



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0014052
(43) 공개일자 2017년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/889 (2006.01) A61K 8/97 (2017.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/889 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0106578

(22) 출원일자 2015년07월28일

심사청구일자 2015년07월28일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

김배환

대구광역시 수성구 청수로 213 1116동 503호 (황금동, 캐슬골드파크1단지)

강미현

경상북도 구미시 사곡로1길 10 2동 201호 (사곡동, 삼성빌라)

(74) 대리인

특허법인태백

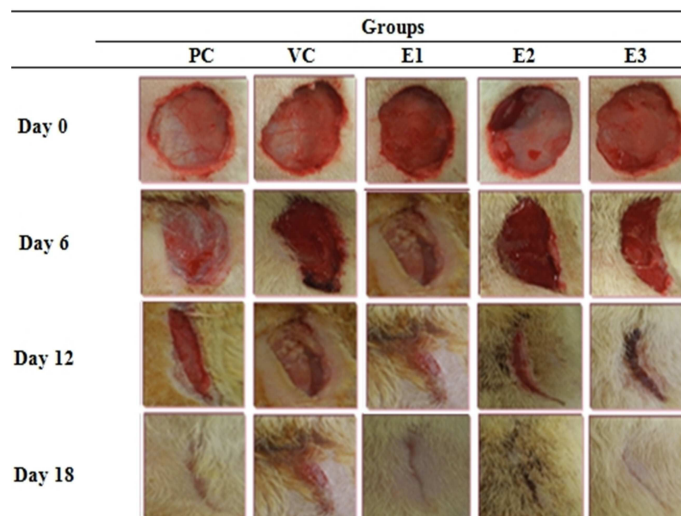
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 치유용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 치유용 약학 조성물, 개선용 화장품 조성물 또는 건강식품에 관한 것으로, 상기 아사이베리 열수추출물(ABWE)를 피부 상처에 처리하면 주위 세포의 이동을 촉진시켜 상처 부위의 치유를 돕고, 상처 치유와 관련된 유전자인 타입-1-프로콜라겐(type-1-procollagen) 및 금속단백분해효소-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)의 발현을 증가시켜 빠른 상처 치유 효과를 보일 뿐만 아니라 염증 개선 효과를 보이므로 창상 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 8/97 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/06 (2013.01)

A61K 9/70 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 치유용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 열수 추출물인 것을 특징으로 하는 창상 치유용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 아사이베리 추출물은 약학 조성물 전체 중량대비 1 내지 5 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 창상 치유용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 겔제, 유제, 주사제, 산제, 과립제, 에어로솔제, 페이스트제, 경피흡수제 및 패치제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 제형인 것을 특징으로 하는 창상 치유용 약학 조성물.

청구항 5

아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 개선용 화장품 조성물.

청구항 6

아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 개선용 건강식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 치유용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 상처 치유는 유해물질로부터 신체를 보호하는 방어기전으로, 일반적으로 염증기, 증식기 그리고 재형성기 크게 3단계로 이루어진다. 상처치유 기전은 상처의 종류에 따라 다양하게 이루어지고 랫트에서 절개상처 모형과 적출상처 모형 등 여러 형태의 상처모형을 이용하여 다양한 상처치유 방법을 연구하고 있다.

[0003] 염증기는 손상 후 즉시 반응이 나타나는 시기로 상처가 발생하면 혈소판이 활성화되고, 활성화된 혈소판은 피브로넥틴(fibronectin), 피브린(fibrin), 비트로넥틴(vitroectin) 및 트롬보스폰딘(thrombospondin) 등이 유리된다. 활성화된 혈소판은 응집되어 혈액을 응고시키고, 혈소판유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 형질전환 성장인자- β (transforming growth factor- β , TGF- β)와 같은 성장인자를 분비한다. 상처 초기에는 혈액에서 유래된 호중구와 단핵구가 나타난다. 단핵구는 손상 후 24 내지 36시간 이내에 상처 부위에 모이게 되고 상피세포가 뚫어나와 상처 표면을 덮고, 48 내지 72시간 후에 대식세포로 대체되어 상처 주위의 세균 및 사멸조직을 제거한다. 더불어 인터루킨-1(interleukin-1)과 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), TGF- β , PDGF 등과 같은 사이토카인들과 성장인자들을 분비하여 염증세포 침윤을 촉진하며 섬유아세포의 침윤과 증식, 교원섬유 합성 촉진과 같은 중요한 역할을 한다.

- [0004] 상처치유에 관여하는 세포로 알려진 비만세포는 히스타민을 분비하여 손상혈관의 투과성을 증진시키고 호산구 및 호중구 등 염증세포 유주에 관여하며, 염증반응과 혈관신생 및 세포외기질의 재흡수에 관여하여 상처치유 과정에서 중요한 역할을 한다. 전환성장인자- β (transforming growth factor- β , TGF- β)는 생체내(in vivo)에서 연부 조직의 상처치유를 촉진하는 인자로 알려져 있고, TGF- β 1은 혈소판, 대식세포, 섬유아세포에서 분비되며, 교원섬유와 기타 기질 성분의 합성과 분비를 증가시켜 세포외기질의 구성과 양을 조절한다.
- [0005] 증식기는 손상 후 3일째부터 대식세포, 섬유아세포 등이 상처부위로 이동하여 육아조직이 형성되는 시기이다. 특히 이 시기에서는 혈관재생, 콜라겐 침착, 상피조직과 상처수축이 나타난다.
- [0006] 상처가 발생하면 24시간 이내에 상처 변연부에서 각질세포의 이동이 시작되고, 각질세포의 이동에는 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)와 성장인자 등이 관여한다. MMPs는 손상된 조직에서 세포 이동과 세포외기질 조절에 중요한 역할을 한다. 이동한 각질 세포에서 만들어지는 MMP-1은 아연을 포함하고 있는 세포외기질 단백질분해효소로 세포외기질 중에서 세포간질이나 기저막 교원질, 단백질, 피브로넥틴, 라미닌 등의 단백질을 구성한 물질을 분해시켜 상처치유 시 결합조직 재형성에 관여한다.
- [0007] 재형성기는 상처 치유의 마지막 단계로 TGF- β 에 의해 새로운 콜라겐이 합성되고, PDGF에 의해 기존 콜라겐은 분해되는데 이 과정에서 반흔이 형성된다. 이 과정에서 섬유아세포와 각질세포의 수는 감소되고 혈액의 흐름도 줄어들게 된다. 따라서 신속한 조직의 재생은 손상된 조직의 반흔 형성을 최소화함으로써 원래의 상태에 가깝게 회복시켜 기능적 또는 심미적 문제를 해소하는 것이 중요하다.
- [0008] 현재 상처 치료에 주로 사용되는 후시딘산나트륨을 함유하는 연고는 피부의 알러지 반응을 유도하거나 반흔 및 유착된 조직을 형성시키는 부작용이 보고된 바 있다.
- [0009] 따라서 최근에는 합성 의약품을 대신할 수 있는 부작용이 적고 안전성이 높은 천연물 치료제의 개발을 위한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 아사이베리의 상처치유 효과와 그 작용기전에 대해서는 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 10-2013-0075871호.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 따라서, 본 발명은 천연물 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 치유용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0012] 또한 본 발명은 천연물 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 개선용 화장품 조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.
- [0013] 또한 본 발명은 천연물 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 개선용 건강식품을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 치유용 약학 조성물을 제공한다.
- [0015] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0016] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따르면 아사이베리 열수추출물(Acai berry water extration, ABWE)을 피부 상처에 처리하면 주위 세

