

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0043757
(43) 공개일자 2025년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/07 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61P 1/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/07 (2024.05)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0126870

(22) 출원일자 2023년09월22일

심사청구일자 2023년09월22일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

구본혁

서울특별시 강동구 고덕로 333, 고덕그라시움 114동 201호

남상수

서울특별시 강동구 동남로 892, 강동경희대학교병원 안면마비센터

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인지담

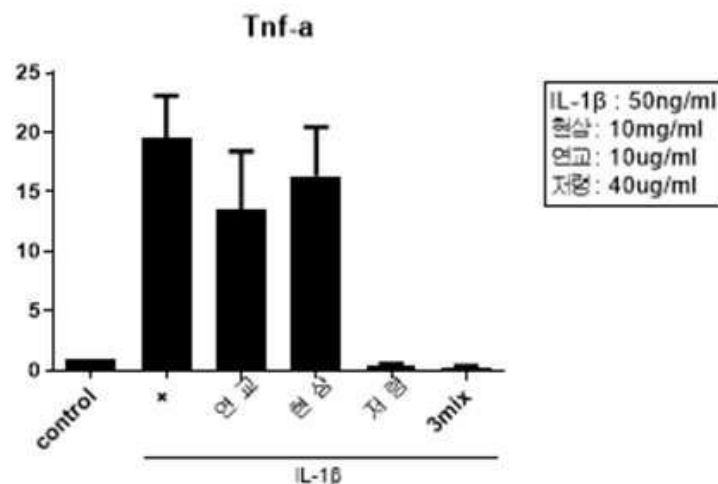
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 치주 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 치주 질환의 예방 또는 개선용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 본 발명은 저령 또는 저령, 연교 및 현삼의 혼합 추출물을 포함하여, 항염증 효과가 우수한 바, 치주 질환을 예방, 치료 또는 개선하는데 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61P 1/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/312 (2013.01)
A23V 2250/208 (2013.01)

(72) 발명자

박연철

서울특별시 강동구 동남로 892, 강동경희대학교병원
 관절류마티스센터

김정현

서울특별시 강동구 동남로 892, 강동경희대학교병원
 안면마비센터

박진봉

서울특별시 도봉구 덕릉로 349, 406 동 201 호

박경주

서울특별시 서초구 방배로 14, 임광아파트 3-802

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711154522
과제번호	2020R1F1A1071927
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	치주염에서 한약물이 조직 특이적 면역 체계 및 구강 내 미생물 군집에 미치는 영향
및 기전에 대한 연구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	강동경희대학교병원
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

저령(*Polyporus umbellatus*) 추출물을 포함하는 치주 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 저령 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 저령 추출물은 IL-6, IL-10, IL-17 또는 TNF- α 의 발현을 감소시키는 것인, 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 연교(*Forsythiae Fructus*) 추출물 또는 현삼(*Scrophularia buergeriana*) 추출물을 더 포함하는, 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 조성물은 연교 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 현삼 추출물을 1 mg/ml 내지 20 mg/ml 의 농도로 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 치주질환은 치주염, 치은염, 치조골 파괴, 치조골다공증, 치조골연화증, 치조골감소증, 치조골형성장애, 잇몸출혈 또는 잇몸염증으로 인한 구취인, 약학 조성물.

청구항 7

저령(*Polyporus umbellatus*) 추출물을 포함하는 치주 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 건강기능식품은 저령 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 것인, 건강기능식품.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 저령 추출물은 IL-6, IL-10, IL-17 또는 TNF- α 의 발현을 감소시키는 것인, 건강기능

식품.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 건강기능식품은 연교(*Forsythiae Fructus*)추출물 또는 현삼(*Scrophularia buergeriana*) 추출물을 더 포함하는, 건강기능식품.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 건강기능식품은 연교 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 현삼 추출물을 1 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 포함하는 것인, 건강기능식품.

