

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0046604
(43) 공개일자 2025년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/185 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/185 (2024.05)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0130227

(22) 출원일자 2023년09월27일

심사청구일자 2023년09월27일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

정혁상

서울특별시 성동구 고산자로 160 (응봉동, 대림강변 타운)

손영주

서울특별시 강남구 역삼로 315-1 (역삼동, 개나리SK뷰)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 11 항

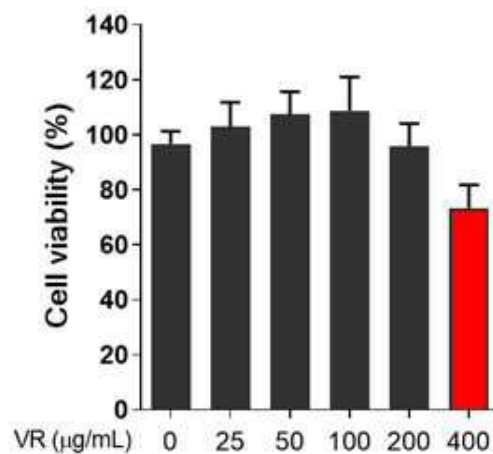
(54) 발명의 명칭 곡기생 추출물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 곡기생(Visci Ramuluset Folium) 추출물을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 상기 곡기생 추출물의 비만세포 탈과립, RBL2H3 세포에서의 IL-4 발현 억제능, 및 HaCaT 세포에서의 TARC, MDC, 및 GM-CSF의 발현 억제능을 확인하고, MAPK 신호전달 경로에 미치는 영향으로서 RBL2H3 세포에서의 ERK, JNK, 및 p38 억제능, 및 HaCaT 세포에서 JNK 억제능을 확인하였다.

이에 따라 상기 곡기생 추출물을 항아토피 피부염 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 효과적으로 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

김은영

경기도 성남시 중원구 은이로24번길 4 (은행동, 성진빌라)

김엄지

서울특별시 은평구 갈현로29길 14 (갈현동)

박호연

경상북도 예천군 호명면 양지로 55 (경북도청모아엘가에듀파크)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711142555

과제번호 2020R1A2C2005836

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 (초)미세먼지 위해성 표준평가 시스템 구축 및 한약물의 미세먼지 유발질환 제어 효과 및 기전 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경희대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

곡기생(Visci Ramuluset Folium)추출물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 곡기생(Visci Ramuluset Folium)추출물은 비만세포 탈과립을 유도하는 것인, 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 곡기생(Visci Ramuluset Folium)추출물은 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 염증성 사이토카인은 RBL2H3 세포에서의 IL-4인 것인, 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 염증성 사이토카인은 HaCaT 세포에서의 TARC, MDC, 및 GM-CSF인 것인, 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 곡기생(Visci Ramuluset Folium)추출물은 RBL2H3 세포에서 MAPK 신호전달 경로 중 ERK, JNK, 및 p38의 인산화를 억제하는 것인, 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 곡기생(Visci Ramuluset Folium)추출물은 HaCaT 세포에서 MAPK 신호전달 경로 중 JNK의 인산화를 억제하는 것인, 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 곡기생(Visci Ramuluset Folium)추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것인, 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 곡기생 추출물은 초음파 추출법으로 추출한 것인 조성물.

