(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0029646
(43) 공개일자 2014년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/23 (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0094746
(22) 출원일자 2012년08월29일
심사청구일자 2012년08월29일
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
최철희
광주광역시 동구 필문대로 309 조선대학교(서석동, 의과대학)
조성동
경기도 용인시 수지구 상현로 59, 152동 103호(상현동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

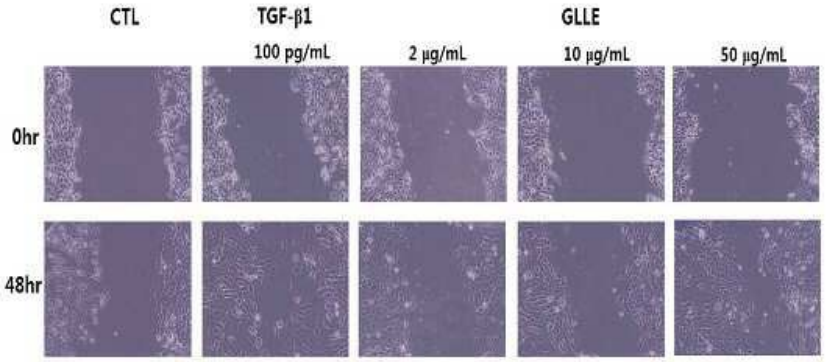
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **ＰＧＥ２ 활성을 조절하는 해방풍 추출물의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 해방풍 추출물의 PGE2 활성을 조절하는 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 해방풍 조추출물 또는 해방풍 조추출물의 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물과 건강식품에 관한 것이다. 본 발명의 해방풍 추출물은 PGE2의 분해에 관여하는 15-PGDH 효소 활성 억제를 통하여 세포내·외에서 PGE2 증가를 촉진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 15-PGDH 자체의 발현 또한 감소시킬 수 있으므로 PGE2 활성을 효과적으로 조절할 수 있다. 따라서 본 발명의 해방풍 추출물은 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 또는 위염과 같은 PGE2 활성 관련 질환을 예방 또는 치료(개선)할 수 있는 소재로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등에 활용할 수 있어 식품산업 및 의약산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다. 특히 본 발명의 해방풍 추출물은 천연물로부터 유래된 물질로서, 세포독성 없이 안전성을 가지므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

대 표 도 - 도10



(72) 발명자

조훈

광주광역시 남구 서문대로663번안길 12, 104동 601호(진월동, 금광하늘연가)

김현정

전라남도 무안군 청계면 영산로 1666 목포대학교(약학대학)

문영숙

광주광역시 동구 필문대로 309 조선대학교 (서석동, 의과대학)

선경훈

광주광역시 남구 화산로31번안길 2

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R13-2003-009
부처명	교육과학기술부
연구사업명	선도연구센터 육성사업 기초의약학분야
연구과제명	항암 및 호르몬내성기전의 규명 및 극복전략개발에 관한 연구
기 여 율	1/1
주관기관	조선대학교 산학협력단
연구기간	2003.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 해방풍 조추출물, 해방풍 극성용매 가용 추출물, 해방풍 비극성용매 가용 추출물 및 해방풍 조추출물의 용매 분획물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 해방풍 조추출물은 해방풍의 초임계 유체 추출물 또는 해방풍의 메탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 해방풍 조추출물의 용매 분획물은 (a) 건조된 해방풍 뿌리 또는 잎 분말을 메탄올을 이용하여 추출하는 단계; (b) 메탄올 추출물을 헥산과 물이 혼합된 혼합용매를 가하여 헥산 분획물과 물 분획물로 분획하는 단계; (c) 상기 (b) 단계를 통해 수득한 물 분획물에 에틸아세테이트와 물이 혼합된 혼합용매를 가하여 에틸아세테에트 분획물과 물 분획물로 분획하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계를 통해 수득한 물 분획물에 부탄올과 물이 혼합된 혼합용매를 가하여 부탄올 분획물과 물 분획물로 분획하는 단계를 통해 제조되는 각각의 분획물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 PGE2의 분해에 관여하는 15-PGDH(15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase) 효소 저해 활성을 통해 PGE2 활성에 관련된 질환의 치료 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 피부 외용제인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PGE2 활성 관련 질환은 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 8

해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 PGE2 활성 관련 질환은 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 10

제8항 또는 제9 항에 있어서,

상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 떡류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 주류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 해방풍 추출물의 PGE2 활성을 조절하는 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 해방풍 조추출물 또는 해방풍 조추출물의 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물과 건강식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 프로스타글란딘(Prostaglandin, PG)은 물리적, 화학적, 특정한 사이토카인 성장인자 기타 자극들에 의해 세포막에서 유리된 아라키돈산로 부터 생성되는 에이코사노이드(eicosanoid)라 알려진 매개물질이다(도 1 참조).

[0003] 이 중에서 특히, 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, 이하 간단하게 'PGE2' 로 표기함)는 상처치유, 소화성 궤양, 눈썹과 두발 형성 및 골 형성의 중요한 매개인자로 알려져 있다. 그러나 PGE2는 NAD+ 의존형 15-PGDH에 의해 신속히 대사되므로, 체내에서 반감기가 매우 짧다.

[0004] 또한 PGE2는 염증 매개자로서 섬유아세포 조절인자(fibroblast modulator) 로서 작용하는 것으로도 알려져 있다. 류마티드성 관절염 및 골관절염처럼 PGE2에 의한 심한 염증 반응을 저지하기 위하여 NSAIDs 나 COX-2 억제제를 사용하여 통증을 완화시키기도 한다. 그러나 NSAIDs나 COX-2 억제제들은 이론적으로 볼 때 염증 반응은 상처치유 단계에 중요한 단계이므로, 상처치유에 좋지 못한 효과를 나타내게 된다. 따라서 켈로이드(keloid) 형성이 없는 상처치유가 이루어지려면 정교히 조절된 염증반응이 이루어져야 한다.

[0005] 최근 보고에 의하면 PGE2는 섬유아세포의 증식을 억제하고 콜라겐 합성을 억제하며, MMPs 의 발현을 증가시킨다고 하였다(Yeh et al., 2006). 또한 켈로이드 섬유아세포(keloid fibroblast)의 경우 일반 섬유아세포에 비해 PGE2의 생성이 적으며, 켈로이드 형성 시 억제된 PGE2를 외부에서 첨가해주면 PGE2 에 의한 섬유증 억제 효과가 회복된다고 보고된 바 있다. 따라서 국소적으로 PGE2를 올려주는 기전을 지닌 제제를 사용한다면 흉터 없는 상처치유제로서의 가능성은 크다고 하겠다.

[0006] 국내 연구로 생체 내 PGE2농도를 증가시켜 관련 질병을 치료하기 위한 약리활성 평가연구는 본 연구팀이 주도하여 시험관 및 동물 질환모델을 구축하고 있다. 국외의 경우도 PGE2를 이용한 위궤양 치유, 뼈 형성, 상처치유 효능, 탈모방지 및 발모등과 관련한 연구가 매우 광범위하게 진행되고 있는 실정이다.

[0007] 한편, 해방풍(海防風: [Glehnia littoralis Fr.Schm.])은 바닷가 모래땅에서 잘 자라는 산형과에 속하는 풀이며 갯방풍, 빈방풍, 해사삼이라고도 하며, 한국(제주 · 강원 · 경기 · 함남 · 함북) · 일본 · 타이완 · 중국 · 쿠릴열도 · 사할린섬 · 오호츠크해 연안 등지에 분포한다. 생약으로 쓰이는 해방풍은 뿌리를 말린 것이며 한방에서는 해열제, 진통제 등으로 사용되어 왔으며, 현재까지 항산화, 항암, 항균, 항진균 등의 효능이 밝혀져 있다. 그러나 해방풍 추출물이 PGE2 활성과 관련된 질환에 효과가 있다는 것에 대해서는 아직까지 진행되거나 명시된 보고가 없다.

