



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0057691
(43) 공개일자 2021년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7048 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7048 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-0150153
(22) 출원일자 2020년11월11일
심사청구일자 2020년11월11일
(30) 우선권주장
1020190144434 2019년11월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
장형진
서울특별시 강남구 도곡로 306, 105동 1502호(도곡동, 래미안그레이튼)
정원석
서울특별시 성북구 길음로 16, 611동 1303호(길음동, 삼성래미안3차아파트)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

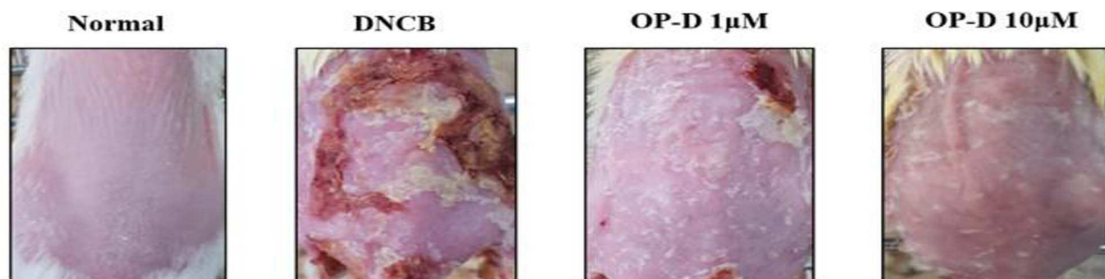
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 오피오포고닌-D를 포함하는 피부질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 피부질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 오피오포고닌-D 또는 이의 염을 포함하는 피부질환 예컨대 아토피피부염의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물, 화장품 조성물, 건강기능식품 조성물 및 의약품 조성물을 제공한다. 오피오포고닌-D가 비만 세포 활성화를 감소시키고, 피부가 두꺼워진 아토피피부염-유도 마우스의 피부 비후를 완하시키며, DNCB에 의해 증가 된 혈액 내 사이토카인 발현 수준을 감소 시키는 것을 확인하였으며, 따라서 오피오포고닌-D 또는 이의 염을 포함하는 조성물은 피부질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품, 화장품, 건강기능식품, 의약품에 널리 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345263730
과제번호	2017R1D1A1B03034345
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업/기본연구지원사업
연구과제명	천연물 선천성 경조증 치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.06.01 ~ 2020.05.31

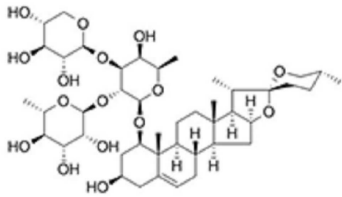
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 오피오포고닌-D (Ophiopogonin D, OP-D) 또는 이의 염을 포함하는, 피부질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 피부질환은 아토피피부염, 건선, 접촉성 알레르기 피부염, 과각화증, 어린선, 모공성 각화증, 광선각화증, 지루각화증, 천포창, 티눈, 사마귀, 평편태선 및 두드러기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-1 β , IFN- γ 및 IL-17으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 사이토카인을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 사이토카인의 억제는 MAPK (mitogen-activated protein kinases) 활성 또는 NF- κ B 전위를 완화시킴으로써 억제되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 피부 비후 (thickening)의 완화 또는 비만세포의 수를 저감시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

오피오포고닌-D (Ophiopogonin D, OP-D) 또는 이의 염을 포함하는, 피부질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 피부질환은 아토피피부염, 건선, 접촉성 알레르기 피부염, 과각화증, 어린선, 모공성 각화증, 광선각화증, 지루각화증, 천포창, 티눈, 사마귀, 평편태선 및 두드러기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 화장료 조성물.

청구항 8

오피오포고닌-D (Ophiopogonin D, OP-D) 또는 이의 염을 포함하는, 피부질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 피부질환은 아토피피부염, 건선, 접촉성 알레르기 피부염, 과각화증, 어린선, 모공성 각화증, 광선각화증, 지루각화증, 천포창, 티눈, 사마귀, 평편태선 및 두드러기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 10

오피오포고닌-D (Ophiopogonin D, OP-D) 또는 이의 염을 포함하는, 피부질환 의 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 피부질환은 아토피피부염, 건선, 접촉성 알레르기 피부염, 과각화증, 어린선, 모공성 각화증, 광선각화증, 지루각화증, 천포창, 티눈, 사마귀, 평편태선 및 두드러기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피부질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 오피오포고닌-D 또는 이의 염을 포함하는 피부질환 예컨대 아토피피부염의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물, 화장품 조성물, 건강기능식품 조성물 및 의약품 조성물을 제공한다.

배경 기술

[0002] 피부질환은 사람을 포함하는 동물의 피부에서 나타나는 모든 이상소견을 말한다. 피부는 신체의 표면을 덮고 있으므로 자외선, 물리화학적 자극과 같은 외부로부터의 여러 자극이나 여러 병원체에 직접 접촉될 기회가 많고, 체내로부터 영향을 받는다. 또한, 유전, 염증, 양성 및 악성 종양, 호르몬, 외상, 퇴행변성 등의 병적 변화에 영향을 받으므로 다양한 원인에 의하여 피부 질환이 유발된다.

[0003] 피부질환 중 하나인 아토피피부염 (Atopic dermatitis, AD)은 전세계적으로 20%의 유병률을 보이며 광범위하게 증가하고 있어 세계적인 문제로 인식되고 있다. 그 증상으로는 가려움증, 습진, 각화 과다증 등이 있으며 표피 면역과 관련된 두꺼워진 척수층을 갖는 소아와 성인 모두에서 발생할 수 있는 염증성 피부질환으로 알려져있다. 염증요인의 불균형 또는 외부자극에 의한 IgE의 과도한 생산으로 인해 피부장벽에서 아토피피부염이 유발될 수 있으며, 또한 T세포의 불균형이나 피부염 환자의 경우 Th1 세포 분화를 억제하는 IL-4 및 IL-5와 같은 헬퍼 T(Th)2 사이토카인의 분화 증가로 인해 발생할 수 있다.

[0004] 피부를 구성하는 세포 중 각질 세포는 Th2 사이토카인에 의해 자극을 받아 다양한 면역인자가 손상된 피부 부위에 침투된다. 종양 괴사 인자인 TNF- α 는 면역반응을 매개하는 면역 사이토카인으로 세포 표면의 수용체에 결합하고, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), 특히 extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38을 활성화시키고, NF- κ B 신호를 활성화한다.

[0005] 대부분의 아토피피부염 약물은 코르티코스테로이드 (corticosteroids)로 구성되며, 경구약물, 연고 및 자외선 광법 (UV phototherapy)형태가 일반적이다. 그러나 자외선 광법은 소요시간이 길고 코르티코스테로이드 약물은 피부감염과 같은 부작용을 일으킬 수 있다는 단점이 있다. 따라서 아토피피부염 치료를 개선할 수 있는 천연 화합물의 개발이 필요한 실정이다.

