



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0046138  
(43) 공개일자 2013년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/235 (2006.01) A61K 36/23 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0110518  
(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

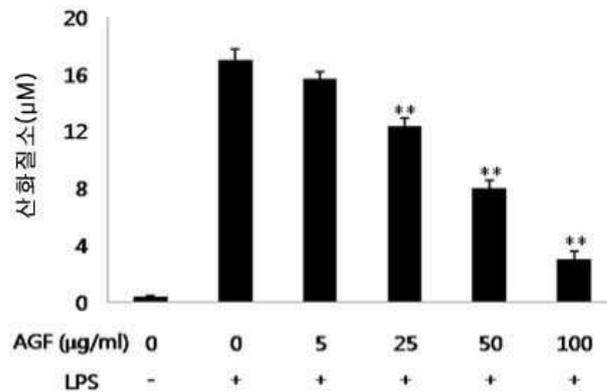
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **소회향 추출물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 소회향 추출물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 소회향 꽃 추출물이 산화질소 생성 및 산화질소 합성효소 발현을 억제하여 항염증 효과를 나타냄을 규명함으로써 이를 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용할 수 있다.

**대표도** - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ0080152011

부처명 농생명바이오식의약소재개발사업단

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 에리오덕티올 및 노다케닌을 이용한 신기능성 아토피 피부개선 화장품 천연소재 개발

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2011.12.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

소회향(*Anethum graveolens*) 꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

소회향 꽃 추출물은 물, 탄소수 1~6의 저급알코올 또는 그것의 혼합용매로 추출한 것, 또는 상기 저급알코올 추출물의 유기용매 분획인 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

염증성 질환은 류마티스 관절염 또는 천식인 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

캡셀, 액제, 주사제, 연질캡셀제, 과립제, 또는 정제 중 어느 하나의 제형을 가지는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 6

소회향(*Anethum graveolens*) 꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

소회향 꽃 추출물은 물, 탄소수 1~6의 저급알코올 또는 그것의 혼합용매로 추출한 것, 또는 상기 저급알코올 추출물의 유기용매 분획인 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

### 청구항 8

제6항에 있어서,

염증성 질환은 류마티스 관절염 또는 천식인 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

**청구항 9**

제6항에 있어서,

유효량의 소회향 꽃 추출물을 포함하는 식품 또는 식품첨가제인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

**청구항 10**

제6항에 있어서,

유효량의 소회향 꽃 추출물을 포함하는 음료 또는 음료첨가제인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 소회향 꽃 추출물이 산화질소 생성 및 산화질소 합성효소 발현을 억제하여 항염증 효과를 나타냄을 규명함으로써 이를 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용하는 소회향 추출물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 만성 염증 질환(예, 류마티스 관절염, 천식)의 원인은 체내에 면역성의 이상으로 발생한다. 예를 들면, 균이나 바이러스의 침입으로부터 우리 몸의 면역계가 이들을 제거하면 자신의 관절이나 몸의 일부를 공격하여 류마티스 관절염의 증상을 일으키게 된다. 우리 나라 인구 중 약 1%가 류마티스 관절염을 앓고 있을 정도로 심각하며, 더 나아가 합병증에 시달리고 있다. 기관지 천식은 기침, 호흡 곤란, 가슴 답답함 등과 기관지 경련을 동반하는 질환인데 통계적으로 전 인구의 7~10%를 차지할 정도로 흔히 볼 수 있는 질환이지만 현재까지 나온 치료법에는 이 질환을 근절시킬 수가 없는 질환으로 증상이 심할 경우에 임시방편적으로 기관지 확장제 등의 치료로 치료의 모든 것을 대체하고 있는 실정인 질환이다. 요즘 들어서는 환경 오염 등으로 인하여 환자의 수가 많아지는 경향을 나타내고 있다.

