



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0020738
(43) 공개일자 2008년03월06일

(51) Int. Cl.

A61K 36/54 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0083944

(22) 출원일자 2006년09월01일

심사청구일자 2006년09월01일

(71) 출원인

재단법인 제주하이테크산업진흥원

제주 제주시 아라1동 4-8번지

(72) 발명자

박수영

제주 제주시 오등동 1653-1 영도그린빌라 C동 308호

정용환

제주 서귀포시 서홍동 446-13 화신빌라 A동 201호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김형준

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 항염활성 및 골대사 관련인자 억제활성을 나타내는까마귀쪽나무 추출물

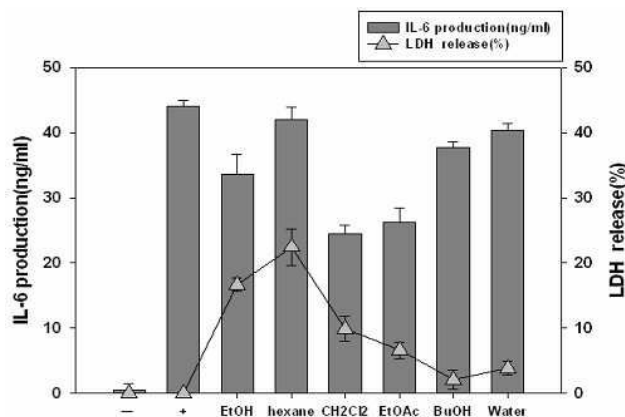
(57) 요약

본 발명은 항염활성 및 골대사 관련인자 억제활성을 나타내는 까마귀쪽나무 추출물에 관한 것이다.

본 발명의 까마귀쪽나무 추출물은, 까마귀쪽나무(*Litsea japonica* juss)의 잎, 줄기, 열매 중 선택된 1종 이상을 준비하고, 음건한 다음, 마쇄기로 분쇄한 분말을 80 % 에탄올에 침적하고, 초음파를 이용하여 1시간씩 3회 추출하여 에탄올추출물을 제조하고, 그 추출물의 상층액을 회수하여 감압 농축하고, 농축물을 증류수에 현탁시킨 후, 현탁액을 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올로 순차적으로 추출하여 까마귀쪽나무 추출분획물을 제조하는 것으로 구성된다.

본 발명에 의해 항산화활성, 항염활성 및 골대사 관련 인자 억제활성을 나타내는 까마귀쪽나무 추출물이 제공된다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

윤원중

제주 제주시 노형동 1047-10

이정아

제주 제주시 용담1동 235-17 평화아파트 701호

김지영

제주 북제주군 추자면 대서리 114-1

오대주

제주 서귀포시 서홍동 378-13

유은숙

제주 제주시 노형동 1~1019

이혜자

제주 제주시 용담1동 2816-6 대도빌라 302호

특허청구의 범위

청구항 1

녹나무과 추출물에 있어서,

까마귀쪽나무(*Litsea japonica* juss)의 잎, 줄기, 열매 중 선택된 1종 이상을 준비하고, 음건한 다음, 마쇄기로 분쇄한 분말을 80 % 에탄올에 침적하고, 초음파를 이용하여 1시간씩 3회 추출하여 에탄올추출물을 제조하고, 그 추출물의 상층액을 회수하여 감압 농축하고, 농축물을 증류수에 현탁시킨 후, 현탁액을 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올로 순차적으로 추출하여 제조된 까마귀쪽나무 추출물 및 분획물로서,

항산화활성, 항염활성, 골대사성 관련 인자 억제활성 중 1 종 이상의 생리활성을 갖는 것이 특징인,

생리활성을 나타내는 까마귀쪽나무 추출물.

청구항 2

제1항의 까마귀쪽나무 추출물을 유효성분으로 포함하는,

DPPH 라디칼 소거제, 크산틴 산화효소(Xanthine Oxidase) 저해제, 과산화물(Superoxide) 라디칼 소거제, 산화질소(Nitric Oxide) 생성 저해제 중 선택된 1종 이상의 항산화용 조성물.

청구항 3

제1항의 까마귀쪽나무 추출물을 유효성분으로 포함하는,

염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

제1항의 까마귀쪽나무 추출물을 유효성분으로 포함하는,

골대사성 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

식품첨가제 또는 음료조성물에 첨가되는 것이 특징인,

생리활성을 나타내는 까마귀쪽나무 추출물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<13> 본 발명은 항염활성 및 골대사 관련인자 억제활성을 나타내는 까마귀쪽나무 추출물에 관한 것이다.

<14> 현대사회는 환경오염과 노인인구의 증가 그리고 진단기술의 발달 등에 의해 각종 질병의 발생률과 확진율이 크게 향상되고 있으며, 이로 인하여 과거에는 연령의 증가에 의해 발생하는 불가피한 질병으로 생각되어 왔던 질병들의 예방 및 치료법에 대한 많은 연구가 활발히 진행되고 있다.

<15> 활성산소는 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환등의 각종 질병을 일으키는 주 원인으로 알려져 있으며, 식품에서는 산패와 독성 물질 생성 등으로 유해한 작용을 하는 것으로 알려졌다.

<16> 현재 당뇨, 고혈압, 동맥경화, 류머티즘, 항암 등의 질병과 관련된 활성산소(ROS, reactive oxygen species) 및 자유라디칼의 역할에 대한 연구와 함께 천연 항산화제 개발에 대한 연구가 지속적인 관심의 대상이 되고 있다

- <17> 또한, 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다.
- <18> 또한, 인간은 성장기뿐만 아니라 살아가면서도 골의 합성과 분해가 지속적으로 계속 된다(Mundy *et al.*, 1993).
- <19> 그러나, 여러 가지 환경적 영향, 신체의 정신적 또는 육체적인 변화에 의한 호르몬의 불균형이나, 골을 만드는 것보다 분해하는 것이 더욱 활발한 노년기의 경우 작은 충격으로도 골이 쉽게 부러지는 현상이 일어나게 된다.
- <20> 흔히들 갱년기 이후의 여성에게 빈번하게 일어나는 골다공증(osteoporosis)은 신체 내에서의 호르몬의 불균형으로 인해 골을 만드는 일이 어려워지고, 골을 분해하는 것이 더욱 활발하여, 골 사이에 공간이 생김으로써 발생하는 병이다.
- <21> 이 외에도 골석화증(osteopetrosis)으로 골의 분해가 잘 일어나지 않을 경우 골 내의 공간이 석회화되면서, 골의 발달이 일어나지 않거나, 팔, 다리가 짧으며 모든 면역세포의 근간인 골수의 형성이 일어나지 않는 병이 생기기도 한다.
- <22> 골다공증의 치료는 골 질량을 증가시켜 골절의 감소 또는 방지하는데 그 목적이 있다.
- <23> 이때, 증가된 골 량의 정도뿐 아니라 어느 부위에 어떠한 질(quality)의 골이 증가되는지도 중요하다.
- <24> IL-6는 골 흡수 인자로서, 파골세포성 골 흡수를 조절하는 다 기능적 사이토카인이며 폐경기 골다공증, 파젯병(Paget's disease), 그리고 류마티스 관절염을 포함한 많은 골질환의 병인에 영향을 끼친다.
- <25> 골에서 IL-6는 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone)에 의해서 조절되는 조골세포성 세포에 의해 생성된다.
- <26> 조골세포에서 생성된 IL-6는 주변의 골 흡수에 중요한 역할을 하는 파골세포의 형성/분화를 유발시키며, 조골세포에서 IL-6 생성은 에스트로겐 매개체를 통하여 에스트로겐에 의해 조절된다고 보고되어 왔다.
- <27> 또한, COX-2는 PGE2(prostaglandin E2)합성을 유발하는 효소로서 파골세포형성에서 관여한다.
- <28> PGE2는 골다공증과 파젯병(Paget's disease)과 같은 질환에서 파골세포의 수와 활성을 증가시키는데 중요한 역할을 한다고 보고되어 왔다.
- <29> COX-2와 PGE2는 골 조직의 리모델링에 중요한 역할을 하며, 파골세포 활성화와 조골세포의 골 형성을 매개하는 사이토카인에 관여한다.
- <30> 또한, COX-2-catalyzed pathway로부터 유리된 PGE2가 조골세포증식과 파골세포분화를 증가시키며, 유방암 세포의 골 대사에서 파골세포형성과 골 파괴에 영향을 끼친다.
- <31> 한편, 까마귀쪽나무(Litsea japonica juss)는 쌍떡잎식물 미나리아재비목 녹나무과의 상록 소교목으로 가마귀쪽나무·구름비라고도 한다.
- <32> 까마귀쪽나무에 대한 약리효능 등의 연구는 이뤄지고 있지 않으나, 녹나무과의 일부 나무는 그 활성에 대한 연구가 진행되고 있다.
- <33> 한국공개특허공보 10-2005-0081631 "녹나무 추출물을 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물"에는 항산화효과를 나타내어 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물로 사용될 수 있는 녹나무 추출물에 관한 것이 공개되어 있다.
- <34> 또, 한국등록특허공보 10-0586269 "생강나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물"에는, 생강나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 및 신장 기능 개선용 조성물에 관한 것이 공개되어 있다.
- <35> 또한, 한국공개특허공보 10-2004-0009772 "세포접착 저해활성을 갖는 락톤 화합물 및 이를 포함하는 육박나무 추출물"에는, 락톤 화합물 및 이를 포함하는 육박나무 추출물은 세포접착 저해제로서 세포접착과 관련된 질환의 예방 및 치료제로 사용할 수 있는 육박나무 추출물에 관한 것이 공개되어 있다.
- <36> 상기와 같이 최근에는 천연자원을 이용한 약리 성분 등을 개발하기 위해 많은 연구를 하고 있으며, 그 중 녹나무과의 일부 나무에 대해서 생리활성 연구가 진행되고 있으나, 아직까지 까마귀쪽나무의 생리활성에 대한 연구는 없는 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <37> 본 발명은 항산화활성, 항염활성 및 골대사 관련 인자 억제활성을 나타내는 까마귀쪽나무 추출물을 제공하는데 그 목적이 있다.
- <38> 또한, 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환, 골대사성 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

