(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 12 월 5 일 (05.12.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/180336 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 36/25 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/006108

(22) 국제출원일: 2012 년 7 월 31 일 (31.07.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0057252 2012 년 5 월 30 일 (30.05.2012) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **조선대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY)** [KR/KR]; 501-759 광주광역시 동구 필문대로 309, Gwangju (KR).

(72) 발명자; 겸
(71) 출원인 : **조훈 (CHO, Hoon)** [KR/KR]; 503-777 광주광역시 남구 서문대로 663 번안길 12, 104 동 601 호, Gwangju (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **최철희 (CHOI, Cheol-Hee)** [KR/KR]; 501-759 광주광역시 동구 필문대로 309, 의과대학, Gwangju (KR). **문영숙 (MOON, Young-Sook)** [KR/KR]; 501-759 광주광역시 동구 필문대로 309, 의과대학, Gwangju (KR). **한지원 (HAN, JI-Won)** [KR/KR]; 500-757 광주광역시 북구 용봉로 33, 수의과대학, Gwangju (KR). **한주희 (HAN, Ju-Hee)** [KR/KR]; 501-837 광주광역시 동구 밤실로 40-1, 3 동 상가 서울세탁소, Gwangju (KR).

(74) 대리인: **위병갑 (WIE, Byoung-Gab)**; 137-873 서울시 서초구 반포대로 26 길 21 소소헌빌딩 1 층, Seoul (KR).

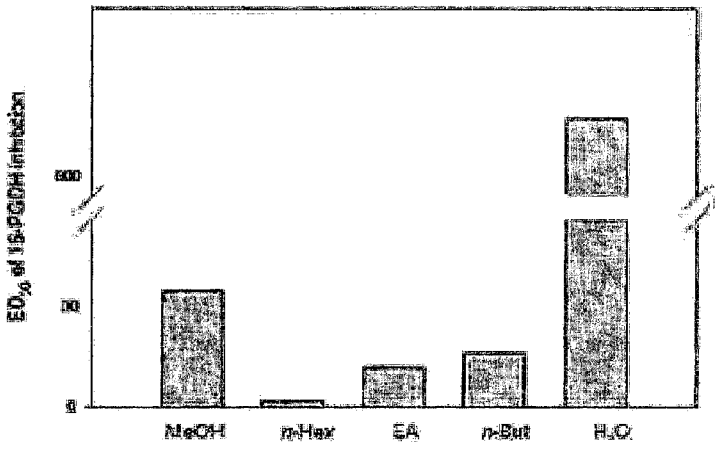
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: USE FOR *DENDROPANAX MORBIFERA* EXTRACT FOR ADJUSTING 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN DEHYDROGENASE AND PGE2 ACTIVITY

(54) **발명의 명칭** : 15-히드록시프로타글란딘 디히드로게나제 및 ＰＧＥ２활성을 조절하는 황칠나무 추출물의 용도

[Fig. 8]



(57) **Abstract**: The present invention relates to the 15-PGDH activity adjusting function of a *Dendropanax morbifera* extract. More specifically, since it has been confirmed that the *Dendropanax morbifera* extract has an outstanding effect in suppressing 15-PGDH activity and so increasing PGE_2, a composition of the present invention which contains the *Dendropanax morbifera* extract as an active ingredient has the advantage of being able to be used to advantage in the production of a functional health food and a therapeutic agent for a disease associated with PGE_2.

(57) **요약서**: 본 발명은 황칠나무 추출물의 15-PGDH 활성조절 기능에 관한 것으로, 구체적으로 황칠나무 추출물이 15-PGDH 활성을 억제하여 PGE_2를 증가시키는 효과가 우수하다는 사실을 확인함으로써, 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 본 발명의 조성물은 PGE_2 관련 질환의 치료제 및 건강기능성식품의 제조에 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

WO 2013/180336 A1

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 15-히드록시프로타글란딘 디히드로게나제 및 PGE2 활성을 조절하는 황칠나무 추출물의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 황칠나무 추출물의 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) 및 PGE_2 활성조절 기능에 관한 것으로, 구체적으로 황칠나무 추출물이 15-PGDH 활성을 억제하여 PGE_2을 증가시키는 기작을 이용하는, 상기 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 PGE_2 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물 또는 이의 이용에 관한 것이다.

배경기술

[2] 두릅나무과에 속하는 황칠나무(*Dendropanax morbifera* Lev.)는 우리나라의 남부 해안 지역과 제주도에서 자생하는 상록활엽교목으로 겨울에도 낙엽이 지지 않는 수종으로 수피에 상처를 주면 황색의 수지액이 나오는데 이것을 황칠이라고 한다.

[3] 황칠은 삼국시대부터 황제의 갑옷, 투구, 기타 금속 장신구의 황금색을 발하는 진귀한 도료로 이용되어 왔으며, 고려시대에 쓰여진 고려사절요, 중국의 계림유사, 계림지, 해동역사에 황칠의 채취시기, 사용용도 등이 기록되어 있고, 그 이전인 백제의 특산품이었다는 것이 당나라 역사서인 책부원구, 통전에 남아있다. 또한, 황칠나무가 번열 제거, 술해독, 안질 및 황달치료, 화상치료, 나병에 효과가 있으며 인체에 무해하다는 기록도 전해지고 있다(이시진, 본초강목,중국문광도서, 1590).

[4] 종래의 황칠나무에 관한 관련 기술로는 한국 특허공개 제 2000-0004499에 항암활성을 가지는 황칠나무 추출물이 기재되어 있고, 한국 특허공개 제 2003-0079205에 간세포 보호효과를 갖는 황칠 추출물, 황칠 분획물 및 이들을 함유한 약학 조성물이 기재되어 있고, 한국 특허공개 제 2004-01077853에 에탄올 유발 간손상을 억제하는 황칠추출물이 기재되어 있고, 한국 특허공개 제 2004-0107852에 피부 미백 효과가 있는 황칠추출물과 황칠 분획물이 기재되어 있으며 한국 특허공개 제 2005-0036093에 황칠나무 수액을 유효성분으로 하는 자외선 차단 화장품 조성물, 한국 특허공개 제 2006-0131360에 생리활성이 뛰어난 황칠나무의 종실추출물이 기재되어 있다.

[5] 그러나, 지금까지 황칠나무 추출물의 15-PGDH 및 PGE_2 활성조절에 관여하는 분자적 메커니즘은 전혀 규명되어 있지 않았으며, 이러한 분자적 메커니즘을 이용한 질환의 치료에 대해서도 어떠한 보고도 없었다.

