



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년05월08일
(11) 등록번호 10-1142759
(24) 등록일자 2012년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/886 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0012692
(22) 출원일자 2010년02월11일
심사청구일자 2010년02월11일
(65) 공개번호 10-2011-0092959
(43) 공개일자 2011년08월18일
(56) 선행기술조사문헌
Biosci. Biotechnol. Biochem., vol.73(4),
pp.828-832(2009)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
숙명여자대학교산학협력단
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가,
숙명여자대학교)
(72) 발명자
성미경
서울특별시 서초구 방배3동 대우효령아파트 106동
1005호
박미영
서울특별시 관악구 남현동 대창센시티 아파트 20
1동 205호
(74) 대리인
강경찬

전체 청구항 수 : 총 4 항

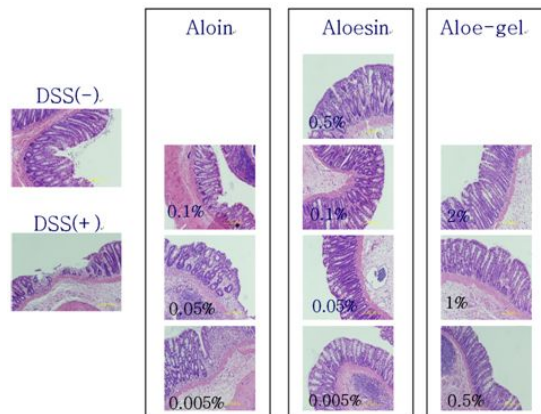
심사관 : 허주형

(54) 발명의 명칭 **염증성 장 질환 개선제 조성물**

(57) 요약

본 발명은 알로인, 알로에신 또는 알로에 겔을 이용한 염증성 장 질환 개선제 조성물을 개시한다. 알로인, 알로에신 또는 알로에 겔은 DSS로 염증성 장 질환이 유도된 실험동물의 결장 점막 조직의 결실을 예방하는 효과를 가지며, 장 손상 동물 모델에서 염증 정도의 지표로 이용되는 미엘로퍼옥시다제의 활성을 낮추며, 염증 매개 물질인 류코트리엔 B4, TNF- α 및 PGE₂ 혈장 농도를 낮출 뿐만 아니라 유전자 수준에서도 TNF- α 와 IL- β 의 발현을 억제하는 활성을 가지고 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	2-0604-011
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	주요 건강기능식품 유효성분의 체내 흡수와 대사 규명 및 타 영양소의 이용율에 미치는 영
향에 관한 연구	
주관기관	숙명여자대학교
연구기간	2006.04.01 ~ 2007.03.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	201101610103
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업
연구과제명	식이성 비만 및 합병증 발생기작과 조기바이오 마커를 활용한 제어기술 연구
주관기관	경북대학교
연구기간	2008.09.01 ~ 2015.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

알로인을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환 개선제 조성물로서,
상기 염증성 장 질환은 대장염인 것을 특징으로 하는
염증성 장 질환 개선제 억제학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 유효성분은 상기 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 15 중량 % 범위로 포함되는 것을
특징으로 하는 염증성 장 질환 개선제 억제학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

알로인을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환 개선 작용을 갖는 조성물로서,
상기 염증성 장 질환은 대장염인 것을 특징으로 하는
염증성 장 질환 개선 작용을 갖는 식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 식품 조성물은 음료인 것을 특징으로 하는 염증성 장 질환 개선 작용을 갖는 식품 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 염증성 장 질환 개선제 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 알로인, 알로에신 또는 알로에 겔 추출물을 이용한 염증성 장 질환 개선제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 궤양성 대장염, 크론병 등의 염증성 장 질환(Inflammatory Bowel Disease)은 소장, 대장 점막에 발생하는 만성적인 염증성 질환들이다. 그 원인으로는 세균 감염, 자가 면역 이상 등이 제시되고 있지만 현재까지 그 원인은 명확하게 알려져 있지 않다(N. Engl. J. Med. (2002) 347: 417-29). 염증성 장 질환에는 궤양성 대장염과 크론병 이외에 광의적으로는 셀리악 병, 장관형 베체트 병과 허혈성 장염도 포함된다.

[0003] 염증성 장 질환은 모두 복통, 설사(혈변) 등의 임상적 증상을 나타내며, 가끔은 류머티스 관절염, 제1형 당뇨병, 다발성 경화증 등 자가면역질환을 수반한다.

