



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월06일
 (11) 등록번호 10-1426873
 (24) 등록일자 2014년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 36/185 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
 A61P 17/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0067342
 (22) 출원일자 2012년06월22일
 심사청구일자 2012년06월22일
 (65) 공개번호 10-2013-0001155
 (43) 공개일자 2013년01월03일
 (30) 우선권주장
 1020110061685 2011년06월24일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR100748851 B1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (72) 발명자
 안경섭
 대전광역시 유성구 과학로 125
 권옥경
 대전광역시 유성구 과학로 125
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 이원희

전체 청구항 수 : 총 12 항

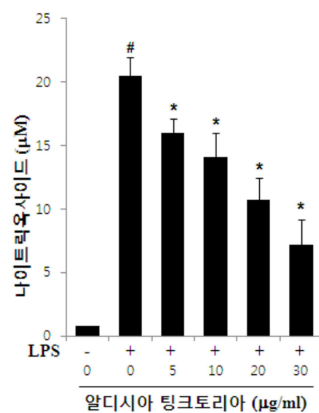
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 알디시아 텡크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.) 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 분획물이 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 나이트릭옥사이드 생성을 저해함을 확인하였으며, 알디시아 텡크토리아 추출물은 농도의존적으로 PGE₂ 및 IL-6(interleukin-6)와 IL-1beta 사이토카인의 양을 현저하게 낮추는 효과가 있었으며, iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질의 발현을 억제함과 p65단백질의 핵전이와 신호전달물질의 인산화를 억제함을 확인하였다. 또한, 카라기난으로 유도된 마우스 족부종 모델에서도 알디시아 텡크토리아 추출물과 에틸아세테이트 분획물이 염증억제 효과가 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 분획물이 염증관련 질환의 예방 및 치료용 또는 개선용 조성물, 피부외용제, 화장품 조성물 및 건강식품용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

오세량

대전광역시 유성구 과학로 125

박지원

대전광역시 유성구 과학로 125

이형규

대전광역시 유성구 과학로 125

김정희

대전광역시 유성구 과학로 125

최광만

대전광역시 유성구 과학로 125

이중구

대전광역시 유성구 과학로 125

최상호

대전광역시 유성구 과학로 125

이상우

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 K20402010430-10A1001-00930

부처명 교육과학기술부

연구사업명 과학기술국제화사업

연구과제명 지구적 생물다양성 협력네트워크 구축사업

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2010.10.01 ~ 2011.09.30

특허청구의 범위

청구항 1

알디시아 텅크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 알디시아 텅크토리아는 물, C₁ ~ C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하여 추출하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 분획물은 상기 알디시아 텅크토리아 추출물에 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올을 가하여 추출한 분획물인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 분획물은 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 알레르기, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 부종 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 부종 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

청구항 9

알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 화장료 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 염증성 질환은 알레르기, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통, 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 개선용 화장료 조성물.

청구항 11

알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 염증성 질환은 알레르기, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통, 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 알디시아 텡크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.) 추출물 또는 이의 분획물을 이용한 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증(inflammation)이란 외부 감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)의 침입에 의하여 형성되는 농양의 병리적 상태를 뜻한다. 구체적으로, 외부 세균이 특정 조직에 침입하여 증식을 하게 되면 생체의 백혈구가 이를 인지하여 증식된 외부 세균을 활발히 공격하게 되는데, 이 과정 중 발생하는 백혈구의 사해가 균에 의하여 침입받은 조직에 축적됨과 동시에 백혈구에 의하여 사멸된 침입균의 세포 파괴물이 침입 받은 조직 내로 용해되어 농양이 형성된다. 염증에 의한 농양의 치료는 소염작용을 통하여 촉진될 수 있는데, 소염작용이란 항균제를 이용하여 침입균의 증식을 억제하거나 농양 중에 축적된 이물질들을 탐식하는 대식세포(macrophage)를 활성화하여 상기 이물질들을 소화 및 배설하는 대식세포의 기능을 향진시키는 등의 염증치료 촉진작용이다.

[0003] 일반적으로 염증 반응은 생체의 세포나 조직에 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려고 하는 생체의 방어 반응과정이다. 따라서 이러한 일련의 반응에는 국소의 혈관, 체액의 각종 조직세포, 면역관련 세포 등이 포함된다고 한다. 최근 분자생물학의 발달과 더불어 염증성 질환이 사이토카인(cytokine)이라는 분자 수준에서의 이해가 시도되고 있으며, 이러한 질환에 영향을 주는 인자들도 하나씩 규명되고 있다.

[0004] 염증을 유도하는 사이토카인과 매개체들은 핵의 요소에 의해 조절된다. 그 예로 NF-κB(nuclear factor-kappa B)는 Rel 유전자계(Rel gene family)의 핵단백질로서 7가지가 있고, 세포질에서는 IκB(inhibitory kappa B)와 결합되어 불활성인 형태로 존재하나, 유해산소(reactive oxygen), TNF-α(tumor necrosis factor-alpha)과 같은 케모카인(chemokines) 및 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide;LPS)와 같은 다양한 자극에 의해 IκB 키나제가 활성화된 후 인산화 과정을 통해 IκB가 떨어져 나가게 된다. p50과 p65의 헤테로다이머(heterodimer)로 구성된 NF-κB는 활성화된 후, 핵으로 이동하여 염증반응을 유도하는 유전자(종양괴사인자나 사이클로옥사이드 합성효소) 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Oh GT *et al.*, *Artherosclerosis*, 159(1):17-26, 2001; Epstein FH *et al.*, *The New England Journal of Medicine*, 336(15):1066-1071, 1997; Zhang WJ *et al.*, *FASEB J*, 15(130):2423-2431, 2001; Denk A *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276(30):28451-28458, 2001; Sahnoun Z *et al.*, *Physiology*, 53(4):315-339, 1998; Lindner V *Pathobiology*, 66(6):311-320, 1998; Landry DB *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 151(4):1085-1095, 1997; ; Gerritsen ME *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 147(2):p278-292, 1995).

[0005]

[0006] 나이트릭 옥사이드(Nitric oxide; NO)는 나이트릭 옥사이드 합성효소(NOS)에 의해 L-아르기닌(L-arginine)이 산화되어 생성되는데, 염증과정의 매개체로서 병원성 DNA를 손상시키는 방어작용을 함으로써 항상성을 유지하는 역할을 한다(Kou and Schroder, *Annals of Surgery* 221, 220-235, 1995). NOS 중에서 유도성 나이트릭옥사이드 합성효소(iNOS; inducible nitric oxide synthase)는 세포내에서 NO의 과생산에 아주 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)와 류코트리엔(Leukotriene) 또한, 아라키도닉산(arachidonic acid)으로부터 생성되는 염증 매개체로서 특히, PGE₂는 사이클로옥사이드 합성효소(COX-2; cyclooxygenase-2 enzyme)에 의해 생성되며 주로 대식세포와 단핵구세포에서 많이 생성되는데, 대식세포는 리포폴리사카라이드와 같은 염증성 제제에 의해 빠르게 유도된다는 것이 밝혀졌다.

[0007] 염증유발을 위해 동물모델에서 사용되는 물질들은 adjuvant, collagen II, carrageenan 등이 있는데, 해조류의 일종인 *Chondrus crispus*에서 추출한 carrageenan은 면역반응 억제 외에도 급성 염증 및 만성염증유발, DIC유발, 종양의 성장 촉진, Hageman factor와 kinin의 활성화, 보체의 불활성화 등 다양한 생물학적 작용이 있는 것으로 알려져 있다(Chan WY *et al.*, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 147: 48, 1965).

[0008] 지금껏 일류가 개발한 약제 중 가장 강력한 항염작용을 지니고 있는 약제는 스테로이드 제제이다. 그러나 장기적으로 사용할 때 반드시 부작용을 수반하게 된다. 따라서 염증 치료에 있어 스테로이드제는 처음 사용할 때 놀라울 정도의 효과를 발휘하여 증상을 완전 소실시켜버리지만 이는 잠시일 뿐이고, 증상은 스테로이드 사용을 중지함과 함께 다시 나타나며 반복사용과 함께 증상은 더욱 심해져 간다. 스테로이드제의 부작용으로는 등근 다혈성의 얼굴, 체액의 저류, 부신억제, 감염에 대한 감수성의 증가와 기타 정신병, 백내장, 녹내장, 소화성 궤양, 창상치유 지연, 초기 감염의 재활성화 등의 많은 부작용을 가지고 있다.

[0009] 따라서 천연식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 의약품이나, 별도의 정제 과정 없이 안전하게 섭취할 수 있으며 염증을 억제할 수 있는 효과가 있고, 용이하게 식품에 이용할 수 있는 물질에 대한 연구가 필요한 실정이다. 그 예로 일본 히로사키대 및 오사카대 연구진은 아토피성 피부염이 염증반응을 일으키는 유전자군을 조절하는 단백질의 하나인 NF-κB가 면역세포의 특정 유전자와 결합하여 염증성 물질을 만들어 발현된다는 것에 착안하여 NF-κB가 결합하는 유전자와 유사한 인공 DNA를 투여하여 인공 DNA와 NF-κB를 결합시켜 NF-κB의 작용을 억제하게 한 아토피성 치료제를 개발하여 임상에서 유효성을 확인한 바 있다. 그리고 스위스 노타비스사는 아스코마이신의 유도제 일종으로, 염증을 유발하는 사이토카인의 방출을 선택적으로 억제하는 기전을 가진 아토피성 피부염 치료제인 Pimecrolimus 성분의 "엘리텔"을 개발하여 시판하고 있다. 또한, 영남대 약대 장현욱 교수 연구팀은 삼백초와 가죽나무의 추출물이 천식과 알레르기 치료에 효과가 있고, 19일 한국과마에 기술 선급료 1억 5000만원, 경상실시료 매출액의 4%로 기술이전 계약을 체결하였다(약사공론 2006년 1월 22일 기사자료).