[0008] 이에 본 발명자들은 해방풍을 이용한 기능성 약제학적, 식품학적 및 화장품 소재를 연구하던 중, 해방풍 추출물이 PGE2의 분해에 관여하는 15-PGDH(15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase) 효소 저해 활성을 가짐에 따라 PGE2 활성 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2009-0050295호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1164083호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 장기간 사용에도 인체에 안전하면서 15-PGDH 효소 저해 활성 우수하여 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 치료에 효과적인 약제학적 조성물을 제공하는 것이다

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 해방풍 조추출물, 해방풍 극성용매 가용 추출물, 해방풍 비극성용매 가용 추출물 및 해방풍 조추출물의 용매 분획물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 해방풍 조추출물은 해방풍의 초임계 유체 추출물 또는 해방풍의 메탄올 추출물일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 해방풍 조추출물의 용매 분획물은 (a) 건조된 해방풍 뿌리 또는 잎 분말을 메탄올을 이용하여 추출하는 단계; (b) 메탄올 추출물을 헥산과 물이 혼합된 혼합용매를 가하여 헥산 분획물과 물 분획물로 분획하는 단계; (c) 상기 (b) 단계를 통해 수득한 물 분획물에 에틸아세테이트와 물이 혼합된 혼합용매를 가하여 에틸아세테에트 분획물과 물 분획물로 분획하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계를 통해 수득한 물 분획물에 부탄올과 물이 혼합된 혼합용매를 가하여 부탄올 분획물과 물 분획물로 분획하는 단계를 통해 제조되는 각각의 분획물일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 PGE2의 분해에 관여하는 15-PGDH 효소 저해 활성을 통해 PGE2 활성에 관련된 질환의 치료 효과를 가질 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 피부 외용제일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PGE2 활성 관련 질환은 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PGE2 활성 관련 질환은 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 떡류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 주류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 해방풍 추출물은 PGE2의 분해에 관여하는 15-PGDH 효소 활성 억제를 통하여 세포내·외에서 PGE2 증가를 촉진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 15-PGDH 자체의 발현 또한 감소시킬 수 있으므로 PGE2 활성을 효과적으로 조절할 수 있다. 따라서 본 발명의 해방풍 추출물은 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 또는 위염과 같은 PGE2 활성 관련 질환을 예방 또는 치료(개선)할 수 있는 소재로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등에 활용할 수 있어 식품산업 및 의약산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다. 특히 본 발명의 해방풍 추출물은 천연물로부터 유래된 물질로서, 세포독성 없이 안전성을 가지므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 다양한 PG(프로스타글란딘)의 생합성 공정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 15-PGDH 및 PGE2가 결합한 복합체의 입체구조를 나타낸 것이다.

도 3은 재조합 15-PGDH를 함유하는 PGEX-2T 발현 벡터를 나타낸 모식도이다.

도 4는 PGEX-2T 발현 벡터로 형질전환된 Escherichia coli BL-21 DE3을 이용하여 생산된 15-PGDH 효소를 SDS-PAGE를 통해 확인한 것이다.

도 5는 NADH의 표준곡선을 나타낸 그래프이다.

도 6은 ELISA 키트를 이용한 PGE2 측정을 위한 실험 공정의 개략도이다.

도 7은 해방풍을 나타낸 사진이다.

도 8은 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물을 HaCaT 세포주에 농도별로 처리한 후, HaCaT 세포의 생존률을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물을 HaCaT 세포주에 처리한 후, PGE2 관련 유전인자(COX-1, COX-2, PGT, MRP4, 15-PGDH)의 mRNA 발현 변화를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 10은 스크래치를 유도한 HaCaT 세포에 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물을 처리한 후, 시간 경과에 따른 창상치유 진행을 현미경을 통해 관찰한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 해방풍 추출물의 PGE2 활성을 조절하는 신규 용도에 관한 것으로서, 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0024] 본 발명의 'PGE2 활성 관련 질환'은 15-PGDH 활성이 증가되어 PGE_2의 생성이 감소함에 의해 유발되는 질환으로 정의하며, 대표적으로 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0025] 본 발명의 '해방풍(海防風: [Glehnia littoralis Fr.Schm.])은 바닷가 모래땅에서 잘 자라는 산형과에 속하는 풀이며 갯방풍, 빈방풍, 해사삼이라고도 하며, 한국(제주·강원·경기·함남·함북)·일본·타이완·중국·쿠릴열도·사할린섬·오호츠크해 연안 등지에 분포한다. 생약으로 쓰이는 해방풍은 뿌리를 말린 것이며 한방에서는 해열제, 진통제 등으로 사용되어 왔다.

[0026] 현재까지 해방풍과 관련된 주요 약리활성으로는 항산화, 항암, 혈류개선, 항염증, 항미생물 효능 등이 보고되어 있으며, 관련 특허로는 부종 치료, 숙취해소, 동맥경화 치료 등을 들 수 있다.

[0027] 본 발명자들은 상기와 같은 특징을 갖는 해방풍 추출물이 PGE2의 분해에 관여하는 15-PGDH 효소 저해 활성을 통해 PGE2 활성을 조절할 수 있음을 확인함으로써, 이를 통해 PGE2 활성 관련 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용할 수 있다는 사실을 최초로 규명하였다.

[0028] 본 발명의 하기 실험예 1에서는, 해방풍 조추출물 및 이의 용매 분획물들의 15-PGDH 효소 저해능을 살펴본 결과, 해방풍 조추출물 및 각 용매 분획물이 모두 15-PGDH 효소 억제활성을 가지는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 GLLM-에틸아세테이트 분획물의 ED_{50} (μg/ml) 값이 1.7로 나타나, 매우 뛰어난 15-PGDH 효소 억제활성을 확인할 수 있었다(표 3참조).

[0029] 또한 본 발명의 하기 실험예 2에서는, 15-PGDH 효소 억제활성이 가장 뛰어난 GLLM-에틸아세테이트 분획물의 세포독성을 평가한 결과, 50%의 세포 생존을 보이는 농도(IC_{50})가 154.89 μg/mL로, 80%의 세포생존을 보이는 농도가 29.45 μg/mL로 나타났으며, 이러한 결과를 통해 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물의 15-PGDH 활성 저해능이 세포의 사멸 또는 독성에 의한 결과가 아님을 확인할 수 있었다(도 8 참조).

[0030] 또한 본 발명의 하기 실험예 3에서는, 15-PGDH 효소 억제활성이 가장 뛰어난 GLLM-에틸아세테이트 분획물의 처리에 따른 PGE2와 연관된 여러 인자들의 mRNA 발현 변화를 조사하기 위하여 Quantitative Real-time PCR을 수행하였으며, 그 결과 15-PGDH의 발현이 유의성 있는 감소되는 것을 확인함으로써, 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물이 15-PGDH 효소 저해활성과 더불어 15-PGDH의 유전자 발현도 저해시키는 것을 확인할 수 있었다(도 9 참조).

[0031] 또한 본 발명의 하기 실험예 4에서는, 15-PGDH 효소 억제활성이 가장 뛰어난 GLLM-에틸아세테이트 분획물의 처

리가 세포내·외에서 PGE2 증가에 어떠한 영향을 미치는지를 평가하였는데, 그 결과 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물 처리 후 12시간이 경과한 경우, 세포내에서는 PGE2의 증가를 보였으나 세포 외 농도는 오히려 감소하는 것으로 나타났다(표 6 참조). 또한 세포 외 PGE2농도의 시간별 변화를 3, 6, 12시간 별로 측정한 결과, 시료 투여 후 초기 3 시간에는 대조군 보다 높은 PGE2증가를 나타내고 있었으나, 이 후 빠르게 소모되는 것을 확인할 수 있었다(표 7 참조).

[0032] 마지막으로 본 발명의 하기 실험예 5에서는, 15-PGDH 효소 억제활성이 가장 뛰어난 GLLM-에틸아세테이트 분획물이 실제로 상처 회복촉진 효능이 있는지를 평가하기 위하여 In vitro 상에서 스크래치 분석을 수행하였으며, 그 결과 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물 50 ㎍/mL을 처리한 실험군에서 양성 대조군 TGF-β1 (100 pg/mL)에 동등 또는 더 우수한 스크래치 회복 촉진효능을 보여주었다(도 10 참조).

[0033] 이와 같은 결과를 통해, 본 발명자들은 해방풍 추출물이 15-PGDH 효소 활성 억제를 통하여 세포내·외에서 PGE2 증가를 촉진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 15-PGDH 자체의 발현을 감소시킬 수 있으므로 PGE2 활성을 조절하는 기능이 우수함을 실험적으로 입증하였다.

[0034] 그러므로 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 PGE2 활성 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 해방풍 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 '추출물' 은 적절한 용매를 이용하여 해방풍(뿌리 또는 잎)으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 해방풍의 조추출물, 극성용매 가용 추출물, 비극성용매 가용 추출물 또는 조추출물의 용매 분획물을 모두 포함한다. 바람직하게는 건조된 해방풍 조추출물의 용매 분획물일 수 있다.

[0036] 상기 해방풍으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약제학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 해방풍 추출물이 해방풍 조추출물인 경우 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출할 수 있 있으며, 초임계 유체를 이용하여 추출할 수도 있다.

[0038] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초임계추출법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 해방풍 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.

[0039] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 해방풍 추출물은 상기한 열수 추출법, 용매 추출법 또는 초임계 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.