[0004] 염증성 장 질환은 청소년과 성인 모두에서 많이 발병하며, 현재 근본적인 치료제가 없어, 평생 동안 괴로워해야 하는 만성적인 난치병 중 하나이다.

[0005] 염증성 장 질환에 대한 치료에는 살라조설파피리딘(salazosulfapyridine), 5-아미노살리실산, 프레드니솔론(부신피질 스테로이드) 등과 아자티오프린(azathioprine), 6-머르캅토피린(6-mercaptopurine) 등의 면역억제제를 주로 사용한다. 그러나 이 치료에 대하여 내성을 갖는 환자가 존재하며 부작용의 문제도 있다. 최근 TNF- α 의 활성을 억제하여 크론병을 앓는 환자에 있어서의 장 염증을 급속히 개선시키는 활성을 갖는 항 TNF- α 모노클로날 항체가 치료제로 개발되었으나(Gastroenterology (1995) 109: 129-35; N. Engl. J. Med. (1997) 337: 1029-35), 악성 종양 등의 부작용이 자주 발생하는 것으로 알려져 있다(Gastroenterology (1999) 117: 1433-37; N. Engl. J. Med. (2001) 345: 1098-104)).

[0006] 따라서 염증성 장 질환의 치료 활성을 물질들은 계속해서 연구될 필요가 있다.

[0007] 본 발명은 염증성 대장염의 치료에 유용한 알로에 유래 물질을 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 염증성 장 질환 개선제를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 구체적인 목적이나 다른 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 텍스트란 황산 나트륨(이하 “DSS”로 약칭)으로 대장염이 유도된 실험동물에 알로인, 알로에신 또는 알로에 겔을 사료와 함께 급여할 경우에, DSS만의 투여군(양성대조군임)과 비교하여, 결장(colon)의 점막 조직의 결실이 관찰되지 않고, 미엘로퍼옥시다제(이하 “MPO”로 약칭)의 활성이 감소하며, 혈장 중의 류코트리엔 B4(이하 “LTB4”로 약칭), TNF- α 및 PGE₂ 농도가 낮아짐을 확인할 수 있었다. 또한 유전자 수준에서도 TNF- α 와 IL- β 의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다. 상기에서 텍스트란 황산 나트륨(이하 “DSS”로 약칭)으로 대장염이 유도된 실험동물은 염증성 대장염의 치료제의 개발에 많이 이용되는 연구 모델이고, 상기 MPO는 장 손상 동물모델에서 염증 정도를 나타내는 지표로 사용되는 효소이며(Singh VP et al., Indian J. Exp. Biol. 2004; 42(7):667-73), LTB4, TNF- α , PGE₂, IL- β 등은 대표적인 염증 매개 물질로 알려져 있다.

[0011] 본 발명은 이러한 실험 결과에 기초하여 완성된 것으로, 본 발명의 염증성 장 질환 개선제 조성물은 알로인, 알로에신 또는 알로에 겔을 유효성분으로 포함함을 특징으로 한다.

[0012] 본 명세서에서, 상기 “염증성 장 질환”은 염증이 매개된 모든 장 질환을 포함하는 의미로서, 궤양성 대장염과 크론병 이외에 셀리악 병, 장관형 베체트 병 및 허혈성 장염을 포함하는 의미이다.

[0013] 또한 본 명세서에서, 상기 “알로에 겔”은 알로에(*Aloe barbadensis*)로부터 얻어진 알로에 잎 중앙에 위치한 위치한 겔 필렛(fillet) 및/또는 이 겔 필렛과 외피(rind) 사이에 위치한 라텍스를 의미하며, 셀룰라제 등에 의하여 가수분해되거나 가수분해된 생성물이 탈색, 여과, 멸균 및/또는 안정화된 것을 포함하는 의미이다. 알로에 겔은 액상으로 또는 분말화시켜 사용하거나 액상의 겔과 분말상의 겔을 적절한 비율로 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 알로에겔은 미국 특허 제3,892,853호, 미국 특허 제4,465,629호, 국제공개특허 제 WO 1999/19505 호 등에 개시된 방법에 방법, 기타 당업계에 공지된 방법을 이용하여 직접 제조하여 사용하거나 시중에 유통되는 순도가 높고 가공 처리된 것을 구입하여 사용할 수도 있다.

