



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0042689
(43) 공개일자 2009년04월30일

(51) Int. Cl.

A61K 31/404 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0108588

(22) 출원일자 2007년10월27일

심사청구일자 2007년10월27일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39

(72) 발명자

윤정한

강원 춘천시 후평1동 846-1 현대맨션 101호

조한진

강원 고성군 토성면 용암1리 274-1

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동인

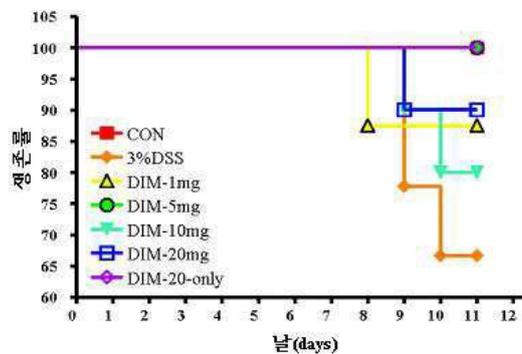
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 3,3'-디인돌릴메탄을 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 3,3'-디인돌릴메탄(3,3'-diindolylmethane)을 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 3,3'-디인돌릴메탄은 NF-κB 및 AP-1 신호전달의 억제를 통하여 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현 및 TAP에 의해 유도된 COX-2 발현의 억제효과를 나타내므로, 염증 질환의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도13



(72) 발명자

김진경

경기도 가평군 가평읍 대곡리 175-5

김은지

강원 홍천군 북방면 히화계리 15-2

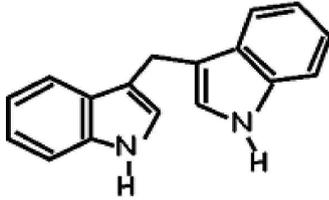
박소영

서울 노원구 중계1동 청구3차아파트 105동 503

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 (1)의 3,3' -디인돌릴메탄을 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.



(1)

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 염증 질환은 급성염증질환, 류마티스성 관절염, 위염, 대장염, 신장염, 간염, 암 또는 퇴행성 질환인 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.1 내지 50% 중량으로 포함하는 약학 조성물.

청구항 4

제 1항의 화학식 (1)로 표기되는 3,3' -디인돌릴메탄을 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제 4항에 있어서, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 건강기능식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 3,3' -디인돌릴메탄을 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- <2> [문헌 1] Miller M. J. et al., *Mediators of inflammation*, 4, pp387-396, 1995
- <3> [문헌 2] Appleton L. et al., *Adv. Pharmacol.*, 35, pp27-28, 1996
- <4> [문헌 3] Weisz A., *Biochem. J.*, 316, pp209-215, 1996
- <5> [문헌 4] Oh, G. T. et al., *Atherosclerosis*, 159(1), pp17-26, 2001
- <6> [문헌 5] Epstein F. H. et al., *The New England Journal of Medicine*, 336(15), pp1066-1071, 1997
- <7> [문헌 6] Zhang W. J. et al., *FASEB J*, 15(130), pp2423-2432, 2001
- <8> [문헌 7] Denk, A, et al., *J Biol. Chem.*, 276(30), pp28451-28458, 2001

- <9> [문헌 8] Sahnoun Z. et al., *Physiology*, 53(4), pp315-339, 1998
- <10> [문헌 9] Lindner V., *Pathobiology*, 66(6), pp311-320, 1998
- <11> [문헌 10] Landry, D. B. et al., *Am. J. Pathol.*, 151(4), pp1085-1997
- <12> [문헌 11] Gerritsen, M. E. et al., *Am. J. Pathol.*, 147(2), pp278-292, 1995
- <13> [문헌 12] Denizot F et al., *J Immunol Methods*, 89, pp271-277, 1986
- <14> [문헌 13] Kim JK et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 345, pp1215-1223, 2006
- <15> [문헌 14] Cho HJ et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 284, ppG996-G1005, 2003
- <16> [문헌 15] Cho IJ et al., *Free radical biology & medicine*, 39, pp1523-36, 2005
- <17> [문헌 16] Surh YJ et al., *Mutat Res.*, 1; pp480-481, pp 243-68, 2001
- <18> [문헌 17] Kundu JK et al., *Biochem Pharmacol.*, 72(11), pp1506-1515, 2006
- <19> [문헌 18] Aharoni R et al., *J Pharmacol Exp Ther.*, 318, pp68-78, 2006
- <20> [문헌 19] Yoshihara et al., *Gut.*, 55, pp334-314, 2006
- <21>

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <22> 염증은 어떤 자극에 대한 생체조직의 방어반응으로, 조직 변질, 순환장애, 삼출, 조직 증식 등을 병발하는 복잡한 병변이다. 또한 염증은 선천성 면역의 일부이며 다른 동물에서처럼 인간의 선천성 면역은 병원체에 특이적으로 존재하는 세포 표면의 패턴을 인식한다. 식세포는 그런 표면을 가진 세포를 비자기로 인식하고 병원체 표면에 달라붙는다. 만일 병원균이 신체의 물리적 장벽을 깨고 들어온다면 염증반응이 일어난다.
- <23> 염증반응은 상처부위에 침입한 미생물들에 대한 적대 환경을 만드는 비특이적인 방어작용으로 국소 혈관 또는 체액 내에 존재하는 염증 매개인자 및 면역세포의 활성화, 염증매개물질 분비, 체액 침윤, 면역세포 이동, 조직 파괴 등의 생리적 반응과 홍반, 부종, 발열, 통증 등의 외적 증상을 나타낸다.
- <24> 염증반응 초기단계에 나타나는 주된 세포는 호중구로서, 염증이 있고 감염된 조직 내로 많은 수가 모인다. 대식세포처럼 호중구도 공통 박테리아 성분 및 보체에 대한 표면 수용체가 있으며 이들이 침투한 미생물을 포식하고 파괴하는 주된 세포이다. 호중구의 유입 이후 단구들이 대식세포로 빠르게 분화하며 이들은 보체, IL-1, IL-6, TNF, IFN등의 염증유발 사이토카인을 분비한다. 감염후기의 염증반응에는 림프구가 관여하는데, 이는 그동안 감염부위로부터 유입된 림프관을 통하여 끌어들인 항원들에 의하여 활성화된 것이다.
- <25> 이러한 염증반응의 원인은 대단히 다양하며 세포 손상을 일으키는 모든 인자는 염증의 원인이 될 수 있다. 염증 반응의 주요 원인으로는 미생물 감염, 과민반응, 물리적 요인, 화학적 요인 및 조직의 과사등이 있다. 특히 L-아르기니(L-arginine)로부터 산화질소(nitric oxide;NO)를 유발시키는 산화질소합성효소(nitric oxide synthase; NOS) 및 아라키돈산(arachidonic acid)에서 프로스타글란딘(prostaglandin)으로 생합성하는데 관여하는 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase)는 염증 반응을 매개하는데 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다.
- <26> 산화질소합성효소는 체내에 항상 일정수준으로 발현되고 있으며, 이의 종류로는 뇌형(brain NOS, bNOS), 신경형(neuronal NOS, nNOS), 혈관형(endothelial NOS, eNOS), 유도형(inducible NOS, iNOS)등이 있다.
- <27> 산화질소합성효소에 의해 생산되는 산화질소는 자유 라디칼을 가지고 있는 분자로 정상상태에서는 내피세포나 대식세포에서 생산되며 혈류를 정상화하고 혈액순환을 조절하며, 뇌세포들 간에 연락을 조절하고 있어서 인간의 집중력, 기억력, 정보저장능력을 도와줄 뿐만 아니라 위산의 운동을 조절하여 소화를 촉진시키는 것으로 알려졌다. 하지만 지질다당체(LPS), 염증유발인자 및 방사선 조사 등에 의해 발현이 유도되는 유도형 산화질소합성효소(induced NOS)는 칼슘 비의존성 경로를 통하여 다량의 산화질소를 생성하며, 이는 세포독성이나 각종 염증반응을 일으키는 것으로 알려졌다(Miller M. J. et al., *Mediators of inflammation*, 4, pp387-396, 1995:

Appleton L. et al., *Adv. Pharmacol.*, **35**, pp27-28, 1996).