[0010] 지금까지 알레르기 질환에서 특징적으로 나타나는 다양한 종류의 사이토카인 및 케모카인에 대한 항체를 이용한 알레르기 질환 치료제로써 다래 추출물을 이용한 알레르기 치료제, 천연초 선인장 발효추출물을 이용한 알레르기성 피부염 치료제 및 특정 유산균을 이용한 항염증 질환 치료제 개발 등이 이루어져 왔으나, 현재까지 알디시아 텅크토리아를 이용한 항염증 치료제에 대한 개발은 이루어지지 않고 있는 실정이다.

[0011] 알디시아 텡크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.)는 Myrsinaceae과에 속하는 식물이며, 민간에서 검정색 염료로 사용되었다고 알려져 있으나, 동속식물인 *A. crenata*, *A. pusilla*의 경우 항산화활성이 있으며(2008-001634, Japan Patent), *A. elliptica* 식물에서 분리된 시링산(syringic acid), 이소람테틴(isorhamnetin), 퀘서틴(queretin) 등의 성분들이 항균활성(살모넬라)을 갖는다는 연구결과(Methin Phadungkit & Omboon Luanratana, 20(7), 693-696, 2006, Natural Product Research) 등 동속식물에 대한 연구결과는 다양한 반면, 알디시아 텡크토리아에 대한 연구나, 성분에 대한 연구는 전혀 보고된 바가 없다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 해외식물추출물을 대상으로 염증활성에 관련한 스크리닝을 수행한 결과, 알디시아 텡크토리아 추출물이 염증 유발에 의해 급격히 증가한 NO와 PGE₂ 및 IL-6(interleukin-6)와 IL-1beta 사이토카인의 양을 현저하게 낮추는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 이러한 염증 억제 작용 기작에 관한 연구로서 알디시아 텡크토리아 추출물이 iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질의 발현을 억제함과 p65단백질의 핵전이와 신호전달물질의 인산화를 억제함을 확인하였으며, 카라기난으로 유도된 마우스 족부종 모델에서도 알디시아 텡크토리아 추출물이 염증억제 효과가 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 알디시아 텡크토리아 추출물은 식물 유래의 세포독성이 없는 안전한 물질로서, 알레르기를 포함하는 다양한 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 알디시아 텡크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물, 피부외용제, 화장품 조성물 및 건강식품용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 알디시아 텡크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 피부 외용제를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0017] 아울러, 본 발명은 알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 알디시아 텡크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.) 추출물 또는 이의 분획물은 우수한 항염증활성을 가지고, 세포독성이 거의 없으므로, 염증관련 질환, 알레르기 질환 등의 예방 및 치료를 위한 의약품, 가공식품, 기능성 식품, 식품첨가제, 기능성 음료, 또는 음료첨가제 등의 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 Raw264.7 세포에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 나이트릭 옥사이드 생성에 대한 알디시아 텡크토리아 추출물의 억제효과를 나타낸 도이다(#는 음성대조군 대비 P<0.001 이하 및 *는 양성대조군 대비 P<0.05 이하):

-; DMSO만 처리한 음성대조군;

+; LPS 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 유도된 양성대조군;

5; 알디시아 텡크토리아 추출물을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 LPS로 유도;

10; 알디시아 텡크토리아 추출물을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 LPS로 유도;

20; 알디시아 텡크토리아 추출물을 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 LPS로 유도; 및

30; 알디시아 텡크토리아 추출물을 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 LPS로 유도

도 2는 LPS로 유도된 나이트리옥사이드 합성효소의 발현에 대한 알디시아 텡크토리아 추출물의 억제효과를 나타낸 도이다:

a; 핵산 증폭법;

b; 웨스턴블라팅; 및

c; 면역형광염색법.

도 3은 LPS로 유도된 프로스타글란딘의 생성에 대한 알디시아 텡크토리아 추출물의 억제효과를 나타낸 도이다(#는 음성대조군 대비 $P < 0.001$ 이하 및 *는 양성대조군 대비 $P < 0.005$ 이하).

도 4는 LPS로 유도된 프로스타글란딘의 발현에 대한 알디시아 텡크토리아 추출물의 억제효과를 나타낸 도이다:

a; 핵산 증폭법; 및

b; 웨스턴블라팅.

도 5는 LPS로 유도된 사이토카인 생성에 대한 알디시아 텡크토리아 추출물의 저해효과를 나타낸 도이다(#는 음성대조군 대비 $P < 0.001$ 이하, *는 양성대조군 대비 $P < 0.005$ 이하 및 **는 양성대조군 대비 $P < 0.05$ 이하).

a; IL-6(interleukin-6); 및

b; IL-1beta(interleukin-1beta).

도 6은 LPS로 유도된 p65의 핵전이에 대한 알디시아 텡크토리아 추출물의 저해효과를 나타낸 도이다:

LPS; LPS로 유도한 군; 및

LPS+AT; AT를 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 LPS로 유도.

도7은 LPS로 유도된 신호전달물질의 인산화에 대한 알디시아 텡크토리아 추출물의 저해효과를 나타낸 도이다.

도 8은 카라기난으로 유도된 마우스 족부종에 대한 알디시아 텡크토리아 추출물의 저해효과를 나타낸 도이다:

대조군; PBS만 투여한 군;

카라기난; PBS 투여후 카라기난으로 염증 유도;

AT; 알디시아 텡크토리아 추출물을 40 mg/kg 투여후 카라기난으로 유도;

ATE; 알디시아 텡크토리아 에틸아세테이트 분획물을 40 mg/kg 투여후 카라기난으로 유도; 및

인도메타신; 인도메타신 5 mg/kg을 투여후 카라기난으로 유도.

도 9는 알디시아 텡크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.) 추출물과 분획물의 TLC(Thin Layer Chromatography)를 나타낸 그림이다:

T: 알디시아 텡크토리아 추출물;

H: 알디시아 텡크토리아 n-헥산 분획물;

C: 알디시아 텡크토리아 클로로포름 분획물;

E: 알디시아 텡크토리아 에틸아세테이트 분획물;

B: 알디시아 텡크토리아 부탄올 분획물; 및

W: 알디시아 텡크토리아 물 분획물.

도 10은 알디시아 텡크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.) 추출물과 분획물의 CAD(Charge Aerosol Detector)를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어 "염증"이란 외부 감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발 물질)의 침입에 의하여 형성되는 농양의 병리적 상태를 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어 "알레르기"는 어떤 외래성 물질과 접한 생체가 그 물질에 대하여 정상과는 다른 반응을 나타내는 현상을 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 염증성 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 염증성 질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 염증성 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0029] 본 발명은 알디시아 텡크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0030] 상기 염증성 질환은 알레르기, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 상기 알디시아 텡크토리아 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [0032] 1) 알디시아 텡크토리아에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0033] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및
- [0034] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축한 후 건조하는 단계.
- [0035] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 알디시아 텡크토리아는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0036] 상기 알디시아 텡크토리아는 잎, 줄기 또는 뿌리가 모두 이용가능하다.

