(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0019395
(43) 공개일자 2018년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) *A61K 36/03* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/03 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0103698
(22) 출원일자 2016년08월16일
심사청구일자 2016년08월16일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
안동현
부산광역시 남구 분포로 113, 201동 204호(용호동, 엘지메트로시티)
김꽃봉우리
부산광역시 사하구 승학로 221, 101동 1507호
김민지
부산광역시 기장군 정관면 방곡로 39, 103동 205호(가화만사성정관타워)
(74) 대리인
위병갑

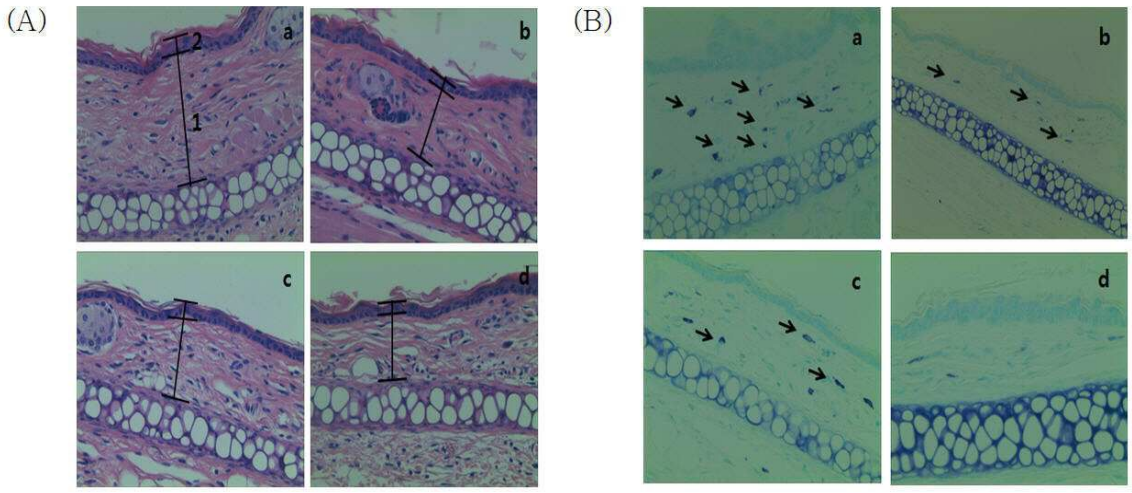
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 상기 미야베 모자반 추출물은 NF-κB와 MAPKs의 활성을 조절함으로써, iNOS와 COX-2의 발현량을 억제시키고, 염증성 사이토카인의 분비와 NO(nitric oxide)의 생성을 억제함으로써 염증성 질환을 예방 또는 개선하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/202 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A6A1028677
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소지원사업
연구과제명 해산식물 유래 항노화 소재 개발 및 분자 작용 메커니즘
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교
연구기간 2012.09.01 ~ 2021.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 미야베 모자반 추출물은 물 또는 유기용매를 이용하여 수득한 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 염증성 질환은 피부염, 아토피 피부염, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 홍채염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 췌장염, 위염, 크론병, 염증성 장질환, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 루프스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선, 류마티스 관절염, 골관절염, 골다공증, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군 및 다발성 경화증으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 미야베 모자반 추출물은 IL-6(interleukin 6), TNF-α(Tumor necrosis factor alpha) 및 IL-1β(interleukin 1 beta)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염증성 사이토카인의 분비를 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 미야베 모자반 추출물은 NO(nitric oxide)의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 미야베 모자반 추출물은 iNOS(inducible nitric oxide synthase) 및 COX-2(cyclooxygenase 2)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 미야베 모자반 추출물은 NF-κB p65(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 및 인산화된 MAPKs(Mitogen-activated protein kinases)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 미야베 모자반 추출물은 부종(edema)을 완화시키고, 비만세포(mast cell)의 침윤을 억제시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 경제성장의 발전과 더불어 평균수명의 연장과 함께 고령자 인구의 비율도 날로 증가하고 있는 추세로, 면역 조절 이상으로 인하여 유발된 염증이 지속됨으로써 발생되는 염증성 질환의 발병률 또한 최근 10년 사이에 서양에서 뿐만 아니라 한국에서도 급증하고 있는 실정이다. 이에 따라 근래에 이르러 건강과 장수에 대한 관심이 증가되고, 건강기능성 소재나 제품에 대한 소비자들의 수요가 많아지고 있다. 이는 건강기능성 식의약품 시장의 규모 확대 등으로 이어지고 있어 천연자원으로부터 새로운 기능성 소재를 발굴하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 염증반응은 생체 혹은 조직에 기질적 변화를 가져오는 화학적 물질, 세균 감염 및 물리적 작용에 의해 발생된 손상 부위를 재생하려는 복구기전이다. 유해한 자극, 감염 및 외상 등에 의해 염증이 발현되면 국소적으로 염증성 성분과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 염증을 유발하는데, 이와 같은 염증반응이 지속되면 오히려 점막손상을 촉진함에 따라 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등으로 인한 류마티스 관절염, 동맥경화증, 위염, 천식 등의 염증성질환을 유발할 수 있다.

