(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0091374
(43) 공개일자 2010년08월19일

(51) Int. Cl.
A61K 31/352 (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0010534
(22) 출원일자 2009년02월10일
심사청구일자 2009년02월10일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(72) 발명자
권형주
충청북도 청주시 상당구 용암동 현대1차아파트 103-1506
박병권
서울특별시 강북구 수유1동 486-810 청화타운 9동 302호
박재봉
강원도 춘천시 요선동 200 한신휴플러스아파트 106-1001
(74) 대리인
구현서

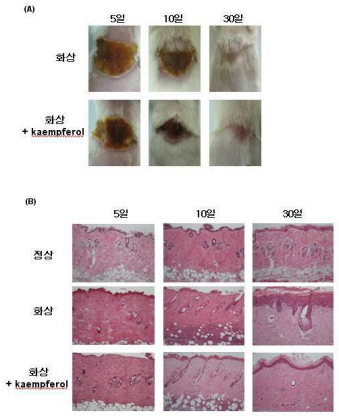
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 캠퍼롤을 유효성분으로 포함하는 화상 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 캠퍼롤(kaempferol)을 유효성분으로 포함하는 화상치료용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A084589
부처명	보건복지가족부
연구사업명	보건의료기술연구개발사업 병원특성화 연구센터
연구과제명	화상의 진행 단계별 문제 해결을 위한 치료기술 개발
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2008. 11. 1 ~ 2010. 03. 31

특허청구의 범위

청구항 1

캠퍼롤을 유효성분으로 함유하는 세포 비독성 화상 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 캠퍼롤의 유효량은 1~200 μg/kg 체중인 것을 특징으로 하는 세포 비독성 화상 치료 또는 예방용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 캠퍼롤을 유효성분으로 하는 화상 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 보건복지 가족부의 보건의료기술연구개발사업 병원특성화 연구센터 사업의 일환으로 수행된 연구로부터 도출된 것이다.[과제 고유번호 A084589, 과제명 : 화상의 진행 단계별 문제 해결을 위한 치료기술 개발]

배 경 기 술

[0003] 일반적으로 플라보노이드는 자연계에 가장 많이 존재하는 폴리페놀계 화합물이다. 폴리페놀계의 프라보노이드의 기본구조는 단일 프라보놀, 프라보놀, 플라보논, 플라본을 포함하는 다이페닐프로판 골격을 가지고 있다 (Chen, CC., *et al., Mol. Pharmacol.* 66:683-693, 2004; Lotito, SB. and Frei, B., *J. Biol. Chem.* 281:37102-37110, 2006). 다양한 플라보노이드들은 항산화기능, 항염증기능, 세포신호전달 단백질의 저해 효능등의 다양한 생물학적 기능을 가지고 있다 (Comalada, M., *et al., Biochem. Pharmacol.* 72:1010-1021, 2006; Fang, SH *et al., Bioorg. Med. Chem.* 13:2381-2388, 2005). 이와 같은 플라보노이드들의 다양한 생물학적기능은 암, 심혈관질환, 자가면역질환, 감염질환등의 치료제로 이용할 수 있는 가능성이 있어 주목받게 되었다 (Kempuraj, D., *et al., Br. J. Pharmacol.* 145:934-944, 2005; Pang, JL, *et al., Biochem. Pharmacol.* 71:818-826, 2006). 그러나 아직까지 플라보노이드의 생물학적기능을 나타내는 작용기전에 대한 정확한 기전은 규명되지 않았다.

[0004] TNF-α는 활성화된 대식세포, 리프구, 내피세포, 비만세포등에서 생산되는 염증반응과 관련된 싸이토카인이다 (Bradley, JR. *J. Pathol.* 214:149-160, 2008; Rahman, M. M. and McFadden, G, *PLoS Pathog.* 2:66-77, 2006). TNF-α의 과대생산은 류마티스관절염, 건선, 크론병, 천식과 같은 알러지성 질환의 발병과 관계가 깊다 (Kim, HJ., *et al., Exp. Mol. Med.* 40:167-175, 2008; Muppidi, JR, *et al.,* 4:461-465, 2004; Palladino, MA *et al., Nat. Rev. Drug Discov.* 9:736-746, 2003). TNF-α는 TNF-α 수용체를 통한 신호전달을 통하여 전사인자인 NF-κB를 활성화하는 것으로 밝혀졌다 (Zhang, G., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:154-160, 2004; Karin, M and Greten FG., *Nat. Rev. Immunol.* 10:749-759, 2005). TNF-α에 의한 NF-κB의 활성화를 억제하기 위하여 항산화효능을 가진 플라보노이들 이용하는 연구가 수행되었다 (Park, JS., *et al., J. Agric. Food Chem.* 54:2951-2956, 2006; Samhan-Arias, AK *et al., Free Radic. Biol. Med.* 37:48-61, 2004). 그러나 NF-κB의 활성화를 억제하는 플라보노이드의 기전은 아직까지 정확하게 규명되지 않았다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 화상 치료용 플라보노이드를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0006] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 캠퍼롤을 유효성분으로 포함하는 화상 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 캠퍼롤의 유효량은 1~200㎍/kg 체중인 것을 특징으로 하는 세포 비독성 화상치료용 조성물. 상기 유효량은 본 발명의 실시예 4 및 도 4의 a)에서 알 수 있는 바와 같이 세포 독성이 없는 범위(약 10~200㎛M)를 kg체중 당 ㎍으로 실험을 통하여 환산한 값이다.

[0008] 본 발명의 조성물은 당업자에게 알려진 방법에 의하여 투여될 수 있다. 투여 형태는 장(경구)투여, 장관외(정맥내, 피하 및 근육내) 투여 및 국부 용도를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 따르는 치료 방법은 합성물, 천연물 또는 이들의 배합물 등의 단일 원료 또는 복합 원료로부터 얻은 캠퍼롤을 치료하는데 유효한 양으로 이들을 필요로 하는 환자들에게 내부로 또는 국부적으로 투여하는 방법을 포함하여 이루어진다.

[0009] 본 발명은 본 발명에 따른 화합물을 함유하는 식물로부터 얻은 캠퍼롤을 분리하고 정제하기 위한 향상된 방법을 포함한다. 본 발명의 방법은 캠퍼롤을 함유하는 식물로부터 추출물을 추출하는 방법; b) 상기 방법으로 추출한 추출물을 중화 및 농축하는 방법; 및 c) 상기 중화 및 농축한 추출물을 정제하는 방법을 포함하여 이루어진다. 본 발명의 바람직한 실시예에서 추출물은 재결정, 침전, 용매상 분리(solvent partition) 및/또는 크로마토그래피 분리로 이루어진 군으로부터 선택된 방법을 이용하여 정제된다. 본 발명은 바람직한 생리학적 활성을 갖는 캠퍼롤의 분리 및 정제를 위하여 상업적으로 수행 가능한 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명에서 "치료"란 용어는 치료 및 예방을 포함한다. 인간뿐만 아니라 동물에 사용되었을 때의 "치료"를 의미한다.