청구항 12

청구항 7에 있어서, 상기 치주질환은 치주염, 치은염, 치조골 파괴, 치조골다공증, 치조골연화증, 치조골감소증, 치조골형성장애, 잇몸출혈 또는 잇몸염증으로 인한 구취인, 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치주 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 일반적으로 '풍치'라고 알려져있는 치주질환은 증상의 정도에 따라 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)으로 나뉜다. 잇몸에 생긴 염증이 비교적 가볍고, 회복이 상대적으로 빠른 치주질환을 치은염이라고 하고, 이러한 염증이 잇몸과 치아를 지지해주는 뼈인 치조골을 포함한 치주조직까지 상태를 치주염이라고 한다. 치주질환은 잇몸과 치아 사이의 V자 모양의 홈(sulcus)의 잇몸 아랫부분이 세균으로부터 공격당해 치주인대와 인접 조직이 손상되는 것을 말한다. 염증이 진행될수록 홈은 치주낭(periodontal pocket)으로 발전하게 되고, 치주염의 정도가 심할수록 치주낭의 깊이도 깊어진다. 치주낭이 깊어지게 되면, 인접하는 치주인대에 염증이 생기게 되며 더욱 진행되면 골 소실까지 일으키기도 한다.

[0004] 이처럼 치주염이 진행되면 치아 상실까지 이어지게 되어, 40세 이후 성인에서 치아를 뽑게 되는 원인 중 치주염이 40%를 차지한다는 보고가 있어, 치주염은 성인의 삶의 질에도 큰 영향을 주는 심각한 문제임을 알 수 있다.

[0005] 현재까지 치주질환의 치료는 환자 개인의 구강위생의 개선이나 외과적인 방법을 통한 치주 조직의 재생술로 이루어져 있다. 하지만, 외과적인 치료방법은 환자가 병원을 방문해야하는 번거로움과 함께 어느정도 염증이 진행된 이후에 적용된다는 점에서 제한점이 있다. 보조적인 치료방법으로 전신적인 항생제 또는 국소 서방형 제제의 이용되고 있지만, 이는 의도하지 않은 부작용을 일으킬 수 있고 최근에는 항생제에 대한 내성을 나타내는 치주질환균이 발견되어 제한점이 있다.

[0006] 이러한 배경하에서, 이러한 종래의 문제들을 해소하기 위한 제제로, 천연물을 활용한 치주질환 치료제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나(한국공개특허 10-2015-0145332), 대개의 경우, 빈약한 항균 효과를 가지거나 단순히 소염, 수렴, 지혈, 혈액순환 촉진과 같은 추상적인 효능을 통하여 치주질환의 발생을 예방한다는 정도만을 나타내고 있는바, 실제 치주질환의 치료제로 활용함에는 어려움이 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2015-0145332호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 치주 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 치주 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일실시예는 저령(*Polyporus umbellatus*) 추출물을 포함하는 치주 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물은 저령 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 저령 추출물은 IL-6, IL-10, IL-17 또는 TNF- α 의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물은 연교(*Forsythiae Fructus*) 추출물 또는 현삼(*Scrophularia buergeriana*) 추출물을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물은 연교 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 현삼 추출물을 1 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 치주질환은 치주염, 치은염, 치조골 파괴, 치조골다공증, 치조골연화증, 치조골감소증, 치조골형성장애, 잇몸출혈 또는 잇몸염증으로 인한 구취상기 치주질환은 치주염, 치은염, 치조골 파괴, 치조골다공증, 치조골연화증, 치조골감소증, 치조골형성장애, 잇몸출혈 또는 잇몸염증으로 인한 구취일 수 있다.