[6] 이에, 본 발명자들은 황칠잎 헥산 추출물이 15-PGDH 효소활성을 억제하여 PGE2를 증가시킴으로써 PGE_2 관련 질환인 창상 및 위궤양 등에 효과가 있다는 것을 다양한 실험을 통해 확인하고, 이러한 황칠나무 추출물의 PGE_2 관련 질환의

예방 및 치료용도를 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명은 황칠나무 추출물의 15-PGDH 활성 및 PGE_2 관련 분자적 메커니즘에 기반을 둔 것으로, 본 발명의 주된 목적은 황칠나무 추출물을 유효 성분으로 함유하는 15-PGDH 활성 및 PGE_2 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

[8] 본 발명의 다른 목적은 황칠나무 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함하는, 15-PGDH 활성 및 PGE_2 관련 질환의 예방 및 개선용 기능성 조성물, 예를 들어 식품 또는 화장료 조성물을 제공하는 데 있다.

과제 해결 수단

[9] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는, 15-PGDH 활성 또는 PGE_2 활성 관련 질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

[10] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 황칠나무 추출물은 황칠나무의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물일 수 있다.

[11] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조추출물은 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매로부터 가용한 추출물일 수 있다.

[12] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 극성용매 가용 추출물은 물, 에탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택되어진 용매로부터 가용한 추출물일 수 있다.

[13] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 비극성용매 가용 추출물은 헥산, 클로로포름, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트에 가용한 추출물을 포함할 수 있다.

[14] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약학조성물은, (i) 15-PGDH 효소활성 억제; (ii) 세포내 및 세포외에서 PGE_2 증가; (iii) COX-1(cyclooxygenase-1) 및 MRP4(multidrug resistance-associated protein4)유전자 발현 증가;(iv) PGT(prostaglandin transporter) 발현 억제 및 (v) 5α리덕타아제(5αreductase) 발현 억제 효과를 갖는 것일 수 있다.

[15] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 15-PGDH 활성 또는 PGE_2 활성 관련 질환은 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염으로 구성된 군에서 선택된 1 이상의 질환인 것일 수 있다.

[16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 창상은 찰과상, 열상, 자상, 절상, 결출상, 관통상 및 피부궤양으로 구성된 군에서 선택되는 질환일 수 있다.

[17] 또한, 본 발명은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 15-PGDH 활성 또는 PGE_2 활성 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

발명의 효과

[18] 본 발명의 황칠나무 추출물은 COX-1과 MRP4 유전자발현의 증가와 PGT

유전자발현의 감소시켜 세포내외에서 PGE_2의 증가를 촉진시키며, 5α 리덕타아제 유전자 발현감소는 표적효소인 15-PGDH의 양적 감소도 초래하게 됨으로써 효소활성억제와 함께 이중효과를 기대할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 황칠나무 추출물을 함유하는 조성물은 15-PGDH 활성 및 PGE_2 관련 질환, 예를 들어, 창상, 화상, 구강궤양(aphthous ulcer), 소화성궤양(위궤양 및 십이지장궤양) 및 위염 등의 치료 및 예방에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 다양한 PG(프로스타글란딘)의 생합성 공정을 나타내는 모식도이다.

[20] 도 2는 15-PGDH 및 PGE_2가 결합한 복합체의 입체구조이다.

[21] 도 3은 황칠나무의 사진이다.

[22] 도 4는 본 발명의 황칠나무 추출물을 제조하는 일 공정을 나타내는 모식도이다.

[23] 도 5는 재조합 15-PGDH를 함유하는 PGEX-2T 발현 벡터의 모식도이다.

[24] 도 6은 NADH의 표준곡선 그래프이다.

[25] 도 7는 ELISA 키트를 이용한 PGE_2 측정을 위한 실험 공정의 개략도이다.

[26] 도 8은 황칠나무 추출물의 15-PGDH 저해활성(ED_{50}) 그래프이다.

[27] 도 9는 MTT 분석에 의한 HaCaT 세포에서의 황칠나무 추출물의 세포 독성 평가 그래프이다.

[28] 도 10은 MTT 분석에 의한 LNCaP·FGC 세포에서의 황칠나무 추출물의 세포 독성 평가 그래프이다.

[29] 도 11은 A549 세포에서의 황칠나무 추출물에 의한 농도-의존적 PGE_2 증가효과를 나타낸 그래프이다.

[30] 도 12는 HaCaT 세포에서 황칠나무 추출물 DMHE에 의해 영향을 받는 시간-의존적 세포외 PGE_2 수준의 변화를 나타낸 그래프이다.

[31] 도 13은 HaCaT 세포에서 황칠나무 추출물 DMHE에 의한 세포내(intra-celluar) 및 세포외(extra-cellular) PGE_2 수준의 변화를 나타낸 그래프이다.

[32] 도 14는 HaCaT 세포에서 DMHE의 COX-1/2, MRP4, 15-PGDH 및 PGT mRNA 발현에의 영향을 나타내는 그래프이다.

[33] 도 15는 HaCaT 세포에서 DMHE의 PGE_2-매개 창상 치유효과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

[34] 도 16은 HaCaT 세포에서 COX-1/2 억제제 존재 또는 부존재하 DMHE의 창상 치유효과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

[35] 도 17은 HaCaT 세포에서 15-PGDH 및 NAD^+ 존재 또는 부존재하에서 DMHE의 창상 치유효과를 나타내는 사진이다.

[36] 도 18은 ICR 마우스를 이용한, DMHE의 위궤양 예방효과를 확인한 사진이다.

[37] 도 19는 원형상처를 낸 마우스 모델을 대상으로, 0.1% BSA(대조군), TGF-β1 (20 ng/day), DMHE (16.5 μg/day, 황칠 헥산추출물) 및 DMHE (66 μg/day, 황칠 헥산추출물)을 각각 처리한 후 상처 치유 정도를 조직 염색을 통해 관찰한

사진을 나타낸 것이다.

[38] 도 20은 도 19의 그림에서 표시된 두 화살표 지점간의 거리를 측정하여 상처간 거리를 그래프로 나타낸 것이다.

[39] 도 21은 도 20에서 측정된 거리를 대조군에 비교하여 상처 치유 효율로 계산한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[40] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[41]

[42] "추출물"은 황칠나무의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물임을 특징으로 한다.

[43] "조추출물"은 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 메탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 50~100% 메탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[44] "극성용매 가용 추출물"은 물, 메탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택되어진 용매, 바람직하게는 물 또는 메탄올, 보다 바람직하게는 메탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[45] "비극성용매 가용 추출물"은 헥산, 클로로포름, 디클로로메탄, 또는 에틸아세테이트, 바람직하게는 헥산, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트, 보다 바람직하게는, 헥산 또는 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물을 포함한다.

