



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월21일
 (11) 등록번호 10-1432884
 (24) 등록일자 2014년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/81 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0044413
 (22) 출원일자 2012년04월27일
 심사청구일자 2012년04월27일
 (65) 공개번호 10-2013-0121321
 (43) 공개일자 2013년11월06일
 (56) 선행기술조사문헌
 X. Yuan et al. Food Chemistry. 2012, Vol.133,
 Issue 1, pp.10-14 (Available online
 2011.09.)*
 EP01940243 B1
 WO2011020853 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
 전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
 (72) 발명자
최철용
 광주 서구 풍암순환로 14, 105동 203호 (풍암동,
 호반아파트)
장욱진
 전남 장흥군 장흥읍 못골길 32, 102동 402호 (동
 산빌라)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
최석진

전체 청구항 수 : 총 6 항

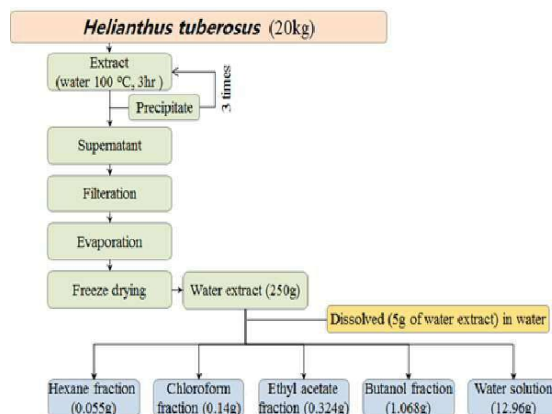
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 **돼지감자 지상부 추출물을 유효성분으로 함유하는 항염 조성물**

(57) 요약

산업용 화학성분을 주원료로 한 염증 예방 및 치료용 약학조성물의 주원료를 우리 나라에서 흔하게 구할 수 있는 천연원료인 돼지감자 지상부 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 돼지감자 지상부 추출물을 함유한 염증 예방 및 치료용 약학조성물을 제공하고자 한다. 더욱 상세하게는 돼지감자 지상부로부터 열수추출된 농축물을 분획용매로 분획하여 추출된 조성물이 항염증효과를 갖는지에 대한 동물실험을 실시한 결과 염증 유발 매개체인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성 억제 효능을 확인하는 한편, LPS로 활성화된 macrophage primary cell에서 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성성이 증가하게 됨을 확인함으로써 돼지감자 지상부 추출물의 NO 생성 억제하여 항염 효능을 가지고 있다는 결과를 얻었다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

설희진

광주 남구 봉선2로 96-14, 203동 806호 (봉선동,
무등2차아파트)

이규욱

전남 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136, 102동 103호
(성은연립)

김 현

광주 북구 서방로31번길 51, (중흥동)

반상오

광주 북구 평교로29번길 23, (문흥동)

박가현

전남 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136, 102동 103호
(성은빌라)

김희숙

경남 고성군 개천면 구만로 337-8,

이동욱

전남 장흥군 장흥읍 북부로 39, 203호 (수창아트빌
아파트)

김선오

광주 북구 양일로 55, 101동 605호 (연계동, 현대
아파트)

김재갑

경기 부천시 소사구 경인로134번길 51, 2동 507호
(송내동, 삼익아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

돼지감자 지상부를 열수 추출한 추출물에 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 부탄올, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 분획용매로 사용하여 분획한 것을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 돼지감자 지상부 추출물은 NO 분비량의 생성 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 돼지감자 지상부 추출물은 염증 유발 매개체인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항염 조성물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항염증제

청구항 5

제4항의 항염증제는 체중 1kg당 10 내지 1000mg/day로 제공되는 것을 특징으로 하는 항염증제

청구항 6

- a) 돼지감자 지상부를 증류수로 수세하여 열수 추출하는 단계;
- b) a)단계의 추출물을 여과한 농축하여 동결건조하는 단계;
- c) b)단계의 추출물을 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 부탄올, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 분획용매에 용해시켜 분획물을 얻어 감압여과 장치로 여과, 농축하여 동결 건조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 제조방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 천연원료를 돼지감자 (뽕딴지; Helianthus tuberosus) 지상부 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 항염 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경기술