[0014] 또한 본 명세서에서, 상기 “유효성분”이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.

[0015] 또한 본 명세서에서, 상기 “개선”이란 염증성 장 질환의 예방, 염증성 장 질환의 치료를 포함하여, 염증성 장 질환의 발병 억제 및 지연을 포함하는 의미이다.

[0016] 본 명세서에서 특별히 정의되지 아니한 용어는 국어사전적 의미나 당업계에서 일반적으로 받아들여지고 있는 의미를 따른다.

[0017] 본 발명의 염증성 장 질환 개선제 조성물은 그 유효성분을 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 염증성 장 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 장 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.

[0018] 본 발명의 염증성 장 질환 개선제 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다.

[0019] 본 발명의 조성물은 구체적인 양태에 있어서는 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.

[0020] 본 발명의 약제학적 조성물은 그 유효성분을 포함하는 이외에 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 등을 포함하여, 경구용 제형(정제, 현탁액, 과립, 에멀전, 캡슐, 시럽 등), 비경구형 제형(멸균 주사용 수성 또는 유성 현

탁액), 국소형 제형(용액, 크림, 연고, 젤, 로션, 패치) 등으로 제조될 수 있다.

- [0021] 상기에서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용 가능한 이상의 독성(충분히 낮은 독성)을 지니지 않는다는 의미이다.
- [0022] 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, 안정화제, 향산화제, 보존제, 물, 식염수, 인산 염 완충 용액 등을 들 수 있다. 이러한 담체는 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적당한 것을 하나 이상 선택하여 사용할 수 있다.
- [0023] 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, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 알긴산 나트륨, 폴리비닐피롤리돈 등의 현탁제나 분산제 등을 들 수 있다. 주사액으로 제조되는 경우 적합한 부형제로서는 링거액, 등장 염화나트륨 등을 들 수 있다.
- [0024] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다.
- [0025] 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.
- [0026] 본 발명의 염증성 장 질환 개선제 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서, 식품 조성물로서 파악할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 식품 조성물은 건강 보조식품, 특수 영양 보충용 식품, 기능성 음료 등으로 제조될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 식품 조성물에는 그 유효성분 이외에 감미제, 풍미제, 생리활성 성분, 미네랄 등이 포함될 수 있다.
- [0029] 감미제는 식품이 적당한 단맛을 내게 하는 양으로 사용될 수 있으며, 천연의 것이거나 합성된 것일 수 있다. 바람직하게는 천연 감미제를 사용하는 경우인데, 천연 감미제로서는 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 슈크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 당 감미제를 들 수 있다.
- [0030] 풍미제는 맛이나 향을 좋게 하기 위하여 사용될 수 있는데, 천연의 것과 합성된 것 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는 천연의 것을 사용하는 경우이다. 천연의 것을 사용할 경우에 풍미 이외에 영양 강화의 목적도 병행할 수 있다. 천연 풍미제로서는 사과, 레몬, 감귤, 포도, 딸기, 복숭아 등에서 얻어진 것이거나 녹차잎, 둥굴레, 대잎, 계피, 국화 잎, 자스민 등에서 얻어진 것일 수 있다. 또 인삼(홍삼), 죽순, 은행 등에서 얻어진 것을 사용할 수 있다. 천연 풍미제는 액상의 농축액이나 고형상의 추출물일 수 있다. 경우에 따라서 합성 풍미제가 사용될 수 있는데, 합성 풍미제는 에스테르, 알콜, 알데하이드, 테르펜 등의 형태의 것들이 이용될 수 있다.
- [0031] 생리 활성 물질로서는 카테킨, 에피카테킨, 갈로가테킨, 에피갈로카테킨 등의 카테킨류나, 레티놀, 아스코르브산, 토코페롤, 칼시페롤, 티아민, 리보플라빈 등의 비타민류 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 미네랄로서는 칼슘, 마그네슘, 크롬, 코발트, 구리, 불소화물, 게르마늄, 요오드, 철, 리튬, 마그네슘, 망간, 몰리브덴, 인, 칼륨, 셀레늄, 규소, 나트륨, 황, 바나듐, 아연 등이 사용될 수 있다.
- [0033] 또한 본 발명의 식품 조성물은 상기 감미제 등 이외에도 필요에 따라 보존제, 유화제, 산미료, 점증제 등을 포함할 수 있다.
- [0034] 이러한 보존제, 유화제 등은 그것이 첨가되는 용도를 달성할 수 있는 한 극미량으로 첨가되어 사용되는 것이 바람직하다. "극미량"이란 수치적으로 표현하면 식품 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.0005중량% 내지 약 0.5중량% 범위를 의미한다.
- [0035] 사용될 수 있는 보존제로서는 소듐 소르브산칼슘, 소르브산나트륨, 소르브산칼륨, 벤조산칼슘, 벤조산나트륨, 벤조산칼륨, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 등을 들 수 있다.
- [0036] 사용될 수 있는 유화제로서는 아카시아검, 카르복시메틸셀룰로스, 잔탄검, 펙틴 등을 들 수 있다.
- [0037] 사용될 수 있는 산미료로서는 연산, 말산, 푸마르산, 아디프산, 인산, 글루콘산, 타르타르산, 아스코르브산, 아

