(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월01일
(11) 등록번호 10-2473639
(24) 등록일자 2022년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/05 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 1/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/05 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0033080
(22) 출원일자 2022년03월17일
심사청구일자 2022년03월17일
(56) 선행기술조사문헌
US20050196410 A1
KR101768613 B1

(73) 특허권자
조선대학교 산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
김춘성
광주광역시 남구 서문대로678번길 7, 101동 1002호(진월동, 대주아파트)
(74) 대리인
특허법인리채

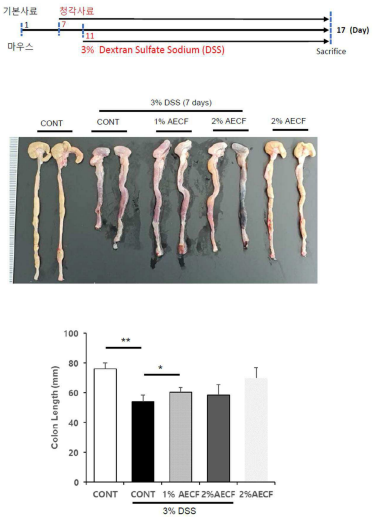
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 **청각 추출물을 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로 보다 상세하게는 청각(*Codium fragile*)의 추출물을 포함하여 부작용 발생 염려는 낮추면서, 대장염을 효과적으로 예방, 지연, 개선 또는 치료할 수 있어, 대장염 예방 또는 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/202 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525011797
과제번호 202106562
부처명 해양수산부
과제관리(전문)기관명 해양수산과학기술진흥원
연구사업명 빅데이터기반해양바이러스제어및마린바이오틱스개발(R&D)
연구과제명 해조류 기반 바이오 헬스케어 유효성 소재 실증 지원
기 여 율 1/1
과제수행기관명 조선대학교 산학협력단
연구기간 2021.04.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

청각(*Codium fragile*)의 열수 추출물을 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 약학 조성물은 대장의 길이 감소 또는 무게의 감소를 억제하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

청각(*Codium fragile*)의 열수 추출물을 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대장염의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 대장염의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 청각(*Codium fragile*) 은 *Codiaceae*과에 속하는 식이 가능한 천연물로, 동아시아, 오세아니아 및 북유럽의 해안을 따라 널리 분포한다. 한국에서 청각은 요리에 사용되는 익숙한 천연물 중 하나로, 뛰어난 항산화 성분으로 알려져 있는 베타카로틴이 다량 함유되어 있으며 혈관 내 노폐물 및 독소 배출을 돕고 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추어 혈관 건강에 뛰어난 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0005] 한편, 대장염(colitis)은 대장에 염증이 발생하는 질환으로, 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD), 과민성 대장염 증후군((irritable bowel syndrome, IBS)등을 포함한다. 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 중 대표적인 질환인 궤양성 대장염(ulcerative colitis; UC)과 크론병(Crohn's disease; CD)은 아직 원인이 명확히 밝혀져 있지 않고 있으며, 복통과 더불어 심한 만성 설사와 혈성 설사를 일으킬 수 있으며, 완치가 힘들고 호전과 악화를 반복하는 특성이 있다. 궤양성 대장염은 대장의 점막에 진무름(미란)이나 궤양이 연속적으로 형성되는 질환으로, 혈변, 점혈변, 설사, 복통이 일어나고, 중증인 경우에는 발열, 체중감소, 빈혈 등의 전신성의 증상이 나타난다. 또한, 궤양성 대장염은 위장관 어느 부위에서도 발생할 수 있다. 크론병은 입에서 항문에 이르는 소화관의 임의의 부위에 궤양 등의 병변이 비연속적으로 발생하는 질환으로서, 복통, 설사, 혈변과 더불어, 중증의 경우에는 발열, 하혈, 체중감소, 전신권태감, 빈혈 등의 증상이 나타난다. 궤양성 대장염과 크론병은 병변과 염증 증상에 있어서 차이가 있지만 여러 면에서 유사한 양상을 보이기 때문에 두 질환의 구분이 서로 명확하지 않은 경우가 흔하다.궤양성 대장염 및 크론병의 발생율은 서양인에게 높다고 알려져 있었지만 최근 식습관 등의 생활습관의 변화로 인해 우리나라 등 동양에서도 환자수가 급증하고 있다. 그러나 근본적 치료법은 확립되어 있지 않다. 이 때문에 완전한 치료를 목표로 하는 것이 아니라 증상을 완화시키고 이러한 상태를 가능한 한 장기간 유지하는 약제가 사용되고 있는 실정이다. 이러한 대증요법을 위한

