시료	$IC_{50}(\mu M)$
1	루테올린 5-글루코피라노시드	64.36 ± 0.05
대조군	AMT	0.08 ± 0.00

실험예 3. 엉겅퀴 조추출물과 분리된 루테올린 5-글루코피라노시드 화합물의 카라게난 유도 생쥐의 우족발 부종 억제활성

*In vivo*에서의 항염증 활성을 평가하기 위하여, Winter *et al.*(1962)의 방법을 약간 변형하여 마우스에서 λ -CGN으로 유도된 발 부종을 측정하였다. 4주령의 수컷 ICR 마우스(20 g)를 (삼타코 바이오 코리아, Samtaco Bio Korea Ltd. Korea)에서 구입하여 온도($22 \pm 2^{\circ}C$)와 상대습도($50 \pm 10\%$), 그리고 명암주기(light : dark cycle)가 12시간 간격이 되도록 조절되는 동물 사육실에서 7일 동안 정상사료와 물은 자유롭게 섭취되도록 하면서 예비 사육하였으며, 체중이 $27 \pm 1 g$ 이 되면 본 실험을 실시하였다. 7마리씩 군을 나누어 DMSO에 녹인 화합물을 0.05 mL씩 복강투여 하고, 1시간 후 식염수에 녹인 1% CGN을 왼쪽 뒷발에 0.05 mL씩 투여하여 발 부종을 유발하였다. 그 후 5 시간째 부종측정기(plethysmometer : Ugo Basil, Italy)를 이용하여 부종의 부피를 측정하였으며, 처음에 화합물을 처리하지 않은 발의 부피보다 증가한 발의 부피를 부종으로 보았다. 대조군으로는 인도메타신(indomethacine)을 사용하였다.

[0069] 부중억제율(%) = [(CGN - 처리대조군 - 실험군) / (CGN-처리대조군 - CGN을 제외한 대조군)] × 100

[0070] 아래 표 3에 나타난 바와 같이 영경귀 조추출물 및 루테오린 5-글루코피라노시드 화합물을 각각 250 mg/kg 과 100 mg/kg을 복강투여하여 부중 억제 실험을 한 결과 59.34%와 48.31% 억제하였으며 대조 화합물인 인도메타신 (억제율 60.43%)과 상응한 항염증 활성을 나타내었다.

표 3

[0071]

연번	시료	% 억제율
1	영경귀 전초 조 추출물 250 mg/kg	59.34
2	루테오린 5-글루코피라노시드 100 mg/kg	48.31
대조군	인도메타신	60.43

[0072] **실험예 4. 영경귀 잎 조추출물 및 분획물의 RAW 264.7 대식세포에서 텃세리 부틸 하이드로 퍼옥사이드 유도 활성산소종(*t*-butylhydroperoxide induced ROS) 억제 활성**

[0073] 영경귀 잎의 조추출물 및 분획물의 RAW 264.7 대식세포에서 텃세리 부틸 하이드로 퍼옥사이드 유도 활성산소종 (*t*-butylhydroperoxide induced ROS) 억제 활성의 측정은 세포를 96-웰 블랙 플레이트(well black plate)에 웰 (well) 당 2.0×10^4 세포가 되도록 분주한 후 24시간 배양하였다. 무혈청(Serum-free) RPMI-1640으로 교환하고, 각각의 농도별로 시료를 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 그 후 *t*-BHP(최종 농도 200 μ M)를 처리하고, DCFH-DA(20 μ M)를 첨가하여 30분 동안 배양시킨 다음 산화된 DCF의 형광 강도를 마이크로플레이트 형광발광 판독기(microplate fluorescence reader, Bio-Tek Instruments Inc., FLx 800, Winooski, UT, USA)로 여기(excitation) 및 방출(emission) 파장을 각각 485와 530 nm에서 측정하였다. 대조군을 100%로 하여 상대적인 ROS 함량을 평가하였으며, 결과는 평균 $\pm$ 표준편차($n=3$)으로 나타내었다.

[0074] *t*-BHP는 세포내에서의 산화환원 상태를 파괴하여 알콕시 라디칼(alkoxyl radicals)과 히드록실 라디칼(hydroxyl radicals)과 같은 활성산소종을 생성한다(Elliott, S. J., Eskin, S. G., Schilling, W. P. Effect of *t*-butyl-hydroperoxide on bradykinin-stimulated changes in cytosolic calcium in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 264, 38063810. 1989). 따라서 세포에 *t*-BHP를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였다. ROS 생성은 ROS에 민감한 형광 지시약인 DCFH-DA(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)(Lebel and Bondy, 1990)을 사용하여 측정하였다. DCFH-DA를 살아있는 세포에 처리하면, 세포 속으로 들어가서 세포 속에 존재하는 에스테라아제(esterase) 효소의 작용에 의하여 탈아세틸화되어 DCFH(2',7'-dichlorodihydrofluorescein)로 변환되고 이것은 세포 내에서 ROS와 정량적으로 반응하여 형광성 DCF(2',7'-dichlorofluorescein)로 바뀌어 형광분광계로 측정한다. 아래 표 4에서 보는 바와 같이, 여러 가지 농도의 영경귀 메탄올 엑스를 *t*-BHP-유도 RAW 264.7 세포에 처리하면 높은 ROS 생성 억제 활성을 나타내었다($IC_{50} = 7.51 \mu$ g/mL). 메탄올 추출물에서 용매 분획한 분획물에서는 EtOAc 분획물이 다른 분획물에 비하여 10 μ g/mL농도에서 68.32%로서 가장 높은 억제활성을 나타내었다. 10 μ g/mL 농도에서 각 분획물의 ROS 생성 억제 활성은 에틸아세테이트 > *n*-부탄 > 디클로로메탄 > 물 분획물의 순서로 나타났으며 이들의 IC_{50} 치는 아래 표 4의 내용과 같다.