[0011] "약제학적 또는 치료학적 유효량(Pharmaceutically or therapeutically effective dose or amount)은 바람직한 생물학적 결과를 유도하기에 충분한 투여량을 의미한다. 그러한 결과는 징후, 증상 또는 질병의 원인의 경감 또는 생물학적 시스템의 원하는 다른 변화일 수 있다.

[0012] 제약의 형태로 투여하기 위한 제품의 제조는 당업자에게 잘 알려진 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있다. 캠퍼롤은 천연 재료의 형태인 허브 파우더; 다양한 농도의 용매 및/또는 초임계 유체 추출물; 재결정, 칼럼 분리, 용매상 분리, 침전 및 다른 방법을 통하여 농축 및 정제된 화합물; 합성에 의하여 제조된 것으로 충분히 정제된 캠퍼롤을 함유하는 단일물 및/또는 혼합물로 제제화될 수 있다.

[0013] 종래 알려진 다양한 운반 시스템이 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 수용액, 리포좀(liposomes)에 의한 캡슐, 미립자 및 미소캡슐 등이다.

[0014] 약제 투여 방법으로는 동맥주사, 흡입성 분무제, 경구적으로 활성인 제제, 경피성 전리요법 또는 좌약과 같은 효과적 투여 방법을 들 수 있으나, 본 발명의 약제학적 조성물은 피부에 도포, 흡입성 분무제 또는 주사에 의한 비경구적 방법으로 투여될 수 있다. 바람직한 운반체로는 생리 염수를 들 수 있으나, 다른 약제학적으로 허용될 수 있는 운반체들도 사용될 수 있을 것이다. 바람직한 실시예로서,

[0015] 운반체 및 캠퍼롤이 생리적으로 융화되어 서서히 방출되는 제제를 구성하는 것을 들 수 있다. 상기 운반체에서 주요 용매는 본래 수용성 또는 비수용성일 수 있다. 게다가, 운반체는 약제의 pH, 삼투압, 점성, 투명성, 색, 무균성, 안정성, 용해율 또는 향을 조절하거나 유지하기 위하여 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 유사하게, 운반체는 안정성, 용해율, 리간드의 방출 또는 흡착을 조절하거나 유지하기 위하여 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 상기 부형제들로는 단일 약제 또는 복합 약제 형태의 비경구 투여용 약제로 제제화하기 위하여 통상적으로 사용되는 물질들이다.

[0016] 치료용 조성물이 제제화되면, 용액, 현탁액, 겔, 유화제, 고체 또는 탈수된 파우더 또는 동결 건조된 파우더 형태로 살균 바이알(vials)에 저장되거나; 또는 경구 투여용 다른 불활성 운반체들과 함께 직접 캡슐화 및/또는 알약(tablete) 형태로 될 수 있다. 이러한 제제들은 투여되기 전에 바로 사용할 수 있는 형태이거나 물에 타서 사용할 수 있는 분말의 형태로 저장될 수 있다. 전신 운반용 조성물을 함유하는 제제를 투여하는 방법은 장, 피하, 근육내, 정맥내, 비경, 질 또는 직장을 통하여 투여된다.

[0017] 본 발명의 화상을 치료하는 데 유효한 조성물의 양은 화상 정도 또는 이상 증상의 성질에 따라 좌우되며, 표준적인 임상기술에 의해 결정될 수 있다. 게다가, 최적의 투여량 확인을 위하여 생체밖 또는 생체내의 분석이 선택적으로 이용될 수 있다. 제제로 투여되는 정확한 양은 투여 경로, 질병 또는 이상 증상의 심각성이나 진전에

따라 좌우되며, 의사와 환자의 상황에 따라 결정된다. 유효한 투여량은 생체밖 또는 동물 모델 테스트 시스템으로부터 유도되는 투여량에 따른 반응 곡선으

[0018] 로부터 외삽하여 추정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 유효한 투여량은 본 발명 조성물을 등급화 된 양으로 투여하여 원하는 효과를 관찰함으로써 쉽게 결정된다.

[0019] 본 발명에 따른 치료 방법은 단일한 원료 또는 복합적 원료로부터 얻은 캠퍼롤 단독 및/또는 복합적인 혼합물을 치료학상으로 유효한 양으로 필요로 하는 환자의 내부에 또는 국부에 투여하는 것을 포함하여 이루어진다. 다수의 캠퍼롤 단독 및/또는 혼합물의 순도는 0.01 내지 100% 범위 내에 포함되지만, 이에 한정되지 않으며, 화합물을 얻기 위하여 사용되는 방법에 의존한다.

[0020] 바람직한 실시예에서 캠퍼롤을 함유하는 약제 조성물의 투여량은 체중의 0.001 내지 200mg/kg 체중, 바람직하게는 1~200μg/kg 체중의 범위 내에서 선택된 양으로 투여하는 것이 유효하고 비독성적이다. 일상적인 임상 테스트를 이용하는 당업자들은 치료되어야 할 개개의 질병에 따라 최적의 투여량을 결정할 수 있다.

[0021] 본 발명의 캠퍼롤을 포함한 조성물은 기술분야에서 공지된 임의의 적합한 투여 방법으로도 투여될 수 있다. 본 발명의 캠퍼롤은 스팀 또는 스프레이로서 상기도에 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 캠퍼롤은 에어로졸화(aerosolization), 분무화 (nebulization) 또는 미립자화 (atomization)에 의해서 투여될 수 있다. 본

[0022] 발명의 캠퍼롤이 에어로졸화, 분무화 또는 미립자화에 의해 투여되는 경우, 이것은 약 1 마이크로미터 내지 약 10 마이크로미터 범위의 직경을 갖는 소적의 형태로 투여된다. 에어로졸화, 분무화 및 미립자화에 유용한 방법 및 장치는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 의료 분무기는 투여자에 의한 흡입을 위한 흡기 스트림 내로 계량된 용량의 생리학적으로 활성인 액체를 전달하기 위해 사용되어 왔다 (예를 들어, 미국 특허 6,598,602 참조). 의료 분무기는 흡기와 함께 에어로졸을 형성하는 액체 소적을 생성시키도록 작동할 수 있다. 다른 환경에서, 의료 분무기는 투여자에게 적합한 습윤 함량을 갖는 기체를 공급하기 위해 물 소적을 분사하기 위해 사용될 수 있고, 이것은 흡기 스트림이 기계적인 호흡 보조기, 예를 들어 호흡기, 인공호흡기 또는 마취 전달 시스템에 의해 제공되는 경우에 특히 유용하다.