- [0002] 일명 뚱뚱지라고 불리는 본 발명의 천연 원료인 돼지감자 (뚱뚱지; Helianthus tuberosus)는 북아메리카가 원산지인 짙은뿌리식물에 속한다. 도 1은 돼지감자의 지상부와 지하부를 나타낸 사진이다. 돼지감자는 땅속의 지하부와 줄기를 포함한 지상부로 나눌수 있으며, 지하부는 땅속줄기의 끝이 굽어져서 덩이줄기가 발달한다. 줄기는 곧게 서고 가지가 갈라지며 높이가 1.5~3m이고 센털이 있고, 잎은 줄기 밑 부분에서는 마주나고 윗부분에서는 어긋나며 긴 타원 모양이며, 끝이 뾰족하며 가장자리에 톱니가 있고 밑 부분이 좁아져 잎자루로 흘러 날개가 된다.
- [0003] 지상부인 꽃은 8~10월에 피고 줄기와 가지 끝에 지름 8cm의 두상화(頭狀花:꽃대 끝에 꽃자루가 없는 많은 작은 꽃이 모여 피어 머리 모양을 이룬 꽃)를 이루며 달리며, 두상화 가장자리에 있는 실상화는 노란 색이고 11~12개이며, 두상화 가운데 있는 관상화는 노란 색·갈색·자주색이다. 총포는 반구형이고, 총포 조각은 바소 모양이며 끝이 뾰족하다.
- [0004] 열매는 수과이고, 덩이줄기는 길쭉한 것에서 울퉁불퉁한 것까지 모양이 매우 다양하고 크기와 무게도 다양하다. 덩이줄기 껍질 색깔도 연한 노란 색·갈색·붉은 색·자주색으로 다양한데, 껍질이 매우 얇아 건조한 공기에 노출하면 금방 주름이 지고 속살이 파삭해진다.
- [0005] 덩이줄기를 식용으로 재배하였으나 지금은 인가 근처에서 야생으로 자라며 일부에서는 가축의 사료로 쓰기 위해 심기도 한다. 한방에서는 뿌리를 국우(菊芋)라는 약재로 쓰는데, 해열 작용이 있고 대량 출혈을 그치게 한다. 유럽에서는 요리에 넣는 야채로 덩이줄기를 많이 이용하고, 프랑스에서는 가축의 사료로 쓰기 위해 오랫동안 심어왔다(출처; 네이버 백과사전)
- [0006] 한편 항염증제는 염증을 억제하는 약제의 총칭으로 스테로이드계와 비스테로이드계로 크게 나뉘는데 여러 가지 염증성 질환, 외과수술 후 및 외상시의 염증치료에 사용한다. 스테로이드계 약제의 작용기구로서는 세포핵에 작용하여 항염증성 단백질을 합성시킨 후에 작용한다. 아스피린이나 인도메타신 등의 비스테로이드계 약제는 아라키돈산에서 프로스타글란딘 합성 초기에 작용하는 고리화 산화효소의 활성을 저해하여 프로스타글란딘 생산을 억제한다.
- [0007] 상기와 같은 항염증제는 화학합성을 통한 제품들이 주를 이루고 있으며, 원료등을 외국의 제약회사로부터 수입하여 제조되므로 약품의 단가가 높아지고 화학합성으로 만들어지므로 부작용이 있을 수 있다.
- [0008] 따라서 원료의 수입대체 및 부작용을 방지하기 위한 항염효과를 갖는 천연자원으로의 대체할 필요가 있고 본 발명에서는 천연원료로서 돼지감자 지상부 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 항염 조성물을 제공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 본 발명과 관련이 있는 선행기술로서 국내 공개특허공보 제10-2012-0021349호는 당뇨병의 치료 또는 예방 효능이 있는 돼지감자에 관한 것으로, 유산균을 이용하여 돼지감자를 발효시킴으로써 항당뇨 효능이 우수하며 기호성이 높은 기능성 식품 및 약제학적 조성물을 개시하고 있다.
- (특허문헌 0002) 그러나, 돼지감자와 관련한 주요한 특허문헌은 식품제조방법, 건강보조식품과 관련한 출원이 많다. 즉, 국내 공개특허공보 제10-2011-0135513호는 돼지감자를 열풍 건조시켜 일정량의 수분을 제거한 후 분쇄하고 첨가물을 혼합하여 반죽을 형성하여 반죽을 소정의 크기로 80~100℃에서 구운 후 50℃에서 열풍 건조시킴으로서 수분이 제거되어 장기간 보관이 가능한 돼지감자를 포함한 식품 제조방법에 관한 구성이 개시되어 있다.
- (특허문헌 0003) 국내 공개특허공보 제10-2011-0124526호는 돼지감자 분말의 제조방법 및 그 돼지감자 분말을 이용한 돼지감자 차와 음료에 관한 것으로, 돼지감자를 세척하고, 2~10mm의 두께로 절단하는 원료 준비 단계와; 절단한 돼지감자를 30~50℃의 온도에서 수분함량이 13% 이하가 될 때까지 건조시키는 건조단계와; 건조시킨 돼지감자를 볶는 볶음단계와; 볶은 돼지감자를 20~80mesh의 크기로 분쇄하는 분쇄단계;를 포함하는 것을

특징으로 하는 구성이 개시되어있다.