[0003] 이제까지는 만성 염증 질환의 진통 증상에 비스테로이드성 진통 소염제, 부신 피질 호르몬제를 사용하였으나, 만성적으로 복용할 경우에 위장장애, 위궤양 등의 심각한 부작용을 초래한다. 따라서, 염증 질환을 치료할 수 있는 새로운 의약품의 개발은 시급하고 절박하다고 하겠다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0004] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제2011-0046210호, 2011.05.04  
 (특허문헌 0002) 2. 미국 공개특허 제2008-0166435, 2008.07.10

**비특허문헌**

[0005] (비특허문헌 0001) 1. Eun Mi Choi et al. *Fitoterapia*, vol.75(6), pp.557-565, 2004.09.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 천연 추출물을 이용하여 부작용이 없이 효과적으로 염증성 질환을 예방 또는 치료하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 염증성 질환을 효과적으로 예방 또는 개선할 수 있는 천연 추출물을 유효성분으로 하는 건강 보조 식품을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 소회향(*Anethum graveolens*) 꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0009] 본 발명은 또한 소회향(*Anethum graveolens*) 꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강 보조 식품을 제공한다.

#### 발명의 효과

- [0010] 본 발명의 소회향 추출물은 산화질소(NO)와 산화질소 합성효소 억제 작용을 나타내므로 부작용이 없이 효과적으로 염증성 질환, 특히 류마티스 관절염, 천식 등을 예방, 개선 또는 치료하는데 사용할 수 있다.

#### 도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 지질다당류(LPS)에 의해 유도된 산화질소 생성에 대한 본 발명의 소회향 추출물의 억제효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 LPS에 의해 유도된 산화질소 합성효소에 대한 본 발명의 소회향 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 LPS에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 본 발명의 소회향 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 소회향 추출물의 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

#### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0013] 본 발명자들은 염증 질환 치료제로 개발될 수 있는 새로운 후보 물질로 소회향(*Anethum graveoloens*)을 선정하고 이의 염증 제거 활성을 규명하였다.
- [0014] 소회향(*Anethum graveoloens*)은 미나리과(*Umbelliferae*)의 한해살이풀로 펜넬(fennel, *Foeniculum vulgare*)에 속하는 다년생 초본으로 근경이나 종자로 번식하며 우리나라 전국 각지에 야생한다. 소회향은 식물 전체에서 독특한 향이 나기 때문에 꽃, 잎, 줄기, 종자를 허브로 사용하고 있으며, 특히 종자의 향이 강하다. 소회향의 종자는 중추신경계에 작용하여 진정시키는 작용, 점막을 자극하여 위, 창자, 인후, 유방 등 분비선의 분비를 돕는 작용, 소화장애, 가래를 삭이고 진통, 진경작용 등이 있는 것으로 학회에 보고되었고, 한의학서에 기록되어 있다. 소회향의 함유성분으로 종자에서 에센셜 오일, 꽃에서 페놀계 화합물, 플라보노이드 및 프로안토시아니딘 등이 보고되어 있다.
- [0015] 이러한, 소회향의 항염증 효과는 보고된바 없어 본 발명자들은 소회향에 대한 연구를 예의 수행한 결과, 소회향

의 꽃의 에탄올 추출물이 산화질소와 산화질소 합성효소 발현을 억제하여 항염증 효과를 나타냄을 최초로 확인하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0016] 따라서, 본 발명은 소회향(*Anethum graveolens*) 꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명에 따른 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 염증성 질환, 특히 류마티스 관절염 또는 천식의 예방 또는 치료용 약제학적 제제로 제조될 수 있다.

[0018] 상기 약제학적 제제는 소회향 꽃에서 분리한 천연 소재를 사용함으로써 기존의 유기합성 약제에 비해 부작용이 없고, 안전성이 매우 높은 특징이 있다.

[0019] 본 발명의 소회향 꽃 추출물의 분리방법은 특별히 한정되지는 않으나, 물 또는 탄소수 1~6의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 90~100℃에서 추출한 후 감압 농축하거나 상기 탄소수 1~6의 저급알코올, 특히 에탄올 추출물에 대해 각종 유기용매, 예컨대, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올로 추가 분획할 수도 있으며, 유기용매 분획 후 각종 크로마토그래피로 추가 정제될 수도 있다.

[0020] 본 발명의 소회향 꽃 추출물에는, 추출, 분획 및 정제 처리의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그 희석액 또는 농축액 또는 그 건조물 중 어느 하나를 포함하는 것으로 한다. 바람직하게는, 소회향 꽃의 에탄올 추출물을 사용하는 것이 좋다.

