(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0056048
(43) 공개일자 2019년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/718 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 36/539 (2006.01) *A61K 36/744* (2006.01)
A61K 36/756 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/718 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0153058
(22) 출원일자 2017년11월16일
심사청구일자 2017년11월16일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
조익현
서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호 (반포동, 반포아파트)
최종희
경상북도 경주시 외동읍 신기앞길 59-2
(74) 대리인
위병갑

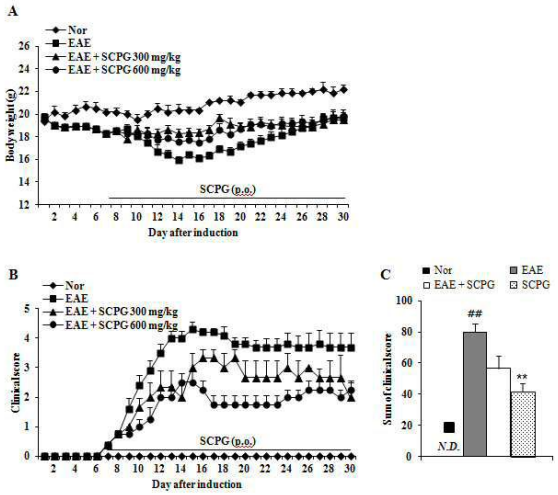
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 포함하는 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 36/539 (2013.01)
A61K 36/744 (2013.01)
A61K 36/756 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017R1A2A2A05069493
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업/중견연구자지원사
연구과제명 헌팅턴질환 동물모델에서 미세아교세포 활성화의 병리 기능 및 치료기술 연구 ; AAV/DJ 벡터와 shRNA 활용
기 여 율 50/100
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2017.09.01 ~ 2020.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2016M3C7A1905074
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업/뇌과학원천기술개발사업
연구과제명 신경손상 연관 뇌기능조절 microglia 타겟 발굴 및 제어 융합기술 개발
기 여 율 50/100
주관기관 서울대학교 산학협력단
연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 열수 추출물인 것인 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 황련, 황금, 황백 및 치자를 1: 1: 1: 1의 무게비율로 혼합한 것을 추출한 것인 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 열수 추출 시 추출 온도는 60℃ 내지 100℃인 것인 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 다발성 경화증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 열수 추출물인 것인 다발성 경화증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 황련, 황금, 황백 및 치자를 1: 1: 1: 1의 무게비율로 혼합한 것을 추출한 것인 다발성 경화증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 열수 추출 시 추출 온도는 60℃ 내지 100℃인 것인 다발성 경화증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 다발성경화증은 인체 내 면역계의 결손에 의해 유발되는 질환으로 뇌와 척수의 백질부분의 신경을 덮는 지방질로 된 수초(myelin sheath)를 침범하여 탈수초화(demyelination)를 산발적으로 일으키는 질환으로 수초가 손상을 받아 수초층의 두께가 감소하면 신경자극은 전달되지만, 효율성이 떨어지고 이에 정상적인 신경자극 전달이 방해를 받아 발병되는 질병이다. 쉽게 설명하자면, 전선을 둘러싸고 있는 절연체가 손상되면 전기의 전도가 느려지는 것과 마찬가지로 신경세포 간의 전도 속도가 느려지는 현상을 초래하여 증상을 일으킨다. 초기에는 수초가 회복되면서 완화증상이 나타나지만, 결국 악화가 반복되며 손상이 영구화된다. 이 같은 수초의 손상으로 인해 신경이 적절히 작용을 하지 못하여 시야장애나 균형감 상실 등의 증상이 야기되고 일부 환자에서는 마비가 올 수 있다.

[0003] 다발성경화증의 치료는 크게 급성기 치료와 장기적인 질병완화 치료, 그리고 증상완화 치료로 나눌 수 있다. 급성기에는 일반적으로 고용량 스테로이드(steroid)의 정맥주사 요법을 사용한다. 스테로이드는 급성기에 증상을 완화시키고 회복 기간을 줄여주지만, 장기적으로 투여할 경우에는 다양한 부작용이 나타날 수 있으므로 사용에 주의를 요한다. 여러 가지 원인에 의해 질병완화 치료를 하기 어려운 환자들은 저용량 스테로이드 유지 요법을 사용하기도 한다. 대표적인 질병완화 치료제로는 인터페론(beta-interferon)과 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate)가 있다. 이들은 재발완화형 다발성경화증(relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS)에서 재발하는 횟수를 줄이고, 재발 시에 나타나는 증상을 완화하는 효과를 가지고 있다. 그러나 이차진행형으로 전환된 환자에서는 뚜렷한 효과가 나타나지 않기 때문에 이 경우에는 환자의 장애를 예방하기 위한 조기치료가 가장 중요하다. 다발성경화증으로 인해 나타나는 여러 증상과 신경학적 장애를 줄여주기 위한 증상완화 치료도 시행한다. 이러한 치료들은 재발율이 높으며, 재발을 확실하게 방지하는 방법은 없다.

[0004] 이러한 배경 하에 본 발명자들은 다발성 경화증에 효과가 있는 천연 추출물에 관한 연구개발을 수행하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국 공개특허공보 10-2015-0070576호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 다발성 경화증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 건강기능식품의 유효 성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 이하, 본 명세서에 대하여 더욱 상세하게 설명한다.

[0010] 본 명세서에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0011] 본 명세서에서 상기 "예방"이란 상기 약학적 조성물의 투여로 다발성 경화증을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 상기 "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여로 다발성 경화증의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0012] 본 발명은 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0013] 상기 "황련"은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 미나리아재비과의 상록 여러해살이풀로 중국이 원산지이나, 생약용으로 한국, 일본, 중국 등지에서 재배되기도 하며 러시아, 북아메리카 등지에 분포하는 등 전세계적으로 여러 종이 존재한다. 한방에서는 11월경에 재식 5 내지 6년 된 황련의 뿌리를 채취하여 햇볕에 말린 것을 황련이라고 하며, 건위, 진정, 소염, 항균 등의 효능이 있어, 소화불량, 위염, 장염, 복통, 구토, 이질, 심계, 번열, 정신불안, 인후종통, 토혈, 코피, 하혈 및 화상 등의 치료에 처방한다. 다른 이름으로는 왕련, 지련, 삼각엽황련,아미야연, 운남황련, 깽깽이풀, 천황련, 토황련, 선황련, 모황련, 조선황련, 산련풀 등이 있다. 실제 황련이라는 생약명으로 여러 종류의 식물이 사용되고 있으며, 따라서, 콥티스(Coptis) 속의 종들을 비롯한 플라지오레그마 두비움 맥심(Plagiorhegma dubium Maxim.) 및 제퍼소니아 두비아 벤트 엣 혹(Jeffersonia dubia Bent. et Hook.)등의 다양한 식물을 포함한다.

[0014] 상기 "황금(Scutellaria baicalensis)"은 꿀풀과에 속하는 다년생초로 중국이 원산지이나 우리나라 전국 각지의 산기슭에서 자라며 약초로도 재배하고 있다. 황금은 겉 표면을 벗겨내면 노란색이 황금과 같다고 하여 붙여진 이름이다. 특히 뿌리를 황금이라 하여 약용으로 사용한다. 황금의 성미는 차갑고 쓰며 독이 없고 해열, 이뇨, 지사, 이담 및 소염 작용이 있다. 쓴맛은 심장과 폐에 들어가 장위를 보하고 차가움은 간장과 폐에 들어가 습열을 없앤다. 또한 지혈, 안태의 효능이 있고, 번갈, 폐열해수, 황달, 자궁출혈, 목적종통, 태동불안을 치료하며, 불면증, 위장염, 대/소장염, 간염, 방광염, 요도염, 천식 등에 쓰는 것으로 알려져 있다. 향수수초, 금, 토금채, 황금다근, 황금다, 속썩은풀, 황금초 등의 속명을 갖는다.

[0015] 상기 "황백"은 산초과에 속하는 낙엽성 교목인 황경피 나무 또는 이의 껍질을 말려 제조한 약재를 의미하는 것으로 황경피, 자벽, 소벽, 단환 등의 다른 이름으로도 불린다. 줄기껍질은 연한 회색이나 코르크층이 발달하여 깊이 갈라지며, 코르크층을 벗긴 내피는 노란색이다. 주로 약재로 사용되는 부분은 수피로서 일반적으로 3 ㎜ 정도의 두께와 30 ㎝ 정도의 길이를 갖는다. 또한 단환이라고 불리는 황벽나무(황백나무)의 뿌리인 황벽근은 명치에 생긴 질병을 치료하는 효능이 있다고 알려져 있다. 특이한 냄새가 있고 점액성이 있으며 침을 황색으로 물들인다. 약효는 상기 황금 또는 황련과 비슷하나 그 약효가 적용되는 부위는 차이가 있다. 알려진 약리작용은 항미생물작용, 수렴작용, 피하출혈흡수촉진작용, 항염증작용, 건위작용, 혈압강하작용, 근수축력증강작용 등이며, 유행성 뇌막염, 세균성이질, 폐렴, 폐결핵, 간경변, 급성 결막염, 해열, 해독, 설사, 당뇨병, 황달, 비만증, 관절통, 근육통 등에 쓰인다.

