



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0046094  
(43) 공개일자 2013년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/185 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)  
A61P 19/02 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0110452  
(22) 출원일자 2011년10월27일  
심사청구일자 2011년10월27일  
(71) 출원인  
연세대학교 원주산학협력단  
강원도 원주시 연세대길 1  
(72) 발명자  
김택중  
강원도 원주시 무실 e-편한세상 아파트 204동  
1703호  
(74) 대리인  
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 9 항

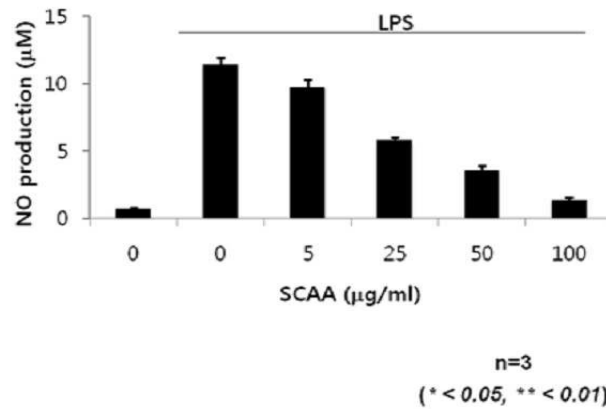
(54) 발명의 명칭 어저귀 추출물을 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 의약 조성물

(57) 요약

본 발명은 어저귀 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

상기 조성물은 산화질소와 산화질소 합성효소 억제 작용을 나타내어 염증성질환 특히, 류마티스 관절염 또는 천식에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-8-5159
부처명	농생명바이오식의약소재개발사업단
연구사업명	차세대바이오그린21
연구과제명	에리오딕티올 및 노다케닌을 이용한 신기능성 아토피 피부개선 화장품 천연소재 개발
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2011.12.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

어저귀 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 의약 조성물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

어저귀 추출물은 어저귀의 잎, 열매, 뿌리, 줄기, 씨, 씨껍질 또는 이들의 혼합물의 추출물인 염증성질환 예방 또는 치료용 의약 조성물.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

어저귀 추출물은 유기용매, 물 또는 이들의 혼합용매 추출물인 염증성질환 예방 또는 치료용 의약 조성물.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

염증성질환은 류마티스 관절염 또는 천식인 염증성질환 예방 또는 치료용 의약 조성물.

### 청구항 5

어저귀 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

### 청구항 6

제 5 항에 있어서,

어저귀 추출물은 어저귀의 잎, 열매, 뿌리, 줄기, 씨, 씨껍질 또는 이들의 혼합물의 추출물인 염증성질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

### 청구항 7

제 5 항에 있어서,

어저귀 추출물은 유기용매, 물 또는 이들의 혼합용매 추출물인 염증성질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

### 청구항 8

제 5 항에 있어서,

염증성질환은 류마티스 관절염 또는 천식인 염증성질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

## 청구항 9

어저귀를 유기용매, 물 또는 이들의 혼합용매로 추출하는 단계를 포함하는 어저귀 추출물의 제조 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 어저귀 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 만성 염증 질환(예, 류마티스 관절염 및 천식)은 체내에 면역성의 이상으로 발생한다. 예를 들면, 류마티스 관절염은 균이나 바이러스의 침입으로부터 몸을 보호하기 위해 면역계가 상기 균 또는 바이러스를 제거하면서 자신의 관절이나 몸의 일부를 공격하여 증상을 일으키게 된다. 류마티스 관절염은 우리 나라 인구 중 약 1%가 이 질병을 앓고 있을 정도로 심각하며, 더 나아가 합병증에 시달리고 있다. 또한, 기관지 천식은 기침, 호흡 곤란 및 가슴 답답함 등과 함께 기관지 경련을 동반하는 질환으로, 통계적으로 전 인구의 7~10%를 차지할 정도로 흔히 볼 수 있는 질환이지만 현재까지 기관지 천식을 근절시키는 치료법은 아직 제시되지 못하고 있으며, 기관지 천식 증상이 심할 경우에만 임시방편적으로 기관지 확장제 등의 치료로 치료의 모든 것을 대체하고 있는 실정이다. 최근에는 환경 오염 등으로 인하여 상기 기관지 천식 환자의 수가 많아지는 경향을 나타내고 있다.