- <39> 본 발명은 항염활성 및 골대사 관련인자 억제활성을 나타내는 까마귀쪽나무 추출물에 관한 것이다.
- <40> 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물은, 까마귀쪽나무(*Litsea japonica* juss)의 잎, 줄기, 열매 중 선택된 1종 이상을 준비하고, 음건한 다음, 마쇄기로 분쇄한 분말을 80 % 에탄올에 침적하고, 초음파를 이용하여 1시간씩 3회 추출하여 에탄올추출물을 제조하고, 그 추출물의 상층액을 회수하여 감압 농축하고, 농축물을 증류수에 현탁시킨 후, 현탁액을 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올로 순차적으로 추출하여 까마귀쪽나무 추출분획물을 제조하는 것으로 구성된다.
- <41> 까마귀쪽나무(*Litsea japonica* juss)는 쌍떡잎식물 미나리아재비목 녹나무과의 상록 소교목으로 가마귀쪽나무 또는 구롬비라고도 한다.
- <42> 이 까마귀쪽나무는 바닷가 산기슭에서 자라며 높이 약 7 m의 나무로서, 7 ~ 10 월에 잎겨드랑이에서 겹산형꽃이 차례로 피며, 열매는 핵과로 타원형이며 다음해 10 월에 열린 자줏빛으로 익는다.
- <43> 본 발명에서는 제주도에 자생하는 식물로 성분이나 약리효능 연구가 거의 되어 있지 않은 까마귀쪽나무에서 생리활성이 큰 추출물을 제조하고, 그 추출물을 대상으로 항산화활성, 항염활성 및 골대사성 관련인자인 IL-6와 PGE2를 합성시키는 COX-2의 생성 억제저해 정도를 측정하여 질병의 예방 및 개선용 조성물로서의 가능성을 모색하는 데 목적을 두고 연구를 하였다.
- <44> 본 발명의 까마귀쪽나무의 부위별 추출물에 대해 항산화활성 및 항염활성을 실험한 결과 까마귀쪽나무 추출물은 잎, 줄기, 열매 모든 부위에서 생리활성이 크게 나타났음을 알 수 있었다.
- <45> 즉, 본 발명의 까마귀쪽나무의 부위별 추출물에 대해 항산화활성을 실험한 결과, 잎추출물과 열매추출물에서 DPPH 라디칼 소거활성이 높게 나타났으며, 줄기추출물 또한 DPPH 라디칼 소거활성이 나타났으나 잎과 열매 추출물에 비해서는 다소 활성이 떨어지는 면이 있었다(도 1).
- <46> 또한, 본 발명의 까마귀쪽나무 잎추출물과 열매추출물, 줄기추출물 모두 크산틴 산화효소 억제활성과 과산화물 라디칼 소거활성이 높게 나타났음을 확인하였다(도 2, 3).
- <47> 또한, 본 발명의 까마귀쪽나무의 부위별 추출물에 대하여 각각 항염활성을 실험한 결과, LPS단독 처리군에서는 NO가 과량 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 잎추출물과 줄기추출물, 열매추출물을 각각 처리한 실험군에서는 NO 생성량이 급격히 감소됨을 확인할 수 있었다(도 4).
- <48> 또한, 본 발명의 까마귀쪽나무 잎추출물 및 각각의 분획물에 대하여 생리활성을 알아보았다.
- <49> 먼저, 항산화활성에 대해 실험한 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 본 발명의 까마귀쪽나무 잎추출물 및 분획물에 대한 DPPH의 라디칼 소거활성은 80 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트, 부탄올, 디클로로메탄 분획물에서 다른 용매 분획물에 비해 대단히 높은 라디칼 소거 활성을 나타냈다.
- <50> 또한, 크산틴 산화효소(xanthine oxidase) 활성억제는 에틸아세테이트 분획물에서, 과산화물(superoxide) 라디칼 소거활성은 에틸아세테이트와 디클로로메탄 분획물이 가장 높은 활성을 나타내었다.
- <51> 전반적으로 가장 항산화 활성이 높게 나타난 에틸아세테이트 분획물의 DPPH의 라디칼 소거활성, 크산틴 산화효소 및 과산화물 소거 활성 IG_{50} 값은 $13.61 \mu\text{g/ml}$, $453.86 \mu\text{g/ml}$, $25.19 \mu\text{g/ml}$ 이었다.
- <52> 그리고 크산틴/크산틴 산화효소 시스템(xanthine/xanthine oxidase system)에 의한 과산화물 소거활성 또한 대조군으로 사용된 알로푸리놀($22.65 \mu\text{g/ml}$)과 비슷한 효과를 나타냈다.
- <53> 특히, 에틸아세테이트 분획물의 전자공여능은 대조군으로 사용된 합성 항산화제인 BHA($22.70 \mu\text{g/ml}$) 보다 높은 것을 확인하였다.
- <54> 그러나, 에틸아세테이트 분획물 뿐만 아니라 80 % 에탄올 추출물과 디클로로메탄, 부탄올 분획물 모두에서 전반

적으로 높은 라디칼 소거 활성을 나타낸 원인으로는 까마귀쪽나무에 함유되어 있는 성분들이 라디칼 반응 전반에 걸쳐 반응성을 모두 억제하는 것이 아니라, 활성산소의 종류나 라디칼 소스에 따라, 또한 산화반응 기작에 따라 반응성이 다르게 작용되기 때문이라 여겨지며, 이를 극복하기 위해선 반응기작에 따라 반응성을 억제할 수 있는 항산화물질 연구가 보다 더 세밀히 이루어져야 될 것으로 여겨진다.