[0006] 한편, 소엽맥문동 (*Ophiopogon japonicas*)은 기관지염 및 천식과 같은 염증성 질환의 치료효과가 알려진 천연물로서 최근 항산화 및 항트롬빈 효과도 알려진바 있다. 오피오포고닌-D (Ophiopogonin D, OP-D)는 라디스 소엽맥문동 (*Radix Ophiopogon japonicas*)의 스테로이드의 배당체로 소엽맥문동 (*Ophiopogon japonicas*) 추출물에서 검출되며, 항염증 및 혈소판 응고 억제 효과가 있으나 아토피피부염의 치료 용도에 대해서는 밝혀진 바가 없어 이에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 오피오포고닌-D 처리에 따른 피부질환 치료 용도를 연구한 결과, 아토피피부염 유도 마우스 모델에 오피오포고닌-D를 처리하는 경우 인간 각질 세포주인 HaCaT 세포 내 특정 신호 경로를 통해 염증성 사이토카인의 발현을 저감함으로써 아토피피부염 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

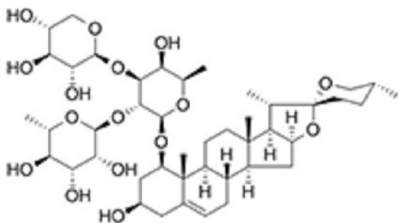
[0008] 이에, 본 발명은 오피오포고닌-D (Ophiopogonin D, OP-D) 또는 이의 염을 포함하는, 피부질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 화장료 조성물, 건강기능식품 조성물 및 의약품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 하기 화학식 1의 오피오포고닌-D (Ophiopogonin D, OP-D) 또는 이의 염을 포함하는, 피부질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 화장료 조성물, 건강기능식품 조성물 및 의약품 조성물을 제공한다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 피부질환은 아토피피부염, 건선, 접촉성 알레르기 피부염, 과각화증, 어린선, 모공성 각화증, 광선각화증, 지루각화증, 천포창, 티눈, 사마귀, 평편태선 및 두드러기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0015] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 조성물은 사이토카인 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-1 β , IFN- γ 또는 IL-17의 발현을 억제할 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 사이토카인의 억제는 MAPK (mitogen-activated protein kinases) 활성화 또는 NF- κ B 전위를 완하시킴으로써 억제될 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 피부 비후 (thickening)를 완하시키거나 비만세포의 수를 저감시킬 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명자들은 오피오포고닌-D가 비만 세포 활성화를 감소시키고, 피부가 두꺼워진 아토피피부염-유도 마우스의 피부 비후를 완하시키며, DNCB에 의해 증가 된 혈액 내 사이토카인 발현 수준을 감소 시키는 것을 확인하였으며, 따라서 오피오포고닌-D 또는 이의 염을 포함하는 조성물은 피부질환 예컨대 아토피피부염의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품, 화장품, 건강기능식품, 의약품에 널리 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

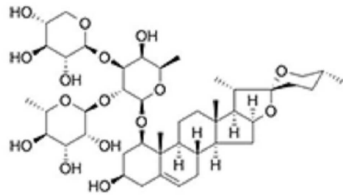
도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 HaCaT 세포에서 오피오포고닌-D 처리에 따른 사이토카인 mRNA 발현수준을 확인한 것으로, 도 1a는 MTT를 통해 오피오포고닌-D 처리 후 5시간이 지난 HaCaT 세포의 세포생존력을 확인한 것이고, 도 1b 내지 1d는 HaCaT 세포에 오피오포고닌-D를 4시간 동안 처리한 후 TNF- α 를 1시간 처리한 뒤 mRNA의 발현 수준을 RT-qPCR을 통해 검출한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 HaCaT 세포에서 오피오포고닌-D 처리에 따른 MAPK 경로 및 NF- κ B 전위 변화를 확인한 것으로, 도 2a는 웨스턴블랏을 통해 오피오포고닌-D로 4시간 처리한 후 15분 동안 TNF- α 처리된 HaCaT 세포의 신호전달 관련 단백질의 발현 수준을 확인한 것이고, 도 2b 및 2c는 이미지 J를 통해 p-ERK/ERK, p-p38/p38, I κ B- α / β -actin, p65/Lamin B의 비율을 확인한 것이고, 도 2d는 면역형광분석을 통해 TNF- α 에 의해 자극된 HaCaT 세포 내 핵 p65를 분석한 것이다.
- 도 3은 DNCB로 유발된 아토피피부염 마우스 피부병변에 대한 오피오포고닌-D의 효과를 확인한 것으로, 도 3a는 무작위 4개 그룹 ((1) 아세톤/올리브 오일 4 : 1 용액으로 처리한 정상군, (2) DNCB만 처리한 DNCB-챌린지 (DNCB-challenged)군, (3) 저농도(1 μ M)의 OP-D 및 DNCB 처리군, (4) 고농도(10 μ M)의 OP-D 및 DNCB 처리군)의 마우스의 피부병변에 대한 임상적 특징을 나타낸 것이고, 도 3b는 각 군의 마우스 등 부위의 피부 세포를 H&E로 비만세포를 톨루이딘 블루로 염색한 결과를 나타낸 것이고, 도 3c는 각 군의 마우스의 표피 두께를 확인한 것이고, 도 3d는 각 군의 마우스의 비만 세포 수를 확인한 것이다.
- 도 4는 DNCB로 유도된 마우스 혈장에서 분비된 전 염증성 사이토카인에 대한 오피오포고닌-D의 억제효과를 확인한 것이다.
- 도 5는 오피오포고닌-D 처리에 따른 항염증 효과를 테스트하기 위해 real-time PCR로 마우스 비장 내 사이토카인 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명자들은 오피오포고닌-D 처리에 따른 피부질환 치료 용도를 연구한 결과, 아토피피부염 유도 마우스 모델에 오피오포고닌-D를 처리하는 경우 인간 각질 세포주인 HaCaT 세포 내 특정 신호 경로를 통해 염증성 사이토카인의 발현을 저감함으로써 아토피피부염 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 이에, 본 발명은 오피오포고닌-D (Ophiopogonin D, OP-D) 또는 이의 염을 포함하는 피부질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 화장품 조성물, 건강기능식품 조성물 및 의약품 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 피부질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"이란 본 발명의 따른 조성물의 투여로 피부질환의 정도를 감소시키거나, 가려움증, 피부 병변의 생성을 감소시키거나, 아토피 피부염의 2차 감염에 따른 증상을 경감시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 피부질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어 "피부질환"은 아토피피부염, 건선, 접촉성 알레르기 피부염, 과각화증, 어린선, 모공성 각화증, 광선각화증, 지루각화증, 천포창, 티눈, 사마귀, 평편태선 및 두드러기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 아토피피부염일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어, "아토피피부염"은 주로 유아기 혹은 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성의 염증성 피부질환으로 소양증 (가려움증)과 피부건조증, 특징적인 습진을 동반한 모든 증상을 포함하는 피부염증을 의미한다.
- [0027] 본 발명의 "오피오포고닌-D"는 화학식 C₄₄H₇₀O₁₆ 으로 구성되고, (1 β ,3 β ,25R)-3-Hydroxyspirost-5-en-1-yl 0-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-deoxy- β -D-galactopyranoside 또는 25(R)-Ruscogenin 1-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)][β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-fucopyranoside, Deacetylphiopogonin C으로 통칭되며 하기 [화학식 1]의 구조를 갖는 화합물을 의미한다.

[0028] [화학적식 1]



[0029]

[0030] 본 발명에 따른 [화학적식 1]로 표시되는 오피오포고닌-D는 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적, 화장품학적 또는 식품학적으로 허용되는 다양한 유기산 또는 무기산에 의해 형성된 산부가염을 사용할 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 다이카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻을 수 있다. 이러한 무독성 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피온산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 수베레이트, 세바케이트, 푸마렐트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디온산, 벤조산, 클로로벤조산, 메틸벤조산, 디니트로 벤조산, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조산, 프탈산, 테레프탈레이트, 벤젠설포산, 톨루엔설포산, 클로로벤젠설포산, 크실렌설포산, 페닐아세트산, 페닐프로피온산, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메틸설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트, 트라이플루오로아세트산 등을 사용하여 제조할 수 있다.

[0031] 이때, 본 발명에 따른 상기 산 부가염은 통상의 방법, 예를들면 [화학적식 1]의 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기용매, 예를들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0032] 또한, 본 발명에 따른 [화학적식 1]로 표시되는 오피오포고닌-D는 염기를 사용하여 약학적, 화장품학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 리튬, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염 (예를들면, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 조성물은 염증성 사이토카인 또는 DNCB에 의해 유도되는 사이토카인의 발현을 억제할 수 있으며, 상기 사이토카인은 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-1 β , IFN- γ 또는 IL-17 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 상기 사이토카인의 억제는 MAPK (mitogen-activated protein kinases) 활성 또는 NF- κ B 전위를 완하시킴으로써 억제될 수 있으며, 또한 본 발명에 따른 오피오포고닌-D를 포함하는 조성물은 피부 비후 (thickening)를 완화시키거나 또는 비만세포의 수를 저감시킬 수 있다.