[0020] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 저령(*Polyporus umbellatus*) 추출물을 포함하는 치주 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0021] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 건강기능식품은 저령 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 저령 추출물은 IL-6, IL-10, IL-17 또는 TNF- α 의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 건강기능식품은 연교(*Forsythiae Fructus*) 추출물 또는 현삼(*Scrophularia buergeriana*) 추출물을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 건강기능식품은 연교 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 현삼 추출물을 1 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 치주질환은 치주염, 치은염, 치조골 파괴, 치조골다공증, 치조골연화증, 치조골감소증, 치조골형성장애, 잇몸출혈 또는 잇몸염증으로 인한 구취상기 치주질환은 치주염, 치은염, 치조골 파괴, 치조골다공증, 치조골연화증, 치조골감소증, 치조골형성장애, 잇몸출혈 또는 잇몸염증으로 인한 구취일 수

있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 치주 질환의 예방 또는 개선용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 본 발명은 저령 또는 저령, 연교 및 현삼의 혼합 추출물을 포함하여, 항염증 효과가 우수한 바, 치주 질환을 예방, 치료 또는 개선하는데 유용하게 활용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도1은 인체치은섬유아세포(HGF-1)에서 저령 추출물의 농도별 세포독성을 나타낸 그래프이다.
 도2는 인체치은섬유아세포(HGF-1)에서 연교 추출물의 농도별 세포독성을 나타낸 그래프이다.
 도3은 인체치은섬유아세포(HGF-1)에서 현삼 추출물의 농도별 세포독성을 나타낸 그래프이다.
 도4는 저령 추출물, 연교 추출물, 현삼 추출물 단독, 및 저령, 연교 및 현삼 추출물의 혼합물의 처리에 따른 IL-6 mRNA 발현량의 변화를 나타낸 그래프이다.
 도5는 저령 추출물, 연교 추출물, 현삼 추출물 단독, 및 저령, 연교 및 현삼 추출물의 혼합물의 처리에 따른 IL-10 mRNA 발현량의 변화를 나타낸 그래프이다.
 도6는 저령 추출물, 연교 추출물, 현삼 추출물 단독, 및 저령, 연교 및 현삼 추출물의 혼합물의 처리에 따른 IL-17 mRNA 발현량의 변화를 나타낸 그래프이다.
 도7는 저령 추출물, 연교 추출물, 현삼 추출물 단독, 및 저령, 연교 및 현삼 추출물의 혼합물의 처리에 따른 TNF- α mRNA 발현량의 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0034] 본 발명은 치주 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물은 저령 추출물을 포함한다.

[0036] 상기 저령 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당 기술분야에 공지된 방법 및 조건으로 공지된 수단을 이용하여 추출한 것일 수 있다.

[0037] 예를 들어, 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 용매를 사용하여 추출할 수 있으며, 바람직하게는 물 또는 30% 에탄올을 사용할 수 있다. 상기 물은 보건부 기준하여 음용 기준에 적합한 물을 말하는 것으로, 일반적으로 여과기나 정수기 등으로 여과시킨 정제수, 멸균수, 음이온수 등의 물이나 수돗물, 생수 등을 사용할 수 있다. 추출물을 추출하는 방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출, 초음파 추출 등의 다양한 방법을 통하여 추출할 수 있지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0038] 상기 저령 추출물은 예를 들어, 상기 조성물 내 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 범위로 제한되는 것은 아니나, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 초과하여 포함되는 경우, 세포 독성의 우려가 있으며, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만으로 포함되는 경우, 항염증 효과가 떨어져 치주 질환 예방 또는 치료 효과를 효과적으로 얻을 수 없다.

[0039] 상기 저령추출물은 염증 관련 인자의 발현을 감소시켜 치주질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 활용될 수 있으며, 염증 관련 인자는 예를 들어, IL-6, IL-10, IL-17 또는 TNF- α 일 수 있다.