[0040] 따라서 본 발명에 있어서 해방풍 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0041] 본 발명의 일실시예에 따른 해방풍 추출물을 제조하는 방법을 조금 더 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

[0042] 먼저, 본 발명의 해방풍 조추출물은 건조된 해방풍 뿌리 또는 잎을 분쇄하여 분말화한 후, 상기 분말에 이산화탄소에 에탄올을 보조용매로 혼합하여 특정 조건에서 통과시킴으로써 초임계 유체 조추출물을 수득할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명의 해방풍 조추출물은 건조된 해방풍 뿌리 또는 잎을 분쇄하여 분말화한 후, 상기 분말에 메탄올을 첨가하여 환류냉각추출하고 여지로 감압 여과한 다음, 이러한 여과 추출물을 진공에서 증발시켜 건조된 파우더로 제조하는 과정을 거쳐 메탄올 조추출물을 수득할 수 있다.

[0044] 한편, 본 발명의 해방풍 조추출물의 용매 분획물은 (a) 건조된 해방풍 뿌리 또는 잎 분말을 메탄올을 이용하여 추출하는 단계; (b) 메탄올 추출물을 헥산과 물이 혼합된 혼합용매를 가하여 헥산 분획물과 물 분획물로 분획하는 단계; (c) 상기 (b) 단계를 통해 수득한 물 분획물에 에틸아세테이트와 물이 혼합된 혼합용매를 가하여 에틸아세테이트 분획물과 물 분획물로 분획하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계를 통해 수득한 물 분획물에 부탄올과 물이 혼합된 혼합용매를 가하여 부탄올 분획물과 물 분획물로 분획하는 단계를 통해 제조될 수 있다.

[0045] 본 발명의 조성물은 상기 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물로서 이러한 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0046] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0047] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0048] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 해방풍 추출물은 조성물에 0.1 내지 100㎍/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 또한 본 발명의 매생이 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 95중량%로 포함될 수 있다.

[0049] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 피부외용제일 수 있다.

[0050] 본 발명의 약제학적 조성물이 치료효과를 나타낼 수 있는 PGE2 활성 관련 질환으로는, 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 일반적으로 창상이나 화상 등에 의해 피부 속 진피가 손상을 받으면 COX-2가 순간 증가하게 되고, 그 결과 피부에서 PGE2가 증가 되어 상처 바닥에서 섬유 세포의 활동을 조절하고, 상처치유과정에서 염증과 섬유와 과정을 조절하여 상처치유를 촉진한다(Parekh, A., et al., Wound Repair Regen, 2009. 17(1): p. 88-98; Futagami, A., et al., Lab Invest, 2002. 82(11): p. 1503-1513; Wilgus, T.A., et al., Am J Pathol, 2004. 165(3): p. 753-761). 따라서 본 발명에 따른 해방풍 추출물은 15-PGDH를 저해함으로써 PGE2를 효과적으로 증가시키므로 창상 또는 화상치유 효과를 얻을 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 "창상(wound)"은 생체의 손상된 상태로서, 생체 내부 또는 외부 표면을 이루는 조직, 예를 들면 피부, 근육, 신경조직, 뼈, 연조직, 내부기관 또는 혈관조직이 분단 또는 파괴된 병리학적 상태를 포괄한다. 창상의 예로는, 이들로 한정하는 것은 아니지만, 좌상(contusion or bruise), 비-치유 외상성 창상, 방사선조사에 의한 조직의 파괴, 찰과상(abrasion), 골괴저, 열상(laceration), 결출상(avulsion), 관통상(penetrated wound), 총상(gunshot wound), 절상, 화상, 동상, 피부궤양, 피부 건조, 피부각화증, 갈라짐, 터짐, 피부염, 피부사상균증에 의한 통증, 수술상, 혈관질환 창상, 각막창상 등의 창상, 욕창, 와창, 당뇨성피부미란과 같은 당뇨병 및 순환불량에 관련된 상태, 만성궤양, 성형수술 후 봉합부위, 척추상해성 창상, 부인과적 창상, 화학적 창상 및 여드름을 포함하며 개체의 어떠한 부분에 대한 손상이 포함된다. 바람직하게는 찰과상, 열상, 자상, 절상, 결출상, 관통상, 피부궤양 등을 포함한다.

[0053] "소화성궤양 및 위염"은 넓은 의미의 창상에 속하는 염증질환으로, 위 속에 기생하는 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori) 균의 감염에 의해서 생기거나 위장관을 헐게 만드는 인자인 위산 및 펩신(pepsin)의 영

향과 이들로부터 위벽을 보호하는 방어인자인 점막(mucosa)의 기능간에 평형이 깨어짐으로써 일어난다. 또한 비스테로이드성 소염진통제(non-steroidal anti-inflammatory drug)를 비롯한 상당수의 약들은 위장관 출혈 등의 부작용을 수반하기 때문에 위염 및 소화성궤양(위궤양 및 십이지장궤양) 등을 일으키는 주요 요인으로 꼽히고 있다.

[0054] 특히, 상기 창상 및 소화성궤양(위궤양 및 십이지장궤양) 등은 염증성 질환의 일 구체예들로서, 염증성 질환이란 세균의 침입에 의하여 형성되는 병리적 상태를 의미한다. 염증의 매개체로서 PGE2는 아라키돈산(arachidonic Acid) 신진대사 경로에 의해 생산된 다른 프로스타노이드와 함께 생물제어제(bioregulator)로서의 기능을 한다. 또한 내인성 프로스타글란딘은 위장관계의 점막 완전성을 유지하는데 중요한 역할을 하는데, PGE2가 이러한 작용에 가장 효과적이다. 실제 PGE2는 위산 역류성 식도염이나 알콜이나 인도메타친(indomethacin)으로부터 위를 보호하며, PGE2의 작용기전은 위 수축의 억제, 십이지장의 바이카보네이트(HCO3-) 분비 자극, 점액분비, 혈관내피 성장인자(VEGF, vascular endothelial factor) 분비가 보고된바 있다 (Takeuchi K. Adv Clin Chem. 2010;51:121-44. Hatazawa, R., et al., Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. 293(4) G788-797; Wallace, J.L., Physiol Rev, 2008. 88(4) p. 1547-1565; Gudis, K. and C. Sakamoto, Dig Dis Sci, 2005. 50 Suppl 1, p. S16-23; Miura, S., et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. 287(2) p. G444-451; Araki, H., et al., in rats. Digestion, 2002. 66(3) p. 145-153; Halter, F., et al., Gut, 2001. 49(3) p. 443-453).

[0055] 또한, 염증을 유발하는 효소인 시클로옥시게나아제(COX)는 아라키돈산에서 프로스타글란딘H2(PGH2)으로의 대사작용의 속도제한단계를 촉매작용하고, PGH2는 더 대사작용하여 PGE2 등의 다양한 프로스트글란딘으로 변화한다. 따라서 PGH2의 발현을 조절하면 이러한 창상, 소화성궤양(위궤양 및 십이지장궤양) 등의 질환 예방 및 치료가 가능한 것이다.

[0056] 또한, 본 발명의 해방풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 구강궤양의 예방 및 치료 효과도 가질 수 있는데, 이는 PGE2는 구내염 또는 구강궤양(aphthous stomatitis or oral ulcer) 이나 항암제에 의한 구강 점막 손상의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있기 때문이다(Wu-Wang et al., Arch Oral Biol. 1995. 40(12) P 1093-1098; Taylor et al., Br Dent J. 1993. 175(4) P125-129; Takaku et al,. Gan To Kagaku Ryoho. 1990 17(11) P2197-2205). 따라서 본 발명에 따른 해방풍 추출물은 15-PGDH를 저해함으로써 PGE2를 효과적으로 증가시키므로 구내염 또는 구강궤양이나 항암제에 의한 구강 점막 손상의 예방과 치료효과를 얻을 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명은 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명은 포유동물에게 해방풍 추출물을 투여하는 것을 포함하는 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0059] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0060] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0061] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명은 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 PGE2 활성 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0063] 본 발명의 건강기능식품은 PGE2 활성 관련 질환의 예방 및 개선을 목적으로, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환

등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0064] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 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.

[0065] 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.

[0066] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0067] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 해방풍 추출물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0068] 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분인 해방풍 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 해방풍 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0069] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 해방풍 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 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.

[0070] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 해방풍 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0071] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 떡류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 주류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0072] 또한, 본 발명은 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 화장료 조성물일 수 있다.

[0073] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 조성물은 상술한 해방풍 추출물뿐만 아니라, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0074] 또한, 본 발명의 조성물은 상술한 해방풍 추출물 이외에, 해방풍 추출물에 의한 탈모방지 및 두피 개선 작용을 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용되어오던 양모제 또는 육모제를 혼합하여 사용할 수 있다.