<28> 또한 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase)는 COX-1과 COX-2 두 가지로 나뉘는데, 사이클로옥시게나제-1(cyclooxygenase-1, COX-1)은 세포내에 항상 존재하여 세포보호 작용에 필요한 프로스타글란딘(PGs)을 합성하는 반면에, COX-2는 염증 반응시 세포내에서 급격히 증가하여 염증 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(Weisz A., *Biochem. J.*, **316**, pp209-215, 1996).

<29> NF-κB는 이러한 염증 반응에서 중요한 신호전달 물질로 알려져 있으며, 면역반응에 필수적인 여러 사이토카인의 발현 및 COX, NOS와 같은 효소의 발현을 증진시킴으로써 면역세포의 활동에 중요한 역할을 하는 전사인자이다. NF-κB는 p50과 p65로 이루어진 이종이합체(heterodimer)로, 정상 환경하에서는 NF-κB의 전사를 억제하는 IκB와 결합하여 세포질 내에 존재하지만, 활성산소(reactive oxygen), TNF-α(tumor necrosis factor-α), 지질다당체(LPS), IL-1등과 같은 다양한 자극을 받으면 IκB키나제(IκB kinase)가 활성화 되어 IκB를 인산화 시키고, 이로 인해 NF-κB는 IκB로부터 방출된다. 이후 NF-κB는 핵 내로 이동하여 염증 반응에 관련된 유전자를 발현을 촉진시킨다(Oh, G. T. et al., *Atherosclerosis*, **159(1)**, pp17-26, 2001; Epstein F. H. et al., *The New England Journal of Medicine*, **336(15)**, pp1066-1071, 1997; Zhang W. J. et al., *FASEB J.*, **15(130)**, pp2423-2432, 2001; Denk, A. et al., *J Biol. Chem.*, **276(30)**, pp28451-28458, 2001; Sahnoun Z. et al., *Physiology*, **53(4)**, pp315-339, 1998; Lindner V., *Pathobiology*, **66(6)**, pp311-320, 1998; Landry, D. B. et al., *Am. J. Pathol.*, **151(4)**, pp1085-1997; Gerritsen, M. E. et al., *Am. J. Pathol.*, **147(2)**, pp278-292, 1995).

<30> 따라서 현재 NF-κB의 제어를 통하여 유도성 산화질소합성효소 및 COX-2의 발현을 억제시키는 염증 질환치료제를 개발하기 위해 많은 노력을 기울이고 있다.

<31> 하지만 현재까지 유도성 산화질소합성효소 및 COX-2의 발현 저해제로는 플라본 유도체들이 보고된 바 있으며, 3,3'-디인돌릴메탄에 의한 유도성 산화질소합성효소 및 COX-2의 발현 억제효과는 교시되거나 개시된 바 없다.

<32> 3,3'-디인돌릴메탄은 배추, 브로콜리, 무 같은 십자화과 채소의 성분인 인돌-3-카비놀(inole-3-carbinol)이 사람의 위와 같은 산성환경에서 자연적으로 중합되어 생성되는 물질이다.

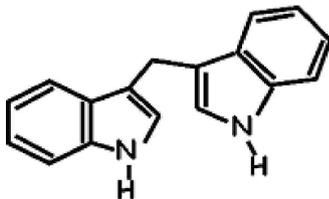
<33> 이에 본 발명자들은 염증 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 강력한 물질을 찾고자 연구를 하던 중, 3,3'-디인돌릴메탄이 NF-κB 및 AP-1 신호의 조절을 통하여 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현 및 TAP에 의해 유도된 COX-2 발현을 억제함으로써 염증 질환 치료에 효과적임을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

<34> 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 (1)로 표기되는 3,3'-디인돌릴메탄을 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

<35> 또한, 본 발명은 하기 화학식 (1)로 표기되는 3,3'-디인돌릴메탄을 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

화학식 1



(1)

<38> 본원에서 정의되는 염증 질환은 급성염증질환, 류마티스성 관절염, 위염, 대장염, 신장염, 간염, 암 또는 퇴행성 질환, 바람직하게는 급성염증질환, 류마티스성 관절염, 위염, 대장염, 신장염 또는 간염을 포함한다.

<39>

- <40> 본 발명의 3,3' -디인돌릴메탄은 시중에서 구입가능하다.
- <41> 본 발명의 염증 질환의 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.1 내지 50% 중량으로 포함한다.
- <42> 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.
- <43> 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- <44> 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테이 트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- <45> 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <46> 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- <47> 또한, 본 발명은 3,3' -디인돌릴메탄을 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- <48> 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 염증 질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- <49> 본 발명의 화합물 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- <50> 본 발명의 상기 화합물은 염증 질환의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- <51> 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의

디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mg당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

<52> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

효 과

<53> 본 발명의 3,3' -디인돌릴메탄은 NF-κB 및 AP-1 신호전달의 억제를 통하여 iNOS 발현 및 COX-2 발현 억제효과를 확인함으로써, 염증 질환의 예방 및 치료용 약화조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<54> 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<55> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

<56> 실시예 1. 3,3' -디인돌릴메탄 및 세포 준비

<57> 3,3' -디인돌릴메탄(이하, "DIM"이라 정의함)은 LKT 레버러토리사(LKT Laboratories, Inc.)에서 구입하였으며, MCF-10A, Raw 264.7 및 PWR-1E 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였다.

<58> 참고예 1. 대식세포 배양 및 염증 유도

<59> 생쥐의 대식세포인 Raw 264.7 세포는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에 10% FBS(fetal bovine serum), 100 units/mL 페니실린(penicillin)과 100 μg/mL 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가하여 배양기(37℃, 5% CO₂)에서 배양하였다. 세포가 100 mm 디쉬(dish) 바닥의 80%정도까지 자라면 PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% 트립신(trypsin)-2.65 mmol/L EDTA 로 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다. 또한 세포의 염증 반응을 유도하기 위하여 1% FBS가 함유된 DMEM 배양액에 LPS(lipopolysaccharide)를 100 ng/mL의 농도로 첨가하였다.(하기 실험예 1에서 사용)

<60> 참고예 2. MCF-10A 및 PWR-1E 세포 배양 및 염증 유도

<61> 인간의 유방 상피세포인 MCF-10A 세포는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)/F12 배지에 5% HS (horse serum), 100 units/mL 페니실린, 100 μg/mL 스트렙토마이신 및 2 mmol/L 글루타민을 첨가하여 배양하였고 전립선 상피세포인 PWR-1E 세포는 10% FBS 케라티노사이트 배지(FBS-keratinocyte medium, Gibco/BRL)를 이용하여 배양기(37℃, 5% CO₂)에서 배양하였다. 세포가 100 mm 디쉬(dish) 바닥의 80%정도까지 자라면 PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-2.65 mmol/L EDTA로 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다. 또한 세포의 염증 반응을 유도하기 위하여 배양액에 TPA(phobol 12-myristate 13-acetate)를 10nmol/L의 농도로 첨가하였다.(하기 실험예 2에서 사용)

<62> 참고예 3. 실험동물

<63> 5주령의 암컷 ICR 생쥐(하기 실험예 3에서 사용)를 코아텍에서 구입 하였으며, C57/BL6 mice(하기 실험예 4에서 사용)는 SLC (Shizuoka)에서 구입하였다. 실험동물들은 식이와 물을 자유급식 (ad libitum feeding) 하였으며, 사육실의 온도는 22 - 25℃, 습도는 55%로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다. 실험동물은 2주 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

<64> 실험예 1. DIM이 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 염증 반응에 미치는 영향 확인

<65> 1-1 세포독성

<66> 상기 실시예 1에서 제조한 DIM이 참고예 1에서 배양한 Raw 264.7 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MTT 어세이법을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Denizot F et al., *J Immunol Methods*, 89, pp271-277, 1986).