포의 이동을 촉진시켜 상처 부위의 치유를 돕고, 상처 치유와 관련된 유전자인 타입-1-프로콜라겐(type-1-procollagen) 및 금속단백분해효소-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)의 발현을 증가시켜 빠른 상처 치유 효과를 보일 뿐만 아니라 염증 개선 효과를 보이므로 창상 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 아사이베리 열수추출물(Acai berry water extration, ABWE)의 엘라스타아제(Elastase) 활성 억제를 확인한 결과이며,
- 도 2는 ABWE의 콜라게나아제(아교질가수분해효소, Collagenase) 활성 억제 효과를 확인한 결과이며,
- 도 3은 ABWE의 독성을 확인한 결과이며,
- 도 4는 ABWE가 섬유아세포인 HS68 세포의 이동성에 미치는 영향을 확인한 결과이며,
- 도 5는 ABWE 처리에 따른 상처 치유와 관련된 유전자의 mRNA 발현 변화를 분석한 결과이며,
- 도 6은 ABWE를 처리한 피부 상처의 치유과정을 나타낸 결과이며,
- 도 7은 ABWE 처리에 따른 마우스의 간, 비장(spleen)의 무게 변화를 측정된 결과이며,
- 도 8은 ABWE 처리에 따른 피부 상처의 혈액학적 변화를 분석한 결과이며,
- 도 9는 ABWE를 처리한 후, 피부 상처 조직의 표피간격 및 염증관련 세포를 관찰한 결과이며,
- 도 10은 ABWE를 처리한 후, 피부 상처 조직의 진피층 내 콜라겐의 양과 형태를 관찰한 결과이며,
- 도 11은 ABWE를 처리한 후, 피부 상처 조직의 비만 세포의 분포 양상을 관찰한 결과이며,
- 도 12는 피부 조직에서 상처 치유 관련 유전자의 발현을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명의 발명자는 피부 창상에 대한 치료 효과를 보이는 천연물 추출물에 대하여 연구하던 중, 아사이베리 열수추출물(Acai berry water extration, ABWE)을 피부 상처에 처리하였을 때 빠른 치료 효과를 보이는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 따라서 본 발명은 아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 치유용 약학 조성물을 제공한다.
- [0021] 상기 추출물은 열수 추출물이다.
- [0022] 상기 아사이베리 추출물은 약학 조성물 전체 중량대비 1 내지 5 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 만약 상기 범위를 벗어나게 되면 아사이베리 추출물의 상처 치료 효능이 제대로 발휘되지 않는 문제가 야기될 수 있다.
- [0024] 상기 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 겔제, 유제, 주사제, 산제, 과립제, 에어로솔제, 페이스트제, 경피흡수제 및 패치제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 제형으로 제공될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 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 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감

미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0027] 상기 아사이베리 추출물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 더불어 본 발명은 아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 화장품 조성물은 유효성분인 본 발명에 따른 아사이베리 추출물 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0031] 상기 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 썬 크림, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0032] 상기 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.

[0033] 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로포름, 오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0034] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 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 지방산 에스테르가 있다.

[0035] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0036] 더불어 본 발명은 아사이베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 창상 개선용 건강식품을 제공한다.

[0037] 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품은 유효성분인 아사이베리 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0038] 상기 건강식품에 포함된 아사이베리 추출물의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0039] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

- [0041] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0043] <실시예 1> 실험방법
- [0044] 1. 시약 준비
- [0045] 디메탈 설펜화물(dimethyl sulfoxid, DMSO), 1,1-디페닐-2-피크릴 히드라질(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 2,2'-아지노-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)(2,2'-azino-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS), 탄닌 산(tannic acid), 아스코르브산(ascorbic acid), 폴린-시오칼토 페놀 시약(Folin-Ciocalteu's phenol reagent)은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.
- [0046] 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)와 소태아혈청(Fetal bovine serum, FBS), 페니실린/스트렙토마이신(Penicillin/Streptomycin, P/S)는 론자(Lonza Company, Cascade, USA)에서 구매하였다.
- [0048] 2. 아사이베리 열수추출물(ABWE)의 제조
- [0049] 아사이베리는 한국 아사이베리(Sambazon, PARAGON LABORATORIES, America)에서 시판되고 있는 동결건조분말(유기농 아사이 분말 99.9%, 구연산 0.1%)을 구입하여 사용하였고, 열수 추출은 분말시료 100g을 80℃, 물 1 L에 3시간 침적시키고 3회 반복 추출 후 여과를 거쳐 72시간 동결건조하여 분말상태의 아사이베리 열수추출물을 제조하여 실험에 사용하였다.
- [0051] 3. 생체 외 실험(세포 실험)
- [0052] 1) 엘라스타아제(Elastase) 활성 억제
- [0053] ABWE의 엘라스타아제 저해 활성을 측정하기 위하여 ABWE 및 아스코르브산(ascorbic acid)을 0.5 mL씩 취하고, 50 mM 트리스-HCl 완충액(tris-HCl buffer, pH 8.6)에 녹인 돼지 췌장 엘라스타아제(porcine pancreas elastase, 2.5 U/mL) 용액 0.5 mL를 가한 후 기질로 50 mM 트리스-HCL 완충액(tris-HCl buffer, pH 8.6)에 녹인 기질, N-수시닐-(L-Ala)-3-p-나이트로아닐라이드(N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide, 0.5 mg/mL)를 첨가하여 37℃에 20분간 반응시킨 후 445nm에서 흡광도를 측정하였다. 엘라스타아제 저해활성은 시료용액의 첨가군과 대조군의 흡광도 감소율로 나타내었으며, 하기 수학적 식을 통해 산출하였다.
- [0054] [수학적 식 1]
- [0055]
$$\text{저해율}(\%) = [1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100$$
- [0057] 2) 콜라게나아제(아교질가수분해효소, Collagenase) 활성 억제
- [0058] 콜라게나아제 저해활성을 측정하기 위해 시료의 수만큼 콜라겐(collagen) 30mg을 15ml 튜브에 각각 가해준 뒤, 이 튜브에 증류수 1L와 N-트리스[하이드록시메틸]메틸-2-아미노에탄설폰산(N-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethansulfonic acid) 12.6g, 염화칼슘(calcium chloride) 0.05g을 가하여 제조한 완충액 3ml씩 첨가하였다. 이에 각 시료 1ml과 콜라게나아제 용액 1 ml를 첨가한 뒤 37℃에서 1시간 동안 교반하며 효소 활성화 반응을 시켰다. 반응 후 반응액 2ml를 취하여 1ml의 닌하이드린 반응 완충액(ninhydrin reaction buffer)를 넣어준 후 37℃에서 20분간 반응하였다. 이 반응액을 상온에서 식힌 후 0.7 ml를 취하여 0.7 ml의 n-프로판올(n-propanol)과 혼합하고 10분간 12,000rpm의 속도로 원심분리한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0060] 3) 세포 배양
- [0061] 섬유아세포인 HS68 세포는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, ATCC)에서 분양받아 계대배양하여 사용하였다. 세포는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)와 1% 페니실린/스트렙토마이신

(penicillin/streptomycin, P/S)가 함유된 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0063] **4) 증식 분석**

[0064] ABWE가 HS68 세포에 미치는 독성을 알아보기 위하여 농도별(0, 0.1, 0.3 또는 1ppm)로 처리하여 테트라졸리움염(tetrazolium salts)인 WST-1을 이용한 분석을 진행하였다.

[0065] HS68 세포를 96 웰 플레이트에 1×10^4 분주하여 24시간 동안 배양한 후 세포의 상층 배지를 제거하고, 시료를 농도별로 반응시켰다. 그 후 각각의 well에 WST-1을 1:10으로 PBS에 희석한 용액을 10 μ l씩 분주하고 차광한 상태로 3시간 동안 배양기에서 반응한 뒤, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0066] 세포 생존율(percentage of cell viability)은 하기 수학적 식 2를 통해 산출하였다.