- [0037] 상기 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂ 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 알디시아 텡크토리아 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 30 내지 100℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 3 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0039] 본 발명의 알디시아 텡크토리아 추출물의 분획물은 상기 알디시아 텡크토리아 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 상기 유기용매로는 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 분획물로는 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 단계적으로 첨가한 후, 각 용매 첨가 단계에서 가용성 분획을 획득한 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물, 및 상기 부탄올 분획물을 제거하고 남은 물층을 농축한 물 분획물이 모두 사용가능하나, 에틸아세테이트 분획물인 것이 가장 바람직하다.
- [0041] 본 발명의 한가지 측면에서, 알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 분획물의 세포독성을 확인하기 위하여, 생쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 96웰 플레이트(well plate)에 접종하여 부착한 후, 알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 다양한 농도로 처리하여 배양한 후, 흡광도를 측정하였으며, 세포생존율은 DMSO를 처리한 음성대조군을 100%로 하여 계산한 결과, 알디시아 텡크토리아 추출물 또는 이의 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물은 20 µg/ml의 농도까지 독성이 없음을 확인하였다(표 1 참조).
- [0042] 본 발명의 한가지 측면에서, 알디시아 텡크토리아 추출물의 염증 억제 효과를 알아보기 위하여, Raw264.7 세포에서 리포폴리사카라이드로 유도된 나이트릭 옥사이드(nitric oxide; NO)의 생성량을 측정된 결과, LPS에 의해 증가된 나이트릭옥사이드 생성량을 알디시아 텡크토리아 추출물이 강하게 억제함을 확인하였으며, 특히, 에틸아세테이트 분획물이 가장 강한 나이트릭옥사이드 생성저해효과(69.87±2.74%)를 나타내는 것을 확인하였다(표 2 참조). 또한, LPS 단독 처리한 군에 비해 알디시아 텡크토리아 추출물을 전처리하고 LPS로 염증을 유도한 군에서 농도의존적으로 나이트릭 옥사이드 생성량이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 1 참조).
- [0043] 또한, 본 발명의 한가지 측면에서, 알디시아 텡크토리아 추출물의 iNOS 유전자 및 단백질 발현 억제 효과를 확인하기 위하여 RT-PCR(Reverse transcription-Polymerase chain reaction), 웨스턴 블랏 및 면역형광염색법을 수행한 결과, 리포폴리사카라이드를 처리한 세포에서 iNOS 유전자 발현이 증가하는 것을 확인하였고, 알디시아 텡크토리아 추출물을 처리한 세포에서는 처리농도에 따라 iNOS의 핵산 발현량 및 iNOS의 단백질 발현이 현저히 줄어드는 것을 확인하였다(도 2 참조).
- [0044] 또한, 본 발명의 한가지 측면에서, 알디시아 텡크토리아 추출물의 프로스타글란딘 E₂(Prostaglandin E₂) 생성 저해 효과를 확인한 결과, 리포폴리사카라이드만 처리한 세포에서는 프로스타글란딘 E₂ 생성이 급격히 증가하는 반면, 알디시아 텡크토리아 추출물을 전처리한 세포에서는 농도의존적으로 프로스타글란딘 E₂ 생성이 저해되는 것을 확인하였다(도 3 참조).
- [0045] 또한, 본 발명의 한가지 측면에서, COX-2 발현에 대한 알디시아 텡크토리아 추출물의 억제 효과를 확인한 결과, 알디시아 텡크토리아 추출물을 전처리한 세포에서는 처리농도에 따라 COX-2의 핵산 발현량 및 단백질 발현이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 4 참조).
- [0046] 또한, 본 발명의 한가지 측면에서, 알디시아 텡크토리아 추출물의 사이토카인 생성 저해 효과를 확인한 결과, LPS의 처리로 증가된 IL-6 및 IL-beta 사이토카인의 양은 알디시아 텡크토리아 추출물을 전처리함으로써 농도의 전적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 5a 및 도 5b 참조).
- [0047] 또한, 본 발명의 한가지 측면에서, 알디시아 텡크토리아 추출물의 NF-κB 단백질인 p65의 이동저해효과를 확인

한 결과, LPS만 처리했을 때 세포질의 p65의 양이 30분까지 감소하는 반면, 핵내의 p65 양은 증가하는 것을 확인하였다. 그러나, 알디시아 톱크토리아를 전처리후 LPS로 유도했을 경우, 핵내의 p65 양의 증가가 미약함을 확인하였다(도 6 참조).

[0048] 또한, 본 발명의 한가지 측면에서, 알디시아 톱크토리아 추출물의 신호전달 단백질의 인산화 억제 효과를 확인한 결과, 대식세포에 알디시아 톱크토리아 추출물을 전처리하고 LPS를 처리한 경우, JNK와 p38은 전체형태는 단백질의 변화가 없었으며, LPS에 의해 인산화형태의 단백질 발현이 증가함을 확인하였으며, 알디시아 톱크토리아 추출물 처리에 대해서는 변화가 없었다. 반면, ERK 단백질은 알디시아 톱크토리아 추출물 처리시 전체형태의 단백질은 변화가 없었으며, 인산화형태의 단백질 또한 발현 증가가 억제됨을 확인하였다(도 7 참조).

[0049] 또한, 본 발명의 한가지 측면에서, 알디시아 톱크토리아 추출물이 동물세포에 대해 염증저해효과가 우수하였기에 동물실험을 통해 염증저해 효과를 확인한 결과, 카라기난으로 유도된 마우스 족부종 모델에서도 알디시아 톱크토리아 추출물과 에틸아세테이트 분획물이 유의적인 염증억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 8 참조).

[0050] 따라서, 본 발명의 알디시아 톱크토리아 추출물 또는 이의 분획물은 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 나이트릭옥사이드 생성을 저해하고, 농도의존적으로 PGE₂ 및 IL-6(interleukin-6)와 IL-1beta 사이토카인의 양을 현저하게 낮추며, iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질의 발현을 억제함과 p65단백질의 핵전이와 신호전달물질의 인산화를 억제하고, 카라기난으로 유도된 마우스 족부종 모델에서도 유의적인 염증억제 효과를 나타내므로, 염증관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0051] 본 발명의 알디시아 톱크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 조성물은 상기 성분은 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0052] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리코디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 알디시아 톱크토리아 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수용용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다.

[0055] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 알디시아 톱크토리아 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0056] 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화

학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

- [0057] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 염증성 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0058] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 방법을 제공한다.
- [0059] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0060] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.
- [0061] 상기 투여 방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0062] 상기 염증성 질환은 알레르기, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물은 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 나이트릭옥사이드 생성을 저해하고, 농도의존적으로 PGE₂ 및 IL-6(interleukin-6)와 IL-1beta 사이토카인의 양을 현저하게 낮추며, iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질의 발현을 억제함과 p65단백질의 핵전이와 신호전달물질의 인산화를 억제하고, 카라기난으로 유도된 마우스 족부종 모델에서도 유의적인 염증억제 효과를 나타내므로, 염증관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0064]
- [0065] 또한, 본 발명은 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 피부외용제를 제공한다.
- [0066] 상기 염증성 질환에는 알레르기, 부종, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 궤양성 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 다양한 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0067] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물은 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 나이트릭옥사이드 생성을 저해하고, 농도의존적으로 PGE₂ 및 IL-6(interleukin-6)와 IL-1beta 사이토카인의 양을 현저하게 낮추며, iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질의 발현을 억제함과 p65단백질의 핵전이와 신호전달물질의 인산화를 억제하고, 카라기난으로 유도된 마우스 족부종 모델에서도 유의적인 염증억제 효과를 나타내므로, 다양한 염증성 질환 예방 및 치료용 피부외용제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 피부 외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 피부용 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한, 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

- [0069] 상기 피부 외용제에 알디시아 텅크토리아 추출물의 투여량은 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여기간, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명은 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0071] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물은 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 나이트릭옥사이드 생성을 저해하고, 농도의존적으로 PGE₂ 및 IL-6(interleukin-6)와 IL-1beta 사이토카인의 양을 현저하게 낮추며, iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질의 발현을 억제함과 p65단백질의 핵전이와 신호전달물질의 인산화를 억제하고, 카라기난으로 유도된 마우스 족부종 모델에서도 유의적인 염증억제 효과를 나타내므로, 염증성 질환 예방 및 개선용 화장품 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 화장품 조성물로 사용하는 경우, 예를 들면 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 폼말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.
- [0073] 상기 화장품 조성물은 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물에 추가로 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.
- [0074] 아울러, 본 발명은 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0075] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물은 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 나이트릭옥사이드 생성을 저해하고, 농도의존적으로 PGE₂ 및 IL-6(interleukin-6)와 IL-1beta 사이토카인의 양을 현저하게 낮추며, iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질의 발현을 억제함과 p65단백질의 핵전이와 신호전달물질의 인산화를 억제하고, 카라기난으로 유도된 마우스 족부종 모델에서도 유의적인 염증억제 효과를 나타내므로, 다양한 염증성 질환 예방 및 개선용 건강식품용 조성물의 성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0076] 상기 염증성 질환에는 알레르기, 부종, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 궤양성 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 다양한 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명의 건강식품은 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0078] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 알디시아 텅크토리아 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0079] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사

카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0080] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 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 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0081] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0082] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0083] <실시예 1> 알디시아 텅크토리아(*Ardisia tinctoria* Pit.) 추출물의 제조

[0084] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 100% 메탄올 추출물은 한국생명공학연구원 해외생물소재허브센터의 해외식물추출물은행에서 구입하였으며, 증거표본(KRIB 0027026)은 한국생명공학연구원 식물표본관(KRIB, Herbarium of the Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)에 보관되어 있다.

[0085] 구체적으로 추출과정을 살펴보면, 알디시아 텅크토리아(잎, 어린 가지, 꽃)를 건조한 후, 분쇄된 분말시료 113 g에 메탄올 1 l를 가한 후 초음파추출기(SDN-900H, SD-ULTRASONIC CO., LTD)를 이용하여 상온에서 30회(40 KHz, 15분 추출-120분 정지) 반복추출하였다. 그런 다음 여과하여 감압농축한 후, 알디시아 텅크토리아 메탄올 추출물(이하 알디시아 텅크토리아 추출물이라 명함) 10.33 g을 수득하였다. 본 발명에서는 알디시아 텅크토리아 추출물을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 20 mg/ml의 농도가 되도록 용해시킨 후, 농도별로 희석하여 사용하였다.

[0086] <실시예 2> 알디시아 텅크토리아의 용매 분획물 제조

[0087] 상기 <실시예 1>에서 얻어진 알디시아 텅크토리아 추출물 중 450 mg 에 증류수를 첨가하여 현탁시키고, 동량의 n-헥산을 가하여 혼합 후 n-헥산가용성 분획부와 물가용성 분획부를 분리하였으며, 이를 3회 실시하여 여과, 감압농축하여 n-헥산 분획물 90.4 mg을 수득하였다. 그런 다음, 상기 n-헥산 분획물을 제거하고 남은 물층에 클로로포름을 동량 가하여 같은 방법으로 클로로포름 분획물 22.0 mg 수득하였고, 다시 남은 물층에 에틸아세테이트를 동량 가하여 같은 방법으로 에틸아세테이트 분획물 44.8 mg을 수득하였으며, 또다시 남은 물층에 부탄올을 동량 가하여 동일한 방법으로 부탄올 분획물 57.6 mg을 수득하였으며, 남은 물층을 농축하여 물 분획물 205.2 mg을 수득하였다.