<67> Raw 264.7 세포를 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 희석하여 50,000 세포/웰의 밀도로 만든 후 24-웰 플레이트에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 1% FBS가 함유된 DMEM 배지로 FBS에 의한 효과를 최소화하였다. LPS가 포함되어 있지 않거나 포함되어 있는 세포배양액에 다양한 농도 (0, 2.5, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$)의 DIM를 첨가하여 세포를 48시간 동안 배양한 후 MTT 방법을 통하여 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

<68> 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 DIM은 10 $\mu\text{mol/L}$ 이하의 농도에서는 세포독성이 없으나, 20 $\mu\text{mol/L}$ 이상의 농도에서는 세포독성이 있는 것으로 나타났다. 또한 세포배양액에 LPS를 첨가하였을 때에도 같은 결과를 보였다(도 1 참조). 따라서 이후의 실험에서는 세포독성을 나타내지 않는 10 $\mu\text{mol/L}$ 이하의 농도로 DIM를 처리하여 실험을 수행하였다.

<69> 1-2 NO 분비량 억제 확인

<70> DIM이 Raw 264.7 세포의 NO 분비량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 그리스 리에이전트 시스템(Griess reagent system)을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Kim JK et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 345, pp1215-1223, 2006).

<71> 실험예 1-1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 Raw 264.7 세포에 DIM 또는 LPS를 첨가하여 24시간 배양한 후, 그 배양액을 수집하여 NO 분비량을 그리스 시약 시스템으로 측정하였다.

<72> 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 Raw 264.7 세포가 분비하는 NO의 기본량은 $0.49 \pm 0.19 \mu\text{mol/L}$ 이었고 LPS 처리군은 $11.6 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$ 으로 현저히 증가하였다. 반면 DIM처리군은 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 농도 의존적(5 $\mu\text{mol/L}$ DIM: $6.48 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$ NO, 10 $\mu\text{mol/L}$ DIM: $3.14 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$ NO)으로 감소시킨 것으로 나타났다(도 2 참조). 따라서 DIM이 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 농도 의존적으로 억제시킴을 확인할 수 있었다.

<73> 1-3 iNOS 단백질 발현억제 확인

<74> Raw 264.7 세포에서 DIM에 의한 NO의 분비 감소가 iNOS 단백질 발현 감소에 기인하는지를 조사하기 위하여 웨스턴 브랏(western blot)방법을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Cho HJ et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 284, G996-G1005, 2003).

<75> 실험예 1-1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 Raw 264.7 세포에 LPS와 DIM를 처리한 후, 1 mmol/L 요오드 초산(iodoacetic acid)과 1 mmol/L PMSF가 포함된 PBS로 행구었다. 이후, 스크레이퍼(Scraper)를 사용하여 Raw 264.7 세포를 모은 후, 펠렛(pellet)에 용해완충액(lysis buffer, 20 mmol/L 헤페스(HEPES), 1% 트리톤(Tritone) X-100, 150 mmol/L 염화나트륨(NaCl), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 100 mmol/L 플루오르화나트륨(NaF), 10 mmol/L 요오드 초산(iodoacetic acid), 0.2 mmol/L PMSF, 20 $\mu\text{g/mL}$ 아프로티닌(aprotinin), 10 $\mu\text{g/mL}$ 안티페인(antipain), 10 $\mu\text{g/mL}$ 류펩틴(leupeptin), 80 $\mu\text{g/mL}$ 벤자미딘 염화수소(benzamidinium HCl))을 넣고 4°C에서 40분 동안 반응시켰다.

<76> 단백질을 분리하기 위하여 상기 방법을 통해 얻은 세포 용해물(50 μg protein)을 SDS-PAGE에서 분리한 후, PVDF막(polyvinylidene fluoride membrane)에 옮겼다. 막은 5% 밀크(milk)-TBST (20 mmol/L 트리스-염소(Tris-HCl), 150 mmol/L NaCl, 0.1% 트윈(Tween)-20, pH 7.5)로 블로킹(blocking)하였으며, 각각의 항체를 5% 밀크(milk)-TBST 혹은 5% BSA/TBST에 희석하여 교반하였다. 항체에 결합된 단백질의 신호는 SWDED 기질(SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate)을 사용한 화학발광(chemiluminescence)방법을 통하여 가시화하였다.

<77> 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 iNOS 단백질 발현은 LPS에 의해서 현저히 증가하였지만, DIM이 농도에 의존적으로 LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다(도 3 참조). 따라서 DIM에 의한 iNOS의 발현억제가 NO의 분비억제를 유발시킴을 예측할 수 있었다.

<78> 1-4. iNOS의 전사활성 억제 확인

<79> DIM이 iNOS의 전사활성을 감소시키는지 조사하기 위해 생쥐의 iNOS 레포터 유전자 구조물을 이용하여

하기와 같이 실험을 수행하였다(Cho IJ et al., *Free radical biology & medicine*, 39, pp1523-36, 2005).