- [0040] 본 발명의 약학 조성물은 연교(Forsythiae Fructus) 추출물 또는 현삼(Scrophularia buergeriana) 추출물을 더 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 연교 추출물은 예를 들어, 조성물 내 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 또한, 상기 현삼 추출물은 예를 들어, 1 mg/ml 내지 20 mg/ml 또는 10 mg/ml 내지 20 mg/ml 의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 범위로 제한되는 것은 아니나, 상한을 초과하는 경우, 세포 독성의 우려가 있으며, 하한 미만으로 포함되는 경우, 항염증 효과가 떨어져 치주 질환 예방 또는 치료 효과를 효과적으로 얻을 수 없다.
- [0042] 상기 치주질환은 치주조직에서 발생하는 일체의 질병을 의미하는 것으로서, 예를 들어, 치주염, 치은염, 치조골 파괴, 치조골다공증, 치조골연화증, 치조골감소증, 치조골형성장애, 잇몸출혈 또는 잇몸염증으로 인한 구취일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함하며, 이는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 한편, 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 이에 한정되는 것이 아니며 1일 당 0.01-2000 mg/kg (체중)일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [0046] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명은 치주 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명의 건강기능식품은 저령추출물을 포함한다.
- [0050] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 연교 추출물 또는 현삼 추출물을 더 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 건강기능식품에 포함되는 천연 추출물, 이의 함량, 효능 및 치주 질환의 종류 또는 증상에 관하여는 전술한 바와 같다.
- [0052] 본 발명의 건강기능식품은 치주 질환의 예방 또는 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 건강기능식품이라 함은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0054] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

- [0055] 상기 식품 첨가물 공전에 수제된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 상기 추출물을 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 추출물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [0057] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 상기 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 상기 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0058] 환 형태의 건강기능식품은 상기 추출물과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0059] 과립 형태의 건강기능식품은 상기 추출물과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0060] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [0061] 상기 건강기능식품은 영양제의 용도로 경구 적용될 수 있으며, 적용 형태는 특별히 제한되지 않는다.

[0063] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0065] 1. 추출물의 제조

[0066] 1-1. 저령 추출물의 제조

[0067] 저령은 Sunilcrudedrugs (Hongcheon, Korea)에서 구입하여 200g을 30% EtOH 2L와 함께 100℃에서 2시간 동안 끓였다. 전탕액을 여과한 후 회전증류농축장치(BUCHI, R-215)를 활용하여 농축한 농축액을 동결건조장치(LABCONCO, 77520-03)를 활용하여 동결건조 분말을 제조하였다. 저령의 수율은 2.6%에 해당하였다.

[0069] 1-2. 연교 추출물의 제조

[0070] 연교는 Sunilcrudedrugs (Hongcheon, Korea)에서 구입하여 200g을 30% EtOH 2L와 함께 100℃에서 2시간 동안 끓였다. 전탕액을 여과한 후 회전증류농축장치(BUCHI, R-215)를 활용하여 농축한 농축액을 동결건조장치(LABCONCO, 77520-03)를 활용하여 동결건조 분말을 제조하였다. 연교의 수율은 37.1%에 해당하였다.

[0072] 1-3. 현삼 추출물의 제조

[0073] 현삼는 Sunilcrudedrugs (Hongcheon, Korea)에서 구입하여 200g을 30% EtOH 2L와 함께 100℃에서 2시간 동안 끓였다. 전탕액을 여과한 후 회전증류농축장치(BUCHI, R-215)를 활용하여 농축한 농축액을 동결건조장치(LABCONCO, 77520-03)를 활용하여 동결건조 분말을 제조하였다. 현삼의 수율은 16.37%에 해당하였다.

[0075] 1-4. 저령, 연교 및 현삼의 혼합 추출물의 제조

[0076] 상기 제조예 1-1, 1-2 및 1-3의 방법으로 제조된 저령, 연교와 현삼을 각각 40 μ g/ml, 10 μ g/ml와 10mg/ml의 농도로 혼합하여 혼합 추출물을 제조하였다.