[0003] 이제까지는 만성 염증 질환의 진통 증상에는 비스테로이드성 진통 소염제 또는 부신 피질 호르몬제 등을 사용하였으나, 상기 치료제를 만성적으로 복용할 경우에는 위장장애 및 위궤양 등의 심각한 부작용을 초래할 우려가 있다. 따라서, 염증 질환을 치료할 수 있는 새로운 의약품의 개발이 시급하다.

[0004] 한편, 어저귀(*Abutilon avicennae*)는 쌍떡잎식물 아욱목 아욱과의 한해살이풀로서 원산지는 인도이다. 섬유식물로 한때 많이 재배하였으며 들로 퍼져 나간 것도 있다. 귀화식물로 높이 1.5m 정도이며 전체가 털로 덮여있다. 잎은 어긋나고 잎자루가 길며 심원형으로서 가장자리에 둔한 톱니가 있으며, 꽃은 8 내지 9월에 피고 황색이며 잎겨드랑이에 모여 달린다. 꽃받침조각과 꽃잎은 5개씩으로 밑부분이 합쳐지고, 수술은 합쳐져서 통처럼 되어있으며, 암술에는 10여 개의 방으로 갈라진 씨방이 있다. 열매는 삭과이고, 9월에 결실하며, 심피가 둘러난 모양으로 배열되고, 흑색으로 익으며, 뾰족한 끝이 밖으로 젖혀진다. 또한, 종자의 겉에는 털이 있다. 어저귀는 줄기에서 윤기가 나는 섬유를 채취하여 로프와 마대를 만들고, 찌꺼기는 종이 원료로 이용할 수 있다.

[0005] 상기 어저귀 추출물이 항염증 작용에 대한 효과를 가진다는 사실은 현재까지 알려진 바 없으며, 따라서 이를 주요 유효 성분으로 포함하는 항염증 치료용 조성물 또한 현재까지 알려진 바 없다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 어저귀 추출물로부터 산화질소 및 산화질소 합성효소의 발현을 억제할 수 있는, 즉, 염증성질환을 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 개발하여, 이를 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 의약 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

#### 과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 오랫동안 한약이나 민간약의 형태로 염증과 통증을 억제하는 목적으로 사용되거나, 고의약서에서 항염증 효과가 있다고 기술되어 있는 천연물로부터 산화질소 및 산화질소 합성효소의 발현을 억제할 수 있는지, 즉 염증 제거 활성을 보이는지 연구한 결과, 어저귀 추출물이 이러한 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0008] 따라서, 본 발명에서는 어저귀 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는

다.

- [0009] 본 발명에서 어저귀 추출물은 어저귀의 잎, 열매, 뿌리, 줄기, 씨, 씨껍질 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 어저귀 씨껍질을 사용할 수 있다. 또한, 어저귀 추출물의 제조 시에는 건조 또는 미건조시킨 어저귀 또는 이들의 혼합물을 사용하여 추출할 수 있으며, 상기 어저귀를 잘게 부수어 추출할 수 있다.
- [0010] 본 발명에서 어저귀 추출물의 제조를 위해서는 어저귀 3 내지 10 배의 추출 용매를 사용하여 통상적인 추출 방법에 따라 추출할 수 있다.
- [0011] 추출 용매로는 천연물 추출에서 널리 이용되고 있는 물, 유기 용매 또는 이들의 혼합 용매를 이용할 수 있다. 상기 유기 용매로는 에탄올, 메탄올, 헥산, 클로로포름 및 에탈아세테이트 등이 포함된다. 이러한 유기 용매는 물과 혼합하여 사용할 수 있으나, 활성 성분의 용이한 용출을 위해서 물과 혼합하지 않고 사용할 수도 있다. 한 구체예에서, 상기 어저귀 추출물은 에탄올 추출물일 수 있다.
- [0012] 본 발명에 있어서, '어저귀 추출물'은 이와 같이 추출에 의해 얻어지는 추출액, 회석액, 농축액 또는 건조물을 포함한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 어저귀를 유기용매, 물 또는 이들의 혼합용매로 추출하는 단계를 포함하는 어저귀 추출물의 제조 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 하기 실시예에서는, 어저귀를 에탄올로 추출하였다. 이러한 어저귀 추출물은 산화질소 및 산화질소 합성효소 발현 억제 효과를 보인다.
- [0015] 따라서, 본 발명의 어저귀 추출물은 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유효성분으로 포함될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물은, 특히, 산화질소 및 산화질소 합성효소 발현 억제 작용을 하며, 산화질소 및 산화질소 합성효소의 발현에 의해 야기되는 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0017] 상기 산화질소 및 산화질소 합성효소의 발현에 의해 야기되는 질환은 이에 제한되는 것은 아니나, 류마티스 관절염 및 천식으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환일 수 있다.
- [0018] 상기 조성물은 본 발명의 유효성분뿐만 아니라 기존에 공지된 염증성 질환 예방 또는 치료제와 함께 사용될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 어저귀 추출물을 유효성분으로 포함하는 의약 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용할 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0020] 상기 의약 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0021] 상기 의약 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 회석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명의 어저귀 추출물은 통상의 약제학적 방법으로 약제학적으로 허용되는 무기 또는 유기염으로 전환될 수 있다.