[0034] 본 발명은 구체적인 실시예를 통해 오피오포고닌-D를 포함하는 조성물이 MAPK 활성 및 NF- κ B 전위를 완하시킴으로써 특정 사이토카인 발현을 억제시키고 아토피피부염이 유도된 동물모델에서 피부 비후가 완화되며 비만세포의 수가 저감되는 것을 확인하였다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서는 HaCaT에 TNF- α 를 사용하여 염증을 유도시킨 후 오피오포고닌-D를 처리하고 염증성 사이토카인의 발현을 확인한 결과, TNF- α , IL-6, IL-1 β mRNA 발현은 오피오포고닌-D 처리에 의해 유의하게 감소하였으며, IL-17도 감소하는 경향을 나타내는 것을 확인하였다 (실시예 2 참조).

[0036] 본 발명의 다른 실시예에서는 DNCB로 아토피피부염이 유도된 마우스에 오피오포고닌-D를 처리하고 H&E로 조직병리학적 관점에서 오피오포고닌-D의 효과를 확인한 결과, 오피오포고닌-D 처리 군에서 피부 비후가 현저하게 완화되는 것을 확인하였으며, 톨루이딘 블루 염색을 통해 오피오포고닌-D의 처리에 따른 비만 세포 활성화를 확인한 결과 오피오포고닌-D 처리군이 DNCB 그룹과 비교하여 진피의 비만 세포 수에 유의적인 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다 (실시예 4 참조).

- [0037] 상기 실시예의 결과로부터 오피오포고닌-D가 비만 세포 활성화를 감소시키고, 피부가 두꺼워진 아토피피부염-유도 마우스의 피부 비후를 완화시키고, DNCB에 의해 증가 된 혈액 내 사이토카인 발현 수준을 감소 시키는 것을 확인하였으며, 이에 본 발명에 따른 오피오포고닌-D를 포함하는 조성물은 아토피피부염의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품, 화장품, 건강기능식품, 의약외품 등에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 조성물이 약학적 조성물의 형태인 경우, 약학적으로 유효한 양의 오피오포고닌-D를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환측의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환측 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0041] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환측의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 1 내지 500 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명에서 "개체"는 쥐, 가축, 생쥐, 인간 등 포유류일 수 있으며, 구체적으로 항암치료가 필요한 반려견, 경주마, 인간 등일 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 피부질환의 치료 용도를 제공한다.
- [0045] 본 발명에 따른 조성물이 화장료 조성물의 형태로 이용되는 경우, 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분으로는 상기 오피오포고닌-D 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예를 들어 물, 계면활성제, 보습제, 저급알코올, 킬레이트제, 살균제, 산화방지제, 방부제, 색소 및 향료로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 화장료 조성물은 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 유탁액, 현탁액, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 파우더, 스프레이, 계면활성제-함유 클린징, 오일, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 파운데이션, 메이크업베이스, 에센스, 화장수, 폼, 팩, 유연수, 선스크린 크림 또는 선오일 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산에스테르가 있다.
- [0048] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같

은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산에스테르 등이 이용될 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물에 포함되는 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 포함될 수 있다.

[0052] 본 발명에 따른 조성물이 건강기능식품 조성물의 형태로 이용되는 경우, 특정보건용 식품, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학 및 의료효과가 높은 식품으로 제조될 수 있으며, 상기 식품은 경우에 따라, 기능성식품, 건강식품, 건강보조식품으로 혼용될 수 있으며, 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[0053] 본 발명의 건강기능식품은 식품 조성물에 통상적으로 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신 (niacin), 비오틴 (biotin), 폴레이트 (folate), 판토텐산 (panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연 (Zn), 철 (Fe), 칼슘 (Ca), 크롬 (Cr), 마그네슘 (Mg), 망간 (Mn), 구리 (Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제 (소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 디히드로초산나트륨 등), 살균제 (표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제 (부틸히드록시아니솔 (BHA), 부틸히드록시 톨루엔 (BHT) 등), 착색제 (타르색소 등), 발색제 (아질산 나트륨, 아조산 나트륨 등), 표백제 (아황산나트륨), 조미료 (MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료 (둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료 (바닐린, 락톤류 등), 팽창제 (명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제 (호료), 피막제, 감기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물 (food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 건강기능식품을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0055] 본 발명의 건강기능식품에 있어서, 오피오포고닌-D의 함량은 특별히 제한되지 않으며, 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 식품의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.

[0056] 본 발명의 조성물이 의약품 조성물의 형태로 이용되는 경우, 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 않으며 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 활용될 수 있으며, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미하며, 피부 외용제 및 개인위생용품도 포함한다.

[0057] 본 발명의 오피오포고닌-D를 피부질환의 예방 또는 개선을 목적으로 의약품 조성물에 첨가할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0058] 상기 의약품 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 개인위생용품, 피부 외용제, 소독청결제, 샤워폼, 멀티슈, 세제비누, 핸드워시, 마스크 또는 연고제를 포함한다. 상기 피부외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태로 제조되어 사용될 수 있다. 상기 개인위생용품에는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 비누, 멀티슈, 휴지, 샴푸, 치약,

모발 손질 제품, 에어프레쉬너 젤 또는 세정 젤일 수 있다.

- [0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0062] **[실시예]**
- [0063] **실시예 1. 실험 재료 및 방법**
- [0064] **1-1. 시약 (Reagent)**
- [0065] 오피오포고닌-D (Ophiopogonin D, OP-D)는 Chemfaces (Wuhan Chemfaces Biochemical Co., Ltd., China)에서 취득하였다. TNF- α 는 Peprotech (Neuilly / Seine, France)에서 입수하였다. β -actin에 대한 항체 및 특정 토끼항체는 Sigma-aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다. MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-[2H]-tetrazolium bromide)는 Invitrogen (Waltham, MA)에서 구입하였다. Extracellular signal-regulated kinases 1 및 2 (ERK1/2), phospho-ERK1/2, p38, phospho-p38, p65, phospho-p65, I κ B는 cell signaling technology (Danvers, MA)에서 구입하였다. β -actin 및 Lamin B 는 Santa cruz (TX, USA)에서 구입하였다.
- [0067] **1-2. 동물 (Animals)**
- [0068] 6주령 암컷 BALB/c 마우스 (대한 바이오 링크 (주) 충청북도 음성군)를 사용하였으며, 모든 동물 실험은 Institutional Animal Care 및 Use Committee (IACUC)에서 승인한 프로토콜에 따라 수행하였다 (confirmation number: KHUASP(SE)-17-090). 실험에 사용한 마우스는 중간 온도 (21-23℃) 및 습도 수준 (55-60 %)에서 12 시간 명암주기의 조건하에 특정 병원체가 없는 (SPF) 동물 실에 보관하였다. 모든 마우스는 실험 전 1주일 동안 적응 (acclimated)시켰다. 적응 기간 동안 모든 마우스에게 표준 설치류 사료 [단백질 28.507 %, 지방 13.496 % 및 탄수화물 57.996 % (LabDiet, St. Louis, MO, USA)] 및 물을 자유롭게 먹였다.
- [0070] **1-3. 아토피피부염 유도 및 치료 처리**
- [0071] 마우스를 무작위 4개 그룹 ((1) 아세톤/올리브 오일 4 : 1 용액으로 처리한 정상군, (2) DNCB만 처리한 DNCB-챌린지 (DNCB-challenged)군, (3) 저농도 (1 μ M)의 OP-D 및 DNCB 처리군, (4) 고농도 (10 μ M)의 OP-D 및 DNCB 처리군)으로 나눈 후 마우스를 면도하여 정상군을 제외한 3개의 그룹에 1일 1회 200 μ L의 1% DNCB (아세톤/올리브 오일 4 : 1 용액)로 4일간 국소 투여하였다. 정상군은 아세톤/올리브 오일 4 : 1 용액만 투여하였다. 샘플 처리 전 피부 장벽 섭동을 향상시키기 위해 100 μ L의 4% SDS를 처리하였다. 충분한 흡수가 이루어지도록 처리 후, 200 μ L의 0.5% DNCB 용액을 적용하여 12일 동안 조건을 유지하였다. 실험 20일 째에 마우스를 희생시켜 orbital puncture로 혈액샘플을 수집하고, 조직 병리학적 변화를 관찰하기 위해 등쪽 피부를 취득하였다.
- [0073] **1-4. 조직학적 분석 (Histological analysis)**
- [0074] 마우스 피부 샘플을 10 % 포르말린에 고정하고 파라핀 처리하였다. 파라핀 샘플을 6 μ m 두께로 절편하고 헤마톡실린 & 에오신 (H & E)으로 염색하였다. 조직 병리학적 특징은 광학 현미경을 사용하여 검출하였다. 청색염색 후 toluidine을 사용하여 비만 세포의 수를 확인하였다.
- [0076] **1-5. 사이토카인 분석**
- [0077] 마우스 혈장은 각 그룹 혈액에서 취득하였으며, 취득된 혈액은 EDTA 코팅된 튜브에서 10분 동안 1000 xg에서 원심분리하였다. Human Cytokine 6-plexExpress (TNF- α , Eotaxin, IL-4, IL-5, IL-9 및 IL-13; Bio-Rad, Hercules, CA) 면역 분석은 1 x 96-well 다중 플레이트에서 수행하였다. 제조업체의 지침에 따라. 결과는 Bio-