(특허문헌 0004) 국내 등록공보 제10-0496119호는 돼지감자 60~72 중량%에 생약재인 숙지황 10~16 중량%, 산수유 6~10 중량%, 산약 3~3.5 중량%, 사인 3~3.5 중량%, 복령 3~3.5 중량%, 오미자 3~3.5 중량%를 첨가하여 형성하고, 상기 추출액은, 추출액 24~35.5 중량%에, 정제수 61~64 중량%와, 감미료인 사과, 배, 모과중 선택된 어느 하나의 농축액 1~7 중량%, 대추농축액 1~2 중량%, 영지 농축액 0.5~1 중량%, 감초 농축액 0.5~1 중량%, 아스파탐, 스테비오사이드, 솔비톨, 울리고당중 선택된 어느 하나의 인공 감미료 0.5~1 중량%를 원료로 한 돼지감자 및 생약제를 함유한 드링크 제조방법에 관한 구성이 개시되어있다.

(특허문헌 0005) 또한, 국내 등록특허공보 제10-0591539호는 곡물류와 종실류 및 1종 이상의 생약제의 건조분말을 유효성분으로 하는 건강보조식품 조성물에 관한 것으로서, 조성물은 곡물류와 종실류로서 현미, 귀눈이콩, 양파를 함유하고 생약재로서 돼지감자, 구기자, 오미자, 울무, 복분자, 두충, 오가피, 산약, 인진쑥, 당귀, 황정, 함초 및 톳를 유효성분으로 함유하며, 상기 조성물에 영양보조성분을 임의로 더욱 첨가하여 된 당뇨병과 같은 각종 성인병의 예방 및 개선효과가 있는 건강보조식품 조성물에 관한 구성을 개시하고 있다.

(특허문헌 0006) 그러나 상기 선행기술들은 본 발명에서 목적으로 하는 돼지감자 지상부를 이용한 항염조성물 및 치료를 위한 조성물과는 상이한 구성을 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 통상 산업용 화학성분을 주원료로 한 염증 예방 및 치료용 약학조성물의 주원료를 우리 나라에서 흔하게 구할 수 있는 천연원료인 돼지감자 지상부 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 돼지감자 지상부 추출물을 함유한 염증 예방 및 치료용 약학조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 돼지감자 지상부로부터 열수추출된 농축물을 분획용매로 분획하여 추출된 조성물이 항염증효과를 갖는지에 대한 동물실험을 실시하였다. 더욱 상세하게는 돼지감자 지상부를 증류수로 수세하여 증류수와 혼합 가열하여 열수추출 및 여과한 다음 감압회전농축기로 농축하였다.

[0012] 농축된 열수추출물을 동결건조기에서 동결건조 하여 얻어진 추출물을 증류수에 완전히 용해시킨 후 분획여두에 넣고 분획용매로 분획하여 얻어진 각각의 분획물을 감압여과 장치로 여과하여 농축한 후 동결건조하여 용매를 완전히 제거한 뒤 항염증효과에 대한 동물실험을 실시하였다.

[0013] 돼지감자 지상부 추출물의 Macrophage primary cell 세포의 증식에 대한 영향을 실험한 결과, 돼지감자 지상부 추출물의 염증 유발 매개체인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성 억제 효능을 확인하는 한편, LPS로 활성화된 macrophage primary cell에서 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생합성이 증가하게 됨을 확인하였다. 이는 돼지감자 지상부 추출물의 NO생성 억제함으로써 항염 효능을 가지고 있다는 것을 보여준다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면 돼지감자 지상부 추출물의 Macrophage primary cell 세포의 증식에 대한 영향을 실험한 결과, 돼지감자 지상부 추출물의 염증 유발 매개체인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성 억제 효능이 확인됨으로서 돼지감자 지상부 추출물을 이용한 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 항염 조성물로서 활용이 가능하여, 종래 화학성분이 주로 사용되는 항염증제를 자연에 서식하는 식물로 대체함으로써 항염증제의 생산단가 절감과 산업화를 통한 수입대체 및 수출효과를 기대할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 돼지감자의 지상부와 지하부를 나타낸 사진이다.
- 도 2는 돼지감자의 지상부 추출물 및 유기용매에 의한 분획물을 얻는 과정을 나타낸다.
- 도 3은 MTT assay 분석에 의한 돼지감자 지상부와 지하부(rhizomes)의 세포생존율 측정 결과를 나타낸다.
- 도 4는 Macrophage primary cell에서 돼지감자 지상부 추출물이 NO형성 억제 효과를 갖는 결과를 나타낸다.
- 도 5는 항염증관련 사이토카인 TNF- α 생성량 측정을 통한 항염효과 측정결과를 나타낸다.
- 도 6은 항염증관련 사이토카인 IL-1 β 생성량 측정을 통한 항염효과 측정결과를 나타낸다.
- 도 7은 항염증관련 사이토카인 IL-6 생성량 측정을 통한 항염효과 측정결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명에서는 돼지감자 지상부 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항염 조성물이 제공된다.