[0016] 상기 "치자"는 상록관목인 꼭두서니과에 속하는 치자나무의 열매 또는 이를 건조시킨 것을 말한다. 상기 치자나무는 우리나라 중부이남, 중국, 대만, 일본 등 더운 지방의 깊은 산중에 자생한다. 열매는 3.5 ㎝ 정도 길이로 9월에 황홍색으로 익으며, 약용으로뿐만 아니라 염료로도 사용된다. 약리적으로 당뇨병, 고혈압, 불면증, 황달, 소변장애, 안구충혈, 결막염, 토혈, 자궁출혈, 혈뇨, 타박상 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 관절타박상을 치료하고 해독효과를 갖는다. 치자 단독으로 또는 다른 약재와 함께 물에 달여 마시거나, 치자를 분말하여 물 등에 개어 환부에 붙이기도 한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 황련, 황금, 황백 및 치자를 1: 1: 1: 1의 무게비율로 혼합한 것을 추출한 것이다.

[0018] 본 발명의 상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 즉, 통상적인 온도와 압력 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 제조될 수 있다.

[0019] 추출방법은 당 분야에 알려진 추출방법, 예컨대 냉침, 열수 추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 초임계 추출, 압착 추출 등의 당업자에게 알려진 방법으로 수행될 수 있다. 본 발명의 구현예에 있어서, 상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 열수 추출물이다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 열수 추출 시 추출 온도는 60℃ 내지 100℃이다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 각각의 건조물의 혼합물의 추출물일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 열수 추출물의 동결 건조물이다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물은 약효를 증가시키지는 않으나 약학적 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 성분을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨

가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 예컨대, 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화 전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 있으나, 이를 한정하지 않는다. 추가로, 상기 약학적 조성물은 단독 사용하거나 기존에 사용된 다발성 경화증에 대한 예방 또는 치료 활성을 가지는 물질을 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하고 경구 또는 비경구용의 인체 또는 수의용으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물을 제제화하는 경우 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose) 및 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이트, 탈크 같은 윤활제를 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물 및 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 개체에 투여하여 다발성 경화증을 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어, "개체"는 다발성 경화증 또는 이의 직, 간접적 원인에 의해 유발된 질환을 가지고 있으며, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 투여하여 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간을 포함한 말, 양, 돼지, 염소, 개 등의 포유동물을 의미하나, 바람직하게는 인간을 의미한다.

[0027] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물이 표적 세포로 이동할 수 있도록 하는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 체중, 성별, 연령, 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 1일 1회 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량의 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0029] 또한, 본 발명은 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 다발성 경화증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0030] 본 발명에 따른 건강기능식품은 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0031] 상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 전술한 바와 동일하다.

[0032] 본 명세서에서 상기 "기능 식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 본 명세서의 상기 "기능"이란 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적인 작용으로 보건 용도에 유용한 효과를 의미할 수 있다.

[0033] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 척수에서 탈수초화(demyelination), T 세포의 유주/침윤, 염증성 사이토카인/케모카인의 mRNA의 발현을 억제한다. 또한, 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 MAPK 및 NF-KB의 신호 기전을 억제한다.

[0035] 따라서, 본 발명에 따른 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 다발성 경화증을 예방하거나 치료 또는 개선용의 약제학적 조성물 또는 건강기능식품으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 EAE(실험적 자가 면역성 뇌척수염, experimental autoimmune encephalomyelitis, 다발성경화증 동물모델)가 유도된 동물 모델에서 행동학적인 검사를 통한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 신경 보호 효과를 확인한 도이다.

도 2는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 허리 척수 절편에서 탈수초화 및 면역세포 침윤 정도에 대한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 보호효과를 확인한 도이다.

도 3은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 내재성 미세아교세포 (resident microglia) 및 말초성 큰포식세포(peripheral macrophages)의 이동/침윤에 대한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 보호효과를 확인한 도이다.

도 4는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 염증매개인자의 활성도에 대한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 효과를 확인한 도이다.

도 5는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 혈액뇌장벽의 변화에 대한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 효과를 확인한 도이다.

도 6은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 T 세포의 활성도에 대한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 효과를 확인한 도이다.

도 7은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 MAPKs와 NF-kB 신호기전의 활성화에 대한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 효과를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0039] **실시예 1. 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물의 제조**

[0040] 건조된 황금, 황련, 황백 및 치자는 옴니허브(Omniherb)(대한민국, 대구)로부터 구입하였다. 상기 4가지 약제의 복합 열수 추출물을 제조하기 위하여, 황련:황금:황백:치자를 1:1:1:1의 비율로 열수 추출하여 동결건조하였다.

[0041] 구체적으로, 열수 추출을 하기 위해 황금, 황련, 황백 및 치자를 음건하고 세절하여 1:1:1:1 무게 비율로 혼합하였다(각 25:25:25:25 g/ 총 100 g). 상기 혼합물은 환류 추출 시스템을 이용하여 1 L의 증류수에 90분간 넣어서 비등시켰다. 열수 추출물을 20-25 ㎛의 공극을 가지는 Whatman No. 4 필터 페이퍼를 이용하여 여과하고, EYELA N-1200A (EYELA, Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 60℃에서 진공 증발시켜 농축하였으며, 동결 건조시켜 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 수율은 17.6%였다. 이하, 본 발명의 황련, 황금, 황백 및

치자의 추출물을 'SCPG'로 명명하였다.

[0043] **실시예 2. 다발성경화증 동물모델(EAE) 유도**

[0044] **(1) 다발성경화증 동물모델(EAE) 유도**

[0045] 수초 희소돌기아교세포 당단백질(MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein)의 펩타이드를 사용하여 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) 동물 모델을 유도하였다. 구체적으로, 출생 후 8주령의 암컷 C57BL/6 마우스((주)나라바이오텍, 대한민국)를 준비하여 일주일 동안 안정시켰다. 마우스에 MOG 펩타이드 35-55 (Sigma-Aldrich, 미국) 200 μg이 포함된 에멀전(emulsion)과 결핵균(mycobacterium tuberculosis; Difco, 미국) 400 μg이 포함된 complete Freund's adjuvant (CFA; Difco, 미국)를 혼합하여 에멀전을 만들고, 0.1 ml의 에멀전을 EAE군의 양쪽 허리부위의 피하로 주사하였고, 동시에 백일해독소(PTX, pertussis toxin; List Biologic, 미국) 200 ng을 복강으로 주사하였다. 48시간 후에 동일한 양의 백일해독소를 복강으로 다시 주사하였다.

[0046] MOG 펩타이드에 의해 유도된 EAE 동물모델의 임상 증상의 척도를 8가지로 구분하여 확인하였다. 즉, 반응이 없음(0 단계), 꼬리 끝이 처짐(1 단계), 꼬리 전체가 처짐(2 단계), 한쪽 뒷다리의 약한 마비(3 단계), 양쪽 뒷다리의 마비(4 단계), 한쪽 앞 다리까지 마비(5 단계), 앞쪽 양쪽 다리까지 마비(6 단계) 및 죽음(7 단계)으로 구분하였다.

[0048] **(2) 다발성경화증 동물모델을 이용한 실험의 실험군 분류**

[0049] 본 발명의 SCPG의 다발성경화증 동물모델에 대한 신경보호 효능을 확인하기 위해, 다음과 같은 실험군으로 구분하였다.

[0051] - Nor군 : MOG 펩타이드와 SCPG를 투여하지 않은 대조군

[0052] - EAE군 : MOG 펩타이드로 EAE를 유도한 군

[0053] - EAE + SCPG군 : MOG 펩타이드로 EAE를 유도하고 SCPG (300 및 600 mg/kg)를 구강으로 투여한 군

[0054] - SCPG군 : MOG 펩타이드로 EAE를 유도하지 않은 정상 마우스에 SCPG (600 mg/kg)를 구강으로 투여한 군

[0056] **(3) 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 투여**

[0057] 본 발명의 SCPG (300 및 600 mg/kg)를 EAE를 유도한 다음 임상증상이 나타나기 시작하는 시점(7-8일째)부터 30일째까지 매일 1회씩 구강으로 투여하였다(onset treatment, 온셋투여). SCPG를 생리식염수에 희석하였으며 개체 당 투여량이 100 ㎕가 되도록 하였다.

[0059] **실시예 3. 다발성경화증 동물모델(EAE)에서 행동학적인 검사를 통한 SESCS의 신경보호 효과**

[0060] 도 1은 EAE(실험적 자가 면역성 뇌척수염, experimental autoimmune encephalomyelitis, 다발성경화증 동물모델)가 유도된 동물 모델에서 행동학적인 검사를 통한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 신경 보호 효과를 확인한 도이다.