[0004] 대식세포는 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주반응에 대하여 항상성 유지에 관여하며, 염증 반응 시에는 nitric oxide(NO) 및 다양한 cytokine을 생산하여 감염 초기에 생체방어에 중요한 역할을 하는 세포이다. RAW 264.7과 같은 대식세포 또는 단핵구는 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소인 lipopolysaccharide(LPS)의 자극에 의해 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β) 및 IL-6와 같은 염증매개성 cytokine의 분비를 촉진한다. Nitric oxide(NO)는 세포 내에서 L-arginine을 기질로 하여 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-citruline과 함께 생성되는 신경계, 면역계, 심장혈관계에서 주요 전달물질로 신경독성 및 신경 보호성의 기능을 동시에 나타내고, 쇼크 및 여러 가지 신경 퇴행성 질병의 발생에도 관여하는 것으로 보고되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제2012-0135576호

(특허문헌 0002) 2. 한국공개특허 제2013-0132735호

(특허문헌 0003) 3. 한국공개특허 제2014-0178341호

(특허문헌 0004) 4. 한국등록특허 제1487065호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미야베 모자반 추출물은 물 또는 유기용매를 이용하여 수득한 추출물인 것일 수 있다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 또는 시클로헥산인 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 아토피 피부염, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 홍채염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 췌장염, 위염, 크론병, 염증성 장질환, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 루프스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선, 류마티스 관절염, 골관절염, 골다공증, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군 또는 다발성 경화증인 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미야베 모자반 추출물은 IL-6(interleukin 6), TNF-α(Tumor necrosis factor alpha) 또는 IL-1β(interleukin 1 beta)의 염증성 사이토카인의 분비를 억제하는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미야베 모자반 추출물은 NO(nitric oxide)의 생성을 억제하는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미야베 모자반 추출물은 iNOS(inducible nitric oxide synthase) 또는 COX-2(cyclooxygenase 2)의 활성을 억제하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미야베 모자반 추출물은 NF-κB p65(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 또는 인산화된 MAPKs(Mitogen-activated protein kinases)의 활성을 억제하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미야베 모자반 추출물은 부종(edema)을 완화시키고, 비만세포(mast cell)의 침윤을 억제시키는 것일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 미야베 모자반 추출물은 미야베 모자반 추출물은 NF-κB와 MAPKs 활성 조절을 통해 iNOS, COX-2의 발현을 감소시키고, 염증성 사이토카인의 분비를 억제하고, NO(nitric oxide)의 생성을 억제함으로써 염증성 질환을 예방 또는 개선하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 미야베 모자반 에탄올 추출물에 대한 세포 독성 여부를 측정한 것이다.

도 2는 LPS로 자극된 대식세포에서 미야베 모자반 에탄올 추출물에 의한 IL-6, TNF-α 및 IL-1β 분비량의 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 3은 LPS로 자극된 대식세포에서 미야베 모자반 에탄올 추출물에 의한 NO 분비량의 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 LPS로 자극된 대식세포에서 미야베 모자반 에탄올 추출물에 의한 iNOS, COX-2 및 NF-κB p65 발현량의 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 5는 LPS로 자극된 대식세포에서 미야베 모자반 에탄올 추출물에 의한 인산화된 p38, ERK 및 JNK 발현량의 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 6는 크로톤유(croton oil)에 의해 유도된 마우스에서 미야베 모자반 에탄올 추출물에 의한 귀부종의 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 7는 크로톤유(croton oil)에 의해 유도된 마우스에서 미야베 모자반 에탄올 추출물에 의한 귀조직을 관찰한 것이다(배율 200x; 1: 진피; 2: 경피; A: H-E(hematoxylin-eosin) 염색; B: 톨루이딘블루(toluidine-blue) 염색; 및 화살표: 침윤된 비만세포). (a) 내지 (c)는 5%의 크로톤유(croton oil)에 의해 염증이 유발되었고, (d)는 염증이 유발되지 않은 그룹이다. (a)에는 2% Tween 80, (b)에는 0.08 mg/ear의 프레드니솔론(prednisolone) 및 (c)에는 20 μL/ear의 미야베 모자반 에탄올 추출물을 처리한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명에서의 용어, "염증성 질환"이란 염증유발인자 등 유해한 자극으로 인해 인체 면역체계를 과도하게 항진시켜 대식세포와 같은 면역세포에서 분비되는 TNF-α(tumor necrosis factor-alpha), IL-1(interleukin-1), IL-6(interleukin-6), 프로스타글란딘(prostagladin), 루코트리엔(luecotriene) 또는 산화질소(nitric oxide, NO)와 같은 염증유발물질(염증성 사이토카인)에 의해 유발되는 질환을 말한다.