[0088] <실시예 3> 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물의 TLC 조사

[0089] 상기 <실시예 1>과 <실시예 2>에서 얻어진 알디시아 텅크토리아 추출물과 분획물을 10mg/ml의 농도로 메탄올에 녹인 후 실리카겔 박층 크로마토그래피(TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck)를 시행하여 비극성 물질들을 확인하였다. 전개용매로는 n-헥산 : 아세톤의 비율이 2 : 1인 혼합용매로 하였다. 또한, 극성물질들을 확인해 보기 위해 실리카겔 역상 크로마토그래피(TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S, Merck)를 실시하였고, 전개용매는 메탄올 50%로 하였다(도 10).

[0090] <실시예 4> 알디시아 텅크토리아의 추출물 또는 이의 분획물의 UPLC 분석

[0091] 상기 <실시예 1>과 <실시예 2>에서 얻어진 알디시아 텅크토리아 추출물과 분획물을 10mg/ml로 메탄올에

녹인 후 0.2 μm의 membrane filter로 여과하였다. 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC, Ultra Performance Liquid Chromatography)는 Waters Acquity UPLC 시스템을 이용하였으며, 컬럼은 ACQUITY UPLC™ BEHC₁₈(10mm X 2.1 mm, i.d., 1.7 μm, waters, 미국)을 35℃에서 사용하였으며, 이동상 A는 물과 formic acid (100:0.1, v/v)로 이동상 B는 acetonitril과 formic acid (100:0.1,v/v)로 하여 초기에 이동상 B를 10%로 1분동안 유지시킨 후, 5분까지 45%로 증가, 7.5분까지 100%로 이동상 B를 증가시켜 분석 한 후, 이동상 B를 100%로 9분까지 유지시키고, 9.5분까지 이동상 B를 10%로 낮추고 11분까지 10%로 안정화시켜 분석에 사용하였다. 이동상의 유속량은 0.4 ml/min 그리고 시료 주입량은 3 μl로 하였다.

[0092] CAD(Charge Aerosol Detector)는 UPLC로부터 분리되어진 물질들에 전하(Charge)를 붙여주어 그 전하를 측정하는 detector로써 크로마토그래피 형식으로 물질의 상대적 함량과 분리도를 확인해 볼 수 있다(도 11).

[0093] <실험예 1> 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물에 대한 세포독성실험

[0094] 본 발명자들은 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물의 세포 생존율에 대한 영향을 확인하기 위하여, 생쥐의 대식세포인 Raw264.7 세포를 소태아혈청(Fetal Bovine Serum) 5% 첨가한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배지에 1 × 10⁵개/ml의 농도로 현탁하여 100 μl씩 96웰 플레이트에 접종하여 부착하였다. 4시간 후에 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 20 μg/ml의 농도로 처리하거나, 알디시아 텅크토리아 추출물을 0, 5, 10, 20 및 30 μg/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, 5 mg/ml의 MTT용액을 웰 당 10 μl씩 첨가하여 4시간 더 배양한 후, 상등액을 제거하고, DMSO를 100 μl씩 첨가한 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포생존율은 DMSO를 0.2% 처리한 음성대조군을 100%로 하여 하기 수학적식에 따라 계산하였다.

수학적식 1

$$\text{세포 생존율}(\%) = \frac{\text{추출물처리한 OD570nm 값}}{\text{음성대조군 OD570nm 값}} \times 100$$

[0095]

표 1

시료 (20 μg/ml)	세포생존율 (%)
음성대조군	100.00 ± 0.98
알디시아 텅크토리아 추출물	88.06 ± 2.37
알디시아 텅크토리아 헥산 분획물	4.61 ± 0.26
알디시아 텅크토리아 클로로포름 분획물	5.59 ± 0.67
알디시아 텅크토리아 에틸아세테이트 분획물	101.13 ± 1.50
알디시아 텅크토리아 부탄올 분획물	88.20 ± 3.21
알디시아 텅크토리아 물 분획물	88.31 ± 1.88

[0096]

[0097] 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이 알디시아 텅크토리아 추출물과 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물은 세포생존율에 미치는 영향이 거의 없으나, 헥산 분획물과 클로로포름 분획물은 아주 강한 세포생존율 저해효과를 나타내는 것을 확인하였다(표 1).

[0098] <실험예 2> 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물의 NO 생성 저해 효과

[0099] 본 발명자들은 알디시아 텅크토리아 추출물의 염증 억제 효과를 알아보기 위하여, Raw264.7 세포에서 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide; LPS, Sigma사)로 유도된 나이트릭 옥사이드(nitric oxide; NO)의 생성량을 측정하였다.

[0100] 구체적으로, ATCC에서 구입한 마우스 대식세포 Raw264.7를 소태아혈청(Fetal Bovine Serum) 5%를 첨가한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배지에 2.5×10^5 개/ml 농도로 현탁하여 96웰 플레이트(96 well plate)에 200 μ l씩 접종하였다. 4시간 동안 부착시킨 후, 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 각각 20 μ g/ml 혹은 알디시아 텅크토리아 추출물을 0, 5, 10, 20, 및 30 μ g/ml의 농도로 처리하여 1시간 동안 배양한 후에 0.5 μ g/ml의 LPS를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 상층액 100 μ l를 회수하여 새로운 96웰 플레이트에 넣고, 그리스 시약(Griess reagent, Sigma사)을 동량 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 측정기(microplate reader, Bio-Rad사)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 소듐 나이트라이트(sodium nitrite)를 이용하여 검량선을 작성하고, 이를 기준으로 배양액 내의 나이트릭 옥사이드 생성량을 구하였으며, LPS를 처리한 군의 나이트릭 옥사이드 생성량을 100%로 하여 각 시료의 저해율을 계산하였다.

[0101] 그 결과, 표 2 에 나타난 바와 같이, LPS에 의해 증가된 나이트릭옥사이드 생성량을 알디시아 텅크토리아 추출물이 강하게 억제함을 확인하였으며, 특히, 에틸아세테이트 분획물이 가장 강한 나이트릭옥사이드 생성저해효과(69.87±2.74%)를 나타내었다. 반면에 n-헥산(NO저해율;68.87±2.45%, 세포생존율;4.61±0.26%)과 클로로포름(NO저해율;72.67±1.81%, 세포생존율;5.59±0.67%) 분획물의 나이트릭옥사이드 생성저해효과는 세포생존율이 감소했기 때문에 나타난 결과로 확인되었다(표 1 및 2).

[0102]

표 2

시료 (20 μ g/ml)	NO 생성저해율 (%)
LPS+알디시아 텅크토리아 추출물	42.54 ± 4.74
LPS+알디시아 텅크토리아 헥산 분획물	68.87 ± 2.45
LPS+알디시아 텅크토리아 클로로포름 분획물	72.67 ± 1.81
LPS+알디시아 텅크토리아 에틸아세테이트 분획물	69.87 ± 2.74
LPS+알디시아 텅크토리아 부탄올 분획물	5.12 ± 3.81
LPS+알디시아 텅크토리아 물 분획물	9.29 ± 2.35

[0103]

[0104] 또한, 도 1에 나타난 바와 같이, LPS를 단독 처리한 군에 비해 알디시아 텅크토리아 추출물을 전처리하고 LPS로 염증을 유도한 군에서 농도의존적으로 나이트릭 옥사이드 생성량이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 1).

[0105] <실험예 3> iNOS 발현에 대한 알디시아 텅크토리아 추출물의 저해 효과

[0106] <3-1> 핵산증폭법 (RT-PCR)

[0107] 알디시아 텅크토리아 추출물의 iNOS 유전자 발현 억제 효과를 확인하기 위하여 RT-PCR(Reverse transcription-Polymerase chain reaction)을 수행하였다.

[0108] 구체적으로, <실험예 1>의 방법으로 100 mm 페트리디쉬에 1×10^6 개의 세포를 분주하고, 알디시아 텅크토리아 추출물을 농도별로 처리하고, LPS로 염증을 유도시켜 24시간 배양 후, 배지를 제거한 다음에 세포를 배양용기로부터 떼어내어 리보핵산 추출 용액(Invitrogen, CA, 미국)을 사용하여 세포를 균질화하였다. 5분 후에 세포를 모아서 원심분리관에 옮기고, 200 μ l의 클로로포름을 넣고 15초간 완전히 섞어주고, 3분간 방치한 후, 14000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 리보핵산을 포함하는 상등액을 새로운 관에 옮겨 담고 아이소프로필알코올 500 μ l와 혼합하였다. 10분 후 다시 원심분리를 하여 상등액은 버리고, 침전물에 75% 에탄올 1 ml을 넣고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액은 버리고 침전된 리보핵산은 20분간 상온에서 건조시켰다. 건조

된 리보핵산은 DEPC(Diethylpyrocarbonate, Sigma)가 처리된 증류수로 현탁하였다. 리보핵산은 정량 후, Omniscript RT kit (Pharmingen, 미국)를 이용하여 상보적 핵산(complementary DNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA를 템플릿(template)로 하고, iNOS 프라이머(정방향 프라이머 5'-GGA GCG ACT TGT GGA TTG TC-3';서열번호 1, 역방향 프라이머 5'-GTG AGG GCT TGG CTG AGT GAG-3';서열번호 2)를 혼합하고, PCR Premix(Fermentas, 미국)를 사용하여 유전자의 발현 정도를 확인하였다.

