(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0089346
(43) 공개일자 2010년08월12일

(51) Int. Cl.
A61K 31/4525 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0008552
(22) 출원일자 2009년02월03일
심사청구일자 2009년02월03일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
유명철
서울특별시 동대문구 이문동 346-73
양형인
서울특별시 동대문구 이문동 311번지 삼성래미안 2차 104동 304호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

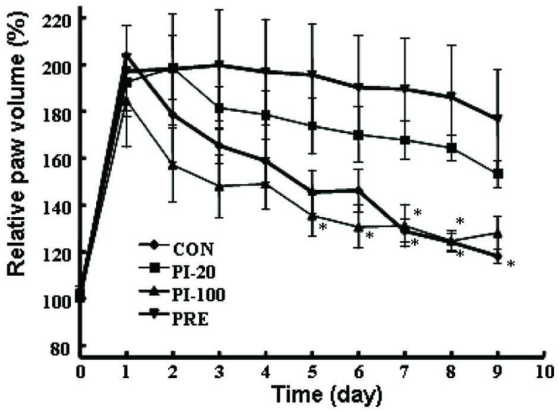
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 피페린 또는 이를 포함하는 식물 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 억제 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요 약

본 발명은 피페린 또는 이를 포함하는 식물 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 억제 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3b



(72) 발명자

김경수

서울특별시 강동구 암사2동 509번지 선사현대아파트 114동 2403호

방준수

서울특별시 강동구 천호4동 291-46 101호

최현미

서울특별시 강동구 암사2동 509번지 선사현대아파트 102동 1510호

오다희

서울특별시 강동구 명일2동 203번지 201호

함대현

경기도 용인시 수지구 상현동 성원쌍떼빌 3차 아파트 232동 904호

특허청구의 범위

청구항 1

피페린 또는 이를 포함하는 식물 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 억제 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 관절염은 류마티스성 관절염인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 인터루킨-6, 프로스타글란딘 E2, COX-2 (cyclooxygenase 2), MMP-1 (matrix metalloprotenase 1) 또는 MMP-13 (matrix metalloprotenase 13) 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

피페린 또는 이를 포함하는 식물 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 억제 또는 개선용 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피페린 또는 이를 포함하는 식물 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 억제 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 관절염은 크게 퇴행성관절염 (osteoarthritis)과 류마티스성관절염 (rheumatoid arthritis)으로 나눌 수 있다. 두 질병의 큰 차이점은 면역반응의 정도로 알 수 있다. 퇴행성 관절염은 나이가 들면서 무릎의 연골이 닳아 무릎의 뼈가 서로 부딪혀 심한 통증을 유발하는 것이다. 반면, 류마티스성 관절염은 자가면역질환의 하나로 면역세포의 비정상적인 활성화로 관절에 많은 면역세포들이 모여들어 염증 반응을 일으키고 관절을 파괴하는 질환이다. 따라서, 류마티스성관절염은 비정상적인 면역반응에 의한 것이므로 치료제로는 대개 염증 및 면역억제제가 사용되고 있다.

[0003] 염증이 생기는 이유와 과정을 살펴보면, 면역세포들이 외부에서 침입한 미생물이나 항원에 자극되어 방어 기전으로 사이토카인을 비롯한 염증매개성 물질을 분비하게 되고 이러한 물질은 주위의 다른 면역세포들 더욱 자극시켜 염증매개성 물질을 과량으로 분비하게 만든다. 이때 분비된 사이토카인들은 세포막에 있는 포스포리파아제 A2 (phospholipase A2, PLA2)라는 효소를 자극하여 세포막 지질로부터 아라키돈산 (arachidonic acid)이 생성하게 된다. 생성된 아라키돈산은 다시 싸이클로옥시게나아제(cyclooxygenase, 이하 "COX"로 약칭) 또는 리폭시게나아제(lipooxygenase)의 2 가지 경로를 거쳐 염증 매개체인 프로스타글란딘류, 류코트리엔류(leukotrienes)로 대사되어 더욱더 다양한 염증 반응을 매개한다. COX 경로에 의해 형성된 다양한 사이토카인 및 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, PGE2) 등이 부종 형성과 혈관 확장에 관여하여 염증과 통증의 원인이 된다고 알려져 있다.