plex (Bio-Rad, CA, United States)로 분석하였다. 3일 후, 1 μ M 농도의 오피오포고닌-D와 200 μ m, 10 μ m의 식염수/올리브 오일 용액을 12일 동안 하루에 한번 마우스 피부에 국소처리하였다.

1-6. 면역형광 분석

Confocal dishes에서 세포에 오피오포고닌-D를 처리하거나 처리하지 않고 면역형광 분석을 진행하였다. 오피오포고닌-D를 처리군의 경우 처리 후 10분 동안 10% 포르말린으로 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS 중 0.2% triton X로 20분 동안 처리하고 PBS 중 5% BSA 용액으로 1시간 동안 차단하였다. 차단된 세포를 4℃에서 항-p65 항체로 밤새 배양하고 실온에서 1시간 동안 Alexa-Fluor-488 항체와 함께 배양하였다. 핵은 실온에서 5분 동안 핵 마커 (4,6-diamidino-2-phenylindole) (DAPI; sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 염색하였다.

1-7. 면역블롯팅 (Immunoblotting)

세포를 세포 용해 완충액 (Cell Signalling Technology; Danvers, MS, USA)으로 용해시켰다. Bio-Rad 단백질 분석 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 각 샘플은 SDS-PAGE 겔에서 분리된 후 니트로 셀룰로오스 막으로 전기 이동 (electro-transfer)시켰다. 상기 막은 TBS-T에서 5% BSA로 차단되었다. 1차 항체, 예컨대 p-ERK1/2, ERK1/2, p-p38, p38, p-p65, p65, I κ B 및 β -actin (전체적으로 1 : 3000)을 4℃에서 밤새 막과 함께 배양하였다. 막을 광범위하게 세척한 다음 goat anti-rabbit IgG-HRP 및 goat anti-mouse IgG-HRP와 같은 2차 항체와 함께 배양하였다.

1-8. 통계분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다. Graph Pad Prism 5 software package (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 결과의 통계분석을 생성하였다. Western blot bands 및 real-time PCR 결과를 분석하기 위해 unpaired t-test를 수행하였다. 0.05 미만의 p값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었으며, 모든 유의한 데이터는 3회 분석되었다.

실시예 2. TNF- α 로 자극된 HaCaT 세포에서 오피오포고닌-D 처리에 따른 전 염증성 사이토카인 발현 억제 확인

인간 각질 형성 세포 (HaCaT) 세포에 대한 오피오포고닌-D의 세포 독성을 조사하기 위해 MTT 분석을 진행하였다. 그 결과 도 1a에 나타난 바와 같이, 오피오포고닌-D는 5 시간 동안 최대 1 μ M까지 세포 생존력에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

이에 더하여, TNF- α 는 HaCaT 세포에서 염증을 유도하는데 사용되며, in vitro 모델에서 염증성 피부 질환을 나타낸다는 것을 기반으로 TNF- α 로 자극된 HaCaT 세포에서 오피오포고닌-D 처리에 따른 사이토카인 발현 억제 효과를 확인하기 위해 실시간 PCR을 수행한 결과, 도 1b 내지 1e에 나타난 바와 같이 TNF- α 를 처리하여 HaCaT 세포를 자극시키는 경우 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 IL-17 발현 수준이 상향 조절되는 것을 확인하였으며, 오피오포고닌-D 처리하는 경우 TNF- α , IL-6, IL-1 β mRNA 발현은 유의하게 감소하였으며, IL-17도 감소하는 경향을 나타내는 것을 확인하였다.

실시예 3. TNF- α 로 자극된 HaCaT 세포에서 오피오포고닌-D의 처리에 따른 MAPK 및 NF- κ B 신호전달경로 확인

오피오포고닌-D 처리가 염증 반응의 두 가지 주요 매개체 인 MAPK 경로와 NF- κ B 신호에 미칠 수 있는 영향을 평가한 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 오피오포고닌-D는 ERK 및 p38 단백질 발현 수준의 인산화를 효과적으로 억제하였으며, 도 2b에 나타난 바와 같이 총 ERK 및 총 p38 수준 비율에 비해 p-ERK 및 p-p38 발현 수준이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.

또한, 일반적으로 HaCaT 세포가 TNF- α 에 의해 자극되면 NF- κ B는 I κ B에서 분리되어 핵으로 이동하여 다양한 사이토카인과 같은 전 염증 인자를 코딩하는 유전자의 전사 촉진을 초래하고, I κ B는 세포질에서 프로테아좀에 의해 인산화되고 분해되는 것으로 알려져 있는바, 전체 세포 분획에서 오피오포고닌-D 처리에 따른 I κ B 분해에 대한 억제 효과를 확인하였다. 이때 단백질의 상대적인 수준은 I κ B/ β -actin 비율로 계산하였다. 그 결과, 도

2a에 나타난 바와 같이 핵 분획에서 오피오포고닌-D는 TNF- α 를 처리한 HaCaT 세포 내 NF- κ B 전위를 효과적으로 억제하는 것을 확인하였으며, 도 2c에 나타난 바와 같이 핵 NF- κ B 단백질 강도는 lamin B로 정규화되었으며 오피오포고닌-D는 핵에서 NF- κ B 단백질 수준에서 현저한 감소를 나타내었다.

[0095] 또한, 면역 형광 분석을 통해 분석한 결과 도 2d에 나타난 바와 같이 HaCaT 세포에서 TNF- α 에 의해 유도된 핵으로의 NF- κ B 전위에 대한 오피오포고닌-D의 현저한 완화 효과를 확인하였다. 상기 결과로부터 오피오포고닌-D가 HaCaT 세포에서 TNF- α 자극에 의해 활성화된 MAPK 및 NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 완화 효과를 통해 전염증성 사이토카인 발현을 감소 시켰음을 유추할 수 있다.

[0097] **실시예 4. DNCB로 유도된 아토피피부염 유도 마우스에서 오피오포고닌-D 처리에 따른 피부 비후 (thickening) 완화 또는 비만 세포 활성화 억제 확인**

[0098] 실시예 1-3에 진술한 4개 그룹 ((1) 아세톤/올리브 오일 4 : 1 용액으로 처리한 정상군, (2) DNCB만 처리한 DNCB-챌린지 (DNCB-challenged)군, (3) 저농도 (1 μ M)의 OP-D 및 DNCB 처리군, (4) 고농도 (10 μ M)의 OP-D 및 DNCB 처리군)에 국소적으로 오피오포고닌-D를 처리한 결과 도 3a에 나타난 바와 같이 오피오포고닌-D를 처리한 군이 DNCB-챌린지 군에 비해 임상 증상을 현저하게 억제하는 것을 확인하였다.