- <80> 페니실린-스트렙토마이신(penicillin- streptomycin)이 첨가되지 않은 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 Raw 264.7 세포를 24 시간동안 배양하였다.
- <81> iNOS의 전사활성을 측정하기 위하여 뉴클레오펙터-II(Nucleofector-II, Amaxa)를 사용하여 pGL-miNOS-1588-Luc 레포터 플라스미드를 pCMV-β-갈락토시다아제 대조군 벡터(galactosidase control vector)와 함께 Raw 264.7 세포에 형질전환시켰다. 이후 형질전환된 세포를 다양한 농도의 DIM과 LPS가 첨가된 배양액에서 6시간 배양하였다. iNOS의 전사활성은 루시페라아제 어세이 시스템(Luciferase assay system)을 이용하여 측정하였다.
- <82> 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 LPS 처리군은 iNOS의 전사활성이 3배 이상 증가한 반면, DIM 처리군은 LPS에 의해 유도된 iNOS 전사활성이 농도 의존적으로 억제된 것으로 나타났다(도 4 참조). 따라서 DIM이 iNOS의 발현억제뿐만 아니라 전사활성도 억제시킴을 확인할 수 있었다.
- <83> 1-5 IκB 단백질 발현억제 확인
- <84> iNOS 유전자 프로모터에는 NF-κB, AP-1와 같은 전사인자들이 결합하기 위한 상동공통배열 (homologous consensus sequence)을 가지고 있다. DIM에 의한 iNOS의 발현 감소가 이 전사인자들의 신호전달 억제에 의해 이루어지는지 조사하였다.
- <85> 우선, DIM에 의한 iNOS의 발현 감소가 NF-κB의 신호전달 억제에 의해 이루어지는지 조사하기 위해 웨스턴 브랏(western blot)방법을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.
- <86> IκB는 NF-κB와 결합하여 NF-κB를 세포질 내에 묶어두는 역할을 하며, 활성산소(reactive oxygen), TNF-α(tumor necrosis factor-α), 지질다당체(LPS), IL-1등과 같은 다양한 자극을 받으면 활성화된 IκB키나제(IκB kinase)의해 인산화되어 분해된다. 이로 인해 NF-κB는 IκB로부터 방출되고 핵 내로 이동하여 염증 반응에 관련된 유전자 발현을 촉진시킨다. 따라서 IκB의 양을 측정하여 DIM의 NF-κB의 신호전달 억제활성을 확인하였다.
- <87> Raw 264.7 세포에 DIM을 처리하여 18시간 동안 배양한 후, LPS를 처리하여 20분 동안 추가 배양하였다. 이후 실험에 1-3에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포 용해물(lysate)을 획득하였고, IκB의 단백질량은 실험에 1-3에 기재된 웨스턴 브랏(western blot)방법을 이용하여 측정하였다.
- <88> 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 IκB의 단백질량은 LPS 처리에 의해서 감소된 반면, DIM 처리에 의해서 LPS에 의해 유도된 IκB의 분해를 억제시킨 것으로 나타났다(도 5 참조). 따라서 DIM에 의해 NF-κB의 신호전달이 억제됨으로써 iNOS의 발현이 감소함을 예측할 수 있었다.
- <89> 1-6 NF-κB의 전사활성 억제 확인
- <90> DIM에 의한 NF-κB의 전사활성을 조사하기 위하여 NF-κB-luc 레포터 벡터를 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.
- <91> Raw 264.7 세포를 페니실린-스트렙토마이신(penicillin- streptomycin)이 첨가되지 않은 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 24 시간 동안 배양하였다.
- <92> NF-κB의 전사활성을 측정하기 위하여 뉴클레오펙터-II (Nucleofector-II, Amaxa)를 사용하여 NF-κB-Luc 레포터 플라스미드를 pCMV-β-갈락토시다아제 대조군 벡터(galactosidase control vector)와 함께 Raw 264.7 세포에 형질전환시켰다. 이후 상기 방법으로 얻은 형질전환된 세포를 다양한 농도의 DIM이 첨가된 배양액에 넣고 18시간동안 배양한 후, LPS를 처리하여 20분 동안 추가 배양하였다. NF-κB의 전사활성은 루시페라아제 어세이 시스템(Luciferase assay system, Promega)을 이용하여 측정하였다.
- <93> 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 DIM은 LPS에 의해 유도된 NF-κB 전사활성을 억제시켰다(도 6 참조). 따라서 DIM이 NF-κB의 전사활성을 억제시킴을 확인할 수 있었다.
- <94> 1-7 AP-1의 전사활성 억제 확인
- <95> Raw 264.7 세포에서 DIM에 의한 AP-1의 전사활성을 조사하기 위하여 AP-1-Luc 레포터 벡터를 이용하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- <96> Raw 264.7 세포를 페니실린-스트렙토마이신(penicillin- streptomycin)이 첨가되지 않은 10% FBS를 함

유한 DMEM 배지에서 24 시간 동안 배양하였다.

<97> AP-1의 전사활성을 측정하기 위하여 뉴클레오펙터-II (Nucleofector-II, Amaxa)를 사용하여 AP-1-Luc 레포터 플라스미드를 pCMV-β-갈락토시다아제 대조군 벡터(galactosidase control vector)와 함께 Raw 264.7 세포에 형질전환시켰다. 이후 상기 방법으로 얻은 형질전환된 세포를 다양한 농도의 DIM이 첨가된 배양액에 넣고 18시간 동안 배양한 후, LPS를 처리하여 20분 동안 추가 배양하였다. AP-1의 전사활성은 루시페라아제 어서이 시스템(Luciferase assay system)을 이용하여 측정하였다.

<98> 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 DIM은 LPS에 의해 증가된 AP-1 전사활성을 감소시켰다(도 7 참조). 따라서 DIM이 AP-1의 전사활성을 억제시킴을 확인할 수 있었다.

<99> 실험예 1의 결과들을 통해, DIM이 LPS에 의해 유도되는 NF-κB 신호전달과 AP-1 신호전달을 억제하여 iNOS의 발현을 억제함을 알 수 있다.

<100> **실험예 2. DIM이 정상상피세포에서 TPA에 의해 유도된 염증 반응에 미치는 영향**

<101> 2-1. TPA에 의해 증가된 COX-2의 발현억제 확인

<102> DIM이 TPA에 의해 증가된 COX-2의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 웨스턴 브랏(western blot)방법을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

<103> 상기 참고예 2에서 배양한 MCF-10A와 PWR-1E에 TPA와 동시에 DIM(0, 5, 10, 20 μmol 농도)을 처리하고 4시간 동안 배양한 후 세포를 모아 COX-2의 단백질량을 실험예 1-3에 기재된 웨스턴 브랏(western blot)방법으로 측정하였다.

<104> 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 MCF-10A와 PWR-1E 두 세포 모두에서 TPA의 처리에 의하여 현저히 증가된 COX-2 단백질이 DIM의 처리에 의해 감소하였다(도 8 참조). 따라서 DIM이 TPA에 의해 증가된 COX-2의 발현을 억제시킴을 확인할 수 있었다.

<105> 2-3. COX-2에 의해 형성된 PGE₂의 분비억제 확인

<106> DIM이 COX-2에 의해 형성된 PGE₂의 분비량에 미치는 영향을 측정하기 위해 PGE₂ 어서이 키트(PGE₂ assay kit)를 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Kim JK et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 345, pp1215-1223, 2006).

<107> MCF-10A 세포에 TPA와 DIM을 처리하고 48시간 동안 배양한 후, 상기 배양액을 수집하여 세포가 분비한 PGE₂의 양을 PGE₂ 어서이 키트를 이용하여 측정하였다.

<108> 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 PGE₂의 분비는 TPA 처리에 의하여 약 1.5배 증가하였으며 DIM의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다(도 9 참조). 따라서 DIM에 의한 COX-2의 발현억제가 PGE₂의 분비억제를 유발시킴을 예측할 수 있었다.

<109> 2-4. NF-κB 신호전달억제 확인

<110> DIM이 COX-2의 발현을 조절하는 NF-κB 신호전달에 미치는 영향을 조사하기 위해 웨스턴 브랏(western blot) 방법을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Surh YJ et al., *Mutat Res.*, 1;480-481, 243-68, 2001).

<111> NF-κB의 이중이합체(p50:p65)중 NF-κB p65의 핵으로의 이동을 조사하기 위해 각각의 세포에 TPA와 DIM을 처리하고 1시간 동안 배양한 후 세포를 모아 핵을 분리한 후 핵 분획을 사용하여 p65의 단백질량을 실험예 1-3에 기재된 웨스턴 브랏(western blot) 방법으로 측정하였다.

<112> 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 MCF-10A와 PWR-1E 두 세포 모두에서 TPA의 처리에 의해 핵으로 이동한 p65가 증가하였고, 이는 DIM의 처리에 의해 감소하였다(도 10 참조). 따라서 DIM이 NF-κB의 신호전달을 억제함을 확인할 수 있었다.

<113> 실험예 2의 연구결과들을 통해, DIM은 인간의 정상 상피세포에서 TPA에 의해 유도된 NF-κB 신호전달의 활성을 억제함으로써 COX-2의 발현을 억제하고 염증반응을 조절할 수 있을 것으로 예측된다.