[0004] 상기의 염증반응을 완화시키기 위한 여러 형태의 화학물질들을 총칭하여 항염증작용약물이라 분류되며, 이들 약물은 염증세포들의 생성과 삼출을 억제할 수 있는 약재와 중간 매개물질의 분비를 감소시킨다. 현재 염증에 사용되는 약물은 진통효과를 함께 나타내는 비스테로이드성 약물과 스테로이드성 약물로 나눌 수 있는데, 스테로이드 및 그 유도체를 제외한 약물들을 비스테로이드성 소염제(NSAID, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)라 부르며 아라키돈산으로부터 프로스타글란딘의 생성을 억제하는 기작을 가지고 있으며 여러 염증 치료에 광범위하게 사용되었으나, 소화장애, 위장관 장애 및 신장기능 감소 등과 같은 전신적인 부작용을 유발하여 환자의 연령이 증가할수록 부작용 발생의 빈도가 높아지므로 노년층 환자 치료 시 장기간에 걸친 전신투여는 많은 문제점을 내포하고 있다. 또한, 염증에 사용되는 코르티코스테로이드(corticosteroids)는 프로스타글란딘 생성을 억제할 뿐 아니라 백혈구의 베타 아드레너직 수용체(β-adrenergic receptor)에 작용하여 인터루킨(IL)의 분비를 억제하고 혈관의 투과성을 감소시켜 혈액 및 염증세포들의 삼출을 억제한다. 또한 골다공증 및 모세혈관의

약화를 촉진시키며, 혈압상승 및 위궤양 등이 생기는 부작용이 있다. 또한, 퇴행성 관절염이나 류마티스성 관절염 등의 관절의 염증치료에 사용되는 항관절염제제(disease modifying anti-rheumatic drugs; DMARDs)는 관절염의 진행과정을 억제하거나 완화시키기 위한 목적으로 사용되고 있으며, 메토트렉세이트(methotrexate), 디-페니실아민(D-penicillamine), 설파살라진(sulfasalazine), 항말라리아제 및 금(金)염 등 매우 다양한 약물들이 포함되어 있다. 이들 약물 역시 관절염의 진행을 다소 감소시키지만 혈액이상, 위염, 설사, 구토, 불면, 졸음, 이명, 발열, 간장장애, 신장장애 등의 심각한 부작용을 동반할 수 있다. 따라서, 염증성 질환 치료에 있어서 무엇보다도 장기복용에 따른 부작용이 없이 우수한 치료효과를 얻을 수 있으며, 상기한 약물을 대체할 수 있는 천연물에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있고 다양한 적용이 시도되고 있다.

[0005] 한국특허등록 제0846125호에는 피페린을 유효성분으로 포함하는 피부주름 개선용 조성물이 개시되어 있으며, 한국특허등록 제656571호에는 퇴행성 관절염 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있으며, 한국특허등록 제585562호에는 염증질환의 치료 또는 개선용 생약 조성물이 개시되어 있으며, 한국특허등록 제623972호에는 녹나무 추출물을 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있으며, 한국특허등록 제532189호에는 인삼노두 추출물을 함유하는 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있으며, 한국특허등록 제694569호에는 항염증 활성을 갖는 우묵사스레피 추출물 및 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 조성물이 개시되어 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명자는 상기의 문제점을 해결하며 염증 및 관절염 치료제를 개발하기 위하여, 후추의 주요 활성 성분인 피페린의 여러 가지 효과를 조사하였다. 피페린은 전통적으로 음식의 향료 외에 식품보존제, 의약품, 향수로까지 아시아 여러 국가들에서 사용되어 왔다. 후추의 주요 활성성분인 페놀계의 피페린은 여러 가지 유용한 생리활성을 가진다. 즉, 췌장의 소화효소 분비를 촉진시키고, 활성산소에 대한 방어 작용, 지질의 peroxidation을 낮추고, 의약품의 생체내 흡수를 촉진시키는 등 여러 가지 기능을 가진다. 그러나 이러한 피페린의 관절염 치료에 대한 연구 및 적용에 대한 연구가 전무하여, 본 발명에서는 피페린의 뛰어난 항염, 진통 및 관절염 증상 억제와 치료 효과에 대한 연구를 하여 관절염 치료제나 염증억제제로서 피페린의 효능을 발명하였다.

과제 해결수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 피페린 또는 이를 포함하는 식물 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 억제 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 피페린 또는 이를 포함하는 식물 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 억제 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

효 과

[0009] 본 발명에 따르면, 본 발명의 피페린은 IL-1β에 의해서 활성화된 관절활막세포의 IL-6, PGE2, MMP-1, MMP-13 생성량을 억제하였다. 또한 동물모델에서도 진통 및 염증을 억제하는 등, 피페린의 관절염 억제 효과가 뛰어나, 피페린은 진통제 그리고 항염제는 물론, 관절염 증상 완화제나 치료제로 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 피페린 또는 이를 포함하는 식물 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 억제 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 억제 또는 치료할 수 있는 관절염은 바람직하게는 류마티스성 관절염이다.

[0012] 본 발명의 약학 조성물은 인터루킨-6, 프로스타글란딘 E2, COX-2 (cyclooxygenase 2), MMP-1 (matrix metalloprotenase 1) 또는 MMP-13 (matrix metalloprotenase 13) 생성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명은 또한, 피페린 또는 이를 포함하는 식물 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 억제 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0014] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0015] 본 발명의 약학 조성물은 피페린 또는 피페린을 포함하는 식물 추출물을 유효성분으로 함유할 수 있으며, 상기 식물은 피페린을 함유하는 어떤 식물도 가능하며, 바람직하게는 후추이다.

