



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0031253
(43) 공개일자 2010년03월22일

(51) Int. Cl.

A61K 36/05 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0090252

(22) 출원일자 2008년09월12일

심사청구일자 2008년09월12일

(71) 출원인

재단법인 제주하이테크산업진흥원

제주 제주시 아라1동 4-8번지

(72) 발명자

이옥재

충청북도 청주시 흥덕구 개신동 개신푸르지오아파트 408동 504호

현장구

제주 제주시 일도2동 삼화아파트 나동 106호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김동진, 강경찬, 박경찬

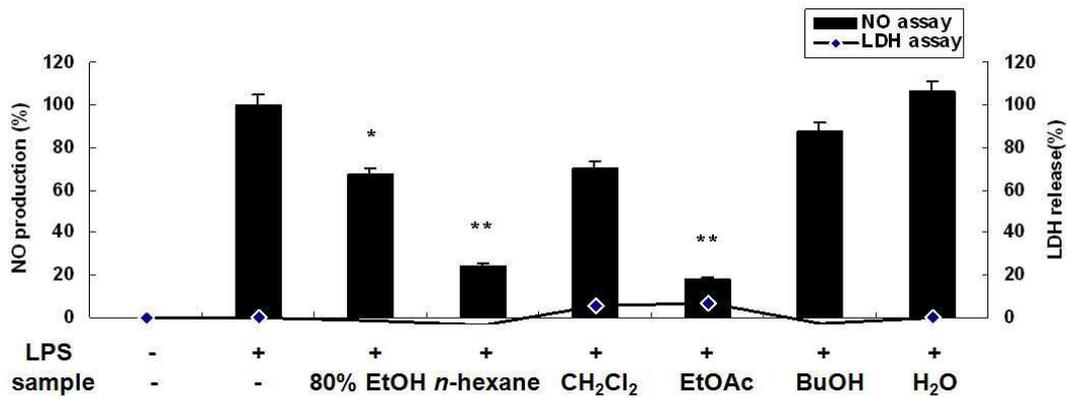
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 가시파래 추출물과 그것의 항염증제로서의 용도

(57) 요약

본 발명은 가시파래 추출물과 그 추출물의 항염증제로서의 용도를 개시한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

윤원중

제주 제주시 노형동 1047-10번지

김지영

제주 제주시 삼도1동 554-11번지(502호)

김동삼

제주 서귀포시 남원읍 신례리 2162-43번지

양은진

제주 제주시 아라1동 4-80번지 세명원룸302호

이남호

제주 제주시 아라2동 1148번지 프로빌아파트 104동
202호

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 추출 대상으로서, 가시파래를 사용하고, (b) 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 5의 알콜, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 탄소수 5 내지 10의 n-알칸, 또는 이들이 혼합 용매를 사용하며, (c) 활성으로서는 항염증 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 가시파래 추출물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항염증 활성은 NO 생성 억제 활성, TNF- α 생성 억제 활성, IL-6 생성 억제 활성, IL-1 β 의 생성 억제 활성, 및 프로스타글란딘 E₂ 생성 억제 활성 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는 가시파래 추출물.

청구항 3

가시파래 추출물을 포함하는 항염증제 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 가시파래 추출물은 가시파래를 물, 탄소수 1 내지 5의 알콜, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 벤젠, 탄소수 5 내지 10의 n-알칸, 또는 이들이 혼합 용매를 사용하여 얻어진 것을 특징으로 하는 항염증제 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 가시파래 추출물은 물과 에탄올의 혼합 용매 추출물로서 용매를 제거하여 얻어진 고형상의 추출물, 그 추출물을 물과 헥산으로 분획하였을 때 얻어지는 헥산층의 분획물, 그 추출물을 물과 에틸아세테이트로 분획하였을 때 얻어지는 에틸아세테이트층의 분획물, 또는 그 추출물을 물과 메틸렌클로라이드로 분획하였을 때 얻어지는 메틸렌클로라이드층의 분획물인 것을 특징을 하는 항염증제 조성물.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항염증제 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 항염증제 조성물.