약제로서 아미노살리실산 제제, 부신피질 스테로이드제, 면역억제제 등이 사용되고 있으나 구역질, 구토, 식욕부진, 발진, 두통, 간장해, 백혈구 감소, 이상 적혈구, 단백뇨, 설사 등의 다양한 부작용이 보고되고 있다. 따라서, 효과가 우수하면서도, 안전하고 부작용을 일으키지 않는 궤양성 대장염, 크론병 등의 장질환 치료제의 개발이 요구되고 있다. 마찬가지로 과민성 대장염 증후군((irritable bowel syndrome, IBS)도 근본적인 치료제는 존재하지 않으며, 각 타입의 증상 경감을 목적으로 한 대증요법이 행해지고 있다. 이러한 대장염을 치료하기 위하여, 부작용이 적은 천연물로부터 대장염을 치료할 수 있는 조성물을 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제2084973호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 대장염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 대장염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. 청각(*Codium fragile*)의 추출물을 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 추출물은 열수추출물인, 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 대장염은 급성 장염, 세균성 대장염, 세균성 이질, 콜레라, 장티푸스, 여행자 설사, 바이러스성 대장염, 위막성 대장염, 아메바성 대장염, 염증성장질환, 궤양성 대장염, 교원성 대장염, 림프성 대장염, 허혈성 대장염, 전환성 대장염, 크론씨 병, 베체트 증후군, 약제 유발 대장염, 현미경적 대장염, 림프구성 대장염, 방사선 대장염, 방사선 대장염, 불확정 대장염 및 과민성 대장염 증후군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0014] 4. 위 1에 있어서, 상기 약학 조성물은 대장의 길이 감소를 억제하는, 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0015] 5. 청각(*Codium fragile*)의 추출물을 포함하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 약학 조성물 및 식품 조성물은 천연물을 유효성분으로 포함함으로써 투여에 따른 부작용 발생 염려는 낮추면서, 대장염을 효과적으로 예방, 지연, 개선 또는 치료할 수 있어, 대장염 예방 또는 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 청각의 추출물이 대장염 유도 마우스의 장 길이 감소를 억제하는 효과를 확인한 실험 결과이다.

도 2는청각의 추출물이 대장염 유도 마우스의 장에서 MPO(Myeloperoxidase) 활성을 저해하는 효과를 확인한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 설명한다.

[0022] 본 발명은 청각(*Codium fragile*)의 추출물을 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0023] "청각(*Codium fragile*)"은 청각과(*Codiaceae*)에 속하는 식이 가능한 천연물이다.

[0024] 추출물은 추출 대상 물질을 추출 용매에 녹여 분리한 물질을 의미하고, 구체적으로 추출대상의 추출처리에 의하

여 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 동결건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등의 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함할 수 있다.

[0025] 청각의 추출물은 당업계에서 공지된 통상적인 추출용매를 이용하여 얻을 수 있다. 추출용매로는 극성 용매 또는 비극성 용매를 이용할 수 있다.예컨대 추출용매는 물, C1 내지 C6의 알코올, 아세트산, 및 이들의 혼합 용매로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0026] 추출물은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 또는 당업계에 알려진 통상적인 추출방법을 통해 추출한 것일 수 있다.

[0027] 일 구현예에 따르면 청각의 추출물은 청각의 열수추출물일 수 있다."열수추출물"은 추출 용매로 물을 이용하고 열을 가해 추출된 추출물이다.

[0028] 예를 들어 청각의 열수추출물은 청각을 건조 및 분쇄시킨 후 추출된 추출액일 수 있다. 청각 열수 추출물은 상기 추출액을 추가적으로 여과 및 건조하여 수득된 추출 분말일 수 있다. 청각 열수 추출물을 상기 추출 분말을 추가적으로 증류수에 용해시킨 후 여과하여 수득된 추출물일 수 있다. 상기 청각의 열수추출물의 열수 추출 온도는 70℃ 내지 120℃, 75℃ 내지 115℃, 80℃ 내지 110℃, 85℃ 내지 105℃ 또는 90℃ 내지 100℃일 수 있다.