[0016] 본 발명의 피페린은 기존의 생약에 첨가하여 효능을 높이는 것에 사용할 수도 있고, 피페린을 많이 함유한 후추 및 다른 생약을 사용할 수도 있다.

[0017] 본 발명의 피페린이 함유되는 생약은 통상적인 건조 방법에 따라 생약 자체를 건조시켜 건조물 상태 또는 상기 건조물을 세절 또는 분말 형태로 하여, 통상적인 추출 방법, 예를 들면 열수 추출 또는 유기용매로 추출하여 사용할 수도 있고, 이미 상품으로 시판되는 추출물 분말을 구입하여 사용할 수도 있다.

[0018] 본 발명의 조성물에 사용하는 생약은 건조한 것, 건조하지 않은 것 또는 이들을 서로 혼합한 상태의 것을 추출에 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명의 조성물에 함유되는 추출물은 생약을 세절한 후, 생약 무게의 약 3배 내지 20배의 물, 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 또는 유기용매, 바람직하게는 30 내지 80% 에탄올로, 실온 내지 100℃의 추출온도에서 약 6시간 내지 10일 동안 열수추출, 냉침추출, 초음파 추출 또는 환류냉각 추출 등의 추출방법에 의하여 1회 내지 5회 반복하여 추출한 후, 추출물을 여과, 감압농축 또는 동결건조하여 제조될 수 있다.

[0020] 상기 저급알콜은 C1 내지 C4의 탄소수를 갖는 저급알콜을 포함하며, 상기 유기용매는 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산, 디클로로메탄과 같은 비극성 용매를 포함하고, 용매를 생약 무게의 3배 이상을 사용하는 것이 바람직한 추출효과를 나타내며, 20배 이상을 사용할 때는 용매가 추출량에 비하여 많이 소요되는 경향이 있다.

[0021] 본 발명의 조성물에 함유되는 추출물의 함량은 제한되지는 않으나, 본 발명의 추출물은 조성물 총 100 중량부에 대하여 0.1 내지 약 95 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0022] 본 발명의 피페린은 관절염환자의 조직에서 분리한 관절활막세포를 IL-1beta 10ng/ml로 자극시켰을 때 증가된 IL-6 와 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, PGE2)와 같은 proinflammatory mediator의 생성량을 효과적으로 억제한다.

[0023] 본 발명의 피페린은 관절염환자의 조직에서 분리한 관절활막세포를 IL-1beta 10ng/ml로 자극시켰을 때 증가된 matrix metalloprotenase 1 과 13 (MMP-1과 MMP-13) 같은 골파괴 효소를 효과적으로 억제한다.

[0024] 본 발명의 피페린은 카라기난으로 유도된 동물 통증 모델에서 기존의 의약품인 셀레콕시브(celecoxib)와 대등한 진통효과를 보였다.

[0025] 본 발명품의 피페린은 카라기난으로 유도된 또 다른 동물 통증 모델에서 스테로이드계통의 코르티코스테로이드인 프레드니솔론(prednisolone)과 비교될 정도의 항염효과와 진통효과를 보였다.

[0026] 따라서, 본 발명의 피페린을 유효성분으로 하는 약학조성물은 항염 또는 진통 및 관절염 치료를 위한 의약품, 식품 등으로 유용하게 사용할 수 있고, 또한, 염증성 질환의 예방, 경감 및 치료를 위한 의약품, 식품 등으로 유용하게 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 피페린 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 피페린 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0029] 본 발명의 피페린 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

[0030] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 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 PA]에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0031] 본 발명의 피페린 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0032] 본 발명의 피페린 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물의 투여량은 염증반응과 진통 그리고 관절염 증상을 억제 또는 치료하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 피페린 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01mg/kg~100㎎/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0033] 본 발명의 피페린 추출물을 함유하는 조성물은 독성이 거의 없으므로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 피페린을 함유하는 조성물은 염증 예방 및 통증 경감을 위한 식품에 다양하게 이용할 수 있다. 본 발명의 조성물은 식품으로 복용할 수 있는 어떠한 제형으로도 적용하여 사용할 수 있으며 그 예로 분말, 과립제, 정제, 환제, 캅셀제, 연질캅셀제 또는 액제 등을 포함한다. 이러한 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 각종 식품류, 육류, 차 등의 음료수, 스넥류, 과자류, 라면류, 기타 면류, 캔디, 초콜릿, 아이스크림류, 껌, 비타민 복합제, 건강 기능 식품류 등이 있다.