[0075] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 헤어토닉, 헤어컨디셔너, 헤어에센스, 헤어로션, 헤어영양로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어트리트먼트, 헤어크림, 헤어영양크림, 헤어모이스처크림, 헤어맛사지크림, 헤어왁스, 헤어에어로졸, 헤어팩, 헤어영양팩, 헤어비누, 헤어클렌징폼, 머릿기름, 모발건조제, 모발보존처리제, 모발염색제, 모발용 웨이브제, 모발탈색제, 헤어겔, 헤어글레이즈, 헤어드레싱어, 헤어래커, 헤어모이스처라이저, 헤어무스 및 헤어스프레이 등 다양한 형태로 제조될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0076] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 해방풍 추출물의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001-30중량%이며, 바람직하게는 0.5-20%이며, 보다 바람직하게는 1.0-10중량%이다. 상기 해방풍 추출물의 함량이 0.00001중량% 미만이면, 해방풍 추출물에 의한 탈모방지 및 두피개선 효과가 크게 감소되고, 30중량%를 초과하는 경우에는 오히려 피부 자극을 초래할 수 있고, 제형상의 문제점이 있다.

[0077] 한편, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 상기 해방풍 추출물을 나노리포좀 내부에 함유시켜 안정화하여 제형화할 수도 있다. 상기 추출물을 나노리포좀 내부에 함유시키면, 추출물의 성분이 안정화되어 제형화시 침전형성, 변색, 변취 등의 문제점을 해결할 수 있으며, 성분의 용해도 및 경피흡수율을 높일 수 있어 상기 추출물로부터 기

대되는 효능을 최대로 발현시킬 수 있다.

[0078] 본 발명에서 나노리포좀은 통상적인 리포좀의 형태를 갖는 것으로서 평균 입자 지름이 10~500nm인 리포좀을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 나노리포좀의 평균 입자 지름은 50~300nm이다. 나노리포좀의 평균 입자 지름이 300nm를 초과하는 경우에는 본 발명에서 달성하고자 하는 기술적 효과 중 피부침투의 개선 및 제형 안정성의 개선이 매우 미약하다.

[0079] 본 발명에 따라 상기 추출물을 안정화하는데 사용되는 나노리포좀은 폴리올, 유성성분, 계면활성제, 인지질, 지방산 및 물을 포함하는 혼합물에 의해 제조될 수 있다.

[0080] 본 발명의 나노리포좀에 이용되는 폴리올은 특히 제한되지 않으며, 바람직하게는 프로필렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 메틸프로판디올, 이소프로필렌글리콜, 펜틸렌글리콜, 에리스리톨, 자일리톨, 솔비톨 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 10~80중량%, 바람직하게는 30~70중량%이다.

[0081] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 유성(oil) 성분은 당업계에 공지된 다양한 오일이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 헥사데칸 및 파라핀 오일과 같은 하이드로카본계 오일, 에스테르계의 합성오일, 디메치콘 및 사이크로메치콘계와 같은 실리콘 오일, 해바라기유, 옥수수유, 대두유, 아보카도유, 참깨유 및 어유와 같은 동식물성 오일, 에톡시레이티드 알킬에테르계오일, 프로폭시레이티드 알킬에테르계오일, 피토스핑고신, 스핑고신 및 스핑가닌과 같은 스핑고노이드 지질, 세레브로사이드 콜레스테롤, 시토스테롤 콜레스테릴설페이트, 시토스테릴설페이트, C_{10-40} 지방알콜 및 이의 혼합물이다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여1.0~30.0중량%일 수 있으며, 바람직하게는 3.0~20.0중량%이다.

[0082] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 계면활성제는 당업계에 공지된 어떠한 것도 사용할 수 있다. 예를 들어, 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용될 수 있다. 바람직하게는 음이온성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제이다. 음이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알킬아실글루타메이트, 알킬포스페이트, 알킬락틸레이트, 디알킬포스페이트 및 트리알킬포스페이트를 포함한다. 비이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알콕시레이티드 알킬에테르, 알콕시레이티드 알킬에스테르, 알킬폴리글리코사이드, 폴리글리세릴에스테르 및 슈가에스테르를 포함한다. 특히 바람직한 계면활성제는 비이온성 계면활성제에 속하는 폴리솔베이트류이다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.1~10중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.5~5.0중량%이다.

[0083] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 또 다른 성분인 인지질은 양쪽친화성 지질이 이용되며, 천연 인지질(예를 들어, 난황 레시틴 또는 대두 레시틴, 스핑고마이엘린) 및 합성 인지질(예를 들어, 디팔미토일포스파티딜콜린 또는 수첨 레시틴)을 포함하며, 바람직하게는 레시틴이다. 특히, 대두 또는 난황에서 추출한 천연 유래의 불포화 레시틴 또는 포화 레시틴이 바람직하다. 통상적으로 천연 유래의 레시틴은 포스파티딜콜린의 양이 23~95%, 그리고 포스파디딜에탄올아민의 양이 20% 이하이다. 본 발명의 나노리포좀의 제조에 있어서, 인지질의 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.5~20.0중량%이며, 바람직하게는 2.0~8.0중량%이다.

[0084] 본 발명의 나노리포좀 제조에 이용되는 지방산은 고급 지방산으로서, 바람직하게는 C_{12-22} 알킬 체인의 포화 또는 불포화 지방산으로서, 예컨대, 라우린산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아린산, 올레산 및 리놀레산을 포함한다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.05~3.0중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.1~1.0중량%이다.

[0085] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 물은 일반적으로 탈이온화된 증류수이며, 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 5.0~40중량%일 수 있다.

[0086] 나노리포좀의 제조는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있으나, 가장 바람직하게는 상기 성분들을 포함하는 혼합물을 고압 호모게나이저에 적용하여 제조된다. 고압 호모게나이저에 의한 나노리포좀의 제조는 소망하는 입자 크기에 따라 다양한 조건(예: 압력, 횟수 등)으로 실시할 수 있으며, 바람직하게는 600~1200bar의 압력 하에서 1~5회 고압 호모게나아저를 통과하도록 하여 나노리포좀을 제조할 수 있다.

[0087] 본 발명에 따른 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 화장료 조성물은 상기 해방풍 추출물을 나노리포좀 충 중량 기준으로 0.1~20.0중량%, 제형 안정화를 위하여 보다 바람직하게 1.0~10.0중량%로 함유할 수 있다.

[0088] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설

명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0089] **<실시예>**

[0090] **<시료 및 사용기기>**

[0091] 갯기름나물(해방풍,Glehnia littoralis Fr.Schm.)의 3종 조추출물은 조선대학교 자연과학대학 조성동 교수로부터 제공받았다.

[0092] PGE2, NAD+, NADH, 글루타치온-세파로오즈(glutathione) 4B, DTT(dithiothreitol), SDS(sodium dodecylsulfate), EDTA, 환원 글루타치온(reduced glutathione), 미토마이신 Sigma Aldrich Co. (USA)로부터 구입하고, TGFβ1을 Biovision Pharmacia Co. (New Jersey, USA)로부터 구입하였다. 인간 태반 cDNA 라이브러리(Cho and Tai, 2002)로부터 인간 15-PGDH의 cDNA를 클로닝하였다. 15-PGDH 효소 kinetic assay는 Shimadzu RFFluorescence Spectrophotometer (Shimadzu, Japan)을 이용하여 UV 스펙트럼을 수득하였다. PGE2 효소 면역분석 키트를 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)로부터 구입하였고, Real-time PCR은 Light Cycler 2.0 Instrument (Roche, Mannheim, Germany)로 수행하였다. In vitro 상처 스크래치들을 역상 현미경(Hitachi, Tokyo, Japan)으로 사진을 찍었다. 분석적 HPLC를, 디개서(degasser), 바이너리 믹싱 펌프, 컬럼 오븐 및 PDA 검출기로 구성된 Agilent HP1100 series 상에서 Waters SunFire™ (4.6 x 150 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하여 수행하였다. Semi-preparative HPLC를, DECASSIT™ 6342 디개서가 결합된 Waters multisolvent delivary system으로 Waters SunFire™ Prep C18 (10×250 mm and 19 x 150 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하여 수행하였다. 식물 추출에 사용된 모든 용매들은 HPLC grade였다.

[0093] **<실시예 1>**

[0094] **해방풍 조추출물의 제조**

[0095] 본 발명의 갯방풍(해방풍, *Glehnia littoralis*)의 3종 조추출물은 조선대학교 자연과학대학 조성동 교수로부터 제공받았다. 하기에서는 해방풍의 3종 조추출물의 추출방법을 간략히 서술하였다.

[0096] <1-1> 해방풍 뿌리의 초임계 유체 조추출물

[0097] 해방풍 뿌리 유래 초임계 유체 조추출물을 제조하기 위하여, 먼저 건조된 실험재료인 해방풍 뿌리를 분말화한 후 사용하였다. 해방풍 뿌리 분말 200 g 을 온도 40 ℃, 압력 30 Mpa, 유속 0.54 cm/min을 추출조건으로 하여 이산화탄소에 에탄올을 보조용매로 혼합(10:1)하여 통과시킴으로써 추출하였다. 그 결과, 해방풍 뿌리의 초임계 유체 조추출물(이하 간략하게 'GLRS'로 표기함) 8.95g을 수득하였다.