[0061] 구체적으로, 도 1A는 날짜별 체중의 변화를 나타낸 도이고, 도 1B는 날짜별 행동학적인 변화를 나타낸 도이며, 도 1C는 도 1B의 그래프를 정량적으로 나타낸 도이다. (ANOVA test; ##p<0.01 versus 정상군; **p<0.01 versus EAE군)

[0062] 본 발명의 SCPG (300 및 600 mg/kg)를 EAE 유도 후, 임상증상이 나타나기 시작하는 시점(7-8일째)부터 30일째까지, 매일 1회씩 구강으로 투여하며, 매일 상기의 임상 증상의 척도를 사용하여 행동학적인 변화에 대한 SCPG의 효능을 확인하였다. EAE군의 행동학적인 증상은 EAE 유도 후, 7일째에서 8일째 사이에 나타나기 시작하여 14일째에서 16일째 사이에 최고조(4.3 ± 0.2)에 도달하였으며, 그 이후에도 지속되었다. EAE 유도 후 8일째부터 30

일째까지의 스코어의 합은 80.0 ± 5.6이었다. 그러나 EAE + SCPG군에서의 행동학적인 증상은 EAE군에 비하여 감소하는 경향이었으며, 모든 EAE + SCPG군에서는 유의한 감소를 보였다. EAE 유도 후 8일째부터 30일째까지의 스코어의 합은 SCPG 300 mg/kg 투여군에서 56.7 ± 8.0이었고, 600 mg/kg 투여군에서 41.5 ± 5.7이었다.

[0064] **실시예 4. 조직병리학적 분석**

[0065] **(1) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SCPG의 탈수초화 및 염증세포의 침윤 억제 효과 확인**

[0066] SCPG (600 mg/kg)를 EAE를 유도한 후에 온셋투여(유도 후 7-8일)로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 16일 사이에 마우스를 에틸에테르(ethyl ether)로 흡입마취하고, 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)를 심장으로 관류하여 고정하고, 허리부위의 척수(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였다. 적출한 척수는 4% PFA에 담가 4℃에서 하루 정도 더 고정시킨 다음에, 30% 수크로스(sucrose)로 바꾸어 4℃에서 3일 이상 기간 동안 보관하여 동결손상을 방지하였다. SCPG의 EAE 동물모델에서의 탈수초화(demyelination) 현상의 억제 효과를 확인하기 위하여 수초(myelin)의 주성분인 인지질을 염색하는 룩솔 페스트 블루(luxol fast blue; LFB) 염색을 통해 탈수초화 정도를 비교하고, H&E (hematoxyline and eosin) 염색을 통해 면역세포의 침윤 정도를 비교하였다. 염색을 하기 위해서 동결절편기를 이용하여 척수를 10 ㎛ 두께로 잘라 유리슬라이드에 붙여서 건조시키고, phosphate buffered saline (PBS)에 5분간 담근 후 95% 에탄올에 5분 동안 담갔다. 그 후 95% 에탄올에 녹아있는 0.1% 룩솔 페스트 블루 용액에 조직을 담가 56℃에서 14시간 동안 방치한 다음 0.5% 리튬 카보네이트(lithium carbonate) 용액과 70% 에탄올 및 증류수에 순서대로 각각 30초씩 담그는 과정을 5-6회 반복하여 색을 조절한 뒤 95%와 100% 에탄올에 각각 5분씩 담가 탈수한 후 자일렌(xylene)에 담근 뒤 커버 그라스를 덮었다. 척수 바깥 부분의 백질(white matter)에는 축삭(axon)이 존재하기 때문에 정상 조직을 염색한 경우에는 척수 백질이 진한 파란색으로 나타나지만, 탈수초화 현상으로 인하여 수초가 소실되게 되면 듬성듬성 염색이 되며 흐린 파란색을 띤다. 또한, 염증 세포(inflammatory cells)의 침윤(infiltration) 정도를 확인하기 위하여 H&E 염색을 수행하였다. 구체적으로, 상기와 동일한 방법으로 준비한 척수조직 슬라이드를 헤마톡실린(hematoxylne) 용액에서 3분간 염색하고, 증류수로 1분씩 세 번 세척하였다. 연속하여, 에오진(eosin) 용액에서 10분간 염색하고 증류수로 1분씩 세 번 세척하였으며, 70%, 90%, 95%, 100% 에탄올에서 순서대로 2분간 탈수한 후 자일렌(xylene)에 담근 뒤 커버 그라스를 덮었다.

[0068] LFB 염색 후 탈수초의 수준을 다음과 같은 기준으로 평가하였다.

[0069] 0, 탈수초화 없음

[0070] 1, 백질의 25% 미만을 수반하는 탈수초화

[0071] 2, 백질의 50% 미만을 수반하는 탈수초화

[0072] 3, 백질의 50% 이상을 수반하는 탈수초화.

[0074] H&E 염색 후 면역 세포의 이동(recruitment) 및 침윤(infiltration) 정도는 다음 기준에 따라 점수를 매겼다.

[0075] 0, 병변 없음

[0076] 1, 뇌척수막(meninges)으로 면역세포 이동/침윤

[0077] 2, 척수 실질(parenchyma)로 면역세포의 표재성 침윤(superficial infiltrates)

[0078] 3, 백질에 중간 정도의 침윤(25% 미만)

[0079] 4, 백질에 심각한 정도의 침윤(50% 미만)

[0080] 5, 백질에 더 심각한 정도의 침윤(50% 이상)

[0082] **(2) 면역조직화학염색법**

[0083] SCPG (600 mg/kg)을 EAE를 유도한 후에 온셋투여(유도 후 7-8일)로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14

일 내지 16일 사이에 마우스를 마취하고, 상기 조직병리학적 분석과 동일한 방법으로 동결 절편을 제작하였다. 염색 방법은 절편을 블로킹 솔루션[200 ㎍ 소혈청알부민(BSA, bovin serum albumin, sigma, 미국), 500 ㎕ FBS (fetal bovine serum, Gibco, 독일), 500 ㎕ NGS (normal goat serum, Vector Laboratories, 미국) 및 10 ㎕ Triton X-100 (Sigma-Aldrich, 미국)을 PBS에 넣어 10 ml을 만듦]을 넣은 플레이트에 담가 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 수세한 후 1차 항체[Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1, 미세아교세포의 마커), CD68 (대식세포의 마커) 및 GFAP (glial fibrillary acidic protein, 별아교세포의 마커)]를 블로킹 솔루션에 희석한 용액으로 교체하고 12시간 이상 반응시켰다. PBS로 수세한 후 2차 항체를 PBS에 1:200으로 희석한 용액으로 교체하고 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 아비딘-바이오틴화 겨자무과산화효소(avidin-biotin horseradish peroxidase)-복합체 (1:200; Vector Laboratories) 및 3,3'-diamino-benzidine를 이용하여 단백질의 발현을 확인하였다.

[0085] **(3) 웨스턴블롯 분석**

[0086] MOG 펩타이드로 유도한 동물 모델에서 탈수초화, 신경아교세포의 활성화, 염증성사이토카인의 분비 및 염증기작의 활성화에 대해 SCPG의 억제 효과를 확인하기 위해 다양한 마커들의 발현을 웨스턴블롯 분석을 이용하여 확인하였다. EAE를 유도한 후에 SCPG (600 mg/kg)를 온셋투여로 구강투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 16일 사이에 마우스를 마취하여 안락사시킨 뒤 허리부위의 척수(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였고, 이를 단백질 용해 완충액(protein lysis buffer; 10 mM 트리스, 0.5 mM EDTA, 0.25 M 수크로스) 200 μl를 넣고, 분쇄기를 이용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 소혈청알부민(BSA, bovine serum albumin, sigma, 미국)을 사용한 Bradford (Bio-rad, 미국) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤 단백질 25 ㎍은 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF 멤브레인(polyvinylidene difluoride membrane, Gendepot, 영국)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% 탈지유(skimmed milk, BD, 미국)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBST (mixture of Tris-Buffered Saline and Tween 20)로 씻은 후 1차 항체[myelin basic protein (MBP; 수초의 마커), CD11b(단핵구 마커), glial fibrillary acidic protein (GFAP; 별아교세포 마커), platelet and endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1 (혈액뇌장벽의 마커), fibronectin (혈액뇌장벽의 마커), phospho-nuclear factor kappa B (p-NF-kB), phospho-I-kappa-B (p-IkB), phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK), phospho-c-Jun N-terminal kinase (p-JNK), phospho-p38 (p-p38) 및 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)]를 3% 탈지유에 1:1,000배로 희석하여 4℃에서 하루 동안 반응시킨 후 TBST로 10분씩 3회 씻고, 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBST에 씻은 뒤 ECL system (Santacruz, 미국)으로 밴드를 확인하였다. 단백질의 확인 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad)를 이용하였다.