[46] "약학적 조성물(pharmaceutical composition)"은 본 발명의 황칠나무 추출물과 희석제 또는 담체와 같은 다른 화학 성분들의 혼합물을 의미한다.

[47] "담체(carrier)"는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 이동을 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸술폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.

[48] "희석제(diluent)"는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다.

[49] "대상" 또는 "환자"는 인간, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.

[50] "조직 또는 세포 샘플"은 대상 또는 환자의 조직으로부터 얻은 유사한 세포의

집합체를 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다. 조직 샘플은 또한 1차 또는 배양 세포 또는 세포주일 수 있다.

[51] "유효량"은, 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 양이다. 유효량은 한번 또는 그 이상 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 유효량은 질병 상태의 진행을 일시적으로 완화, 개선, 안정화, 되돌림, 속도를 늦춤 또는 지연시키는데 적절한 양이다. 만약, 수혜동물이 조성물의 투여에 견딜 수 있거나, 조성물의 그 동물에의 투여가 적합한 경우라면, 조성물은 "약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능함"을 나타낸다. 투여된 양이 생리학적으로 중요한 경우에는 상기 제제는 "치료학적으로 유효량"으로 투여되었다고 말할 수 있다. 상기 제제의 존재가 수혜 환자의 생리학적으로 검출가능한 변화를 초래한 경우라면 상기 제제는 생리학적으로 의미가 있다.

[52] "치료하는"이란 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, '치료'란 용어는 '치료하는'이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다.

[53] "기능성 식품"이란, 일반 식품에 본 발명의 황칠나무 추출물을 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다. 기능성은 물성 및 생리기능성으로 대별될 수 있는데, 본 발명의 추출물을 일반식품에 첨가할 경우, 일반 식품의 물성 및 생리기능성이 향상될 것이고, 본 발명은 이러한 향상된 기능의 식품을 포괄적으로 '기능성 식품'이라 정의한다.

[54]

[55] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[56]

[57] 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.

[58]

[59] 본 발명은 황칠나무 추출물의 용도에 관한 것으로, 황칠나무 추출물이 내포하고 있는 특정 생리활성 및 기능의 발휘에 관한 것이다.

[60] 황칠나무(*Dendropanox morbifera* LEV.)는 두릅나무에 속하는 상록 활엽교목으로 우리나라의 제주도와 완도, 보길도, 해남 등 남・서해안 일대에 자생하고 있는 우리나라 특산 수종이다(도 3). 황칠나무에 함유된 정향성분은 소량의 터펜(Terpene)류와 다량의 세스퀴터펜(Sesquiterpene)류가 포함되어

있는데, 채취시기나 장소에 따라서 차이가 있지만 germacrene-d, β-selinene,α-amorphene, α-selinene, δ-cadinene,γ-cadinene, T-muurolol, β-elemene, bicyclo [4,4,0] dec- 1 -en - 2 - isopropyl - 5 - methyl - 9-methylene, β-cadinene, germacrene-B, α-copaene, α-humulene, α-cadinene과 소량의 linalool L, α-terpinene, α-cubebene, α-ylangene,(+)-calarene, 3,7-guaiadine, (-)-isoledene, β-cubebene, limonene, aromadendrene, cadina-1,4-diene 등이 함유되어 있다.

[61] 본 발명에서 사용할 수 있는 황칠나무의 부위는 잎, 줄기, 수피 등 제한이 없으나, 바람직하게는 잎을 사용할 수 있다.

[62] 황칠나무 추출물은 당업계에 알려진 방법, 이의 변형된 방법 또는 본 발명에 의한 방법으로 제조하여 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 이하와 같은 방법으로 제조할 수 있다.

[63] 본 발명의 황칠나무 추출물 또는 조추출물은 황칠나무 중량의 약 1 내지 30배 부피량, 바람직하게는 5 내지 15배 부피 량 (w/v%)의 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 50~100% 에탄올을 가하여, 약 0 내지 100℃, 바람직하게는 실온에서 10 내지 60 시간, 바람직하게는 30 내지 50 시간 동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 또는 가열추출법 등의 추출방법으로, 바람직하게는 열수추출법으로 추출한 후 여과하고 감압 농축하여 본 발명의 황칠나무 조추출물을 얻을 수 있다.

[64] 또한, 본 발명의 극성용매 또는 비극성용매 가용 추출물은 상기에서 얻은 조추출물, 바람직하게는 50~100% 에탄올 조추출물 중량의 약 1 내지 150배, 바람직하게는 5 내지 100배 부피(w/v%)의 물을 분산시킨 후, 헥산, 에틸아세테이트 및 부탄올을 순차적으로 물의 약 1 내지 10배, 바람직하게는 1 내지 5배의 부피를 가하여 1 내지 5회, 바람직하게는 2 내지 4회 분획하여 본 발명의 극성 용매 및 비극성용매 가용 추출물을 수득할 수 있다. 바람직하게는 헥산 추출물을 수득하여 사용할 수 있다.

[65] 상기 추출물들의 농축액을 -80℃ 동결건조 혹은 50℃ 진공감압을 통하여 분말상태로도 얻을 수 있다.

[66] 본 발명은 상기 황칠나무 추출물을 제조하는 방법을 포함한다. 상기 제조방법은 그것의 예시적인 방법에 지나지 않으며, 당해 분야의 기술에 근간한 다양한 방법들에 의해 적절히 변형시켜 사용할 수 있다.예를 들면, 본 발명에 따른 비-예시된 추출방법은 당 분야의 숙련가에게 명백한 변형에 의해 성공적으로 수행될 수 있다.

[67] 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 본 발명에 따른 황칠나무 추출물의 제조를 위한 구체적인 반응조건 등을 추후 설명하는 실시예들을 통해 확인할 수 있으므로, 그에 대한 자세한 설명은 생략한다.

[68] 본 발명은 황칠나무 추출물의 15-PGDH 활성 및 PGE_2 관련 기작의 분자적

메커니즘의 발견에 기초하고 있다.

[69] 본 발명의 황칠나무 추출물은 NAD^+ 의존형 15-PGDH의 활성을 억제하여 PGE_2의 세포내외 생성을 증가시킨다.

[70] 프로스타글란딘(Prostaglandin, PG)는 물리적, 화학적, 특정한 사이토카인 성장인자 기타 자극들에 의해 세포막에서 유리된 아라키돈산로 부터 생성되는 에이코사노이드(eicosanoid)라 알려진 매개물질이다. 다양한 PG의 생합성 공정을 도 1에 도시하였다. 이 중에서 특히, PGE_2는 상처치유, 소화성 궤양, 눈썹과 두발 형성 및 골 형성의 중요한 매개인자로 알려져 있다. 그러나 PGE_2는 NAD+ 의존형 15-PGDH에 의해 신속히 대사되므로, 체내에서 반감기가 매우 짧다.

