



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0113462
(43) 공개일자 2009년11월02일

(51) Int. Cl.

A61K 33/14 (2006.01) A61K 36/899 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0039197

(22) 출원일자 2008년04월28일

심사청구일자 2008년04월28일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

주식회사 라이프투게더

강원 춘천시 약사동 40-2

(72) 발명자

음원식

강원 춘천시 후평2동 595번지 극동늘푸른아파트
101-301

최수영

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105-706

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

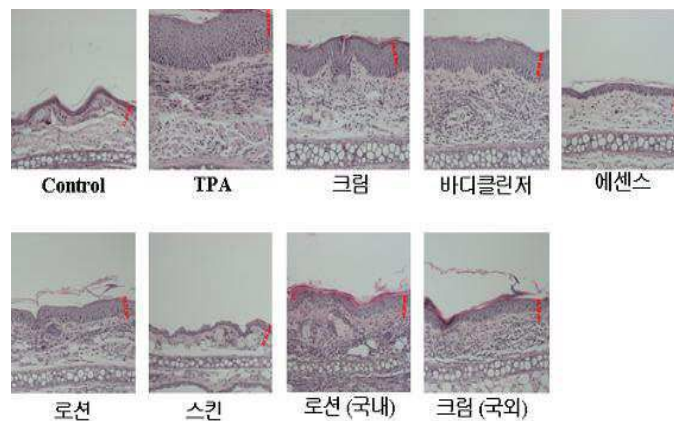
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 피부 염증 예방 및 치료용 천연물 조성물

(57) 요약

본 발명은 아토피 피부염 등 피부 염증을 억제하는 천연물 조성물에 관한 것으로서, 좀더 자세히는 세포 및 동물 실험을 통하여 다양한 천연물질 중 소금, 오죽 및 루이보수의 혼합 조성물이 염증 억제 효능을 나타냄을 확인하였다. 또한, 상기 천연물 조성물을 함유한 화장품 제품이 동물실험에서 염증반응에 의한 다양한 사이토카인 mRNA의 발현을 효과적으로 감소시켜주는 것을 확인하였고, 조직염색을 통하여 염증반응에 의한 조직의 부종을 현저히 감소시킴을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 본 발명의 조성물이 세포 및 조직에서 염증반응을 안정적이고 효과적으로 억제함을 잘 나타내고 있다. 따라서, 본 발명 조성물은 아토피 피부염 등의 피부 염증 억제 기능성 화장품 및 피부 외용제로 이용할 수 있다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

박진서

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105동 1404호

송운서

강원도 춘천시 약사동 40-2

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

부처명

중소기업청

연구사업명

산학연공동기술개발컨소시엄사업

연구과제명

아토피 피부염 신소재 개발

주관기관

한림대학교 산학협력단

연구기간

2007년 09월 01일 ~ 2008년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

소금, 오죽 추출물 및 루이보수 추출물의 혼합 조성물을 유효성분으로 함유하는 피부 염증 예방 및 치료용 천연물 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 혼합 조성물은 소금: 오죽 추출물: 루이보수 추출물의 중량 혼합비가 1: 0.001~10: 0.001~10인 것을 특징으로 하는 피부 염증 예방 및 치료용 천연물 조성물.

청구항 3

소금, 오죽 추출물 및 루이보수 추출물의 혼합 조성물을 유효성분으로 함유하는 피부 염증 예방 및 개선용 화장료 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 혼합 조성물은 소금: 오죽 추출물: 루이보수 추출물의 중량 혼합비가 1: 0.001~10: 0.001~10인 것을 특징으로 하는 피부 염증 예방 및 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 조성물은 에센스 또는 스킨 제형인 것을 특징으로 하는 피부 염증 예방 및 개선용 화장료 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 아토피 피부염 등 피부 염증을 억제하는 천연물 조성물에 관한 것으로서, 좀더 자세히는 소금, 오죽, 루이보수를 적절한 비율로 조합하여 각 단일성분보다 염증 억제 기능이 향상된 천연물 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

- <2> 아토피 피부염의 발병은 국내의 경우 약 18~20%의 발생빈도를 보이며, 선진국에서도 전 인구의 약 20~40%의 환자 발생이 보고되었다. 선진국의 경우 치료비용이 년 약 1-2조원에 이르며 국내는 약 1000억 원 이상의 규모로서, 아토피 피부염 예방 및 치료에 막대한 경제적 손실이 발생하고 있다. 아토피 피부병은 발병 후 지속적인 장기간 동안의 치료가 요구되며, 또한 현재까지 증상과 병력에 의존하는 진단 외에 아토피 피부염의 병리유전학적(pathogenomic) 기준에 의존하는 진단법이 사실상 개발되어 있지 않다. 이런 점에 근거하여 새로운 진단법과 치료약제의 개발은 부가가치가 막대하다.
- <3> 일부 아토피 피부염환자는 타인과 어울리기 싫어하는 대인 기피증이 있어 학교 및 사회생활에 크게 영향을 준다. 환자 자신의 소외감, 불안증, 수면장애뿐만 아니라 환자 부모들도 수면장애, 정서적인 장애, 피곤함 등으로 가족 및 사회생활에 있어 막대한 지장을 초래한다.
- <4> 아토피 피부병의 치료로는 증세에 따라 다양한 기존의 치료 방법이 현재까지 사용되고 있으며 크게 국소요법, 전신투약요법, 자외선 등의 물리적 요법으로 대변된다. 그러나 치료에 있어서 사용되고 있는 국소 및 전신 약제의 장기 투여는 반대급부로 후유증 및 부작용을 동반해서 치료가 성공적일지라도 치료 중단 시 곧 병변이 재발되는 어려움이 있다. 또한 현재 선진국에서 개발되어 임상 시험 중인 여러 약제의 경우도 효과적이긴 하나 전신적 투여 시 의료비용의 부담이 크며, 장기간 사용 시 부수적으로 야기되는 전신면역 억제 현상으로 인해 또 다른 질환을 발생시킬 수 있는 단점이 있다.
- <5> 효율적인 아토피 피부염 예방 및 치료를 위해서는 기존의 치료법과 상이한 특이적 치료법의 개발이 요구된다. 효과적인 치료방법의 확립은 환자 개인뿐 아니라 사회적인 비용을 획기적으로 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

이와 아울러 기존의 치료제의 단점을 개선하고 약효가 뛰어난 약제의 개발은 치료 효과의 개선, 치료기간의 단축 및 비용의 절감을 통하여 많은 파급효과를 줄 것이다.