[0109] 그 결과, 도 2a에서 보는 바와 같이 음성대조군에 비해 리포폴리사카라이드를 처리한 세포에서 iNOS 유전자 발현이 증가하는 것을 확인하였고, 알디시아 텅크토리아 추출물을 처리한 세포에서는 처리농도에 따라 iNOS의 핵산 발현량이 현저히 줄어드는 것을 확인하였다(도 2a).

[0110] <3-2> 웨스턴블라팅 (Western blotting)

[0111] 알디시아 텅크토리아 추출물의 iNOS 단백질의 발현 억제 효과를 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0112] 구체적으로, 상기 <실험예 3-1>과 동일한 방법으로 시료를 처리한 세포에서 배지를 제거한 다음에 세포를 배양 용기로부터 떼어내어 단백질 분해효소 저해제(Protease inhibitor cocktail, Roche, 미국)를 함유한 단백질 용출용액(CelLytic™-MT Tissue Lysis Reagent, Sigma, 미국)을 사용하여 균질화하였다. 추출액은 20분 동안 14000 rpm에서 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액의 단백질 농도는 바이오-라드 단백질 분석 키트(Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad, 미국)를 이용하여 측정하였다. 또한, 상등액을 5× SDS(0.156M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 37.5% 글리세롤, 37.5 mM DTT)와 1:4로 섞어 100℃에서 10분간 끓였다. 끓인 시료에서 20 μg 단백질을 SDS 4-12% SDS-PAGE 겔에 로딩하고 125 V에서 2시간 동안 전기영동 하여 분자량에 따라 분리하였고, 상기 단백질을 겔 한 장당 100 mA의 조건으로 1시간 동안 전기영동 하여 PVDF 막으로 옮겼다. 이 막에 1차 항체로 항-iNOS 항체(1:100, Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 결합시킨 후, 감광하여 분석하였다.

[0113] 그 결과, 도 2b에서 나타내는 바와 같이 대식세포에 리포폴리사카라이드와 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물을 전처리한 경우 농도의존적으로 iNOS의 단백질 발현이 감소하였다(도 2b).

[0114] <3-3> 면역형광염색법 (Immunofluoresence)

[0115] 약 2× 10⁵ 개/ml 세포를 퍼머노스 챔버 플라스틱 슬라이드(Permanox chambered plastic slides; Nunc, 미국)에 부착시키고, 상기 <실험예 2>에서와 같이 대식세포에 염증을 유도한 후, 상등액을 제거하고, 인산완충액(PBS)로 세척하였다. 이후 4℃에서 30분간 에탄올로 고정하였고, 세척한 후, 3% 소혈청알부민(bovine serum albumin)으로 실온에서 30분간 차단하였다. 차단 후 1차 항체[항-iNOS 항체(1:100)]를 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 인산완충액으로 3번 세척한 이후에 텍사스레드(Texas red; Santa Cruz Biotechnology, 미국)가 연결된 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 실온의 암조건에서 2시간 동안 반응하였다. 인산완충액으로 프로롱 골드 안티페이드 용액(ProLong Gold Antifade reagent, Invitrogen, 미국)으로 3번 마운팅한 후 공초점 현미경(LSM510m Carl Zeiss, Germany)으로 촬영하였다.

[0116] 그 결과, 도 2c에서 보는 바와 같이, 리포폴리사카라이드만 처리한 세포에서는 iNOS의 단백질 발현이 급격히 증가하는 반면, 알디시아 텅크토리아 추출물을 전처리한 세포에서는 단백질의 발현이 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다(도 2c).

[0117] <실험예 4> 프로스타글란딘 생성에 관한 알디시아 텅크토리아 추출물의 억제 효과

[0118] 알디시아 텅크토리아 추출물의 프로스타글란딘 E₂(Prostaglandin E₂) 생성 저해 효과를 확인하기 위한 실험으로서, 상기 <실험예 2>와 동일한 방법으로 처리한 Raw264.7 세포의 배양 상층액을 취하여 프로스타글란딘 측정 키트(PGE₂ assay kit; R&D systems, Minneapolis, 미국)를 사용하여 프로스타글란딘 E₂(Prostaglandin E₂)의 생성 저해 효과를 측정하였다.

[0119] 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 리포폴리사카라이드만 처리한 세포에서는 프로스타글란딘 E₂ 생성이 급격히

증가하는 반면, 알디시아 텅크토리아 추출물을 전처리한 세포에서는 농도의존적으로 프로스타글란딘 E₂ 생성이 저해되는 것을 확인하였다(도 3).

[0120]

[0121] <실험예 5> COX-2 발현에 대한 알디시아 텅크토리아 추출물의 억제 효과

[0122] <5-1> 핵산증폭법 (RT-PCR)

[0123] 상기 <실험예 3-1>에서 합성된 cDNA를 템플릿(template)로 하고, COX-2 프라이머(정방향 프라이머 5'-GAA GTC TTT GGT CTG GTG CCT G-3'; 서열번호 3, 역방향 프라이머 5'-GTC TGC TGG TTT GGA ATA GTT GC-3'; 서열번호 4)를 혼합한 후, PCR Premix (Fermentas, 미국)를 사용하여 유전자의 발현 정도를 확인하였다.

[0124] 그 결과, 도 4a에서 보는 바와 같이 음성대조군에 비해 리포폴리사카라이드를 처리한 세포에서 COX-2 유전자 발현이 증가하는 것을 확인한 반면, 알디시아 텅크토리아 추출물을 전처리한 세포에서는 처리농도에 따라 COX-2의 핵산 발현량이 현저히 줄어드는 것을 확인하였다(도 4a).

[0125] <5-2> 웨스턴블라팅 (Western blotting)

[0126] 상기 <실험예 3-2>와 동일한 방법으로 단백질을 부착시킨 막에 1차 항체로 항-COX-2 항체(1:100, Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 결합시킨 후, 감광하여 분석하였다.

[0127] 그 결과, 도 4b에서 보는 바와 같이 대식세포에 리포폴리사카라이드와 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물을 전처리한 경우 농도의존적으로 COX-2의 단백질 발현이 감소하였다(도 4b).

[0128] <실험예 6> 알디시아 텅크토리아 추출물의 사이토카인 생성 저해 효과

[0129] 본 발명자들은 알디시아 텅크토리아 추출물의 사이토카인 생성 저해 효과를 확인하기 위하여, LPS로 유도된 IL-6(interleukin-6)와 IL-1beta의 생성량을 효소면역학적 분석키트(mouse IL-6 ELISA set; BD OptEIA™, 미국 혹은 mouse IL-1beta Enzyme Immunometric Assay Kit; Assay designs, 미국)를 이용하여 측정하였다.

[0130] 구체적으로, 상기 <실험예 2>과 동일한 방법으로 Raw264.7 세포를 배양한 후, 상층액 100 μl를 회수하여 마우스 면역글로불린을 코팅한 96 웰플레이트에 분주하여 2시간 동안 교반하며 반응시켰다. 그런 다음, 세척용액으로 4회 세척한 다음, 제 1차 항체인 항-IL-6 항체 혹은 항-IL-1beta 항체를 100 μl씩 분주한 후 2시간 반응시켰다. 반응 후에 세척을 하고 제 2차 항체를 분주하고 30분간 반응시켰다. 다시 세척한 후 기질을 넣어 30분간 반응시킨 다음, 발색 정도를 마이크로플레이트 측정기로 450 nm에서 측정하였다.

[0131] 그 결과, 도 5에서 보는 바와 같이, LPS의 처리로 증가된 각각의 IL-6와 IL-1beta 사이토카인의 양이 알디시아 텅크토리아 추출물을 전처리함으로써 인하여 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 5a 및 5b).

[0132] <실험예 7> 알디시아 텅크토리아 추출물의 NF-κB 단백질의 이동저해효과

[0133] 알디시아 텅크토리아 추출물의 NF-κB 단백질인 p65의 이동저해효과를 확인하기 위하여 Raw264.7 세포에 알디시아 텅크토리아를 30μg/ml의 농도로 처리하고 30분 후에 LPS를 0.5μg/ml의 농도로 처리한 후, 시간별로 세포를 수집하여 핵과 세포질 단백질 추출용액(NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo Fisher Scientific Inc., 미국)을 이용하여 각각 용출하였다.

[0134] 단백질은 실험예 <3-2>와 동일한 방법으로 PVDF막에 부착시키고, 이를 p65 항체를 부착시켜서 단백질 발현량을 확인하였다.

[0135] 그 결과, 도 6에서 보는 바와 같이 LPS만 처리했을 때 세포질의 p65의 양이 30분까지 감소하는 반면, 핵내의 p65 양은 증가하는 것을 확인하였다. 그러나, 알디시아 텅크토리아를 전처리후 LPS로 유도했을 경우, 핵내의 p65 양의 증가가 미약함을 확인하였다(도 6).