[0021] 상기 소회향 꽃 추출물은 산화질소 생성 및 산화질소 합성효소 발현을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다.

[0022] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 지질다당류(lipopolysaccharide)를 이용하여 대식세포에 염증반응을 유발하는 경우, 산화질소(NO) 등 다양한 염증 매개 물질들이 유리되는데, 상기 소회향 꽃 추출물은 농도 의존적인 방식으로 산화질소의 농도를 감소시켜 대식세포에서 지질다당류에 의해 유도되는 염증반응을 억제하는 효과가 있다. 또한, 산화질소 합성효소(iNOS)의 발현 역시 농도 의존적인 방식으로 감소시킨다. 다시 말해, 소회향 꽃 추출물은 산화질소 합성효소의 발현을 억제함으로써 산화질소의 농도를 감소시켜 항염증 효과를 나타내는 것이다. 또한, 소회향 꽃 추출물은 농도 의존적인 방식으로 NF-κB의 활성을 저해한다. 이로부터 소회향 꽃 추출물은 IκB의 분해를 막아 직접적으로 NF-κB의 활성을 저해함을 알 수 있다.

[0023] 아울러, 소회향 꽃 추출물은 세포의 생존활성 측정 실험에서 세포 생존율에는 영향을 주지 않아 독성이 없음을 확인하였다.

[0024] 또한, 본 발명의 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0025] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소암모늄, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0026] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.

[0028] 본 발명의 조성물은 전신계 또는 국소적으로 투여될 수 있으며, 이러한 투여를 위해 공지 기술로 적합한 제형으로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 활성 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 협축 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.

- [0029] 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야 공지된 기법 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 배설속도, 환자의 연령 및 체중, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 성인에게 1일 일일 10mg 내지 5,000mg을 1 내지 3회 투여할 수 있고, 환자의 체중, 성별, 나이 및 질병의 정도에 따라서 그 사용량을 증감할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태의 주사제, 액제, 분말제, 과립제, 정제, 연질캡셀제, 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 또한 약학적 유효량의 소회향 추출물을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 동물의 염증성 질환 치료 방법을 제공한다.
- [0034] 상기 염증성 질환 치료 방법에 사용되는 약학적 조성물 및 투여 방법은 상기에서 설명하였으므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.
- [0035] 한편, 상기 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 투여할 수 있는 개체는 모든 동물을 포함한다. 예를 들어, 개, 고양이, 마우스와 같은 인간을 제외한 동물일 수 있다.
- [0036] 본 발명은 또한 소회향(*Anethum graveolens*) 꽃의 에탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강 보조 식품에 관한 것이다.
- [0037] 상기 "건강 보조 식품"이란 소회향 꽃 추출물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과가 있는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강 보조 식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 높은 만성 염증 질환의 예방 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.
- [0038] 본 발명의 건강 보조 식품에 있어서, 소회향 꽃 추출물의 첨가량은 대상인 건강 보조 식품의 종류에 따라 달리 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되고, 대상 식품에 대하여 통상 0.01~50 중량%, 바람직하게는 0.1~20 중량%의 범위이다. 또한, 과립, 정제 또는 캡슐형태의 식품의 경우에는 통상 0.1~100 중량%, 바람직하게는 5~100 중량%의 범위에서 첨가하면 된다.
- [0039] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0040] <실시예 1> 소회향 추출물의 제조
- [0041] 소회향은 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. 꽃 시료를 99% 에탄올로 추출하여 시험재료로 이용하였다.
- [0042] <실시예 2> 대식세포의 염증 방어 활성 검색
- [0043] 대식세포(macrophage)의 염증 방어 활성을 갖는 물질을 천연물로부터 창출하는 과정에서 우선 요구되는 것은 이

러한 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.

[0044] 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 세포내 G1 단백질을 자극하고 미토젠 활성화 단백질 키나아제(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)류와 산화질소(nitro oxide: NO) 등과 같은 다양한 염증 매개 물질들이 유리된다.