청구항 7

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항염증제 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 항염증제 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 가시파래 추출물과 그 추출물의 항염증제로서의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증은 외부의 물리·화학적 자극, 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 각종 알레르기 유발 물질 등 외부 감염원의 감염에 대한 생체의 방어 반응이다.

[0003] 염증 반응은 선천성 면역 반응의 일부이며, 다른 동물에서처럼 인간의 선천성 면역 반응은 대식세포가 병원체에

특이적으로 존재하는 세포 표면의 패턴을 통해 비자기(non-self)로 인식하고 공격함으로써 시작된다. 염증 반응 시에는 염증 부위에 혈장이 축적되어 세균이 분비한 독성을 희석시키며, 혈류가 증가하고, 홍반, 통증, 부종, 발열 등의 증상이 수반되게 된다.

- [0004] 이러한 염증 반응에는 다양한 생화학적 현상이 관여하는데, 특히 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)와 다양한 프로스타글란딘(prostaglandins, PG)의 생합성과 관련되는 사이클로옥시제나제(cyclooxygenase, COX)가 염증 반응의 중요한 매개체로 알려져 있다.
- [0005] NOS는 세 가지 이성질체가 존재하는데, 칼슘이나 카모듈린 의존성인 eNOS(내피성 NOS)와 nNOS(신경성 NOS), 그리고 LPS(lipopolysaccharide)와 같은 세균의 내독소나 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12과 같은 여러 염증성 사이토카인에 의해 유도되는 iNOS(유도성 NOS)가 있으며, L-아르기닌(L-arginine)으로부터 산화질소(NO)를 생성한다.
- [0006] eNOS나 nNOS에 의해 생성되는 NO는 혈압 조절 작용, 신경 전달 작용, 학습, 기억 등과 관련된 다양한 생리 반응을 수행함으로써 인체의 항상성 유지에 중요한 역할을 하지만, iNOS에 의해 생성되는 NO는 관절염, 패혈증, 조직이식거부반응, 자가면역질환, 신경세포의 사멸 등 다양한 염증성 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Moncade S. et al, Pharmacol. Rev., 1991, 43, 109; Nature Medicine, 2001, 7, 1138; Mu, M. M., J. Endotoxic Res. 7, p341, 2001).
- [0007] COX 효소는 COX의 기능과 함께 하이드로퍼옥시다제(hydroperoxidase, HOX) 활성을 가지고 아라키돈산으로부터 중간체인 PGG₂와 PGH₂를 합성하며, 이들 화합물로 PGE₂, PGF₂, PGD₂, 프로스타시클린 및 트롬복신A₂(thromboxane A₂, TxA₂)를 만든다. COX의 기능 중 PGH 합성효소의 기능은 PGE₂의 합성을 통해 통증과 염증 반응에 관여한다.
- [0008] COX에는 두 가지 아형이 있고 COX-1은 대부분의 조직에 항상 발현되는데 비해, COX-2는 염증성 사이토카인에 의해 신속히 발현이 유도되어 염증 반응에서 중요한 역할을 한다.
- [0009] 따라서 염증성 사이토카인의 생성 억제 활성을 갖거나 PGE₂의 생성 억제 활성을 갖는 물질은 염증성 질환 치료제로서 활용될 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 항염증 활성을 가지는 가시파래 추출물을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 추출물을 이용한 항염증제 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적이나 기타의 양태 등은 이하에서 제시될 것이다.