- <6> 아토피성 피부면역 질환을 포함한 면역질환 진단시장의 세계규모는 1997년도 기준으로 약 13억불에 이르며 2005년에는 16억불에 이를 것으로 추정되고 있다.
- <7> 국내는 피부과 내원 환자 중 아토피 피부염이 수위인 것을 감안할 때 약 1000억 원 이상의 규모이며 아토피 피부염 치료 및 예방을 위하여 의사 처방 없이 손쉽게 제제를 구입하는 비용이 약 100~200억 원이라고 보고되었다.
- <8> 또한, 아토피 화장품 시장은 국내에서 2003년에 400억 원대로 확대되고 향후 3-5년 이내에 1천억 원대의 시장을 형성할 것으로 전망하고 있다.
- <9> 특허공개공보 2002-61963호는 청자소엽 및 자소엽 추출물과 소금을 함유한 아토피 피부염 치료용 화장료에 대해 개시하고 있다.
- <10> 또한, 특허 제772494호는 생체 적합성 고분자, 다가 알콜 및 약용식물 추출물을 포함하여 구성되는 아토피 피부염 치료용 수화겔에 관한 것으로서, 수화겔을 구성하는 주요 성분인 생체 적합성 고분자의 보조적 성분으로서, 어성초, 감잎, 애기뽕풀, 솔잎, 작두콩, 로즈마리, 라벤더, 스피아민트, 카모마일 및 루이보수 혼합 추출물을 개시하고 있다.
- <11> 또한, 특허 제761248호는 대나무 및 황금 추출물을 일정 비율로 혼합한 아토피 치료용 조성물에 관한 것이다.
- <12> 그러나, 현재까지 소금, 대나무, 루이보수 각 개별 천연물 성분보다 더 효능이 우수한 상기 세 가지 성분의 혼합 조성물에 대해서는 알려진바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <13> 따라서, 본 발명은 인체에 대한 부작용이 없거나 적은 다양한 천연물을 발굴하여 이들의 염증억제 효능을 규명함으로써 새로운 염증억제 기능성 화장료 및 피부 외용제를 개발하려는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- <14> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자는 다양한 천연물과 천연물의 조성물에 대하여 농도와 혼합 종류를 달리해 가며 염증 억제 효과 등을 실험하고, 가장 뛰어난 염증 억제 효과를 나타내는 혼합물 조성을 발명하게 되었다.

효 과

- <15> 본 발명에 의한 천연물 조성물은 아토피, 가려움증 등 피부 염증 질환 치료에 효과적인 피부 외용제 및/또는 화장료를 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <16> 본 발명자들은 피부 및 면역세포에서 본 발명 조성물의 세포 유해성을 시험한 결과, 본 발명 조성물을 구성하는 각 원료인 소금, 오죽, 루이보수 및 이들 세 가지 천연물의 조성물은 일정 농도 이하로 투여하였을 경우 세포 유해성이 크지 않음을 확인할 수 있었다(도 1, 2).
- <17> 또, 면역세포에 지다당을 처리하여 세포 내 염증반응을 일으킨 다음 각 시료를 넣어 이 시료들이 세포 내 염증반응을 효과적으로 억제하는지를 COX-2 수준을 웨스턴 블랏팅으로 측정한 결과, 각 단일 원료 및 본 발명의 천연물 조성물이 면역세포에서 염증반응을 억제함을 알 수 있었다(도 3).
- <18> 피부 세포 염증반응에서 MMP-9의 활성을 측정한 결과, 염증반응에 의한 MMP-9의 활성이 본 발명의 천연물 조성물 처리에 의하여 현저히 감소하였다(도 4).
- <19> 또, 본 발명자들은 염증 동물모델을 제조하고 본 발명의 천연물 조성물을 처리하여 마우스의 귀 무게와 두께를 측정하여 염증억제 효능을 확인한 결과, 본 발명의 조성물은 모두 동물모델에서 염증을 억제하였고, 특히 소금 10%를 혼합한 천연물 조성물(즉, 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%, 소금 10%)이 가장 현저한 효능을 나타내

었다(도 5).