[0045] 본 실험예에서는 소회향 추출물의 대식세포에서 항염증 효과를 알아보기 위하여 LPS에 대한 방어효과를 산화질소의 정량 측정과 산화질소 합성효소(iNOS)의 단백질 수준에서 측정하고, NF- $\kappa$ B의 활성을 측정하였다. 또한 소회향 추출물의 독성을 관찰하기 위하여 세포 생존율을 측정하였다. 본 실험예에서 나타난 데이터는 약물학적 계산(pharmacologic calculation) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 여러 처치군간의 유의성을 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newmann-Kelus test로 판정하였다 (\*\*p<0.01).

[0046] (1) Mouse의 대식세포주인 RAW264.7 세포배양

[0047] 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 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldich, St. Louis, MO, USA) 배지에서 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양되었다.

[0048] (2) 산화질소생성에 대한 소회향 추출물의 효과측정

[0049] Raw 264.7 세포를 24-웰 플레이트에  $1 \times 10^6$  cells/mL로 심은 후, 4 시간 동안 배양하였다. 24-웰 플레이트의 각 웰에 소회향 추출물을 각 농도(5, 25, 50, 또는 100  $\mu$ g/mL)로 넣고, 30 분간 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후, LPS를 100 ng/mL의 농도가 되도록 각 웰에 넣어준 후, 인큐베이터에서 18 시간 동안 배양하였다. 각 웰의 상층액 100  $\mu$ L를 96-웰 플레이트에 분주하였다. 이 후 Griess 시약(1 % 설페닐아마이드(sulfanilamide), 0.1 % N-(1-나프틸)에틸렌디아민 디하이드로-클로라이드(N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydro-chloride), 2.5 % 인산) 100  $\mu$ L를 96-웰 플레이트의 각 웰에 동일하게 넣어주고, 5 분간 상온에서 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 아질산나트륨을 표준곡선으로 이용하여 농도를 측정하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0050] LPS에 의해 유도된 Raw 264.7 세포는 평소에 비해 0.4  $\mu$ M에서 16.9  $\mu$ M까지 산화질소의 농도가 급격하게 증가한 것을 확인하였다. 그러나 LPS에 의해 유도된 Raw 264.7 세포에 소회향 추출물을 농도(5, 25, 50, 또는 100  $\mu$ g/mL)로 처리하였을 때, 16.9  $\mu$ M까지 농도가 증가하였던 산화질소의 농도는 각각 15.6, 12.3, 8.0, 3.0  $\mu$ M로 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 소회향 추출물은 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증 반응에 억제 효과를 가진다는 것을 의미한다.

[0051] (3) 산화질소 합성효소 (iNOS) 발현억제에 대한 소회향 추출물의 효과측정

[0052] Raw 264.7 세포를 6-웰 플레이트에  $1 \times 10^6$  cells/mL의 개수로 심은 후, 4 시간 동안 배양하였다. 6-웰 플레이트의 각 웰에 소회향 추출물을 각 농도 (5, 25, 50, 또는 100  $\mu$ g/mL)로 넣고, 30 분간 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후, LPS를 100 ng/mL의 농도로 각 웰에 넣어주었다. 6-웰 플레이트를 인큐베이터에서 확인하려

는 단백질의 조건에 맞는 시간 동안 배양하였다. 각 웰을 1×PBS로 2 회 세척하여, pro-prep을 첨가하여 30 분간 4 °C에서 반응시켜 균질화(homogenizing)하였다. 이를 스크래퍼(scraper)를 이용하여 세포를 긁어 1.5-mL 튜브에 담아, 볼텍스와 소니케이션을 3회 반복하였다. 1 시간 동안 얼음 속에서 반응시킨 뒤 12000 rpm, 4 °C에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질의 정량은 브래포드 방법을 이용하여 정량하였다. 단백질 용해물(Protein lysate)은 8×SDS 로딩 버퍼(loading buffer)와 혼합하여 5 분간 끓인 후 10% 폴리아크릴아마이드 겔을 통해 전기영동하여 분리하였다. 여기서 분리된 단백질들은 PVDF 멤브레인에 옮겨 블랏시킨 후 5 % 스킵밀크 용액에 블로킹 하였다. 이 후, iNOS 단클론 항체(1:2000)를 5% 스킵밀크 용액에 희석하여 밤새도록(overnight) 반응시켰다. TBS-T를 이용하여 3 회 세척한 후, 서양고추냉이 페록시다아제-항 토끼 IgG 2차 항체(1:5000)를 5 % 스킵밀크 용액에 희석하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. TBS-T를 이용하여 3 회 세척한 후, ECL(enhanced chemiluminescence) 검출 시약을 이용하여 항원-항체반응을 통해 발색 반응시켜 X-선 필름에 이를 감광시켜 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0053] LPS만 단독으로 처리한 대조군에서 iNOS 단백질의 발현이 급격하게 증가된 것을 확인할 수 있었다. 그리고 여기에 소회향 추출물은 각 농도 (5, 25, 50, 또는 100 µg/mL)으로 처리한 결과, 농도의존적으로 감소한 것을 확인하였다.