[0022] 본 발명에서의 용어, "치료"란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 상기 치료란 용어는 "치료하는"이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서 염증질환의 "치료" 또는 "치료요법"은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0023] (1) 염증질환의 발달을 저지시킴,

[0024] (2) 염증질환의 확산을 예방함,

[0025] (3) 염증질환을 경감시킴,

[0026] (4) 염증질환의 재발을 예방함 및

[0027] (5) 염증질환의 증상을 완화함(palliating)

[0029] 본 발명에 따른 미야베 모자반 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 미야베 모자반으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 미야베 모자반 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함할 수 있다.

[0030] 상기 미야베 모자반으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 이에 제한되지 않으나, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 에탄올(주정), n-헥산 및 에틸아세테이트 용매를 사용할 수 있다.

[0031] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 미야베 모자반 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.

[0032] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 미야베 모자반 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한, 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid

chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서, 본 발명에 있어서, 미야베 모자반 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0034] 본 발명은 미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0035] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 하나 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0037] 또한, 상기 미야베 모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 식품 조성물로 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 미야베 모자반 추출물은 세포에 독성을 유도하지 않음을 일실시예를 통해 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 미야베 모자반 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0038] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0040] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 미야베 모자반 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명을 실시예 및 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다

구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] **실시예 1. 실험재료 및 방법**

[0046] **1.1. 실험재료**

[0047] 미야베 모자반(*Sargassum miyabei*)는 부산 백운포에서 2015년도에 채취하여 담수로 깨끗이 씻은 후 동결 건조하여 잘게 분쇄시킨 뒤 -20℃에서 저장하면서 실험에 사용하였다.

[0048] 미야베 모자반 추출물은 건조 분쇄된 미야베 모자반에 에탄올을 가하여 추출하였고 농축하여 에탄올을 제거한 후 실험에 사용하였다. 건조된 시료는 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

[0050] **1.2. 세포배양**

[0051] 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB40071)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM(dulbecco modified eagle medium)에 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 배지를 배양액으로 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 배양한 RAW 264.7 세포의 배양액을 스크랩퍼(scraper)로 모은 후, 1000 rpm, 3분, 4℃에서 원심 분리하였고, 10% FBS-DMEM 배지를 첨가하여 $2.5x10^5$ 및 $1x10^6$ cell/mL 농도로 희석하였다. 이를 웰-플레이트에 분주하여 37℃, CO_2 배양기(MCO-15 AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 18 및 20시간 배양한 후, DPBS(dulbecco's phosphate-buffered saline)로 3회 세척하여 부유세포를 제거하고 10% FBS-DMEM 배지를 첨가하였다. 그 후, PBS(phosphate-buffered saline), LPS(lipopolysaccharide, 1 μg/mL) 및 시료를 첨가하여 37℃, CO_2 배양기(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 12 및 24시간 배양하였다.

[0053] **1.3. RAW 264.7 세포에서의 NO(Nitric Oxide) 분비량 측정**

[0054] Microplate에 RAW 264.7 세포의 상층액을 넣고, 동량의 griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, microplate reader(Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양액 내 NO의 농도는 $NaNO_2$(sodium nitrite)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