- <55> 또한, 항염활성에 대해 실험한 결과 LPS단독 처리군에서는 NO가 과량 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 본 발명의 실시예 1의 까마귀쪽나무 잎추출물 및 분획물을 동시에 처리한 실험군에서는 NO 생성량이 급격히 감소됨을 확인할 수 있었다.
- <56> 특히, 에탄올 추출물과 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 분획물에서 NO의 생성량이 현저히 저해됨을 볼 수 있었으나(도 5), NO의 형성억제 효과가 높게 나타난 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물에서는 RAW264.7 세포의 세포독성이 낮게 나타내지 않았지만, 헥산 분획물에서는 세포독성이 강하게 나타났다.
- <57> 이러한 결과로 미루어 볼때 헥산 분획물에서의 NO의 형성억제 효과는 세포독성에 의한 결과라고 사료된다.
- <58> 또한, 까마귀쪽나무의 대식세포주인 RAW264.7 으로부터의 LPS 자극에 의한 NO의 형성억제 효과 및 iNOS의 발현, COX-2의 생성 및 활성저해 정도를 알아보았다.
- <59> 이에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 사용하여 RAW264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 생성을 유도한 후 까마귀쪽나무 추출물 및 분획물에 의한 저해 정도를 RT-PCR과 Western blot를 통해 알아보았다.
- <60> 그 결과 헥산, 디클로로메탄 분획물의 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 iNOS의 단백질 발현이 현저히 저해되는 것을 확인할 수 있었으며(도 6, 7), iNOS의 단백질 발현 억제 결과와 마찬가지로 현저히 COX-2의 단백질 발현도 저해됨을 확인할 수 있었다 (도 8).
- <61> 특히, 디클로로메탄 분획물에서 그 억제 효과가 가장 강하게 나타났으나, 헥산 분획물에서는 NO의 형성억제 효과 결과처럼 iNOS의 발현도 강하게 억제되었으나, COX-2의 발현은 그다지 억제시키지 못하였다.
- <62> 그 원인으로는 헥산 분획물인 경우는 독성효과에 의해 NO의 형성억제 및 iNOS의 발현 억제효과를 보인 것으로 판단된다.
- <63> 또, 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 염증성 프로스타글란딘 E_2 (prostaglandin E_2) 억제 효과를 ELISA kit를 이용하여 정량한 결과, 프로스타글란딘 E_2 (PGE_2) 생성억제는 디클로로메탄 분획물에서 높은 억제 효과를 나타냈으며, 까마귀쪽나무의 디클로로메탄 분획물이 LPS에 의해 발현되는 prostaglandin E_2 억제에 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다(도 9).
- <64> 이러한 결과는 COX-2의 생성 억제가 PGE_2 생성 억제를 통한 것으로 여겨진다.
- <65> 그러나, 헥산 분획물인 경우는 독성효과에 의해 PGE_2 의 억제효과가 나타난 것으로 사료된다.
- <66> 또한, 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물 및 분획물에 대하여 골대사 관련인자 억제활성에 대하여, IL-1 β 가 조골세포(osteoblast)에서 IL-6 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로 IL-1 β (10ng/ml)를 처리하여 조골세포 계열인 MG-63 세포로부터 IL-6의 생성을 유도하여 실험하였다.
- <67> 그 결과, IL-1 β 단독 처리군에서는 IL-6가 과량 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 까마귀쪽나무 시료를 동시에 처리한 시험구에서는 IL-6 생성량이 급격히 감소됨을 확인할 수 있었고, 특히 조추출물과 디클로로메탄, 에틸아세테이트 분획물에서 IL-6의 생성량이 현저히 저해됨을 볼 수 있었다(도 10).
- <68> 그러나, 헥산 분획물에서는 세포독성이 강하게 나타났다.
- <69> 이는 본 발명의 까마귀쪽나무 헥산 분획물은 COX-2의 발현억제 효과와 유사하다는 사실을 보여주는 것이다.
- <70> 또한, IL-6 생성억제가 mRNA 발현을 억제한 결과인지를 조사하기 위하여 IL-1 β 와 까마귀쪽나무 시료를 함께 처리하여 IL-1 β 에 의한 IL-6 mRNA 발현에 대한 억제효과를 조사하였다.
- <71> 그 결과, 까마귀쪽나무 디클로로메탄 분획물에서 IL-6 억제효과가 강하게 나타났으며, 이는 IL-1 β 에 의해 발현되는 IL-6 억제에 중요한 작용을 함을 알 수 있었다.
- <72> β -Actin을 같이 나타내줌으로써 동일한 양의 RNA를 가지고 실험에 이용한 것을 보여주었다(도 11).

- <73> 한편, 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화제 조성물, 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물, 골대사성 질환의 예방 및 치료용 조성물 등을 제조할 수 있다.
- <74> 또한, 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물을 이용하여 식품첨가제, 음료조성물, 화장품조성물, 동물용 사료첨가제, 양식어류 사료첨가제 등으로 폭넓게 활용할 수 있다.
- <75> 이하, 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대하여 실시예 및 실험예를 통하여 상세히 설명하나, 이들이 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- <76> <실시예 1> 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물의 제조1
- <77> 제주도 해안가에 자생하고 있는 까마귀쪽나무(*Litsea japonica* juss) 잎을 2005년 11월경에 채집하여 준비하였다.
- <78> 준비한 까마귀쪽나무의 잎을 음건한 다음, 마쇄기로 분쇄한 분말을 80 % 에탄올에 침적하고 초음파를 이용하여 1시간씩 3회 추출하여 까마귀쪽나무 추출물을 제조하였다.
- <79> 또한, 그 추출물의 상층액을 회수하여 감압 농축하여 에탄올 추출농축액을 제조한 다음, 그 추출농축액 중 일부에 증류수를 농축액 30 g 당 1ℓ의 비율로 넣고 현탁시킨 후에 핵산(1ℓ × 3), 디클로로메탄(1ℓ × 3), 에틸아세테이트(1ℓ × 3), 부탄올(1ℓ × 3)로 순차적으로 추출하여 각각의 분획물을 제조하였다.
- <80> <실시예 2> 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물의 제조2
- <81> 본 발명의 실시예 1과 같은 방법으로 추출물을 제조하되, 까마귀쪽나무 줄기를 이용하여 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물을 제조하였다.
- <82> <실시예 3> 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물의 제조3
- <83> 본 발명의 실시예 1과 같은 방법으로 추출물을 제조하되, 까마귀쪽나무 열매를 이용하여 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물을 제조하였다.
- <84> <실험예 1> 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대한 항산화활성 실험
- <85> 1. DPPH 라디칼 소거활성에 의한 항산화활성 측정
- <86> 전자공여능(electron donating ability) 측정은 Blois 방법에 의한 DPPH 라디칼 소거법에 따라 측정하였다.
- <87> 본 발명의 실시예 1 내지 3의 방법으로 제조한 까마귀쪽나무 추출물을 준비하였다.
- <88> 메탄올에 녹인 시료의 각각의 농도를 96 well plate에 100 μℓ씩 분주하고 0.4 mM DPPH용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- <89> 대조군으로는 아스코르빈산(ascorbic acid), BHA(butylated hydroxy anisole), 트롤록스(trolox)를 사용하였다.
- <90> DPPH 라디칼 소거활성은 아래식으로부터 산출하였고, DPPH의 흡광도가 50 % 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC₅₀)로 표시하였으며, 각 시료는 3 회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.
- <91>
$$\text{DPPH radical 소거활성 (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$
- <92>
$$A_{\text{sample}} = \text{시료를 첨가한 반응액의 흡광도}$$
- <93>
$$A_{\text{control}} = \text{시료대신 메탄올을 첨가한 반응액의 흡광도}$$
- <94> 2. 크산틴 산화효소 억제활성 및 과산화물 소거활성 검색
- <95> 크산틴/크산틴 산화효소(Xanthine/xanthine oxidase)에 의한 요산(uric acid) 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였고, 과산화물(superoxide)의 양은 니트로블루 테트라졸리움(nitroblue tetrazolium, NBT) 환원방법에 의해 측정하였다.
- <96> 반응액은 각 시료의 여러 농도와 0.5 mM 크산틴(xanthine)과 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer (pH 7.5) 100 μℓ에서 준비하였고, 50 mU/㎖ 크산틴 산화효소(xanthine oxidase)를 첨가하여 요산(uric acid)의 생성을 유도하였다.