[0017] 돼지감자 지상부 추출물은 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산, 디클로로메탄 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 사용하여 추출한 것일 수 있고, 추출용매를 사용하여 추출한 돼지감자 지상부 추출물에 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 부탄올, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 분획용매로 사용하여 분획한 것일 수 있다.

[0018] 또한, 상기 돼지감자 지상부 추출물은 NO 분비량의 생성 억제 효과를 갖고, 염증 유발 매개체인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 항염 조성물이 제공되며, 상기 항염 조성물을 유효성분으로 포함하는 항염증제를 제공하며 상기 항염증제는 체중 1kg당 0.1 내지 2000mg/day로 제공될 수 있다.

[0019] 항염조성물 추출방법으로는 돼지감자 지상부를 증류수로 수세하여 추출 용매와 혼합하여 추출하는 단계; 상기 추출물을 여과한 농축하여 동결건조하는 단계; 상기 단계의 추출물을 분획용매에 용해시켜 분획물을 얻어 감압여과 장치로 여과, 농축하여 동결건조하는 단계를 포함하는 추출방법이 제공된다.

[0020] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 하기에서 본 발명을 설명함에 있어서, 공지기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략하였다.

1. 돼지감자 지상부 추출 및 분획제조

[0022] 도 2는 돼지감자의 지상부 추출물 및 유기용매에 의한 분획물을 얻는 과정을 나타낸다. 돼지감자 지상부를 각각 20kg을 증류수로 수세한 다음 증류수 30L를 가하고, 전기약탕기로 100℃에서 3시간 동안 가열, 추출하였다. 추출된 용액은 400 메쉬 여과포로 여과한 다음, 감압회전농축기로 농축하였다. 여과 후 남은 잔사에 다시 동량의 증류수를 사용하여 동일 과정으로 2번 더 추출, 여과 및 감압 농축한다. 농축된 열수추출물을 동결건조기(Freeze dryer)에서 동결건조 하여 돼지감자 지상부 추출물 250g (1.25%)을 얻었다.

2. 돼지감자 지상부 추출물의 극성용매 및 비극성용매 가용 추출물 제조

[0024] 도 2에 도시된 바와 같이 제조된 열수추출물을 유기 용매를 이용하여 분획물을 제조하였다. 돼지감자 지상부 추출물의 극성용매 및 비극성용매 가용 추출물은 돼지감자 지상부 추출물 250g을 증류수에 완전히 용해시킨 후 분획여두 깔대기에 넣고 헥산(Hexane)을 동량 첨가하여 water층과 헥산층(hexane)으로 분리하였고, 이와 같은 공정을 3번 반복하였다. 동일한 과정의 반복을 통해 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트(ethyl

acetate), 부탄올(butanol)을 순차적으로 가하여 각 분획물을 얻었으며, 얻어진 각각의 분획물을 감압여과 장치로 여과하여 농축한 후, 동결건조하여 용매를 완전히 제거한 뒤 본 실험에 사용하였다.

[0025] 2.1. 헥산 가용성 분획 분리

[0026] 돼지감자 지상부 추출물 250g을 5L의 증류수에 완전히 용해시킨 후에 분획여두에 넣고 헥산 5L를 첨가하여 헥산 불용성층(수층)과 헥산가용성층을 분리하였다. 다시 헥산 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 헥산 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.

[0027] 2.2. 클로로포름 가용성 분획분리

[0028] 헥산불용성 분획(수층)에 클로로포름 5L를 가하여 섞은 후에 클로로포름가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 클로로포름 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 클로로포름 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.

[0029] 2.3. 에틸아세테이트 가용성 분획분리

[0030] 클로로포름 불용성 분획(수층)에 에틸아세테이트 5L를 가하여 섞은 후에 에틸아세테이트 가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 에틸아세테이트 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 에틸아세테이트 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.

[0031] 2.4. 부탄올 가용성 분획분리

[0032] 상기 에틸아세테이트 불용성 분획(수층)에 부탄올 5L를 가하여 섞은 후에 부탄올 가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 부탄올 불용성층을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 부탄올 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.

[0033] 2.5. 시료 수득

[0034] 헥산 가용성 분획, 클로로포름 가용성 분획, 에틸아세테이트 가용성 분획 및 부탄올 가용성 분획을 감압 농축한 후에 동결건조하여 헥산분획 0.28g, 클로로포름 분획 0.7 g, 에틸아세테이트 분획 1.62g, 부탄올 분획 5.34g, 물 분획 64.99g을 얻어 시료로 사용하였다.