세트산 등을 들 수 있다. 이러한 산미료는 맛을 증진시키는 목적 이외에 미생물의 증식을 억제할 목적으로 식품 조성물이 적정 산도로 되도록 첨가될 수 있다.

[0038] 사용될 수 있는 점증제로서는 현탁화 구현제, 침강제, 겔형성제, 팽화제 등을 들 수 있다.

[0039] 또한 본 발명의 식품 조성물은 향미나 기호성을 향상시키고 다른 기능성(예컨대 류머티스 관절염)을 추가로 가지도록 한약재가 추가될 수 있는데, 추가될 수 있는 한약재로서는 두충 추출물, 숙단 추출물, 녹용 추출물, 홍화인 추출물, 토사자 추출물, 숙지황 추출물, 별갑 추출물, 산수유 추출물, 구기자 추출물, 감초 추출물, 당귀 추출물, 갈근 추출물, 강진향 추출물, 합환피 추출물, 산두근 추출물, 괴화 추출물, 고삼 추출물 등이 예시될 수 있다.

발명의 효과

[0040] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 알로인, 알로에신 또는 알로에 겔을 이용한 염증성 장 질환 개선제 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 염증성 장 질환 개선제 조성물은 약품 또는 식품으로 제품화될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 DSS로 염증성 장 질환이 유도된 실험동물에 있어 알로인, 알로에신, 및 알로에 겔을 투여한 경우 DDS만의 투여군에 비해 점막 조직의 결실이 미미하거나 관찰되지 않음을 보여주는 결장 조직의 현미경 사진이다.

도 2는 DSS로 염증성 장 질환이 유도된 실험동물에 있어 알로인, 알로에신 및 알로에 겔을 투여한 경우 DDS만의 투여군에 비해 MPO의 활성이 대체로 농도 의존적으로 억제됨을 보여주는 결과이다.

도 3은 DSS로 염증성 장 질환이 유도된 실험동물에 있어 알로인, 알로에신 및 알로에 겔을 투여한 경우 DDS만의 투여군에 비해 LTB₄의 혈장 농도가 대체로 농도 의존적으로 낮아짐을 보여주는 결과이다.

도 4 및 도 5는 DSS로 염증성 장 질환이 유도된 실험동물에 있어 알로인, 알로에신 및 알로에 겔을 투여한 경우 DDS만의 투여군에 비해 TNF- α 및 PGE₂의 혈장 농도가 농도 의존적으로 낮아짐을 보여주는 결과이다.

도 6 및 도 7은 DSS로 염증성 장 질환이 유도된 실험동물에 있어 알로인, 알로에신 및 알로에 겔을 투여한 경우 DDS만의 투여군에 비해 유전자 수준에서 농도 의존적으로 TNF- α 및 IL-1 β 의 발현이 억제됨을 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] <실시예> **알로인, 알로에신 및 알로에겔의 항염 활성 평가 실험**

[0044] <실시예 1> **DDS로 실험동물의 대장염 유발 및 조직학적 검사**

[0045] 6 주령의 음성 SD계 랫드(n=120)를 (주)중앙실험동물(대한민국 서울)로부터 구입하여 사료와 물을 자유로이 공급하면서 1주간 적응시킨 후, 무작위로 10마리씩 12개의 그룹으로 나누었다.