과제 해결수단

- [0013] 일 측면에 있어서, 본 발명은 항염증 활성을 가지는 가시파래 추출물에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명자들은 가시파래를 80% 에탄올로 추출하고, 이 에탄올 추출물을 헥산, 메틸렌클로라이드(디클로로메탄), 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 분획하고, 상기 에탄올 추출물과 분획물의 NO 생성 억제 활성, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성 억제 활성, 및 PGE₂ 생성 억제 활성을 살펴보았는데, 위 추출물 및 분획물 모두 활성의 정도에는 차이가 있었지만 대체로 위 활성들을 가짐을 확인할 수 있었다.
- [0015] 본 발명은 이러한 실험 결과에 기초하여 제공되는 것이다.
- [0016] 본 명세서에서 "가시파래"는 학명이 *Ulva prolifera*인 해조류를 가리킨다.
- [0017] 또 본 명세서에서, "항염증 활성"은 아래에서 정의되는 염증성 질환의 개선 활성으로서 정의된다. 구체적으로는 NO 생성 억제 활성, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및/또는 IL-1 β 의 생성 억제 활성 및/또는 PGE₂ 생성 억제 활성으로 정의될 수 있다.
- [0018] 또 본 명세서에서, "개선"이란 아래에서 정의되는 염증성 질환이 가지는 병리적 증상의 개선, 치료 및 그러한 병리적 증상의 발병 억제/지연을 포함하는 의미이다.

- [0019] 또 본 명세서에서, "가시과래 추출물"은 추출 대상으로 가시과래를 사용하고 추출 용매로서 물, 부탄올, 이소프로판올, 에탄올, 메탄올 등을 포함한 탄소수 1 내지 5의 알콜, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 벤젠, n-헥산을 포함한 탄소수 5 내지 10의 n-알칸, 또는 이들이 혼합 용매를 사용하여 얻어진 것을 의미하며, 그 추출물을 극성에 차이가 있는 상기 두 가지 이상의 용매를 사용하여 얻어진 분획물을 포함한다.
- [0020] 상기 용매는 물, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 벤젠, 및 n-헥산 순으로 극성이 낮아진다.
- [0021] 따라서 극성에 차이가 있는 두 가지 이상의 용매를 사용하여 얻어진 분획물로서는, 예컨대 어떠한 추출물을 물과 헥산으로 분획하여 얻어진 물층의 분획물과 헥산층의 분획물, 어떠한 추출물을 물과 메틸렌클로라이드로 분획하여 얻어진 물층과 메틸렌클로라이드층의 분획물 등을 예시할 수 있다.
- [0022] 상기 가시과래 추출물은 바람직하게는 아래의 실시예 및 실험예가 보여주듯이, 비극성 용매 또는 물보다는 극성이 약한 용매로 추출된 것이나 비극성 방향으로 분획된 분획물을 의미한다. 아래의 실시예 및 실험예는 미지의 지표물질 즉 항염증 활성을 나타내는 지표물질이 비극성의 물질이거나 물보다는 극성이 약한 물질일 것임을 암시하기 때문이다.
- [0023] 상기 비극성 용매로서는 벤젠 또는 n-헥산을 포함한 탄소수 5 내지 10의 n-알칸을 들 수 있고, 물보다 극성이 약한 용매로서는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 또는 에탄올과 물의 혼합물을 들 수 있다.
- [0024] 또 상기 비극성 방향으로 분획된 분획물은 극성이 서로 다른 두 가지의 용매로 분획할 때, 극성이 약한 용매층의 분획물을 의미한다. 예컨대 어떠한 용매의 추출물을 물과 헥산으로 분획할 때는 헥산층의 분획물을 의미하며, 또 물과 에틸아세테이트로 분획할 때에는 에틸아세테이트층의 분획물을 의미하며, 또 물과 메틸렌클로라이드로 분획할 때는 메틸렌클로라이드층의 분획물을 의미하며, 또 물과 부탄올로 분획할 때는 에탄올층의 분획물을 의미한다.
- [0025] 당업자는 그의 통상의 능력 범위 내에서 극성의 강약, 극성 용매와 비극성 용매를 확인·판별할 수 있다. 본 명세서에서 극성 용매 및 비극성 용매의 의미, 그리고 극성이 강한 용매 및 극성이 약한 용매의 의미는 당업계의 통상적인 의미를 따른다.
- [0026] 가장 바람직하게는 아래의 실시예 및 실험예에서 확인되듯이, 물과 에탄올의 혼합 용매 추출물(바람직하게는 80% 에탄올 추출물)로서 용매를 제거하여 얻어진 고형상의 추출물, 그 추출물을 물과 헥산으로 분획하였을 때 얻어지는 헥산층의 분획물, 그 추출물을 물과 에틸아세테이트로 분획하였을 때 얻어지는 에틸아세테이트층의 분획물, 또는 그 추출물을 물과 메틸렌클로라이드로 분획하였을 때 얻어지는 메틸렌클로라이드층의 분획물을 의미한다.
- [0027] 한편 추출 용매를 사용하여 상기 추출물을 얻을 때 열수, 가온, 냉침, 초음파 방사, 교반, 이들을 혼합한 방법 등의 임의의 방법이 사용될 수 있다. 실제 본 발명자들은 아래의 실시예 및 실험예로 개시하지는 않았지만 헥산으로 추출할 때 가온하여 추출한 경우나 초음파를 방사하여 추출한 경우에도 모두 항염증 활성을 가짐을 확인한 바 있다.
- [0028] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 진술한 바의 가시과래 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 개선용 조성물에 관한 것이다.
- [0029] 본 명세서에서, 상기 "염증성 질환"이란 외부의 물리·화학적 자극 또는 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 각종 알레르기 유발 물질 등 외부 감염원의 감염에 대한 국부적 또는 전신적 생체 방어 반응으로 특정되는 어떠한 상태로서 정의될 있다. 이러한 반응은 각종 염증 매개 인자와 면역세포와 관련된 효소(예컨대 iNOS, COX-2 등) 활성화, 염증 매개 물질의 분비(예컨대, NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE₂의 분비), 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등의 일련의 복합적인 생리적 반응을 수반하며, 홍반, 통증, 부종, 발열, 신체의 특정 기능의 저하 또는 상실 등의 증상에 의해 외적으로 나타난다. 상기 염증성 질환은 급성, 만성, 궤양성, 알레르기성 또는 괴사성을 띠 수 있으므로, 어떠한 질환이 상기와 같은 염증성 질환의 정의에 포함되는 한 그것이 급성이든지, 만성적이든지, 궤양성이든지, 알레르기성이든지 또는 괴사성이든지를 불문한다. 구체적으로 상기 염증성 질환에는 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편