[0054] 이를 통해 소회향 추출물은 LPS에 의해 유도된 Raw 264.7 세포에서 iNOS 단백질의 발현을 억제함으로써, 산화질의 농도를 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0055] (4) NF-κB 활성화에 대한 소회향 추출물의 효과측정

[0056] Raw 264.7 세포를 6-웰 플레이트에 1×10<sup>6</sup> cells/mL로 심은 후, 4 시간 동안 배양하였다. Opti-MEM 배지 : 리포펙타민(lipofectamine) 2000 시약 : DNA를 각각 100 µL : 1 µL : 2 mg의 비율로 섞어 20 분 동안 상온에서 반응시켰다. 이때 사용한 DNA는 pELAM과 pCMV-luc으로 코-트랜스펙션(co-transfection)하였다. 6-웰 플레이트를 무혈청배지로 2회 세척하고, 리포펙타민 혼합액을 배양 배지의 1/5 용량으로 넣어, 24 시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 코-트랜스펙션한 6-웰 플레이트의 각 웰에 소회향 추출물을 각 농도(5, 25, 50, 또는 100 µg/mL)로 넣고, 30 분간 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후, LPS를 100 ng/mL의 농도로 각 웰에 넣어주었다. 이를 1 시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 여기에 듀얼 루시페라아제 리포터 분석 시스템(Dual Luciferase Reporter Assay System)을 이용하여 NF-κB 루시페라아제 활성을 측정하였다. 이때, 반딧불이 루시페라아제 활성(Firefly luciferase activity)은 바다팬시 루시페라아제 활성(Renilla luciferase activity)으로 정량하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0057] LPS를 단독으로 처리한 대조군에서 아무것도 처리하지 않은 군에 비해 활성화 정도가 약 5 배 정도 증가하였다. 여기에 소회향 추출물을 농도별로 처리하였을 때, NF-κB의 활성화 정도가 농도의존적으로 감소함을 보였고, 소회향 추출물을 50 또는 100 µg/mL로 처리한 실험군에서 아무것도 처리하지 않은 군의 수준까지 유의하게 활성화가 감소함을 보여주었다. 이를 통해 소회향 추출물이 IkB의 분해를 막아, 직접적으로 NF-κB의 활성을 억제한다는 것을 예상할 수 있었다.

[0058] (5) 세포의 생존활성 측정

[0059] Raw 264.7 세포를 96-웰 플레이트에 1×10<sup>6</sup> cells/mL로 심은 후, 4 시간 동안 배양하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 소회향 추출물을 각 농도 (5, 25, 50, 또는 100 µg/mL)로 넣고, 인큐베이터에서 23 시간 동안 배양하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 Ez-cytox 키트를 1/10의 용량으로 넣어준 후, 1 시간 동안 추가로 배양하였다. 세포 독성은 microplate reader를 사용하여 450 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다. 이때, 아무것도 처리하지 않은 세포를 기준으로 독성을 측정하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