[71] 또한 PGE_2는 염증 매개자로서 fibroblast modulator 로서 작용하는것으로도 알려져 있다. 류마티드성 관절염 및 골관절염처럼 PGE_2에 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. 최근 보고에 의하면 PGE_2는 fibroblast의 증식을 억제하고 콜라겐 합성을 억제하며, MMPs의 발현을 증가시킨다고 하였다(Yeh et al., 2006). 또한 keloid fibroblast (KF)의 경우 대조군의 fibroblast에 비해 PGE_2의 생성이 적으며, 또한 keloid 형성 시 억제된 PGE_2를 외부에서 첨가해주면 PGE_2 에 의한 antifibrotic 효과가 회복된다고 보고된 바 있다. 따라서 국소적으로 PGE_2를 올려주는 기전을 지닌 제제를 사용한다면 흉터 없는 상처치유제로서의 가능성은 크다고 하겠다.

[72] 이러한 관점에서 볼 때 본 발명의 황칠 추출물은 15-PGDH를 효과적으로 억제할 수 있고 PGE_2증가에 관여하는 기전을 지니며, 동시에 in vitro scratch assay 를 통하여 keratinocyte cell migration에서 용량 차이는 있지만 TGFβ1에 버금가는 효능이 있음을 확인함으로써(도 19~21 참조), 흉터 형성을 최소화 시키면서 상처 치유를 신속하게 진행할 수 있는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[73] 또한, 참고적으로 본 발명에 따른 황칠 추출물의 상처 치유 효능은 종래 상처 치유 효과가 있는 것으로 알려진 TGFβ1과 동등 또는 더 우수한 활성이 있는 것으로 확인되었는데, TGF-β(Transforming growth factor β)은 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.

[74] 앞서 기술한 바와 같이, 본 발명의 황칠 추출물은 상기 15-PGDH를 억제함으로써 PGE_2를 증가시키는 탁월한 활성을 가지고 있는데, 이를 입증할 수

있는 결과로서, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 황칠잎 추출물(methanol, n-hexane, n-butanol 및 water)의 15-PGDH 효소활성 억제효능(ED_{50})이 1.74 μg/mL ~ 661.8 μg/mL로 다양하게 나타났고, 특히 n-헥산 과 에틸 아세테이트 추출물의 경우 각각 1.74 μg/mL 와 10.6 μg/mL의 ED_{50}값을 보였다. 또한, 황칠잎 헥산 추출물은 A549 폐암세포에서 세포외 PGE_2를 농도 의존적으로 증가시켰고, HaCaT 세포주에서도 세포내 및 세포외의 PGE_2 농도를 증가시켰다.

[75] 또한, 본 발명의 황칠나무 추출물은 상기 기작과 관련하는 다른 특정 유전자의 발현 메커니즘에도 영향을 미친다.

[76] 즉, 본 발명의 황칠나무 추출물은 COX-1(cyclooxygenase-1)과 MRP4(multidrug resistance-associated protein 4) mRNA 발현을 증가시켰으며, PGT(prostaglandin transporter)와 15-PGDH의 mRNA 발현은 감소시켰다.

[77] 특히, 황칠나무 추출물은 상기 COX-1 발현의 증가에 의해 PGE_2에 매개하여 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염의 치유효능을 발휘한다.

[78] 본 발명의 일 실시예에서는 HaCaT 세포주에서 *in vitro* 스크래치 분석을 통해 황칠잎 헥산 추출물이 창상치유를 촉진시킴을 확인하였다. 그리고, 이러한 효과는 15-PGDH와 보조인자인 NAD+를 동시에 투여한 경우에는 관찰되지 않았는 바, 황칠나무 추출물의 창상 치유효과가 PGE_2에 이해 매개됨을 시사한다.

[79] 또한 본 발명의 황칠나무 추출물의 상기 창상치유 효과에는 COX-2보다 COX-1 발현의 조절이 중요한 역할을 한다.

[80] 이는 COX-1의 선택적 억제제인 SC560와 COX-1/2의 비선택적 억제제인 나프록센을 사용한 경우 황칠잎 헥산 추출물의 창상치유가 지연되고, COX-2 억제제인 세레콕시브(celecoxib)를 사용한 경우 창상치유에 영향을 미치지 않은 본 발명의 실시예를 통해 확인되었다.

[81] 또한, 본 발명의 일실시예에서는 ICR 마우스를 이용한 *in vivo* 소화성궤양 모델에서 뛰어난 출혈예방 효과를 확인하였다.

[82] 이와 같이, 본 발명의 황칠나무 추출물은 15-PGDH 효소활성 및 발현을 억제; 세포내 및 세포외의 PGE_2 농도를 증가; COX-1(cyclooxygenase-1) 및 MRP4(multidrug resistance-associated protein4)유전자의 발현 증가; PGT(prostaglandin transporter) 발현 억제; 및 5α 리덕타아제 유전자 발현을 억제하고, 실험동물에서 독성을 나타내지 않으므로, 이러한 분자적 메커니즘을 기반으로 15-PGDH 활성 및 PGE_2 관련 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다

[83] 본 발명은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 15-PGDH 활성 및 PGE_2 관련 질환의 치료 또는 예방용 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본원에서 정의되는 질환의 치료 또는 예방 활성효과는 15-PGDH 활성을 억제하고 PGE_2 생성을 증가시키는 활성을 통하여 작용함을 특징으로 한다.

[84] 따라서, 본 발명의 "15-PGDH 활성 및 PGE_2 관련 질환"은 특히, 15-PGDH 활성이 증가되어 PGE_2의 생성이 감소함에 의해 유발되는 질환으로, 대표적으로

창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[85] 일반적으로 창상이나 화상 등에 의해 피부 속 진피가 손상을 받으면 COX-2가 순간 증가하게 되고, 그 결과 피부에서 PGE_2가 증가 되어 상처 바닥에서 섬유세포의 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 황칠나무 추출물은 15-PGDH를 저해함으로써 PGE_2를 효과적으로 증가시키므로 창상 또는 화상치유 효과를 얻을 수 있다.

[86] 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.

[87] "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 영향과 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.