[0023] 예시적인 분무기는 예를 들어 마우스피스를 통해 투여자의 흡입에 의해 생성되는 통과하는 공기 스트림 (흡기 스트림) 내로 의료용 액체의 소적을 분사하도록 작동되는 핸드 헬드 장치를 설명하고 있는 WO 95/01137에 설명되어 있다. 다른 예는 호흡 부전 환자에게 호흡 제어 및 증대를 제공하고 의약 액체 입자를 환자의 기도 및

[0024] 폐의 폐포 내로 전달하기 위한 분무기를 포함하는 양압 인공호흡기 시스템을 설명하고 있는 미국 특허 5,388,571에서 볼 수 있다. 미국 특허 5,312,281에는 낮은 온도에서 물 또는 액체를 미립자화시키고 보고된 바에 의하면 미스트의 크기를 조정할 수 있는 초음파 분무기가 기재되어 있다. 또한, 미국 특허 5,287,847은 신생아, 소아 및 성인에게 의약 에어로졸을 전달하기 위한 것으로, 측정가능한 유속 및 배출 (output) 용적을 갖는 공기역학적 분무 설비를 기술하고 있다. 추가로, 미국 특허 5,063,922에는 초음파 미립화기 (ultrasonicatomizer)가 기술되어 있다.

[0025] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0026] 본 발명에서 본 발명자들은 플라보노이드인 캠퍼롤이 HEK 293 세포에서 TNF-α 자극에 의해 발현되는 IL-8의 발현을 효과적으로 억제함을 연구하였다. 본 발명자들은 캠퍼롤은 다른 플라보노이드들과 달리 세포독성이 없음을 확인하였다. 캠퍼롤은 TNF-α의 자극에 의해 생산되는 활성산소의 생산을 억제하였으며, IκBα의 분해 및 NF-κB의 활성화를 억제함을 관찰하였다. 본 발명에서 본 발명자들은 kampeferol 이 염증반응이 유발된 화상피부조직에서 염증반응을 억제하여 화상을 치료하는 효능이 있음을 확인하였다.

효 과

[0027] 본 발명자들은 여러종류의 플라보노이드들중에서 캠퍼롤이 세포독성이 없으며, TNF-α에 의한 염증반응을 억제함을 확인하였으며, 또한 화상이 유발된 피부조직에 캠퍼롤을 처리하였을 때, 화상조직에서 치료효능이 있다는 것을 보였다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0029] 단 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 목적으로 기재된 것이지, 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0030] 실시예 1: 플라보노이드들이 TNF-α에 의한 IL-8 발현을 억제하는 효능 분석

[0031] 1) IL-8 프로모터-*Luc* 리포터 플라스미드의 제작

[0032] IL-8 프로모터 영역 (-135 bp에서 +46 bp 까지)을 증폭하기 위하여, 인간 게놈 DNA를 주형으로 하고 다음과 같은 프라이머 셋트를 이용하여 PCR을 수행하였다.

표 1

[0033]

5' primer (서열번호 1)	5'- GTGAGATCTGAAGTGTGATGACTCAGG-3'
3' primer (서열번호 2)	5'- GTGAAGCTTGAAGCTTGTGTGCTCTGC-3'

[0034] 표 1은 IL-8 프로모터 영역에 대한 프라이머이다.

[0035] 상기 증폭된 IL-8 프로모터 영역 단편을 *Bgl*Ⅱ 및 *Hin*dⅢ로 절단된 pGL3-Basic 플라스미드(Promega)에 삽입하였다. 이렇게 하여 IL-8 프로모터-*Luc* 리포터 플라스미드를 제조하였다(Wu G. D. *et al., J. Biol. Chem.*,272:2396-2403, 1997).

[0036] 2)프로모터 활성화 분석:루시퍼라제 활성 어세이

[0037] HEK 293세포(ATCC, Rockviller, MID)를 $5X10^4$ cells/well의 농도로 12-웰 플레이트에 분주하여 37 ℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 상기 1)에서 제조한 IL-8 프로모터-*Luc* 리포터 플라스미드와 pRL-null 플라스미드 (Promega)로 공동-형질감염(co-transfection)시켰다. 이후, 37 ℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 플라보노이드들(10, 20, 40, 80 μM/well)을 각 웰에 처리하고, 37 ℃, 5% CO_2 배양기에서 1시간 동안 배양하였고, TNF-α (5 ng/ml)를 처리하고 8시간 동안 배양하였다. 이 때 대조군에는 PBS를 처리하였다. 이후, 듀얼-루시퍼라제 리포터 어세이 시스템(Dual-luciferase reporter assay system, Promega)의 PLB(passive lysis buffer)을 100 ㎕/well의 농도로 각 웰에 첨가하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 원심분리하고 얻은 상층액(15 ㎕)을 이용하여 루시퍼라제 어세이를 수행하였다. 루시퍼라제 활성은 TD-20/20(Turner designs) 루미노미터(luminometer)를 사용하여 측정하였다. TNF-α의 처리에 따른 각 프로모터의 활성은 대조군에 대한 상대적인 활성으로 나타내었다. 즉, 대조군의 활성을 '1'로 하여 이에 대한 활성화 배수(fold activation)로 나타내었다.

[0038] 3) RT-PCR

[0039] HEK 293 세포에 캠퍼롤을 전처리하고 TNF-α를 처리한 후 IL-8의 발현은 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. TRIzol(Invitrogen)을 이용하여 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 이후, 총 RNA(5 ㎍)에 M-MLV 역전사 효소(invitrogen)를 처리하여 cDNA를 제조하였다. 이렇게 제조한 cDNA를 주형으로 하고 IL-8의 다음과 같은 특이적인 프라이머 셋트를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

표 2

[0040]

정방향 프라이머(서열번호 3)	5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3'
역방향 프라이머(서열번호 4)	5'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT-3'

[0041] 표 2는 IL-8에 대한 프라이머 서열이다.

[0042] PCR 증폭은 95℃에서 30초 동안 DNA 변성 57℃에서 40초 동안 프라이머 어닐링 및 72 ℃에서 1분 동안 연장을 한 싸이클로 하여 총 25회 반복 수행하였다. PCR 반응이 완료된 후, 1% 아가로스 겔에서 증폭된 PCR 산물을 확인하였다.