- <97> 과산화물(Superoxide) 소거활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT를 첨가하여 반응 시켰다.
- <98> 크산틴 산화효소(Xanthine oxidase) 억제활성 및 과산화물(superoxide) 소거 활성은 각각 생성된 요산(uric acid)과 과산화물(superoxide)의 흡광도가 50 % 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC_{50})로 표시하였다.
- <99> 3. 항산화활성 실험 결과
- <100> 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 본 발명의 실시예 1의 까마귀쪽나무 잎추출물 및 분획물에 대한 DPPH의 라디칼 소거활성은 80 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트, 부탄올, 디클로로메탄 분획물에서 다른용매 분획물에 비해 대단히 높은 라디칼 소거 활성을 나타냈다.
- <101> 또한, 크산틴 산화효소(xanthine oxidase) 활성억제는 에틸아세테이트 분획물에서, 과산화물(superoxide) 라디칼 소거활성은 에틸아세테이트와 디클로로메탄 분획물이 가장 높은 활성을 나타내었다.
- <102> 전반적으로 가장 항산화 활성이 높게 나타난 에틸아세테이트 분획물의 DPPH의 라디칼 소거활성, 크산틴 산화효소 및 과산화물 소거 활성 IC_{50} 값은 13.61 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 453.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25.19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.
- <103> 그리고 크산틴/크산틴 산화효소 시스템(xanthine/xanthine oxidase system)에 의한 과산화물 소거활성 또한 대조군으로 사용된 알로푸리놀(22.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 비슷한 효과를 나타냈다.
- <104> 특히, 에틸아세테이트 분획물의 전자공여능은 대조군으로 사용된 합성 항산화제인 BHA(22.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 보다 높은 것을 확인하였다.
- <105> 그러나, 에틸아세테이트 분획물 뿐만 아니라 80 % 에탄올 추출물과 디클로로메탄, 부탄올 분획물 모두에서 전반적으로 높은 라디칼 소거 활성을 나타낸 원인으로는 까마귀쪽나무에 함유되어 있는 성분들이 라디칼 반응 전반에 걸쳐 반응성을 모두 억제하는 것이 아니라, 활성산소의 종류나 라디칼 소스에 따라, 또한 산화반응 기작에 따라 반응성이 다르게 작용되기 때문이라 여겨지며, 이를 극복하기 위해선 반응기작에 따라 반응성을 억제할 수 있는 항산화물질 연구가 보다 더 세밀히 이루어져야 될 것으로 여겨진다.

<106> <표 1> 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대한 항산화활성 측정실험 결과

처리	$IC_{50}(\mu\text{g}/\text{ml})^a)$		
	DPPH 라디칼 소거활성	크산틴 산화효소 억제활성	과산화물 라디칼 소거활성
에탄올추출물	52.02 \pm 1.72	> 1000	> 1000
헥산분획물	669.29 \pm 2.83	> 1000	> 1000
디클로로메탄 분획물	56.54 \pm 1.75	> 1000	243.51 \pm 2.39
에틸아세테이트 분획물	13.61 \pm 1.13	453.86 \pm 2.66	25.19 \pm 1.40
부탄올분획물	31.25 \pm 1.49	> 1000	> 1000
물 분획물	114.24 \pm 2.06	> 1000	> 1000
BHA ^{b)}	22.70 \pm 0.61	NA ^{c)}	NA ^{c)}
아스코르빈산	3.90 \pm 3.22	-	-
트롤록스	8.62 \pm 2.20	288.60 \pm 4.4	189.9 \pm 2.03
알로푸리놀	NA ^{c)}	3.12 \pm 0.17	22.65 \pm 0.35

<108> * a) IC_{50} 값은 흡광도가 50 % 감소할 때 나타나는 시료의 농도로써 3 회 반복 실험하여 계산된 값임.

<109> * b) BHA : 부틸하이드록시 아니솔(Butylated hydroxy anisole)

<110> * c) NA는 Not available method.

<111> 한편, 본원발명의 실시예 1의 까마귀쪽나무 잎추출물과 실시예 2의 줄기추출물, 실시예 3의 열매추출물에 대하여 각각 항산화활성을 측정한 결과, DPPH 라디칼 소거활성은 잎추출물과 열매추출물의 활성은 비슷하였으나, 줄기추출물의 DPPH 라디칼 소거활성이 다소 떨어지는 것을 알 수 있었다(도 1).

- <112> 또, 크산틴 산화효소 억제활성은 실시예 1 내지 3의 추출물이 모두 비슷하게 측정되었으며(도 2), 과산화물 소거활성도 큰 차이를 보이지 않았다(도 3).
- <113> 이는, 까마귀쪽나무의 부위에 따라 항산화활성이 큰 차이가 없으며, 까마귀쪽나무의 잎, 줄기, 열매 모두 활성이 좋다는 것을 보여주는 결과였다.
- <114> 항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거작용은 활성라디칼(free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다.
- <115> 크산틴 산화효소(Xanthine oxidase)는 산화적 환경에서 크산틴 탈수소효소(xanthine dehydrogenase)로부터 생성된다.
- <116> 크산틴 산화효소는 하이포크산틴(hypoxanthine)을 산화시켜 최종적으로 요산(uric acid)과 산소를 생성하며, 산소유리기와 수소과산화기가 이 산소로부터 발생하게 된다.
- <117> 요산(Uric acid)의 축적은 고요산혈증과 통풍을 유발하는 것으로 알려져 있으므로 요산 형성의 억제제가 이들 질환을 위한 치료 물질로서 유용할 것이다.
- <118> 크산틴 산화효소(Xanthine oxidase)에 의해 생성된 산소유리기는 세포의 손상을 초래한다.
- <119> 그러나, 이 내인성 항산화 방어체계가 세포내 산화-환원 균형을 유지하는데에 문제가 생길 경우 결과적으로 산화스트레스가 일어나게 되며 이 산화스트레스는 직접적으로 세포내 거대분자의 손상을 일으키거나 세포손상을 일으키는데 중요한 역할을 한다.
- <120> 따라서, 산소유리기의 자유기를 소거할 수 있는 물질 또한 산화적 손상의 예방에 유용할 것이다.
- <121> <실험예 2> 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대한 항염활성 실험
- <122> 염증 반응은 조직(세포)의 손상이나 외부감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)에 감염되었을 때 국소 혈관과 체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종, 발열, 통증 등 외적 증상을 나타낸다.
- <123> 정상인 경우 염증반응은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능회복작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 내부물질이 원인이 되어 염증반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 이끈다.
- <124> 생체에 있어서 염증의 발생원인으로서 다양한 생화학적 현상이 관여하고 있으며 특히, Nitric oxide(NO)를 발생시키는 효소인 nitric oxide synthase(NOS)와 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생합성과 관련된 효소들은 염증 반응을 매개하는데 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다.
- <125> 따라서, L-아르기닌(L-Arginine)으로부터 NO를 생성시키는 효소인 NOS나, 아라키돈산(Arachidonic acid)으로부터 프로스타글란딘류를 합성하는데 관련된 효소인 COX는 염증을 차단하는데 있어서 주된 목표가 되고 있다.
- <126> 체내 염증과정에서는 과량의 nitric oxide(NO) 및 prostaglandin E₂(PGE₂) 등의 염증인자가 NO synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase(COX-2)에 의해 형성된다. 이 중 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다.
- <127> 이에 까마귀쪽나무 추출물의 뮤린 마크로파지 세포주(murine macrophage cell line)인 RAW264.7 으로부터의 LPS 자극에 의한 NO의 형성억제 효과 정도 및 그 독성정도를 확인해 보았다.
- <128> 1. 세포 배양
- <129> 조골세포 계열(human osteoblast cell line)인 MG-63 세포와 대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양받아 준비하였다.
- <130> 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin) 100 units/ml와 10 % 우태혈청(FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO₂ 항온기에서 배양하였으며, MG-63 세포는 4일에 한번씩, RAW 264.7 세포는 3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.
- <131> 2. LDH 세포독성 검색(LDH cytotoxicity detection)