[0067] **[수학적 식 2]**

[0068] 세포 생존율(percentage of cell viability) = $(A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$

[0070] **5) 이동성 분석**

[0071] ABWE가 HS68 세포의 이동성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HS68 세포를 6 웰 플레이트에 1×10^5 로 분주하여 10% FBS가 첨가된 DMEM에 24시간 배양하였다. 그런 후 200 μ l의 플라스틱 마이크로피펫 팁(plastic micropipette tip)을 이용하여 단일 세포층을 스크래치(scratch)한 후 시료를 농도별로 처리하고 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하여 세포의 이동성을 관찰하였다.

[0073] **6) HS68 세포의 RNA의 분리**

[0074] 세포에 트리졸 용액(Trizol solution)을 800 μ l을 넣고 스크레이퍼(scraper)로 긁은 후 튜브로 옮겨 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 160 μ l의 클로로포름(chloroform)을 첨가하여 가볍게 섞은 후(vortexing) 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4℃에서 12,000 xg의 속도로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 여기에 동일한 양으로 250 μ l의 아이소프로판올(Isopropanol)을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4℃에서 12,000 xg의 속도로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 펠렛(pellet)을 75% 에탄올(ethanol)로 세척한 후 4℃에서 12,000 xg의 속도로 8분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 펠렛을 건조하고 250 μ l의 디에틸피로카르보네이트(diethyl pyrocabonate, DEPC)를 처리한 증류수에 녹여 분광광도계(spectrophotometer, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 0.25 μ g/ μ l의 농도로 정량하였다.

[0075]

[0076] **7) cDNA의 합성(역전사, Reverse Transcription)**

[0077] 2 μ g의 총 RNA에 1.1 μ l의 10×디옥시리보핵산가수분해효소 I(de-oxyribonuclease I, DNase I) 반응 완충액, 1 μ l의 1 U/ μ l DNase I를 첨가한 후 DEPC를 처리한 증류수를 넣어 반응액이 11 μ l의 부피가 되게 조정하고 실온에서 15분간 배양하여 오염되었는지 모를 DNA를 제거하였다. 반응 후 1 μ l의 반응액을 따로 분리하고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 PCR 반응을 하였다. 10 μ l의 반응액에 1 μ l의 0.5 μ g/ μ l의 올리고(dT)12-18 프라이머(Oligo(dT)12-18 primer)를 첨가한 후 70℃에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4 μ l의 5× 첫번째 가닥 완충액(first strand buffer), 1 μ l의 10 mM 각각의 데옥시-뉴클레오타이드 트리-포스페이트(deoxy-nucleotide tri-phosphates, dNTPs), 2 μ l의 0.1M 디티오프레이톨(Dithiothreitol, DDT), 1 μ l의 200 U/ μ l M-MLV 역전사효소(Reverse Transcriptase), 0.5 μ l의 40 U/ μ l 리보뉴클레아제1(Ribonuclease1, RNase) 억제제, 5.5 μ l의 DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 μ l로 만들고 37℃에서 60분간 배양하여 단일 가닥 cDNA(single strand cDNA)를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72℃에서 15분간 배양하여 효소를 불활성화하였다.

[0079] 8) 실시간 중합효소연쇄반응(Realtime PCR)

[0080] 각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 1 μ l의 cDNA에 12.5 μ l의 2 $\times$ SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(SYBR Green PCR Master Mix), 각각 1.5 μ l의 5 μ M 센스(sense), 안티센스(antisense) 프라이머(Genotech co. Daejun, Korea), 8.5 μ l의 증류수를 넣어 25 μ l가 되게 한 후 유전자 Amp 5700 시퀀싱 디텍션 시스템(Gene Amp 5700 Sequence Detection System)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 최초 변성(denaturation)한 후 95 $^{\circ}$ C 15초, 62 $^{\circ}$ C 45초로 40 사이클(cycle) 반복하였다. β -액틴(β -actin), 타입-1-프로콜라겐(type-1-procollagen), 금속단백분해효소-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1), 피브로넥틴(fibronectin)의 유전자 프라이머 시퀀스는 하기 표 1과 같다.

[0081] cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 연속 희석(serial dilution)한 후 각 농도당 3개씩 PCR하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 증폭(amplification)이 한계점(threshold)에 도달한 사이클 넘버(Cycle number, Ct)를 기준으로 표준 곡선(standard curve)을 그려서 정량하였고 각 유전자의 발현량은 글리세르알데히드-3-인산 수소 이탈효소(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)의 발현량을 이용하여 정량화하였다. PCR 반응의 종료 후 60 내지 95 $^{\circ}$ C 사이에서의 온도별 신호(signal)를 측정하여 해리곡선(dissociation curve)을 작성하고 피크(peak)가 하나인지를 확인하였고 더불어 2% 아가로스 겔(agarose gel)에서 밴드의 크기를 확인함으로써 비특이적 PCR 생성물이나 프라이머 이합체(primer dimer) 등이 없는지 확인하였다.

표 1

유전자	방향	프라이머	예상 크기(bp)	서열번호
Type I-procollagen	Forward	GCT TCA CCT ACA GCG TCA CT	306	1
	Reverse	AAG CCG AAT TCC TGG TCT GG		2
MMP-1	Forward	GAT GTG GAG TGC CTG ATG TG	298	3
	Reverse	TGC TTG ACC CTC AGA GAC CT		4
Fibronectin	Forward	ACT CTG ACA GGC CTC ACC A	478	5
	Reverse	GTG TAG GGG TCA AAG CAC GA		6
β -actin	Forward	AAT CTG GCA CCA CAC CTT CTA C	318	7
	Reverse	ATA GCA CAG CCT GGA TAG CAA C		8

[0083] 그런 후, 2% 아가로스 겔에서 PCR 반응액 5 μ l를 로딩(loading)하고 1 $\times$ TAE buffer(40 mM Tris, 20 mM 아세트이트(acetate) pH 8.1, 2 mM 에틸렌디아민타트라세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 포함)에서 100 볼트(volt)로 30분 동안 전기영동한 후 타입-1-프로콜라겐, MMP-1, 피브로넥틴 유전자의 발현량을 확인하였다.

[0085] 4. 생체 내 실험(동물 실험)

[0086] 1) 실험동물 및 상처 유발

[0087] 생후 6주령의 수컷 Sprague-Dawley (SD) rat(180 내지 200g)를 대한 바이오링크(Daehan biolink, Eumsung, Chungbuk)로부터 분양받아 1주간 특정병원체 부재 무균 사육실에서 사육하였다. 온도는 22 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C, 습도는 50 $\pm$ 5%, 명암주기 12시간 밤과 낮 단위로 조절되는 표준사육 환경에서 적응과정을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험 기간 동안 사료(Purina, 한국)와 물의 양은 제한 없이 공급하였다.

[0088] 실험의 모든 과정은 계명대학교 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인을 얻은 후 원칙을 준수하여 수행하였다.

[0089] 실험군은 각 군당 5마리씩 무작위로 분류하여 증류수(D.W)에 용해한 2% 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose)를 도포한 용매대조군(VC), 퓨시드산나트륨(Fusidate Sodium) 20 mg/g이 함유된 시판연고를 도포한 양성대조군(PC), 1% 아사이베리 열수추출물 도포군(E1), 3% 아사이베리 열수추출물 도포군(E2), 5% 아사이베리 열수추출물 도포군(E3)으로 구성하였다.