- [0078] **2. 저령 추출물, 연교 추출물, 현삼 추출물 단독, 및 저령, 연교 및 현삼 추출물의 혼합물의 처리**
- [0079] 2-1. HGF-1(Human Gingival Fibroblast, 인체치은섬유아세포) 세포의 배양
- [0080] 10% 우태아혈청(FBS), 페니실린(100U/ml) 및 스트렙토마이신(100 μ g/ml)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle' medium)배지에 인체치은섬유아세포(HGF-1)를 혼합하여 24 웰 플레이트에 접종하여 37℃ 및 5% CO₂의 조건에서 배양하였다.
- [0082] 2-2. IL-1 β 처리로 염증이 유도된 HGF-1 세포에 저령 추출물, 연교 추출물, 현삼 추출물 단독, 및 저령, 연교 및 현삼 추출물의 혼합물의 처리
- [0083] 상기 2-1의 방법으로 배양된 인체치은섬유아세포에 50ng/ml 농도의 IL-1 β (Interleukin-1 β)와 40 μ g/ml 농도의 상기 1-1에서 수득한 저령 추출물, 10 μ g/ml 농도의 상기 1-2에서 수득한 연교 추출물, 10mg/ml 농도의 상기 1-3에서 수득한 현삼 추출물 및 1-4에서 수득한 저령, 연교, 현삼의 혼합물을 각각 처리하였다. 대조군은 IL-1 β 만 처리하였다.
- [0085] **3. 저령 추출물, 연교 추출물, 현삼 추출물의 세포독성 실험**
- [0086] 3-1. 실험 준비
- [0087] 저령, 연교, 현삼 추출물의 세포 독성을 확인하고자 상기 2-1의 방법으로 배양된 세포에 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 검사를 수행하였다.
- [0089] 3-2. 실험 과정
- [0090] 50ng/ml 농도의 IL-1 β 에 의해 활성화된 인체치은섬유아세포에 저령, 연교, 현삼의 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 배양하였다. Well 당 MTT 용액(2mg/ml)을 100 μ l씩 넣어 37℃, 5% CO₂의 조건에서 1시간 반응시킨 후 배지는 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 well 당 100 μ l씩 넣어 5분간 plate shaker에서 blue formazan 결정을 용해시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 540nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 세포독성을 확인하였다.
- [0092] 3-3. 실험 결과
- [0093] 저령 추출물을 1, 10, 20, 30, 40, 50 μ g/ml의 농도로 HGF-1 세포에 처리한 후 세포 생존율을 관찰하였을 때, 40 μ g/ml의 농도까지는 세포 생존율이 80% 이상이었으나, 50 μ g/ml의 농도 이상에서는 세포독성이 나타났다(도1).
- [0094] 연교 추출물을 1, 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml의 농도로 HGF-1 세포에 처리한 후 세포 생존율을 관찰하였을 때, 모든 농도에서 세포 생존율은 80% 이상으로 나타났다 (도2).
- [0095] 현삼 추출물을 1, 5, 10, 25, 50mg/ml의 농도로 HGF-1 세포에 처리한 후 세포 생존율을 관찰하였을 때, 10mg/ml의 농도까지는 세포 생존율이 80% 이상이었으나, 25mg/ml의 농도 이상에서는 세포독성이 나타났다(도3).
- [0097] **4. 저령 추출물, 연교 추출물, 현삼 추출물 단독, 및 저령, 연교 및 현삼 추출물의 혼합물의 항염 효능 비교**
- [0098] 4-1. 실험 준비
- [0099] 저령 추출물, 연교 추출물, 현삼 추출물 단독, 및 저령, 연교 및 현삼 추출물의 혼합물의 항염 효능을 확인하고자 상기 2-1의 방법으로 배양된 세포에 qRT-PCR (Real-time polymerase chain reaction) 검사를 수행하였다.
- [0101] 4-2. 실험 과정
- [0102] 50ng/ml 농도의 IL-1 β (Interleukin-1 β)에 의해 활성화된 인체치은섬유아세포에 40 μ g/ml 농도의 저령 추출물과 10 μ g/ml 농도의 연교 추출물, 10mg/ml 농도의 현삼 추출물, 그리고 이들의 혼합물을 처리하고 24시간 배양하였