[0029] 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 대장염의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 대장염의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 본원에 사용된 용어 "개선"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0030] 본 발명의 조성물은 대장염으로 인한 대장의 길이 감소 또는 무게 감소를 억제할 수 있다.

[0031] 용어 "대장염"은 대장에 염증이 발생한 상태를 의미하며, 세균 감염이나 장 내용물의 병적 발효 등으로 인해 나타날 수 있고 감염성 대장염과 비감염성 대장염을 포함한다.

[0032] 대장염은 염증성 대장 질환(inflammatory bowel disease; IBD) 및 과민성 대장염증후군(irritable bowel syndrome, IBS)등을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 대장염은 급성 장염, 세균성 대장염, 세균성 이질, 콜레라, 장티푸스, 여행자 설사, 바이러스성 대장염, 위막성 대장염, 아메바성 대장염, 염증성장질환, 궤양성 대장염, 교원성 대장염, 림프성 대장염, 허혈성 대장염, 전환성대장염, 크론씨 병, 베체트 증후군, 약제 유발 대장염, 현미경적 대장염, 림프구성 대장염, 방사선 대장염, 불확정 대장염 및 과민성 대장염증후군으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 청각의 열수추출물이 대장염 마우스 모델에서 대장의 길이 감소를 유의하게 억제하는 것을 확인하였다.

[0035] 일 구현예에서, 청각의 열수추출물이 대장염 마우스 모델의 대장에서Myeloperoxidase(MPO) 활성이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0036] MPO는 백혈구 중 호중구 침착 지표로 측정되는 효소로, 대장에서의 MPO 활성을 측정함으로써 대장 내에서 염증반응 정도를 확인할 수 있다.

[0037] 상기의 결과들로부터 청각의 열수 추출물이 대장염 개선 효과를 나타내는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 청각의 열수추출물을 대장염 예방 또는 치료를 위해 사용할 수 있다.

[0038] 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 약학 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오즈, 덱스트로즈, 수크로스, 덱스트린, 말토덱스트린, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면 활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제되나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며 이에 제한되지는 않으나, 이

러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0041] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 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.

[0042] 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 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. 상기 약학 조성물은개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0043] 약학 조성물에서 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg당 1 내지 6000 mg, 바람직하게는 60 내지 600 mg을 1회 또는 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0045] 본 발명은 청각(*Codium fragile*)의 추출물을 포함하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0046] "청각(*Codium fragile*)의 추출물", "대장염", "예방", "개선"에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.

[0047] 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0048] 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 식품 첨가물 공전에 수재된 품목에는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 식품 조성물은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류. 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명은 청각(*Codium fragile*)의 추출물을 포함하는 대장 내 Myeloperoxidase (MPO) 활성 저해용 조성물을 제공한다.

[0052] "청각(*Codium fragile*)의 추출물" 에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.

[0053] 상기 조성물은 시험관 내(*in vitro*) MPO 활성 저해용 조성물일 수 있다.

[0055] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0056] **1. 청각(C. fragile)의 추출물 제조**

[0057] 완도 해변에서 수집한 신선한 청각을 수돗물에 3번 세척 하여 표면에 붙어 있는 소금, 착생 식물 및 모래를 제거한 후, 50℃에서 에어건조기를 이용하여 48시간 동안 건조시켰다. 건조된 시료는 분쇄기로 분쇄 후 20배 부피의 증류수를 넣고 95℃에서 1 시간 동안 추출하였다. 이후, 3M paper로 추출액을 여과한 후 분무건조 하였다. 건조된 추출 분말은 100 mg/ml로 증류수에 용해시킨 후 0.2 μm 주사기 필터로 여과하여 본 실험을 수행하였다.

[0059] **2. 대장염 마우스 모델에서 장 길이 측정을 통한 청각의 추출물에 의한 대장염 저해 효과 확인**

[0060] 3% Dextran Sulfate Sodium (DSS)으로 유도한 마우스를 이용하여 대장염에 청각열수추출물 (AECF)이 미치는 대장염 항염증 작용을 확인하였다.