[0090] 동물용 전기제모기(electric clipper)를 이용하여 각 시험군의 등 부위를 제모한 후 피부에 요오드팅크를 사용하여 피부 표피를 소독하고 요추에서 외측으로 2 cm 떨어진 등 양쪽 피부에 외과용 11번 메스를 사용하여 20 mm의 원형 결손창을 4개소 만들어 상처를 유발하였다. 상처유발 후 절개 후 2차 치유를 유도하기 위해 절개부위를 멸균 소독된 거즈로 덮어 드레싱 하였다.

- [0091] 상처유발 후 18일간 ABWE를 매일 1회씩 상처부위에 200 μ l를 도포 후 외부 접촉을 최소화하기 위해 멸균된 거즈를 덮고 그 위에 100 μ l를 추가 도포하였고 양성대조군은 푸시드산나트륨(sodium fusidate) 150 mg을 도포하였다
- [0092] 상처 치유의 진행과정은 0, 3 또는 6일에 시료도포 전 디지털 카메라를 이용해 각 군별로 일정거리에서 촬영하여 상처의 변화를 육안으로 관찰하였다. 각 군의 표피 또는 진피의 치유 정도를 병변 없음(no lesion (-)), 양호(mild (+)), 중도(moderate (++)), 심각(severe (+++))으로 주관적 판정하였다.
- [0094] **2) 헤마톡실린 & 에오신(Hematoxylin & eosin, H&E) 염색**
- [0095] 절취한 상처 부위의 조직을 10% 중성 포르말린용액에 24시간 고정한 다음 통상적인 방법에 따라 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 두께 4 μ m로 절편을 만들어 H&E 염색한 후 광학현미경으로 표피의 두께, 염증 세포 침윤 등 피부조직의 변화를 관찰하였다.
- [0097] **3) 톨루이딘 블루(Toluidine blue) 염색**
- [0098] 절취한 상처 부위의 조직을 10% 중성 포르말린용액에 24시간 고정한 다음 통상적인 방법에 따라 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 두께 4 μ m로 절편을 만들어 톨루이딘 블루 염색한 후 광학현미경으로 진피 내 비만세포(mast cell)의 분포를 관찰하였다.
- [0100] **4) 메이슨 트리크롬(Masson' s trichrome) 염색**
- [0101] 절취한 상처 부위의 조직을 10% 중성 포르말린용액에 24시간 고정한 다음 통상적인 방법에 따라 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 두께 4 μ m로 절편을 만들어 메이슨 트리크롬 염색한 후 광학현미경으로 표피의 두께, 염증 세포 침윤 등 피부조직의 변화를 관찰하였다.
- [0103] **5) 피부조직의 Total RNA의 분리 및 cDNA 합성**
- [0104] 적출한 피부조직에 트리졸 용액(Trizol solution)을 800 μ l을 넣고 균질기를 이용하여 피부조직을 갈아준 후 tube로 옮겨 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 160 μ l의 클로로포름(chloroform)을 첨가하여 가볍게 섞은 후(vortex) 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4℃에서 12,000xg의 속도로 15분간 원심분리하였다.
- [0105] 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 여기에 동일한 양으로 250 μ l의 아이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4℃에서 12,000 xg의 속도로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 펠렛(pellet)을 75% 에탄올(ethanol)로 세척한 후 4℃에서 12,000xg의 속도로 8분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 펠렛을 건조하고 250 μ l의 디에틸피로카르보네이트(diethylpyrocabonate, DEPC)가 처리된 증류수에 녹여 분광광도계(spectrophotometer, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 0.25 μ g/ μ l의 농도로 정량하였다.
- [0106] 이를 이용하여 상기 실시예 1의 3 중 7의 방법을 따라 cDNA를 합성하였다.
- [0108] **6) RT-PCR**
- [0109] 각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 RT-PCR을 실시하였다. cDNA 1 μ l, dNTP 2 μ l, Hot ntaq buffer 2 μ l, Hot ntaq 0.2 μ l, 프라이머(Forward) 0.5 μ l, 프라이머(Reverse) 0.5 μ l를 넣고 총 용량을 20 μ l로 맞추는 다음 각 유전자의 반응시간 조건에 맞추어 반응시켰다. β -액틴, 타입-1-프로콜라겐, 혈관내피세포성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), MMP-1, 표피브로넥틴, 인터루킨-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 및 종양괴사인자- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)의 프라이머는 하기 표 2와 같다.

표 2

유전자	방향	프라이머	예상 크기(bp)	서열번호
Type-1-collagen	Forward	TTC TCC TGG TAA AGA TGG TGC	254	9
	Reverse	TGT TAA AGG TGA TGC TGG TCC		10
VEGF	Forward	AGT CTT GCC AAT GTG GAC TC	515	11
	Reverse	GGC AGT GGA TTC TCA TCT TG		12
MMP-1	Forward	TGG GAT TTC CAA AAG AGG TG	121	13
	Reverse	ACG TGG TTC CCT GAG AAG A		14
Fibronectin	Forward	AGC TCA TCA GCA TCC AGC AG	255	15
	Reverse	ACT GTG GCT CAT CTC CCT CC		16
IL-1 β	Forward	CCC AAG CAA TAC CCA AAG AA	52	17
	Reverse	GCT TGT GCT CTG CTT GTG AG		18
TNF- α	Forward	ATC TTC TCG AAC CCC GAG TG	51	19
	Reverse	GGG TTT GCT ACA ACA TGG GG		20
β -actin	Forward	CAC CCG CGA GTA CAA CCT TC	207	21
	Reverse	CCC CAT ACC CAC CAT CAC ACC		22

그런 후, 2% 아가로스 겔에서 PCR 반응액 5 μ l를 로딩(loading)하고 1 $\times$ TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM 아세트레이트(acetate) pH 8.1, 2 mM 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA))에서 100 볼트(volt)로 30분 동안 전기영동한 후 후 사이즈 마커를 기준으로 발현 밴드를 확인하였다

<실시예 2> ABWE의 엘라스타아제(Elastase) 활성 억제 확인

엘라스타아제는 피부 탄력을 관장하는 엘라스틴(Elastin)을 분해하는 단백질 분해 효소이며, 엘라스타아제는 콜라겐(collagen), 피브리노겐(fibrinogen) 면역계 및 혈전 인자를 분해하고, 외부에서 침입하는 미생물을 파괴한다.

특히 상처 치료에 있어서, 손상된 세포를 제거하여 세포 재생에 필요한 공간을 제공하는 역할을 한다.

ABWE의 엘라스타아제(Elastase) 활성 억제 효과를 확인한 결과 도 1과 같이, ABWE를 12.5 mg/mL의 저농도로 처리한 경우에도 대조군인 아스코르브산에 비하여 더 작은 엘라스타아제 활성 억제 효과를 보였다.

특히, 1,000 ppm의 농도에서 ABWE는 21.7%의 억제 활성을 보였다.

<실시예 3> ABWE의 콜라게나아제(아교질가수분해효소, Collagenase) 활성 억제 확인

ABWE의 콜라게나아제(Collagenase) 활성 억제 효과를 확인한 결과 도 2와 같이, ABWE 및 대조군인 아스코르브산은 12.5 mg/mL의 저농도로 처리한 경우에는 비슷한 억제 활성을 보였지만, 2.5 mg/mL의 농도로 처리한 경우 ABWE가 더 작은 억제 활성을 보였다.

특히, 1,000 ppm의 농도에서 ABWE는 56.4%의 억제 활성을 보였다.

<실시예 4> ABWE가 HS68 세포의 증식에 미치는 영향 확인

HS68 세포에 0.1, 0.3 또는 1 mb/mL의 농도의 ABWE를 처리하여 농도에 따른 세포의 생존율을 확인하여 도 3 중 A에 나타내었다.