다. 세포 획득 후, Easy Blue (intron biotechnology, USA)용액을 1ml 넣어서 세포를 용해시킨 다음, 100 μ l의 chloroform 용액을 가하고 잘 섞어준 뒤 원심분리하여 상층액을 얻었다. 그 후 2-propanol과 섞은 뒤 원심분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물을 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시킨 후, 침전물에 DEPC(Diethylpyrocarbonate, Sigma) 처리한 증류수를 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다. RNA는 정량 후, RT-PreMix(AccuPower RT PreMix, 바이오니아)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형(template)으로 표1에 기재된 IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α 프라이머를 각각 혼합한 후, Real Time PCR로 분석하였다.

표 1

유전자(Gene)	프라이머	
IL-6	sense	5' -ttt ctg acc aga aga agg aa-3'
	antisense	5' -ctg gtc ttt tgg agt ttg ag-3'
IL-10	sense	5' -gaa gac cga ggc cat gagg-3'
	antisense	5' -ggc tga att tgc aga tca gca-3'
IL-17	sense	5' -caa ggt gag gtg gat ggg tt-3'
	antisense	5' -cgg act gtg atg gtc aac-3'
TNF- α	sense	5' -atc ggc tac agg ctt gtc act-3'
	antisense	5' -ccc agg gac ctc tct tct cta atc-3'
GAPDH	sense	5' -tcc acc acc ctg ttg ctg ta-3'
	antisense	5' -acc aca tgc cat gcc atc ac-3'

4-3. 실험 결과

IL-6 mRNA의 발현량을 비교한 그래프 도4에 따르면 IL-1 β 만을 처리한 군과 비교했을 때, 저령, 연교, 현삼 추출물을 단독으로 처리한 군에서는 IL-6 mRNA의 발현량을 각각 약 69%, 13%, 23% 감소시킴을 확인하였다. 또한 저령, 연교, 현삼 추출물의 혼합물을 처리한 군은 IL-1 β 만 단독 처리한 군에 비해 IL-6 mRNA의 발현량을 95% 감소시킴을 확인하였다. 이는 저령 추출물 처리군과 저령, 연교, 현삼 추출물의 혼합물을 처리한 군이 연교, 현삼 단독 처리군에 비하여 IL-6 생성을 현저히 억제함을 의미한다.

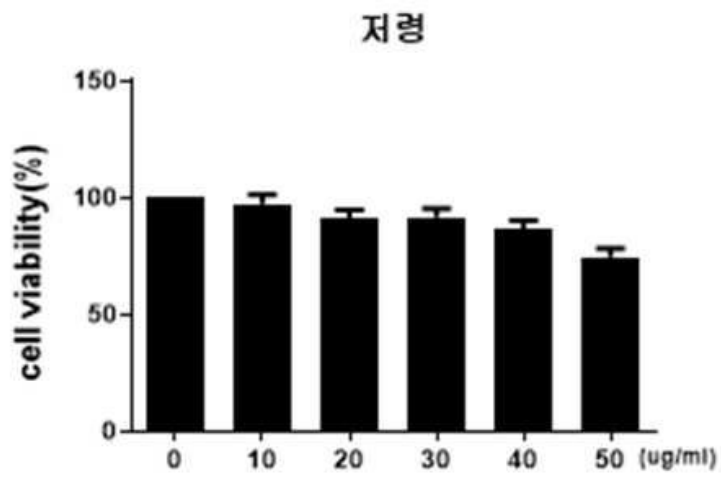
IL-10 mRNA의 발현량을 비교한 그래프 도5에 따르면, IL-1 β 만을 처리한 군과 비교했을 때, 저령, 현삼 추출물을 단독으로 처리한 군에서는 IL-10 mRNA 발현량이 각각 29%와 23% 감소하고, 연교 추출물을 단독으로 처리한 군에서는 IL-10 mRNA 발현량이 약 14% 증가하였음을 확인하였다. 또한, 저령, 연교, 현삼 추출물의 혼합물을 처리한 군은 IL-1 β 만 단독 처리한 군에 비해 IL-10 mRNA의 발현량을 58% 감소시킴을 확인하였다. 이는 저령, 연교, 현삼 추출물의 혼합물이 저령 연교, 현삼 추출물의 단독 처리군보다 IL-10 mRNA의 발현을 현저히 억제함을 의미하며, 단독 추출물 처리군 중에서는 저령 추출물 처리군이 IL-10 mRNA 발현량이 가장 감소한 것을 알 수 있다.