[0136] <실험예 8> 알디시아 텅크토리아 추출물의 신호전달 단백질의 인산화 억제 효과

[0137] 상기 <실험예 7>의 방법으로 처리된 세포를 배양용기로부터 떼어내어 단백질 분해효소 저해제 및 인산화분해효소(phosphatase inhibitor, Roche, 독일)를 함유한 단백질 용출용액을 사용하여 균질화하였다. 추출액은 20분 동안 14000 rpm에서 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액의 단백질을 정량하여 시료당 20 µg의 단백질을 SDS 10% SDS-PAGE 겔에 전기영동한 후, PVDF 막으로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막에서 단백질이 없는 부분을 탈지분유로 차단(blocking)시킨 다음, 1차 항체로 항-ERK, 항-p38 MAPK, 항-JNK(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, 미국)의 전체형태의 항체를 부착하거나, 항-p38 MAPK과 항-JNK(1:1000, Enzo, Rarmingdale, NY) 또는 항-ERK(1:1000, Cell Signaling Technology, 미국)의 인산화형태의 항체를 부착한 후, 2차 항체를 순차적으로 결합시켰다.

[0138] 그 결과, 도 7에서 보는 바와 같이 대식세포에 알디시아 텅크토리아 추출물을 전처리하고 LPS를 처리한 경우, JNK와 p38은 전체형태는 단백질의 변화가 없었으며, LPS에 의해 인산화형태의 단백질 발현이 증가함을 확인하였으며, 알디시아 텅크토리아 추출물 처리에 대해서는 변화가 없었다. 반면, ERK 단백질은 알디시아 텅크토리아 추출물 처리시 전체형태의 단백질은 변화가 없었으며, 인산화형태의 단백질 또한 발현 증가가 억제됨을 확인하였다(도 7).

[0139] <실험예 9> 카라기난(carrageenan) 유도 마우스 족부종에 대한 알디시아 텅크토리아 추출물의 억제효과

[0141] 알디시아 텅크토리아 추출물이 동물세포에 대해 염증저해효과가 우수하였기에 동물실험을 통해 염증저해 효과를 확인하였다.

[0142] 구체적으로, 무게가 20-25g인 BALB/c 암컷 마우스(코아텍, 대한민국)를 4-5마리씩 무작위적으로 선정하여 각 그룹으로 나누었다. 알디시아 텅크토리아 추출물 혹은 에틸아세테이트 분획물은 인산완충액(PBS)에 초음파로 녹여서 40 mg/kg의 농도로 투여하였으며, 음성대조군으로는 PBS를 투여하였으며, 양성대조군으로는 인도메타신(Indomethacin, Sigma, 미국)을 5 mg/kg의 농도로 투여하였다. 30분 후에, 염증을 유도하기 위하여 PBS에 녹인 카라기난(1% v/v) 용액을 마우스의 왼발에 25 µl씩 주사하였다. 발의 두께는 카라기난을 주사하기 전에 캘리퍼(Digital caliper, Niigata Seiki, 일본)로 측정하였으며, 카라기난 주사하고 4시간 후에 다시 측정하여 염증 유도정도를 계산하였다.

[0143] 그 결과, 도 8에서 보는 바와 같이 음성대조군은 카라기난에 의해 발의 두께가 0.85 ± 0.12 mm 증가하였으나, 알디시아 텅크토리아 추출물을 전처리한 군에서는 0.32 ± 0.05 mm 증가하였으며, 알디시아 텅크토리아 에틸아세테이트 분획물을 전처리한 군에서는 0.38 ± 0.07 mm 증가하였기에 알디시아 텅크토리아 추출물 및 분획물 모두 카라기난으로 유도된 마우스 족부종을 억제효과가 있음을 확인하였다(도 8).

[0144] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0145] <1-1> 산제의 제조

[0146] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 2 g
 [0147] 유당 1 g
 [0148] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0149] <1-2> 정제의 제조

[0150] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 100 mg
 [0151] 옥수수전분 100 mg
 [0152] 유당 100 mg
 [0153] 스테아린산 마그네 2 mg

[0154] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0155] <1-3> 캡슐제의 제조

[0156] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 100 mg

[0157] 옥수수전분 100 mg

[0158] 유 당 100 mg

[0159] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0160] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0161] <1-4> 환의 제조

[0162] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 1 g

[0163] 유당 1.5 g

[0164] 글리세린 1 g

[0165] 자일리톨 0.5 g

[0166] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0167] <1-5> 과립의 제조

[0168] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 150 mg

[0169] 대두추출물 50 mg

[0170] 포도당 200 mg

[0171] 진분 600 mg

[0172] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섞씨 60 °C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[0173] <제조예 2> 식품의 제조

[0174] <2-1> 밀가루 식품의 제조

[0175] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0176] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0177] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0178] <2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0179] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0180] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0181] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0182] <2-5> 선식의 제조

[0183] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0184] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0185] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0186] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0187] 곡물류(현미 30 중량부, 울무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0188] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0189] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물(3 중량부),

[0190] 영지(0.5 중량부),

[0191] 지황(0.5 중량부).

[0192] <제조예 3> 음료의 제조

[0193] <3-1> 건강음료의 제조

[0194] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0195] <3-2> 야채 주스의 제조

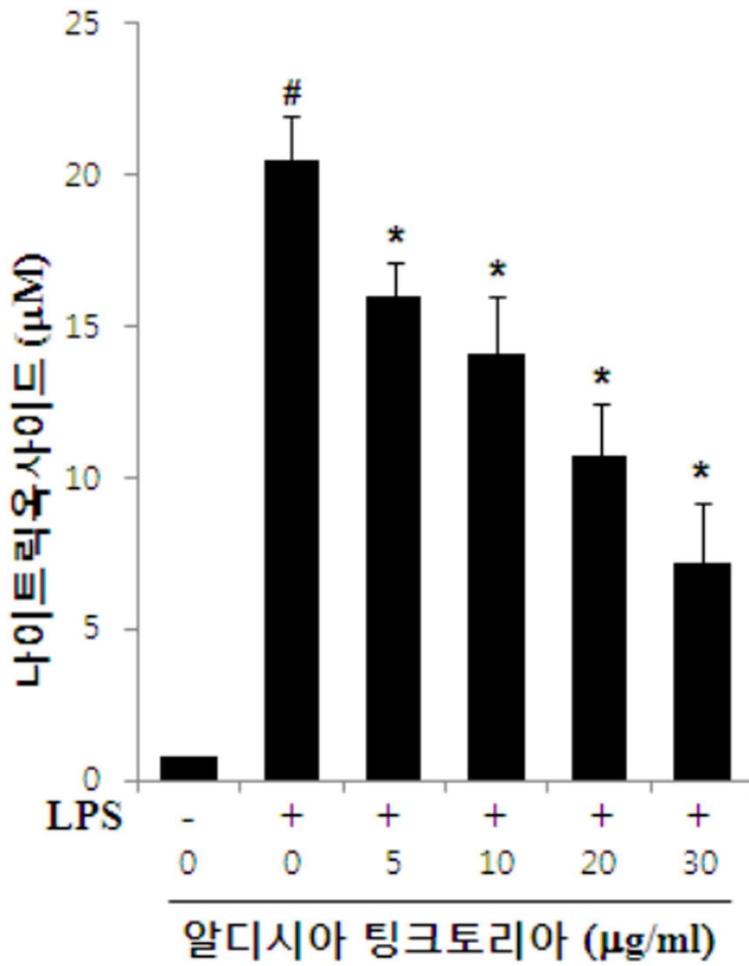
[0196] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0197] <3-3> 과일 주스의 제조

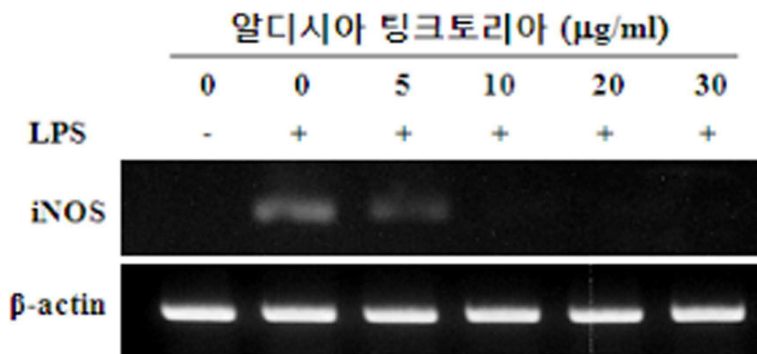
[0198] 본 발명의 알디시아 텅크토리아 추출물 또는 이의 분획물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