두풍, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염(예컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 피부염, 습진, 다발성 경화증 등이 포함될 것이다.

- [0030] 본 명세서에서 "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.
- [0031] 한편 본 발명의 염증성 질환 개선제 조성물은 그 유효성분인 상기 정의된 가시과래 추출물을 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 치료를 의도하는 염증성 질환의 개선 활성을 나타낼 수 있는 한 임의의 양(유효량)으로 포함할 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 15 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 그 적용 대상인 포유동물 바람직하게는 사람에게서, 염증성 질환의 개선, 치료, 또는 이러한 병리적 증상의 발병 억제/지연을 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 구체적인 양태에 있어서는 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효물질인 가시과래 추출물을 이외에 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 등을 포함하여, 경구용 제형(정제, 현탁액, 과립, 에멀전, 캡슐, 시럽 등), 비경구용 제형(멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액), 국소용 제형(용액, 크림, 연고, 젤, 로션, 패치) 등으로 제조될 수 있다.
- [0035] 상기에서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용가능한 이상의 독성(충분히 낮은 독성)을 지니지 않는다 의미이다.
- [0036] 약제학적으로 허용되는 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 전분(예컨대 옥수수 전분, 감자 전분 등), 셀룰로오스, 그것의 유도체(예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 등) 맥아, 젤라틴, 탈크, 고체 윤활제(예컨대 스테아르산, 스테아르산 마그네슘 등), 황산 칼슘, 식물성 기름(예컨대 땅콩 기름, 면실유, 참기름, 올리브유 등), 폴리올(예컨대 프로필렌 글리콜, 글리세린 등), 알긴산, 유화제(예컨대 TWEENS), 습윤제(예컨대 라우릴 황산 나트륨), 착색제, 풍미제, 정제화제, 안정화제, 항산화제, 보존제, 물, 식염수, 인산염 완충 용액 등을 들 수 있다. 이러한 담체는 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적당한 것을 하나 이상 선택하여 사용할 수 있다.
- [0037] 부형제도 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적합한 것을 선택하여 사용할 수 있는데, 예컨대 본 발명의 약제학적 조성물이 수성 현탁제로 제조될 경우에 적합한 부형제로서는 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 히드로프로필메틸셀룰로오스, 알긴산 나트륨, 폴리비닐피롤리돈 등의 현탁제나 분산제 등을 들 수 있다. 주사액으로 제조되는 경우 적합한 부형제로서는 링거액, 등장 염화나트륨 등을 들 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있고, 경우에 따라서는 국소적으로 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약제학적 조성물은 그 1일 투여량이 통상 0.001 ~ 150 mg/kg 체중 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 환자의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되는 것이므로 상기 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 아니 된다.
- [0040] 본 발명의 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서, 식품 조성물로 이용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 식품 조성물은 껌류, 비타민 복합제, 건강 보조식품, 특수 영양 보충용 식품, 기능성 음료 등으로 제조될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 식품 조성물에는 유효성분인 가시과래 추출물이 포함되는 것 이외에, 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 감미제, 사과, 레몬, 감귤 등의 과일이나 녹차잎, 둥굴레, 대잎 등의 차류에서 얻어진 풍미제, 카테킨, 레티놀, 아스코르브산, 토코페롤 등의 생리활성 성분, 갈슘, 마그네슘, 크롬, 코발트, 구리, 불소화물 등의 미네랄 등이 또한 첨가될 수 있으며, 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.
- [0043]