청구항 10

제1항의 곡기생(Visci Ramuluset Folium)추출물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 및 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제1항의 곡기생(Visci Ramuluset Folium)추출물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 및 개선용 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은, 곡기생(Visci Ramuluset Folium)추출물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 아토피 피부염은 심한 가려움증을 동반하고 피부 건조증 및 병변이 주요 증상인, 만성적으로 재발하는 피부 습진 질환이다. 유아기에는 얼굴과 팔다리의 펼쳐진 쪽 부분에 습진으로 시작되지만, 성장하면서 특징적으로 팔이 굽혀지는 부분과 무릎 뒤의 굽혀지는 부위에 습진의 형태로 나타나게 되며, 많은 경우에 성장하면서 자연히 호전되는 경향을 보인다. 어른의 경우 접히는 부위 피부가 두꺼워지는 태선화(lichenification)가 나타나고, 유소아기에 비해 얼굴에 습진이 생기는 경우가 많다. 아토피 피부염은 세계적으로 증가하는 추세이며 유병이 인구의 20%라는 보고도 있다. 아토피성 피부염의 발생 빈도는 나이가 들면서 점점 줄어들지만, 소아, 청소년, 성인에 이르기까지 호전과 악화를 반복하며 만성적인 경과를 보이기도 하며, 전 세계적인 소아의 이환율은 약 10~30%이다.
- [0003] 아토피 피부염의 발병 원인은 아직 확실하게 알려져 있지 않다. 임상 증상도 피부건조증, 습진 등으로 다양하게 나타나기 때문에 발병 원인이 어느 한 가지로만 설명될 수는 없지만, 환경적인 요인과 유전적인 소인, 면역학적 반응 및 피부보호막의 이상 등이 주요 원인으로 여겨지고 있다. 환경적인 요인으로는 산업화로 인한 매연 등 환경 공해, 식품첨가물 사용의 증가, 서구식 주거 형태로 인한 카펫, 침대, 소파의 사용 증가, 실내 온도 상승으로 인한 집먼지 진드기 등의 알레르기를 일으키는 원인 물질(알레르겐)의 증가 등이 있으며, 실내에서 애완동물을 키우며 원인 물질에 노출되는 것도 원인이 되며, 환자들의 가족력으로 미루어 보아 유전적인 영향도 그 원인으로 제시되고 있다.
- [0004] 아토피 피부염의 치료방법으로는 건조한 피부의 보습, 피부염 치료를 위한 부신피질호르몬제, 면역조절제, 국소 면역조절제와 가려움증을 치료하기 위한 항히스타민제가 사용된다. 약물로는 국소 또는 전신 스테로이드, 타크로리무스(tacrolimus), 피메크로리무스(pimecrolimus) 성분으로 만든 국소 면역조절제, 전신 면역억제제인 사이클로스포린(cyclosporine) 등을 사용한다. 그 외에도 광선치료나 감마리놀산 등이 치료에 이용되고 있으나, 아토피 피부염은 그 원인물질이 명확하지 않은바 증상이나 부작용에 따라 치료방법을 바꿔야 하며, 완치가 쉽지 않은 실정이다.
- [0005] 한편, 곡기생(Visci Ramuluset Folium)은 주로 겨울에서 봄까지 참나무, 밤나무, 자작나무 등에서 기생하며 자라는 겨우살이과에 속하며, 문헌적으로는 항바이러스작용, 항균작용, 진정작용, 이뇨작용, 항병독작용 등이 그 효능으로 알려져 있으나, 아직 아토피 피부염 치료 효능에 대해서는 알려진 바 없다.
- [0006] 본 발명자들은 곡기생 추출물의 RBL2H3 세포에서의 비만세포 탈과립, IL-4 발현 억제능, 및 MAPK 신호전달 경로 중 ERK, JNK, 및 p38 인산화 억제능을 확인하였고, 또한 HaCaT 세포에서의 TARC, MDC, 및 GM-CSF의 발현 억제능 및 MAPK 신호전달 경로 중 JNK 억제능을 확인하였다. 이에 따라 상기 곡기생 추출물을 항아토피 피부염 예방 및 치료용 조성물에 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 곡기생(Visci Ramuluset Folium) 추출물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 구체적으로, 본 발명의 목적은 곡기생(Visci Ramuluset Folium) 추출물을 포함하는 조성물로서, 비만세포의 탈과립을 유도하고, 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고, MAPK 신호전달 경로에서 ERK, JNK, 및 p38의 인산화를 억제하는 아토피 피부염의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 곡기생(Visci Ramuluset Folium)추출물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 곡기생(Visci Ramuluset Folium) 추출물을 포함하는 조성물로서, 비만세포의 탈과립을 유도하고, 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고, MAPK 신호전달 경로에서 ERK, JNK, 및 p38의 인산화를 억제하는 아토피 피부염의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 곡기생(Visci Ramuluset Folium) 추출물이 비만세포의 탈과립을 유도하고, 염증성 사이토카인의 발현을 억제하며, RBL2H3 세포에서 MAPK 신호전달경로 중 ERK, JNK, 및 p38의 인산화를 억제하고, HaCaT 세포에서 MAPK 신호전달 경로 중 JNK의 인산화를 억제하는 것을 확인하였다. 이를 통해 상기 조성물이 아토피 피부염의 예방 및 치료용도로 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 곡기생 추출물의 RBL2H3세포에 대한 세포 독성을 확인한 도이다. 세포 생존율은 CCK-8 assay(n=3)를 이용하여, 곡기생 추출물에 24시간 노출 후 대조군에 대한 RBL2H3 세포의 백분율로 표현하였으며, 결과는 평균±표준오차로 표시하였다.