- [0023] 또한, 본 발명은 표유동물에게 치료상 유효량의 어저귀 추출물을 투여하는 것을 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0024] 여기에서 사용된 용어 "표유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 표유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0025] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상가에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분 또는 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 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. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 어저귀 추출물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 10 mg 내지 5000 mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0026] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 어저귀 추출물을 유효 성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 어저귀 추출물을 포함하는 염증성질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명에서 염증성질환 예방 또는 개선용 식품 조성물은 전술한 의약 조성물과 같이, 염증성질환 예방 또는 개선에 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 의약 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

### 발명의 효과

- [0030] 본 발명에 따른 어저귀 추출물은 산화질소와 산화질소 합성효소 억제 작용을 나타내어 염증성질환 특히, 류마티스 관절염 또는 천식에 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 LPS에 의해 유도된 산화질소 생성에 대한 어저귀 씨겉질 추출물의 억제효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 LPS에 의해 유도된 산화질소 합성효소와 염증관련 단백질 발현에 대한 어저귀 씨겉질 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 LPS에 의해 유도된 I-kB 발현에 대한 어저귀 씨겉질 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 어저귀 씨겉질 추출물의 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명은 이들의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법을 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명의 청구항의 범위에 의해 정의될 뿐이다.

- [0033] 실시예
- [0034] 제조예. 어저귀 씨겉질 추출물의 제조
- [0035] 어저귀는 농촌진흥청(Rural Development Administration, RDA)의 우수농산물관리제도(Good Agricultural Practice, GAP)에 의해 재배되었으며, 2009년 충청북도 음성(GPS: E 128° 62' N 36° 56')에서 수확되었다.
- [0036] 상기 어저귀의 씨겉질을 99% 에탄올로 추출하여 시험재료로 이용하였다.
- [0037] 실험예: 대식세포의 염증 방어 활성 검색
- [0038] 대식세포(macrophage)의 염증 방어 활성을 갖는 물질을 천연물로부터 창출하는 과정에서 우선 요구되는 것은 이러한 활성을 갖는 물질을 탐색할 수 있는 적절한 검색법의 확립이다. 천연물로부터 염증 방어 활성을 갖는 물질을 찾기 위하여 인간의 대식세포와 생리, 생화학적으로 유사하다고 알려진 흰쥐의 대식세포가 검색계로 널리 사용되고 있다. 천연물을 대상으로 대식세포 보호 활성을 검색하기 위해서는 먼저 배양한 대식세포에 천연물을 처리하고 어느 정도의 시간이 흐른 뒤, 내독소 물질을 처리하여 인위적으로 염증을 일으킬 때 방어효과의 정도를 측정한다.
- [0039] 본 발명에서는 대식세포에 염증을 유발하기 위해, 지질다당류 (lipopolysaccharide: LPS)를 사용하였다. LPS는 그람 음성균 세포벽을 구성하는 주 구성요소이며, 세포질에서 혈장 LPS 결합단백질(LPB)과 결합하여 세포막의 인지질로 이동하여 대식세포 표면에 존재하는 CD14에 결합하거나, LPS 자체가 직접 세포막에 존재하는 95kDa, 80kDa 단백질등과 결합하여 염증반응을 나타낸다(Hewett, J. A. and Roth, R. A.: Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. Pharmacol. Rev. 45, 382-411 (1993)). LPS와 수용체와의 결합은 세포 내 G1 단백질을 자극하고 미토젠 활성화 단백질 카이네이즈(mitogen activated protein kinase: MAPK)의 신호전달체계를 통하여 세포로부터 종양괴사인자(tumor necrosis factor: TNF- $\alpha$ ), 인터루킨-1(IL-1), IL-6, 프로스타노이드(prostanoids), 루코트리엔(leukotriens) 등의 사이토카인(cytokine)류 및 니트로 옥사이드(nitro oxide: NO) 등과 같은 다양한 염증 매개 물질들이 유리된다.
- [0040] 본 실험예에서는 제조예에서 제조된 어저귀 씨겉질 추출물의 대식세포에서 항염증 효과를 알아보기 위하여, LPS에 대한 방어효과를 산화질소의 정량 측정과 산화질소 합성효소(iNOS)와 염증관련 효소(COX-2)의 단백질 수준에서 측정하고, I-kB의 발현을 측정하였다. 또한 어저귀 씨겉질 추출물의 독성을 관찰하기 위하여 세포 생존율을 측정하였다. 본 실험예에서 나타난 데이터는 약물학적 계산(pharmacologic calculation) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 여러 처리군간의 유의성을 one way analysis of variance(ANOVA)로 검정한 후, Newmann-Kelus test로 판정하였다(\*\*p<0.01).
- [0041] (1) Mouse의 대식세포주인 RAW264.7 세포배양
- [0042] 염증반응을 실험하기 위하여 사용한 세포는 수컷쥐에서 추출한 대식세포인 Raw 264.7이며, 이는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받았다. Raw 264.7 세포는 10% 소혈청, 100 U/ml 페니실린과 100 mg/ml 스트렙토마이신이 포함된 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 37℃, 5 % CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양되었다.
- [0043] (2) 산화질소 생성에 대한 어저귀 씨겉질 추출물의 효과측정
- [0044] Raw 264.7 세포를 24 웰 플레이트에 1 x 10<sup>6</sup>cells/ml의 개수로 심은 후, 4 시간 동안 배양하였다. 24 웰 플레이트의 각 웰에 어저귀 씨겉질 추출물을 각 농도(5, 25, 50, 및 100 ug/ml)로 넣고, 30 분간 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후, LPS를 100 ng/ml의 농도가 되도록 각 well에 넣어준 후, 인큐베이터에서 18 시간 동안 배양하였다. 각 웰의 상층액 100 ul를 96 웰 플레이트에 분주하였다. 이 후 그리스 시약(Griess reagent, 1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydro-chloride, 2.5% phosphoric acid) 100 ul를 96 웰 플레이트의 각 well에 동일하게 넣어주고, 5 분간 상온에서 반응시켰다. 마이크로플레이트 리더(Microplate reader)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때, 아질산나트륨을 표준 곡선(standard curve)을 이용하여 농도를 측정하였다.