더불어 1000 ppm 농도의 아사이베리 열수추출물을 처리한 후, 시간별 증식 정도를 확인하여 도 3 중 B에 나타내었다.

그 결과 농도 의존적으로 세포의 증식이 증가하였으며, 같은 농도의 ABWE를 처리한 경우에도 시간 의존적으로 세포의 증식이 증가하였다.

[0127] 따라서 본 발명의 ABWE는 독성을 보이지 않는 것을 확인하였다.

[0129] <실시예 5> ABWE가 HS68 세포의 이동성에 미치는 영향 확인

[0130] 상처치유 중에 세포 이동은 가장 중요한 역할로 알려져 있으므로, 세포 이동에 ABWE가 미치는 영향을 확인하기 위해 스크래치 상처 분석(scratch wound assay)을 실시하였다.

[0131] 배양한 정상 인간 섬유아 세포(Normal human fibroblast cell)인 HS68 세포에 스크래치를 내고 ABWE를 2시간 동안 농도별로 처리한 결과 도 4와 같이, ABWE를 처리하지 않은 군보다 ABWE를 처리한 군에서 scratch 부위로 세포이동이 더 활발한 것을 확인하였다.

[0133] <실시예 6> ABWE 처리에 따른 상처 치유와 관련된 유전자의 mRNA 발현 변화 분석

[0134] ABWE 처리에 따른 HS68 세포의 타입-1-프로콜라겐, MMP-1 및 피브로넥틴 mRNA 발현량을 측정하여 도 5에 나타내었다.

[0135] 상기 피브로넥틴은 '세포외막단백질(Extracellular Matrix Protein)'로 훼손된 피부나 조직에서 손상된 부위를 덮어준다.

[0136] 이후 세포들이 손상 부위를 덮은 세포외막단백질의 '그물망'에 붙어 성장하면서 상처가 회복된다.

[0137] 더불어 상기 타입-1-프로콜라겐 및 MMP-1은 콜라겐 매트릭스(collagen matrix)를 분해하고 리모델링하는 효소이다.

[0138] 아사이베리 추출물을 농도별로 처리했을 때 타입-1-프로콜라겐과 피브로넥틴은 농도 의존적으로 유의하게 증가하였지만, MMP-1은 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0140] <실시예 7> ABWE 처리에 따른 상처 치료 효과 확인

[0141] ABWE를 처리한 피부 상처의 육안적 치유 과정을 관찰하였다. 상처의 정도를 평가하여 하기 표 3에 나타내었고, 치유 과정을 사진으로 찍어 도 6에 나타내었다.

표 3

[0142]

	Groups				
	PC	VC	E1	E2	E3
Day 0	+++	+++	+++	+++	+++
Day 6	++	++	++	++	++
Day 12	++	++	+	+	+
Day 18	+	+	-	-	-

[0143] 상기 표 3과 같이, 상처 유발 6일째까지는 각 시험군이 유사한 치유 효과를 보였지만, 12일째에서 ABWE 도포군인 E1, E2 또는 E3의 상처 치유 효과가 더 좋은 것을 확인할 수 있었다.

[0144] 더불어 도 6를 참고하면 피부 상처유발 당일에는 모든 군에서 염증과 삼출액이 분비되는 급성, 염증성 변화가 나타나기 시작했다. 상처 유발 6일째부터 상처크기의 변화가 확실하게 관찰되었고, 특히 용매대조군에 비해 아사이베리 열수추출물 도포군에서 상처반경이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 상처유발 12일 경과 후부터는 삼출액 분비가 거의 없었으며, 상처반경이 현저하게 감소하면서 상처가 회복되기 시작하였다. 상처유발 18일째에는 모든 군에서 재상피화가 일어났고 상처의 반흔이 형성되었다. 상처유발 12일에서 아사이베리 열수추출물 도포군은 반흔의 모양을 관찰 할 수 있었고, 18일에서는 대조군에 비해 아사이베리 열수추출물 도포군에서 반흔의 크기가 현저하게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 특히, 용매대조군에 비해 E3 군에서 반흔은 거의 관찰되지 않았다.

[0146] <실시예 8> 간 및 비장 무게 측정

[0147] 더불어 각 시험군의 마우스로부터 간, 비장(spleen)을 적출하고, 이를 생리식염수로 씻어내고 여과지로 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다.

[0148] 그 결과 도 7과 같이, 간의 무게(A)는 모든 군에서 유의한 차이가 없었지만, 비장의 무게(B)는 증가된 것을 확인하였다.

[0150] <실시예 9> ABWE 처리에 따른 피부 상처의 혈액학적 변화

[0151] 실험 종료 후 안락사하고 부검 시 심장에서 채혈을 실시하였다. 채혈한 혈액은 EDTA 튜브에 넣어 혈액분석기를 통해 호중구(neutrophil), 림프구(lymphocyte), 단핵구(monocyte), 호산구(eosinophil) 및 호염구(basophil)를 분석하여 염증세포의 침윤변화를 관찰하였다.

[0152] 그 결과 도 8과 같이, 대조군에 비하여 ABWE 도포군인 E1, E2 또는 E3의 호중구, 림프구 및 단핵구의 수치가 감소한 것을 확인하였다.

[0154] <실시예 10> ABWE 처리에 따른 조직학적 변화 관찰

[0155] ABWE를 처리한 후, 피부 상처의 표피간격 및 염증관련 세포를 관찰하였다.

[0156] 그 결과 도 9과 같이, 대조군에 비해 ABWE를 처리한 시험군에서 표피와 진피층 배열이 규칙적이고 염증이 개선된 양상을 확인하였다.

[0157] 더불어 피부 상처의 진피층 내 콜라겐의 양과 형태를 관찰하였다.

[0158] 그 결과 도 10과 같이, 대조군에 비해 ABWE를 처리한 시험군은 콜라겐의 밀도가 조밀하고 배열이 규칙적인 것을 확인하였다.

[0159] 더불어 ABWE를 처리한 후, 피부 상처의 비만 세포의 분포 양상을 관찰하였다.

[0160] 그 결과 도 11과 같이, 대조군에 비해 ABWE를 처리한 시험군은 비만 세포의 수가 다소 적은 것을 확인하였다.

[0161] 비만 세포는 히스타민 등 염증 매개체(mediator)를 포함하는 과립을 가지고 있다. 때문에 비만 세포가 활성화되면, 탈과립에 의해 과립 내부의 염증 매개체가 유리되면서 염증 반응이 일어난다. 때문에 ABWE를 처리한 시험군은 비만 세포의 수가 적기 때문에 염증이 개선되었다고 판단하였다.

[0163] <실시예 11> 피부 조직에서 상처치유 관련 유전자의 발현 확인

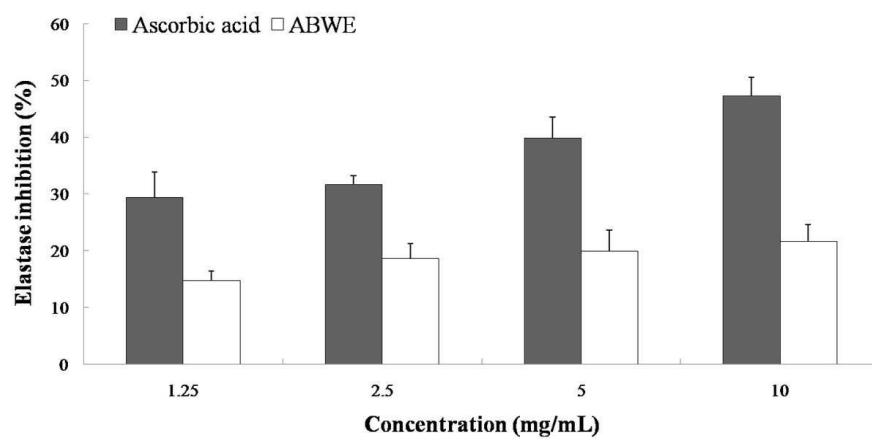
[0164] 상처난 피부 조직에서 상처치유 관련 유전자의 발현을 확인한 결과 도 12와 같이, 상기 실시예 6에서 확인한 도 5의 결과와 마찬가지로, 대조군에 비해 5% ABWE 군의 타입-1-프로콜라겐, 피브로넥틴의 발현량은 크게 증가되었으며, 더불어 VEGF의 발현도 크게 증가된 것을 확인하였다.