[0035] 본 발명의 피페린 추출물은 염증 예방 및 통증 그리고 관절염 경감을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 때, 식품 또는 음료 중의 피페린 양은 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 5% 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0036] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 피페린을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0037] 상기 외에 본 발명의 피페린은 여러가지 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 10 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] **실시예**

[0040] **실시예 1: 본 발명의 피페린의 시험관 내 염증 억제 효과 확인**

[0041] **1) 피페린의 proinflammatory mediators 억제 효과**

[0042] 관절염 환자의 수술시 얻은 관절활막세포 (fibroblast-like synoviocytes)를 채취 및 배양한 후 interleukin-1beta (IL-1β) (R&D Systems 사)을 10 ng/ml 로 자극시켜 여러 가지 proinflammatory mediators 나 골파괴 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs) 생성량을 증가하게 만든다. 이 때 피페린을 농도별로 10, 50, 100 ㎍/㎖ 씩 각각 처리하여 인터루킨-6 (IL-6), 프로스타글란딘 E2 (PGE2) 생성량과 싸이클로옥시게나아제 2 (COX-2) 발현량, 그리고 MMP-1 과 MMP-13의 생성량과 전사의 억제 정도를 ELISA (R&D Systems 사) 및 반정량적 PCR 로 관찰하였다. 본 실험에서 피페린은 농도 의존적으로 IL-6와 PGE2의 생성량을 억제하였고, 특히 PGE2 생성량은

피페린 10 ㎍/㎖ 농도에서 통계학적으로 의미 있게 감소하였다 (도 1a).

[0043] 또한, 전사 수준에서 IL-6와 COX-2 발현량을 조사해 보았을 때, IL-6의 전사 수준은 농도 의존적으로 감소하였지만, COX-2 수준은 피페린 100 ㎍/㎖에서 감소함을 보였다 (도 1b). 따라서, COX-2의 번역 수준에서 피페린 억제 효과를 웨스턴 블롯 방법으로 조사하였더니, 피페린은 농도 의존적으로 COX-2의 단백질 발현량을 억제하였다 (도 1c).

[0044] MMP-1과 MMP-13는 관절염에서 연골 및 골 파괴에 중요한 역할을 한다. 그 중에서도 MMP-13는 연골의 주성분인 콜라겐 타입 II에 선택적인 활성을 보이기에 이들의 억제정도가 골 파괴 억제에 중요한 지표가 될 수 있다. 따라서 피페린의 MMP-1 과 MMP-13 의 발현 억제 효과를 조사하였다. 피페린은 MMP-1 보다는 MMP-13에 대해서 농도 의존적으로 전사 및 번역 수준에서 효과적인 억제 효과를 보였다 (도 1d).

[0045] **2) 피페린의 세포신호전달의 억제 기작**

[0046] 피페린의 IL-6, PGE2, MMPs의 억제 작용기작을 알기 위하여, 세포신호전달 과정의 억제 효과를 조사하였다. 알려진 대로 IL-1β가 활성화시키는 신호전달과정은 pERK1/2, p-JNK, p-P38이며, IkB-a을 분해하는 과정을 통한다. 도 2a에서 피페린은 활성화된 여러 가지 세포신호전달 중에서 ERK1/2의 인산화를 선택적으로 억제한다. 다른 신호전달과정에는 영향을 미치지 않는다. 따라서 신호 전달의 마지막 단계인 전사 인자의 세포 핵내로의 이동이 억제되는지를 조사하였더니, NF-kB의 이동은 억제되지 않았고, AP-1의 핵내로의 이동이 억제되었다 (도 2b). 따라서, 피페린은 ERK1/2의 인산화를 선택적으로 억제하여 전사 인자인 AP-1의 활성화를 억제하여 여러 가지 유전자의 발현을 억제하는 것으로 밝혀졌다.

[0047] **실시예 2: 동물모델에서 피페린의 염증, 진통 및 관절염 억제 효과 확인**

[0048] (1) 급성 통증 동물 모델에서 피페린의 진통효과

[0049] 시험관 내 실험을 통해서 확인된 피페린의 PGE2 생성량 억제 효과가 생체 내 동물 모델에서 진통효과가 있는지 확인하고자 하였다. 옥수수 기름에 녹인 피페린을 20 과 100 mg/kg 로 경구로 먹인 뒤, 한 시간 후에 1% 카라기난 용액 100 ㎕를 뒷다리 발바닥에 피하 주사하여 염증을 유발했다. 급성 통증을 측정하는 기기인 paw pressure analgesia instrument (UGO-BASIL Biological Research Apparatus Co., Comerio-Varese, Italy)를 이용하여 압통에 대해서 쥐가 얼마나 오래 참는지를 측정하였다 (도 3a). 이 때 대조 물질로는 선택적으로 싸이클로옥시게나아제-2 (COX-2)를 저해하는 Celebrex® (Pfizer Inc., NY, USA) 100 mg/kg의 용량으로 사용하였다. 실험결과 피페린 100 mg/kg을 투여한 실험군에서의 진통효과가 기존의 COX-2 저해제인 Celebrex 100 mg/kg 처리군보다도 통계학적으로 유의한 우수한 진통 효과를 보였다. 그러나, 피페린 20 mg/kg는 Celebrex와 동등 또는 그보다는 못한 효과를 보였고 두 군 모두 통계적 유의성은 없었다.