[0099] 이에 더하여, H&E으로 조직병리학적 특징에 대한 오피오포고닌-D의 효과를 확인한 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이 H&E 염색 결과에서 정상 군은 표피와 진피에서 좁은 범위를 보였지만 DNCB-챌린지 군 (130.6 $\pm$ 7.7 m)의 표피 두께는 정상 그룹 (42.2 $\pm$ 7.4 m)에 비해 거의 3 배 증가함으로써 DNCB에 챌린지 군이 정상 군에 비해 피부가 두꺼워지는 것을 확인하였다. 또한, 도 3c에 나타난 바와 같이 1 μ M의 오피오포고닌-D 처리 그룹 (101.1 $\pm$ 1.9 m)과 10 μ M의 오피오포고닌-D 처리 그룹 (96.4 $\pm$ 4.2 m)에서 피부 비후가 현저하게 완화되는 것을 확인하였다.

[0100] 나아가, DNCB 처리 마우스에서 오피오포고닌-D의 처리에 따른 비만 세포 활성화를 확인하기 위해 톨루이딘 블루 염색을 진행하고 세포를 계수하였다. 그 결과, 도 3d에 나타난 바와 같이 DNCB에 민감해진 그룹 (102.7 $\pm$ 3.07)은 정상 그룹 (24 $\pm$ 2.7)보다 약 4.5 배 더 많은 염색된 비만 세포를 나타내었다. 도 3d에 나타난 바와 같이 오피오포고닌-D (1 μ M의 오피오포고닌-D 처리군 : 59.7 $\pm$ 5.5, 10 μ M의 오피오포고닌-D 처리군 : 60 $\pm$ 7.8) 실험은 DNCB 그룹과 비교하여 진피의 비만 세포 수에 유의적인 억제 효과를 나타내었다.

[0102] **실시예 5. DNCB에 의해 유발된 마우스의 혈액 및 비장 염증에서 오피오포고닌-D 처리에 따른 사이토카인 발현수준 억제 확인**

[0103] 마우스 혈장에서 eotaxin, IL-4, IL-13, TNF- α , IL-5, IL-9의 발현 정도를 다중 평가 방법으로 검출한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 DNCB 처리는 정상 군에 비해 사이토카인 수치가 증가한 것으로 나타났으며, 오피오포고닌-D를 처리하는 경우 DNCB 처리군에서 증가된 TNF- α , IL-4 및 IL-5 발현 수준에 유의한 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한, IL-13과 eotaxin 생산 수준은 오피오포고닌-D와 함께 감소하는 경향이 있었고, IL-9 발현에 대한 억제 효과는 미미한 것을 확인하였다.

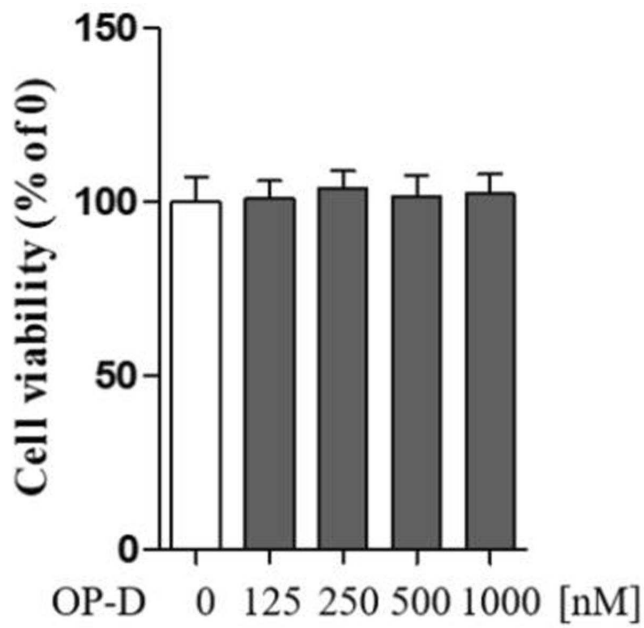
[0104] 이에 더하여, 오피오포고닌-D 처리에 따른 항염증 효과를 테스트하기 위해 real-time PCR로 마우스 비장 내 사이토카인 수준을 분석한 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이 DNCB 처리 그룹은 비정상적으로 확장된 비장을 나타냈으며, 오피오포고닌-D의 처리는 DNCB 단독 처리 그룹에 비해 비장 무게 대 체중 비율을 현저하게 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 도 5b 내지 d에 나타난 바와 같이 오피오포고닌-D를 처리하는 경우 TNF- α , IL-1 β 및 IFN- γ mRNA 발현 수준을 현저히 감소시키는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 오피오포고닌-D가 비만 세포 활성화를 감소시키고, 피부가 두꺼워진 아토피피부염-유도 마우스의 피부 비후를 완화시키며, DNCB에 의해 증가된 혈액 내 사이토카인 발현 수준을 감소 시킴으로써 아토피피부염 예방, 개선 또는 치료에 효과가 있음을 유추할 수 있다.

[0106] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것

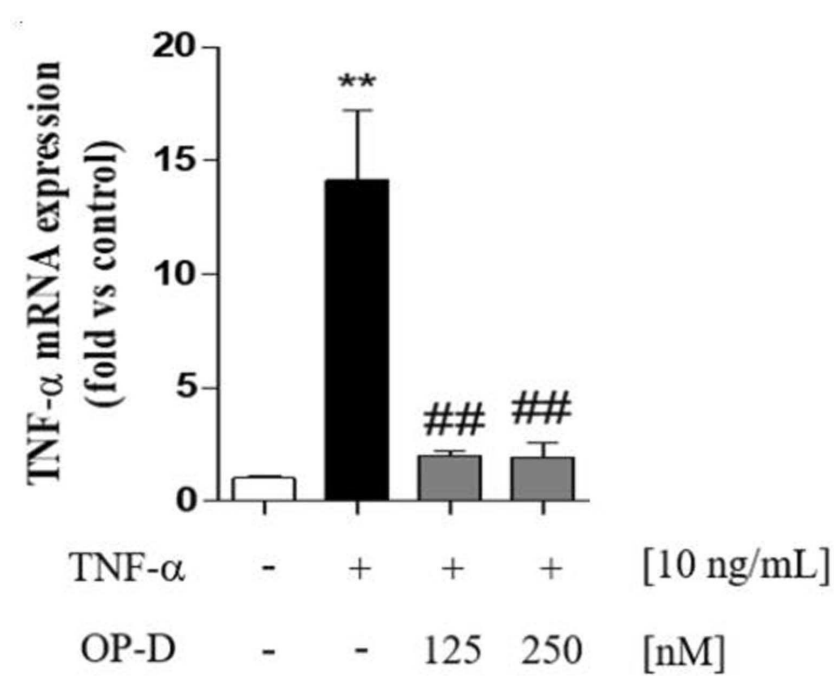
으로 이해해야만 한다.