- <20> 또한, RT-PCR을 이용하여 염증반응에서 발현되는 COX-2와 IL-1 β mRNA를 확인한 결과, 본 발명의 조성물을 처리하면 염증반응에서 일어나는 사이토카인의 발현이 현저하게 감소하고, 소금 10%가 함유된 천연물 조성물(즉, 소금 10%, 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%)이 동물모델에서 염증억제 효능을 나타내었다(도 6).
- <21> 본 발명의 조성물(소금 10%, 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%)을 다양한 화장품 제형으로 제조하여 동물 모델의 염증에 대한 효과를 조사한 결과, 양성 대조군으로 시판 중인 국내기업 및 국외기업의 아토피 염증 화장품에 비하여 우수한 결과를 나타내었고, 그 중 에센스 및 스킨 제품이 가장 효능이 좋았다.
- <22> 같은 조건에서 염증반응에서 발현되는 다양한 사이토카인(COX-2, IL-1 β , MIP2, KC) mRNA를 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과, 염증반응에서 일어나는 사이토카인의 발현이 현저하게 감소함을 알 수 있었으며, 대조군보다 효능이 더 좋은 것을 알 수 있었다(도 8).
- <23> 조직염색을 통하여 본 발명의 조성물을 함유한 화장료의 염증 억제 효능을 확인한 결과, 본 발명의 천연물 혼합물을 함유한 화장품이 염증반응에 의한 부종을 억제함을 확인하였다(도 9).
- <24> 또한, 도 5, 도 6, 도 7의 결과 등을 통하여 각 개별 천연물보다 소금, 오죽 및 루이보수 추출물의 혼합 조성물이 현저한 염증 개선 효과를 나타냄을 확인할 수 있다.
- <25> 본 발명은 소금, 오죽 추출물 및 루이보수 추출물을 유효성분으로 하는, 아토피 피부염을 비롯한 피부 염증 예방 및 치료용 천연물 조성물을 제공한다.
- <26> 본 발명의 조성물에 있어서, 오죽 및 루이보수는 상업적으로 구입할 수 있는 통상의 생약 원물을 사용할 수 있고, 이들 생약의 전초, 가지, 껍질, 잎, 순, 뿌리, 내피 등을 사용할 수 있고, 바람직하게는 이를 분말화하거나 추출물을 제조하여 사용할 수 있다.
- <27> 본 발명의 오죽 추출물 및 루이보수 추출물은 물 또는 C1~4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 사용할 수 있다. 상기 오죽 및 루이보수 추출물은 50~90% 에탄올 추출물이나 열수 추출물을 사용하는 것이 바람직하다.
- <28> 상기 추출은 열탕추출, 소니케이션 등 통상의 방법으로 수행할 수 있으며, 이 추출물의 동결건조물을 형성하여 본 발명의 조성물에 사용할 수도 있다. 또한 상기 추출물은 통상의 분획법 또는 크로마토그래피에 의해 좀더 정제된 상태로 사용할 수 있으며, 이러한 분획물 또는 정제물 또한 본 발명의 범위에 속함은 자명하다.
- <29> 본 발명의 조성물은 각각의 성분을 단독으로 사용하는 것보다 오죽 추출물, 루이보수 추출물과 소금을 혼합하여 사용할 경우 상승효과를 나타내어 실제 염증 유발 피부에서 염증을 억제하는 효과가 현저하게 나타났다. 본 발명 조성물은 예컨대, 소금, 오죽 추출물 및 루이보수 추출물을 중량 대비 1: 0.001~10: 0.001~10, 바람직하게는 1: 0.05~1: 0.05~1의 중량비로 혼합할 수 있다. 오죽 또는 루이보수 추출물이 0.001 미만인 경우에는 혼합 조성물의 현저한 효과를 거둘 수 없으며, 오죽 또는 루이보수 추출물이 10을 넘는 경우에는 함량 증가에 따른 효과 증대 정도가 미미하여 비경제적이다.
- <30> 본 발명의 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의해 제제화할 수 있고, 추출물 자체 또는 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 등과 혼합하여 통상의 약학적 제제, 예를 들면 액제, 시럽제, 캡슐제, 과립제, 분말, 연고, 예멀전, 겔, 크림 등으로 제제화할 수 있으며, 이를 여러 경로로 투여할 수 있다.
- <31> 본 발명 조성물의 투여량에 특별한 제한은 없으나, 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 추출물은 통상 1일 0.0001~100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001~100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한 번 내지 수회 나누어 투여할 수 있다.
- <32> 본 발명은 또한, 상기 천연물 조성물을 유효성분으로 하는 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- <33> 본 발명은 또한, 상기 천연물 조성물을 유효성분으로 하는 화장료 조성물을 비롯한 피부 외용제 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물을 유효성분으로 하는 도포제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 크림형 도포제를 제조함에 있어서는 일반적인 수중유형(O/W) 또는 유중수형(W/O)의 크림 베이스에 본 발명의 천연물 조성물을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.