IL-17 mRNA의 발현량을 비교한 그래프 도6에 따르면 IL-1 β 만을 처리한 군과 비교했을 때, 저령, 연교, 현삼 추출물을 단독으로 처리한 군에서는 IL-17 mRNA의 발현량을 각각 약 97%, 37%, 95% 감소시킴을 확인하였다. 또한 저령, 연교, 현삼 추출물의 혼합물을 처리한 군은 IL-1 β 만 단독 처리한 군에 비해 IL-17 mRNA의 발현량을 99% 감소시킴을 확인하였다.

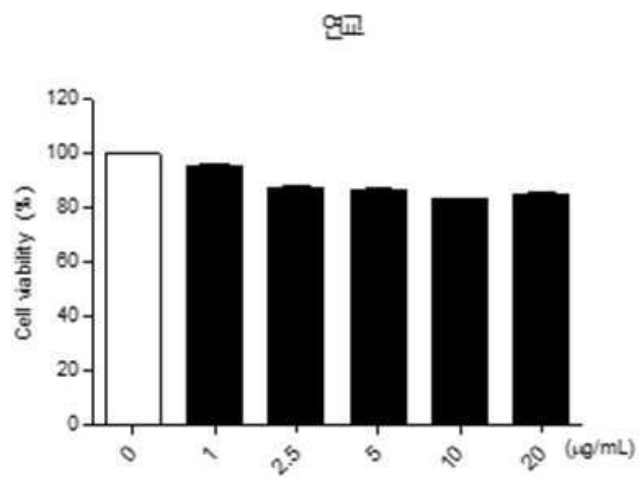
TNF- α mRNA의 발현량을 비교한 그래프 도7에 따르면 IL-1 β 만을 처리한 군과 비교했을 때, 연교 추출물과 현삼 추출물을 단독으로 처리한 군은 TNF- α mRNA의 발현량을 각각 약 47%, 28% 감소시킴을 확인하였다. 이에 비해, 저령 추출물을 단독으로 처리한 군과 저령, 연교, 현삼 추출물의 혼합물을 처리한 군은 모두 약 99% TNF- α mRNA의 발현량을 감소시킴을 확인하였다.