[0056] **1.4. RAW 264.7 세포에서의 사이토카인(cytokine) 분비량 측정**

[0057] Microplate에 RAW 264.7 세포의 상층액을 넣고, ELISA-kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 IL-6(Interleukin 6), TNF-α(Tumor necrosis factor alpha) 및 IL-1β(Interleukin 1 beta) 사이토카인(cytokine)의 분비량을 측정하였다. 먼저, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) microplate에 anti-mouse IL-6, TNF-α 및 IL-1β mAntibody를 분주하여 코팅(coating)하고, 10% FBS 용액으로 블러킹하였다. 배양액을 넣고 biotinylated anti-mouse IL-6, TNF-α 및 IL-1β mAntibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하였다. 그 후, OPD(o-phenylenediamine dihydrochloride) 용액을 첨가하여 암반응시키고, microplate reader(Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0059] **1.5. RAW 264.7 세포에서의 세포증식능 측정**

[0060] RAW 264.7 세포를 1×10^6 cell/mL 농도로 배양한 후, PBS 및 배양액을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 다시 배양하였다. 본 배양 시 MTT (thiazol blue tetrazolium bromide, 5 mg/mL) 시약을 첨가하여 2시간 배양하여 포마잔 크리스털(fomazan crystal) 형성을 유도하였다. 이를 4℃, 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. RAW 264.7 세포의 증식능

은 다음 식에 의해 계산하였다.

[0061] 증식능(Proliferation Index, %) = (Sample의 흡광도 / Control의 흡광도) × 100

[0063] **1.6. 웨스턴 블럿(Western blot) 측정**

[0064] 미야베 모자반 에탄올 추출물이 iNOS(inducible nitric oxide synthase), COX-2(cyclooxygenase 2), NF-κB p65(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), 및 p-ERK(extracellular signal-regulated kinases), p-JNK(c-Jun N-terminal kinases), p-p38(P38 mitogen-activated protein kinases)을 포함하는 인산화된 MAPKs(Mitogen-activated protein kinases)의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, cytosol lysis buffer[50 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40]를 첨가하여 30분간 4° C에서 용해시킨 후, 15,520×*g*에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였으며, 30 μL의 lysate를 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Bio-Rad)에 1시간 동안 전사시켜 5% 스킴밀크(skim milk)가 포함된 TBSS(tris buffered saline; pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 블러킹하였다. iNOS, COX-2 및 NF-κB의 발현량을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF-κB (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBSS로 3회 세정하였다. 2차 항체로 HRP(horseradish peroxydase)가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBSS로 3회 세정하여 ECL 기질과 1~3분간 반응 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool (GeneGnome5, Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 가시화하였다. MAPKs의 발현량을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 18시간 전 배양하고 미야베 모자반 에탄올 추출물을 처리하여 30분 동안 본 배양한 후, p38, ERK, JNK, p-p38, p-ERK 및 p-JNK의 발현량을 검토하기 위하여 anti-mouse p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK 및 JNK (Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA) 항체를 1:500으로 희석하여 사용하였다. 이후의 실험은 iNOS, COX-2 실험법과 동일하게 진행하였다.

[0066] **1.7. 귀부종 및 귀조직 관찰**

[0067] 미야베 모자반 에탄올 추출물의 항염증 효과를 *in vivo* 상에서 알아보기 위하여 다음과 같이 귀부종 측정 실험을 실시하였다. 생후 8주령의 수컷, ICR 마우스에 추출물을 10, 50 및 250 mg/kg · body weight 농도로 200 μL씩 단회 경구 투여하고 한 시간 후, 오른쪽 귀에 2.5% 크로톤유(croton oil)을 20 μL/ear 농도로 도포하였다. 도포 5시간 후 귀 두께를 측정하였고 croton oil의 처리로 귀 두께가 증가한 것을 부종의 형성으로 간주하였다. 귀 조직 관찰은 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 미야베 모자반 에탄올 추출물을 100 mg/mL 농도로 20 μL씩 도포하고 15분 뒤, 5% 크로톤유(croton oil)을 20 μL씩 도포하였다. 6시간 뒤, 디에틸에테르로 마취사 시키고, 귀 조직을 절제하여 10% 포름알데하이드에 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 H-E(hematoxylin-eosin) 염색과 톨루이딘블루(toluidine-blue) 염색을 하여 조직을 관찰하였다. 부종 생성율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

[0068] Edema formation (%) = (Sample의 귀 두께 / Control의 귀 두께) × 100

[0070] **실시예 2. 세포 독성 측정**

[0071] 미야베 모자반 에탄올 추출물은 0.1-100 μg/ml 농도에서 대식세포에 대한 세포 독성을 나타내지 않았다(도 1). 따라서, 미야베 모자반 에탄올 추출물은 독성 없이 LPS에 의해 유도된 염증 반응 억제에 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0073] **실시예 3. 사이토카인(cytokine) 분비량 측정**