- <34> 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은 화장료로서 이용할 수 있는데, pH 조절제, 향료, 유화제, 방부제 등을 필요에 따라 부가하여 통상의 화장료 제조 방법으로 화장수, 젤, 수용성 파우더, 지용성 파우더, 수용성 리퀴드, 크림 또는 에센스 등으로 제형화할 수 있다.
- <35> 아래에서는 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- <36> **실시예 1: 천연물 추출물 제조**
- <37> 소금은 라이프투게더(한국)에서 중금속 등 불순물을 제거한 정제천일염을 입수하였고, 오죽 추출물은 오죽의 잎과 대(줄기)를 열수추출하여 농축한 액상의 것을 라이프투게더에서 입수하였으며, 루이보수 추출물은 루이보수의 잎과 줄기를 열수추출 및 농축한 액상의 것을 라이프투게더에서 입수하였다.
- <38> **1-1. 오죽 추출물 제조**
- <39> 음건한 오죽 잎 10kg에 6배 중량의 물을 가한 후 100℃에서 6시간 가열하여 추출하였다. 추출액을 여과하고 감압 농축한 후 침전물을 여과하여 제거하고, 여과액을 감압 농축하여 150g의 오죽 추출물을 수득하였다.
- <40> **1-2. 루이보수 추출물 제조**
- <41> 루이보수 잎 1kg에 물 5ℓ를 가하고, 75℃에서 3시간 동안 환류 추출하였다. 추출물을 냉각, 여과, 농축하여 루이보수 추출물 200g을 얻었다.
- <42> **1-3. 혼합 조성물 제조**
- <43> 상기와 같이 제조한 오죽 추출물과 루이보수 추출물을 이용하여 오죽 2%, 루이보수 5%인 조성물, 오죽 2%, 루이보수 5%, 소금 5%인 조성물, 오죽 2%, 루이보수 5%, 소금 10%인 조성물을 제조하였다.
- <44> **실시예 2: 세포배양**
- <45> 면역세포 Raw 264.7(ATCC No. TIB-71™)를 ATCC에서 구입하였고, 피부세포 HaCaT(Human keratinocyte cell line)를 N. Fusenig 교수(German Cancer Research Institute, Germany)에게서 받았다. 37℃에서 95% 공기와 5% CO₂를 공급해주며 5% FBS(fetal bovine serum) 및 항생제(100μg/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린) 그리고 3.7g/ℓ NaHCO₃가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 배양하였다.
- <46> **실시예 3: MTT 어세이**
- <47> 세포의 생존율은 세포에 지다당(Lipopolysaccharide; "LPS") 100ng/ml를 처리한 다음, 시료를 처리한 후 MTT[3-(4,5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 활성을 측정하여 결정하였다.
- <48> 먼저, 세포를 96 웰 플레이트에 놓고 시료를 처리한 후 5mg MTT/PBS 1ml의 MTT 용액 20μℓ를 가하여 37℃로 CO₂ 배양기에서 4시간 가량 배양하였다. 배지를 제거하고 여기에 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 20μℓ 가하여 혼합한 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다.
- <49> **실시예 4: 웨스턴 블랏 분석**
- <50> 세포 분쇄액 내의 단백질을 SDS 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동으로 분리한 다음 젤에 있는 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 전기이동시켰다. 단백질이 이동된 니트로셀룰로스 막을 5% 탈지분유가 들어있는 TBST(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20) 완충액으로 2시간 실온에서 블로킹시킨 후, 막을 1차 항체로 1시간 반응시켰다. 1차 항체를 TBST 완충액으로 세척한 다음 피옥시다제가 결합된 항-마우스 IgG 항체(Sigma, 1:10,000 희석)로 1시간 반응시키고 ECL 키트를 이용하여 단백질에 반응하는 단백질 띠를 확인하였다.
- <51> **실시예 5: 피부 염증 동물모델**
- <52> TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 1mg/ml 용액을 아세톤과 1: 20 비율로 혼합하여 6-8주 된 ICR 생쥐의 귀에 6시간 간격으로 3회/day, 1주일간 발라주어 피부 염증 동물모델을 제조하였다.
- <53> **실시예 6: 화장료 제조**
- <54> 소금 10%, 오죽 추출물 2% 및 루이보수 추출물 5%를 함유한 다양한 화장료(크림, 바디클린저, 에센스, 로션, 스킨)를 제조하였다. 통상적인 크림, 바디클린저, 에센스, 로션 및 스킨 베이스에 소금 10%, 오죽 추출물 2% 및

루이보수 추출물 5% 농도가 되도록 가하여 화장료를 제조하여 시험에 사용하였다.

<55> **실시예 7: 사이토카인 mRNA 분석**

<56> 세포 및 조직에서 RNA 분리 키트를 총 RNA를 이용하여 분리하였다. 분리된 RNA에 사이토카인에 대한 프라이머를 가하여 RT-PCR을 수행하여 사이토카인의 발현 정도를 확인하였다.

<57> 각 사이토카인 프라이머는 다음과 같다.

<58> COX-2 센스 프라이머: 5'-ACTCACTCAGTTTGTGAGTCATTC-3'

<59> COX-2 안티센스 프라이머: 5'-TTTGATTAGTACTGTAGGGTTAATG-3'

<60> IL-1 β 센스 프라이머: 5'-TGCAGAGTTCCCCAACTGGTACATC-3'

<61> IL-1 β 안티센스 프라이머: 5'-GTGCTGCCTAATGTCCCCTGAATC-3'

<62> MIP-2 센스 프라이머: 5'-GAACAAAGGCAAGGCTAACTGA-3'

<63> MIP-2 안티센스 프라이머: 5'-AACATAACAACATCTGGGCAAT-3'

<64> KC 센스 프라이머: 5'-AAGGGAGAAGAAGACAGAC-3'

<65> KC 안티센스 프라이머: 5'-GACGAGACCAGGAGAAACAG-3'

<66> 액틴 센스 프라이머: 5'-GGACAGTGAGGCCAGGATGG-3'

<67> 액틴 안티센스 프라이머: 5'-AGTGTGACGTTGACATCCGTAAACA-3'

<68> **실시예 8: 면역조직염색(Immunohistochemistry)**

<69> 실험동물은 질소와 산소 혼합가스가 들어있는 3% 이소플루란스(isoflurance)로 마취시킨 후 관류 세척하였다. 관류 세척이 끝난 후, 적출된 장기는 파라포름알데히드를 함유한 0.1M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)으로 고정하고 고정이 끝난 조직은 조직을 떼어내어 4% 파라포름알데히드 용액에 담가 보존하였다. 조직을 임베딩 배지(Reichert-Jung, Germany)로 포매하고 동결박절기(cryostat; Reichert-Jung, Germany)를 이용하여 절편으로 만든 다음 사용하였다.

<70> 조직 절편은 0.01M PBS로 10분간 완충시킨 후 다시 증류수로 10분간 세척하였다. 7분씩 2회 PBS로 세척한 다음 조직 내의 내인성 퍼옥시다제를 제거하기 위해서 0.5% 과산화수소가 함유된 PBS 용액에서 20분간 반응시켰다. 이후 PBS로 7분씩 3회 세척한 후 비특이적 반응을 방지하기 위하여 조직을 PBS에 들어있는 5% 정상 염소 혈청에 30분간 반응시킨 다음 통상적인 스트렙타비딘-바이오틴 퍼옥시다제법을 이용한 면역조직화학반응을 실시하였다.