[0088] **(4) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction)**

[0089] MOG 펩타이드로 유도한 EAE 동물모델에서 염증성사이토카인의 분비 및 염증기작의 활성화에 대한 SCPG의 억제 효과를 확인하기 위하여 실시간 PCR 분석을 이용하여 mRNA 발현을 확인하였다. SCPG (600 mg/kg)를 EAE를 유도한 후에 온셋투여로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 16일 사이에 마우스를 마취하여 안락사한 뒤 허리부위의 척수(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였다. 척수조직에 트리졸(Trizol, Invitrogen, 미국) 1 ml을 넣고 분쇄기로 갈고, 원심분리하여 RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위해 0.5 μg의 Oligo dT, 0.5 mM dNTP mix, 5x first-strand buffer, RNase out, 5 mM dithiothreitol (DTT), 및 M-MLV 역전사효소를 포함하는 반응혼합물(reaction mixture) 중에서 1 μg의 총 RNA를 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. RT-PCR 분석은 RT-PCR kit의 제조사의 메뉴얼에 따라 수행되었다(Roche, Germany). PCR용 프라이머의 염기서열은 아래의 표 1과 같다. PCR 증폭을 위해, 특정 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍은 6 μl of PCR Master Mix (Lucigen, WI, USA) 중에서 1 μl의 cDNA 및 0.6 U의 Econo TaqDNA 중합효소를 반응시켰다. 결과물의 5-7 μl를 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 트랜스일루미네이터(transilluminator)에서 브롬화 에티듐(ethidium bromide)으로 염색한 후에 확인하였다. 각 유전자의 발현 수준은 GAPDH 로 표준화하였다.

[0090] [표 1]

타겟 유전자	프라이머			
	명칭	서열	방향	서열번호
CD11b	CD11b_F	TGC TTA CCT GGG TTA TGC TTC TG	정방향	서열번호 : 1
	CD11b_R	CCG AGG TGC TCC TAA AAC CA	역방향	서열번호 : 2
CD3	CD3_F	CTC TGG GCT TGC TGA TGG	정방향	서열번호 : 3
	CD3_R	GGT TGG GAA CAG GTG GTG	역방향	서열번호 : 4
COX-2	COX-2_F	CAG TAT CAG AAC CGC ATT GCC	정방향	서열번호 : 5
	COX-2_R	GAG CAA GTC CGT GTT CAA GGA	역방향	서열번호 : 6
GAPDH	GAPDH_F	AGG TCA TCC CAG AGC TGA ACG	정방향	서열번호 : 7
	GAPDH_R	CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA T	역방향	서열번호 : 8
GFAP	GFAP_F	CGA GTC CCT AGA GCG GCA AAT G	정방향	서열번호 : 9
	GFAP_R	CGG ATCT GGA GGT TGG AGA AAG TC	역방향	서열번호 : 10
ICAM-1	ICAM1_F	TGC GTT TTG GAG CTA GCG GAC CA	정방향	서열번호 : 11
	ICAM1_R	CGA GGA CCA TAC AGC ACG TGC AG	역방향	서열번호 : 12
IFN-γ	IFN-γ_F	ACA ATG AAC GCT ACA CAC TGC AT	정방향	서열번호 : 13
	IFN-γ_R	TGG CAG TAA CAG CCA GAA ACA	역방향	서열번호 : 14
IL-1β	IL1b_F	TTG TGG CTG TGG AGA AGC TGT	정방향	서열번호 : 15
	IL1b_R	AAC GTC ACA CAC CAG CAG GTT	역방향	서열번호 : 16
IL-17	IL-17_F	GTG TCT CTG ATG CTG TTG	정방향	서열번호 : 17
	IL-17_R	AAC GGT TGA GGT AGT CTG	역방향	서열번호 : 18
IL-4	IL-4_F	CGA AGA ACA CCA CAG AGA GTG AGC T	정방향	서열번호 : 19
	IL-4_R	GAC TCA TTC ATG GTG CAG CTT ATC G	역방향	서열번호 : 20
IL-6	IL6_F	TCC ATC CAG TTG CCT TCT TGG	정방향	서열번호 : 21
	IL6_R	CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G	역방향	서열번호 : 22
iNOS	iNOS_F	GGC AAA CCC AAG GTC TAC GTT	정방향	서열번호 : 23
	iNOS_R	TCG CTC AAG TTC AGC TTG GT	역방향	서열번호 : 24
MCP-1	MCP-1_F	CTT CTG GGC CTG CTG TTC A	정방향	서열번호 : 25
	MCP-1_R	CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA	역방향	서열번호 : 26
MIP-1α	MIP-1α_F	CAG CCA GGT GTC ATT TTC CT	정방향	서열번호 : 27
	MIP-1α_R	AGG CAT TCA GTT CCA GGT CA	역방향	서열번호 : 28
RANTES	RANTES_F	ACA CCA CTC CCT GCT GCT TT	정방향	서열번호 : 29
	RANTES_R	GAC TGC AAG ATT GGA GCA CTT G	역방향	서열번호 : 30
TNF-α	TNFa_F	AGC AAA CCA CCA AGT GGA GGA	정방향	서열번호 : 31
	TNFa_R	GCT GGC ACC ACT AGT TGG TTG T	역방향	서열번호 : 32
VCAM-1	VCAM-1_F	CCT CAC TTG CAG CAC TAC GGG CT	정방향	서열번호 : 33
	VCAM-1_R	TTT TCC AAT ATC CTC AAT GAC GGG	역방향	서열번호 : 34

[0091]

[0092] **(5) 유세포 분석(flow cytometry analysis)**

[0093] EAE를 유도한 후에 SCPG (600 ㎎/㎏)를 온셋투여로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 16일 사이에 마우스를 마취하여 안락사시킨 뒤 허리부위의 척수(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였다. 구체적으로, 전체 조직으로부터 정제된 단일 세포 현탁액을 제조한 후(300g에서 5 분간 원심 분리) 2% PFA로 고정시키고, 세포를 2% FBS를 함유하는 PBS로 세척하고, 마우스 항-마우스 CD32 (BD Bioscience)로 10분간 처리하여 Fc 수용체를 차단하고 2% FBS 세척 완충액으로 2 회 세척하였다. 형광 표식을 이용한 면역 마커의 세포 표면 염색을 위해 세포를 APC 항-마우스 CD4 (RM4-5, BD Biosciences), PE 항-마우스 CD8a (53-6.7, BD Biosciences), APC 항-마우스/인간 CD11b (M1/70; Biolegend), 및 PE 항-마우스 CD45 (30-F11; BD Biosciences)과 함께 30분간 4℃에서 반응시켰다. 염색되지 않은 세포를 음성대조군으로 사용하였다. 세포 내 세포 염색을 위해, 세포는 PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate, Sigma), ionomycin (Sigma), 및 Golgistop (protein transport inhibitor, BD Biosciences)으로 5시간 동안 재자극(restimulated)시켰다. 자극 후, 세포는 PerC3 anti-mouse CD4 (RM4-5, BD Biosciences), FITC anti-mouse IFN-γ (BD Biosciences), PE anti-mouse IL-17A (TC11-18H10, BD Biosciences), PE anti-mouse IL-4 (11B11; Biolegend), PE anti-mouse CD25 (BD Biosciences) 및 APC anti-mouse/rat forkhead box P3 (Foxp3) (FJK-16s; eBioscience)으로 4℃에서 30분간 형광염색하였다. 염색된 세포는 2% FBS 완충액으로 2회 세척하여 유세포 분석을 위해 사용하였다. 데이터는 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences)로 수집하였고 CellQuest Pro software (BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다. $CD4^+$ T 세포는 Th1, Th2, Th17, and Treg 세포 분포을 분석하기 위해 사용되었다. 동시 분석을 위한 한 세포의 세 컬러의 염색 및 세포 내 사이토카인의 결과는 $CD4^+$ 세포 분포 내 백분율로 나타내었다.

[0095] **(6) 통계처리**

[0096] 모든 결과는 SPSS 21.0 package (SPSS Inc, Chicago, USA)을 이용하여 분석하였으며, 실험결과는 mean±standard deviation(평균±표준편차) 값으로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 ANOVA(일원배치 분산분석)를 이용하여 분석 후 Tukey post hoc로 사후분석하였고, 유의확률값(p-value) 은 $p<0.05$ 및 $p<0.01$ 미만인 경우에만 인정하였다.

[0098] **실시예 4. 조직병리학적 분석결과**

[0099] **(1) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SCPG의 탈수초화 및 염증세포의 침윤 억제 효과**

[0100] SCPG의 탈수초화 현상의 억제 효과를 확인하기 위하여, EAE를 유도한 후, 14-16일째에 척수의 조직절편을 제작하여, 수초의 주성분인 인지질을 염색하는 룩솔 페스트 블루(LFB) 염색을 시행하였고, 면역세포의 침윤 정도를 비교하기 위하여 H&E염색을 시행하였다.

[0101] 도 2는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 도 2A 내지 도 2D는 LFB염색 결과, 도 2E 내지 도 2H는 H&E염색 결과를 통하여 탈수초화와 면역세포의 침윤 정도를 확인한 도이다.