도 2는 본 발명의 곡기생 추출물의 비만세포 β -hexosaminidase 분비 억제능을 확인한 도이다. 이를 통해 상기 곡기생 추출물의 비만세포 탈과립 유도능을 확인한 도이다.

도 3은 본 발명의 곡기생 추출물의 RBL2H3 세포에 대한 염증성 사이토카인인 IL-4 발현 억제능을 확인한 도이다.

도 4는 본 발명의 곡기생 추출물이 RBL2H3 세포의 MAPK 신호전달 경로 중 ERK, JNK, 및 p38의 인산화를 유의하게 억제함을 확인한 도이다.

도 5는 본 발명의 곡기생 추출물의 HaCaT 세포에 대한 세포 독성을 확인한 도이다. 세포 생존율은 CCK-8 assay(n=3)를 이용하여, 곡기생 추출물에 24시간 노출 후 대조군에 대한 HaCaT 세포의 백분율로 표현하였으며, 결과는 평균±표준오차로 표시하였다.

도 6은 본 발명의 곡기생 추출물의 HaCaT 세포에 대한 염증성 사이토카인인 TARC, MDC, 및 GM-CSF의 발현 억제능을 확인한 도이다.

도 7은 본 발명의 곡기생 추출물이 HaCaT 세포의 MAPK 신호전달 경로 중 JNK의 인산화를 유의하게 억제함을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0015] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0017] 본 발명에서 어떤 구성요소를 “포함” 한다는 것은, 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0018] 본 발명은 곡기생(Visci Ramuluset Folium) 추출물을 포함하는 아토피 피부염의 예방, 치료, 및 개선용 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 곡기생(Visci Ramuluset Folium)은 겨우살이과(桑寄生科, Loranthaceae)에 속한 상록 반기생 소관목(常綠半寄生 小灌木)인 겨우살이(Viscum album L. var. coloratum Ohwi)의 잎, 줄기, 및 가지를 말하며, 본 명세서에 기재된 실시예에서는 옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입한 곡기생을 사용하였다.

[0020] 본 발명에서 사용된 용어 “추출물”은 추출 방법, 용매 또는 추출물의 형태를 불문하고, 천연물로부터 특정 성분을 뽑아냄으로써 얻어진 물질을 포함하는 광범위한 개념으로, 당업계의 통상적인 추출 방법으로 수득할 수 있

는 것이다.

- [0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “추출 방법”은 열수 추출, 고온가압 추출, 저온고압 추출, 알코올 추출, 환류 추출, 초음파 추출 또는 냉각 추출일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “추출물”은 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) 중 어느 하나 이상의 용매를 이용하는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있으며, 상기 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유일 수 있고, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사 등 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 상기 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 항아토피 및 항염 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0027] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 곡기생 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 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 복합체 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 클렌징, 오일, 팩, 마사지크림 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 곡기생(Visci Ramulus Folium) 추출물을 포함하는 조성물은 비만세포의 탈과립을 유도하는 조성물일 수 있으며, 이는 비만세포의 과립 내에 존재하는 효소로서 비만세포의 탈과립을 나타내는 지표인 β -hexosaminidase의 분비량으로 확인될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 RBL2H3 세포에서 염증성 사이토카인인 IL-4의 발현을 억제하는 조성물일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 RBL2H3 세포에서 MAPK 신호전달 경로인 ERK, JNK, 및 p38의 인산화를 억제하는 조성물일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인인 TARC, MDC, 및 GM-CSF의 발

현을 억제하는 조성물일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 HaCaT 세포에서 MAPK 신호전달 경로인 JNK의 인산화를 억제하는 조성물일 수 있다.

[0034] 본 발명에서 사용하는 용어 “아토피 피부염”은 피부의 염증과 가려움증을 주요 증상으로 하는 만성적인 피부 상층의 염증 질환으로, 주로 영유아에서 발병하여 청소년기까지 지속되는 경우가 많으며, 성인에서는 완치가 어렵고 재발이 잦은 경과를 가지는 질환으로서, 일반적으로 습진을 의미하나, 이에 한정되지 않는다.