효 과

[0044] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 항염증 활성을 가지는 가시과래 추출물과 그 추출물의 항염증제로서의 용도를 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0045] 이하 본 발명은 참조예, 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0046] **<실시예> 가시과래 추출물 및 분획물의 제조**

[0047] 가시과래를 동결건조하여 얻은 가시과래 분말에 그 가시과래 분말 무게의 10배에 해당하는 80% 에탄올을 넣고 교반하면서 24시간 동안 추출한 후 와트만 종이여과지(Whatman No.2)로 여과하여 그 여액을 감압·농축하여 용매를 제거하고 가시과래 추출물을 얻었다. 그 추출물에 그 추출물 무게 10배의 증류수와 동량의 헥산(n-hexane)을 첨가하여 교반 후의 정지 시간을 24시간으로 하여 분획한 후 감압·농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물 층의 순차적 분획물을 얻었다. 상기 모든 과정은 3회 반복하였다.

[0048] **<실험예> 가시과래 추출물의 항염증 활성 평가**

[0049] <실험예 1> 세포 및 시약

[0050] 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 KCLB(Korean Cell Line Bank)로부터 분양받아 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 DMEM 배지(Gibco, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 3일 간격으로 계대 배양하면서 실험을 수행하였다.

[0051] <실험예 2> NO 생성 억제 활성 평가

[0052] RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.5 X 10⁵ cell/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 상기 실시예의 추출물 및 분획물 100µg/ml과 LPS(1µg/ml; Sigma 사)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO 양은 Griess 시약[1% (w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻ 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100µl와 Griess시약 100µl를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO₂)를 standard로 비교하였다. 그 결과를 <도 1>에 나타내었다.

[0053] <도 1>의 결과를 참조하여 보면, 상기 실시예의 추출물은 대체로 NO 생성 억제 효과를 지님을 알 수 있다. 특히 에탄올 추출물, 헥산 분획물, 메틸렌클로라이드 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 NO 생성 억제 효과가 높음을 알 수 있다.