[88] 특히, 상기 창상 및 소화성궤양(위궤양 및 십이지장궤양) 등은 염증성 질환의 일 구체예들로서, 염증성 질환이란 세균의 침입에 의하여 형성되는 병리적 상태를 의미한다. 염증의 매개체로서 PGE_2는 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, PGE_2가 이러한 작용에 가장 효과적이다. 실제 PGE_2는 위산 역류성 식도염이나 알콜이나 인도메타친(indomethacin)으로부터 위를 보호하며, PGE_2의 작용기전은 위

수축의 억제, 십이지장의 바이카보네이트(HCO_3^-) 분비 자극, 점액분비, 혈관 내피 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).

[89] 또한, 염증을 유발하는 효소인 시클로옥시게나아제(COX)는 아라키돈산에서 프로스타글란딘H2(PGH_2)으로의 대사작용의 속도제한단계를 촉매작용하고, PGH_2는 더 대사작용하여 PGE_2등의다양한 프로스트글란딘으로 변화한다. 따라서, PGH_2의 발현을 조절하면 이러한 창상, 소화성궤양(위궤양 및 십이지장궤양) 등의 질환 예방 및 치료가 가능한 것이다.

[90] 또한, 본 발명의 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 구강궤양의 예방 및 치료 효과도 가질 수 있는데, 이는 PGE_2는 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 황칠나무 추출물은 15-PGDH를 저해함으로써 PGE_2를 효과적으로 증가시키므로 구내염 또는 구강궤양이나 항암제에 의한 구강 점막 손상의 예방과 치료효과를 얻을 수 있다.

[91] 본 발명은 일 관점에서 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 15-PGDH 활성 및 PGE_2 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학조성물에 관한 것이다. 또한, 다른 관점에서, 본 발명은 환자에게 유효량의 황칠나무 추출물을 투여하여 15-PGDH 효소활성을 억제시키고 PGE_2 생성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 즉, 황칠나무 추출물을 사용하여 15-PGDH 및 PGE_2와 관련된 질병들의 치료 및 예방하는 방법을 제공한다.

[92] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료하는"이란 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "치료"란 용어는 "치료하는"이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다.

[93] 본 발명의 황칠나무 추출물을 함유하는 15-PGDH 활성관련 질환의 예방 및 치료를 위한 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다.

[94] 본 발명의 황칠나무 추출물을 함유하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[95] 또한, 본 발명의 황칠나무 추출물을 포함하는 조성물은 이미 사용되고 있는 스테로이드성 약물, 항히스타민제, 소염진통제 및 항생제 등의 약제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용될 수 있다.

[96] 본 발명에 따른 황칠나무 추출물을 함유하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제,캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 특히, 창상 치유와 관련하여서는 피부 외용제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[97] 본 발명의 추출물을 함유하는 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오즈(lactose), 덱스트로즈, 수크로스(sucrose), 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 들 수 있다.

[98] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[99] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제,감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[100] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[101] 본 발명의 추출물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한 그 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[102] 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[103] 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[104] 한편, 본 발명은 다른 관점에서 상기 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 15-PGDH 활성관련 질환의 예방 및 개선용 기능성 조성물에 관한 것이다. 이러한 기능성 조성물로는 예를 들어, 건강 기능식품 또는 화장료 조성물 등을 들 수 있다.

[105] 기능성은 물성 및 생리기능성으로 대별될 수 있는데, 본 발명의 황칠나무 추출물을 첨가할 경우, 해당 조성물의 물성 및 생리기능성이 향상될 것이다.

[106] 예를 들어, 본 발명의 황칠나무 추출물의 분자적 메커니즘을 이용하여 창상, 위궤양 등의 질환의 예방 및 개선용 기능성 조성물을 제조할 수 있다.

[107] 본 발명의 황칠나무 추출물은 다양한 기능성 식품 및 화장품 제조시 주성분 또는 첨가제 및 보조제로 사용될 수 있다. 일 구체예로서, 기능성 조성물 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 전체 조성물 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 상기 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물 또는 화장료 조성물의 제조방법에 따라 당업자가 적절히 선택하여 이용할 수 있다.

[108] 또한, 여러 가지 영양성분, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제,방부제, 글리세린, 알콜 등을 적절히 함유할 수 있다.

[109]

[110] 본 발명의 황칠나무 추출물 함유 조성물은 천연 식물성 성분이기 때문에, 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 사용하는 경우에도 안심하고 사용할 수 있다.

[111]

[112] 실시예

[113] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다

[114] 각 실험들은 3번 이상 수행하였고, 각 데이터들을 평균± SE로 표시하였다. 통계적 유의성은 paired Student's t test에 의해 결정하였다. $P < 0.05$는 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[115]

[116] 재료 및 기구

[117] 한국 무안에 위치한 곡우 농장에서 황칠 나무(*Dendropanax morbifera*)의 잎을 수거하였다.

[118] PGE_2, NAD+, NADH, 글루타치온-세파로오즈(glutathione-Sepharose) 4B,

DTT(dithiothreitol), SDS(sodium dodecylsulfate), EDTA, 환원 글루타치온(reduced glutathione), SC560 (COX-1 저해제), 세레콕시브(celecoxib, COX-2 저해제), 나프록센(naproxen, 비선택성 COX 저해제), 5α-dihydrotestosterone (DHT), 미토마이신, 수크랄페이트(sucralfate), CMC (carboxy methyl cellulose), 및 미녹시딜을 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하고, TGF-β1을 Biovision Pharmacia Co. (New Jersey, USA)로부터 구입하였다.

[119] 인간 태반 cDNA 라이브러리(Cho and Tai, 2002)로부터 인간 15-PGDH의 cDNA를 클로닝하였다. Shimadzu RF-5301IPC Fluorescence Spectrophotometer (Shimadzu, Japan)을 이용하여 UV 스펙트럼을 수득하였다.

[120] PGE_2 효소 면역분석 키트를 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)로부터 구입하였고, Real-time PCR을 Light Cycler 2.0 Instrument (Roche, Mannheim, Germany)로 수행하였다.

[121] *In vitro* 상처 스크래치들을 역상 현미경(Hitachi, Tokyo, Japan)으로 사진을 찍었다.

[122] 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 x 250 mm and 19 x 150 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하여 수행하였다. 식물 추출에 사용된 모든 용매들은 HPLC grade였다

[123]

[124] 실시예 1 : 황칠나무잎 추출물 제조

[125] (1) 추출물 제조

[126] 모아둔 *D. morbifera* 잎을 상온에서 그늘진 곳에서 건조시켰다.

[127] 건조된 잎들을 상온에서 메탄올로 3회 추출하였다. 상기 메탄올 추출물을 Whatman No. 1 filter paper로 여과하고, 상기 결합된 메탄올 추출물을 회전식 증발농축기로 진공에서 농축시켰다.