<71> **<결과>**

<72> **1. 피부 및 면역 세포에서의 염증 억제**

<73> **1) 피부 및 면역세포에서 본 발명 조성물의 세포 유해성 시험**

<74> 소금, 오죽, 루이보수를 피부 및 면역세포에 다양한 농도별로 투여하고 세포 생존율(cell viability)을 측정하였다(도 1, 2). 그림에서 보여주듯이 본 발명 조성물을 구성하는 각 원료인 소금, 오죽, 루이보수 및 이들 세 가지 천연물의 조성물은 일정 농도 이하로 투여하였을 경우 세포 생존율을 크게 낮추지 않아 세포 유해성이 크지 않음을 확인할 수 있었다.

<75> **2) 면역세포에서의 면역억제 효능**

<76> 면역세포에 지다당을 처리하여 세포 내 염증반응을 일으킨 다음 각 시료를 넣어 이 시료들이 세포 내 염증반응을 효과적으로 억제하는지를 COX-2 수준을 웨스턴 블랏팅으로 측정하여 확인하였다(도 3). 각 단일 원료 및 본 발명의 천연물 조성물이 면역세포에서 염증반응을 억제함을 알 수 있었다.

<77> **3) 피부 세포에서의 면역억제 효능**

<78> 피부 세포 염증반응에서 MMP-9의 활성을 측정하였다. MMP-9은 염증반응에서 활성이 증가하는 것으로 잘 알려져 있다. 시험 결과, 염증반응에 의한 MMP-9의 활성이 본 발명의 천연물 조성물 처리에 의하여 현저히 감소함을 알 수 있었다(도 4).

2. 동물모델에서의 염증 억제

1) 염증 동물모델 제조 및 효능

TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)를 아세톤에 녹인 후 6-8주 된 ICR 생쥐의 귀에 매일 발라주고 1시간 후 시료를 같은 곳에 발라주었다. 그런 다음, 마우스의 귀 무게와 두께를 측정하여 염증억제 효능을 확인하였다(도 5).

도 5와 같이, 본 발명의 조성물은 모두 동물모델에서 염증을 억제하였고, 특히 소금 10%를 혼합한 천연물 조성물(즉, 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%, 소금 10%)이 가장 현저한 효능을 나타내었다.

또한, RT-PCR을 이용하여 염증반응에서 발현되는 COX-2와 IL-1 β mRNA를 확인하였다. 본 발명의 조성물을 처리하면 염증반응에서 일어나는 사이토카인의 발현이 현저하게 감소함을 알 수 있었으며, 소금 10%가 함유된 천연물 조성물(즉, 소금 10%, 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%)과 오죽, 루이보수 모두가 동물모델에서 염증억제 효능을 나타내었다(도 6).

2) 화장품 제조 및 효능

본 발명의 조성물 즉, 소금 10%, 오죽 추출물 2% 및 루이보수 추출물 5%를 함유한 다양한 화장품 제품(크림, 바디클린저, 에센스, 로션, 스킨)을 제조하였고, 이러한 제품들을 위와 같은 방법으로 확인하였다. 양성 대조군으로 시중에서 판매되고 있는 국내기업 및 국외기업의 아토피 염증 화장품을 구입하여 사용하였다. 로션(양성대조군)은 국내 제품(B사 제품)으로 동백 추출물, 마치현 추출물, 옥수수과 콩에서 추출한 다당류 및 셰어버터를 주요 성분으로 하는 제품이고, 크림(양성 대조군)은 국외 제품(N사 제품)으로 천연달맞이꽃 오일과 판테놀을 주요 성분으로 하는 제품이다.

도 7과 같이, 모든 화장품 제품에서 염증억제 효능이 나타났지만 그 중 에센스 및 스킨 제품이 가장 효능이 잘 나타났고, 대조군으로 사용한 현재 시중에서 판매되는 국내/외 아토피 염증 화장품보다 효능이 더 좋은 것을 알 수 있었다.

같은 조건에서 염증반응에서 발현되는 다양한 사이토카인(COX-2, IL-1 β , MIP2, KC) mRNA를 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과, 염증반응에서 일어나는 사이토카인의 발현이 현저하게 감소함을 알 수 있었으며, 특히 에센스, 로션, 스킨 제형은 동물모델에서 염증억제 효능이 잘 나타났다(도 8). 또한, 대조군보다 효능이 더 좋은 것을 알 수 있었다.

3) 조직염색

조직염색을 통하여 본 발명의 조성물을 함유한 화장료의 염증 억제 효능을 확인하였다(도 9). 그림과 같이, 본 발명의 조성물을 함유한 화장품이 염증반응에 의한 부종을 억제하고 있음을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 면역세포에서의 안정성 데이터.

소금, 오죽, 루이보수는 각각 소금 5% 농도, 오죽 추출물 2% 농도, 루이보수 추출물 5% 농도의 용액을 나타내며, 우측의 혼합물(0%)는 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%가 함유된 혼합 조성물, 혼합물(5%)는 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%, 소금 5%를 의미하고, 혼합물(10%)는 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%, 소금 10%를 의미한다. 이하 도면에서 동일하게 사용되었다.

도 2는 피부세포에서의 안정성 데이터.

도 3은 LPS에 의한 면역세포에서 COX-2 발현 변화를 나타내는 웨스턴 블랏팅 결과.

도 4는 MMP-9 활성 억제 효과.