- <132> 젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase, LDH)는 대부분의 세포에 존재하는 안정형 세포질 효소(stable cytoplasmic enzyme)로서 원형질막이 손상을 입으면 세포배양액으로 방출된다.
- <133> 손상을 입은 세포가 방출하는 LDH 활성을 측정하는 비색분석법(Colorimetric assay)을 본 실험에서 사용하였다.
- <134> 즉, 세포를 48 well plate의 각 well에 seeding 하고 24시간 동안 배양 후, 시료를 농도별로 첨가하여 세포배양이 끝난 후 LDH 세포독성검색 키트(LDH cytotoxicity detection kit, Promega)를 사용하여 492 nm에서 효소 활성을 측정하였다.
- <135> 3. NO 생성 억제율 검색
- <136> RAW264.7 세포를 10 % FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.0×10^5 cells/ml로 조절한 후 48 well plate 에 접종하고, 추출물 시료와 LPS ($1 \mu\text{g/ml}$)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다.
- <137> 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO의 형태로 측정하였다.
- <138> 세포배양 상등액 100 μl 와 Griess시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 μl 를 혼합하여 96 well plates에서 10 분 동안 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- <139> 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO_2)를 표준으로 비교하였다.
- <140> 4. Prostaglandin E_2 (PGE_2) 생성 및 정량
- <141> 쥐원 마크로파지 세포주(Murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5 % CQ 항온기에서 18시간 전배양 하였다.
- <142> 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/ml)로 조제된 시험물질 25 μl 와 450 μl 의 LPS 최종농도($1 \mu\text{g/ml}$)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다.
- <143> 24 시간 후 프로스타글란딘 E_2 (PGE_2)를 측정하기 위해 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻었다.
- <144> PGE_2 의 정량은 PGE_2 ELISA kit (R&D Systemes, Inc, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.
- <145> 5. 항염활성 실험결과
- <146> 본 발명의 실시예 1 내지 3의 까마귀쪽나무 추출물을 각각 RAW264.7 에서 $25 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 nitric oxide(NO) 생성 억제 효과를 세포 배양액 중에 존재하는 NO $^-$ 의 형태로 측정하였다.
- <147> 그 결과, LPS단독 처리군에서는 NO가 과량 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 본 발명의 실시예 1의 까마귀쪽나무 잎추출물과 실시예 2의 줄기추출물, 실시예 3의 열매추출물을 각각 처리한 실험군에서는 NO 생성량이 급격히 감소됨을 확인할 수 있었다(도 4).
- <148> 특히, 까마귀쪽나무 잎추출물에서 NO 생성량이 급격히 감소됨을 확인할 수 있었다.
- <149> 또한, LPS단독 처리군에서는 NO가 과량 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 본 발명의 실시예 1의 까마귀쪽나무 잎추출물 및 분획물을 동시에 처리한 실험군에서는 NO 생성량이 급격히 감소됨을 확인할 수 있었다.
- <150> 특히, 에탄올 추출물과 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 분획물에서 NO의 생성량이 현저히 저해됨을 볼 수 있었다(도 5).
- <151> 그러나, NO의 형성억제 효과가 높게 나타난 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물에서는 RAW264.7 에서의 세포독성이 낮게 나타내지 않았지만, 헥산 분획물에서는 세포독성이 강하게 나타났다.
- <152> 이러한 결과로 미루어 볼때 헥산 분획물에서의 NO의 형성억제 효과는 세포독성에 의한 결과라고 사료된다.
- <153> LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 많은 양의 NO를 생성하게 되며, 이에 의한 세포독성은 염증반응, 세포의 돌연변

이 및 종양 발생 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다.

- <154> 염증반응과 관련된 조직 손상에서 NO와 iNOS의 발현이 증가되어 있음이 보고되어 있으며, 다수의 합염증제 약물들의 작용기전은 프로스타글란딘 합성 억제제를 나타내며, 이는 COX-2의 생성 및 활성화저해에 의한 것이다.
- <155> COX는 COX-1과 COX-2로 나뉘어지는데 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다.
- <156> COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 프로스타글란딘(prostaglandin)의 합성에 작용한다.
- <157> 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발현된다.
- <158> 따라서, COX-2에 의한 프로스타글란딘(prostaglandin)의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨진다.
- <159> 이에 까마귀쭈크나무의 대식세포주인 RAW264.7 으로부터의 LPS 자극에 의한 NO의 형성억제 효과 및 iNOS의 발현, COX-2의 생성 및 활성화저해 정도를 알아보았다.
- <160> 이에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 사용하여 RAW264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 생성을 유도한 후 까마귀쭈크나무 추출물 및 분획물에 의한 저해 정도를 RT-PCR과 Western blot를 통해 알아 보았다.
- <161> 그 결과 핵산, 디클로로메탄 분획물의 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 iNOS의 단백질 발현이 현저히 저해되는 것을 확인할 수 있었으며(도 6, 7), iNOS의 단백질 발현 억제 결과와 마찬가지로 현저히 COX-2의 단백질 발현도 저해됨을 확인할 수 있었다 (도 8).
- <162> 특히, 디클로로메탄 분획물에서 그 억제 효과가 가장 강하게 나타났다.
- <163> 그러나, 핵산 분획물에서는 NO의 형성억제 효과 결과처럼 iNOS의 발현도 강하게 억제되었으나, COX-2의 발현은 그다지 억제시키지 못하였다.
- <164> 그 원인으로는 핵산 분획물인 경우는 독성효과에 의해 NO의 형성억제 및 iNOS의 발현 억제효과를 보인 것으로 판단된다.
- <165> 또한, 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 염증성 프로스타글란딘(prostaglandin) E₂ 억제 효과를 ELISA kit를 이용하여 정량하였다.
- <166> 그 결과, 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂) 생성억제는 디클로로메탄 분획물에서 높은 억제 효과를 나타내었으며 까마귀쭈크나무의 디클로로메탄 분획물이 LPS에 의해 발현되는 prostaglandin E₂ 억제에 영향을 준다는 것을 확인 할 수 있었다(도 9).
- <167> 이러한 결과는 COX-2의 생성 억제가 PGE₂ 생성 억제제를 통한 것으로 여겨진다. 그러나 핵산 분획물인 경우는 독성효과에 의해 PGE₂의 억제효과가 나타난 것으로 사료된다.
- <168> <실험예 3> 본 발명의 까마귀쭈크나무 추출물에 대한 골대사 관련인자 억제활성 실험
- <169> 골대사성 질환의 치료는 골 질량을 증가시켜 골절의 감소 또는 방지하는데 그 목적이 있다.
- <170> 이때, 증가된 골 양의 정도뿐 아니라 어느 부위에 어떠한 질(quality)의 골이 증가되는가하는 것도 중요하다.
- <171> 에스트로겐이 골소실의 감소 및 방지하는 기전에 대해서 정확히 밝혀져 있지는 않지만, 여성 호르몬은 폐경 후 여성에서 조골세포 및 골수기질 조골세포들을 조절해서 증가된 IL-6 생성을 억제하여 파골세포의 활동을 감소시키며, 또한 파골세포의 예정사(apoptosis)를 증가시켜 골 양의 감소를 나타낸다.
- <172> 골에서 IL-6는 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone)에 의해서 조절되는 조골세포성 세포에 의해 생성된다.
- <173> 조골세포에서 생성된 IL-6는 주변의 골 흡수에 중요한 역할을 하는 파골세포의 형성/분화를 유발시킨다.
- <174> 또한, 조골세포에서 IL-6 생성은 에스트로겐 매개체를 통하여 에스트로겐에 의해 조절된다고 알려졌다.
- <175> 이에 본 발명의 까마귀쭈크나무 추출물과 분획물을 대상으로 IL-6의 생성 억제정도를 조사하였다.
- <176> 1. Interleukin-6 생성 및 정량
- <177> 조골세포 계열인 MG-63 세포(4.0×10^5 cells/ml)를 DMEM 배지를 이용하여 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂

항온기에서 18시간 전 배양하였다.

<178> 이후 배지를 제거하고 10배 농도(1 mg/ml)로 조제된 시험물질 50 μ l와 IL-1 β (10ng/ml) 450 μ l를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다.