[0074] 미야베 모자반 에탄올 추출물은 LPS에 의해 증가된 IL-6, TNF-α, IL-1β의 분비량을 농도의존적으로 감소시킴을 확인하였다. 특히, LPS에 의해 증가된 IL-6 분비량은 50 μg/mL 농도의 추출물에서는 51%로 감소되었고, 100

μg/mL 농도의 추출물에서는 73%로 감소되는 것으로 나타났다. TNF-α의 경우, 100 μg/mL 농도의 추출물에서는 36%로 감소되었으며, IL-1β의 분비량은 100 μg/mL 농도에서 72%의 감소효과를 나타내었다(도 2). 따라서, 미야베 모자반 에탄올 추출물은 전염증성 사이토카인인 IL-6, TNF-α, IL-1β의 분비 억제를 통해 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

[0076] **실시예 4. NO(nitric oxide) 분비량 측정**

[0077] 미야베 모자반 에탄올 추출물은 LPS에 의해 증가된 NO의 분비량을 농도의존적으로 감소시킴을 확인하였다(도 3). 100 μg/mL 농도의 추출물을 처리하는 경우에는 대조군에 비하여 NO 분비량이 43%로 감소되었음을 확인하였다. 따라서, 미야베 모자반 에탄올 추출물은 염증반응에 관여하는 NO 분비량을 억제시킴으로서 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

[0079] **실시예 5. iNOS, COX-2, NF-κB 및 MAPKs 발현량 측정**

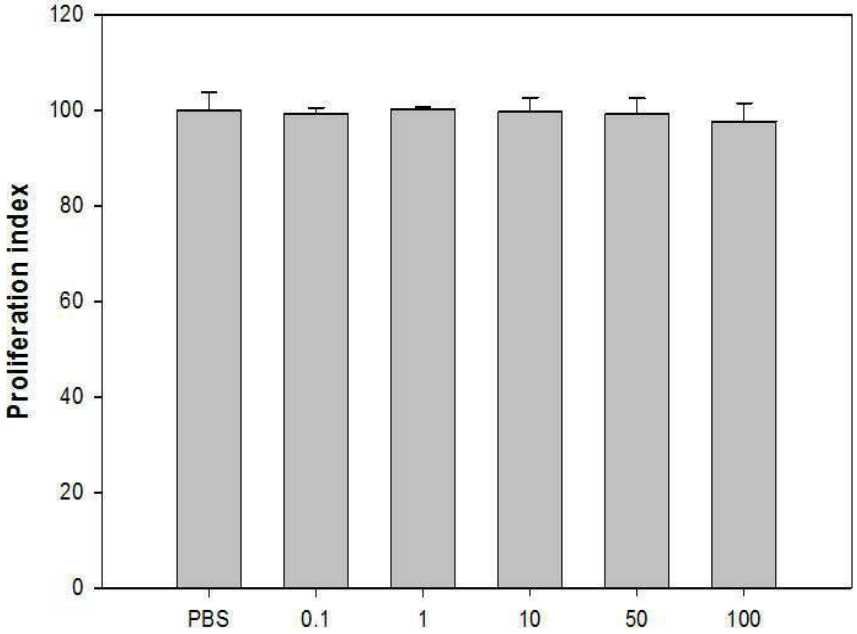
[0080] 미야베 모자반 처리에 의한 iNOS, COX-2, NF-κB p65 및 MAPKs의 발현량 조절에 미치는 영향에 대해 알아보았다. iNOS, COX-2 및 NF-κB p65의 발현량은 LPS에 의해 증가하였으나, 미야베 모자반 에탄올 추출물 처리에 의해 농도의존적으로 감소함을 보였다(도 4). 또한, 미야베 모자반 에탄올 추출물 처리가 대식세포 내 인산화된 MAPKs의 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, LPS에 의해 증가한 인산화된 ERK, JNK, 및 p-38의 발현량이 추출물 처리에 의해 농도의존적인 감소를 보였다(도 5). 따라서, 미야베 모자반 에탄올 추출물 처리에 의해 LPS로 유도된 염증성 사이토카인, NO, iNOS, COX-2와 같은 염증성 인자들의 활성화에 관련하여 NF-κB와 MAPKs 신호 전달 경로를 효과적으로 억제함에 따라 항염증 효과를 보인 것으로 사료된다.