[0075]

표 4

[0076]

시료	$IC_{50}(\mu$ g/ml)
영경귀 잎 조추출물	7.51 ± 0.60
영경귀 잎 디클로로메탄 가용성 분획물	11.22 ± 0.77
영경귀 잎 에틸아세테이트 가용성 분획물	1.48 ± 0.08
영경귀 잎 부탄올 가용성 분획물	2.59 ± 0.25
영경귀 잎 수가용성 분획물	21.28 ± 1.74
대조약물(트로록스)	14.04 ± 1.27

[0077] 실험예 5. 엉겅퀴 전초로부터 분리된 루테오린 5-글루코피라노시드 화합물의 RAW 264.7 세포의 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향

[0078] 가. 웨스턴 블랏(Western blot)을 통한 iNOS 및 COX-2 발현 분석

[0079] LPS에 의한 iNOS와 COX-2의 발현 양을 측정하기 위해서 RAW 264.7 세포에 다양한 농도의 화합물을 2시간 동안 전처리 한 후, LPS(1.0 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 그 후 차가운 PBS(phosphate buffered saline)으로 2회 세척하고 긁어낸 후 세포용해 완충액(lysis buffer)을 4℃에서 30분 동안 가하여 세포를 용해(lysis)시켰다. 4℃에서 14,000 $\times g$ 으로 20분간 원심분리 하여 세포 내 단백질을 얻었다. 단백질의 농도는 브래드퍼드(Bradford) 방법으로 정량하였다. 단백질을 겔 완충액(gel buffer, Bio-Rad)와 혼합하고 5분간 끓여 변성시킨 후, 동량의 단백질을 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔(SDS-polyacrylamide gel)을 이용하여 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝나면 습식전이시스템(wet transfer system, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 PVDF 멤브레인(PVDF membrane)으로 옮기고, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해서 멤브레인을 블로킹 용액(blocking solution, 5%(w/v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20, pH 7.4(TBST buffer))으로 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 그 후 멤브레인에 iNOS와 COX-2에 대한 항체(1:1000 in TBST buffer)를 4℃에서 밤새 반응시켰다. iNOS와 COX-2 발현 양은 HRP가 부착되어 있는 anti-rabbit IgG(1:2000 in TBST buffer)로 실온에서 1시간 반응 후 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광 배양기(Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate)를 이용하여 X-ray 필름에 노출시켜 확인하였다. 분자량은 폴-레인지 레인보 분자량 마커(full-range rainbow molecular weight markers, Amersham)을 이용하여 확인하였다. 웨스턴 블로팅 데이터(Western blotting data)는 3회 이상 실험하여 동일한 경향이 나오는 것을 확인하였다.