[0165] 반면, 염증 반응과 관련된 IL-1 β 의 발현은 크게 감소하는 모습을 보였고, MMP-1 및 TNF- α 는 유의한 변화를 보이지 않았다.

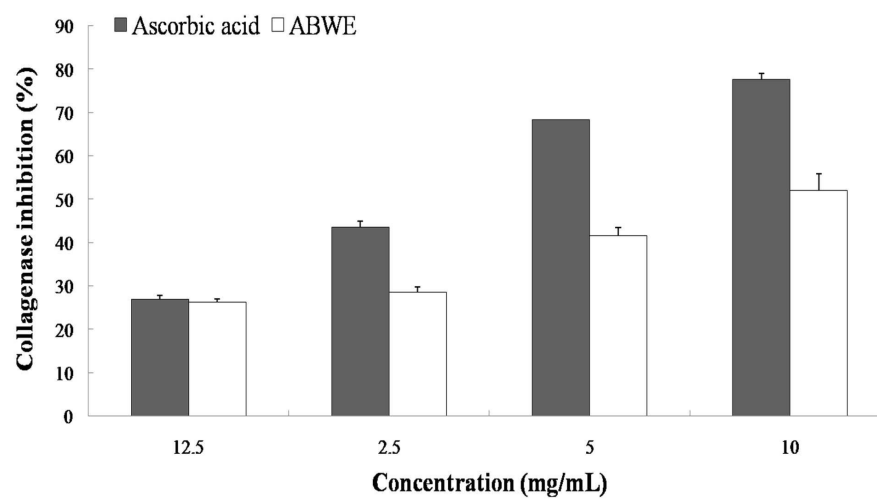
[0167] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백한 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