[0061] 비슷한 무게의 수컷 C57/BL/6 마우스 (12주령) (다물사이언스, 대전, 한국)를 각 군별 (n=6)로 나누어 1주일 정도 안정화시켰다. 구체적으로, 마우스를 4 그룹으로 나누어 실험을 수행하였다: 대조군1 (n=6, 기본사료+ 증류수투여군), 대조군2 (n=6, 기본사료+DSS 투여군), 1% AECF군 (n=6, 1% 청각열수추출물(AECF) 함유사료+DDS 투여군), 2% AECF군 (n=6, 2% 청각열수추출물 함유사료+DDS 투여군). 음성대조군 (n=6)으로는 2% 청각열수추출물 혼합 사료와 증류수를 투여하였다. AECF 함유사료는 AIN-76 기본사료에 1~2%의 AECF를 혼합하여 제조 (대한바이오링크, 충북, 한국) 하였으며, 3% DSS (MP Biomedicals, Aurora, OH, USA)를 먹이기 3일전부터 섭취하게 하였다. 3% DSS는 1차 증류수에 희석하여 사용하였으며, 3% DSS를 먹이고 6일후에 각 군의 마우스를 희생하여, 장을 분리하였다. 분리된 장은 맹장부터 직장까지 길게 세로로 나열한 후 길이를 자를 이용하여 측정하고, 장 내용물은 PBS를 사용하여 깨끗하게 제거한 후 10% 중성완충포르말린에 보관하였다.

[0062] 3% DSS로 대장염을 유도한 마우스의 장 길이는 DSS를 처리하지 않는 마우스에 비해 장의 길이가 유의하게 짧아졌으며, 1% 청각열수추출물 함유 사료를 식이한 마우스의 장 길이는 대장염이 유도된 마우스에 비해 통계적으로 유의하게 장의 길이가 길어지는 것을 확인하였다 (도 1 참조, *p=0.0150, **p=0.000005). 이는 청각의 열수추출물이 대장염 개선 효능이 있음을 시사한다.

[0064] **3. 대장염 마우스 모델의 장에서 MPO 활성 측정을 통한 청각의 추출물에 의한 대장염 저해 효과 확인**

[0065] Myeloperoxidase (MPO) activity assay kit (Colorimetic, ab105136, abcam)를 이용하여 대장염 마우스의 장에서의 MPO 활성을 분석하였다. MPO는 호중구 과립구에서 가장 풍부하게 발현되는 과산화요소로서 염증이 있는 부분의 조직에서 많이 발현되므로, 마우스의 장으로부터 MPO 활성도를 측정하여 청각 추출물의 대장염의 저해효과를 확인할 수 있다.

[0066] 수컷 C57/BL/6 마우스 (12주령) (다물사이언스, 대전, 한국)은 각 군별로 나누어 1주일정도 안정화시켰다. 구체적으로, 마우스를 아래의 4 그룹으로 나누어 실험을 수행하였다: 대조군1 (n=6, 기본사료+ 증류수투여군), 대조군2 (n=6, 기본사료+DSS 투여군), 1% AECF군 (n=6, 1% 청각열수추출물(AECF) 함유사료+DDS 투여군), 2% AECF군 (n=6, 2% 청각열수추출물 함유사료+DDS 투여군). AECF 함유사료는 AIN-76 기본사료에 1~2%의 AECF를 혼합하여 제조 (대한바이오링크, 충북, 한국) 하였으며, 3% DSS (MP Biomedicals, Aurora, OH, USA)를 먹이기 3일전부터 섭취하게 하였다. 3% DSS는 1차 증류수에 희석하여 사용하였으며, 3% DSS를 먹이고 6일후에 각 군의 마우스를 희생하여, 장의 말단을 분리하였다. 분리된 장으로부터 장 내용물을 차가운 PBS로 잘 씻어낸 후 MPO 분석완충액에 담아 분석하기 전까지 초저온 냉동고 (-70℃)에 보관한다. 각 군의 보관된 장은 조직파쇄기를 이용하여 균질화한 후 13000rpm, 30분 원심분리하였다. 원심분리한 조직샘플의 상층액을 정량하여, 50ug의 단백질을 MPO 활성분석에 사용하였다. MPO 활성은 MPO activity assay kit (Colorimetic, ab105136, abcam)의 방법에 따라 시행하였다.

[0067] 각각의 정량된 샘플, 스탠다드 (연속적인 TNB nmol)과 백그라운드 (MPO 기질을 넣지 않음) 웰에 MPO 기질을 혼합하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 정지용액을 넣고 TNB를 더하여 OD412nm에서 측정하였다. 측정한 OD값은 아래의 수학식 1에 따라 MPO 활성을 계산하였다.