[0080] 루테오린 5-O-글루코시드는 200 μM 농도까지 어떤 세포 독성을 나타내지 않았다. 아마도 루테오린의 C-5 위치에 글루코시드가 도입되면 세포독성이 감소되는 것 같았다. 이와 같은 결과는 플라보노이드(Flavonoid) 화합물들의 RAW 264.7 세포에서 NO 생성억제 실험에 대한 이전의 연구결과와 잘 일치하였다; 루테오린 7-O-글루코시드는 루테오린보다 독성이 낮았으며(Hu, C., Kitts, D. D., Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 265, 107-113. 2004) 또한 Caco-2 내장세포(Caco-2 intestinal cells, Hu and Kitts, 2004)에서도 마찬가지로 나타났다. 그렇지만 루테오린과 루테오린 7-글루코시드의 NO 생성 억제에 대한 IC₅₀치는 8.7 μM 과 9.4 μM 로서 비슷하였다(Hu and Kitts, 2004). 루테오린 5-글루코시드의 IC₅₀치는 64.36 μM 로서 루테오린 7-글루코시드보다 NO 생성억제활성은 훨씬 더 낮고 반면에 세포독성도 낮았다고 하는 사실은 특이할 만하다. 따라서 C-5 위치의 수산기가 글루코실화되면 구조적인 차이에 의하여 LPS-유도 RAW264.7 세포의 NO 생성 억제 활성화에 영향을 가져온다고 여겨진다. iNOS와 COX-2 단백질의 발현은 염증반응과 관련이 있다(Yun *et al.*, 1996). 루테오린 5-O-글루코시드의 iNOS와 COX-2 발현 억제는 처음으로 밝혔다(도 2 참조). 이와 같은 결과는 루테오린 5-O-글루코시드가 RAW264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 발현을 통하여 NO와 ROS 생성을 억제한다고 할 수 있다. 플라본(Flavone)과 플라놀(flavonol) 화합물들은 mRNA 발현과 전사를 억제하여 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 억제한다(Chen, Y. C., Shen, S. C., Lee, W. R., Hou, W. C., Yang, L. L., Lee, T. J. F., In hibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced NOS and cyclooxygenase-2 gene expression by rutin, quercetin and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell Biochem.*, 82, 537-548. 2001). 20 μM 의 루테오린과 루테오린 7-글루코시드를 처리하면 세포 손상 없이 iNOS와 COX-2 발현을 억제 한다(Hu and Kitts, 2004). 반면에 많은 플라보노이드 화합물들은 iNOS 활성화에 영향을 미치지 않고 COX-2 활성화에만 영향을 가져온다고 알려져 있다(Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F., Lin, J. K., Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 20, 1945-1952. 1999).

[0081] 참고로, 도 1은 엉겅퀴 부위별 메탄올 조추출물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 크로마토그램이다. 도 1에서 피크 1은 루테오린 5-글루코피라노시드(Rt: 28.2 min), 피크 3은 아피게닌 7-글루코시드(Rt: 32.6 min), 피크 8은 루테오린(Rt: 41.2 min), 피크 9는 아피게닌(Rt: 44.6 min)이다.

[0082] 상기 엉겅퀴 부위별 조추출물의 HPLC 분석조건은 아래 내용과 같다.

[0083] JASCO HPLC 시스템(Tokyo, Japan)

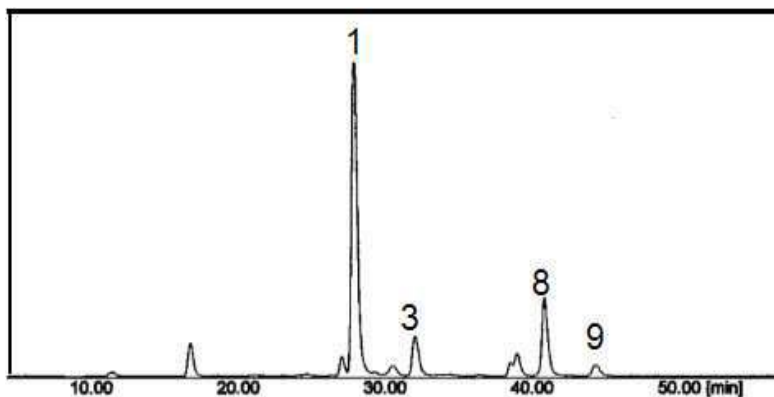
- [0084] 분석 프로그램 : 보르빈(BORWIN) 크로마토그래픽 시스템(Le Fontanil, France)
- [0085] 컬럼 : 페노메넥스 C18 역상 컬럼(Phenomenex, 4.6 250 mm, 5 m)
- [0086] 온도: 25 °C
- [0087] UV 검출기: 340 nm
- [0088] 용매조건 : A 용매 : 0.5% 인산용액, B 용매 : 100% 메탄올, A:B 혼합용매(75%:25%)를 60분간 0% :1 00%로 유속 0.5 ml/min로 실행한다.
- [0089] HPLC 결과에서 메탄올 엑스에는 주 피크인 피크 1과 8은 각각 루테오린 5-글루코피라노시드와 루테오린으로 확인되었으며 정량 결과 루테오린 5-*O*-글루코시드가 5.67% 함유하고 있었다. 이러한 결과를 미루어 메탄올 조추출물에서는 이 화합물이 주요 화합물로 구성되어있음을 추정할 수 있었다.
- [0090] 그리고, 도 2는 웨스턴 블랏(Western blot) 방법에 의해 엉겅퀴 전초로부터 분리된 루테오린 5-글루코피라노시드 화합물의 RAW 264.7 세포의 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향을 측정한 사진에 관한 것으로, 웨스턴 블랏(Western blot) 방법에 의하여 NF- κ B 관련 염증 반응인 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 루테오린 5-글루코피라노시드 화합물의 영향을 살펴보았다. LPS 처리 시 증가한 이들 단백질 발현은 루테오린 5-글루코시드 전 처리로 농도 의존적으로 억제되었음을 확인할 수 있었다.

부호의 설명

- [0091] 1 : 루테오린 5-글루코피라노시드 3 : 아피게닌 7-글루코시
8 : 루테오린 9 : 아피게닌

도면

도면1



도면2