[0050] (2) 관절염 동물 모델에서 피페린의 진통, 염증, 관절염 억제 효과

[0051] 임상통증 모델에 근접한 염증성 관절염 동물 모델을 사용하여 피페린의 항염증 및 통증 효과를 행동학적으로 검증하였다. 관절염 동물모델은 식염수에 녹인 3% 카리기난을 쥐의 한쪽 발목 관절강 내에 100 ㎕를 직접 주입하여 염증을 유도하는 방법을 사용하였다. 옥수수 기름에 녹인 피페린을 20 과 100 mg/kg 로 경구 투여한 후, 피페린의 염증, 진통 그리고 관절염 억제 효과를 관찰하였다. 이 때 양성 대조 물질로는 대표적 스테로이드 제제인 프레드니솔론을 10 mg/kg의 용량으로 사용하였다. 관절염 동물모델의 증상을 분석하기 위해 발목 부종 (paw volume), 발목굴신검사 (ankle flexion test)에서의 울음 점수 (squeaking score) 및 체중분배비율 (weight distribution test) 등의 행동학적 지표를 사용하였다. 발목 부종 (paw volume) 측정은 부종 부피를 자동으로 측정할 수 있는 plethysmometer (UGO-BASIL Biological Research Apparatus Co., Comerio-Varese, Italy)를 사용하여 측정하였고 (도 3b), 울음점수는 부종으로 경직된 발목을 한 차례 굴신(폈다가 구부리는 동작)시키는 동안 울음소리가 나면 1점 그렇지 않으면 0점을 부여하는 방식으로 발목하나에 대해 5초 간격으로 총 10회 굴신하여 합산함으로써 관절염 유발 발목의 통증정도를 정량화하였다 (도 3c). 체중분배비율은 정상적으로 양쪽 다리에 균일하게 분산되는 체중의 균형이 관절염으로 인해 한쪽 발목에 유발된 통증으로 깨지게 되어 체중이 한쪽 발로 쏠리는 현상을 측정하는 장치인 incapacitance meter (UGO-BASIL Biological Research Apparatus Co.,

Comerio-Varese, Italy)를 시용하여 측정하였다 (도 3d). 도 3b, 3c, 3d에서 보는 바와 같이 카리기난 주입 후 1일 경과 시점에서 통증과 부종이 최고조에 이르렀으며 이 시점에서 피페린을 20 과 100 mg/kg의 용량으로 8일간 매일 경구 투여하였다. 그 결과 용량 의존적인 항염증 및 진통효과를 보였으나 20 mg/kg 용량의 피페린 처리군에서는 통계학적 유의성은 뚜렷하지 않았다. 100 mg/kg의 용량의 피페린 처리군의 경우, 특히 부종억제효능면에서는 양성대조군인 프레드니솔론의 효능에 근접한 것으로 관찰되었다.

[0052] 3) 조직염색을 통한 염증 억제 효과 관찰

[0053] 상기 관절염 유발 실험동물의 관절의 조직학적 변화를 관찰하여, 피페린 투여군에서 염증 억제 효과를 관찰하였다. 도 4에서 보는 것과 같이 옥수수기름만 투여한 실험군에서 염증이 심한 것을 볼 수 있고, 피페린 투여군에서는 염증 정도가 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 실험군의 쥐 5마리를 모두 관찰하여 염증의 심한 정도에 따라서 0-5점까지 점수를 주었을 때 피페린 처리군에서 통계학적으로 유효한 염증 억제 효과를 보였다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1a는 피페린의 IL-6 및 PGE2 생성량 억제 효과를 보여준다. *p<0.05, **<0.01, ***<0.001

[0055] 도 1b는 피페린의 IL-6 및 COX-2의 전사 수준의 발현 억제 효과를 보여준다.

[0056] 도 1c는 피페린의 COX-2 단백질 발현 억제 효과를 보여준다.

[0057] 도 1d는 피페린의 MMP-1 및 MMP-13의 생성 억제 효과를 보여준다.

[0058] 도 2a는 피페린의 세포신호전달 억제 효과를 보여준다.

[0059] 도 2b는 피페린의 전사 인자 활성화 억제 효과를 보여준다.

[0060] 도 3a는 카라기난으로 유도된 통증 동물 모델에서 피페린의 진통 효과를 보여준다.

[0061] 도 3b는 카라기난으로 유도된 통증 동물 모델에서 피페린의 부종 억제 효과를 보여준다.