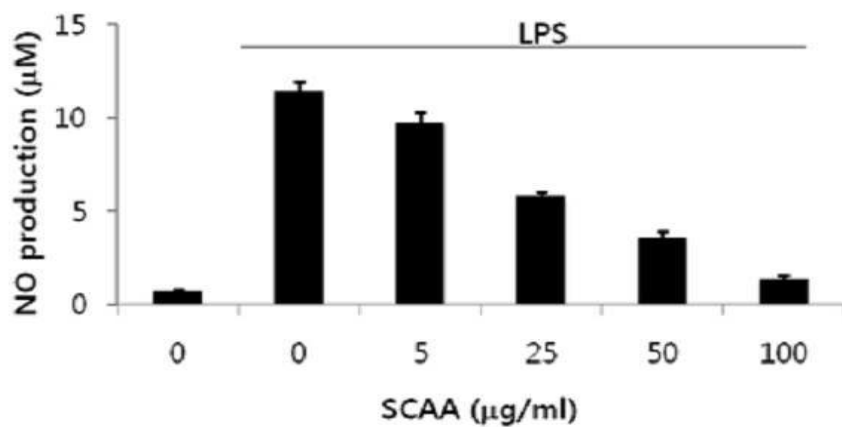
- [0045] 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0046] 도 1은 LPS에 의해 유도된 산화질소 생성에 대한 어저귀 씨겉질 추출물의 억제효과를 나타낸 그래프로, LPS에 의해 유도된 Raw 264.7 세포는 평소에 비해 산화질소의 농도가 급격하게 증가한다. 그러나 LPS에 의해 유도된 Raw 264.7 세포에 어저귀 씨겉질 추출물을 처리하였을 때, 증가되었던 산화질소의 농도는 농도 의존적으로 감소한다. 이를 통해, 어저귀 씨겉질 추출물은 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증 반응에 억제 효과를 가진다는 것을 확인할 수 있다.
- [0047] (3) 산화질소 합성효소(iNOS)와 염증관련 효소 COX-2발현억제, I-kB 발현에 대한 어저귀 씨겉질 추출물의 효과 측정
- [0048] Raw 264.7 세포를 6 웰 플레이트에  $1 \times 10^6$  cells/ml의 개수로 심은 후, 4 시간 동안 배양하였다. 6 웰 플레이트의 각 well에 어저귀 씨겉질 추출물을 각 농도(5, 25, 50, or 100 ug/ml)로 넣고, 30 분간 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후, LPS를 100 ng/ml의 농도로 각 well에 넣어주었다. 6 well plate를 인큐베이터에서 확인하려는 단백질의 조건에 맞는 시간 동안 배양하였다. 각 well을 1x PBS로 2 회 세척하여, pro-prep을 첨가하고 30 분간 4℃에서 반응시켜 균질화(homogenizing)하였다. 이를 스크레이퍼(scraper)를 이용하여 세포를 긁어 1.5 ml 튜브에 담아, vortex와 sonication을 3회 반복하였다. 1 시간 동안 얼음 속에서 반응시킨 뒤, 12000 rpm, 4℃에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질의 정량은 브래드퍼드법(Bradford method)을 이용하여 정량하였다. 단백질 용해물(Protein lysate)은 8 x SDS loading buffer와 혼합하여 5 분간 끓인 후 10% 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)을 통해 전기영동하여 분리하였다. 여기서 분리된 단백질들은 PVDF 멤브레인(PVDF membrane)에 이동(transfer)하여 블롯(blots)한 후, 5% 탈지유 용액에 블로킹(blocking)하였다. 이 후, iNOS 또는 COX-2 단일클론 항체(COX-2 monoclonal antibody(1:2000))를 5% 탈지유 용액에 희석하여 하룻밤(over-night) 반응시켰다. TBS-T를 이용하여 3 회 세척한 후, 안티레빗 IgG 2차 항체(anti-rabbit IgG secondary antibody(1:5000))가 컨쥬게이트된 겨자나무과 산화효소(horseradish peroxidase)를 5% 탈지유 용액에 희석하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. TBS-T를 이용하여 3 회 세척한 후, 증강 화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL) 검출 시약을 이용하여 항원-항체반응을 통해 발색 반응시켜 X-ray film에 이를 감광시켜 확인하였다.