<179> 24 시간 후 배양 배지를 원심분리(12,000rpm, 3분)하여 얻어진 상층액의 IL-6 함량을 측정하였다(Tolonen *et al.*, 2002).

<180> 모든 시료는 정량 전까지 -20℃ 이하에 보관하였다.

<181> IL-6 정량은 human enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit (Farming system, Inc, USA)를 이용하여 정량하였으며, standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

<182> 2. RNA 분리 및 RT-PCR

<183> 세포로부터의 Total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC)를 이용하였으며, RNase-free한 조건하에서 이루어졌다.

<184> 1 μ g의 Total RNA를 oligo(dT)₁₈ primer, dNTP(0.5 μ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase(2U)로 70℃ 5 min, 37℃ 5 min, 37℃ 60 min, 그리고 70℃에서 10 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다.

<185> 연쇄중합반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)은 합성된 cDNA로부터 유전자를 증폭시키기 위하여 2 μ l cDNA, 4 μ M의 5'과 3'primer, 10X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 unit Taq polymerase (Promega)를 섞고 증류수로 전체를 25 μ l로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다.

<186> 이때 PCR cycle은 94℃/45초, 55~60℃/45초, 72℃/60초, 30 회 이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5 % 아가로스겔에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다(표 2).

<187> <표 2> RT-PCR 분석시 사용한 프라이머 염기서열

유전자			프라이머 서열	서열번호	단편크기
RAW 264.7	COX-2	F	5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'	1	696 bp
		R	5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'	2	
	iNOS	F	5'-CCCTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'	3	496 bp
		R	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'	4	
	β -Actin	F	5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'	5	603 bp
		R	5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	6	
MG-63	IL-6	F	5'-AATTCGGTACATCCTCGACG-3'	7	421 bp
		R	5'-GCGCAGAATGAGATGAGTTG-3'	8	
	β -Actin	F	5'-ATGGGTCAGAAGGATTCTCTATG-3'	9	588 bp
		R	5'-CAGCTCGTAGCTCTTCTCCA-3'	10	

<189> 3. 웨스턴 블랏 분석(Western blot analysis)

<190> 세포에 까마귀쭈나무 추출물 및 분획물을 100 μ g/ml의 농도로 각각 처리 후 세포를 수집하였다.

<191> 세포를 2 ~ 3 회 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 1 ml의 lysis buffer을 첨가, 30 분 ~ 1 시간동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20 분간 원심하여 세포막 성분 등을 제거하였다.

<192> 단백질 농도는 BSA(Bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다.

<193> 30 ~ 50 μ g의 lysate를 8 ~ 12 % mini gel SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에 200mA로 2시간 동안 transfer하였다.

<194> 그리고, Membrane의 blocking은 5 % skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2 시간 동안 실시하였다.

<195> iNOS의 발현 양을 검토했기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (1: 1000) (Santa-Cruz) 을 COX-2의 발현 양을 검토했기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2 (1: 1000) (Cell Signaling)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2 시

간 반응시킨 후 TTBS로 3 회 세정하였다.

- <196> 2차 항체로는 HRP(Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Co.)를 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 30 분간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Co.)과 1~3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.
- <197> 4. 골대사 관련인자 억제활성 실험결과
- <198> IL-1 β 가 조골세포(osteoblast)에서 IL-6 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로 IL-1 β (10ng/ml)를 처리하여 조골세포 계열인 MG-63 세포로부터 IL-6의 생성을 유도하였다.
- <199> 그 결과, IL-1 β 단독 처리군에서는 IL-6가 과량 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 까마귀쪽나무 시료를 동시에 처리한 시험구에서는 IL-6 생성량이 급격히 감소됨을 확인할 수 있었고, 특히 조추출물과 디클로로메탄, 에틸아세테이트 분획물에서 IL-6의 생성량이 현저히 저해됨을 볼 수 있었다(도 10).
- <200> 그러나, 헥산 분획물에서는 세포독성이 강하게 나타났다.
- <201> 이는 본 발명의 까마귀쪽나무 헥산 분획물은 COX-2의 발현억제 효과와 유사하다는 사실을 보여주는 것이다.
- <202> 또한, IL-6 생성억제가 mRNA 발현을 억제한 결과인지를 조사하기 위하여 IL-1 β 와 까마귀쪽나무 시료를 함께 처리하여 IL-1 β 에 의한 IL-6 mRNA 발현에 대한 억제효과를 조사하였다.
- <203> 그 결과, 까마귀쪽나무 디클로로메탄 분획물에서 IL-6 억제효과가 강하게 나타났으며, 이는 IL-1 β 에 의해 발현되는 IL-6 억제에 중요한 작용을 함을 알 수 있었다.
- <204> β -Actin을 같이 나타내줌으로써 동일한 양의 RNA를 가지고 실험에 이용한 것을 보여주었다(도 11).

발명의 효과

- <205> 본 발명에 의해 항산화활성, 항염활성 및 골대사 관련 인자 억제활성을 나타내는 까마귀쪽나무 추출물이 제공된다.
- <206> 또한, 본 발명에 의해 까마귀쪽나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환, 골대사성 질환의 예방 및 치료용 조성물이 제공된다.

도면의 간단한 설명

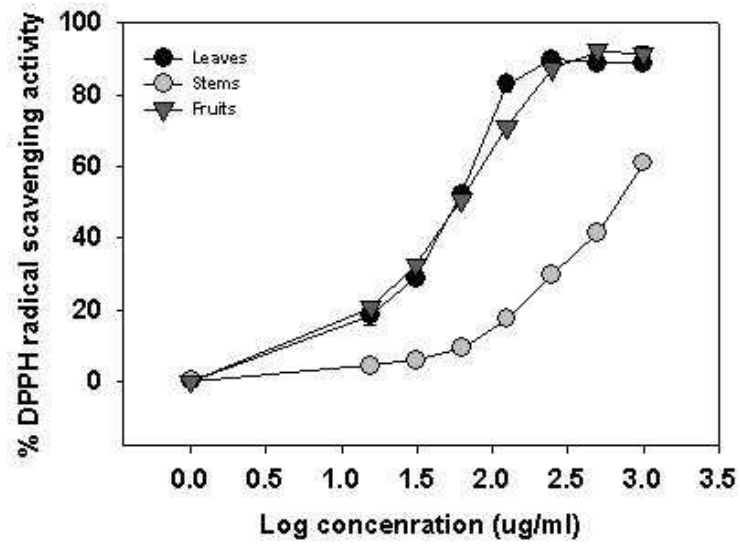
- <1> 도 1은 본 발명의 까마귀쪽나무의 부위별 추출물에 대한 DPPH 라디칼 소거활성 결과를 나타내는 그래프
- <2> 도 2는 본 발명의 까마귀쪽나무의 부위별 추출물에 대한 크산틴 산화효소 억제활성 결과를 나타내는 그래프
- <3> 도 3은 본 발명의 까마귀쪽나무의 부위별 추출물에 대한 과산화물 라디칼 소거활성 결과를 나타내는 그래프
- <4> 도 4는 본 발명의 까마귀쪽나무의 부위별 추출물에 대한 RAW 264.7 세포에서의 세포독성 및 질소산화물(NO) 생성율에 대한 그래프
- <5> 도 5는 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대한 RAW 264.7 세포에서의 세포독성 및 질소산화물(NO) 생성율에 대한 그래프
- <6> 도 6은 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대한 RAW 264.7 세포에서 iNOS 의 단백질 발현의 억제효과를 나타내는 웨스턴블랏 사진
- <7> 도 7은 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대한 RAW 264.7 세포에서 iNOS 의 mRNA 발현의 억제효과를 나타내는 웨스턴블랏 사진
- <8> 도 8은 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대한 RAW 264.7 세포에서 COX-2 의 단백질 발현의 억제효과를 나타내는 웨스턴블랏 사진
- <9> 도 9는 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대한 RAW 264.7 세포에서 염증성 프로스타글란딘 E₂(prostaglandin E₂)의 억제 효과를 나타내는 그래프
- <10> 도 10은 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대한 MG-63 세포에서 IL-6 생성 억제효과를 나타내는 그래프