[0098] <1-2> 해방풍 뿌리 또는 잎의 메탄올 조추출물

[0099] 해방풍 뿌리 또는 잎의 메탄올 조추출물을 제조하기 위하여, 먼저 건조된 실험재료인 해방풍 뿌리를 분말화한 후 사용하였다. 해방풍 뿌리 및 잎 분말 각각 20 g 에 80% (v/v) 메탄올 400 ml를 넣어 80℃에서 3시간 동안 환류 추출하였다. 추출액을 여과한 후 여액을 분리하여 rotary evaporator로 감압 건조하여 뿌리 3.48 g 및 잎 2.68 g의 조추출물을 각각 수득하였다(이하 해방풍 뿌리 메탄올 조추출물은 'GLRM'으로 표기하며, 해방풍 잎 메탄올 조추출물은 'GLLM'로 표기함).

[0100] 본 발명의 해방풍 조추출물은 아래 표 1에서 나타내었다.

표 1

[0101] 해방풍 조추출물의 수득양

조추출물의 종류	수득양(g)
GLRS	8.95
GLRM	3.48
GLLM	2.68

[0102] **<실시예 2>**

[0103] **해방풍 조추출물을 이용 세부 추출물(용매 분획물) 제조**

[0104] 상기 실시예 1을 통해 수득한 각각의 조추출물(GLRS, GLRM, GLLM)은 계통분획법에 따라 용매분획을 실시하였다.

[0105] 먼저 각각의 조추출물(GLRS, GLRM, GLLM)을 1L의 물에 현탁한 후 동량의 헥산을 처리하여 헥산 분획과 물 분획으로 분리하였으며; 이렇게 얻어진 물 분획에 에틸아세테이트와 물이 1:1의 비율로 혼합된 혼합용매를 처리하여 에틸아세테이트 분획과 물 분획으로 다시 분리하였으며; 이렇게 얻어진 물 분획에 부탄올과 물이 1:1의 비율로 혼합된 혼합용매를 처리하여 부탄올 분획과 물 분획으로 분리하였다. 분획이 완료된 분획물들은 rotary evaporator를 이용하여 건조시킨 후 하기 실험에 사용하였다. 본 발명의 시료로 사용된 해방풍 조추출물의 용매 분획물들은 아래 표 2에서 나타내었다.

표 2

[0106] 해방풍의 추출용매에 따른 수득양

순번	분획물의 종류	수득양(g)
1	GLRS-헥산 분획물	4.03
2	GLRS-에틸아세테이트 분획물	0.29
3	GLRS-부탄올 분획물	0.02
4	GLRS-물 분획물	0.04
5	GLRM-헥산 분획물	0.26
6	GLRM-에틸아세테이트 분획물	0.12
7	GLRM-부탄올 분획물	0.21
8	GLRM-물 분획물	2.18
9	GLLM-헥산 분획물	0.03
10	GLLM-에틸아세테이트 분획물	0.01
11	GLLM-부탄올 분획물	0.37
12	GLLM-물 분획물	1.37

[0107] **<실험예 1>**

[0108] **해방풍 조추출물의 용매 분획물의 15-PGDH 효소 저해 활성 분석**

[0109] 혈류개선 및 상처치유 효능의 주요 매개인자 중 하나인 PGE2 (prostaglandin E2)의 분해에 관여하는 15-PGDH (15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase, 29 kDa) 효소의 활성 저해능을 평가하여 PGE2 농도에 미치는 영향을 평가하였다.

[0110] <1-1> 15-PGDH 효소 생산

[0111] 15-PGDH의 생산을 위해서 재조합 15-PGDH cDNA가 발현된 PGEX-2T 발현 벡터를 내재한 Escherichia coli BL-21 DE3를 이용하였으며, 이 후 정제과정을 거쳐 순수한 15-PGDH를 획득하였다.

[0112] 먼저, BamH I 및 EcoR I 위치 사이에 재조합 15-PGDH 를 함유하는 PGEX-2T 발현 벡터(도 3 참조)로 Escherichia coli BL-21 DE3 세포들을 형질전환하였다. 형질전환된 세포들을 50 μg/mL 암피실린을 함유하는 500 mL 배지에서 37 ℃ 및 220 rpm 하 성장시켜 600 nm에서 O.D.가 0.6에 이르게 하였다. IPTG (isoprophyl β-D-thiogalactoside, 1M stock solution)을 첨가하고 상기 세포들을 12시간 동안 25 ℃에서 배양하였다. 그

후, 세포들을 30분 동안 4 ℃에서 4000×g 으로 원심분리하여 수득하고 상기 세포 펠렛들을 20 mL의 차가운 용해 버퍼(1 x PBS buffer pH 7.4 containing 1mM EDTA 및 0.1 mM DTT)에 재 현탁하고, 초음파로 분해하였다(4 ×10 s at 4 ℃). 파쇄된 세포들을 4 ℃에서 20분 동안 4000×g으로 원심분리하였다. 상등액을 천천히 글루타치온-세파로오즈 4B 컬럼에 적용하여 4 ℃에서 용해 버퍼로 평형화시켰다. 상기 컬럼을 280 nm에서 O.D가 0.005 아래에 이르기까지 용해 버퍼로 세척하였다. 그 후, 글루타치온-세파로오즈 4B 컬럼으로부터 상온에서 5분 동안 용리버퍼(50 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 10 mM reduced glutathione, 1 mM EDTA and 0.1 mM DTT)를 이용하여 15-PGDH를 용리하였다. 15-PGDH의 농도를 Bradford method (Schleicher and Wieland, 1978)로 측정하고 15-PGDH(분자량 29KD)의 순도를 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacryl amide gel electrophoresis) 및 쿠마신 블루 염색으로 확인하였다. 쿠마신 블루(Coomassie blue) 염색을 위해, SDS-PAGE 겔을 염색용액(0.1% Coomassie brilliant blue R 250, 50% methanol and 10% glacial acetic acid in water)으로 20분 동안 염색하였다. 상기 겔을 탈염색 용액(10% methanol, 7% glacial acetic acid in water)으로 겔의 배경이 완전히 탈색될 때까지 여러 번 세척하였다. 최종적으로, 상기 겔을 저장 용액(5% glacial acetic acid in water)에 저장하고 검출을 위해 스캔하였다.

[0113] 그 결과 도 4에서 나타낸 바와 같이, 15-PGDH가 생성된 것을 확인할 수 있었다.

[0114] <1-2> 해방풍 조추출물의 용매 분획물의 15-PGDH 효소 저해능

[0115] 상기 실시예 2를 통해 제조된 본 발명의 해방풀 조추출물의 용매 분획물들의 15-PGDH 저해 활성 분석은 형광 분광광도계를 이용하여 468 nm 및 340 nm에서 NADH의 형성을 측정함으로써 수행하였다.

[0116] 간략하게는, 각 시료에 대한 효소의 활성 저해능은 형광광도계(Shimadzu RF-5301IPC, Japan)를 이용하여 340 nm에서 들뜸 후 480 nm에서 방출 스펙트럼을 통해 NADH의 생성을 측정함으로써 이루어졌다. NADH의 표준곡선을 통해, 시료 적용 후 효소활성의 변화 유무를 흡광도를 바탕으로 도출하여 이 결과를 50% 효소활성 저해능에 필요한 시료의 농도(ED_{50}, μg/mL)로 표시하였다.

[0117] 0.1 mM DTT, 0.25 mM NAD+, 정제된 효소 (10 μg), 21 μM PGE2 및 다양한 종류의 해방풀 조추출물의 용매 분획물을 함유하는 Tris-HCl 버퍼 (50 mM, pH 7.5)를 각 반 응 혼합물에 첨가하였다. 트리플리케이트에서 각 농도를 분석하였다. 반응 혼합물의 흡광도를 NADH의 표준곡선으로부터 15-PGDH 저해 활성으로 보정하였다.

[0118] 그 결과 하기 표 3에서 나타낸 바와 같이, 해방풍 조추출물의 용매 분획물의 종류별로 다양한 15-PGDH의 ED_{50} 값을 나타내었으며, 특히 GLLM-에틸아세테이트 분획물에서 ED_{50} 값이 1.7μg/ml로 나타나 매우 높은 15-PGDH 저해능을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 가장 높은 15-PGDH 저해능을 보이는 GLLM-에틸아세테이트 분획물을 대상으로 하기 후속 실험을 진행하였다.