[0043] 실시예 2: 플라보노이드들이 TNF-α에 의한 IκBα 분해 및 NF-κB 활성화 저해 효능 분석

[0044] 1) 웨스턴 블럿팅

[0045] TNF-α의 자극에 의해 IκBα가 분해되고, 플라보노이드들의 전처리에 의해 IκBα의 분해가 억제되는 것을 웨스턴 블럿팅을 통하여 확인하였다. 동량의 단백질들을 12.5% SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동으로 분리하고, 폴리비닐리딘 후로라이드 막(Millipore, Bedford, MA)으로 일렉트로트랜스퍼하였다. 막들을 1시간 동안 상온에서 0.05% 트윈 20과 2% 소 혈청 알부민을 함유한 트리스-버퍼 식염수로 블록킹하고 2시간 동안 항-IκBα 항체 또는 항-phospho-IκBα 항체로 배양하였다. 면역반응성(Immunoreactive) 단백질들은 양고추냉이 퍼옥시데이즈-결합된 2차 항체(Jackson ImmunoResearch Laborities, *Inc.*, West Grove, PA) 및 인헨스된 케미루미니센스 시약(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)에 의하여 검출하였다.

[0046] 2) 공초점 현미경

[0047] TNF-α의 자극에 의해 NF-κB가 활성화되고, 플라보노이드들의 전처리에 의해 NF-κB의 활성화가 억제되는 것을 공초점 현미경을 통하여 확인하였다. 본 발명자들은 전에 Kwon, H. J., 외 (2003). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311,** 129-138에 기재된 것과 같이 공초점 현미경을 사용하여 NF-κB p65를 검출하였다. HEK 293 세포들(5×10^4)을 직접적으로 24-웰 플레이트 내의 유리 커버슬립에서 배양하였다. 24시간 후, 1시간 동안 플라보노이드들을 전처리하고 TNF-α를 30분 동안 처리한 후, 그 세포들을 상온에서 10분간 PBS 내의 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 세포 핵을 동정하기 위하여, 본 발명자들은 DNA 염색(0.5 mg/ml Hoechst No. 33258; Sigma, St. Louis, MO)을 사용하였다. 커버슬립들을 Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)내에 장착하였다. 샘플들을 Plan-Apochromat 100X/Oil DIC 오브젝티브(Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 Axiovert 100 현미경에 부착된 Zeiss LSM 510 레이져 스캐닝 공초점 장치로 스캔하였다.

[0048] 실시예 3: 플라보노이드들이 TNF-α에 의한 활성산소 생산 저 효능 분석

[0049] TNF-α의 자극에 의해 활성산소가 생산되고, 플라보노이드들의 전처리에 의해 활성산소 생산이 억제되는 것을 공초점 현미경을 통하여 확인하였다. 산화-민감성 형광탐침인 dihydrorhodamine 123 을 이용하여 세포내 활성산소를 측정하였다.

[0050] 실시예 4: MTT assay

[0051] HEK 293 세포를 $1X10^4$개/웰로 접종하고, 플라보노이드들을 0-160 μM 처리하고 48시간 동안 일정한 시간간격으로 배양하면서 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 통하여 세포 생존율을 관찰하였다. MTT 용액(0.2 mg/ml in DMSO) 를 각 웰에 넣고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에 4 시간동안 배양하였다. 배양액을 버리고 MTT 반응에 의해 세포에 형성된 formazan crystal blue 를 DMSO로 녹였다. Formazan의 양을 microplate reader를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0052] 실시예 5: 캠퍼롤의 화상치료효능 분석

[0053] 1) 마우스에서 화상 유발

[0054] 6주령이 된 BALB/c 마우스의 등 부위를 깨끗하게 제모하고, 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 마취한 후, 마우스 등 부위에 플라스틱판을 대고 100℃의 물에 8초 동안 피부를 적셨다.

[0055] 2) 피부조직 분석

[0056] 화상유발 1시간 후부터 12시간 간격으로 마우스당 100 μg/kg 체중 마우스의 캠퍼롤을 도포하여주었다. 화상 유발 후 5일, 10일, 30일 후에 마우스를 마취한 후, 화상 부위의 피부를 2 mm punch를 이용하여 생검하였다. 4% 포말린용액에 고정한 후, 파라핀으로 채우고 4 μm의 두께로 잘랐다. 조직을 hematoxylin-eosin을 이용하여 염색하여 관찰하였다.

[0057] 3) RT-PCR

[0058] 마우스 피부조직에서 TNF-α의 발현은 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. TRIzol(Invitrogen)을 이용하여 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 이후, 총 RNA(5 ㎍)에 M-MLV 역전사 효소(invitrogen)를 처리하여 cDNA를 제조하였다. 이렇게 제조한 cDNA를 주형으로 하고 TNF-α의 다음과 같은 특이적인 프라이머 셋트를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

표 3

[0059]

정방향 프라이머(서열번호 5)	5'-TCT CAT CAG TTC TAT GGC CC-3'
역방향 프라이머(서열번호 6)	5'-GGG AGT AGA CAA GGT ACA AC-3'

[0060] 표 3은 TNF-α에 대한 프라이머 서열이다.

[0061] PCR 증폭은 95℃에서 30초 동안 DNA 변성 57℃에서 40초 동안 프라이머 어닐링 및 72 ℃에서 1분 동안 연장을 한 싸이클로 하여 총 25회 반복 수행하였다. PCR 반응이 완료된 후, 1% 아가로스 겔에서 증폭된 PCR 산물을 확인하였다.

[0062] 상기 실시예의 결과는 다음과 같다.

[0063] 플라보노이드 (kaempferol, quercetin, fisetin, chrysin) 들은 TNF-α의 자극에 의해 발현되는 IL-8의 생산을 감소함을 확인할 수 있었다. 플라보노이드들은 농도의존적으로 TNF-α에 의한 IL-8의 프로모터활성화를 저해함을 루시퍼레이즈어세이를 통하여 확인할 수 있었다 (도 1a). Fisetin 과 chrysin에 의한 IL-8 프로모터 활성화 저해 정도가 가장 높았다. 또한 플라보노이드들은 TNF-α에 의한 IL-8의 mRNA 발현을 저해함을 RT-PCR을 통하여 확인할 수 있었다 (도 1c).

[0064] TNF-α는 TNF-α 수용체를 자극하여 IκBα를 인산화시켜 IκBα를 분해시키며, NF-κB가 활성화 되어 핵으로 이동하게 된다. 플라보노이드들을 전처리한 후, TNF-α를 처리하게 되면, IκBα의 인산화 및 IκBα의 분해가 저해됨을 관찰할 수 있었다 (도 2a). 또한 플라보노이드들의 전처리에 의해 TNF-α에 의한 NF-κB의 활성화가 억제됨을 공초점현미경으로 관찰할 수 있었다 (도 2b). TNF-α는 활성산소의 생산을 증가 시켜서 NF-κB를 활성화 시킨다는 사실이 보고되어었다. 이와같은 활성산소의 생산을 플라보노이드들이 억제함을 산화-민감성 형광탐침인 dihydrorhodamine 123 을 이용하여 확인할 수 있었다 (도 3).