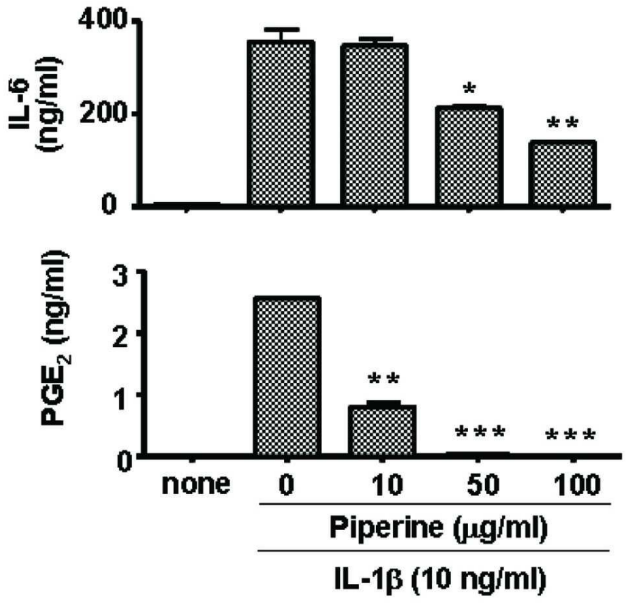
[0062] 도 3c는 카라기난으로 유도된 통증 동물 모델에서 피페린의 울음 억제 효과를 보여준다.

[0063] 도 3d는 카라기난으로 유도된 통증 동물 모델에서 피페린의 체중분배비율 조정 효과를 보여준다.

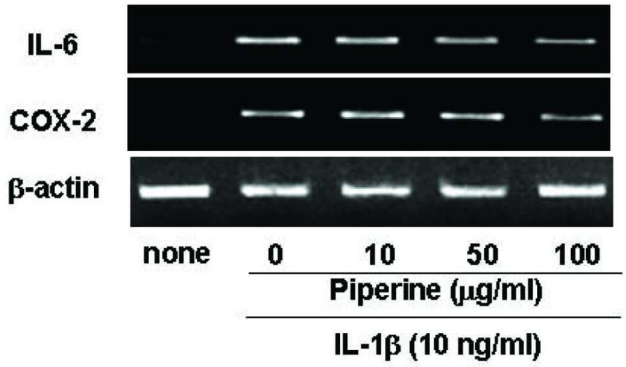
[0064] 도 4는 조직학적으로 관찰된 피페린의 염증 억제 효과를 보여준다.

도면

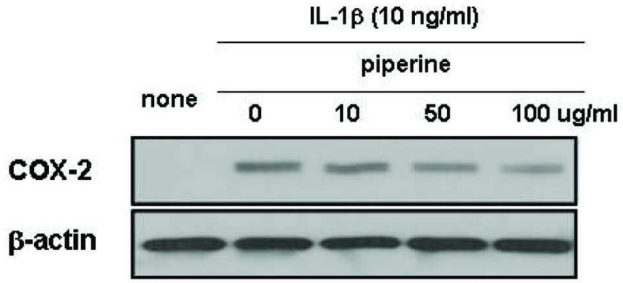
도면1a



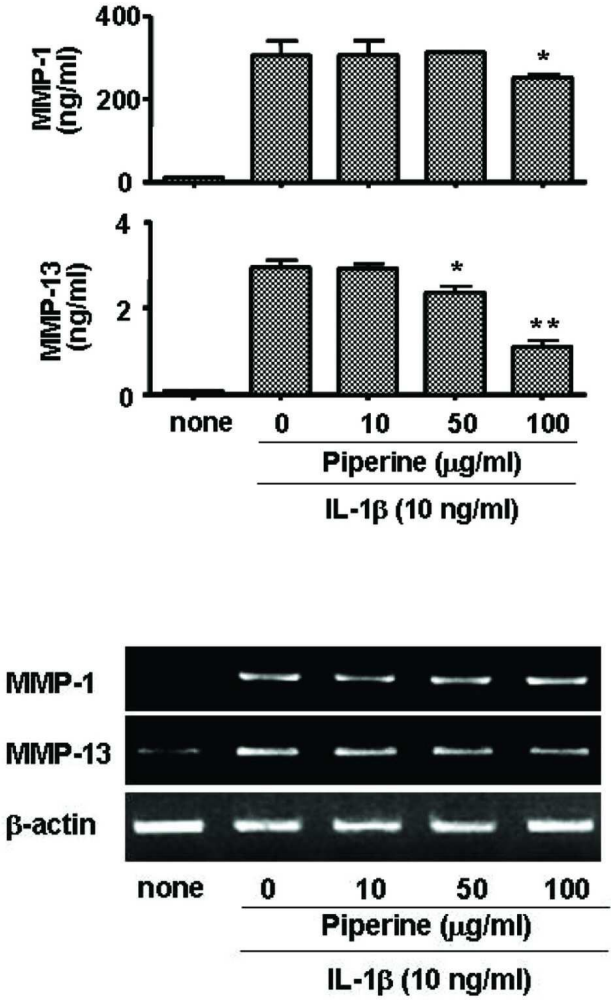
도면1b


IL-6
COX-2
β-actin
none
0
10
50
100
Piperine (μg/ml)
IL-1β (10 ng/ml)