표 3

[0119] 해방풍 조추출물 및 용매 분획물의 종류별 15-PGDH의 ED_{50} 값

추출물의 종류	ED_{50}(μg/ml)
GLRM	99.3
GLLM	136.8
GLRM-헥산 분획물	21.5
GLRM-에틸아세테이트 분획물	13.0
GLRM-부탄올 분획물	387.0
GLRM-물 분획물	393.1
GLLM-헥산 분획물	>500
GLLM-에틸아세테이트 분획물	1.7
GLLM-부탄올 분획물	25.4
GLLM-물 분획물	244.0

[0120] **<실험예 2>**

[0121] **해방풍 조추출물의 용매 분획물의 세포독성 평가**

[0122] 상기 실시예 2를 통해 제조된 본 발명의 해방풍 조추출물의 용매 분획물 중 GLLM-에틸아세테이트 분획물이 15-PGDH 저해 활성이 가장 높은 것을 상기 실험예 1을 통해 확인하였는바, 본 실험에서는 이러한 GLLM-에틸아세테이트 분획물이 세포독성을 가지는지 여부를 MTT 분석(Mosmann, 1983)을 통해 확인하였다.

[0123] 먼저, 인간 케라티노사이트 세포주(HaCaT 세포)를 10% 가열 불활성화된 FBS, 100 μg/mL 항생제로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's media)로, 37 ℃ 하 습한 5% CO_2배양기에서 배양하였다. 모든 배양된 배지들은 10% 가열 불활성화된 FBS 및 100 μg/m L 페니실린으로 보충되었다.

[0124] 96 웰 플레이트에 DMEM 배지 90 μL 당 상기 배양한 HaCaT 세포(1×10^4 /mL들을 분주하였다. 밤새 배양 후, 본 발명의 해방풀 조추출물의 용매 분획물 각각을 72시간 동안 처리하고, MTT (5 mg/mL stock solution) 10 μL로 4시간 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 DMSO 150 μL를 첨가하여 포마잔을 용해시켰다. ELISA microplate reader (PerkinElmer, California, USA)을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0125] 그 결과 도 8에서 나타낸 바와 같이, 50%의 세포 생존을 보이는 농도(IC_{50})가 154.89 μg/mL로, 80%의 세포생존을 보이는 농도가 29.45 μg/mL로 나타났으며, 이러한 결과를 통해 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물의 15-PGDH 활성 저해능이 세포의 사멸 또는 독성에 의한 결과가 아님을 확인할 수 있었다.

[0126] **<실험예 3>**

[0127] **해방풍 조추출물의 용매 분획물 처리에 따른 PGE2 관련 유전인자의 변화**

[0128] 본 실험에서는 가장 높은 15-PGDH 저해능을 보이는 GLLM-에틸아세테이트 분획물의 처리에 따른 PGE2와 연관된 여러 인자들의 mRNA 발현 변화를 조사하기 위하여 Quantitative Real-time PCR을 수행하였다.

[0129] 세포내(intra-cellular) 및 세포외(extra-cellular) PGE2수준은 COX-1/2(cyclooxygenase-1/2), MRP4(multidrug resistance-associated protein 4), 15-PGDH(15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase) 및 PGT(prostaglandin transporter)의 유전자 발현 수준과 기능적 관계가 있다.

[0130] 상기 유전자들에서 해방풍의 영향을 알아보기 위해, HaCaT 세포에서 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물을 농도별로(2, 10, 50 μg/mL) 처리하여 48시간이 경과한 다음, COX-1/2, MRP4 및 PGT의 mRNA 발현을 측정하였다. 분석에 사용된 GLLM-에틸아세테이트 분획물은 이전 실험을 통해 세포독성을 가지지 않는, 충분한 15-PGDH 저해활성을 보이는 농도를 사용하였다.

[0131] 이를 위해, TRI 시약(RNAiso Plus, Takara)을 이용하여 세포로부터 전체 세포 RNA를 분리하였다. 각 RNA 샘플로부터 cDNA를 20 μL 합성하였다 (Invitrogen, USA). PCR 반응은 4 μL의 1:5 희석된 cDNA, 4 mM MgCl2,10pmole의 각 프라이머 및 4 μL의 Fast Starter Mix buffer (dNTPs, SYBR Green dye and Tag polymerase)을 포함하였다. RT-PCR에 활용한 프라이머 및 조건들을 이하 표 4 및 표 5에 기재된 바와 같다.

표 4

[0132] 15-PGDH 대사에 관여하는 유전자의 RT-PCR 프라이머 서열

유전자	Amplicon	프라이머 서열	
PGT	386	센스	5'-GGATGCTGTTTGGAGGAATC-3'
		안티센스	5'-GCACGATCCTGTCTTTGCTGA-3'
MRP	394	센스	5'-ACCTCTAACCGACATTCCTG-3'
		안티센스	5'-TCAACATATACAGCCACCAT-3'
COX-1	207	센스	5'-CCTCATGTTTGCCTTCTTTGC-3'
		안티센스	5'-GGCGGGTACATTTCTCCATC-3'
COX-2	171	센스	5'-GATCTACCCTCCTCAA-3'
		안티센스	5'-GAACAACTGCTCATCAC-3'
15-PGDH	105	센스	5'-TGCTTCAAAGCATGGCATAG`-3'
		안티센스	5'-AACAAAGCCTGGACAAATGG-3'
베타-액틴	504	센스	5'-GACTATGACTTAGTTGCGTT-3'

안티센스	5’-GTTGAACTCTACATACTTCCG-3’

표 5

[0133] 15-PGDH 대사에 관여하는 유전자의 RT-PCR 증폭조건

유전자	Hot start	denaturation	annealing	extension
PGT	95℃, 1 min	95℃, 15 sec	60℃, 5 sec	72℃, 12 sec
MRP			57℃, 5 sec	72℃, 16 sec
COX-1			60℃, 5 sec	72℃, 15 sec
COX-2			59℃, 5 sec	72℃, 7 sec
15-PGDH			60℃, 5 sec	72℃, 5 sec
베타-액틴			55℃, 5 sec	72℃, 21 sec

[0134] 그 결과 도 9에서 나타낸 바와 같이, HaCaT 세포주에 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물을 처리한 경우 COX-1의 발현이 약간 증가하였으나, COX-2, PGT, MRP4 등은 변화를 보이지 않았다. 반면에 15-PGDH의 발현은 유의성 있는 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0135] **<실험예 4>**

[0136] **해방풍 조추출물의 용매 분획물 처리에 따른 PGE2의 농도 변화**

[0137] 본 실험에서는 가장 높은 15-PGDH 저해능을 보이는 GLLM-에틸아세테이트 분획물의 처리가 세포 내외에서 PGE2 증가에 어떠한 영향을 미치는지를 평가하기 위하여, PGE2 단백질 정량 분석 및 PGE2 방출 검사를 수행하였다.

[0138] COX 및 마이크로좀 PGE 신타아제-1 (mPGES-1)-유래 PGE2는 폐기능의 중요한 조절인자로 간주되고 있다. 특히, 감염부위에서 PGE2생성은 면역 및 염증성 반응을 조절하고, 감염시 폐 상피 세포에서 유리됨이 보고되어 있다 (N'Guessan et al. , 2007).

[0139] 단백질 농도는 Bradford (Schleicher and Wieland, 1978)에 기반을 둔 Bio-Rad 단백질 분석법에 의해 측정하였다. 표준곡선을 BSA (bovine serum albumin)의 연속적 희석을 이용하여 준비하고, Bio-Rad 단백질 분석 염색 시약을 수 중 1:4의 비율로 희석하였다. 4 μL의 표준 및 샘플들을 1 mL의 희석된 염색 시약에 첨가하고 흡광도를 595nm에서 측정하였다. 샘플 단백질 농도를 BSA로 준비한 표준곡선으로부터 결정하였다.

[0140] 한편, PGE2방출을 알아보기 위해, HaCaT 세포들을, 37 ℃ 및 습윤된 5% CO_2배양기에서 FBS 및 항생제가 함유된 DMEM 의 각 배지에서 6웰 배양 플레이트에 분주하고(5×10^5cells/well), 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물 50μg/ml를 처리한 후, 배지들을 약 12시간 반응시키면서 특정 시간마다 상층액을 수집하였다. 세포내 및 세포외 PGE2수준을, PGE2효소 면역분석 키트(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0141] 그 결과 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물 처리 후 12시간이 경과한 경우, 세포 내에서는 PGE2의 증가를 보였으나 세포 외 농도는 오히려 감소하는 것으로 나타났다(표 6 참조). 또한 세포 외 PGE2농도의 시간별 변화를 3, 6, 12시간 별로 측정한 결과, 시료 투여 후 초기 3 시간에는 대조군 보다 높은 PGE2증가를 나타내고 있었으나, 이 후 빠르게 소모되는 것을 확인할 수 있었다(표 7 참조).