수학식 1

[0068]
$$\text{MPO 활성도} = \frac{B}{\Delta T \times V} \times \text{샘플 희석 배수} = \text{nmol/min/mL} = \text{mU/mL}$$

[0069]
$\triangle A_{412nm} = A_{\text{백그라운드}} - A_{\text{샘플}}$

B = 스탠다드 커브에 $\triangle A_{412nm}$를 적용하여 산출 (주어진 시간 안에 샘플 반응동안 소비되는 TNB (nmol))

T = 최초 반응 시간

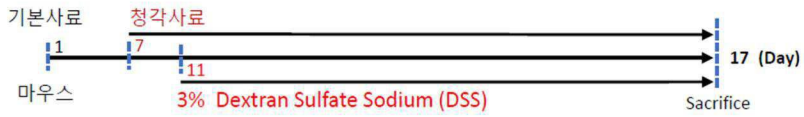
V = 반응 웰에 추가된 샘플부피 (ml)

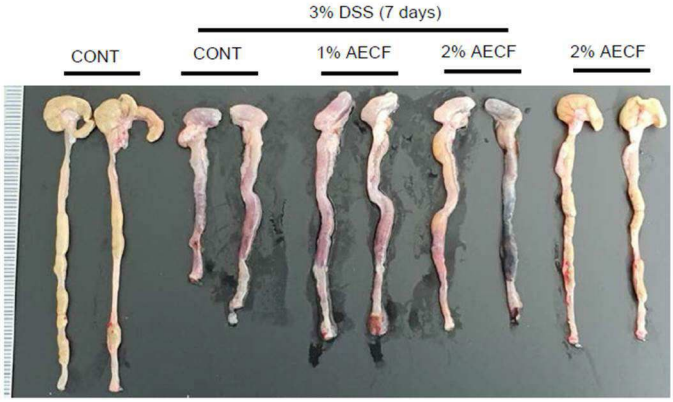
[0070] 아무것도 처리하지 않는 마우스에 비해 대장염을 유도한 마우스의 장에서 MPO 활성은 증가되었으며, 청각의 열

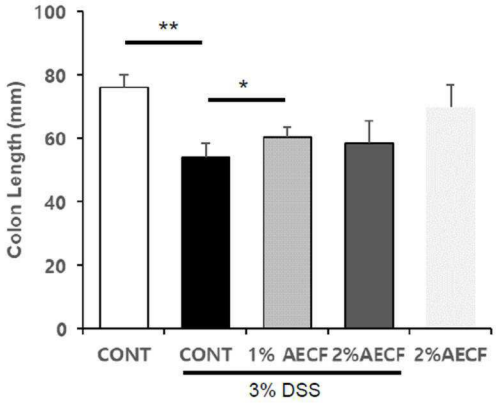
수추출물을 투여한 마우스의 장에서 MPO 활성은 통계적으로 유의하게 감소되는 것을 확인하였다(도 1 참조, *p=0.0405). 이는 청각의 열수추출물이 대장염 개선 효능이 있음을 시사한다.

도면

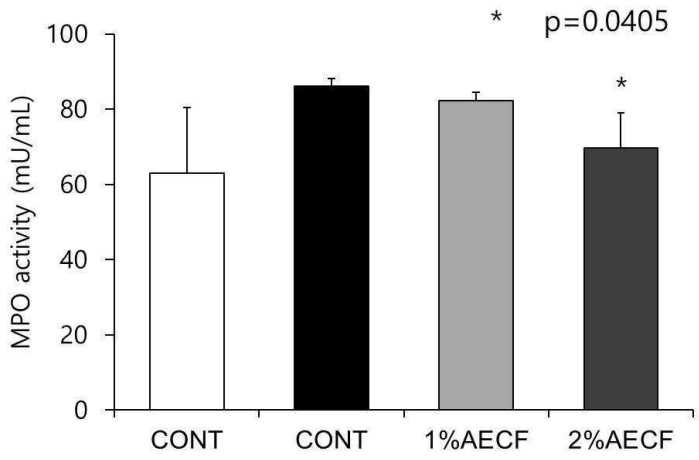
도면1







도면2


*
p=0.0405
*
100
80
60
40
20
0
MPO activity (mU/mL)
CONT
CONT
1%AECF
2%AECF