[0082] **실시예 6. 귀부종 억제 효과**

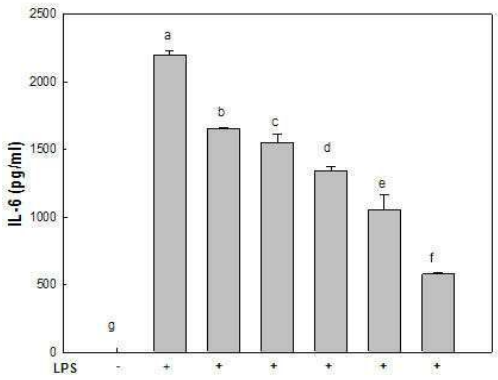
[0083] 크로톤유(croton oil)는 피부에 도포하면 즉각적으로 강한 급성 염증반응을 유도하여 부종을 일으키는 것으로 알려져 있다. 에탄올 추출물의 염증 억제활성을 염증반응의 하나인 부종의 완화효과 및 조직 내의 비만세포(mast cell) 침윤 억제효과를 통해 동물실험을 통해 확인하였다. 추출물을 10, 50 및 250 mg/kg 농도로 마우스에 경구 투여한 후 크로톤유(croton oil)로 염증을 유발하고 부종이 유발된 귀 두께를 측정하였다. 부종실험을 진행한 결과, 크로톤유(croton oil)만을 처리하여 부종이 발생한 대조군과 비교 시 추출물 처리에 의해 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소하였으며, 합성 스테로이드제인 프레드니솔론(prednisolone)을 10 mg/kg 농도로 경구 투여했을 때와 비교한 경우 미야베 모자반 추출물을 250 mg/kg·body weight로 경구 투여했을 때와 유사한 억제효과를 나타냄을 확인하였다(도 6). 또한, 조직 관찰 결과에서도 같은 경향을 나타내어 크로톤유(croton oil)로 부종을 유발한 마우스 귀 조직에 미야베 모자반 추출물을 처리하였을 때 프레드니솔론(prednisolone) 처리구와 유사한 정도로 경피 및 진피 두께가 얇아졌다(도 7). 또한, 톨루이딘블루(toluidine-blue)로 염색한 진피에서의 비만세포(mast cell)의 침윤이 눈에 띄게 억제되었음을 확인하였다. 따라서, 미야베 모자반 추출물은 염증반응인 부종을 완화하고 비만세포(mast cell)의 침윤을 효과적으로 억제하여 염증 반응을 억제하는 것으로 나타났다.