도면

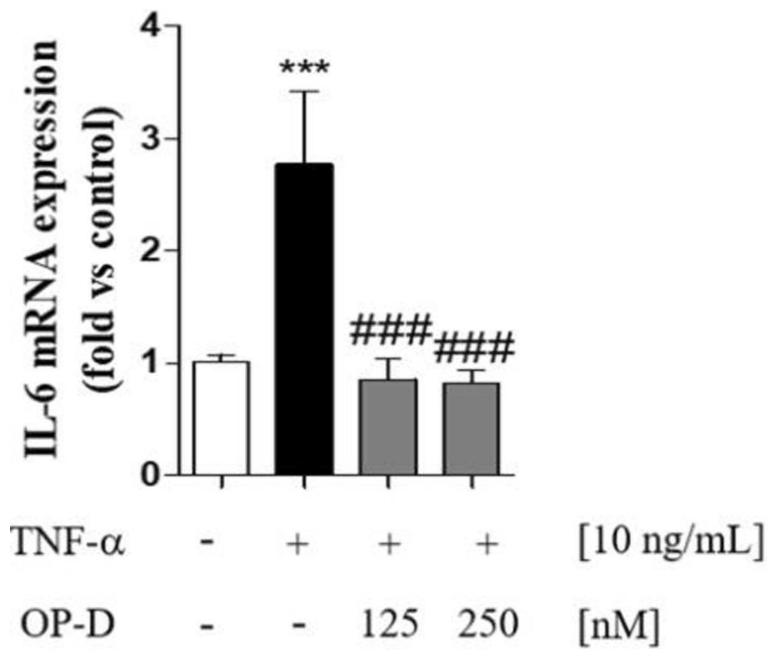
도면1a



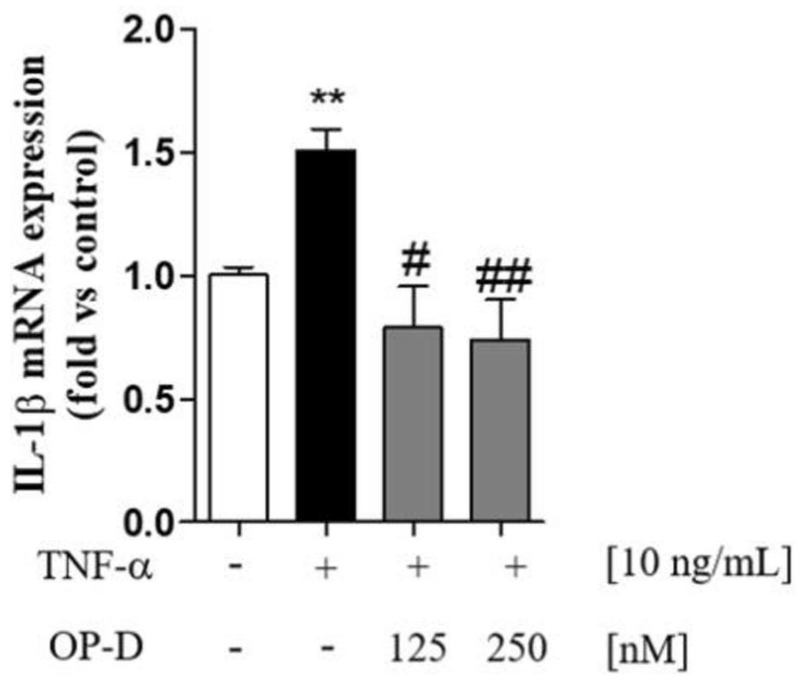
도면1b



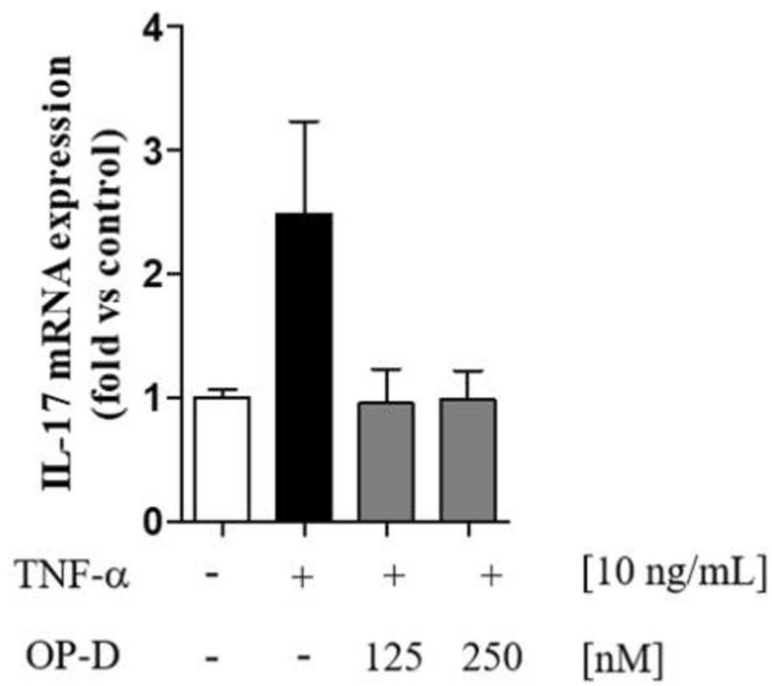
도면1c



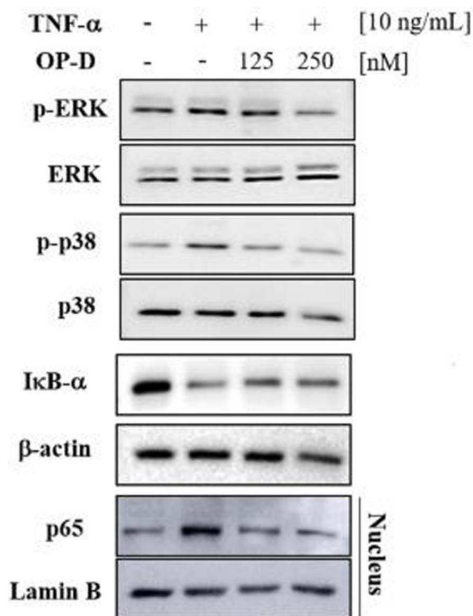
도면1d



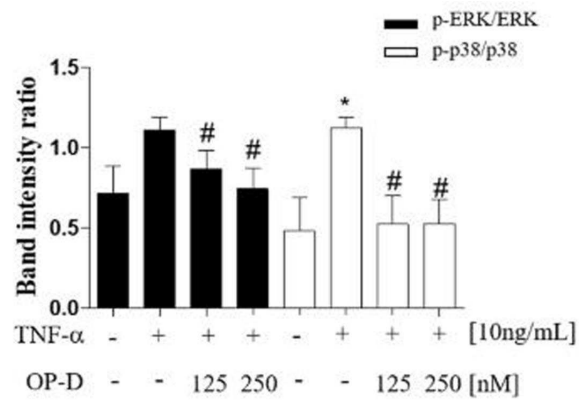
도면1e



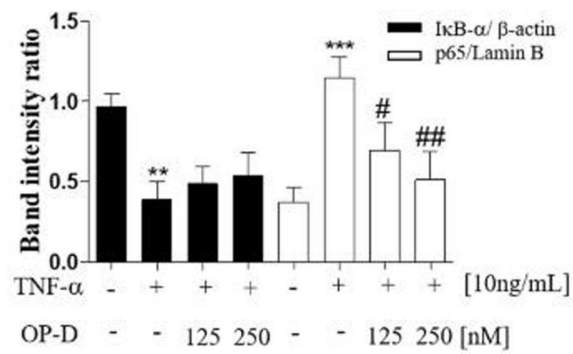
도면2a



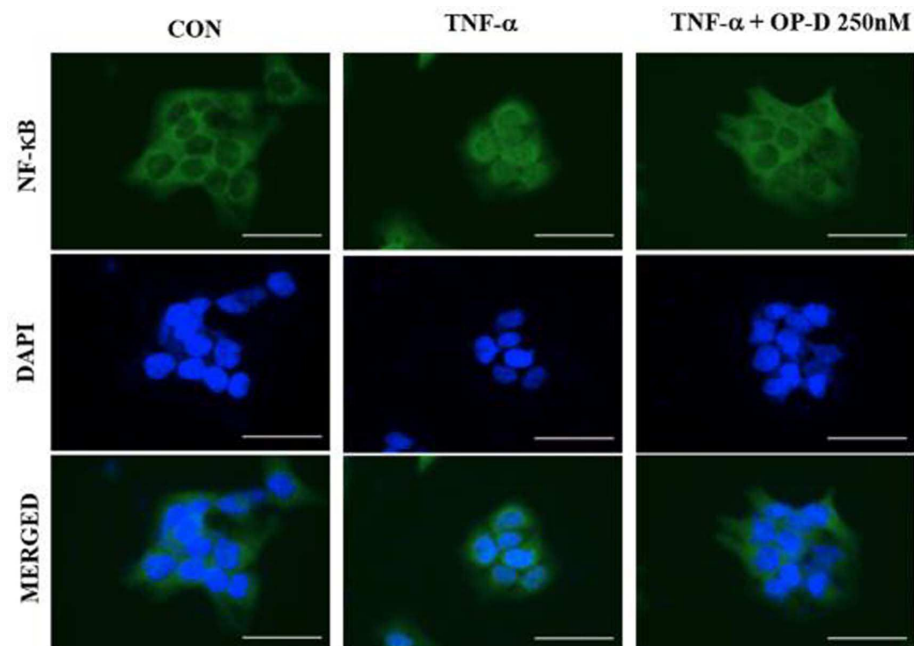