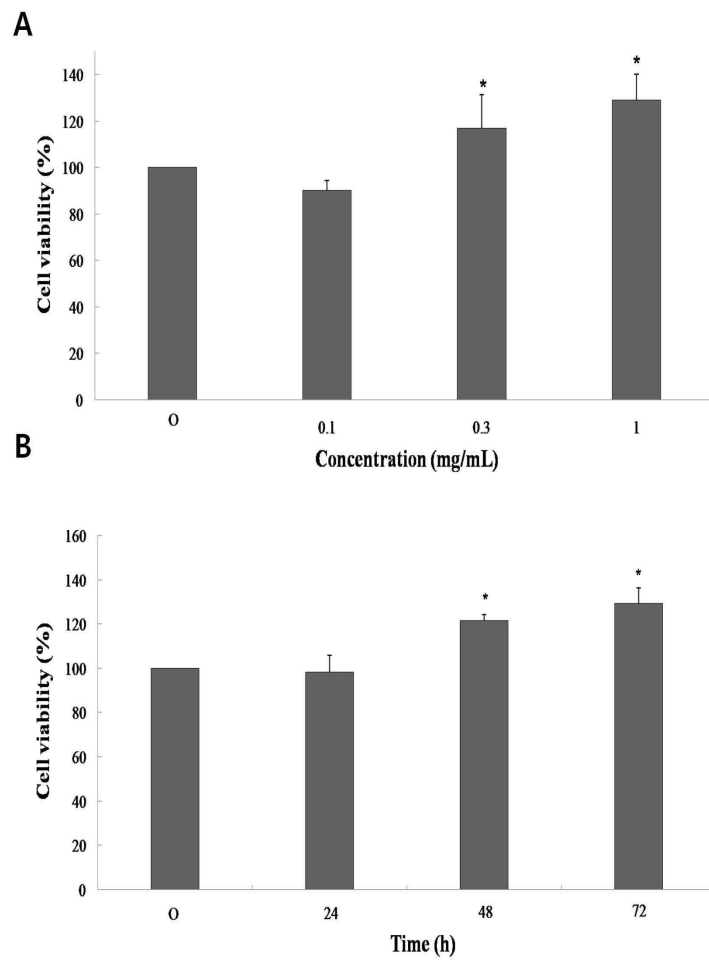
도면1



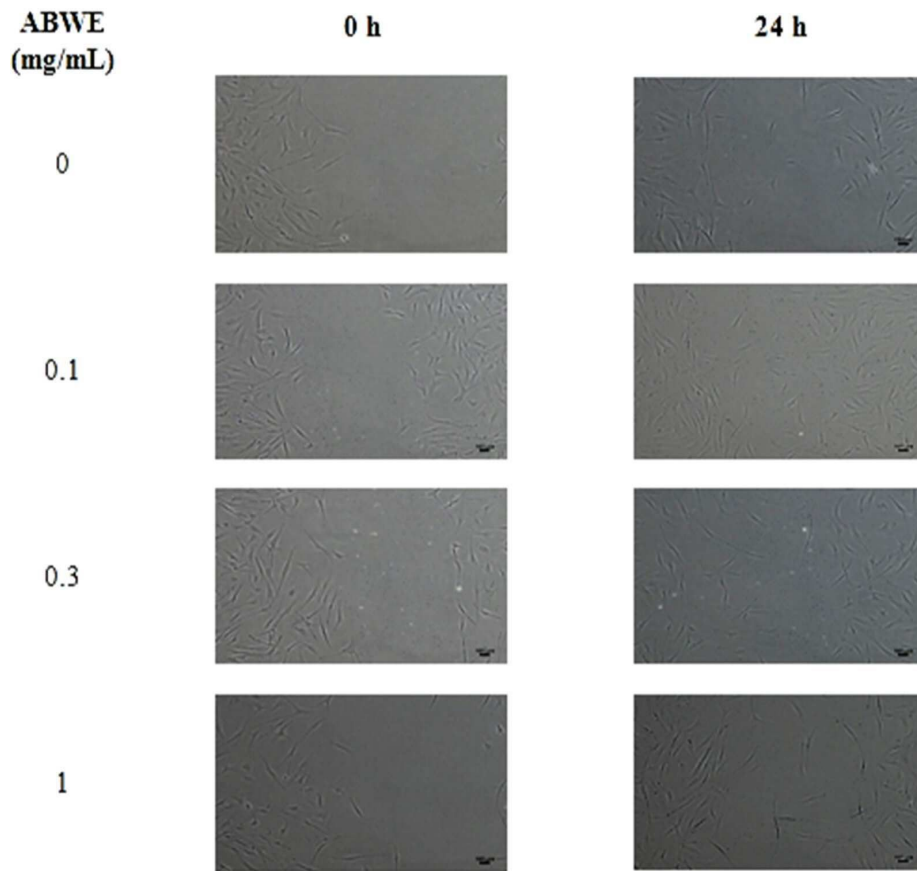
도면2



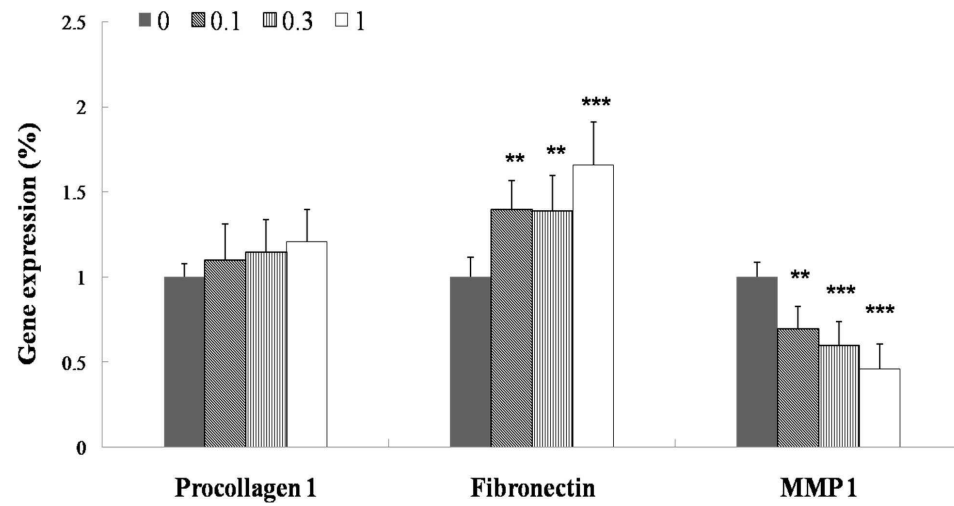
도면3



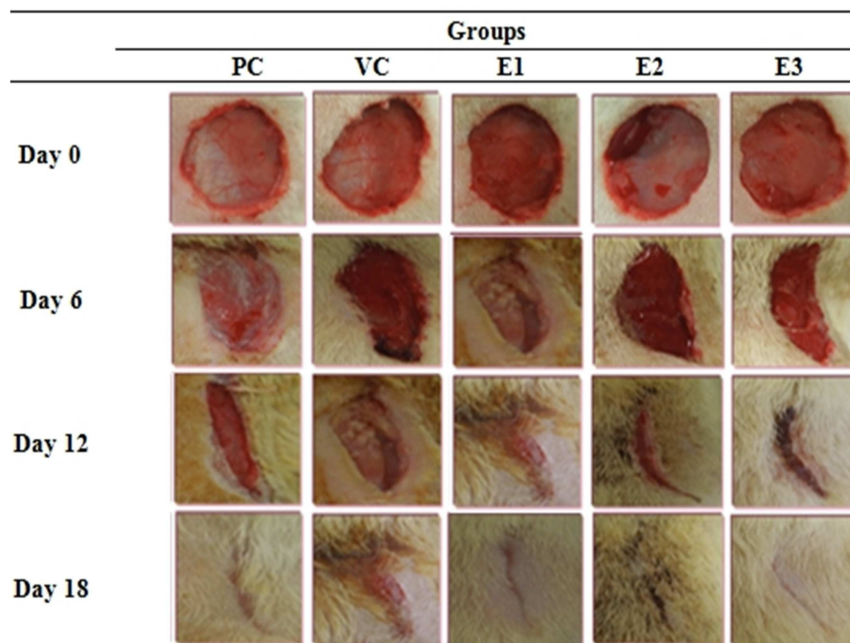
도면4



도면5

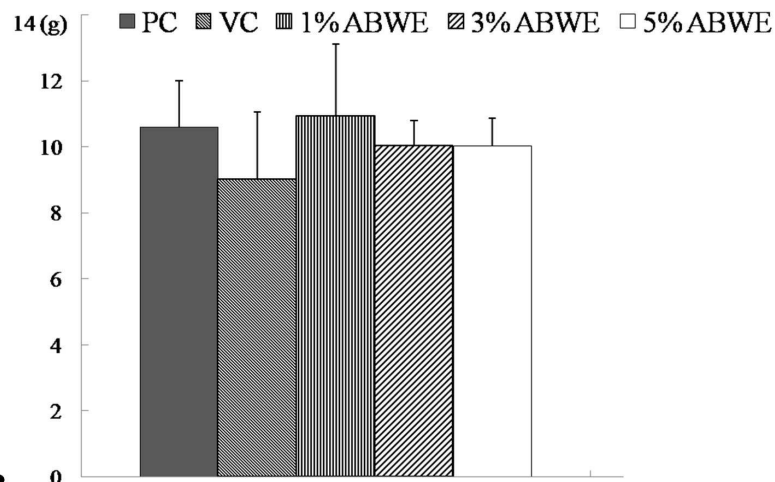


도면6

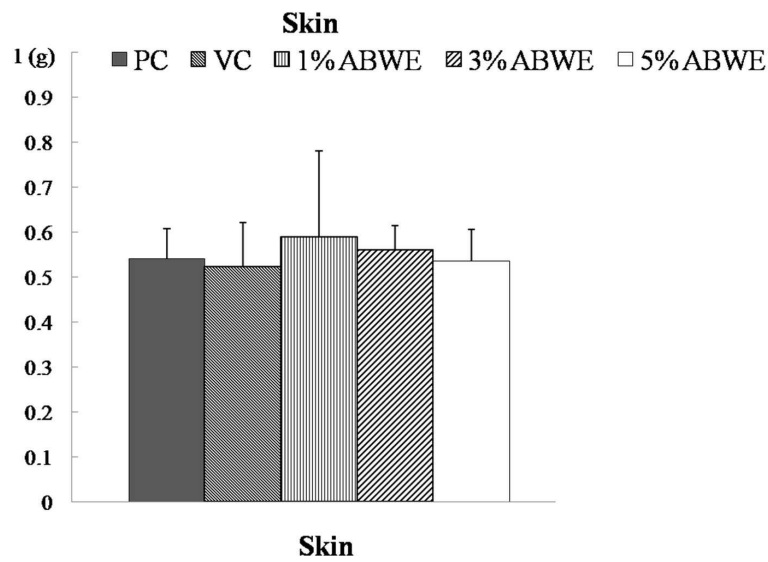


도면7

A



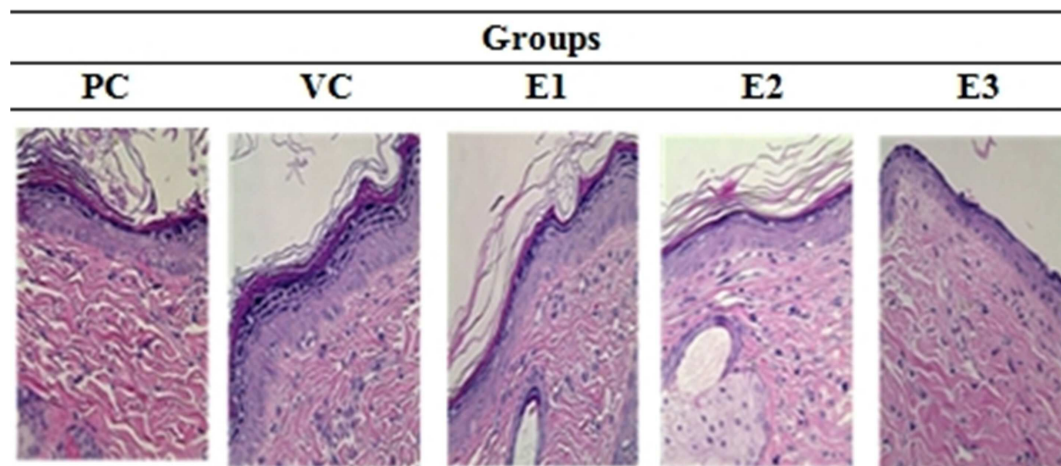
B



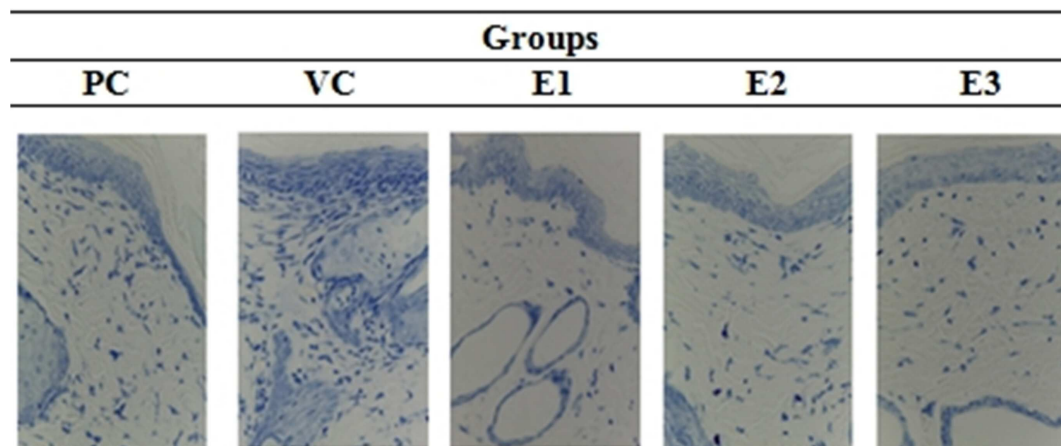
도면8

Items	Groups				
Items	PC	VC	E1	E2	E3
WBC	14.87±2.05	9.85 ±0.10	8.58 ±1.46	13.38±0.31	10.87±2.51
Neutrophil	28.10±9.89	26.20±0.28	22.00±0.98	13.75 ±4.17	18.55 ±1.20
Lymphocyte	84.25±0.21	74.35±6.71	56.25 ±0.35	70.05±11.95	69.90±10.04
Monocyte	4.10 ±0.28	6.35 ±1.06	2.65 ±0.21	3.95 ±1.62	2.00 ±0.28
Eosinophil	1.50 ±0.42	1.95 ±0.07	1.25 ±0.77	1.45 ±0.07	1.45 ±0.21
Basophil	0.10±0.00	0.10 ±0.00	0.10 ±0.00	0.15 ±0.07	0.10 ±0.00

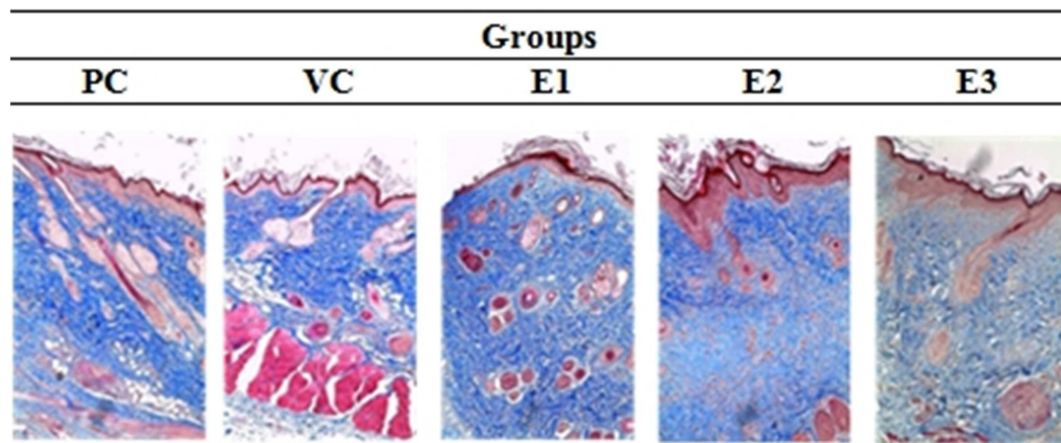
도면9



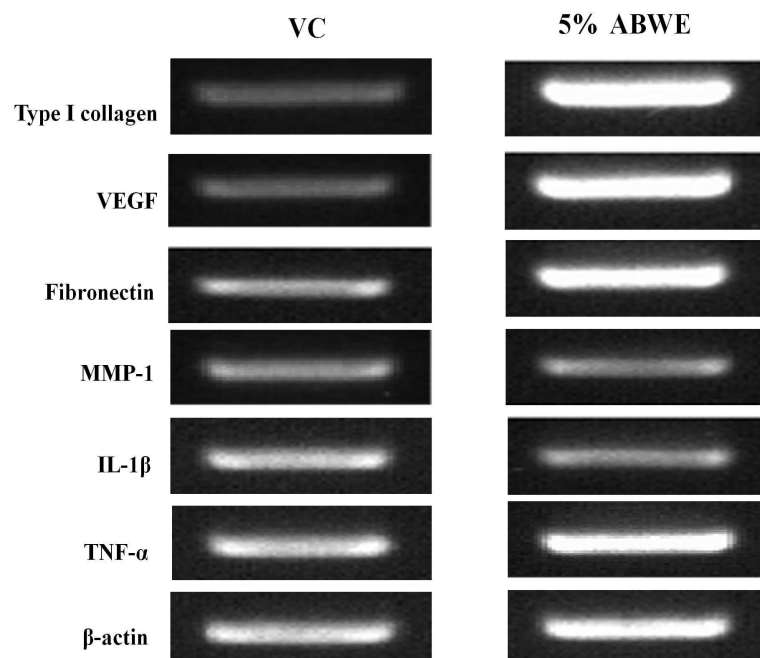
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY
- <120> Composition for wound-healing comprising acai berry extract
- <130> ADP-2015-0294
- <160> 22
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Type I-procollagen primer_forward

<400> 1
gcttcaccta cagcgtcact 20
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Type I-procollagen primer_reverse

<400> 2
aagccgaatt cctggctctgg 20
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> MMP-1 primer_forward

<400> 3
gatgtggagt gcctgatgtg 20
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> MMP-1 primer_reverse

<400> 4
tgcttgaccc tcagagacct 20
<210> 5
<211>
> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Fibronectin primer_forward

<400> 5
actctgacag gcctcacca 19
<210> 6
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fibronectin primer_reverse

<400> 6

gtgtaggggt caaagcacga 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-actin primer_forward

<400> 7