소금 0%는 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%가 혼합된 조성물,

소금 5%는 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%, 소금 5%가 혼합된 조성물,

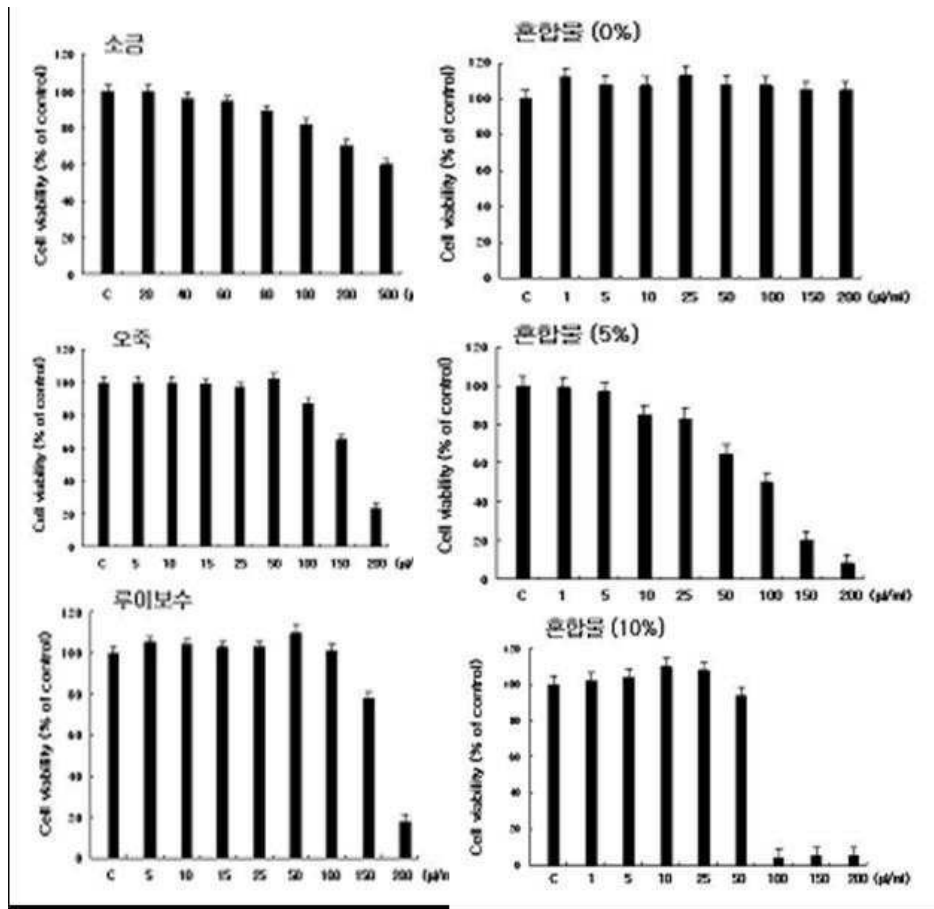
소금 10%는 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%, 소금 10%가 혼합된 조성물을 의미한다.

도 5는 마우스에서 본 발명 조성물의 염증억제 효능.

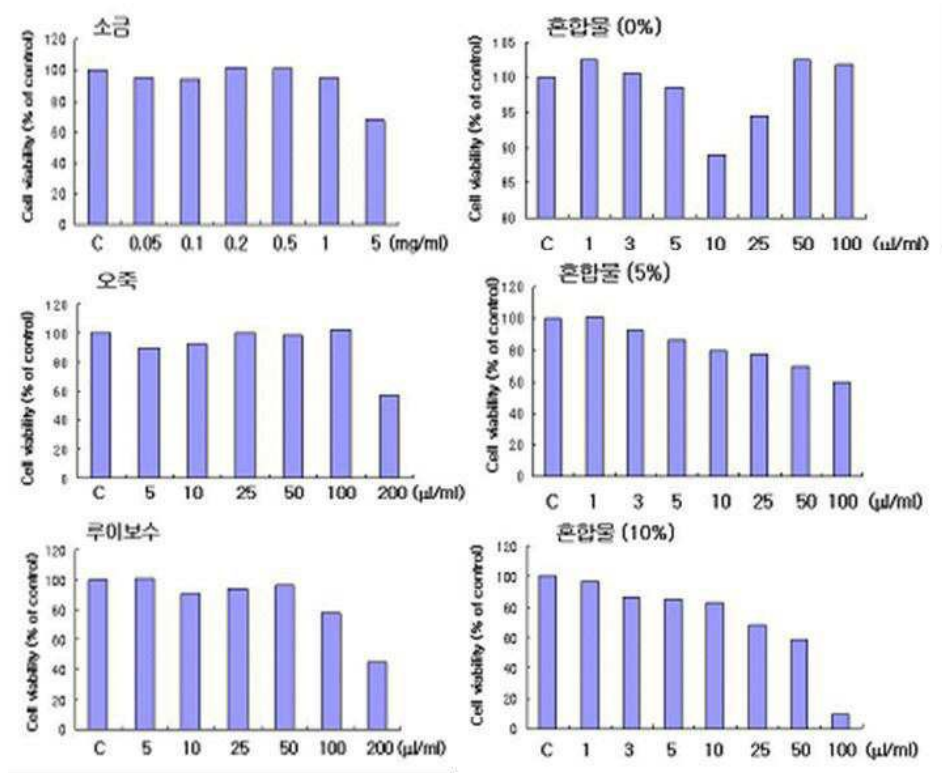
- <99> 1: 소금 5%,
- <100> 2: 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%가 혼합된 조성물,
- <101> 3: 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%, 소금 5%가 혼합된 조성물,
- <102> 4: 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%, 소금 10%가 혼합된 조성물,
- <103> 5: 오죽 추출물 2%,
- <104> 6: 루이보수 추출물 5%.
- <105> 도 6은 마우스에서 사이토카인 mRNA의 발현 변화
- <106> 1: 대조군,
- <107> 2: TPA 처리,
- <108> 3: 소금 5%,
- <109> 4: 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%가 혼합된 조성물,
- <110> 5: 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%, 소금 5%가 혼합된 조성물,
- <111> 6: 오죽 추출물 2%, 루이보수 추출물 5%, 소금 10%가 혼합된 조성물,
- <112> 7: 오죽 추출물 2%,
- <113> 8: 루이보수 추출물 5%
- <114> 도 7은 본 발명 조성물을 함유한 화장품 제형이 마우스에서 염증을 억제하는 효능을 시험한 결과이다.
- <115> 1: 크림, 2: 바디클린저, 3:에센스, 4:로션, 5:스킨, 6:로션(양성 대조군), 7: 크림(양성 대조군)
- <116> 도 8은 본 발명 조성물을 함유한 화장품 제형이 사이토카인 mRNA의 발현을 억제하는 효능을 시험한 결과.
- <117> 1: 대조군, 2: TPA, 3: 크림, 4: 바디클린저, 5:에센스, 6:로션, 7:스킨, 8: 로션(양성 대조군), 9: 크림(양성 대조군).
- <118> 도 9는 본 발명의 조성물을 함유한 화장품 제형이 염증반응에 의한 귀 조직 부종을 억제하는 효과.