도면2b



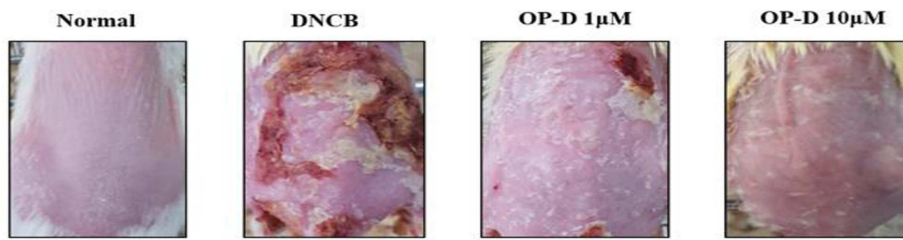
도면2c



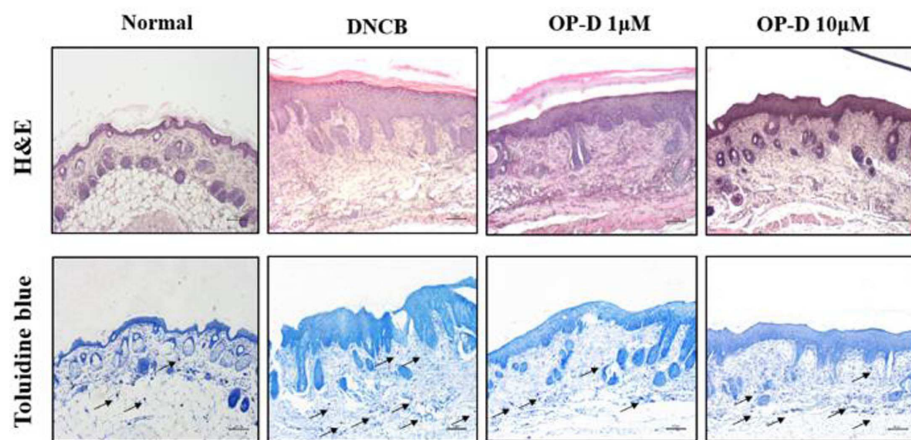
도면2d



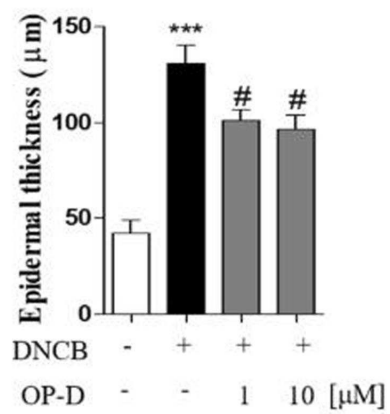
도면3a



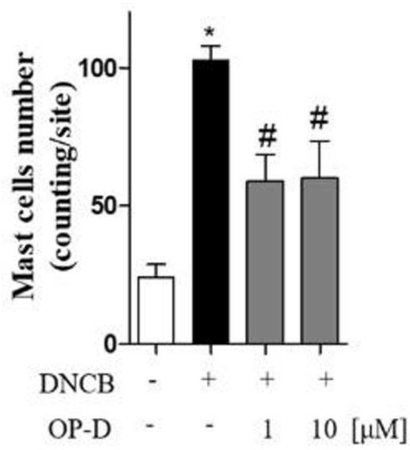
도면3b



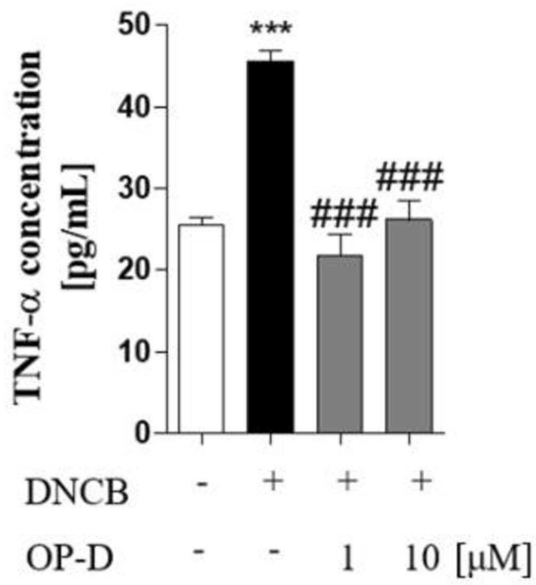
도면3c



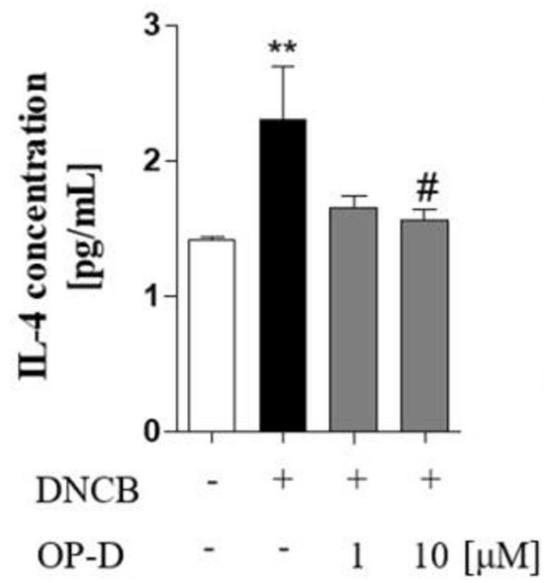
도면3d



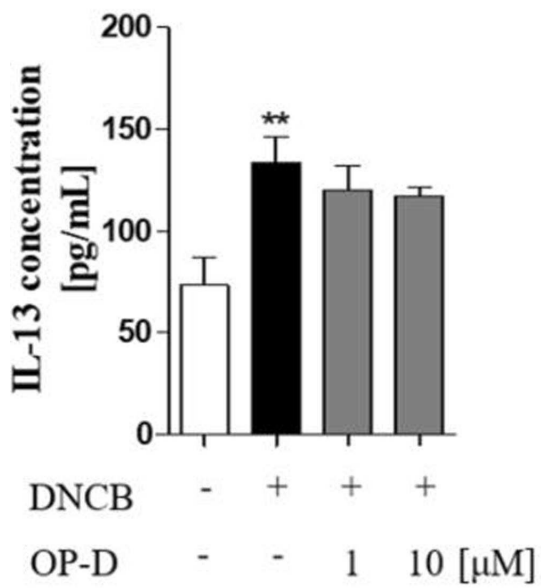