<114> **실험예 3. 생체 내(in vivo)실험체계에서 DIM이 염증작용에 미치는 영향과 작용 기전 규명**

- <115> 3-1. 생체 내(in vivo)에서 TPA에 유도된 COX-2와 iNOS 단백질 발현억제 확인
- <116> DIM이 TPA에 유도된 COX-2와 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 웨스턴 브랏(western blot)방법을 이용하여 하기 같이 실험을 수행하였다(Kundu JK et al., Biochem Pharmacol., 72(11), pp1506-1515, 2006).
- <117> 동물 등의 털을 동물용 전기용 클리퍼(electric clipper)를 사용하여 제거한 후 48시간이 지난 후에 다양한 농도 (0, 10, 20, 30 μ mol)의 DIM을 TPA(10 nmol)처리하기 30분전에 동물의 등에 국소 도포하였다. DIM과 TPA는 각각 DMSO(dimethyl sulfoxide)와 아세톤을 15대 85의 비율로 혼합한 DMSO-아세톤 용매 0.2 mL에 녹여 사용하였다. DIM과 TPA 처리 8시간 후 동물을 희생시켜 피부를 잘라낸 다음 액체 질소로 냉동하였다. 냉동된 피부 조직을 막자사발에 옮겨 액체 질소 하에서 갈아 분말화하였다. 상기의 방법으로 분말화된 피부조직에 1 μ mol/L PMSF, 1 mmol/L Na3VO4와 단백질 분해효소 억제 콕테일 테브렛(protease inhibitor cocktail tablet, Roche)이 포함된 차가운 RIPA 완충액(50 mmol/L Tris, pH 7.0, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% 트리톤(Triton) X-100, 1% 노니데트(nonidet) P-40, 0.25% 디옥시콜산(deoxycholic acid))을 첨가한 후 폴리트론(polytron)을 사용하여 균질화하였고, 원심분리하여 세포 용해물을 얻었다. 상기 세포 용해물의 단백질 양은 BCA 단백질 어세이 키트(BCA protein assay Kit)를 사용하여 측정하였다. 세포 용해물을 4-20%까지 농도를 다르게 한 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)에서 분리한 후 PVDM(polyvinylidene difluoride membrane)에 이동시켰다. 막은 5% 스킵 밀크(skim milk)-TBST (20 mmol/L 트리스-염산(Tris-HCl), pH 7.5, 150 mmol/L 염화나트륨(NaCl), 0.1% 트윈(Tween) 20)에서 1시간 동안 블로킹(blocking)하였고, COX-2항체를 첨가하여 4°C에서 16시간 동안 또는 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. 그 후 HRP(horse radish peroxidase)가 부착된 항-토끼(anti-rabbit) IgG 또는 HRP(horse radish peroxidase)가 부착된 항-생쥐(anti-mouse) IgG (Amersham, Buckinghamshire)를 첨가하여 1시간 동안 교반하였다. COX-2 단백질의 밴드는 SWDED 기질(SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate)을 사용하여 화학발광(chemiluminescence)방법으로 가시화하였고, COX-2 단백질량은 필름에 나타난 밴드의 강도를 농도측정기(densitometry)방법으로 측정하여 비교하였다.
- <118> 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 DIM 처리 농도가 증가할수록 TPA에 유도된 COX-2와 iNOS 단백질 발현이 유의적으로 감소하였다(도 11 참조). 따라서 DIM은 생체 내(in vivo)에서 TPA에 의해 증가된 COX-2와 iNOS의 발현을 억제시킴을 확인할 수 있었다.
- <119> 3-2. 생체 내(in vivo)에서 NF- κ B 신호전달억제 확인
- <120> 생체 내(in vivo)에서 DIM이 COX-2의 발현을 조절하는 NF- κ B 신호전달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NF- κ B에 특이적으로 일치하는 올리고뉴클레오타이드(NF- κ B-specific consensus oligonucleotide)를 이용하여 하기와 같이 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)를 수행하였다.
- <121> 실험예 3-1에 기재된 바와 같이, DIM과 TPA를 처리 후 동물을 희생시켜 피부를 잘라내었다. 이후 잘라낸 피부 조직을 분말화한 다음 완충액 A(Buffer A, 10 mmol/L 헤페스(HEPES), pH 7.8, 10 mmol/L 염화칼륨(KCl), 2 mmol/L 염화마그네슘(MgCl2), 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L PMSF, 10 mmol/L 요오드 초산(iodoacetic acid), 단백질분해효소 억제제 콕테일 테블렛(protease inhibitor cocktail tablet))을 넣고 균질화하였다. 얼음에서 15분간 동안 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였고, 이 상층액에 10% 노니데트(Nonidet) P-40을 첨가한 후 원심분리하여 상층액(cytosolic fraction)과 핵 펠렛(nuclei pellet)을 얻었다. 상기의 방법으로 얻어진 핵 펠렛에 완충액(Buffer) C(50 mmol/L 헤페스(HEPES), pH 7.8, 50 mmol/L 염화칼륨(KCl), 300 mmol/L 염화나트륨(NaCl), 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L PMSF, 10% (v/v) 글리세롤(glycerol))을 첨가하여 섞은 후 20분간 방치하였다. 이후 원심분리(12,000 rpm, 5분)하여 상층액을 취함으로써 핵 추출물(nuclear extract)을 얻었다. 상기와 같은 방법으로 얻은 핵 추출물을 NF- κ B에 특이적으로 일치하는 올리고뉴클레오타이드와 반응시켜 EMSA를 수행하였다.
- <122> 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 TPA는 NF- κ B의 DNA 결합 활성을 증가시켰고, DIM은 TPA에 의해 유도된 NF- κ B의 DNA 결합 활성을 현저히 감소시켰다(도 12 참조). 따라서 DIM은 생체 내(in vivo)에서 TPA에 의해 증가된 NF- κ B의 DNA 결합 활성을 억제시킴을 확인할 수 있었다.
- <123> 실험예 3의 결과들을 통해, DIM은 동물 피부에서 TPA에 의해 유도된 NF- κ B 신호전달의 활성을 억제함으로써 COX-2와 iNOS의 발현을 억제함을 알 수 있다.
- <124> 실험예 4. 염증성 장질환 모델에서 DIM이 염증작용에 미치는 영향과 작용 기전 규명

<125> 4-1. 생존율

<126> DIM의 염증성 장질환 치료제로서의 효과를 알아보기 위해 DSS(Dextran sodium sulfate)로 유발한 염증성 장질환 모델을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Aharoni R et al., J Pharmacol Exp Ther., 318, pp68-78, 2006; Yoshihara et al., Gut., 55, pp334-314, 2006).

<127> 염증성 장질환을 유발하기 위하여 C57/BL6 생쥐에 3%의 DSS를 음용수로 7일간 급여하였다. DSS 급여와 동시에 DIM을 마우스 체중 1 kg당 1, 5, 10, 20 mg의 농도로 1일 1회 7일간 경구투여 하였다. 실험 10일째, 11일째에 모든 동물을 부검하였다.

<128> 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 3% DSS로 염증성 장질환을 유발한 군에서의 생존율은 65%로 감소하였으나, DIM 투여군, 특히 20mg/Kg 투여군에서는 생존율이 90%로 유의적인 생존율의 증가를 보였다(도 13 참조). 따라서 DIM이 강력한 항염증 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

<129> 4-2. 체중변화 및 염증지표

<130> 마우스의 대장염 진전을 조사하기 위해 임상평가시스템(clinical scoring system, 표 1)을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

<131> 실험예 4-1에 기재된 바와 같이 C57/BL6 생쥐에 3%의 DSS로 염증성 장질환을 유발한 후 무게, 직장출혈, 대변의 경도, 생존율을 매일 관찰하여 종합적인 질병의 정도를 임상평가시스템(clinical scoring system, 표 1)에 의해 0~4로 기록하였다.