[0065] 본 발명에 이용한 플라보노이드들이 세포독성을 유발시키는지 MTT assay를 통하여 확인한 결과 quercetin, fisetin, chrysin은 농도의존적으로 HEK 293의 세포 생존을 억제함을 관찰할 수 있었다. 반면에 캠퍼롤은 HEK 293 세포의 생존에 영향을 주지 않았다 (도 4).

[0066] 100 ℃의 물을 마우스 피부에 노출하게 되면 피부조직에 화상이 발생하면서 피부조직의 이상이 발생된다. 화상유발후에 피부조직의 진피층에 염증세포들이 10일후에 많이 모여들고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 30일 후에 각질형성세포층에 두껍게 형성됨을 확인할 수 있었다. 반면에 화상을 유발 시킨 후 캠퍼롤을 12시간 간격으로 100 ㎍/kg 체중 마우스 씩 도포해주면, 피부조직으로 염증세포들이 이동되는 것이 억제 되었으며, 각질형성세포층도 정상의 마우스 피부조직과 유사하게 됨을 관찰하였다 (도 5B).

[0067] 100 ℃의 물을 마우스 피부에 노출하게 되면 피부조직에 화상이 발생하면서 10일 후에 TNF-α의 발현이 증가함을 RT-PCR을 통하여 확인할 수 있었다. 화상을 유발 시킨 후 캠퍼롤을 12시간 간격으로 100 ㎍/kg 체중 마우스 씩 도포해주면, 10일 후에 피부조직에서 TNF-α의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다 (도 6).

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1a는 플라보노이드들이 IL-8 프로모터를 활성화가 TNF-α에 의해 유도되는 과정에 미치는 영향을 루시퍼레이즈어세이를 통하여 HEK 293 세포에서 확인하였다. kaempferol, quercetin, fisetin, chrysin이 TNF-α에 의한 IL-8 프로모터의 활성화를 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다. 도 1b는 HEK 293 세포에 TNF-α를 처리하였을 때, IL-8의 발현이 증가함을 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 도 1c는 HEK 293 세포에 kaempferol, quercetin, fisetin, chrysin을 40 ㎛씩 1시간 동안 전처리하고 TNF-α를 표시된 시간동안 처리하였을 때, IL-8의 발현이 플라보노이드에 의해 영향을 받음을 RT-PCR을 통하여 확인하였다.

[0069] 도 2a는 HEK 293세포에 TNF-α를 처리하면 IκBα가 인산화되고 분해되는데, 플라보노이드들을 전처리하게 되면 IκBα의 인산화 및 분해가 억제됨을 웨스턴블롯팅으로 확인하였다. 또한 도 2b에서는 HEK 293세포에 TNF-α를 처리하면 NF-κB가 활성화되어 핵으로 이동하게 되는데, 플라보노이드들을 전처리하게 되면 NF-κB의 활성화가 억제됨을 공초점 현미경으로 확인하였다.

[0070] 도 3은 HEK 293세포에 TNF-α를 처리하면 활성산소가 생산됨을 산화-민감성 형광탐침인 dihydrorhodamine 123을 이용하여 공초점 현미경으로 확인하였고, 플라보노이드들을 전처리하게 되면 활성산소의 생산이 억제됨을 공초점 현미경으로 확인하였다.

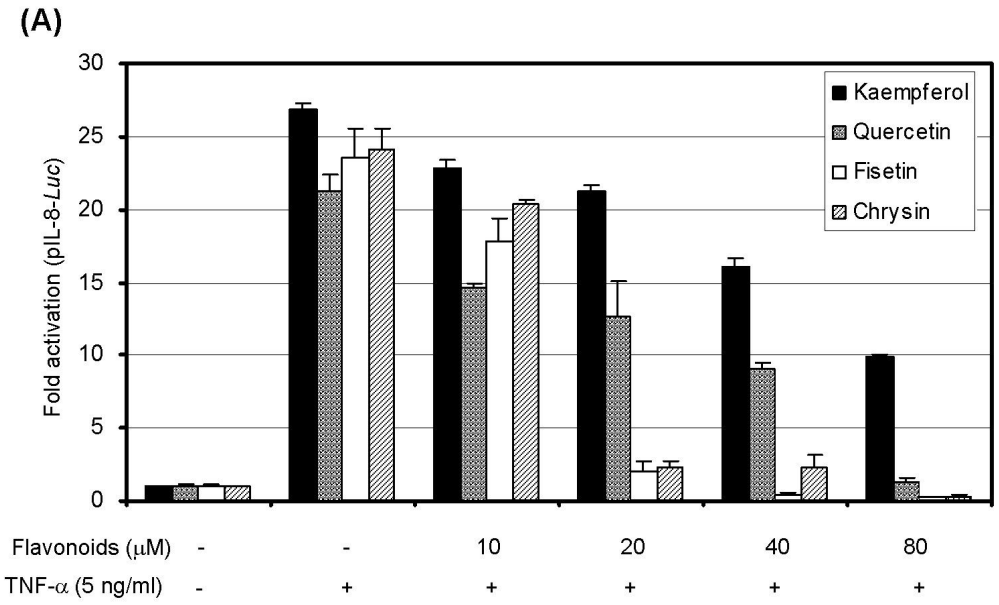
[0071] 도 4는 HEK 293 세포에 kaempferol (A), quercetin (B), fisetin (C), chrysin (D)을 10-160 μM씩 각각 처리하고 48시간동안 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 통하여 세포생존율을 관찰한 결과 여러 플로보노이드들 중에 유일하게 캠퍼롤이 세포에 독성이 없음을 확인하였다.

[0072] 도 5A는 BALB/c 마우스의 등 부위를 깨끗하게 제모하고, 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하고, 마취한 후, 마우스 등 부위에 플라스틱판을 대고 100℃의 물에 8초 동안 피부를 적셨다. 화상 유발 1시간 후에 12시간간격으로 캠퍼롤을 도포하여 30일 동안 육안으로 피부조직을 관찰한 결과이다. 도 5B는 100 ℃의 물을 마우스 피부에 노출하게 되면 피부조직에 화상이 발생하면서 피부조직에 염증반응이 발생됨을 보여주고 있다. 반면에 화상을 유발 시킨 후 캠퍼롤을 12시간 간격으로 100 μg/kg 체중 마우스 씩 도포해주면, 피부조직으로 염증세포들이 이동되는 것이 억제 되었으며, 각질형성세포층도 정상의 마우스 피부조직과 유사하게 됨을 관찰하였다.