[0035] 이하 본 발명을, 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0037] <실시예 1> 곡기생 추출물의 제조

[0038] 본 발명에 사용한 곡기생은 한국 경북에서 수집한 재료를 옴니허브 (Daegu, Korea)를 통해 구매하였다. 곡기생 200 g을 30% (v/v) 에탄올 2L에 넣어 2주간 냉침 후 초음파 추출하였다. 추출액은 여과지로 여과하고, 동결건조하여 사용하였다.

[0040] <실시예 2> 곡기생 추출물의 RBL2H3 세포에서의 항아토피 피부염 효과 확인

[0041] <2.1> 곡기생 추출물의 세포 독성 확인

[0042] 곡기생 추출물의 적정 처리 농도를 결정하기 위해, RHL2H3 세포에 대한 독성을 CCK-8 assay(n=3)로 분석하였다. 상기 실시예 1에서 제조된 곡기생 추출물을 각각 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 및 400 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 도 1과 같이 400 μ g/ml에서 RHL2H3 세포 생존율이 73.27%로 나타나, 세포 독성이 관찰되었다. 이를 통해 RBL2H3 세포에서 상기 곡기생 추출물의 효능 분석을 위한 농도는 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 및 200 μ g/ml로 선택하였다.

[0044] <2.2> 비만세포 탈과립 유도 효과 확인

[0045] 곡기생 추출물이 비만세포의 탈과립에 미치는 영향을 확인하기 위해, 곡기생 추출물 투여에 따른, 비만세포의 과립 안에 존재하는 효소로서 탈과립 지표인 β -hexosaminidase의 분비량을 분석하였다. 먼저, RBL2H3 세포에 anti-DNP-IgE 및 DNP-HSA를 처리하여 β -hexosaminidase의 분비를 유의하게 증가시킨 후(p<0.01), 곡기생 추출물을 1시간동안 전처리하고, 37° C에서 3시간동안 DNP-HSA 처리하였다. 이후 배양 배지를 채취하여 원심분리 후 상층액의 β -hexosaminidase를 측정하였다. 이를 통해 도 2와 같이, 곡기생 추출물은 비만세포의 β -hexosaminidase 분비를 50 μ g/ml에서 25.3%(p<0.01), 100 μ g/ml에서 43.9%(p<0.01), 및 200 μ g/ml에서 55.7%(p<0.01)로 농도의존적으로 유의하게 감소시킴을 확인하였다.

[0047] <2.3> 염증성 사이토카인 발현 억제능 확인

[0048] 곡기생 추출물이 염증성 사이토카인인 IL-4의 발현에 미치는 영향을 분석하였다. RBL2H3세포를 24시간 동안 anti-DNP-IgE로 감작시켜 IL-4의 발현을 유의하게 증가시킨 후(p<0.01), 실시예 1에서 선택된 농도의 곡기생 추출물을 1시간 동안 전처리 하고, 37° C에서 3시간동안 DNP-HSA 처리하였다. 이후 배양 배지를 채취하여 원심분리 후 상층액의 IL-4를 ELISA를 통해 분석하였다. 이를 통해 도 3과 같이, 곡기생 추출물은 IL-4의 발현을 100 μ g/ml에서 17.1%(p<0.05), 200 μ g/ml에서 37.3%(p<0.01)로 유의하게 감소시킴을 확인하였다.

[0050] <2.4> MAPK 신호전달 경로 조절능 확인

[0051] 곡기생 추출물이 MAPK 신호전달 경로인 ERK, JNK, p38의 인산화에 미치는 영향을 분석하기 위해, RBL2H3세포에 anti-DNP-IgE 및 DNP-HSA를 처리하여 ERK, JNK, 및 p38의 인산화를 유의하게 증가시킨 후(all p<0.01), 실시예 1의 곡기생 추출물을 투여하였다. 이를 통해 도 4와 같이, 상기 곡기생 추출물은 200 μ g/ml에서 ERK의 인산화를 51.1%(p<0.01, 도 4B)로 유의하게 억제함, JNK의 인산화는 41.7%(p<0.01, 도 4C)로 유의하게 억제함, 및 상

기 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 p38의 인산화를 각각 41.2%, 56.7%로 유의하게 억제함(각각 $p<0.05$, $p<0.01$, 도 4D)을 확인하였다(처리하지 않은 세포와 비교시 $\#\#P<0.01$, anti-DNP-IgE/DNP-HSA 처리 세포와 비교시 $**P<0.01$).