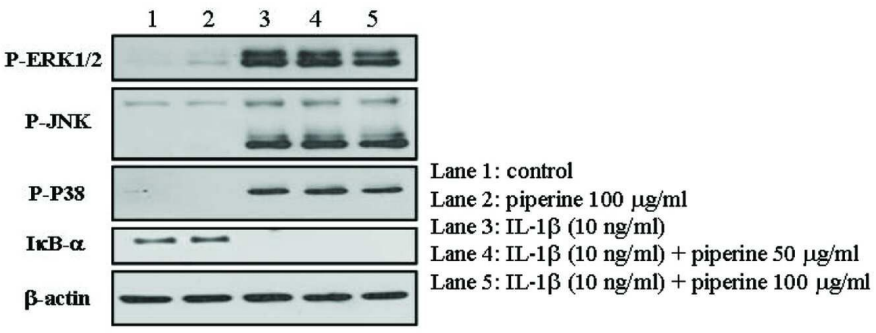
도면1c


IL-1β (10 ng/ml)
piperine
none
0
10
50
100 ug/ml
COX-2
β-actin

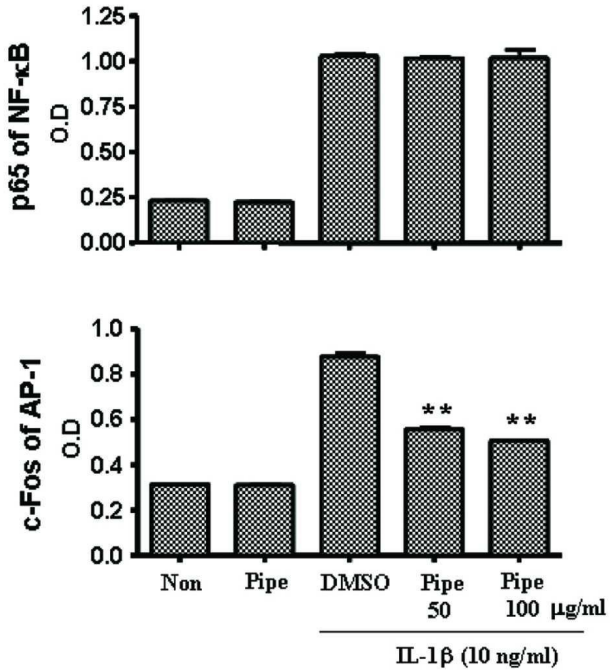
도면1d


MMP-1 (ng/ml)
400
200
0
*
MMP-13 (ng/ml)
4
2
0
*
**
none
0
10
50
100
Piperine (μg/ml)
IL-1β (10 ng/ml)
MMP-1
MMP-13
β-actin
none
0
10
50
100
Piperine (μg/ml)
IL-1β (10 ng/ml)

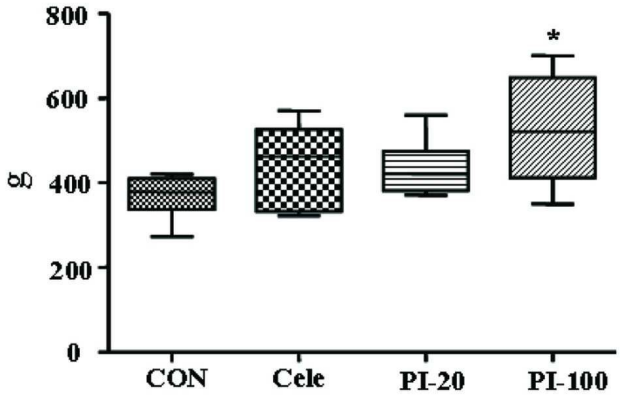
도면2a


1
2
3
4
5
P-ERK1/2
P-JNK
P-P38
IκB-α
β-actin
Lane 1: control
Lane 2: piperine 100 μg/ml
Lane 3: IL-1β (10 ng/ml)
Lane 4: IL-1β (10 ng/ml) + piperine 50 μg/ml
Lane 5: IL-1β (10 ng/ml) + piperine 100 μg/ml