<132> 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이 3% DSS로 염증성 장질환을 유발한 군은 DSS 투여 5일후로부터 급격한 체중감소를 보여 DSS투여 10일 후에는 약 30%의 체중감소를 보였다. 이에 비하여 DIM 투여군의 체중감소의 폭이 DSS 투여군에 비하여 완만하였으며, 특히 20mg/Kg 투여군에서는 DSS 투여 10일 후 약 5%의 체중감소를 보였다(도 14 참조). 따라서 DIM이 강력한 항염증 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

<133> [표 1] DAI 스코어(score)

스코어(score)	증상
0	체중감소 없음, 혈변없음, 정상적인 대변의 밀도
1	1~5%의 체중감소, 혈변없음, 정상적인 대변의 밀도
2	5~10%의 체중감소, 혈변, 견고하지 않은 대변
3	10~20%의 체중감소, 혈변, 견고하지 않은 대변
4	20% 이상의 체중감소, 직장출혈, 설사

<135> 실험예 4의 결과들을 통해, DIM이 염증성 장질환 모델에서 염증억제 작용을 함을 알 수 있다.

<136> 하기에 본 발명의 DIM을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<137> 제제예 1. 산제의 제조

<138> DIM (실시예 1) 20 mg

<139> 유당 100 mg

<140> 탈크 10 mg

<141> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

<142> 제제예 2. 정제의 제조

<143> DIM (실시예 1) 10 mg

<144> 옥수수전분 100 mg

<145> 유당 100 mg

<146> 스테아린산 마그네슘 2 mg

<147> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<148> **제제예 3. 캡슐제의 제조**

<149>	DIM (실시예 1)	10 mg
<150>	결정성 셀룰로오스	3 mg
<151>	락토오스	14.8 mg
<152>	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

<153> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<154> **제제예 4. 주사제의 제조**

<155>	DIM (실시예 1)	10 mg
<156>	만니톨	180 mg
<157>	주사용 멸균 증류수	2974 mg
<158>	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	26 mg

<159> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

<160> **제제예 5. 액제의 제조**

<161>	DIM (실시예 1)	20 mg
<162>	이성화당	10 g
<163>	만니톨	5 g
<164>	정제수	적량

<165> 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

<166> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<167>	DIM (실시예 1)	1000 mg
<168>	비타민 혼합물	적량
<169>	비타민 A 아세테이트	70 µg
<170>	비타민 E	1.0 mg
<171>	비타민 B1	0.13 mg
<172>	비타민 B2	0.15 mg
<173>	비타민 B6	0.5 mg
<174>	비타민 B12	0.2 µg
<175>	비타민 C	10 mg
<176>	비오틴	10 µg
<177>	니코틴산아미드	1.7 mg
<178>	엽산	50 µg
<179>	판토텐산 칼슘	0.5 mg
<180>	무기질 혼합물	적량

<181>	황산제1철	1.75 mg
<182>	산화아연	0.82 mg
<183>	탄산마그네슘	25.3 mg
<184>	제1인산칼륨	15 mg
<185>	제2인산칼슘	55 mg
<186>	구연산칼륨	90 mg
<187>	탄산칼슘	100 mg
<188>	염화마그네슘	24.8 mg

<189> 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

<190> **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<191>	DIM (실시예 1)	1000 mg
<192>	구연산	1000 mg
<193>	올리고당	100 g
<194>	매실농축액	2 g
<195>	타우린	1 g
<196>	정제수를 가하여	전체 900 ml

<197> 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

<198> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면의 간단한 설명

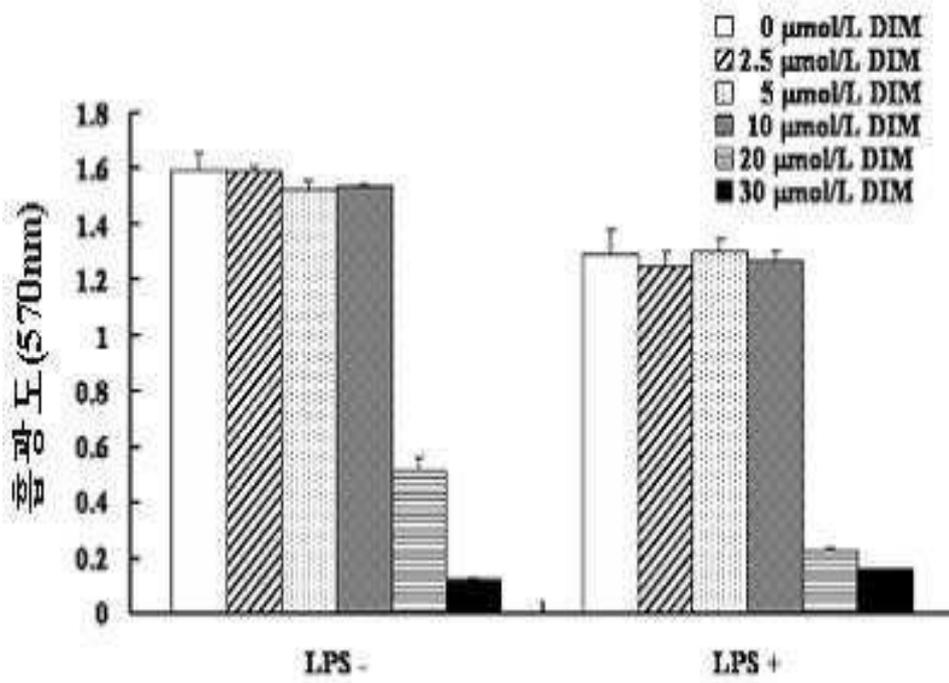
- <199> 도 1은 DIM의 세포독성 정도를 나타낸 도이고,
- <200> 도 2는 DIM이 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 농도 의존적으로 억제함을 나타낸 도이며,
- <201> 도 3은 DIM이 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현을 농도 의존적으로 억제함을 나타낸 도이고,
- <202> 도 4는 DIM이 LPS에 의해 유도된 iNOS의 전사활성을 억제함을 나타낸 도이며,
- <203> 도 5는 DIM이 LPS에 의해 유도된 IκB의 발현을 억제함을 나타낸 도이고,
- <204> 도 6은 DIM이 LPS에 의해 유도된 NF-κB의 전사활성을 억제함을 나타낸 도이며,
- <205> 도 7은 DIM이 LPS에 의해 유도된 AP-1의 전사활성을 억제함을 나타낸 도이고,
- <206> 도 8은 DIM이 TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현을 억제함을 나타낸 도이며,
- <207> 도 9는 DIM이 COX-2에 의해 형성된 PGE2의 분비를 억제함을 나타낸 도이고,
- <208> 도 10은 DIM이 TPA에 의해 유도된 NF-κB의 신호전달을 억제함을 나타낸 도이며,
- <209> 도 11은 DIM이 생체 내에서 TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현을 억제함을 나타낸 도이고,
- <210> 도 12는 DIM이 TPA에 의해 유도된 NF-κB의 DNA 결합활성을 억제함을 나타낸 도이며,
- <211> 도 13은 염증성 장질환 모델에서의 생존율을 관찰을 통해 DIM의 항염증 효과를 나타낸 도이고,