도면

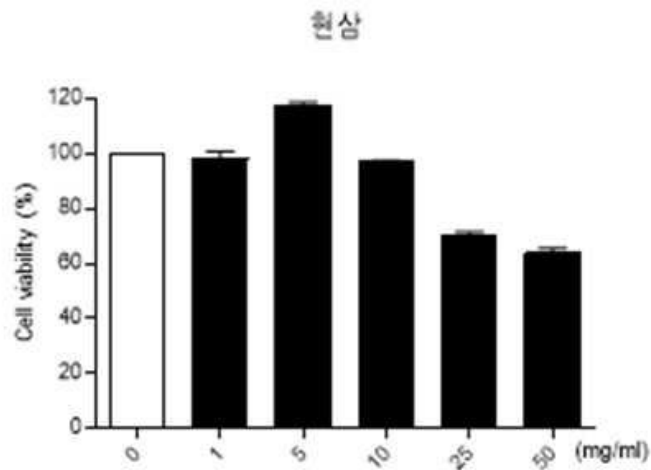
도면1



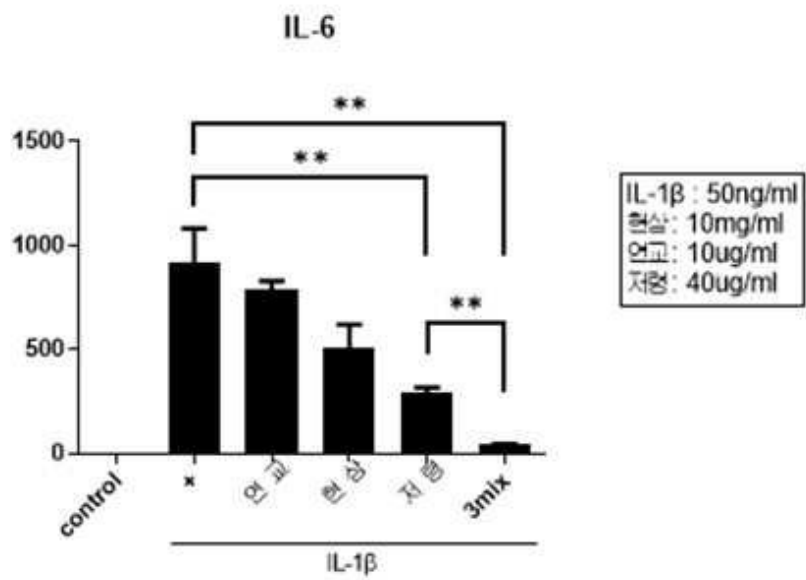
도면2



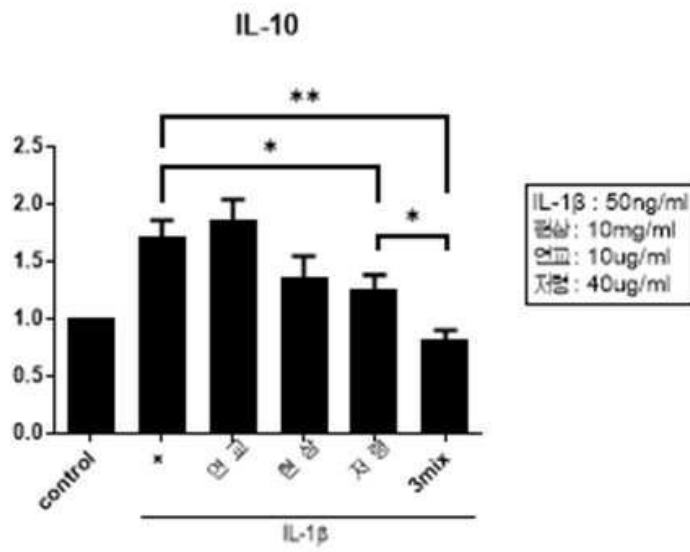
도면3



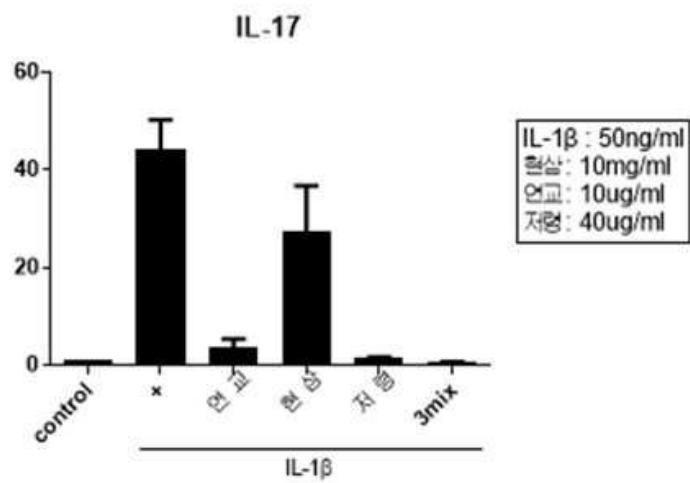
도면4



도면5



도면6



도면7