[0053] <실시예 3> 곡기생 추출물의 HaCaT 세포에서의 항아토피 피부염 효과 확인

[0054] <3.1> 곡기생 추출물의 세포 독성 확인

[0055] 곡기생 추출물의 적정 처리 농도를 결정하기 위해, HaCaT 세포에 대한 독성을 CCK-8 assay($n=3$)로 분석하였다. 상기 실시예 1에서 제조된 곡기생 추출물을 각각 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 및 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 도 5와 같이 400 $\mu\text{g/ml}$ 까지 세포 독성이 관찰되지 않았다. 이를 통해서 도 5와 같이, HaCaT세포에서 VR의 효능분석을 위한 곡기생 추출물의 농도는 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 및 400 $\mu\text{g/ml}$ 로 선택하였다.

[0057] <3.2> 염증성 사이토카인 발현 억제능 확인

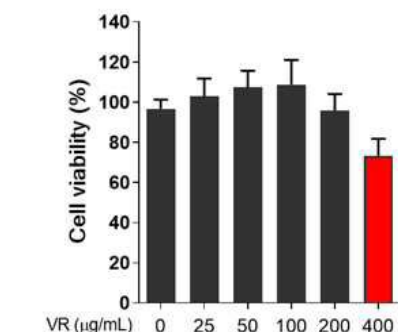
[0058] 곡기생 추출물이 염증성 사이토카인인 TARC, MDC, GM-CSF, IL-6, 및 ICAM의 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 먼저, HaCaT세포에 $\text{TNF-}\alpha/\text{IFN-}\gamma$ 를 처리하여 TARC, MDC, GM-CSF, IL-6, 및 ICAM의 발현을 유의하게 증가시킨 후, 곡기생 추출물의 효과를 비교하기 위한 다른 HaCaT 세포에 실시예 1에서 선택된 농도의 곡기생 추출물을 1 시간 동안 전처리한 후, 24시간 동안 $\text{TNF-}\alpha/\text{IFN-}\gamma$ 를 처리하였다. 이후, 배양 배지를 채취하여 원심분리 후 상층액의 TARC, MDC, GM-CSF, IL-6, 및 ICAM를 ELISA를 통해 분석하였다. 이를 통해서 도 6과 같이, 곡기생 추출물은 IL-4의 발현을 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 17.1%($p<0.05$), 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 37.3%($p<0.01$)로 유의하게 감소시킴을 확인하였다.

[0060] <3.3> MAPK 신호전달 경로 조절능 확인

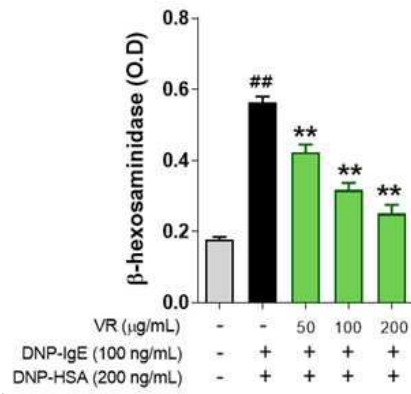
[0061] 곡기생 추출물이 MAPK 신호전달 경로인 ERK, JNK, p38의 인산화에 미치는 영향을 분석하기 위해, HaCaT세포에 $\text{TNF-}\alpha/\text{IFN-}\gamma$ 를 처리하여 ERK ($p<0.01$, 도 7B) 및 JNK ($p<0.05$, 도 7C) 인산화를 유의하게 증가시켰다. 도 7D와 같이, 상기 처리에도 불구하고 p38의 인산화에는 영향을 미치지 않았다. 이후 상기 HaCaT세포에 실시예 1에서 선택된 농도의 곡기생 추출물을 처리하였고, 도 7C 및 7D와 같이 곡기생 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 JNK의 인산화를 유의하게 감소시켰으나 ($p<0.05$), ERK와 p38의 인산화에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