aatctggcac cacaccttct ac 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-actin primer_reverse

<400> 8

atagcacagc ctggatagca ac 22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Type-1-collagen primer_forward for RT-PCR

<400> 9

ttctcctggt aaagatgggtg c 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Type-1-collagen primer_reverse for RT-PCR

<400> 10

tgttaaaggt gatgctgggtc c 21

<210> 11

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VEGF primer_forward for RT-PCR
 <400> 11
 agtcttgcca atgtggactc 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <
 220><223> VEGF primer_reverse for RT-PCR
 <400> 12
 ggcagtgatg tctcatcttg 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-1 primer_forward for RT-PCR
 <400> 13
 tgggatttcc aaaagaggtg 20
 <210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-1 primer_reverse for RT-PCR
 <400> 14
 acgtggttcc ctgagaaga 19
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fibronectin primer_forward for RT-PCR
 <400> 15

agctcatcag catccagcag	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Fibronectin primer_reverse for RT-PCR	
<400> 16	
actgtggctc atctccctcc	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-1beta primer_forward for RT-PCR	
<400> 17	
cccaagcaat acccaaagaa	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-1beta primer_reverse for RT-PCR	
<400> 18	
gcttgtgctc tgcttgtgag	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TNF-alpha primer_forward for RT-PCR	
<400> 19	
atcttctcga accccgagtg	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> TNF-alpha primer_reverse for RT-PCR
 <400> 20
 gggtttgcta caacatgggg 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-actin primer_forward for RT-PCR
 <400> 21
 caccgcgag tacaaccttc 20
 <210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> beta-actin primer_reverse for RT-PCR
 <400> 22
 ccccatacc accatcacac c 21