도면

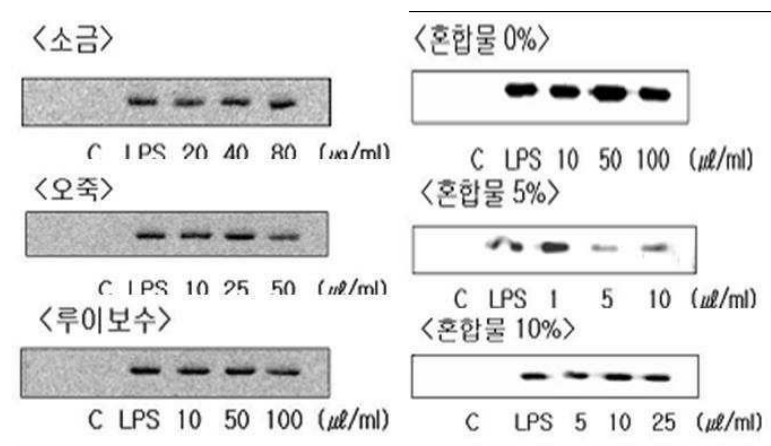
도면1



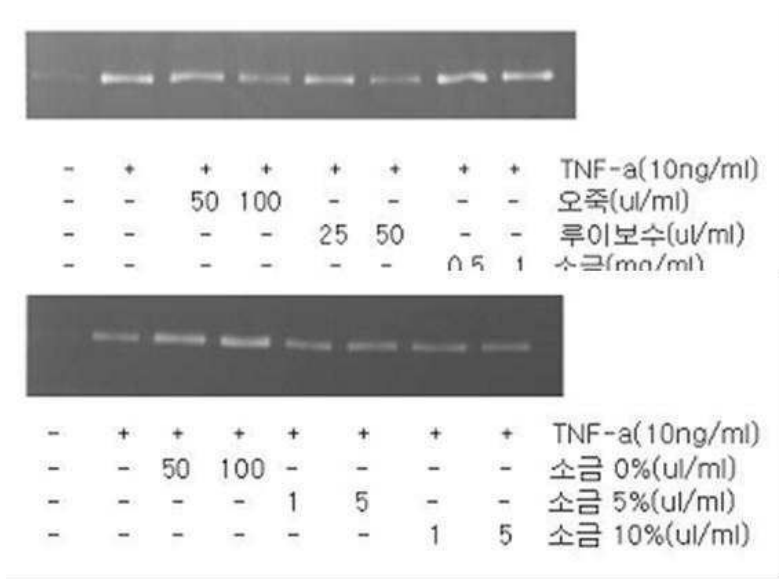
도면2



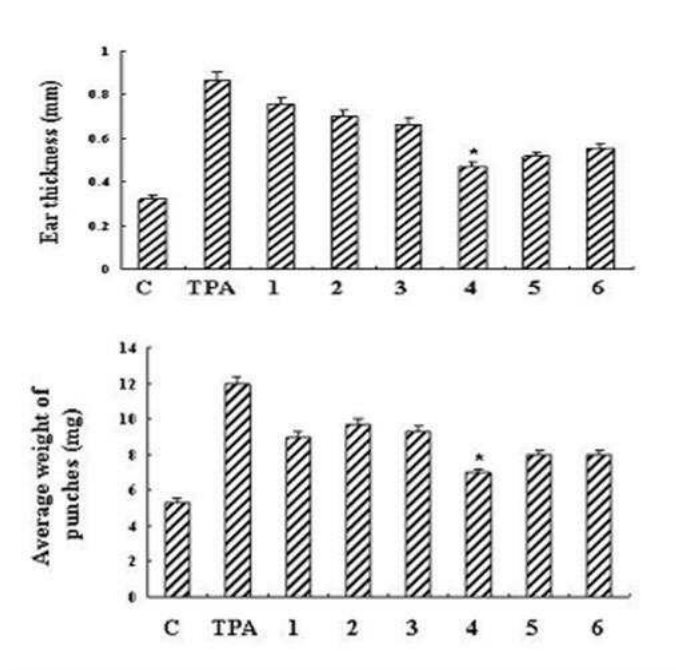
도면3



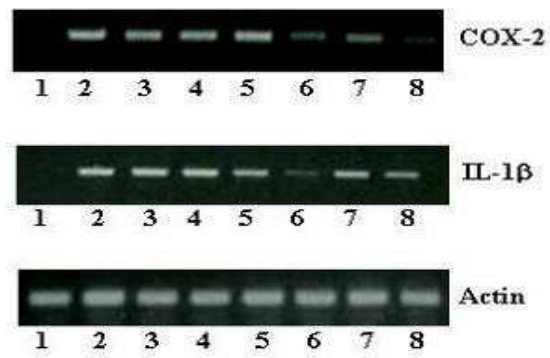
도면4



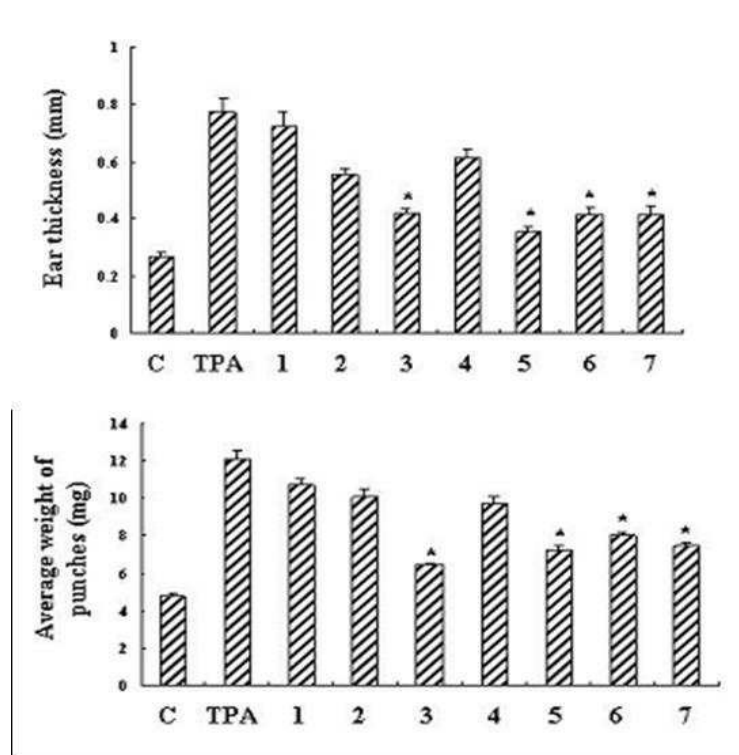
도면5



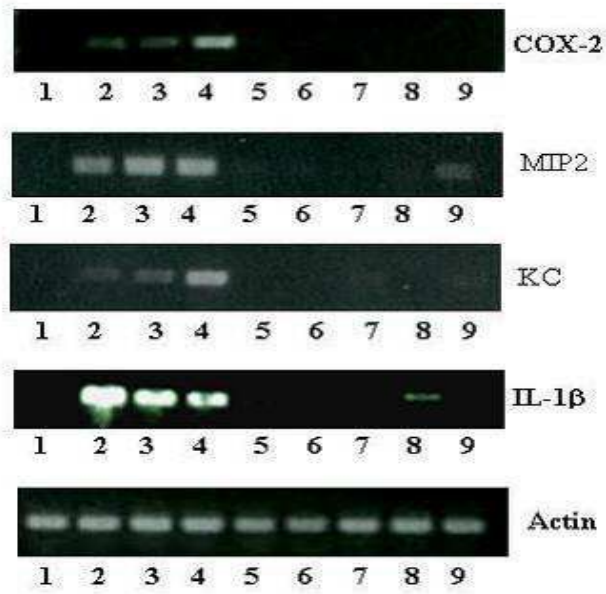
도면6



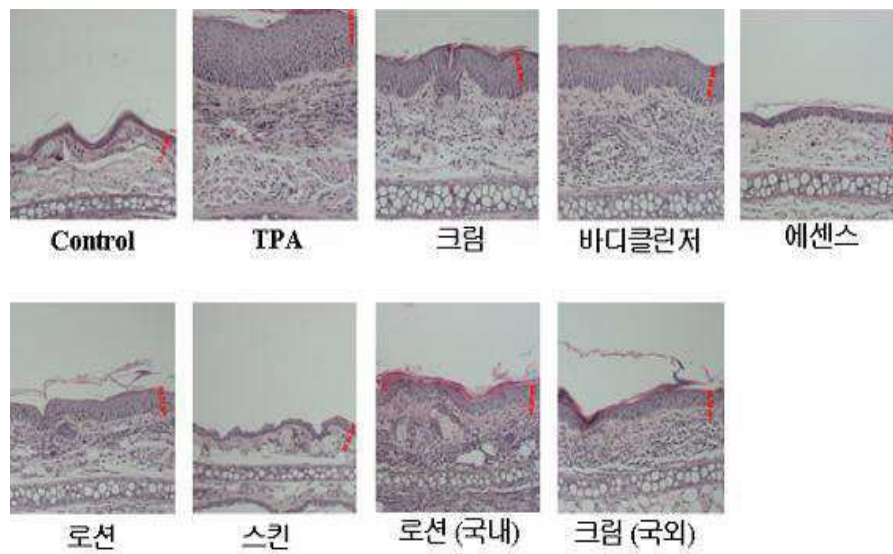
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY
LIFETOGETHER CO., LTD
- <120> A NATURAL COMPOSITION WHICH INHIBITS SKIN INFLAMMATION

<130> Hallym-WSEUM01

<160> 10

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer of COX-2

<400> 1

actcactcag ttgttgagt cattc

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense primer of COX-2

<400> 2

tttgattagt actgtagggt taatg

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer of IL-1b

<400> 3

tgcagagttc cccaactggt acatc

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense primer of IL-1b

<400> 4

gtgctgccta atgtcccctt gaatc

25

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer of MIP-2

<400> 5

gaacaaaggc aaggctaact ga

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense primer of MIP-2

<400> 6

aacataacaa catctgggca at

22

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer of KC

<400> 7

aagggagaag aagacagac

19

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> antisense primer of KC

<400> 8
 gacgagacca ggagaaacag

20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> sense primer of actin

<400> 9
 ggacagtgag gccaggatgg

20

<210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> antisense primer of actin

<400> 10
 agtgtgacgt tgacatccgt aaaca

25