표 6

[0142] HaCaT 세포내·외 PGE2증가량에 미치는 효과

	세포내 PGE2 농도(ng/ml)	세포외 PGE2 농도(pg/ml)
대조군	2.0	397.58
GLLM-에틸아세테이트 추출물	2.5	240.95

표 7

[0143] 시간 경과별 세포외 PGE2변화량에 미치는 효과

시간(h)	시료	세포외 PGE2 농도(pg/ml)
0	대조군	58.2
	GLLM-에틸아세테이트 추출물	58.2
3	대조군	452.5
	GLLM-에틸아세테이트 추출물	472.0
6	대조군	674.8
	GLLM-에틸아세테이트 추출물	629.2
12	대조군	327.2
	GLLM-에틸아세테이트 추출물	170.5

[0144] **<실험예 5>**

[0145] **In vitro 스크래치 분석을 통한 상처 회복능 검증**

[0146] 본 실험에서는 가장 높은 15-PGDH 저해능을 보이는 GLLM-에틸아세테이트 분획물이 실제로 상처 회복촉진 효능이 있는지를 평가하기 위하여 In vitro 상에서 스크래치 분석을 수행하였다.

[0147] In vitro 스크래치 분석(Hintermann et al ., 2001; Koivisto et al., 2006)을 위해, HaCaT 세포들을 각 웰당 3×10^5밀도로 6웰 플레이트에 분주하고, 80% 컨플루언스에 이를 때까지 배양하였다. 그 후 배지들을 미토마이신(10 μg/mL) 함유 하는 무혈청 DMEM으로 교체하였고, 세포들을 2시간 동안 배양하여 상처 증식을 막고 PBS로 깨끗하게 세척 하였다. 멸균된 200 μL 피펫 팁으로 스크래치를 만들고 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 추출물을 농도별(50, 10, 2 μg/mL)로 투여하고 48시간 후, 손상 부위의 회복 촉진 유무를 평가하였다. 음성 대조군으로 약물 비처리군, 양성 대조군으로 TGF-β1 (100 pg/mL)을 사용하였다. 배양 전후에 있어서 동일 위치에서 사진을 찍어 상처 치유 진행을 관찰하였다. 실험들을 3회 반복하고 대표적인 사진들을 하기 도 10에 나타내었다. 스크래치 즉시 이들 스크래치를 현미경(× 100)으로 사진으로 찍고 배양 후 48시간 후 다시 한 번 더 찍었다.

[0148] 그 결과 도 10에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 GLLM-에틸아세테이트 분획물 50 μg/mL을 처리한 실험군에서 양성 대조군 TGF-β1 (100 pg/mL)에 동등 또는 더 우수한 스크래치 회복 촉진효능을 보여주었다.

[0149] 참고적으로 종래 상처 치유 효과가 있는 것으로 알려진 TGF-β(Transforming growth factor β)는 여러 가지 형태의 세포(혈소판, 대식세포 및 섬유아세포) 에서 분비되는 사이토카인의 하나로서 1980년대 초반에 처음 발견된 이래 여러 가지 상처치유 모델에 많이 연구되고 있다. 특히 TGF-β1을 국소적으로 도포한 부위에서는 단핵구 및 섬유아세포(fibroblast)의 유입 및 콜라겐의 축적 증가로 TGF-β가 상처 치유제로서 사용 가능함이 알려져 있다.

[0150] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

[0151] PG: Prostaglandin

PGE2: prostaglandin E2

15-PGDH: 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase

COX-1: cyclooxygenase-1

COX-2: cyclooxygenase-2

MRP4: multidrug resistance-associated protein 4

PGT: prostaglandin transporter

GLRS: 해방풍 뿌리의 초임계 유체 조추출물

GLRM: 해방풍 뿌리의 메탄올 조추출물

GLLM: 해방풍 잎의 메탄올 조추출물

GLRS-헥산 추출물: 해방풍 뿌리 초임계 유체 조추출물의 헥산 분획물

GLRS-에틸아세테이트 추출물: 해방풍 뿌리 초임계 유체 조추출물의 에틸아세테이트 분획물

GLRS-부탄올 추출물: 해방풍 뿌리 초임계 유체 조추출물의 부탄올 분획물

GLRS-물 추출물: 해방풍 뿌리 초임계 유체 조추출물의 물 분획물

GLRM-헥산 추출물: 해방풍 뿌리 메탄올 추출물의 헥산 분획물

GLRM-에틸아세테이트 추출물: 해방풍 뿌리 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물

GLRM-부탄올 추출물: 해방풍 뿌리 메탄올 추출물의 부탄올 분획물

GLRM-물 추출물: 해방풍 뿌리 메탄올 추출물의 물 분획물

GLLM-헥산 추출물: 해방풍 잎 메탄올 추출물의 헥산 분획물

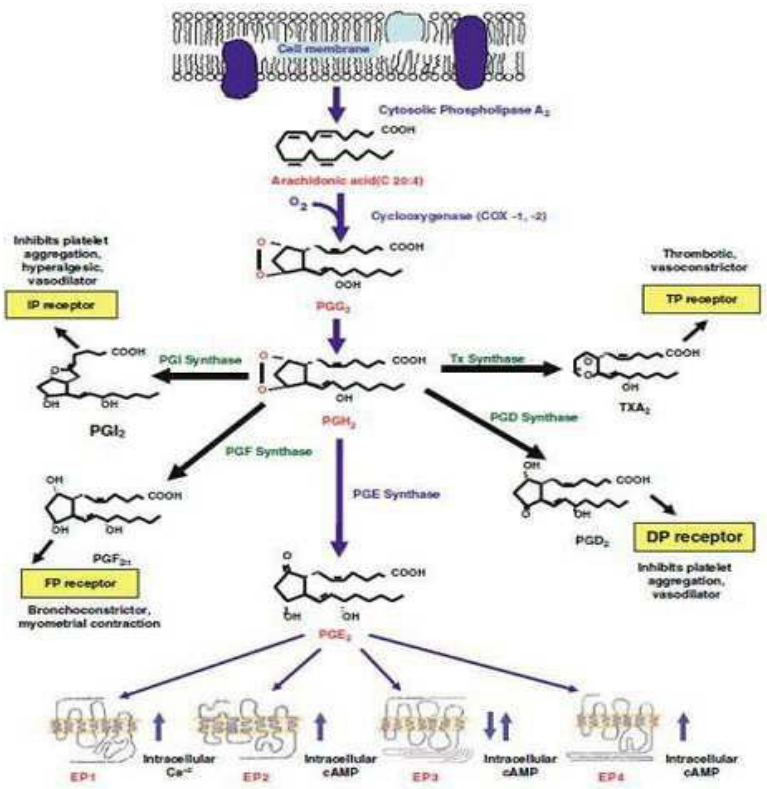
GLLM-에틸아세테이트 추출물: 해방풍 잎 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물