도면4a



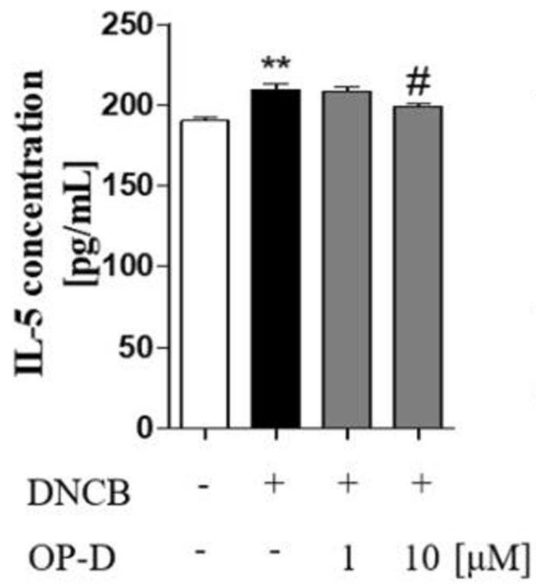
도면4b



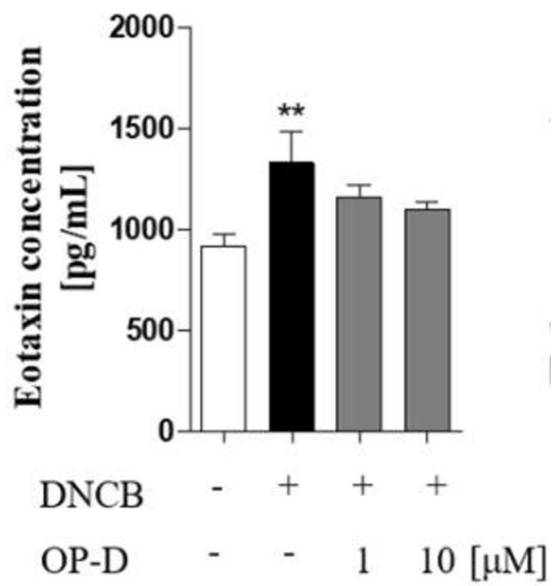
도면4c



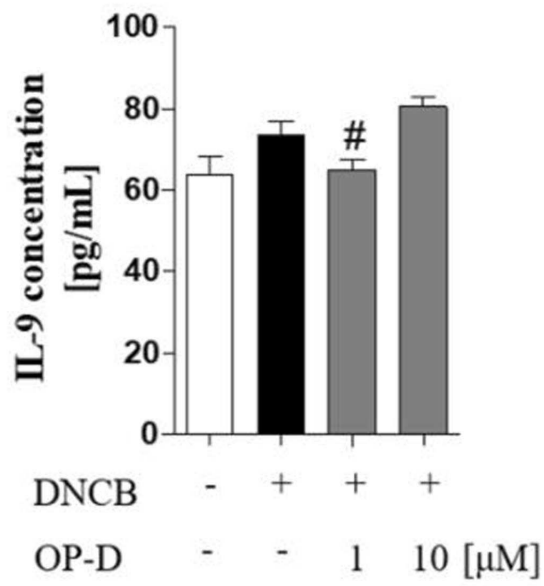
도면4d



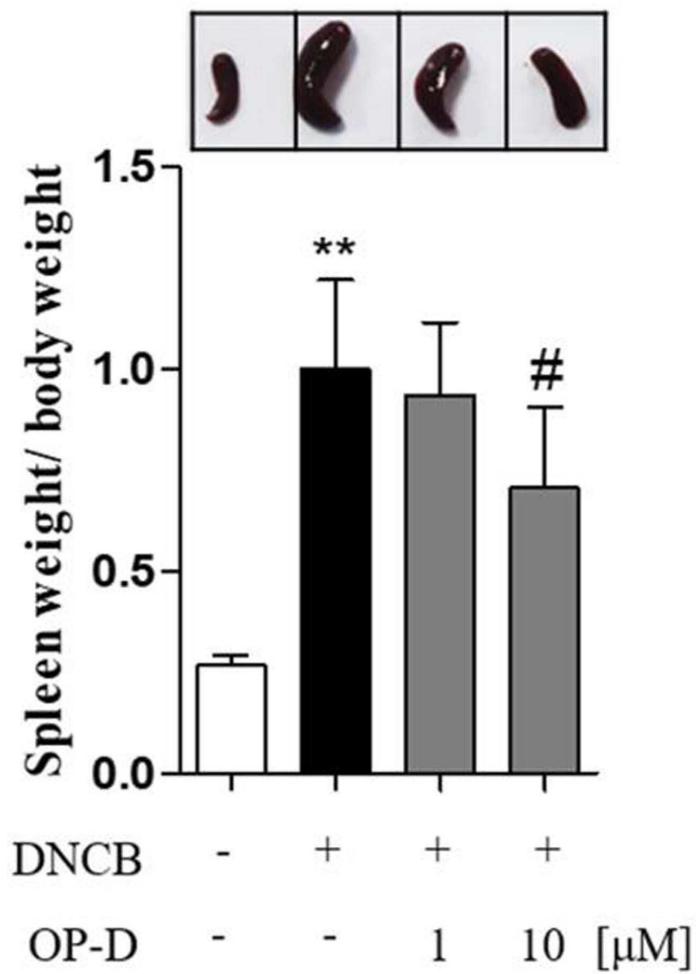
도면4e



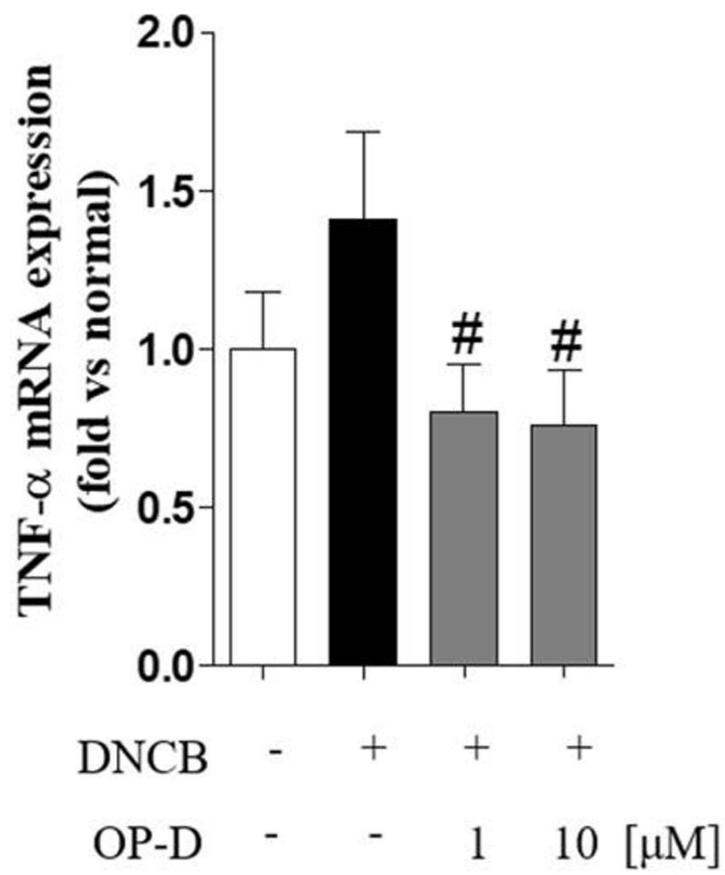
도면4f



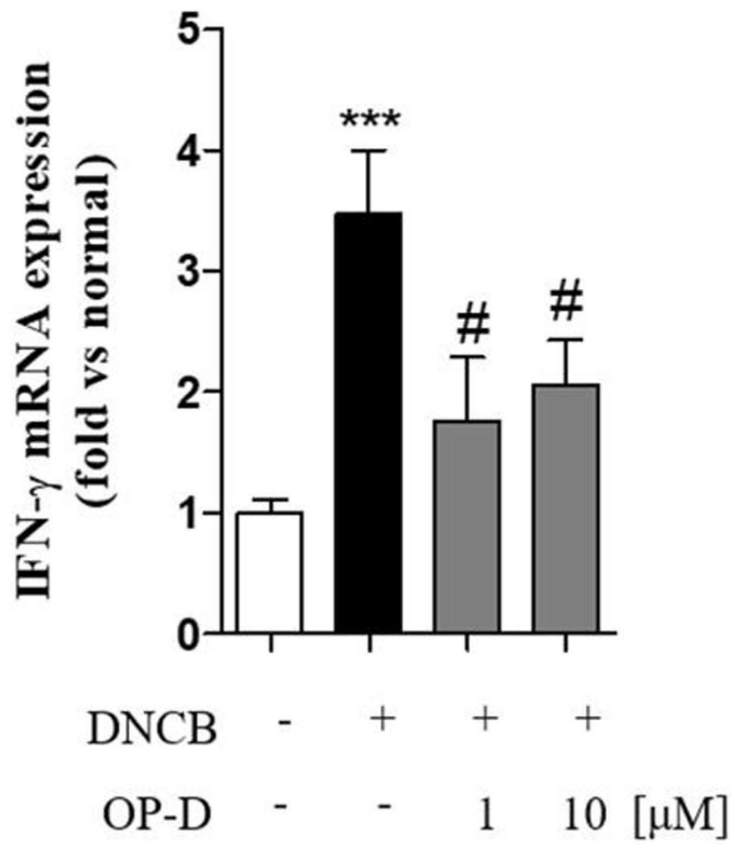
도면5a



도면5b



도면5c



도면5d