[0102] 구체적으로 도 2A와 도 2E는 정상군을 도 2B와 도 2F는 EAE군, 도 2 C와 도 2G는 EAE + SCPG (600 mg/kg)군, 도 2D와 도 2H는 SCPG (600 mg/kg)군을 나타낸 도이고, 도 2I는 탈수초화 정도의 정량적 결과를 나타낸 도이며, 도 2J는 면역세포의 침윤 정도의 정량적 결과를 나타낸 도이고, 도 2K는 수초 마커(MBP)의 웨스턴블롯 분석의 결과를 나타낸 도이며, 도 2L는 도 2K를 정량적으로 나타낸 도이다. (Bar = 100 μm. ANOVA test; #p<0.05와 ##p<0.01 versus 정상군; *p<0.05와 **p<0.01 versus EAE군.)

[0103] 상기 도 2의 결과를 보면, EAE군은 정상군에 비하여 탈수초화와 면역세포의 침윤 정도가 증가되었으며, SCPG 투여군은 EAE군에 비하여 탈수초화 정도와 염증세포의 침윤 정도가 감소된 것을 확인할 수 있다.

[0105] **(2) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SCPG의 미세아교세포 활성화 및 말초성 대식세포의 이동/침윤 억제 효과**

[0106] SCPG의 미세아교세포의 활성화 억제 효과를 확인하기 위하여, EAE를 유도한 후, 14-16일째에 척수를 채취하여, CD11b에 대한 분자학적 검사(웨스턴블롯과 RT-PCR 분석)와 Iba-1과 CD68에 대한 면역염색을 수행하였다. 또한, 단핵구 세포(내재성 미세아교세포 및 말초성 대식세포)의 비율을 각각 알아보기 위해 CD11b와 CD45에 대한 유세포 분석을 실시하였다.

[0107] 도 3은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 내재성 미세아교세포 (resident microglia) 및 말초성 큰포식세포(peripheral macrophages)의 이동/침윤에 대한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 보호효과를 확인한 도이다.

[0108] 구체적으로 도 3A 및 도 3C는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 CD11b의 RT-PCR 분석결과를 나타낸 도이고, 도 3B 및 도 3D는 CD11b의 웨스턴블롯 분석 결과를 나타낸 도이며, 도 3E 내지 도 3H는 Iba-1 단백질의, 도 3I 내지 도 3L은 CD68의 면역조직화학적 염색 결과를 나타낸 도이며, 도 3M 및 도 3N은 CD11b와 CD45의 유세포 분석을 시행하여 미세아교세포 활성도와 말초성 대식세포의 이동/침윤을 검사하고 정량화를 한 결과를 나타낸 도이다. (Bar = 100 μm. C와 D는 A와 B의 정량적인 결과. ANOVA test; ##p<0.01 versus 정상군; *p<0.05와 **p<0.01 versus EAE군.)

[0109] 도 3을 보면, 그 결과, 척수에서 CD11b의 mRNA와 단백질의 발현은 EAE군에서 증가되었나, EAE + SCPG군에서는 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한, 활성화된 Iba-1(+) 미세아교세포와 말초에서 중추로 침윤된 대식세포가 EAE군에서 증가되었으나, EAE + SCPG군에서는 감소된 것을 확인할 수 있다.

[0111] **(3) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SCPG의 염증매개인자의 발현 억제 효과**

[0112] SCPG의 염증매개인자의 발현을 억제하는 기능을 확인하기 위하여 EAE를 유도한 후, 14-16일째에 척수를 채취하여, 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석을 하였다.

[0113] 도 4는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 RT-PCR 분석을 시행하여 염증매개인자의 활성도를 검사하고 정량화를 한 결과를 나타낸 도이다.

[0114] 구체적으로, 도 4A는 MCP-1, 도 4B는 MIP-1α, 도 4C는 RANTES, 도 4D는 IL-1β, 도 4E는 IL-6, 도 4F는 TNF-α, 도 4G는 COX-2, 도 4H는 iNOS의 염증매개인자의 활성도에 대한 정량화를 나타낸 도이다. (ANOVA test; #p < 0.05와 ##p<0.01 versus 정상군; *p<0.05와 **p<0.01 versus EAE군.)

[0115] 도 4에 나타낸 바와 같이, 대표적인 케모카인(MCP-1, MCP-1α 및 RANTES), 전염증성 사이토카인(IL-1β, IL-6

및 TNF-α), COX-2 및 iNOS에 대한 mRNA 발현이 EAE군에서 증가되었나, EAE + SCPG군에서는 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0117] **(4) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SCPG의 혈액뇌장벽 투과성 억제 효과**

[0118] EAE 동물 모델의 척수에서 SCPG의 혈액뇌장벽 투과성 조절효과를 검증하였다. 대표적인 혈액뇌장벽의 마커인 PECAM-1과 fibronectin의 단백질 발현 정도를 확인한 결과를 도 5에 나타내었다.

[0119] 도 5는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 혈액뇌장벽의 변화에 대한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 효과를 확인한 도이다.

[0120] 도 5A는 혈관뇌장벽의 마커인 PECAM-1(platelet-endothelial celladhesion molecule-1; 혈소판-내피세포 결합 단백질-1) 및 피브로넥틴(fibronectin)에 대한 웨스턴블롯의 분석 결과를 나타낸 도이고, 도 5B 및 도 5C는 각 PECAM-1 및 피브로넥틴의 웨스턴 블롯을 정량화한 결과를 나타낸 도이다.

[0121] 또한 도 5D는 별아교세포의 마커인 GFAP (glial fibrillary acidic protein; 신경교섬유질산성단백질) 및 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)에 대한 RT-PCR 분석을 나타낸 도이고, 도 5E는 GFAP 및 GAPDH에 대한 웨스턴 블롯의 분석 결과를 나타낸 도이며, 도 5F는 상기 도 5D를 정량화한 결과를 나타낸 도이고, 도 5G는 상기 도 5E를 정량화한 결과를 나타낸 도이다.

[0122] 도 5H 내지 도 5K는 신경교섬유산성단백질(glial fibrillary acidic protein; GFAP)의 면역조직화학적 염색 결과를 나타낸 도이다.

[0123] 도 5L은 세포부착분자(ICAM-1, VCAM-1)의 mRNA나 단백질 발현의 정도를 검사하기 위하여, ICAM-1 및 VCAM-1의 RT-PCR 분석을 나타낸 도이고, 도 5M은 ICAM-1의 RT-PCR 분석을 정량화한 결과를 나타낸 도이며, 도 5N은 VCAM-1의 RT-PCR 분석을 정량화한 결과를 나타낸 도이다. (ANOVA test; #p < 0.05와 ##p<0.01 versus 정상군; *p<0.05와 **p<0.01 versus EAE군.)

[0124] 도 5의 결과를 보면, 혈액뇌장벽 마커인 두 단백질의 발현(PECAM-1, fibronectin)은 EAE군에서 증가되었으나, EAE + SCPG군에서는 감소되었다(도 5A-5C). 혈액뇌장벽의 주요 구성성분의 하나인 GFAP의 발현을 확인한 결과, GFAP의 mRNA와 단백질 발현 정도와 GFAP 면역양성 별아교세포의 활성화의 정도는 EAE군에서 증가하였으나, EAE + SCPG군에서 감소하였다(도 5D-5K). 또한, 세포접착물질(ICAM-1과 VCAM-1)에 대한 mRNA의 발현 정도도 EAE군에서 증가하였으나, EAE + SCPG군에서 감소하였다(도 5L-5N).

[0126] **(5) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SCPG의 T 세포 분화 및 침윤 억제 효과**

[0127] SCPG의 T 세포의 분화/침윤에 대한 조절 효과를 확인하기 위하여 EAE를 유도한 후, 14-16일째에 척수를 채취하여, T세포의 마커인 CD3에 대한 프라이머를 사용하여 RT-PCR 분석을 수행하고, 유세포 분석과 실시간 PCR 분석을 통해 도움 T (Th; $CD4^+$) 및 세포 독성 T ($CD8^+$) 세포의 분포를 분석한 결과를 도 6에 나타내었다.

[0128] 도 6은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 T 세포의 활성도에 대한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 효과를 확인한 도이다.

[0129] 도 6A는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 RT-PCR 분석결과를 나타낸 도이고, 도 6B 내지 도 6I는 유세포 분석을 나타낸 도이며, 도 6J 내지 도 6M은 실시간 PCR 시행하여 T 세포의 활성도를 조사하고 정량화한 결과를 나타낸 도이다. (CD3, T 세포의 마커; INF-r, Th1 세포의 분비물; IL-4, Th2 세포의 분비물; IL-17, Th17 세포의 분비물; CD25와 Foxp3, Treg 세포의 마커.)