[0046] 이중 음성대조군(1 그룹)과 양성대조군(1 그룹)에는 AIN-76 사료를 급여하였고, 알로인의 투여군(3 그룹)에는 0.005 중량%, 0.05 중량%, 및 0.1 중량%의 알로인이 함유된 AIN-76 사료를, 알로에신 투여군(4 그룹)에는 0.005 중량%, 0.05 중량%, 0.1 중량% 및 0.5 중량% 알로에신이 함유된 AIN-76 사료를, 알로에 겔 투여군(3 그룹)에는 0.5%, 1%, 및 0.2% 알로에겔이 함유된 AIN-76 사료를 급여하였다(AIN-76 사료의 sucrose 일부 함량이 각 시료의 함량으로 대체되었음).

[0047] 사육 2주 후에 양성 대조군과 각 실험군에 3% DSS가 함유된 물을, 물 대신 1주간 공급하여 대장염을 유발하였다.

[0048] 3주 후에 실험동물들을 희생시키고, 결장 조직을 적출하여 PBS로 세척하고 10% 완충 포르말린에 고정시킨 후 에탄올 탈수 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하고, 절편하여 hematoxylin-eosin(HE) 염색 후 현미경으로 관찰하였다.

[0049] 결과를 도 1에 나타내었는데, 도 1을 참조하여 보면 양성대조군의 경우 음성대조군에 비하여 점막 조직의 결실

이 뚜렷이 관찰되나 실험군의 경우 점막 조직의 결실이 매우 미미하거나 관찰되지 않음을 알 수 있다.

- [0050] <실시에 2> 결장 조직의 MPO 활성 측정
- [0051] 결장 조직의 MPO 활성은 Bradley 등의 방법(Bradley et al., (1982) The Journal of Investigative Dermatology 78 (3), 206-209)에 따라 측정하였다. 결장의 점막 조직을 0.5% 헥사-데실-트리메틸-암모늄 브로마이드를 함유한 50 mM 인산칼륨 완충용액(pH 7.0)에 현탁하여 균질화하고, 동결-해동과 초음파 처리를 3회 반복한 후 40,000 rpm에서 15 분간 4 °C에서 원심분리하여 얻어진 상등액을 효소액으로 사용하였다. 이 효소액 100 μl을 0-디아니시딘 염화수소 및 과산화수소 함유 2.9 ml의 50 mM의 인산 칼륨 완충 용액(pH 6.0)에 넣고 반응시켜 470nm에서 5분간 ELISA microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 흡광도의 변화를 관찰하였으며, MPO 활성은 1분간 흡광도의 변화로 측정하였다. 결과를 도 2에 조직 1g 당 MPO unit(1 unit은 25 °C에서 1 μmol의 과산화수소를 분해할 수 있는 활성으로 정의된다)으로 나타내었다.
- [0052] 도 2를 참조하여 보면, 알로인의 경우 0.005% 처리군에서 유의 수준으로 MPO 활성을 억제함을 보여주고 있으며, 알로에신과 알로에겔의 경우는 농도 의존적으로 MPO의 활성을 억제함으로 보여주고 있다.
- [0053] <실시에 3> 류코트리엔 B4(LTB4) 혈장 농도 측정
- [0054] 상기 <실시에 1>의 실험동물을 희생시켜 혈액을 채취하고 그 혈액에서 혈장을 분리하고 바로 동결시켜 -70°C에서 보관하였다가 실험에 사용하였다.
- [0055] LTb4의 혈장 농도 측정은 ELISA kit (R&D, Ann Arbor, MI, USA)을 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 이루어졌다.
- [0056] 결과를 도 3에 나타내었는데, 모든 실험군이 유의적으로 LTb4의 혈장 농도를 낮쳤으며, 각 실험군은 대체로 농도 의존적인 경향을 보였다.
- [0057] <실시에 4> TNF-α 및 PGE₂ 혈장 농도 측정
- [0058] TNF-α 및 PGE₂의 혈장 농도의 측정은 ELISA kit (R&D, Ann Arbor, MI, USA)을 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 이루어졌다.
- [0059] 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었는데, TNF-α 및 PGE₂의 혈장 농도는 모든 실험군에서 유의적으로 낮았으며, 각 실험군은 모두 농도 의존적 경향을 보였다.
- [0060] <실시에 5> 유전자 수준에서 TNF-α 및 IL-1β의 발현 정도 측정
- [0061] 결장 조직의 TNF-α 및 IL-1β의 유전자 수준에서의 발현 정도를 RT-PCR를 통하여 측정하였다.
- [0062] 먼저 점막 조직으로부터 Trizol reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)를 사용하여 전체 RNA를 분리한 후 이를 preMix RNA PCR kit (iNtRON, INC., Seoul, Korea)로 제조자의 매뉴얼에 따라 RT-PCR를 수행하였다.
- [0063] RT-PCR 산물을 아래의 [표 1]의 프라이머를 사용하여 PCR를 수행하였고, PCR 조건은 초기 변성은 94°C 5분, 변성은 94°C 30초, 접합은 60°C 30초, 신장 반응은 72°C 1분으로 하여 30 cycle을 진행했고, 최종 연장 반응은 72°C에서 5분간 수행하였다. 증폭된 DNA를 0.03 μg/ml 에티움 브로마이드를 함유한 2% 아가로오스 겔상에 전기영동을 수행하여 TNF-α 및 IL-1β의 발현 정도를 β-actin의 발현 정도와 비교하여 평가하였다.