[0054] <실험예 3> LDH assay 방법을 이용한 세포 독성 평가

[0055] RAW 264.7 세포 (1.5×10⁵ cells/mL)를 DMEM 배지에 상기 실시예의 추출물 및 분획물 100µg/ml과 LPS (1 µg/ml)를 동시에 처리하여 24시간 배양 한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. LDH(lactate dehydrogenase) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit(Promega)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지 50µl와 reconstituted substrate mix를 50µl를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50µl의 stop solution을 넣고 microplate reader(Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군(LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

[0056] 결과를 <도 1>에 나타내었다. <도 1>의 결과는 상기 NO 생성 억제 효과가 세포 독성에 의한 것이 아님을 보여준다.

[0057] <실험예 3> PGE₂ 생성 억제 활성 평가

[0058] RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5x10⁵ cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO₂항온기

에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도(1mg/mL)로 조제된 상기 실시예의 추출물 및 분획물 50 μ l와 450 μ l의 LPS(1 μ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후 PGE₂를 측정하기 위해 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻었다. PGE₂의 측정은 PGE₂ ELISA kit(R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r²값은 0.99 이상이었다.

[0059] 결과를 <도 2>에 나타내었다.

[0060] <도 2>를 참조하여 보면, 상기 실시예의 추출물 중 에탄올 추출물, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 PGE₂ 생성 억제 효과가 높음을 알 수 있다.

[0061] <실험예 4> 염증성 사이토카인 생성 억제 활성 평가

[0062] RAW 264.7 세포 (1.5×10⁵ cells/mL)를 DMEM 배지를 이용하여 24 well plate 에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18 시간 전 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10 배 농도 (1mg/mL)로 조제된 상기 실시예의 추출물 및 분획물 50 μ l와 LPS (1 μ g/ml) 450 μ l를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24 시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 분)하여 얻어진 상층액의 pro-inflammatory cytokines 생성 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 -20℃ 이하에 보관하였다. 염증성 사이토카인의 정량은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다.

[0063] 결과를 <도 3> 내지 <도 5>에 나타내었다. 대체로 실시예의 추출물 중 에탄올 추출물, 헥산 분획물, 메틸렌클로라이드 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 효과가 높음을 알 수 있다.

[0064] **통계분석**

[0065] 모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 ± 표준편차 (SD)를 구하여 신뢰수준 95% 및 99%(p<0.05, p<0.01)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

도면의 간단한 설명

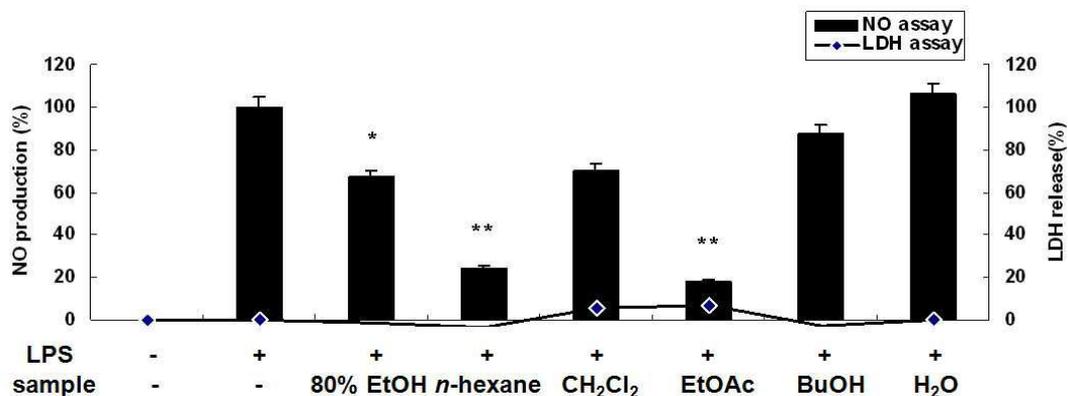
[0066] 도 1은 가시파래 추출물이 100 μ g/ml 농도에 세포 독성을 나타내지 않음과 NO 생성을 억제함을 보여주는 결과이다.

[0067] 도 2는 가시파래 추출물이 PGE₂ 생성을 억제함을 보여주는 결과이다.