[0130] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, CD3의 mRNA 발현은 EAE군의 척수에서 증가하였으나, EAE + SCPG군의 척수에서는 감소하였다(도 6A). 이어서, CD4 T 세포의 분포는 EAE군의 척수에서 증가하였으나, EAE + SCPG군의 척수에서는 감소하였다(도 6B와 6C). 또한, $CD4^+$/IFN-r^+ (Th1 세포)와 $CD4^+$/IL-17^+(Th17 세포)의 분포와 mRNA 발현도 EAE군의 척수에서 증가하였으나, EAE + SCPG군의 척수에서는 감소하였다(도 6D, 6I, 6J 및 6K). 억제(suppressor) T 세포로 알려진 $CD4^+$/$CD25^+$/$Foxp3^+$ T 세포의 분포은 EAE 실험군의 척수에서 증가하였고 EAE + SCPG 처리군에서 유의하게 더욱 증가하였다(도 6H, 6I 및 6M). 그러나 $CD4^+$/IL-4^+(Th2 세포)의 분포와 mRNA 발

현은 EAE 유도와 SCPG 투여에 의하여 유의한 영향을 받지 않음을 확인할 수 있었다(도 6F, 6G 및 6L). (ANOVA test; #p < 0.05와 ##p < 0.01 versus 정상군; *p<0.05와 **p<0.01 versus EAE군.)

[0132] **(6) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SCPG의 MAPKs와 NF-kB 신호기전 억제 효과**

[0133] EAE 동물모델의 척수에서 SCPG가 염증반응을 억제하는지를 확인하기 위하여, EAE를 유도한 후, 14-16일째에 척수를 채취하고, 웨스턴 블롯 분석을 시행하여 MAPKs와 NF-kB 신호기전의 활성화 정도를 검증한 결과를 도7에 나타내었다.

[0134] 도 7은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 MAPKs와 NF-kB 신호기전의 활성화에 대한 본 발명의 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물(SCPG)의 효과를 확인한 도이다.

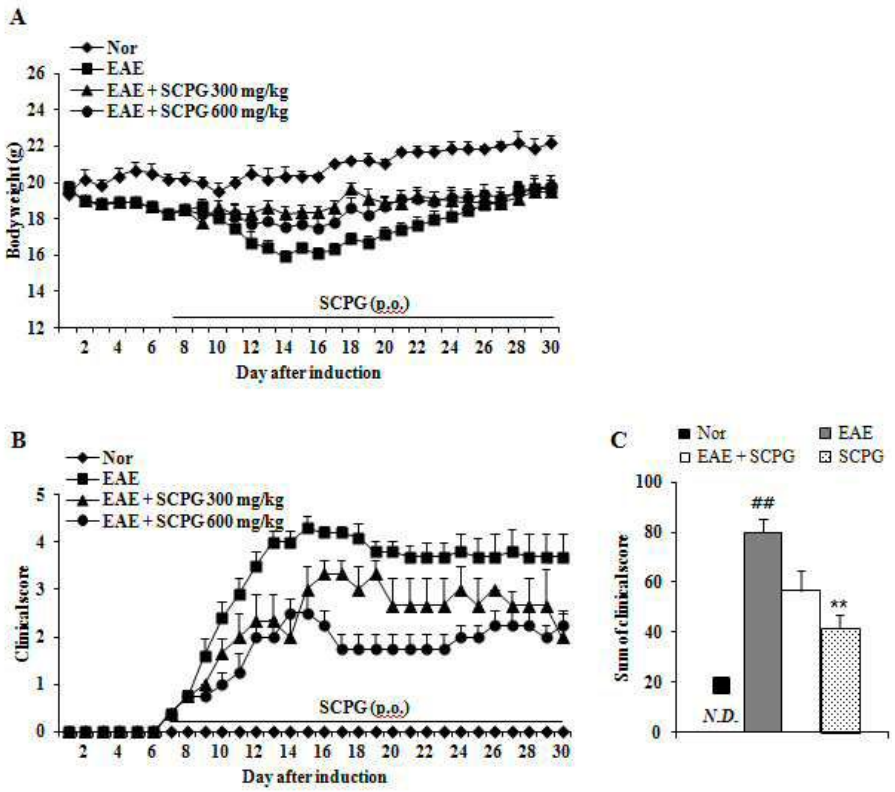
[0135] 도 7A 내지 도 7C는 각각 MAPKs 신호기전인 p-ERK, p-JNK 및 p-p38에 대한 웨스턴블롯의 분석 결과를 나타낸 도이고, 도 7D 내지 도 7E는각각 NF-kB 신호기전인 p-NF-kB와 p-IkB에 대한 웨스턴블롯의 분석 결과를 나타낸 도이다. (ANOVA test; #p < 0.05 versus 정상군; *p<0.05와 **p<0.01 versus EAE군.)

[0136] 그 결과 도 7에 나타낸 바와 같이, p-NF-kB, p-IkB, p-ERK, p-JNK 및 p-p38의 단백질 발현은 EAE군의 척수에서 증가하였으나, EAE + SCPG군의 척수에서는 감소하였는 것을 확인할 수 있었다.

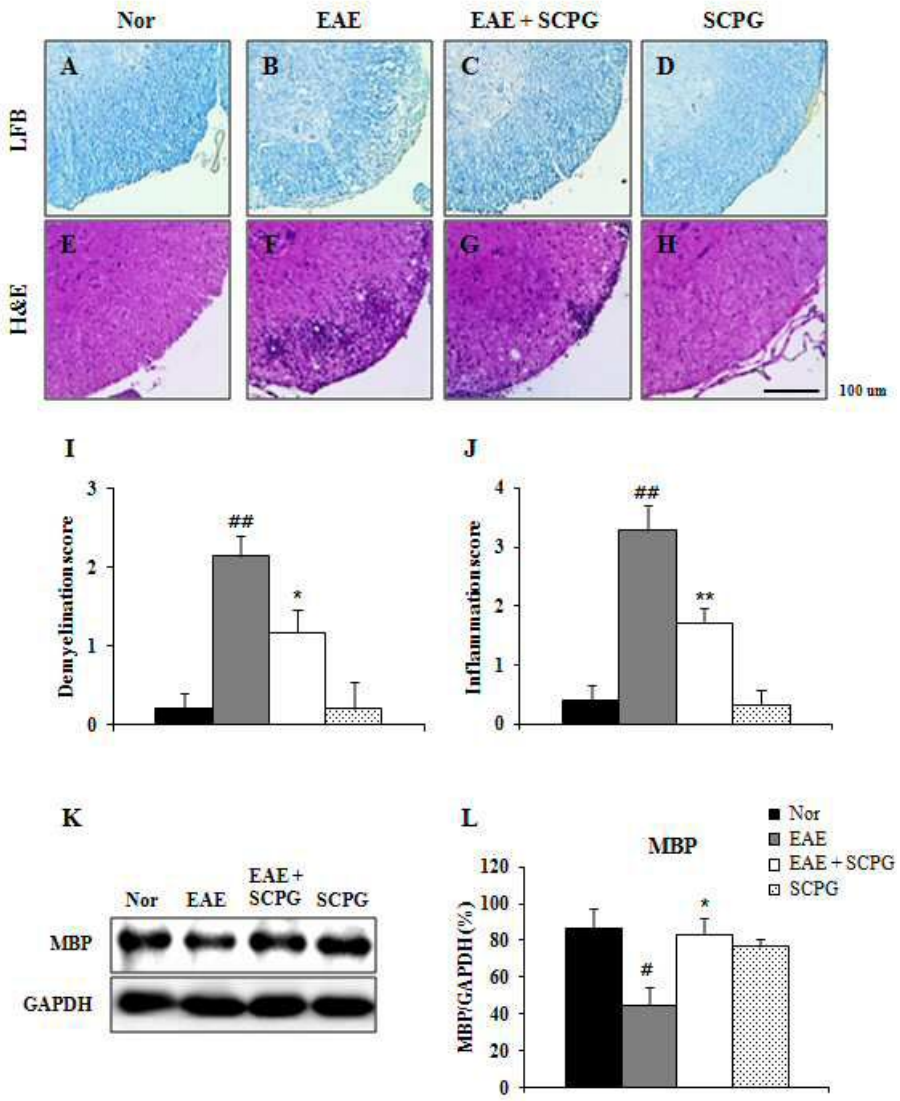
[0137] 상기 실시예들의 결과로 보아, 본 발명에 따른 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물은 다발성 경화증의 신경학적인 임상증상 척도를 개선하고, 척수의 탈수초화를 억제하며, 미세아교세포의 활성화를 억제하고, 혈액뇌장벽 투과성을 억제하며, 케모카인 및 염증성 사이토카인의 생성을 억제하고, COX-2 및 iNOS의 유전자 발현을 억제하고, MAPK 및 NF-KB의 신호 기전을 억제한다는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 황련, 황금, 황백 및 치자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 다발성 경화증의 발생을 예방하거나, 치료 또는 개선용의 약제학적 조성물 또는 건강기능식품으로 유용하다는 것을 확인할 수 있다.