표 1

[0064]

Gene name	Forward primer	Reverse primer
β-actin	CAT GTA TTC AGG CAT TGT TG (서열번호 1)	ATG GTA GAA GGT GGA CAG TG (서열번호 2)
IL-1β	AGC ACA GAC CTG TCT TCC TA (서열번호 3)	CTC TGA GAG ACC TGA CTT GG (서열번호 4)
TNF-α	CAG ATG GGC TGT ACC TTA TC (서열번호 5)	GCT GAC TTT CTC CTG GTA TG (서열번호 6)

[0065] (PCR에 사용된 프라이머)

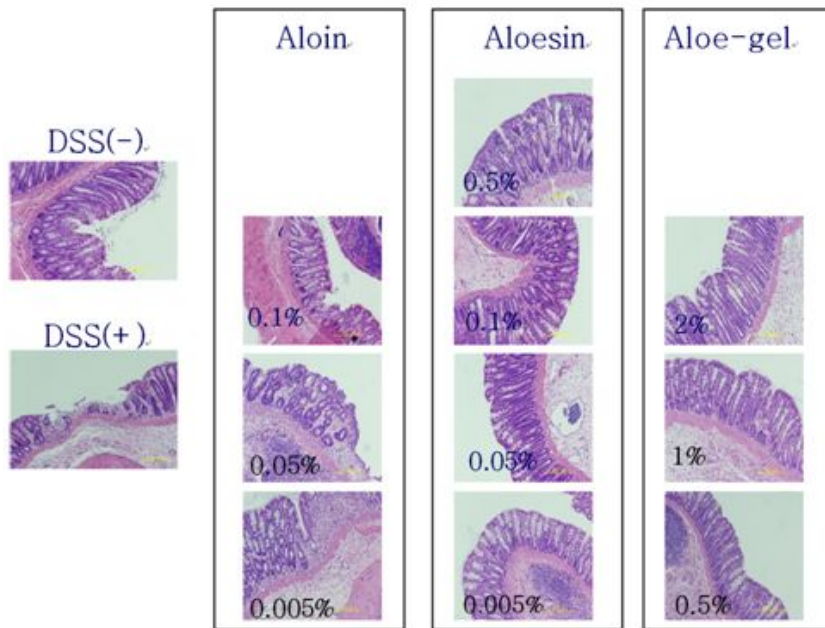
[0066] 결과를 도 6과 도 7에 나타내었다. 도 6 및 도 7를 참조하여 보면 실험군은 모두 유의적으로 농도 의존적으로 TNF- α 및 IL-1 β 의 발현을 억제함을 알 수 있다.