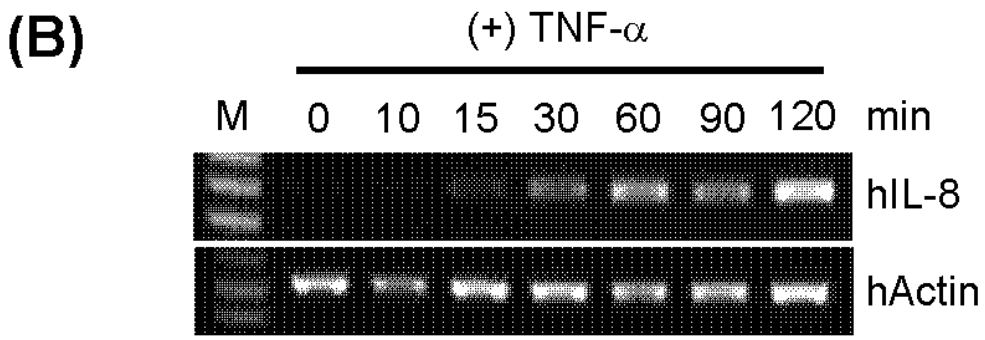
[0073] 도 6은 BALB/c 마우스의 등 부위에 화상 유발 1시간 후에 12 시간간격으로 캠퍼롤을 도포하여 5일, 10일, 30일 후에 피부조직을 취하였다. 피부조직에서 RNA를 분리하여 TNF-α의 발현을 RT-PCR을 통하여 확인하였다.