<212>

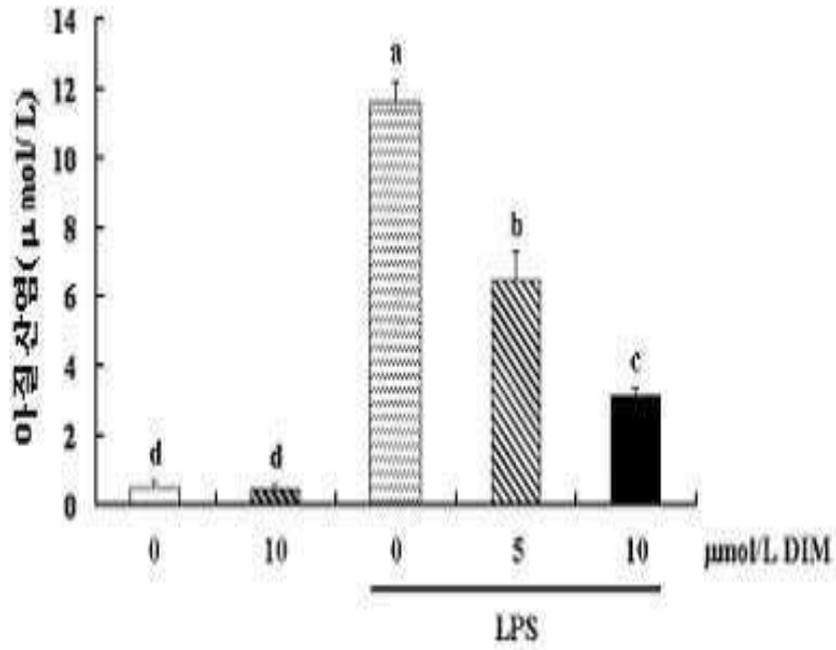
도 14는 염증성 장질환 모델에서의 체중변화 및 염증지표를 통해 DIM의 항염증 효과를 나타낸 도이다.