- [0049] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 상기 도 2는 LPS에 의해 유도된 산화질소 합성효소와 염증관련 단백질 발현에 대한 어저귀 씨겉질 추출물의 효과를 나타낸 그래프로, LPS만 단독으로 처리한 대조군에서 iNOS 단백질 및 COX-2 단백질의 발현이 급격하게 증가되었다. 또한, 어저귀 씨겉질 추출물을 각 농도로 처리한 결과, iNOS 단백질 및 COX-2이 단백질농도에 의존적으로 감소하였다. 이를 통해 어저귀 추출물은 LPS에 의해 유도된 Raw 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 억제함으로써, 산화질소의 농도를 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다.
- [0050] 또한, 도 3은 LPS에 의해 유도된 I-kB 발현에 대한 어저귀 씨겉질 추출물의 효과를 나타낸 그래프로, 상기 도 3에 나타나듯이, LPS를 단독으로 처리한 대조군에서 아무것도 처리하지 않은 군에 비해 I-kB의 발현 정도가 감소하였다. 여기에 어저귀 씨겉질 추출물을 농도 별로 처리하였을 때, I-kB의 발현 정도가 농도의존적으로 증가함을 보였고, 어저귀 씨겉질 추출물을 처리한 실험군에서 아무것도 처리하지 않은 군의 수준까지 유의하게 발현이 증가함을 보여주었다. 이를 통해 어저귀 씨겉질 추출물이 I-kB의 발현 저하(degradation)을 막아, 직접적으로 NF-kB의 활성을 억제 한다는 것을 예상할 수 있었다
- [0051] (4) 세포의 생존활성 측정
- [0052] Raw 264.7 세포를 96 웰 플레이트에  $1 \times 10^6$  cells/ml의 개수로 심은 후, 4 시간 동안 배양하였다. 96 웰 플레이트의 각 웰에 어저귀 씨겉질 추출물을 각 농도로 넣고, 인큐베이터에서 23 시간 동안 배양하였다. 96 웰 플레이트의 각 웰에 Ez-cytox kit를 1/10의 용량으로 넣어준 후, 1 시간 동안 추가로 배양하였다. 세포 독성은 마이크로플레이트 리더를 사용하여 450 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다. 이 때, 아무것도 처리하지 않은 세포를 기준으로 독성을 측정하였다.
- [0053] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4는 어저귀 씨겉질 추출물의 세포 생존율을 나타낸 그래프로, 어저귀 씨겉질 추출물을 각 농도로 처리하고 LPS를 처리한 군도 24시간까지 세포 생존율에 영향이 없다.