[128] 메탄올 추출물을 수 중 현탁시키고 이어서 헥산, 디에틸 에테르, 에틸 아세테이트, n-부탄올 및 물로 극성에 따라 분획하였다. 각 추출물들을 회전식 진공 증발농축기로 농축하였다. 이러한 공정을 도 4에 도시하였다.

[129]

[130] (2) 분획화 및 분리 공정

[131] 그래디언트 용매 시스템 [CHCl3 (0.1% HCOOH) 100% through CHCl3 (0.1% HCOOH) -MeOH (0.1% HCOOH)/55:45 for 120 min]을 이용하여 Isolera Flash Purification system (BIOTAGE, Sweden)으로 헥산 추출물의 활성 유도 분획법(Activity-guided fractionation)을 254 및 280 nm 하에 수행하여 10 분획을 제공하였다(DEE01-DEE10). 각 분획을 그래디언트 MeCN-H_2O (0.1% HCOOH) 용매 시스템에서 HPLC을 이용하여 모니터하고 각 화합물을 검출하였다.

[132] 또한, UV광(254nm)하에서 얇은 층 크로마토그래피에 의해 스팟들을 검출하거나 바닐린-H_2SO_4 으로 스프레이한 후 110℃로 가열하였다.

[133] 0.1% 포름산(30:70 → 100% MeCN)을 함유하는 MeCN/H_2O의 그래디언트 용매 시스템으로 SunFire™ Prep C18 (10 x 250 mm 및 19 x 150 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하여 반복적인 semi-preparative HPLC 실험을 40분 동안 수행하고, 이러한 분획으로부터 주요한 성분들로서 화합물들을 최종적으로 분리하였다.

[134]

[135] (3) 결과

[136] 추출 용매에 따른 황칠나무 추출물 수율은 하기 표 1에 기재하였다.

[137] 표 1

[Table 1]

용매	최종산물(g)	수율(%)
Methanol	230.1	13.6
n-Hexane	34.6	2.1
Ethyl acetate	31.0	1.9
n-Butanol	46.6	2.8
Water	98.4	5.8

[138]

[139] 실시예 2 : 15-PGDH의 발현 확인

[140] (1) 15-PGDH의 발현 및 정제

[141] 도 5에 도시한 바와 같은 벡터, 즉, BamH I 및 EcoR I 위치 사이에 재조합 15-PGDH 를 함유하는 PGEX-2T 발현 벡터로 *Escherichia coli* BL-21 DE3 세포들을 형질전환 하였다.

[142] 세포들을 50 μg/mL 암피실린을 함유하는 500 mL 배지에서 37 ℃ 및 220 rpm 하 성장시켜 600nm에서 O.D.가 0.6에 이르게 하였다. IPTG (isoprophyl β-D-thiogalactoside, 1M stock solution)을 첨가하고 상기 세포들을 12시간 동안 25 ℃에서 배양하였다.

[143] 그 후, 세포들을 30분 동안 4 ℃에서 4000 x g 으로 원심분리하여 수득하고 상기 세포 펠렛들을 20mL의 차가운 용해 버퍼(1 x PBS buffer pH 7.4 containing 1mM EDTA 및 0.1 mM DTT)에 재현탁하고, 초음파로 분해하였다(4 x 10 s at 4 ℃). 파쇄된 세포들을 4 ℃에서 20분 동안 4000 x g으로 원심분리하였다.

[144] 상등액을 천천히 글루타치온-세파로오즈 4B 컬럼에 적용하여 4 ℃에서 용해 버퍼로 평형화시켰다. 상기 컬럼을 280에서 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.

[145] 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.

[146]

[147] (2) 쿠마신 블루(Coomassie blue) 염색

[148] 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 탈색될때까지 여러 번 세척하였다. 최종적으로, 상기 겔을 저장 용액(5% glacial acetic acid in water)에 저장하고 검출을 위해 스캔하였다.

[149]

[150] (3) 15- PGDH 활성 분석

[151] 15-PGDH 저해제의 활성 분석을, 형광 분광광도계를 이용하여 468 nm 및 340 nm에서 NADH의 형성을 측정함으로써 수행하였다

[152] 0.1 mM DTT, 0.25 mM NAD+, 정제된 효소 (10 μg), 21 μM PGE2 및 다양한 농도의 15-PGDH 저해제를 함유하는 Tris-HCl 버퍼 (50 mM, pH 7.5)를 각 반 응 혼합물에 첨가하였다. 트리플리케이트에서 각 농도를 분석하였다. 반응 혼합물의 흡광도를 도 6의 NADH의 표준곡선으로부터 15-PGDH 저해제 활성으로 보정하였다.

[153]

[154] 그 결과를 하기 표 2 및 도 8에 나타내었다.

[155] 5-PGDH에 대한 ED50 값은 추출용매에 따라 1.7 μg/mL ~ 661.8 μg/mL 값으로 나타났다.

[156] 표2

[Table 2]

Extraction solvent	ED_{50} (μg/mL)
Methanol	31.0
n-Hexane	1.74
Ethyl acetate	10.6
n-Butanol	14.3
Water	661.8

[157]

[158] 실시예 3 : 세포 생존능 분석

[159] (1) 세포 배양

[160] HaCaT 세포, 인간 케라티노사이트 세포주를 10% 가열 불활성화된 FBS, 100 μg/mL 항생제로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's media)로, 37 ℃ 하 습한 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

[161] 아데토칼시노마(adenocarcinoma) 유사 인간 폐포(alveolar) 타입 II 로부터 유래된 A549 세포를 RPMI 배지로 37 ℃ 하 습한 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 그리고, LNCaP·FGC (androgen-dependent prostate cancer) 세포를, RPMI 배지로 37 ℃ 하 습한 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 모든 배양된 배지들은 10% 가열 불활성화된 FBS 및 100 μg/m L 페니실린으로 보충되어 있다.

[162]

[163] (2) 세포 독성 평가

[164] MTT 분석(Mosmann, 1983)에 의해 세포 독성을 측정하였다.

[165] 96 웰 플레이트에 DMEM 배지 90 μL 당 HaCaT 세포 (1 x 104 /mL), LNCaP·FGC 세포 (4 x 104/mL)들을 씨딩하였다. 밤새 배양 후 , 약들을 72시간 동안 처리하고, MTT (5 mg/mL stock solution) 10 μL로 4시간 배양 하였다. 그 후, 배지 를 제거하고 DMSO 150 μL를 첨가하여 포마잔을 용해시켰다. ELISA microplate reader (PerkinElmer, Calif ornia, USA)을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 하기 표3 및 도9, 도 10에 도시하였다.