[0035] 3. 돼지감자 추출물의 항염효과 측정을 위한 실험동물 및 복강대식세포 분리 배양

[0036] 3.1 돼지감자 추출물의 항염효과 측정을 위한 실험동물

[0037] 돼지감자 추출물의 항염효과 측정을 위한 실험동물로서 체중 200~300g 된 Sprague-Dawley 흰 쥐를 샘타코 사에서 구입하여 온도 22±2℃, 상대습도 65±5%로, 명암 12시간 주기의 환경에서 7일 동안 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 고탄사료(삼양사료) 및 물을 충분히 공급하였다.

[0038] 3.2 복강대식세포 분리 및 배양

[0039] 실험동물로서 사용된 체중 200~300g의 Sprague-Dawley 흰 쥐를 경추 탈골시킨 후, HBSS를 복강 주사하여 대식세포(macrophage)를 뽑아낸 다음 56℃에서 30분간 열처리한 fetal bovine serum(FBS)을 10% 첨가한 RPMI 1640배지에 100units/mL의 penicillin/streptomycin을 넣어 대식세포를 분리 사용하였으며, 37℃, 5% CO2 인큐베이터에서 배양하였다.

[0040] 4. MTT assay 분석에 의한 복강 대식세포의 세포생존율 측정

[0041] 상기 복강대식세포 분리 및 배양에서 준비된 macrophage primary cell를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후, 48 well plate에 2×10^4 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다.

[0042] 돼지감자 지상부 열수추출물과 지하부 열수추출물을 실험동물의 체중에 따른 농도별(10, 50, 100, 및 200mg/kg)로 각각 처리한 후 12시간 동안 반응시켰다.

[0043] 배양액을 제거한 후 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어준 후, 4시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양한 후 tetrazolium bromide salt를 제거하고 DMSO를 200 μ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 도 3은 MTT assay 분석에 의한 돼지감자 지상부와 지하부(rhizomes)의 세포생존율 측정 결과를 나타낸다.

[0044] 돼지감자 지상부 및 지하부 추출물이 Macrophage primary cell 세포의 증식에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 각각의 추출물을 0, 10, 50, 100 및 200 μ l/ml의 농도별로 처리하고, 24시간 후에 MTT 방법으로 세포의 생존을 관찰하였다.

[0045] 돼지감자 지상부 및 지하부 열수추출물에 의한 세포의 생존율은 최고 200 μ l/ml 처리시에도 유의할만한 변화를 나타내지는 않았다. 따라서 이 농도 범위에서 각 화합물의 독성이 없는 것으로 판단되어 이 농도 범위에서 항염 억제 효과 실험을 실시하였다.

[0046] 5. Macrophage primary cell에서 돼지감자 지상부 추출물의 NO형성 억제 효과

[0047] 상기 실시예에서 준비된 복강대식세포 프라이머리셀(macrophage primary cell)을 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후, 48 well plate에 5×10^5 cells/의 세포수가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다.

[0048] 새로운 DMEM배지로 교환한 후, 돼지감자 지상부 열수 추출물을 농도(10, 50, 100 및 200 μ g/ml)별로 세포에 처리하고, 자극제인 LPS (1 μ g/ml)를 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 분리된 상층 액을 새로운 마이크로 플레이트(micro plate)에 분취하였다.

[0049] 동일한 양의 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride, 2% phosphoric acid)을 처리하여 상온에서 10분 반응 시켰다. 배양액과 Griess 용액을 5분 동안 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 도 4는 Macrophage primary cell에서 돼지감자 지상부 추출물이 NO형성 억제 효과를 갖는 결과를 나타낸다.

[0050] Macrophage에서 돼지감자 지상부 추출물의 NO형성 억제 효과를 보면 LPS를 처리하지 않은 정상대조군의 경우, 낮은 NO 분비량을 갖는 것으로 확인되었다(도 4 왼쪽). 반면, LPS(1 μ l/ml)를 첨가한 대조군의 경우, LPS로 인해 염증이 유발됨으로써 NO의 함량이 현저하게 증가하는 것이 확인되었다(도 4 오른쪽). 또한, LPS(1 μ l/ml) 처리함에도 불구하고, 상기에서 제조된 돼지감자 지상부 추출물을 농도(10, 50, 100, and 200 μ g/ml) 별로 처리한 경우, NO 분비량이 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다(도 4의 중간).

[0051] 돼지감자 지하부 추출물 또한 농도별로 처리한 경우, NO 생성량이 농도 의존적으로 감소하였지만, NO 생성 억제효과는 지상부추출물과 비교했을 때 다소 낮은 결과를 보였다. 따라서, 이로부터 돼지감자 지상부 추출물의 NO생성억제 효과를 확인하였으며, 돼지감자의 지하부보다 더 우수한 NO억제효과를 확인하였다.