[0067] 통계 처리

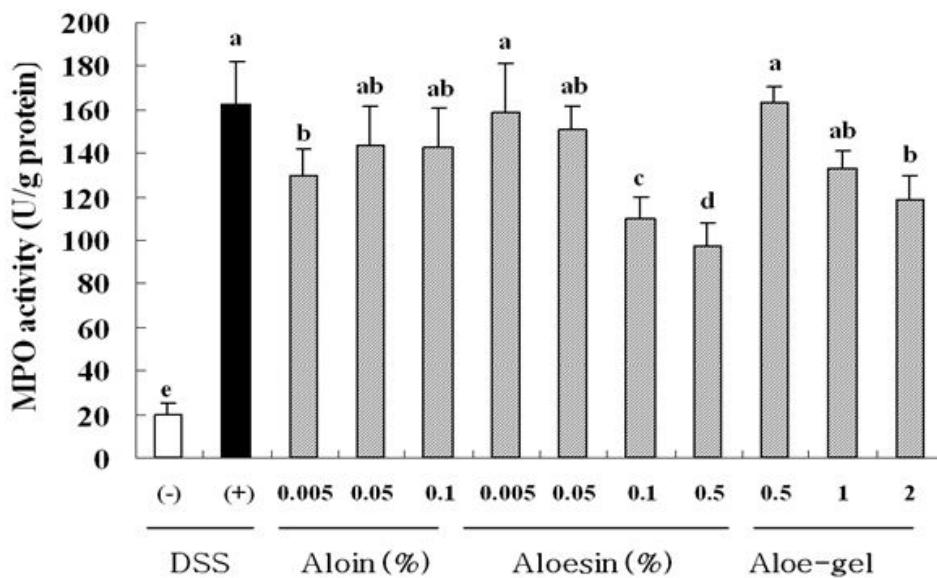
[0068] 데이터는 평균±표준편차로 나타내었고, 효과를 판정하기 위해 one way ANOVA test를 이용하였고 사후검정을 위해 Duncan's multiple test를 사용하였다. 통계학적 유의성은 $p < 0.05$ 로 하였다.