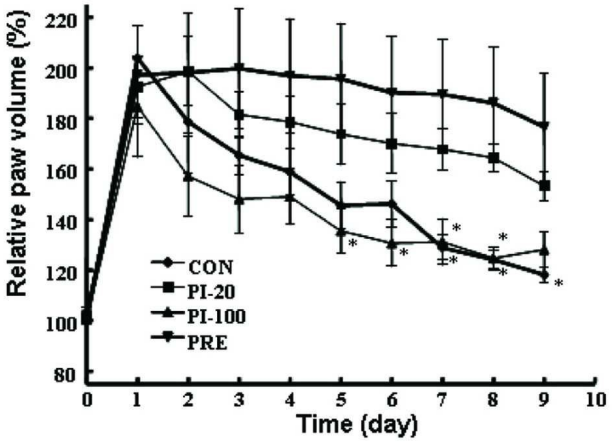
도면2b


p65 of NF-κB
O.D
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
c-Fos of AP-1
O.D
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
**
Non
Pipe
DMSO
Pipe 50
Pipe 100 μg/ml
IL-1β (10 ng/ml)

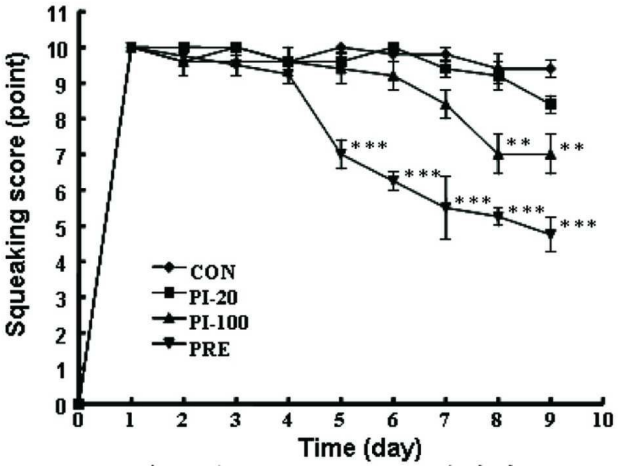
도면3a


800
600
400
200
0
δD
*
CON
Cele
PI-20
PI-100

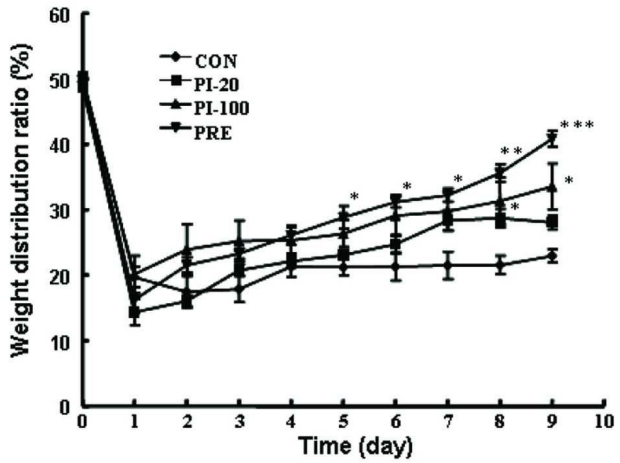
도면3b



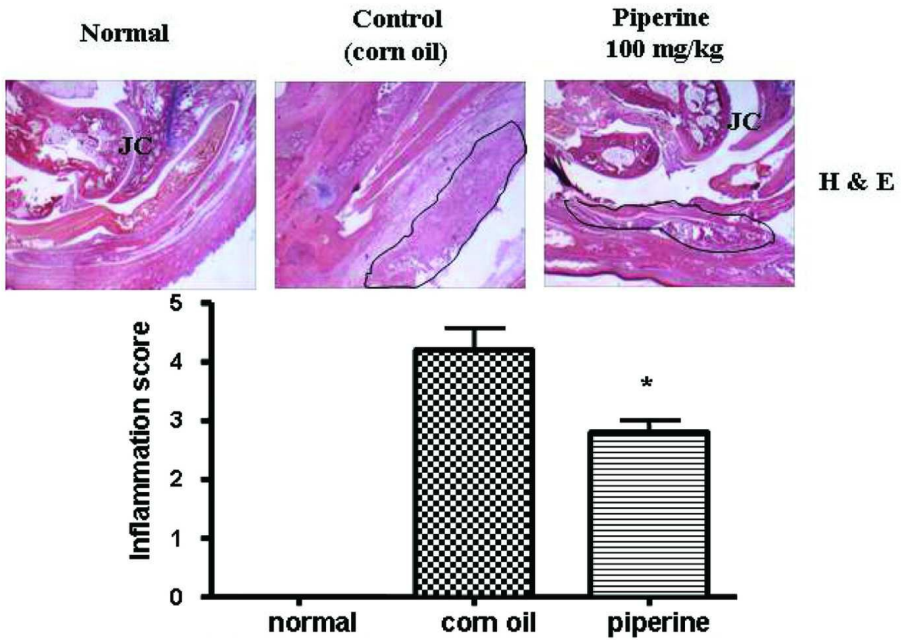
도면3c



도면3d



도면4


Normal
Control
(corn oil)
Piperine
100 mg/kg
JC
JC
H & E
Inflammation score
5
4
3
2
1
0
*
normal
corn oil
piperine