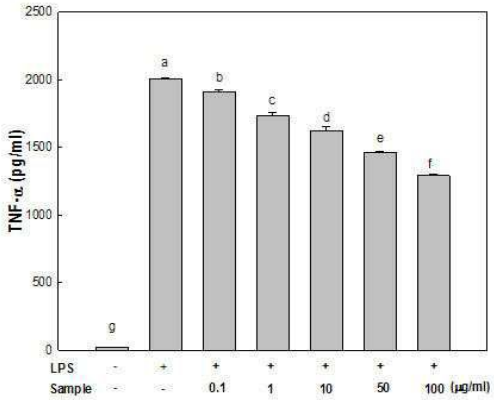
도면

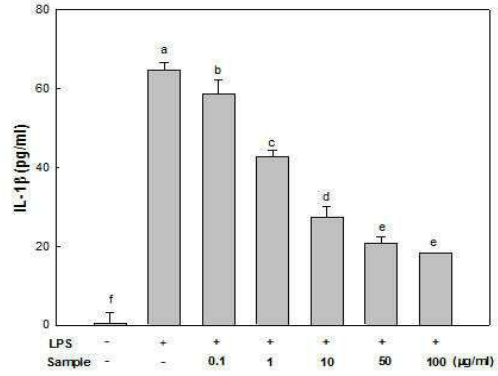
도면1


Proliferation index
120
100
80
60
40
20
0
PBS
0.1
1
10
50
100

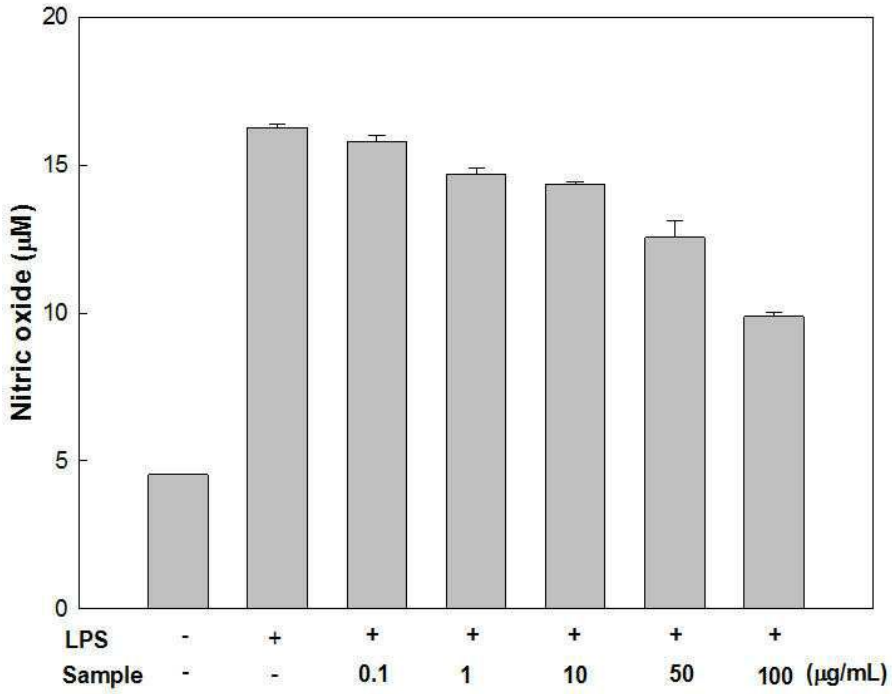
도면2


IL-6 (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
a
b
c
d
e
f
g
LPS - + + + + + +

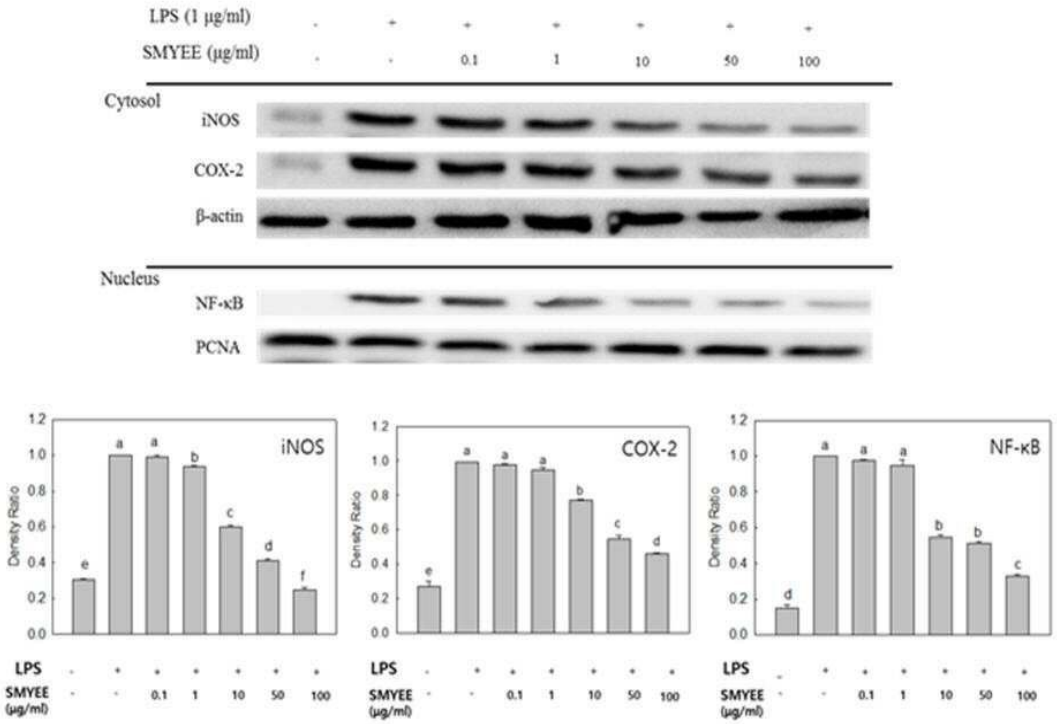

TNF-α (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
a
b
c
d
e
f
g
LPS - + + + + + +
Sample - - 0.1 1 10 50 100 (μg/ml)


IL-1β (pg/ml)
80
60
40
20
0
a
b
c
d
e
e
f
LPS - + + + + + +
Sample - - 0.1 1 10 50 100 (μg/ml)