[166] 표 3

[Table 3]

용매	HaCaT IC_{50}(μg/mL)	LNCaP·FGC IC_{50}(μg/mL)
n-Hexane	39.86	169
Ethyl acetate	246.27	88.3
n-Butanol	471.40	562
Water	>1000.00	>800

[167] 상기 표에서 알 수 있는 것처럼, 황칠나무의 헥산, 에틸아세테이트, 메탄올 및 물 추출물의 IC_{50} 는 HaCaT 세포에서 39.86 μg/mL ~ > 1000 μg/mL (도 9), LNCaP·FGC 세포에서 88 μg/mL ~ > 800 μg/mL (도 10)로 나타났다. 즉, 소수성

추출물이 상대적으로 높은 독성을 보이긴 했지만, 세포 생존능에는 치명적인 정도는 아니었다.

[168]

[169] 실시예 4 : 단백질 정량 분석 및 PGE_2 방출 검출

[170] COX 및 마이크로좀 PGE 신타아제-1 (mPGES-1)-유래 PGE_2는 폐기능의 중요한 조절인자로 간주되고 있다. 특히, 감염부위에서 PGE_2 생성은 면역 및 염증성 반응을 조절하고, 감염시 폐 상피 세포에서 유리됨이 보고되어 있다 (N'Guessan et al. , 2007).

[171] 단백질 농도는 Bradford (Schleicher and Wieland, 1978)에 기반을 둔 Bio-Rad 단백질 분석법에 의해 측정하였다. 표준 곡선을 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.

[172] 한편, PGE_2 방출을 알아보기 위해, HaCaT 세포 및 A549 세포들을, 37 ℃ 및 습윤된 5% CO_2 배양기에서 FBS 및 항생제가 함유된 DMEM 및 RPMI의 각 배지에서 6웰 배양 플레이트에 씨딩 하고(5×10^5 cells/well), 상이한 농도의15-PGDH 저해제를 처리한 후, 배지들을 약 처리 후 특정 시간마다 상층액을 수집하였다. 세포내 및 세포외 PGE_2 수준을, PGE_2 효소 면역분석 키트(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다.

[173]

[174] 그 결과, 도 11에 도시되어 있는 바와 같이, DMEA (1-, 2-, 및 3-배 ED_{50}), DMW (1-, 10-, 및 100-배 ED_{50}), DMHE (1-, 10-, 및 100-배 ED_{50}) 및 DMME (0.5-, 1- 및 2-배 ED_{50})는 농도 의존적으로 PGE_2를 증가시켰다. *D. morbifera* 헥산 추출물(DMHE)은 15-PGDH를 보다 효율적으로 저해하였다.

[175] 그리고, 시간 의존적으로 세포외 PGE_2 변화가 확인되었다. PGE_2 수준은 24시간째 대조군의 1200%까지 급격히 증가하였고, 그 시간 후 빠르게 감소하였다(표 4, 도 12). 이러한 결과를 통해 PGE_2 검출의 적합한 시간이 12시간째임을 확인 하고, DMHE (17.4 μg/mL)을 12시간 동안 처리하고 마찬가지로 세포내 및 세포외 PGE_2 수준을 측정하여 각각 대조군과 비교하여 165% 및 315%까지 상승하였음을 확인하였다(표 5, 도 13).

[176]

[177] 표 4

[Table 4]

Time	샘플	PGE_2 (pg/mL)
0 hour	대조군	143.6
	DMHE	143.6
12 hour	대조군	420.4
	DMHE	3967.1
24 hour	대조군	442.9
	DMHE	5373.2
48 hour	대조군	323.3
	DMHE	687.3

[178] 표 5

[Table 5]

샘플	Intracellular (ng/mg)(mean ± SD)	Extracellular (pg/mL)(mean ± SD)
대조군	1.96 ± 0.18	393.67 ± 12.46
DMHE(17.4 μg/mL)	3.24 ± 0.53*	1238.04 ± 91.76*

[179] * $p < 0.05$

[180]

[181] 실시예 5 : 정량적 RT-PCR 분석

[182] 세포내(intra-cellular) 및 세포외(extra-cellular) PGE_2 수준은 COX-1/2, MRP4, 15-PGDH 및 PGT의 유전자 발현 수준과 기능적 관계가 있다. 상기 유전자들에서 *D. morbifera* 의 영향을 알아보기 위해, HaCaT 세포에서 DMHE (17.4 μg/mL) 처리 후 COX-1/2, MRP4 및 PGT의 mRNA 발현을 측정하였다. 분석에 사용된 DMHE (17.4 μg/mL,10 x ED50) 농도는 이전 실험을 통해 세포독성을 가지지 않는, 충분한 15-PGDH 저해활성을 보이는 농도를 사용하였다.

[183] 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 $MgCl_2$, 10 p mole의 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 표에 기재된 바와 같다. 표에 기재되지 않은 5R 1, 2 프라이머는 Qiagen Korea Ltd.(Seoul, Korea)으로부터 검증된 것을 구입하여 사용하였으며, 각각의 amplicon size는 185 bp,119 bp이며 annealing temperature 는 60℃에서 5초, extension 은 72℃에서 8 초간 수행하였다.

[184] 표6

[Table 6]

Gene	Amplicon (bp)	Primer	
PGT	386	Sense	5'-GGATGCTGTTTGGAGGAATC-3' (서열번호 1)
		Antisense	5'-GCACGATCCTGTCTTTGCTGA-3' (서열번호 2)
MRP4	394	Sense	5'-ACCTCTAACCGACATTCCTG-3' (서열번호 3)
		Antisense	5'-TCAACATATTACAGCCACCAT-3' (서열번호 4)
COX-1	207	Sense	5'-CCTCATGTTTGCCTTCTTTGC-3' (서열번호 5)
		Antisense	5'-GGCGGGTACATTTCTCCATC-3' (서열번호 6)
COX-2	171	Sense	5'-GATCTACCGTCCTCAA-3' (서열번호 7)
		Antisense	5'-GAACAACTGCTCATCAC-3' (서열번호 8)
PSA	217	Sense	5'-CCTCCTGAAGAATCGATTCC-3' (서열번호 9)
		Antisense	5'-GAGGTCCAACACTGAAG-3' (서열번호 10)
15-PGDH	105	Sense	5'-TGCTTCAAAGCATGGCATAG-3' (서열번호 11)
		Antisense	5'-AACAAAGCCTGGACAAATGG-3' (서열번호 12)
β-actin	604	Sense	5'-GACTATGACTTAGTTGCGTT-3' (서열번호 13)
		Antisense	5'-GTTGAACTCTACATACTTCCG-3' (서열번호 14)

[185] 표7

[Table 7]

Gene	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension
PGT	95 °C, 1 min	95 °C, 15 sec	60 °C, 5 sec	72 °C, 12 sec
MRP4			57 °C, 5 sec	72 °C, 16 sec
COX-1			60 °C, 5 sec	72 °C, 15 sec
COX-2			59 °C, 5 sec	72 °C, 7 sec
PSA			57 °C, 5 sec	72 °C, 9 sec
15-PGDH			60 °C, 5 sec	72 °C, 5 sec
β-actin			56 °C, 5 sec	72 °C, 21 sec

[186] 그 결과, 도 14에 도시한 바와 같이, Real-time PCR 분석결과 는 DMH가 COX-1 및 MRP4 mRNA 발현을 증가시키고, MRP4, PGT 및15-PGDH의 발현은 감소시킴을 나타냈다.