[0052] 6. 항염증관련 사이토카인 TNF-, IL-6 및 IL-1 생성량 측정을 통한 항염효과 측정

[0053] Sprague-Dawley 흰 쥐를 경추 탈골시킨 후 HBSS를 복강 주사하여 대식세포를 뽑아낸 다음 56에서 30시간 열처리한 fetal bovine serum(FBS)을 10% 첨가한 RPMI 1640배지에 100units/ml의 penicillin / streptomycin을 넣어 대식세포를 분리 사용하였으며, 37, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0054] 24 well plate에 well당 1×10^6 개 macrophage primary cell이 들어있는 부유액 1ml을 넣었다. 돼지

감자 지상부 추출물을 농도(10, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)별로 처리한 후 염증 반응 유도인자인 lipopolysaccharides(LPS)를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 주었다. 6시간 배양 후 세포 부유액을 모아 400 xg로 10분 간 원심분리하고 상층액을 모아 측정 전까지 -80°C 에서 동결 보관하였다. 생산된 TNF- α 양은 TNF- α ELISA system을 이용하여 측정하여 450nm 에서 비색정량하였다.

[0055] IL-6와 IL-1 β 의 경우, 12시간 배양 후 각각의 세포 부유액을 모아 400 xg로 10분간 원심분리하고 상층액을 모아 측정 전까지 -80°C 에서 동결 보관하였다. ELISA assay를 이용하여 IL-6와 IL-1 β 의 생성 정도를 각각 측정하였다. 도 5 내지 7은 항염증관련 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성량 측정을 통한 항염효과 측정 결과를 나타낸다.

[0056] 돼지감자 지상부 추출물의 염증 유발 매개체인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성 억제 효능을 확인하였다 (도 5, 6, 7). LPS로 활성화된 macrophage primary cell에서 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생합성이 증가하게 됨을 확인하였다.

[0057] 한편, 돼지감자 지상부 추출물을 농도(10, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)별로 처리한 실험군에서는 농도 의존별로 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성량이 감소함을 확인하였다. 이는 돼지감자 지상부 추출물의 NO생성 억제함으로써 항염 효능을 가지고 있다는 것을 보여준다.

[0058] 이로부터 돼지감자 지상부 추출물을 유효성분으로 한 항염 효과를 갖는 식품, 건강식품 및 약품 등으로 개발이 가능할 것으로 판단된다.

산업상 이용가능성

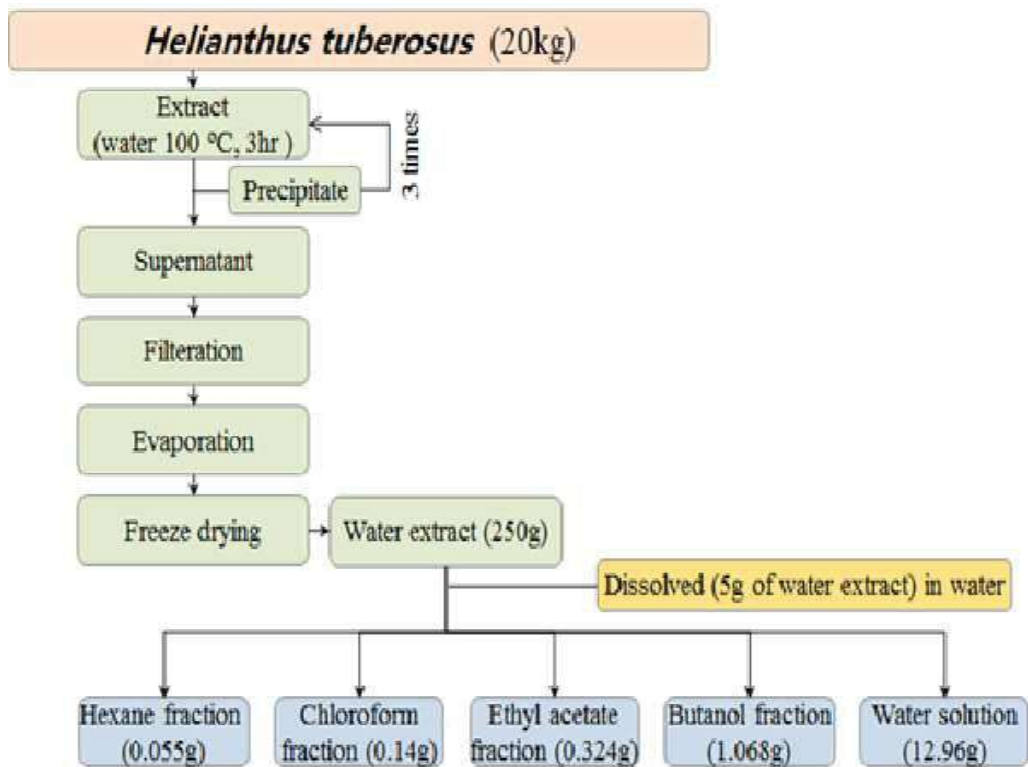
[0059] 돼지감자 지상부 추출물의 염증 유발 매개체에 대한 생성 억제 효능이 확인됨으로서 돼지감자 지상부 추출물을 이용한 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 항염 조성물로서 활용이 가능하며, 종래 화학성분이 주로 사용되는 항염증제를 자연에 서식하는 식물로 대체함으로써 항염증제의 생산단가 절감과 산업화를 통한 수입대체 및 수출효과를 기대할 수 있을 것이다.