도면

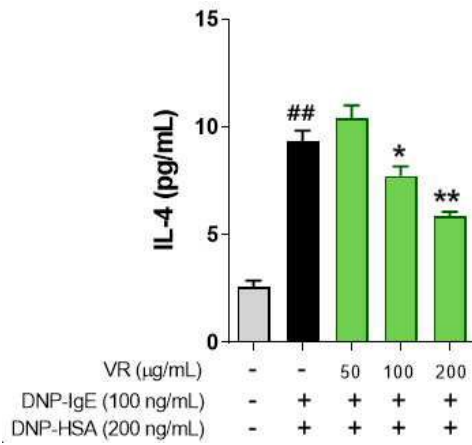
도면1



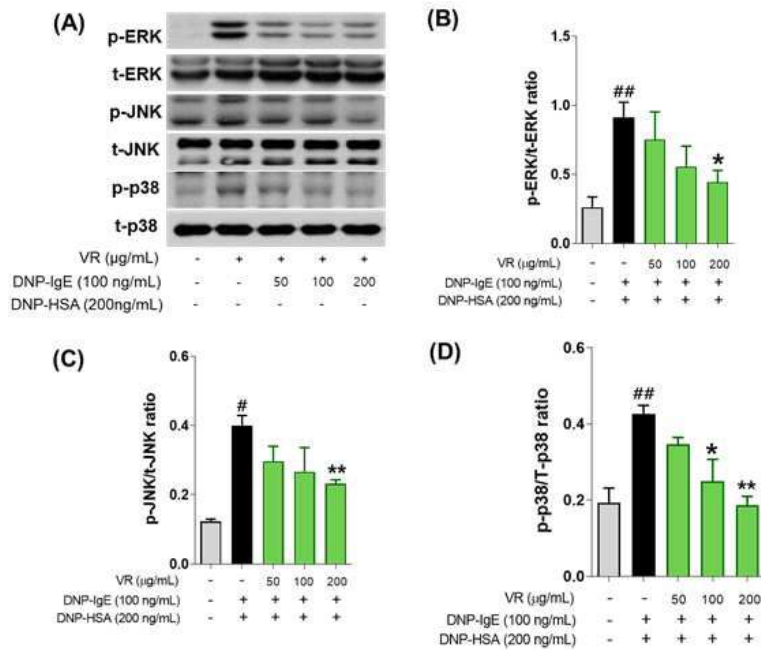
도면2



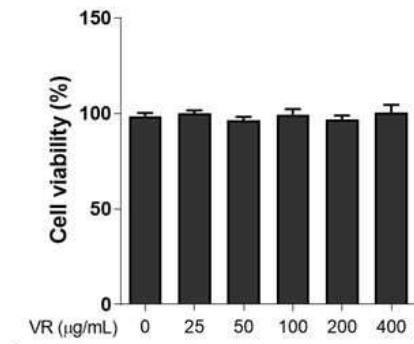
도면3



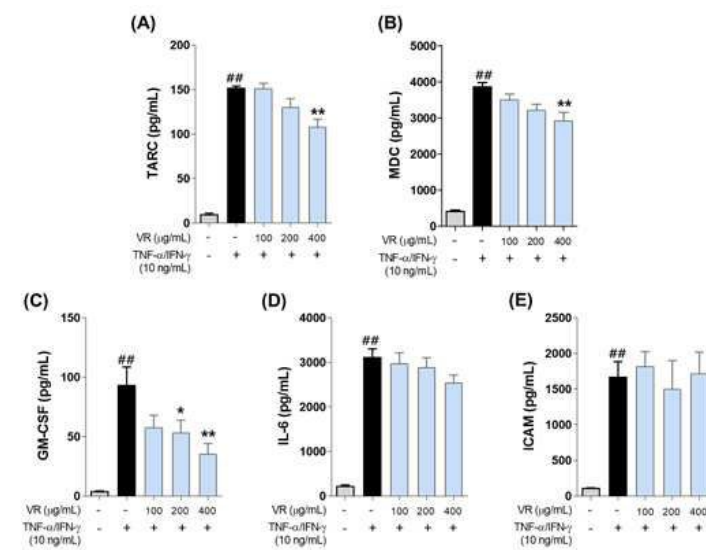
도면4



도면5



도면6



도면7