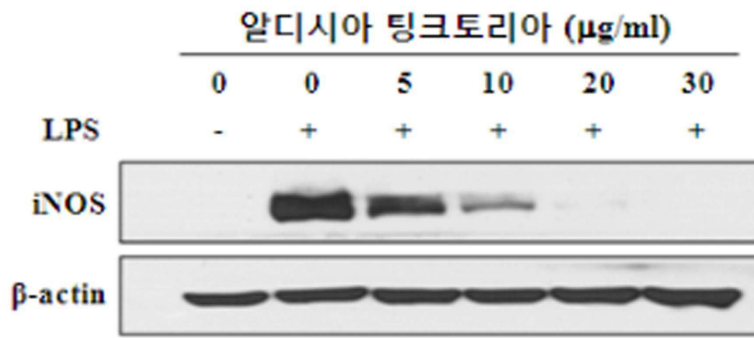
도면1



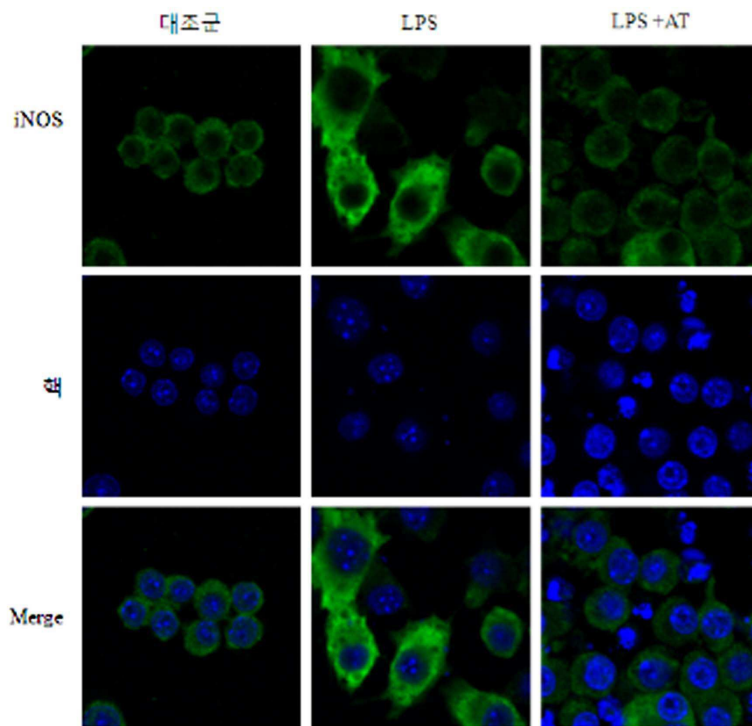
도면2a



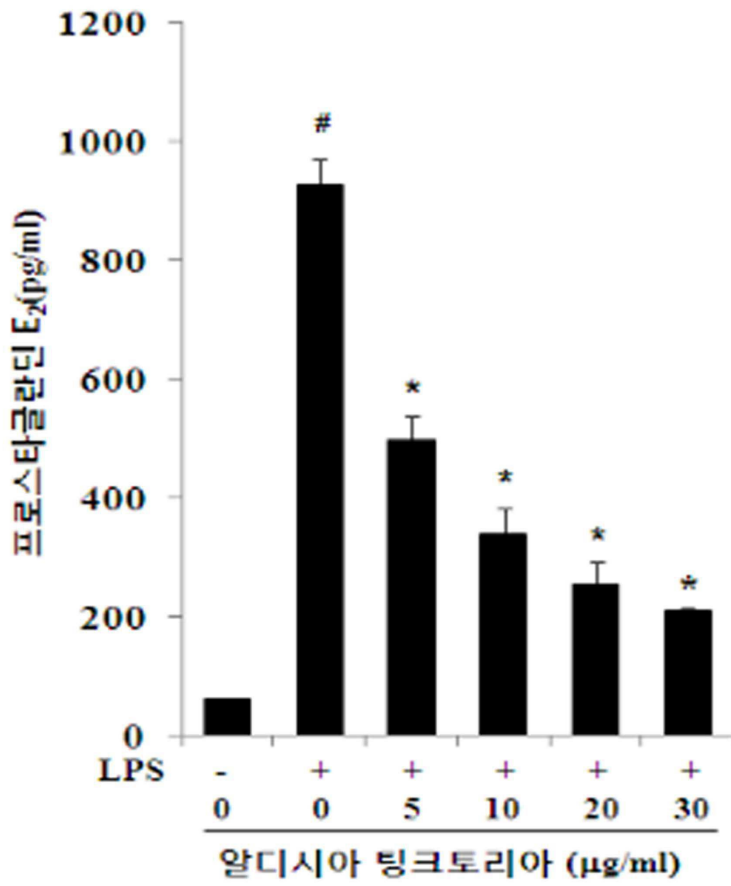
도면2b



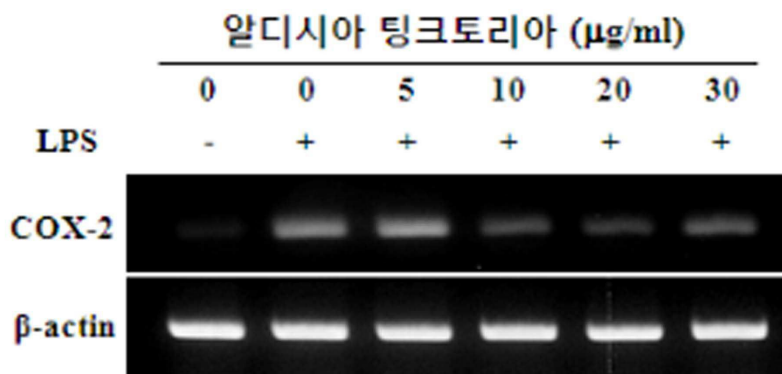
도면2c



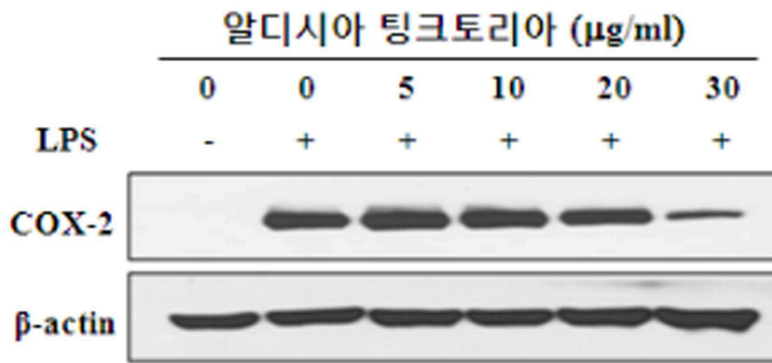
도면3



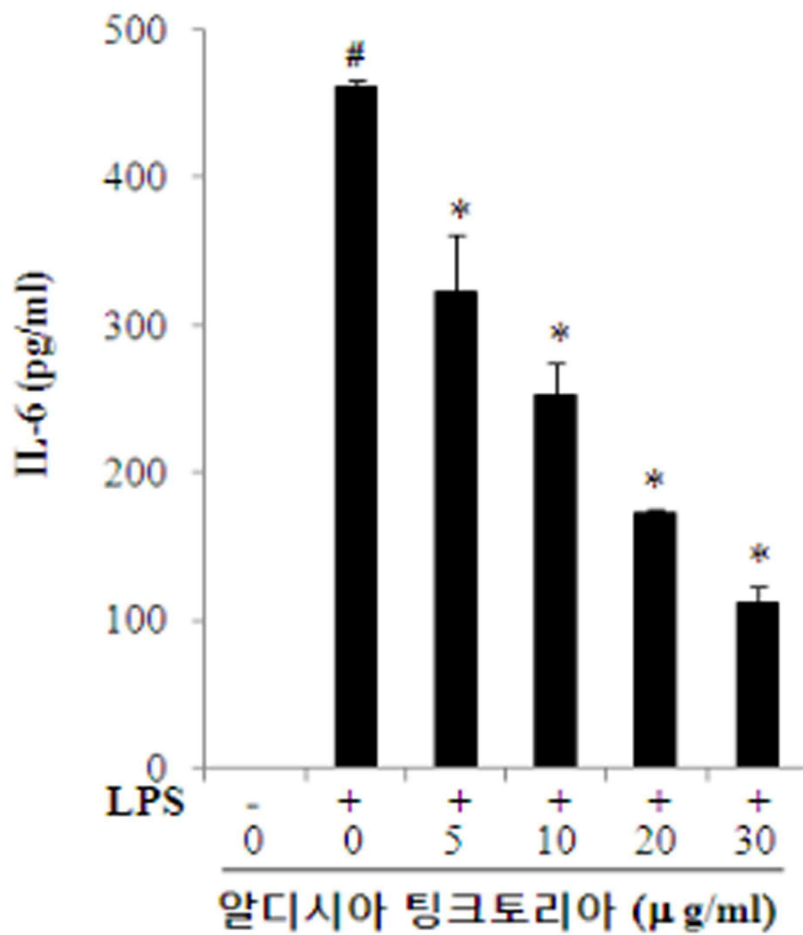
도면4a



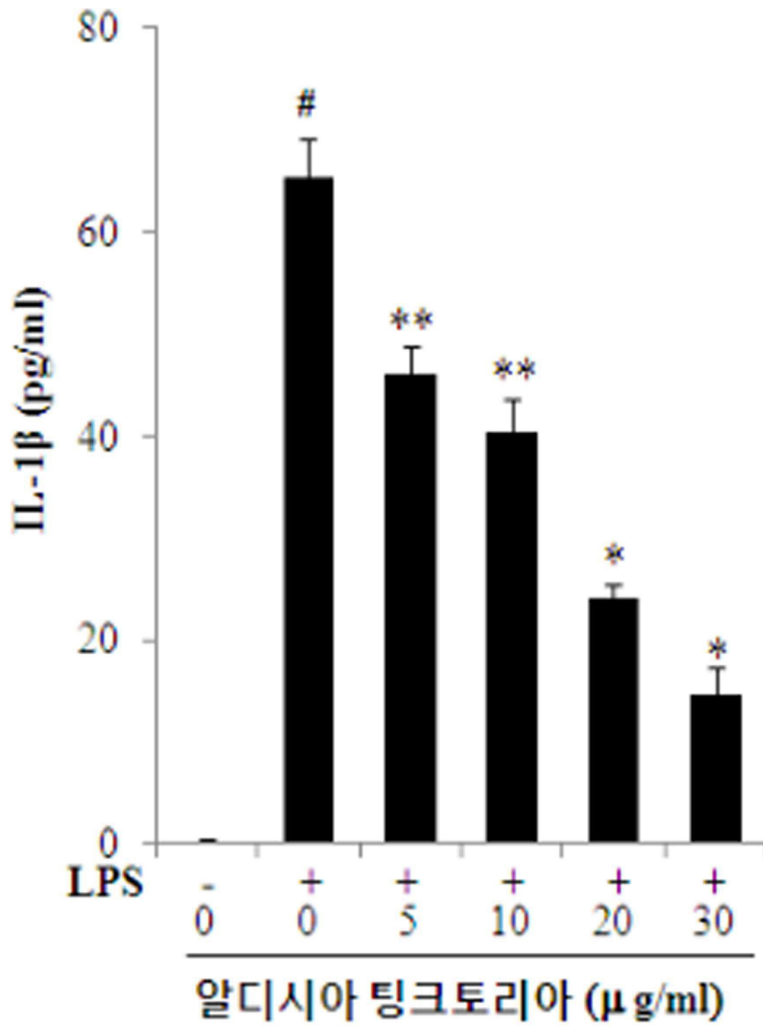
도면4b



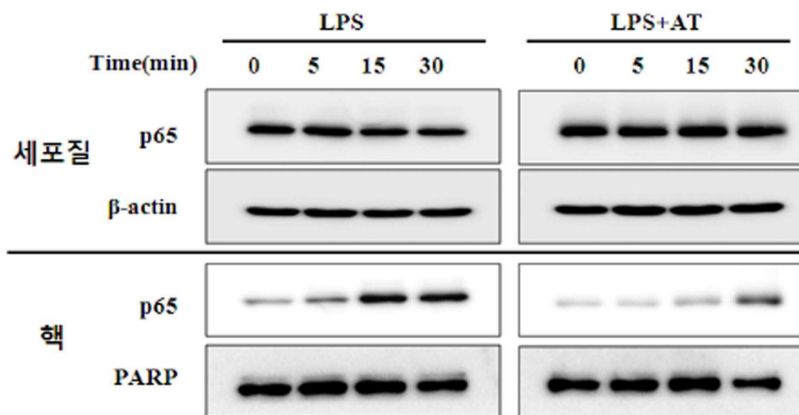
도면5a



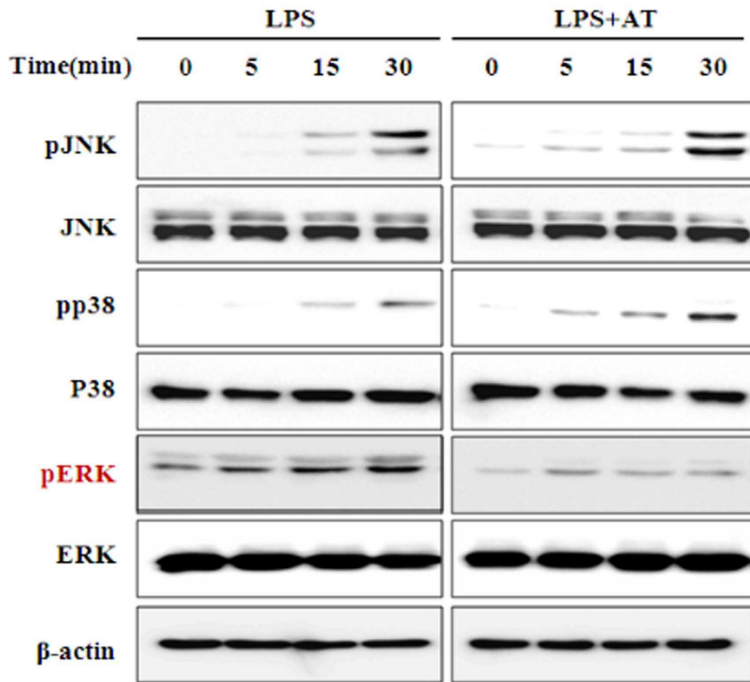
도면5b



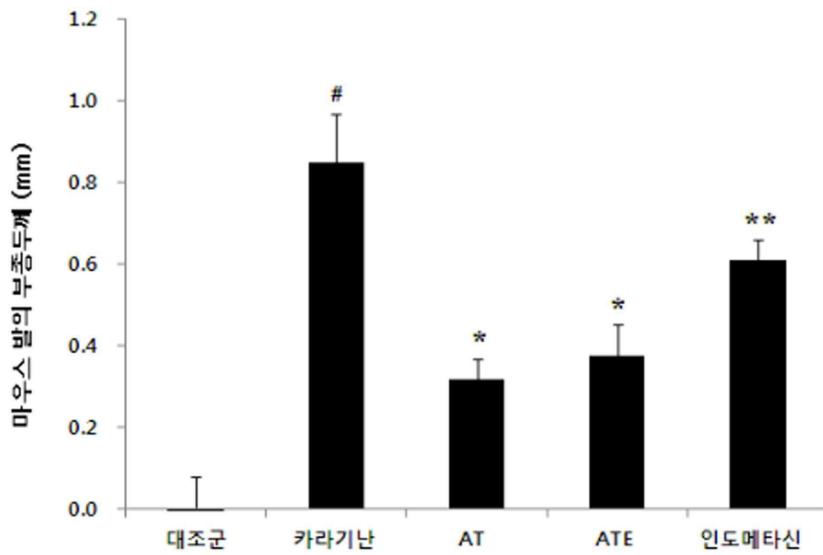
도면6



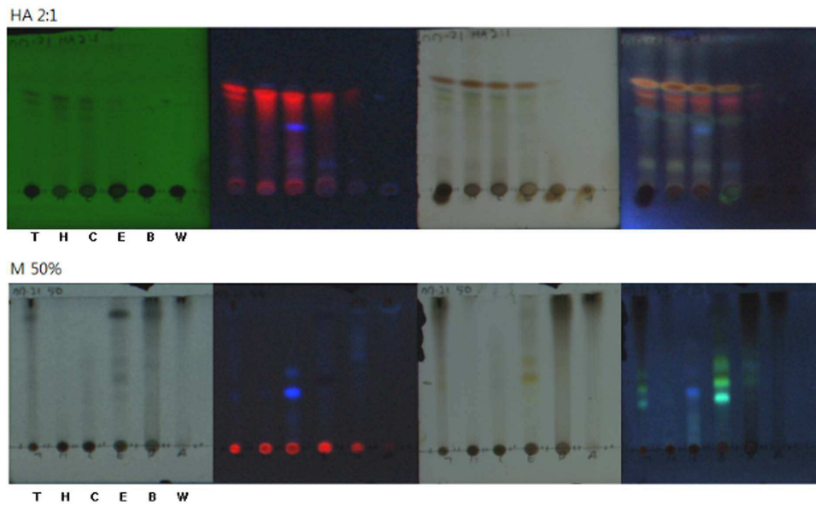
도면7



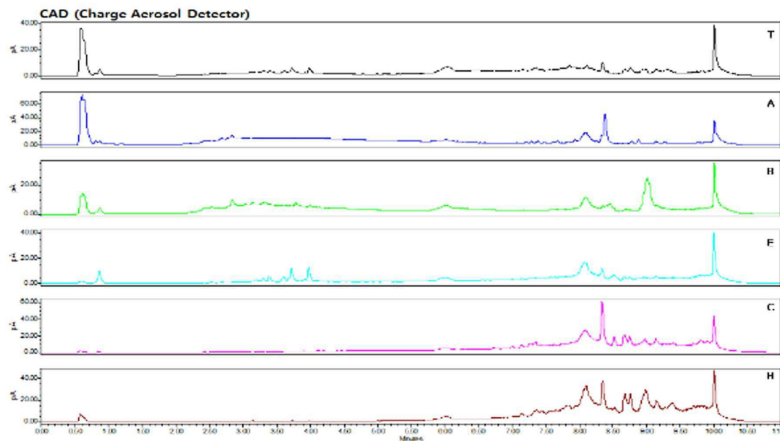
도면8



도면9



도면10



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Pharmaceutical composition for prevention and treatment of inflammatory diseases comprising extract or fractions of Ardisia tinctoria Pit. as an active ingredient
- <130> 12p-06-17
- <160> 4
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> iNOS forward primer

<400>	1	
ggagcgactt	gtggattgctc	20
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	iNOS reverse primer	
<400>	2	
gtgaggcctt	ggctgagtga g	21
<210>	3	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COX-2 forward primer	
<400>	3	
gaagtctttg	gtctggtgcc t	21
<210>	4	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COX-2 reverse primer	
<400>	4	
gtctgctggt	ttggaatagt tgc	23