도면

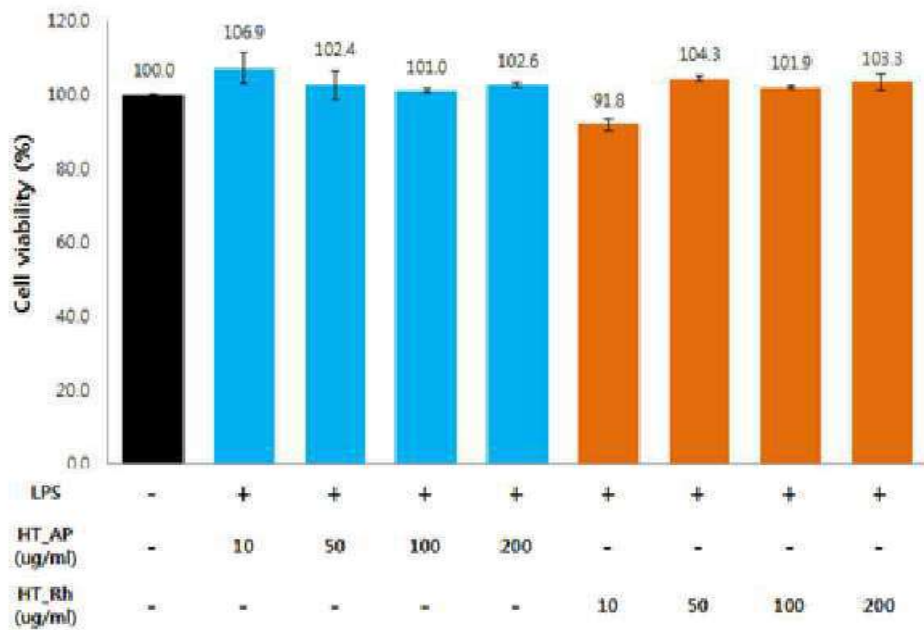
도면1



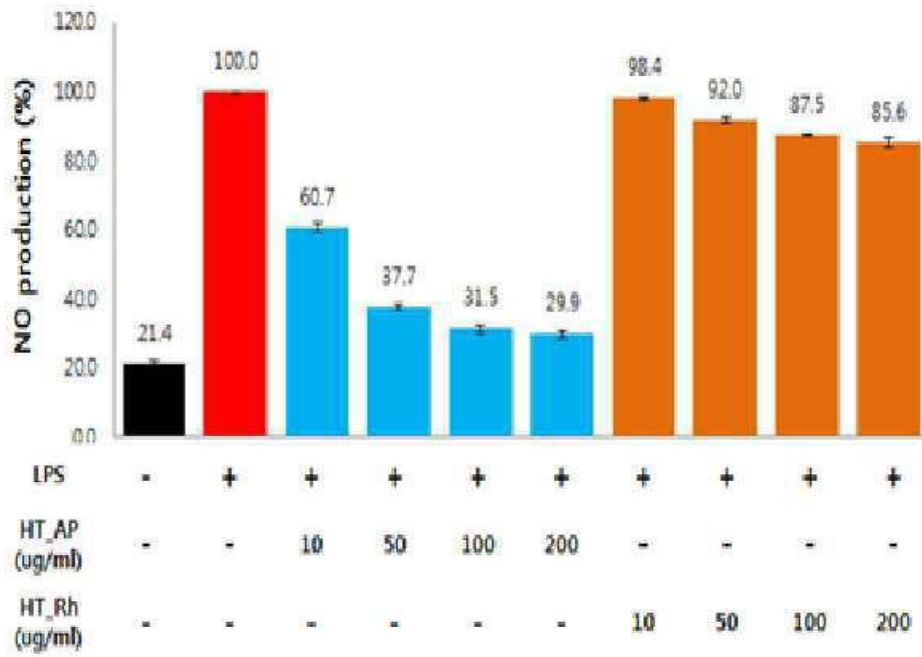
도면2