- [0054] 제제실시예 1
- [0055] 어저귀 씨겉질 추출물: 100mg
- [0056] 주사용 멸균증류수: 적량
- [0057] pH 조절제: 적량
- [0058] 어저귀 추출물을 주사용 증류수에 용해하고, pH 조절제로 pH를 약 7.6으로 조절한 다음, 전체를 2ml로 한 후 2ml용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조한다.
- [0059] 제제실시예 2
- [0060] 어저귀 씨겉질 추출물: 10mg
- [0061] 유당: 100mg
- [0062] 전분: 50mg
- [0063] 스테아린산 마그네슘: 적량
- [0064] 상기의 성분을 혼합하고, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0065] 제제실시예 3
- [0066] 어저귀 씨겉질 추출물: 5mg
- [0067] 유당: 100mg
- [0068] 전분: 93mg
- [0069] 탈크: 2mg
- [0070] 스테아린산 마그네슘: 적량
- [0071] 상기의 성분을 혼합하고, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [0072] 제제실시예 4
- [0073] 어저귀 씨겉질 추출물: 100mg
- [0074] 설탕: 20g
- [0075] 이성화당: 20g
- [0076] 레몬향: 적량
- [0077] 정제수를 가하여 전체 100ml
- [0078] 상기의 성분을 통상의 액제의 제조방법에 따라서 혼합하고, 100ml의 갈색병에 충전하고 멸균시켜서 액제를 제조한다.

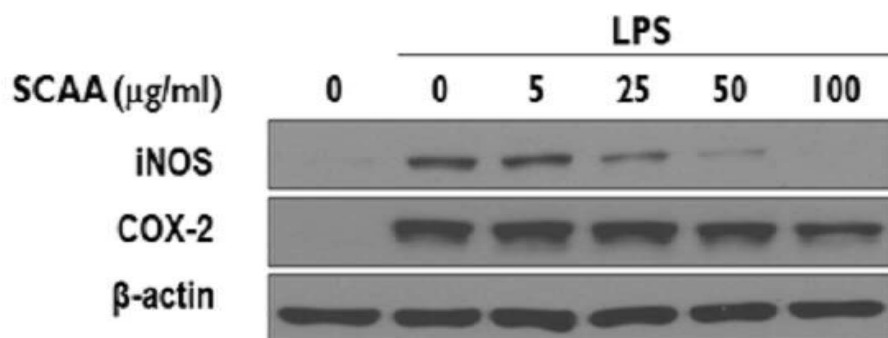
도면

도면1

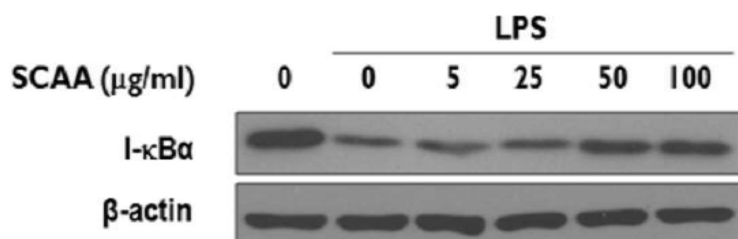


n=3  
(\* < 0.05, \*\* < 0.01)

도면2



도면3



도면4