도면

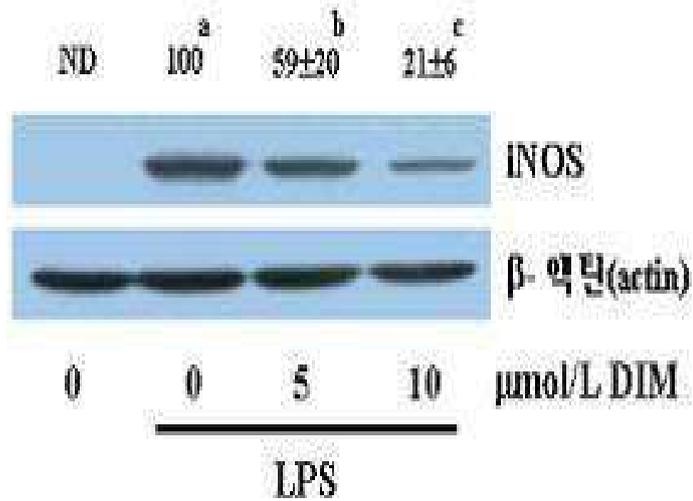
도면1



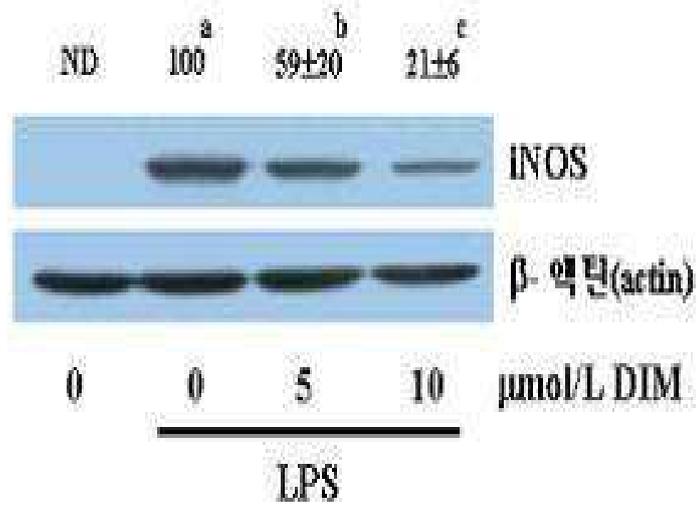
도면2



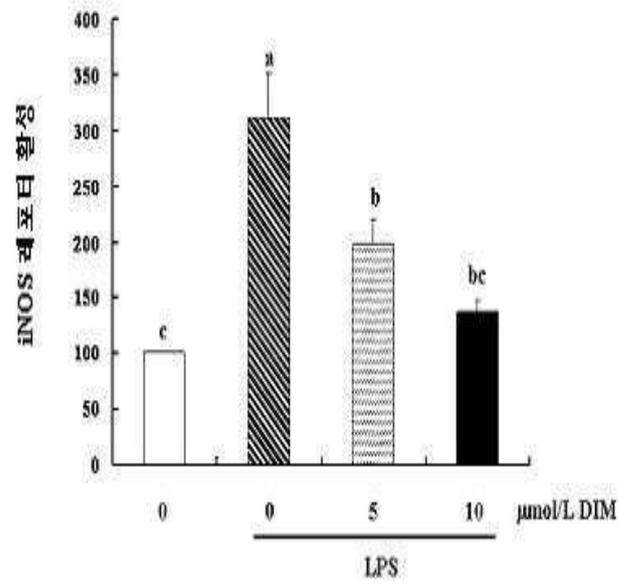
도면3



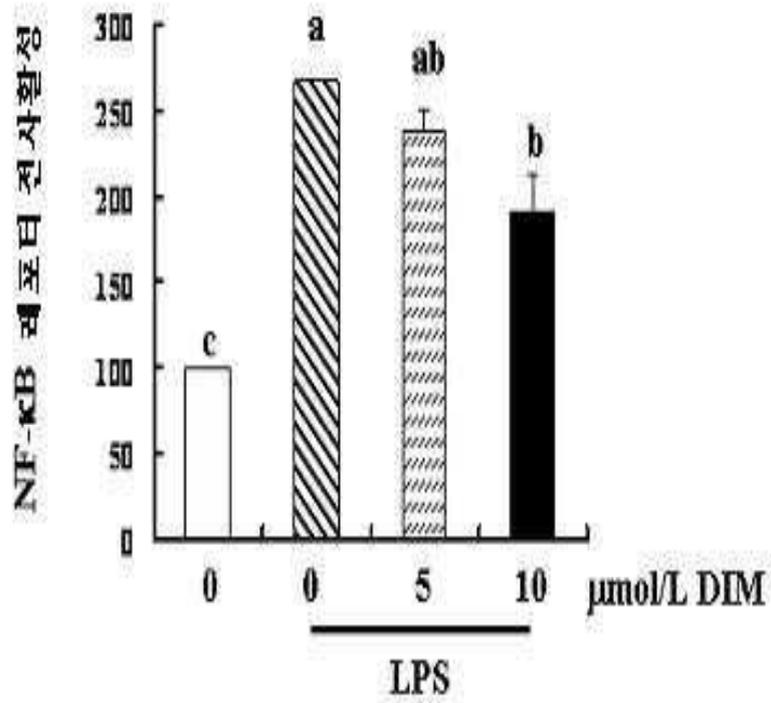
도면4



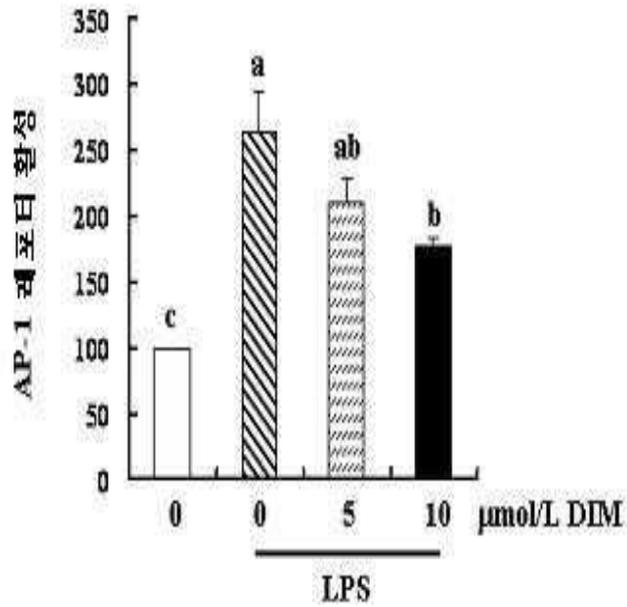
도면5



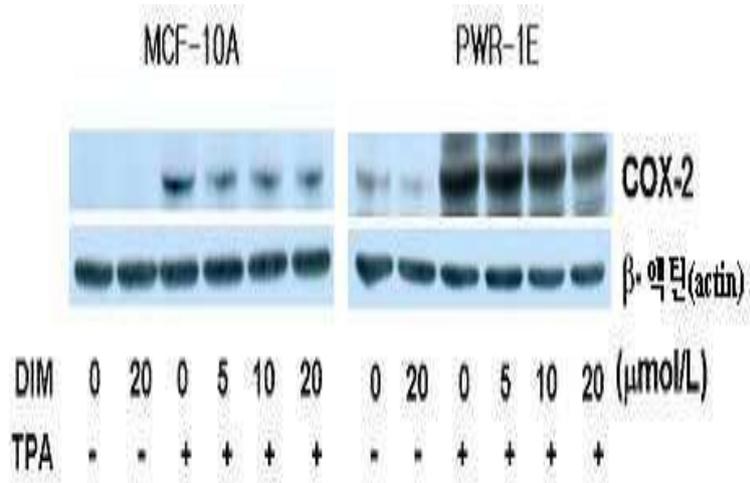
도면6



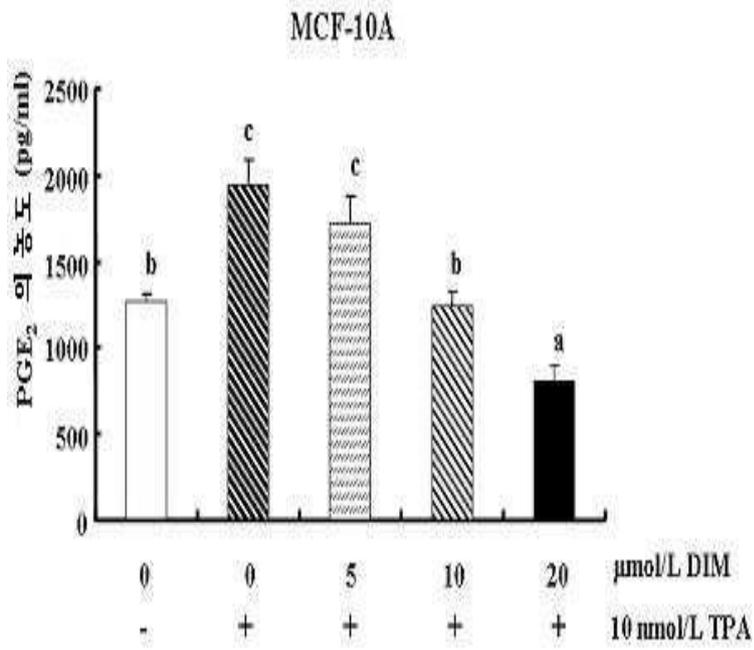
도면7



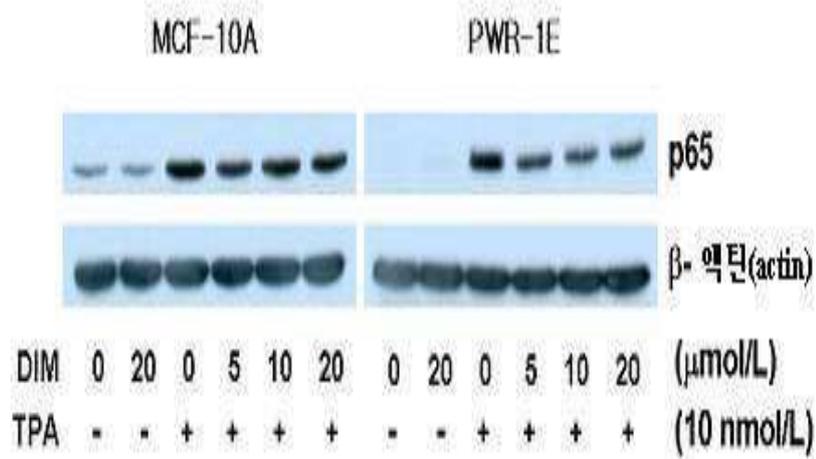
도면8



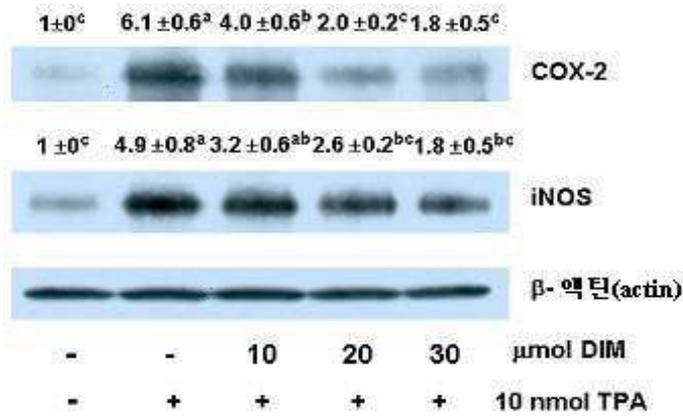
도면9



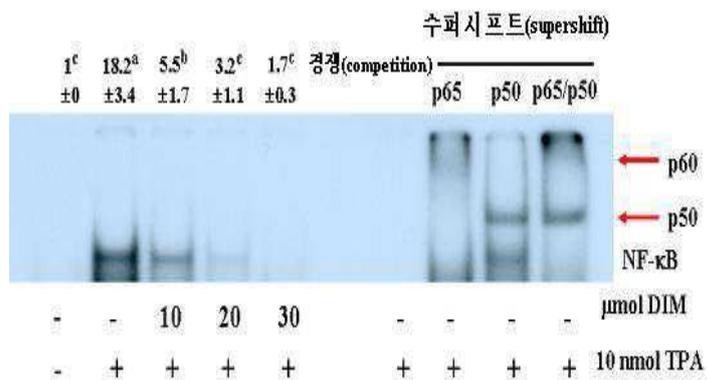
도면10



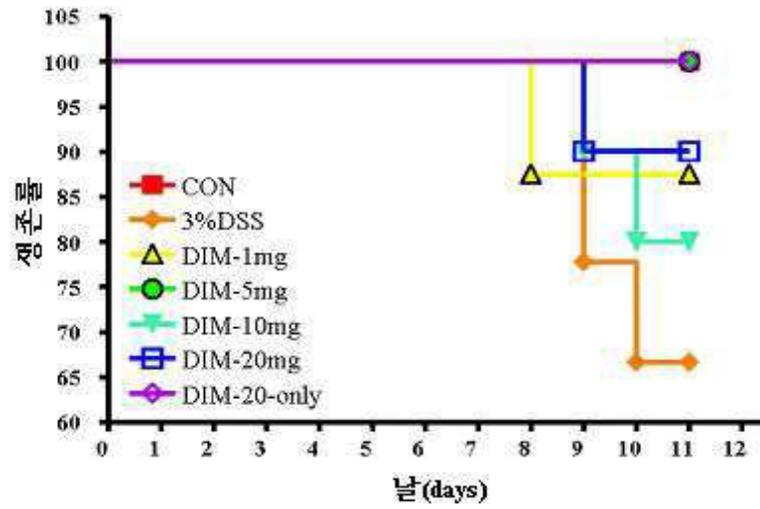
도면11



도면12



도면13



도면14