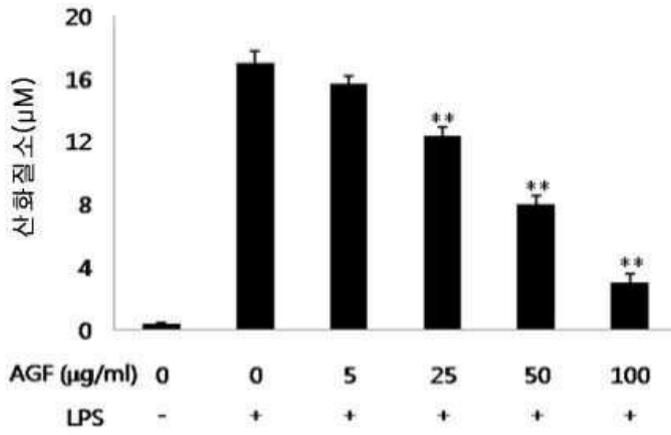
[0060] 도 4에 나타난 바와 같이, 소회향 추출물을 5, 25, 50 및 100 µg/mL 농도로 처치하고 LPS를 처치한 군도 24시간 까지 세포 생존율은 영향이 없었다.

[0061] 다음에 제제실시예로서 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

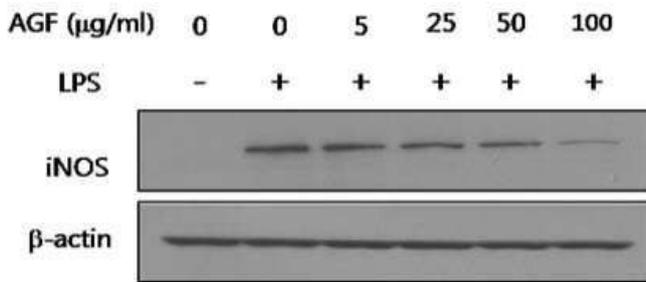
- [0062] <제제실시예 1>
- [0063] 소회향 추출물 100mg
- [0064] 주사용 멸균증류수 적량
- [0065] pH 조절제 적량
- [0066] 소회향 추출물을 주사용 증류수에 용해하고 pH 조절제로 pH 약 7.6로 조절한 다음 전체를 2mL로 한 후 2mL 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조한다.
  
- [0067] <제제실시예 2>
- [0068] 소회향 추출물 10mg
- [0069] 유당 100mg
- [0070] 전분 50mg
- [0071] 스테아린산 마그네슘 적량
- [0072] 상기의 성분을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
  
- [0073] <제제실시예 3>
- [0074] 소회향 추출물 5mg
- [0075] 유당 100mg
- [0076] 전분 93mg
- [0077] 탈크 2mg
- [0078] 스테아린산 마그네슘 적량
- [0079] 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
  
- [0080] <제제실시예 4>
- [0081] 소회향 추출물 100mg
- [0082] 설탕 20g
- [0083] 이성화당 20g
- [0084] 레몬향 적량
- [0085] 정제수를 가하여 전체 100mL
- [0086] 상기의 성분을 통상의 액제의 제조방법에 따라서 혼합하고 100mL의 갈색병에 충전하고 멸균시켜서 액제를 제조한다.

도면

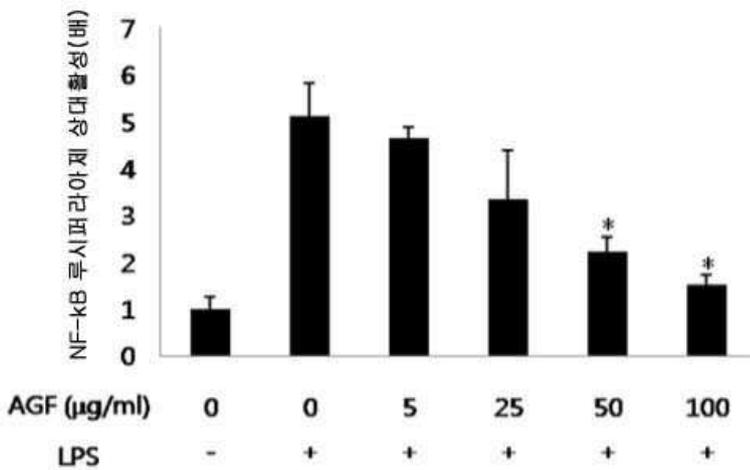
도면1



도면2



도면3



도면4