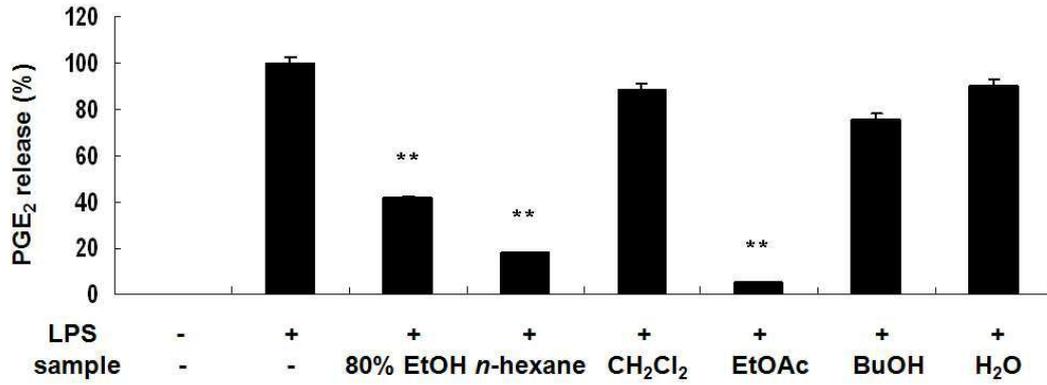
[0068] 도 3 내지 도 5는 가시파래 추출물이 염증성 사이토카인의 생성을 억제함을 보여주는 결과이다.

도면

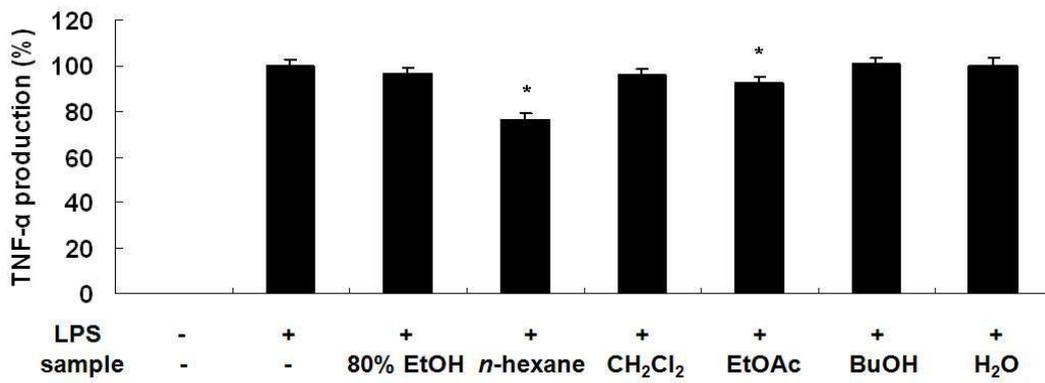
도면1



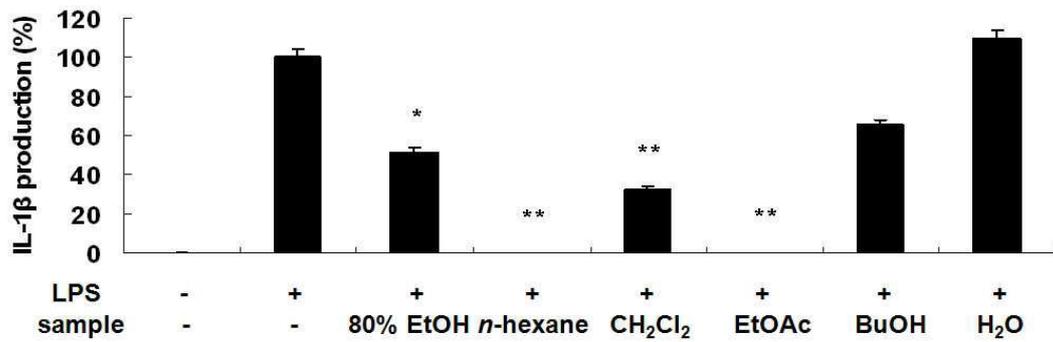
도면2



도면3



도면4



도면5