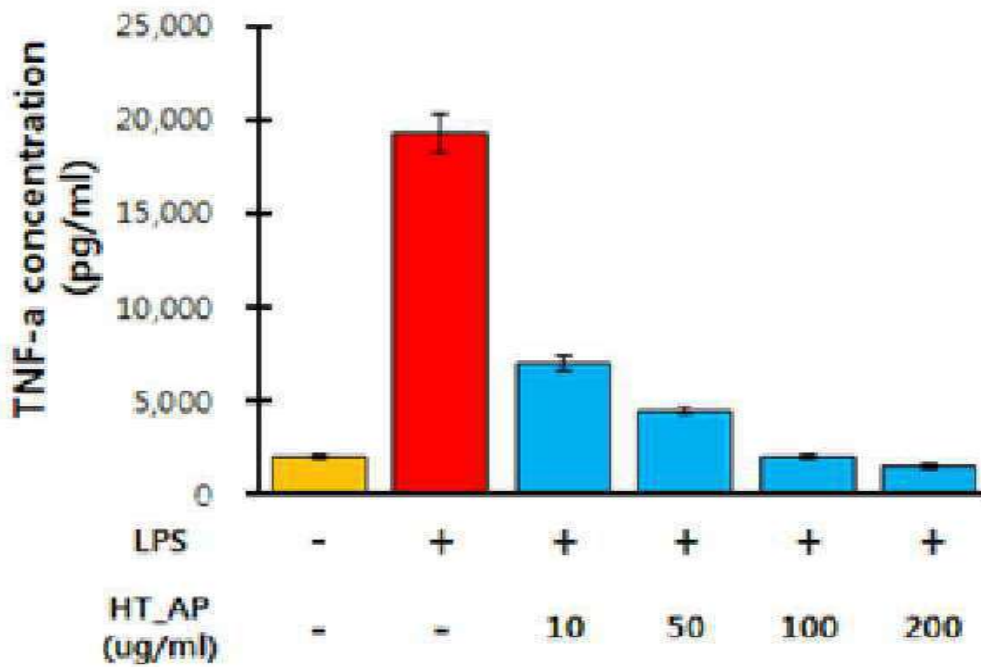
도면3



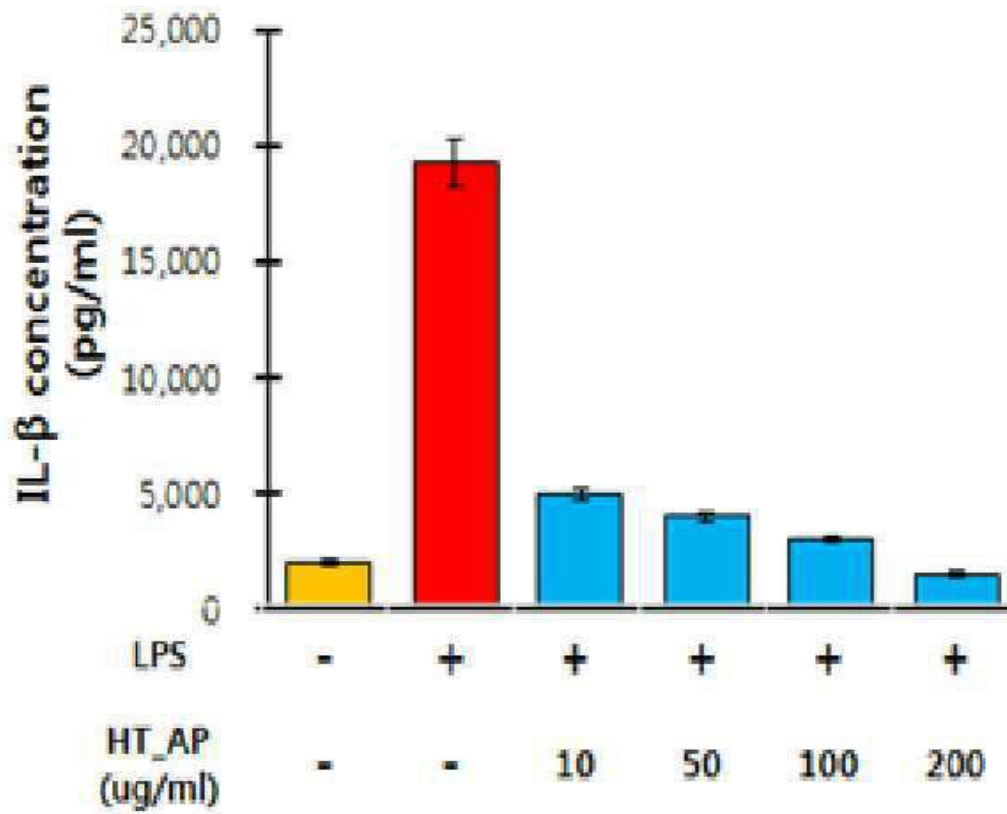
도면4



도면5



도면6



도면7