도면

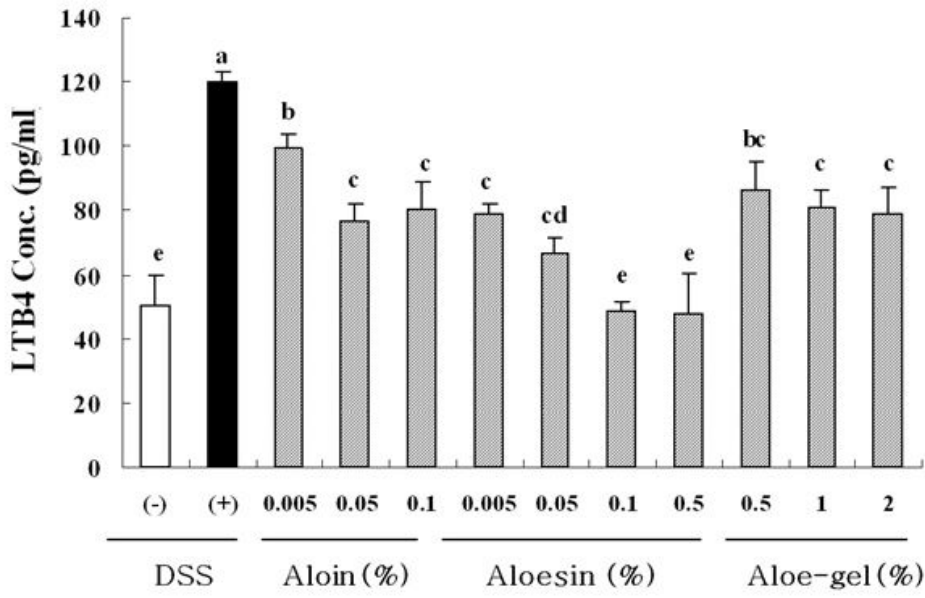
도면1



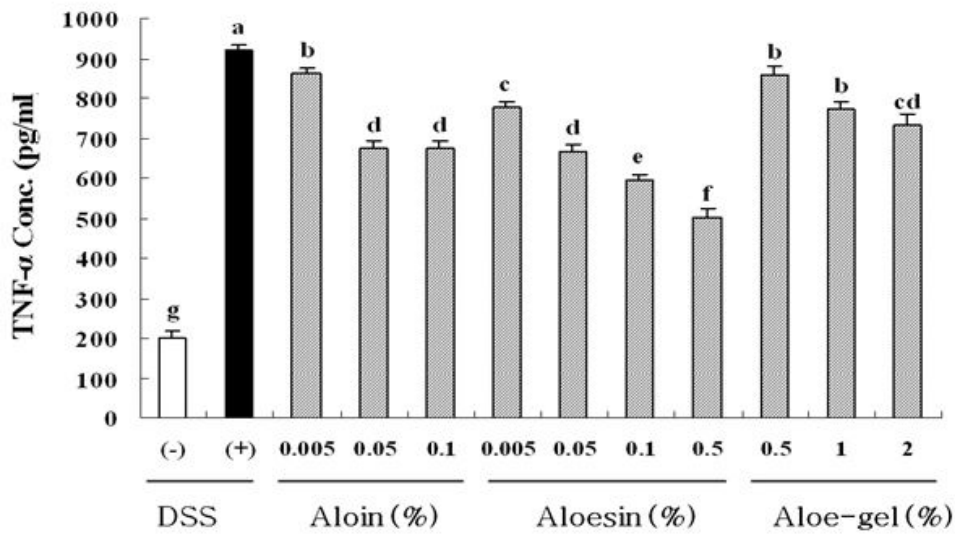
도면2



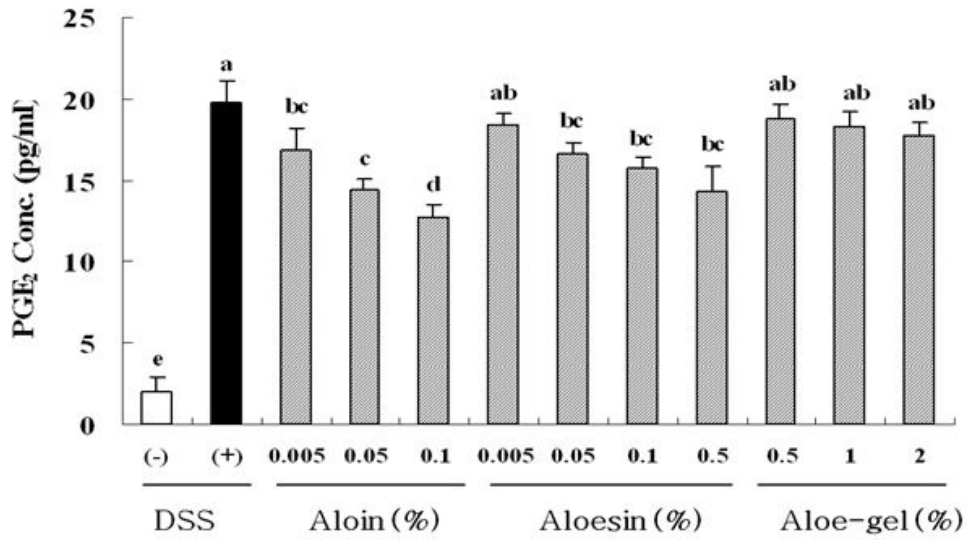
도면3



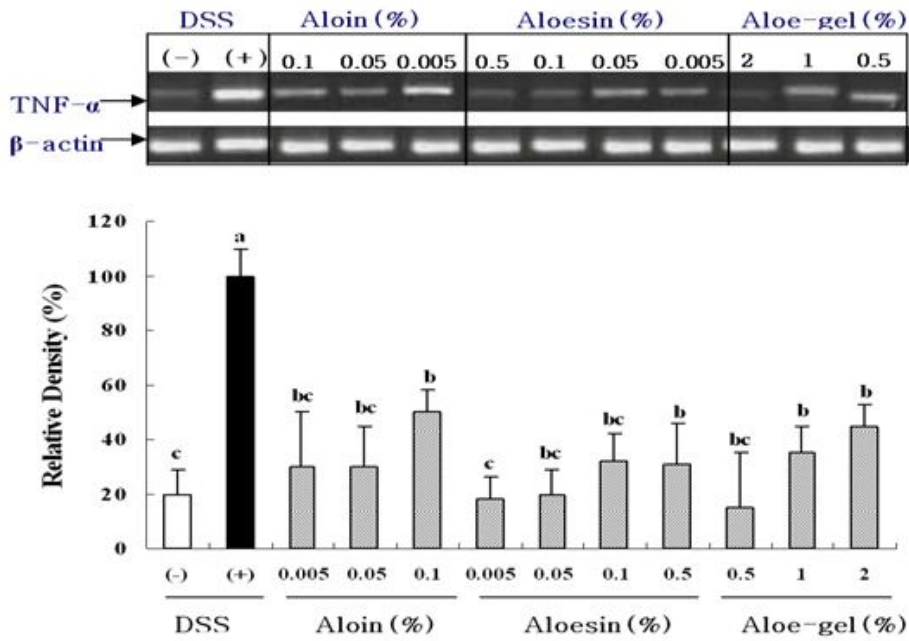
도면4



도면5



도면6



도면7