GLLM-부탄올 추출물: 해방풍 잎 메탄올 추출물의 부탄올 분획물

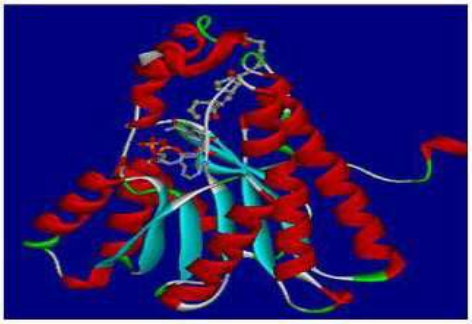
GLLM-물 추출물: 해방풍 잎 메탄올 추출물의 물 분획물

도면

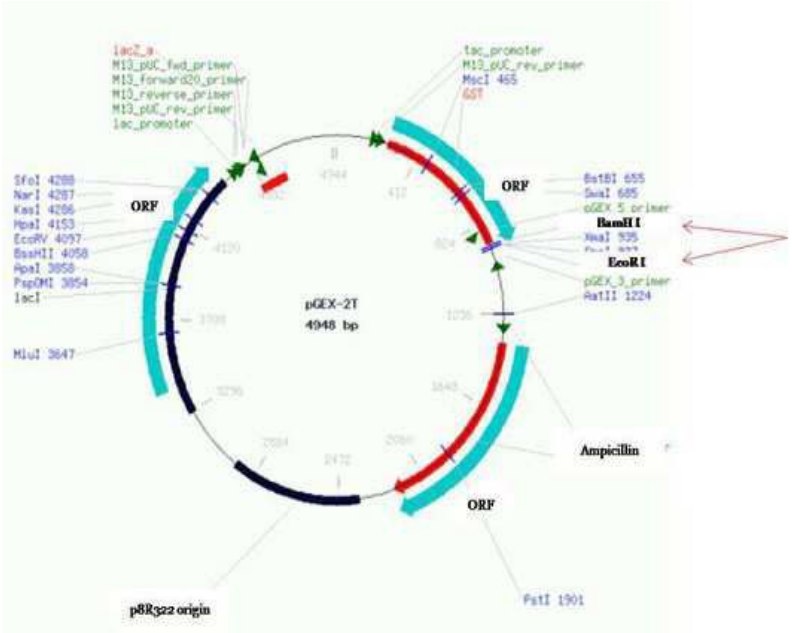
도면1



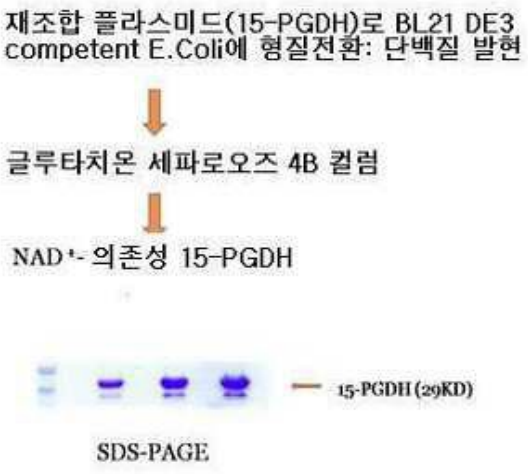
도면2



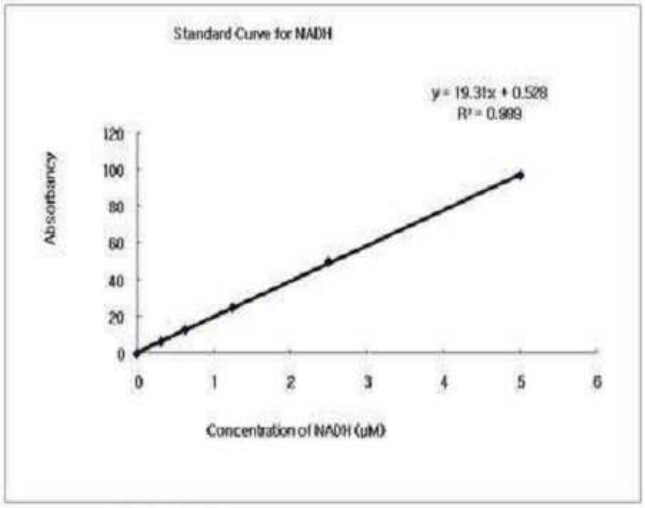
도면3


lacZ_a
M13_pUC_fwd_primer
M13_forward20_primer
M13_reverse_primer
M13_pUC_rev_primer
lac_promoter
tac_promoter
M13_pUC_rev_primer
MscI 465
SfoI 4288
NarI 4287
KasI 4206
MpaI 4153
EcoRV 4097
BssHII 4058
ApaI 3858
PspOMI 3854
lacI
MluI 3647
ORF
ORF
BstBI 655
SwaI 685
pGEX 5 primer
BamH I
NcoI 935
EcoR I
pGEX_3_primer
AatII 1224
pGEX-2T
4948 bp
Ampicillin
ORF
p8R322 origin
PstI 1901

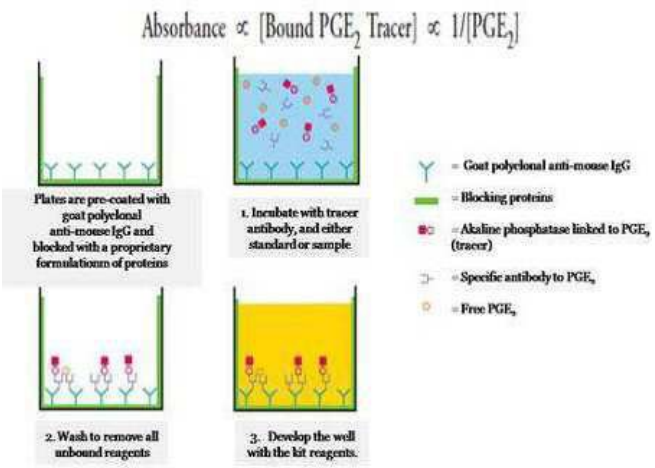
도면4


재조합 플라스미드(15-PGDH)로 BL21 DE3
competent E.Coli에 형질전환: 단백질 발현
글루타치온 세파로오즈 4B 컬럼
NAD+-의존성 15-PGDH
15-PGDH (29KD)
SDS-PAGE

도면5

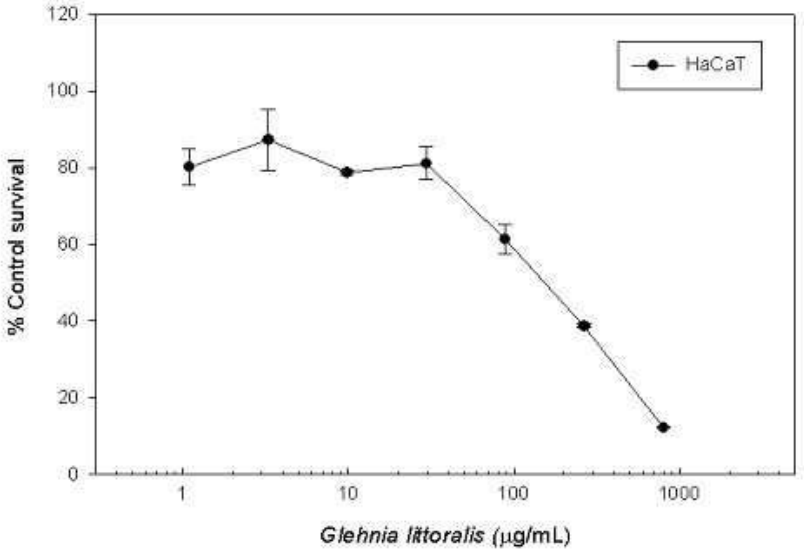

Standard Curve for NADH
y = 19.31x + 0.528
R² = 0.999
Absorbancy
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Concentration of NADH (uM)

도면6

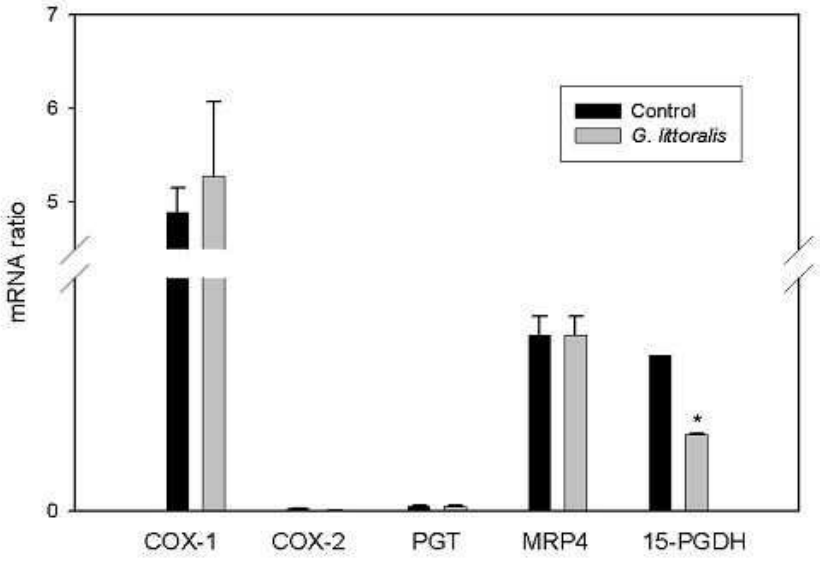

Absorbance ∝ [Bound PGE2 Tracer] ∝ 1/[PGE2]
Plates are pre-coated with goat polyclonal anti-mouse IgG and blocked with a proprietary formulationm of proteins
1. Incubate with tracer antibody, and either standard or sample
2. Wash to remove all unbound reagents
3. Develop the well with the kit reagents.
= Goat polyclonal anti-mouse IgG
= Blocking proteins
= Alkaline phosphatase linked to PGE2 (tracer)
= Specific antibody to PGE2
= Free PGE2

도면7

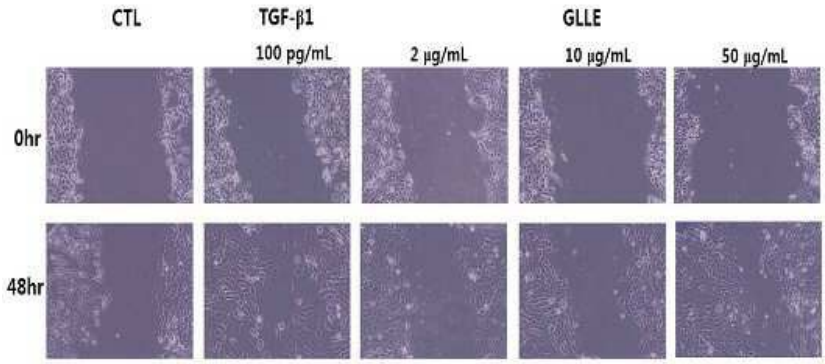
도면8


HaCaT
% Control survival
120
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
Glehnia littoralis (μg/mL)

도면9


Control
G. littoralis
mRNA ratio
7
6
5
0
*
COX-1
COX-2
PGT
MRP4
15-PGDH

도면10


CTL
TGF-β1
100 pg/mL
2 μg/mL
GLLE
10 μg/mL
50 μg/mL
0hr
48hr