도면

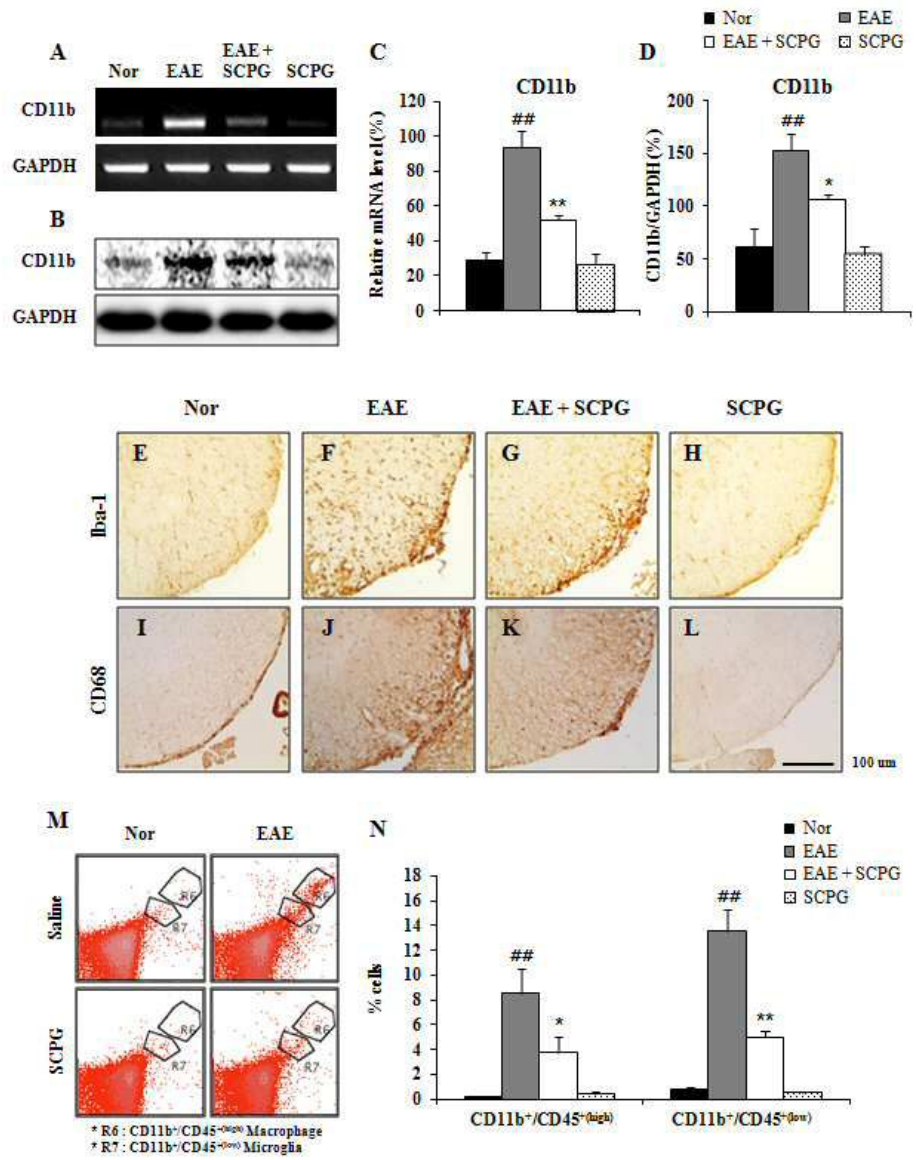
도면1



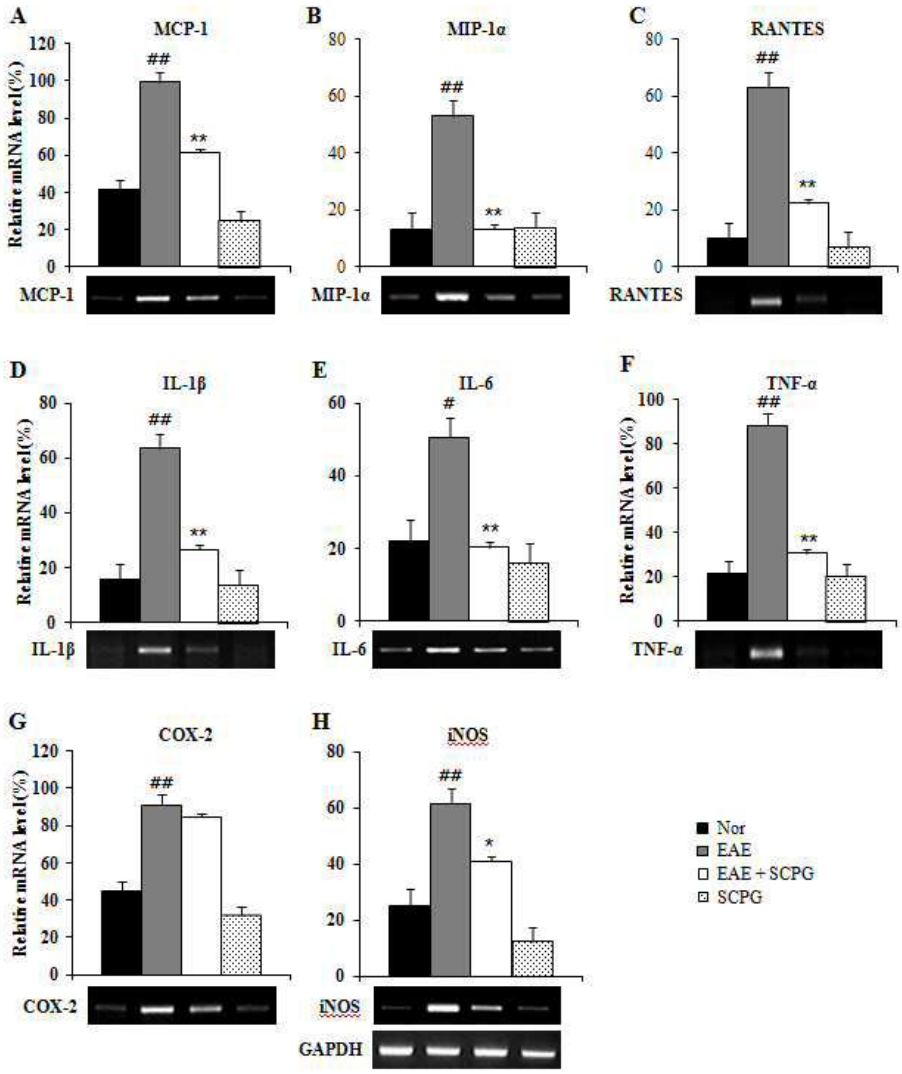
도면2


Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG
A
B
C
D
LFB
E
F
G
H
H&E
100 um
I
Demyelination score
##
*
J
Inflammation score
##
**
K
Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG
MBP
GAPDH
L
MBP
Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG
MBP/GAPDH (%)
#
*