도면

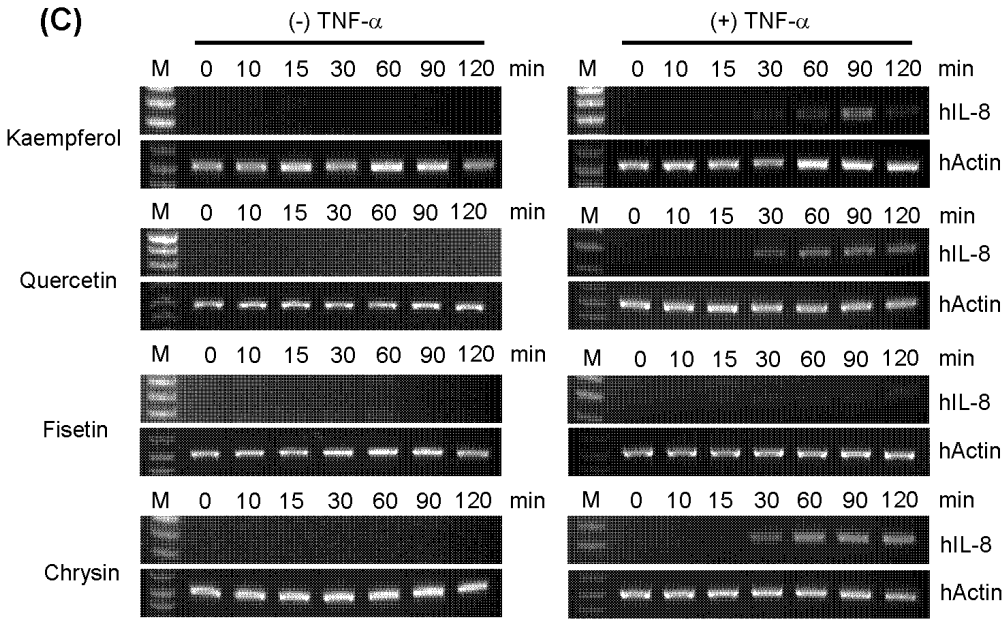
도면1a



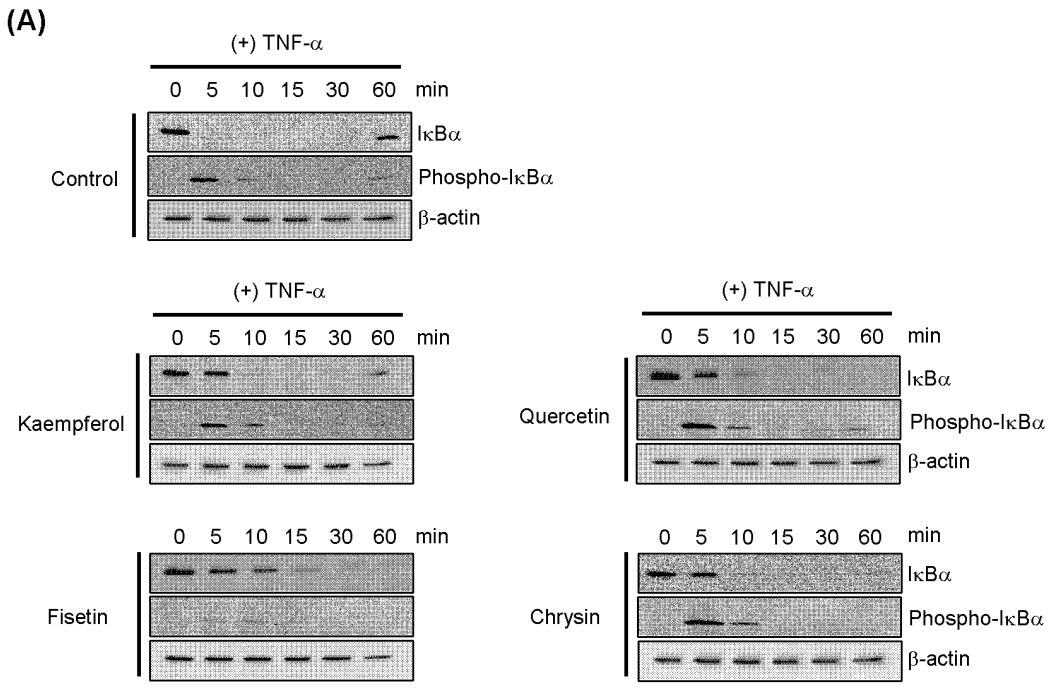
도면1b


(B)
(+) TNF-α
M 0 10 15 30 60 90 120 min
hIL-8
hActin

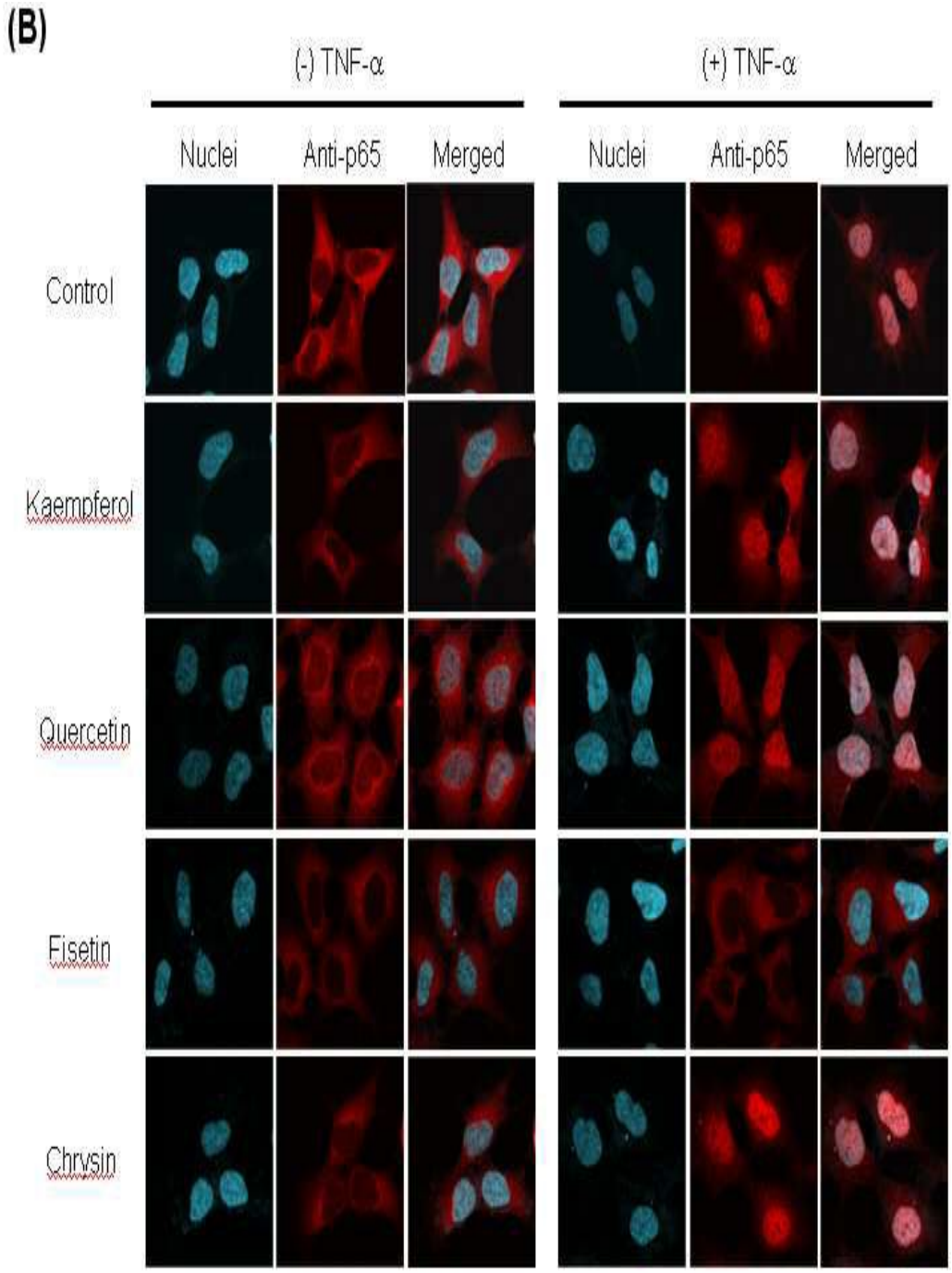
도면1c


(C)
(-) TNF-α
(+) TNF-α
M 0 10 15 30 60 90 120 min
Kaempferol
Quercetin
Fisetin
Chrysin
hIL-8
hActin

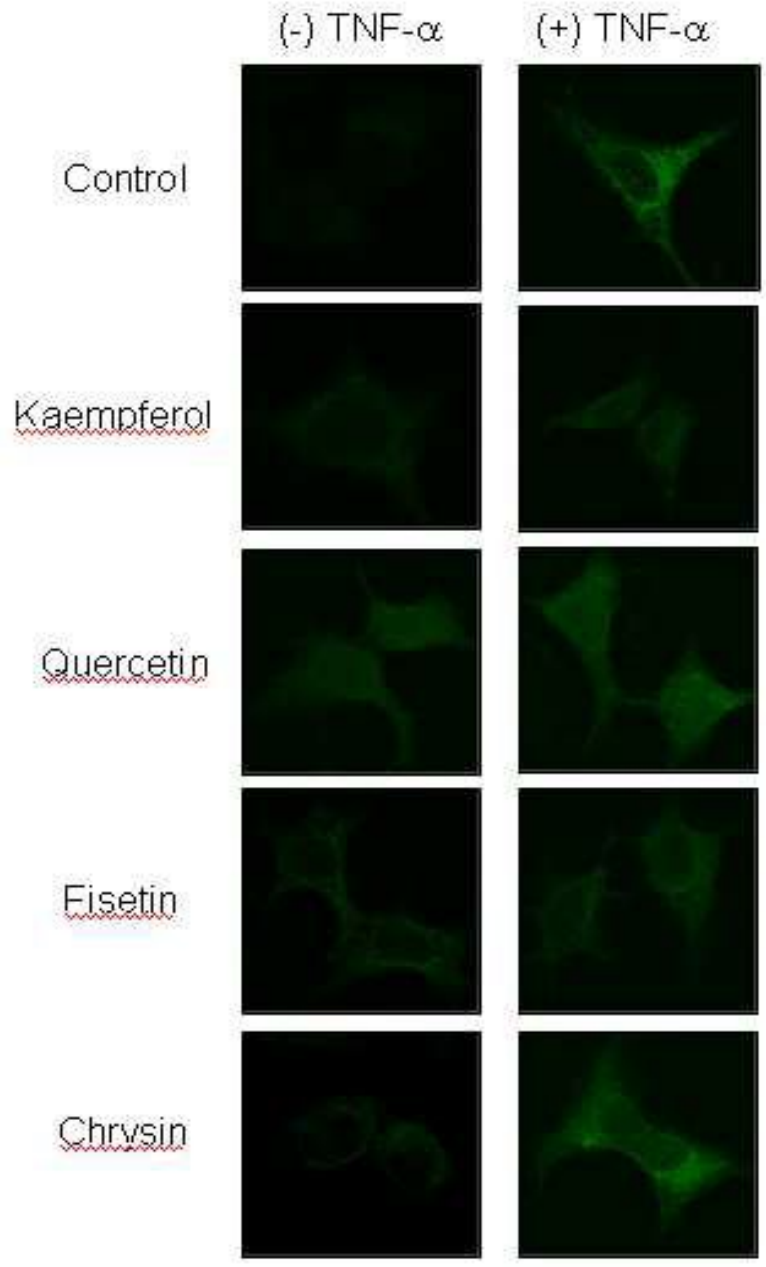
도면2a


(A)
(+) TNF-α
0 5 10 15 30 60 min
Control
IκBα
Phospho-IκBα
β-actin
(+) TNF-α
0 5 10 15 30 60 min
Kaempferol
(+) TNF-α
0 5 10 15 30 60 min
Quercetin
IκBα
Phospho-IκBα
β-actin
0 5 10 15 30 60 min
Fisetin
0 5 10 15 30 60 min
Chrysin
IκBα
Phospho-IκBα
β-actin