<11> 도 11은 본 발명의 까마귀쪽나무 추출물에 대한 MG-63 세포에서 IL-6 mRNA 발현 억제효과를 나타내는 웨스턴블랏 사진과 그래프

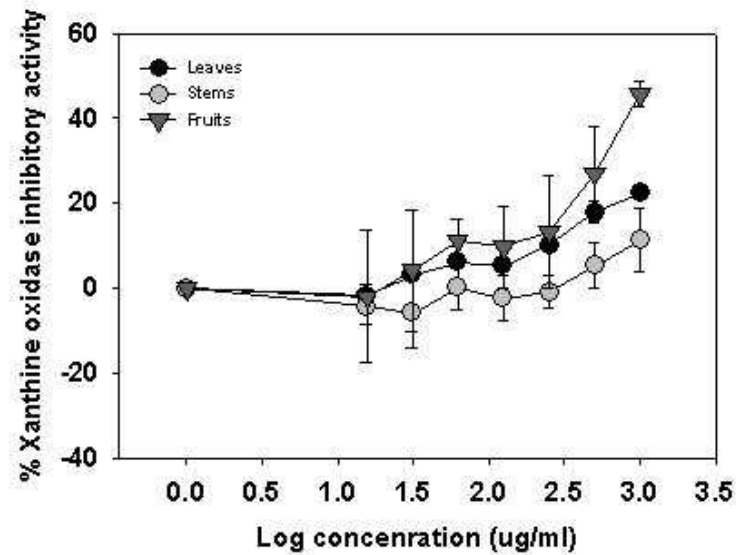
<12> A : 웨스턴블랏 사진, B : 그래프

도면

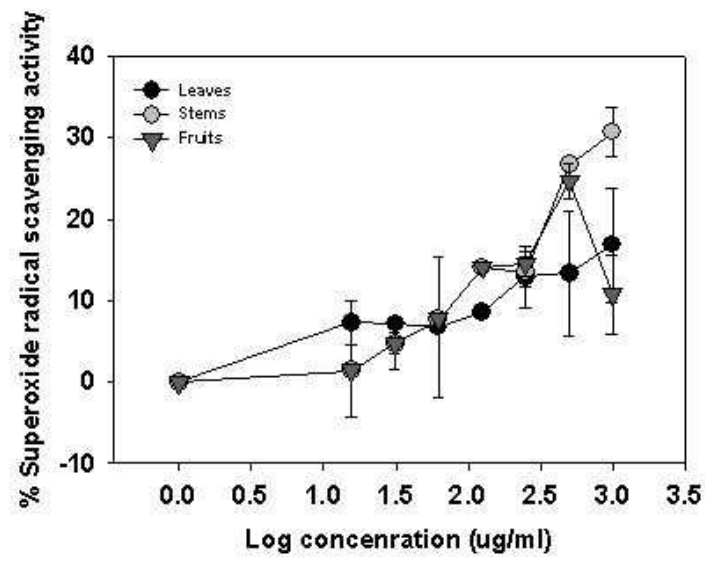
도면1



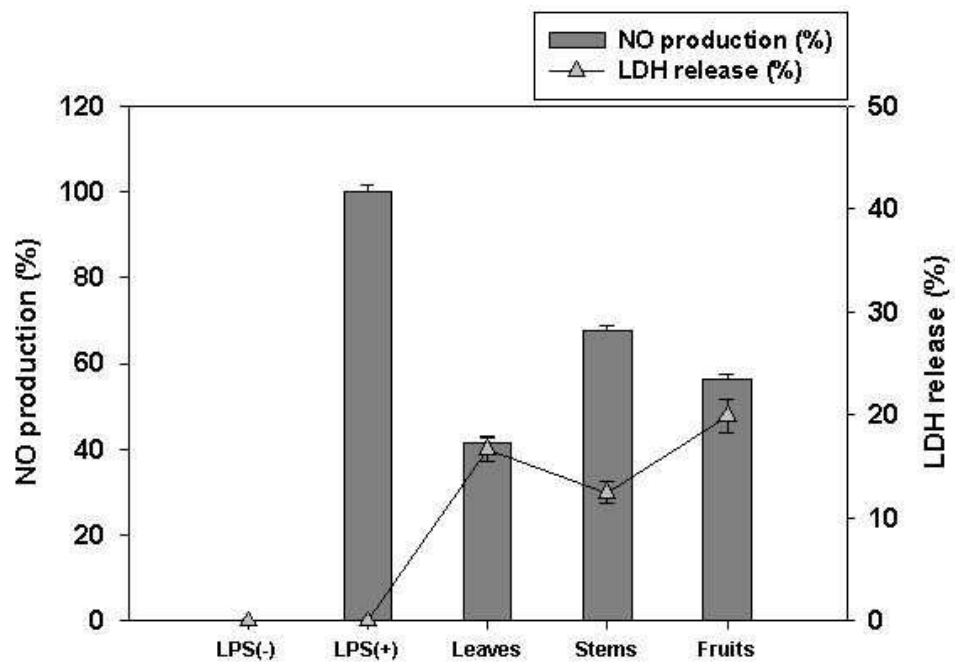
도면2



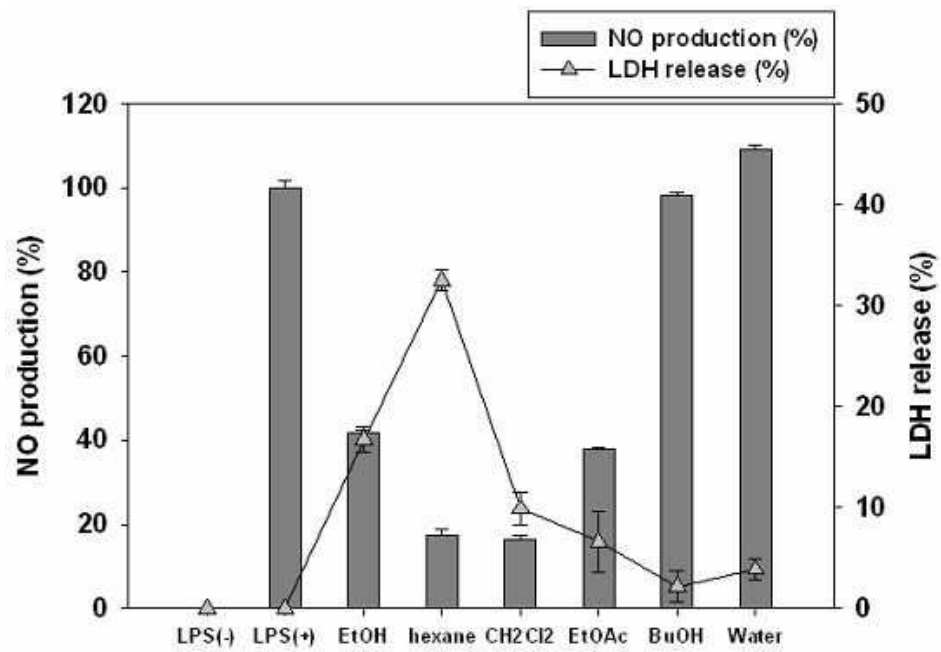
도면3



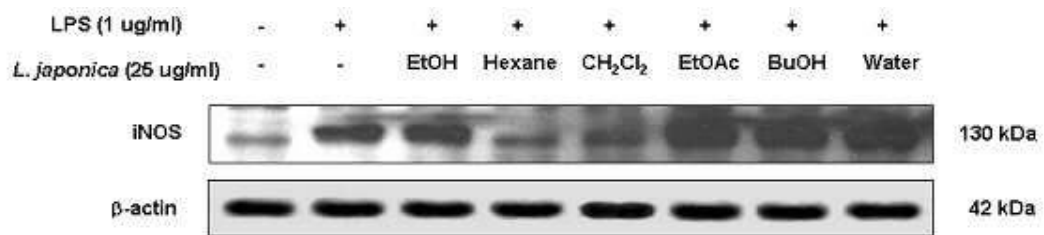
도면4



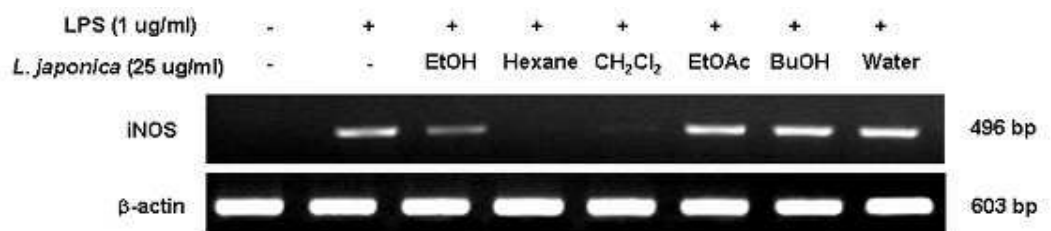
도면5



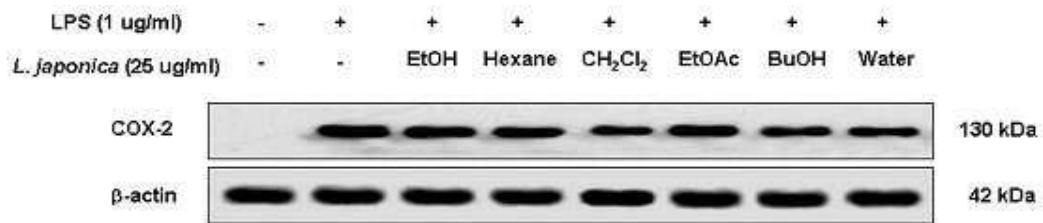
도면6



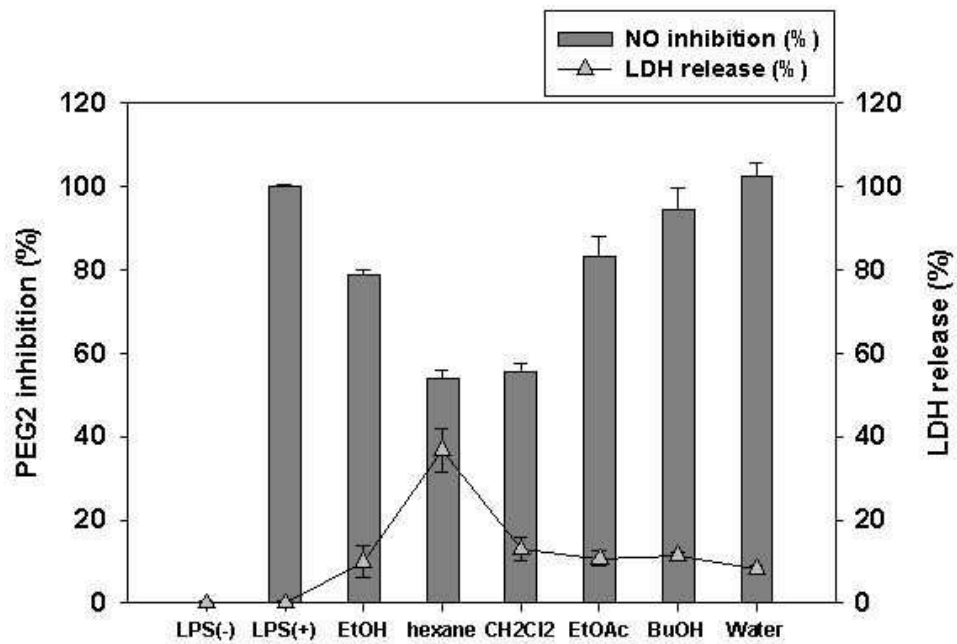
도면7



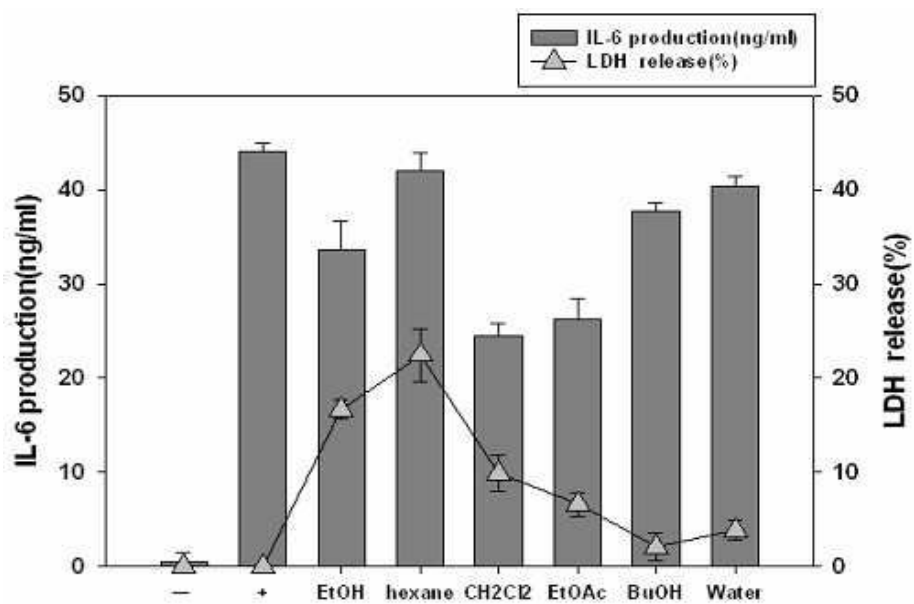
도면8



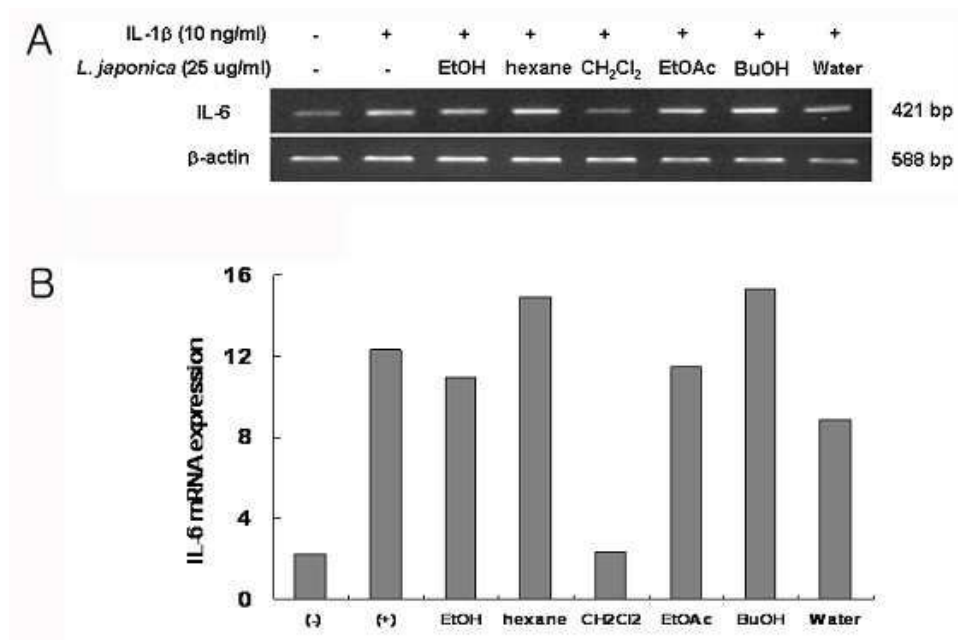
도면9



도면10



도면11



서열목록

<110> Jeju-Hi Tech Industry Development Institute
 <120> LITSEA JAPONICA EXTRACTS HAVING ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY AND
 BONE METABOLISM FACTOR INHIBITION ACTIVITY

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

cactacatcc tgaccactt

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2
atgctcctgc ttgagtatgt 20

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
cccttccgaa gtttctggca gcagc 25

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 4
ggctgtcaga gcctcgtggc tttgg 25

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 5
gtgggcccgc ctaggcacca g 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 6
ggaggaagag gatgcggcag t 21

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7

aattcggtag atcctcgacg 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 gcgcagaatg agatgagttg 20

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 atgggtcaga aggattccta tg 22

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 cagctcgtag ctcttctcca 20