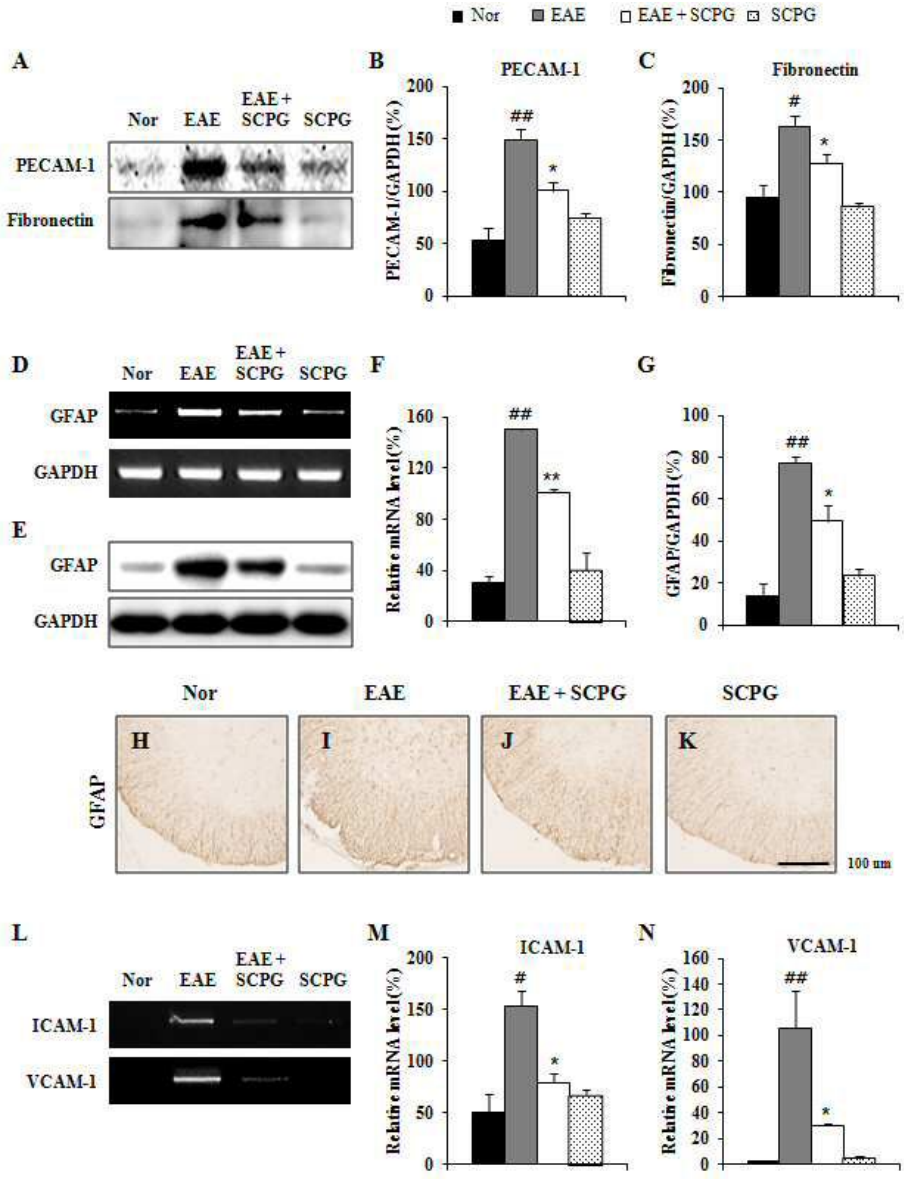
도면3


A
Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG
CD11b
GAPDH
B
CD11b
GAPDH
C
CD11b
Relative mRNA level(%)
##
**
D
Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG
CD11b
CD11b/GAPDH(%)
##
*
Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG
Iba-1
CD68
E
F
G
H
I
J
K
L
100 um
M
Nor
EAE
Saline
SCPG
R6
R7
* R6 : CD11b+/CD45-(high) Macrophage
* R7 : CD11b+/CD45-(low) Microglia
N
Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG
% cells
##
*
##
**
CD11b+/CD45+(high)
CD11b+/CD45+(low)

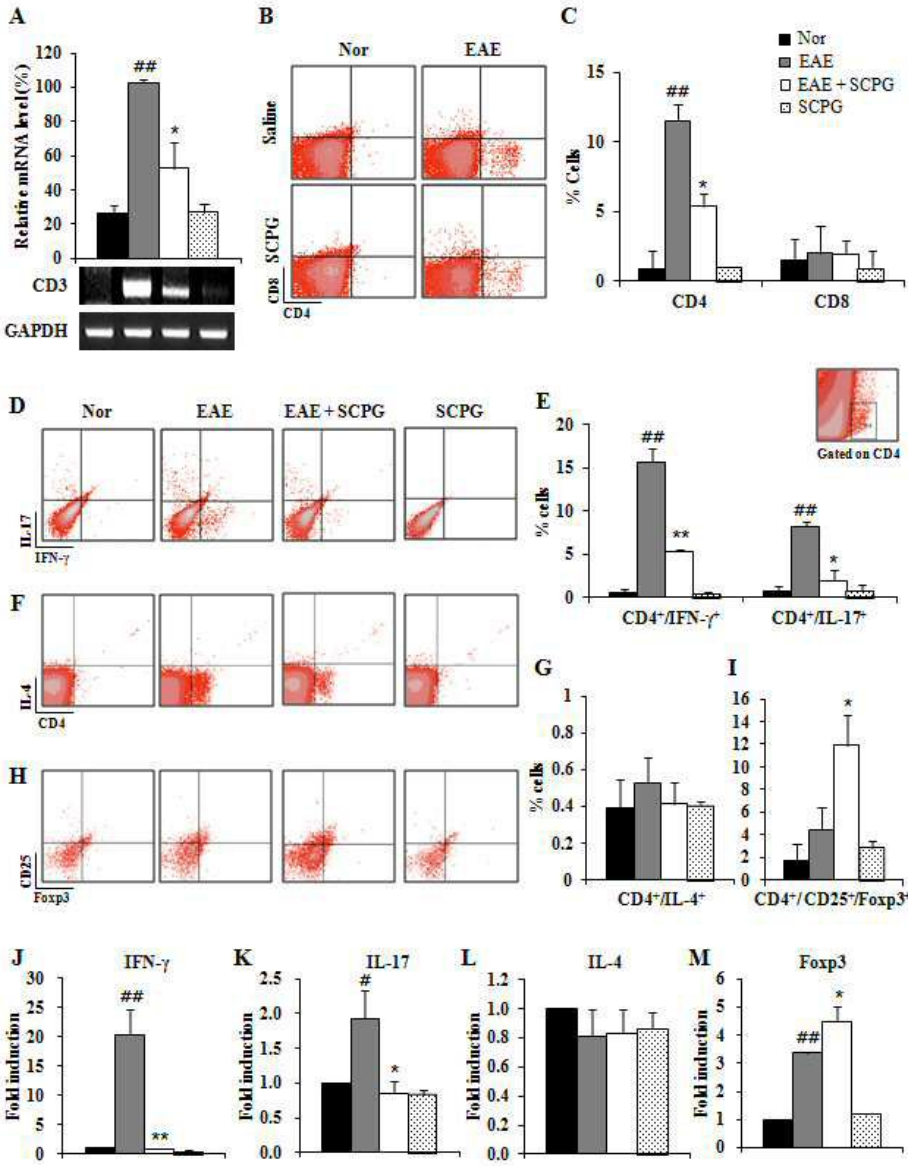
도면4


A
MCP-1
Relative mRNA level(%)
MCP-1
B
MIP-1α
MIP-1α
C
RANTES
RANTES
D
IL-1β
IL-1β
E
IL-6
IL-6
F
TNF-α
TNF-α
G
COX-2
COX-2
H
iNOS
iNOS
GAPDH
Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG

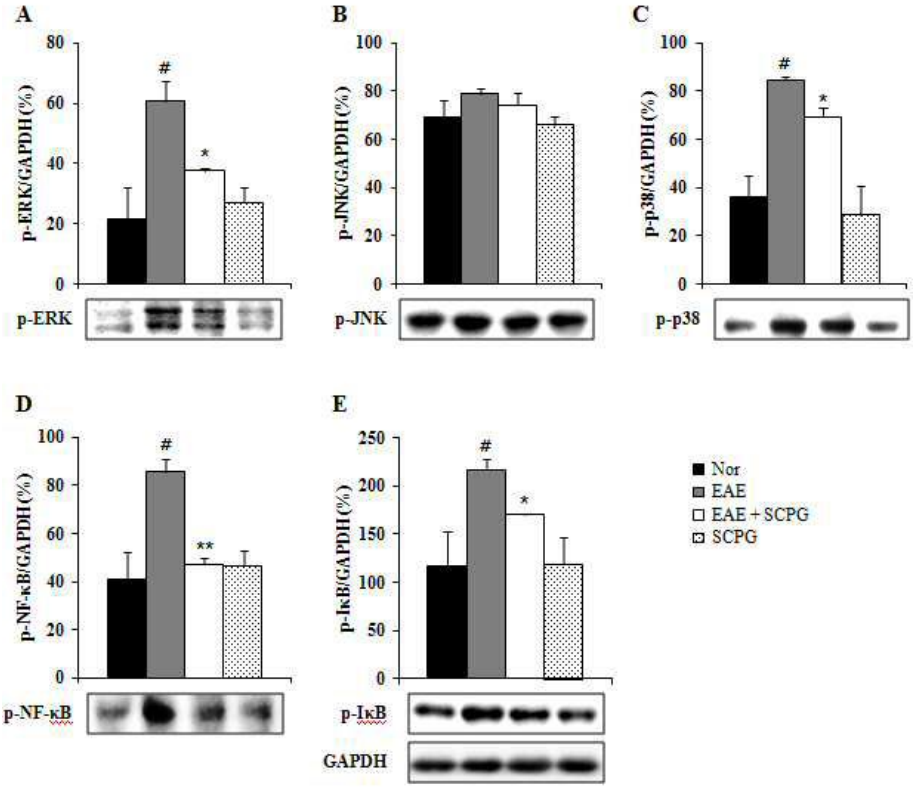
도면5


Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG
A
PECAM-1
Fibronectin
B
PECAM-1
PECAM-1/GAPDH (%)
C
Fibronectin
Fibronectin/GAPDH (%)
D
GFAP
GAPDH
E
F
Relative mRNA level (%)
G
GFAP/GAPDH (%)
H
I
J
K
100 um
L
ICAM-1
VCAM-1
M
N

도면6


A
Relative mRNA level(%)
CD3
GAPDH
B
Nor
EAE
Saline
SCPG
CD8
CD4
C
Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG
% Cells
CD4
CD8
D
Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG
IL-17
IFN-γ
E
Gated on CD4
% cells
CD4+/IFN-γ+
CD4+/IL-17+
F
IL-4
CD4
G
% cells
CD4+/IL-4+
I
CD4+/CD25+/Foxp3+
H
CD25
Foxp3
J
IFN-γ
Fold induction
K
IL-17
L
IL-4
M
Foxp3

도면7


A
p-ERK/GAPDH(%)
p-ERK
B
p-JNK/GAPDH(%)
p-JNK
C
p-p38/GAPDH(%)
p-p38
D
p-NF-κB/GAPDH(%)
p-NF-κB
E
p-IκB/GAPDH(%)
p-IκB
GAPDH
Nor
EAE
EAE + SCPG
SCPG