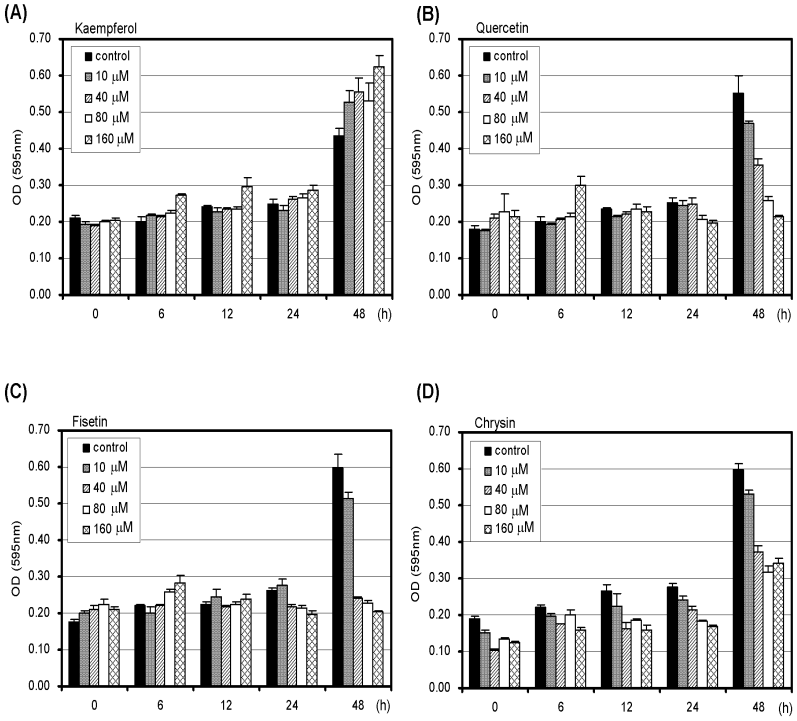
도면2b


(B)
(-) TNF-α
(+) TNF-α
Nuclei
Anti-p65
Merged
Nuclei
Anti-p65
Merged
Control
Kaempferol
Quercetin
Fisetin
Chrysin

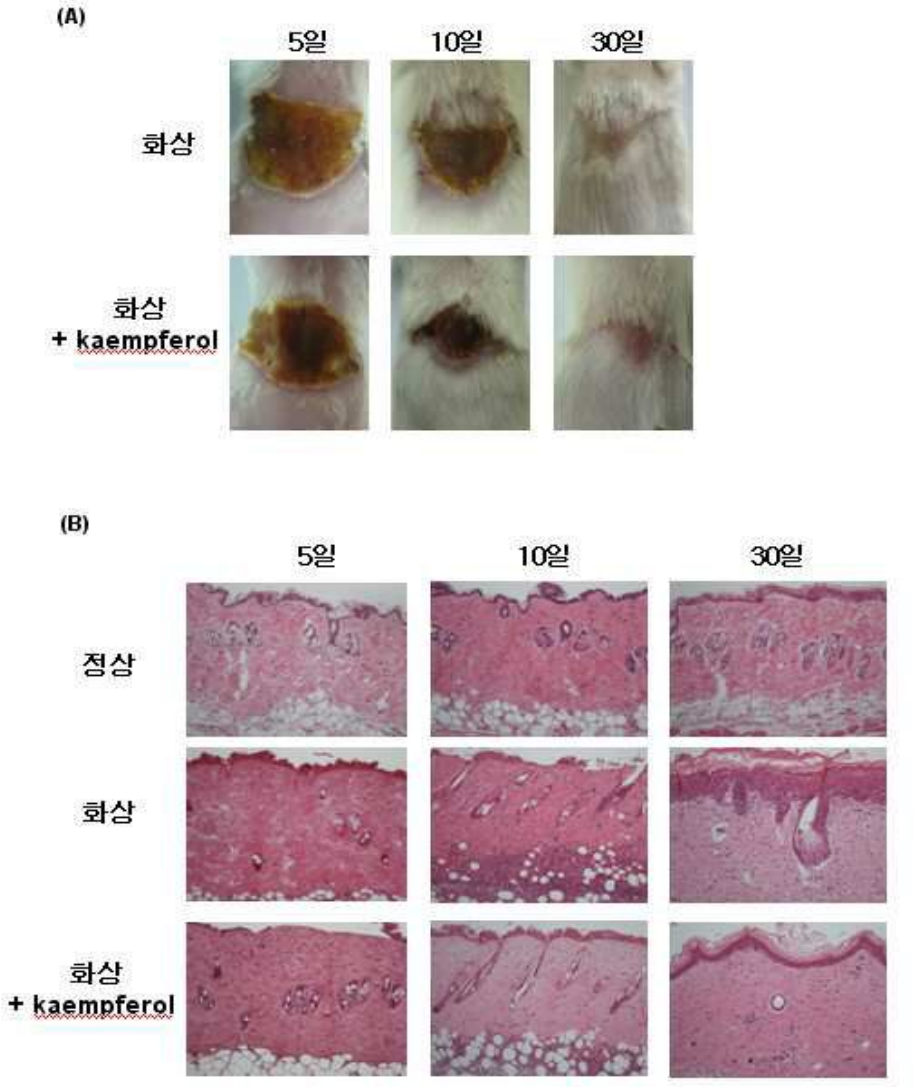
도면3



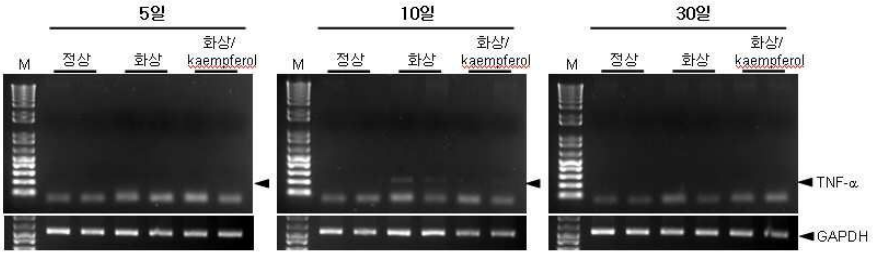
도면4


(A)
Kaempferol
(B)
Quercetin
(C)
Fisetin
(D)
Chrysin
control
10 μM
40 μM
80 μM
160 μM
OD (595nm)
0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0
6
12
24
48
(h)

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> Hallym University Industrial Academic Cooperation Foundation

<120> Composition for treating burn comprising kaempferol

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 1
gtgagatctg aagtgtgatg actcagg 27

<210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
gtgaagcttg aagcttgtgt gctctgc 27

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
atgacttcca agctggccgt ggct 24

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
tctcagccct cttcaaaaac ttct 24

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
tctcatcagt tctatggccc 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
gggagtagac aaggtacaac 20