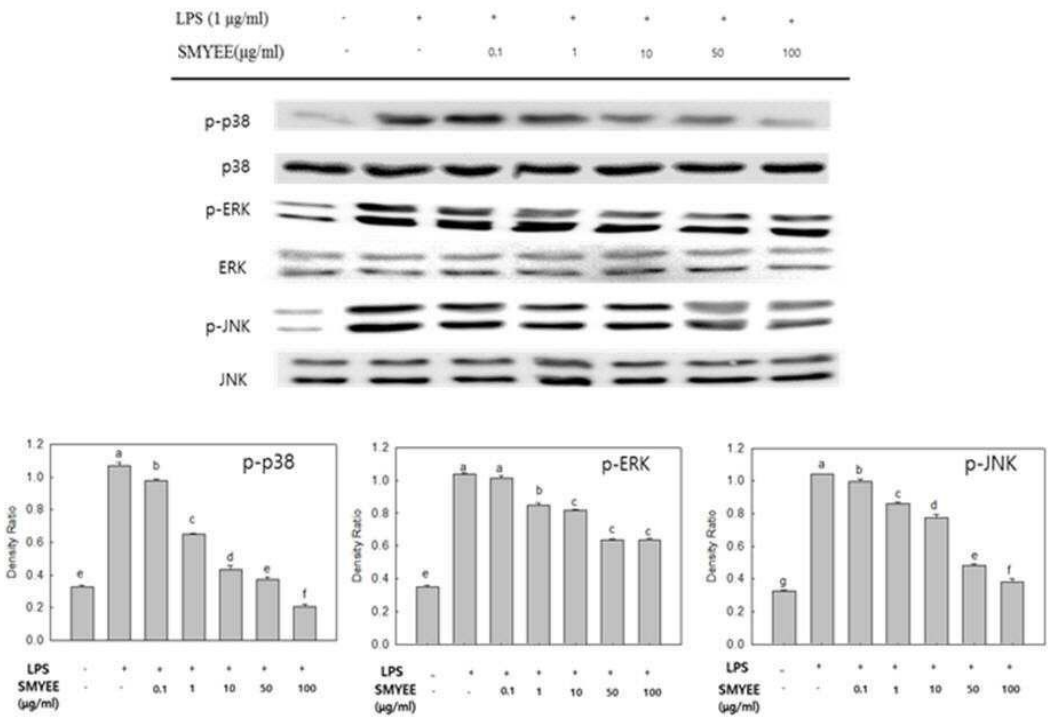
도면3


Nitric oxide (μM)
20
15
10
5
0
LPS - + + + + + +
Sample - - 0.1 1 10 50 100 (μg/mL)

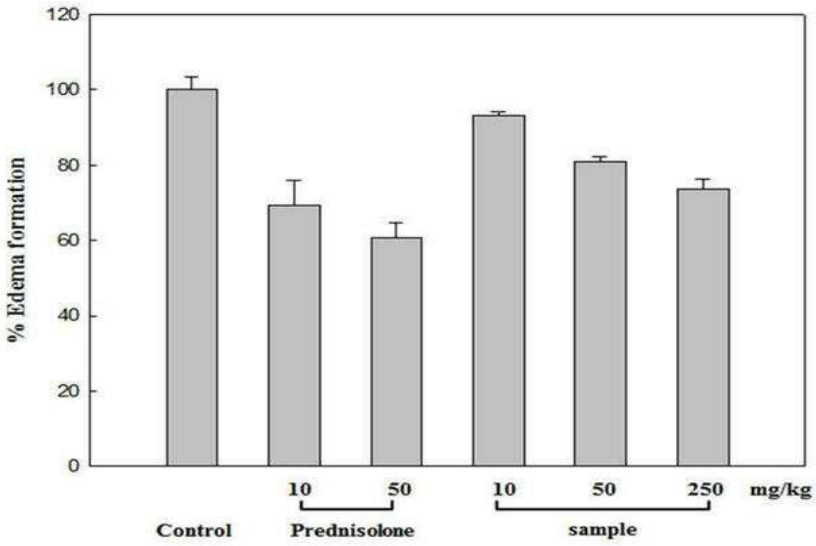
도면4


LPS (1 μg/ml) - + + + + + +
SMYEE (μg/ml) - - 0.1 1 10 50 100
Cytosol
iNOS
COX-2
β-actin
Nucleus
NF-κB
PCNA
iNOS
COX-2
NF-κB
Density Ratio
LPS
SMYEE (μg/ml)

도면5


LPS (1 μg/ml)
SMYEE(μg/ml)
p-p38
p38
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
p-p38
p-ERK
p-JNK
Density Ratio
LPS
SMYEE (μg/ml)

도면6


% Edema formation
Control
Prednisolone
sample
mg/kg

도면7