[187]

[188] 실시예 6 : In vitro 스크래치 분석

[189] *in vitro* 스크래치 분석(Hintermann et al ., 2001; Koivisto et al., 2006)을 위해, HaCaT 세포들을 각 웰당 3 x 105 밀도로 6웰 플레이트에 씨딩하고, 80% 컨플루언스에 이를 때까지 배양하였다. 그 후 배지들을 미토마이신 (10 μg/mL) 함유 하는 무혈청 DMEM 으로 교체하였고, 세포들을 2시간 동안 배양하여 상처 증식을 막고 PBS로 깨끗하게 세척 하였다. 멸균된 200 μL 피펫 팁으로

스크래치를 만들고 재세척하였다.

[190] 음성 대조군으로 약물 비처리군, 양성 대조군으로 TGF-β1 (100 pg/mL), 그리고 DMHE (17.4 μg/mL) 단독 처리, 및 COX-1 저해제 (SC 560 , 0.5 μM), COX-2 저해제 (celecoxib, 0.5 μM) 및 비선택성 COX 저해제(naproxen, 80 μM)와의 조합처리 로 실험을 설계하였다.

[191] 배양 전후에 있어서 동일 위치에서 사진을 찍어 상처 치유 진행을 관찰하였다. 실험들을 3회 반복하고 대표적인 사진들을 도시하였다. 스크래치 즉시 이들 스크래치를 현미경(x 100)으로 사진으로 찍고 배양 후 48시간 후 다시 한 번 더 찍었다. 스크래치 거리를 측정함으로써 약물에 의한 회복 율 %를 음성 대조군과 비교하여 계산하였다.

[192] 그 결과, 도 15에 도시한 바와 같이, 음성 대조군과 비교하여 DMHE는 창상 치유를 촉진하였다. 이는 TGF-β1의 결과와도 비교할 만하였다. TGF-β1는 253% 회복률을 보인 반면, DMHE는 204% 회복률을 보였다.

[193] 또한, 도 16에 나타난 것처럼, DMHE의 창상 치유 효과는 COX 저해제 존재하에서 억제됨이 관찰되었다. 특히, COX-1 저해제(SC560) 및 비 선택성COX 저해제 (naproxen)가 COX-2 저해제보다 더 창상 치유 능을 억제하였다.

[194] 이러한 결과들은 COX-2보다 COX-1이 PGE_2 상승 및 창상 치유효과에 더욱 기여함을 시사한다(도 16). 이는 또한 DMHE에 의해 영향을 받는 mRNA 유전자 발현 프로파일과 일치한다(도 14)

[195]

[196] 한편, PGE2가 직접적으로 스크래치 치유에 관여하는지 알아보기 위해, 15-PGDH 및 조효소인 NAD^+를 동일한 모델 시스템에 처리하였다.

[197] 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, 15-PGDH 및 NAD^+ 처리는 DMHE 및 TGF-β1의 창상 치유능을 완전히 사라지게 하였고, 이는 창상 치유에 PGE_2가 직접적으로 관여함을 의미한다.

[198]

[199] 실시예 7 : *In vivo* 위궤양 예방효과

[200] 소화성궤양에 대한 황칠나무의 예방 효과를 살펴보기 위해, 체중 20 ± 2 g 의 3주령의 수컷 ICR 마우스를 사용하였다. 상기 마우스는 Damul Science Co. (Daejuen, Korea)로부터 구입하였다. 실시 예에서 수행한 동물실험은 전남대학교 동물실험 윤리위원회(IRB)의 승인(CNU IACUC-YB-R-2012-11)을 얻어 수행하였다.

[201] 상기 동물들을 3그룹으로 나누고(각 그룹당 n = 7), 이는 정상그룹(vehicle 0.5% CMC(carboxyl methylcellulose)), 양성대조군(sucralfate, 100 mg/kg in 0.5% CMC) 및 실험군(황칠나무잎 헥산 추출물 in 0.5% CMC)을 포함한다.

[202] 동물들에게 균형잡힌 식이를 제공하고 물은 자유롭게 공급하였다. 일주일 후, 하루 동안 절식시켰다. 장 출혈 유도 24시간 전, 황칠나무 헥산 추출물(DMHE, dissolved in 0.5% CMC)을 경구 용량 0.87 mg/kg으로 투여하고 HCl/에탄올 적용

1시간 전 한번 더 투여하였다. 음성(0.5% CMC, 1 mL/kg) 및 양성 대조군(sucralfate, 100 mg/kg in 0.5% CMC)도 동시에 수행하였다. 60% 에탄올 중 150 mM HCl을 포함하는 HCl/에탄올 혼합물을 위 내부 투여에 의해 위 출혈 병소를 유도하였다. 에탄올 투여 한 시간 후, 상기 동물들을 경추 탈골에 의해 죽이고 위를 재빨리 적출하였다. 물로 헹군 후, 파라핀 플레이트 상에 펼치고 사진을 찍었다.

[203]

[204] 그 결과를 도 18에 도시하였다.

[205] 음성 대조군(약물 처리않음)은 많은 양의 출혈 및 부종을 보인 반면, DMHE-처리군(0.87 mg/kg) 및 양성 sucralfate-처리군(100 mg/kg)은 어떠한 병변도 발견되지 않았다.

[206]

[207] 실시예 8 : In vivo 상처치유 효과

[208] 본 발명에 따른 황칠 추출물의 상처치유 효과를 in vivo 에서 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 ICR 수컷 마우스 7 주령 (체중 평균: 25g)을 Damul Science Co.(Daejuen, Korea)에서 구입하여 1주일의 적응 기간을 거친 후에, 마취제(zoletil, 50 uL)를 복강에 투여하여 마취를 한 후, 마취상태에서 5 mm 직경의 원형상처를 내었다. 이후 다음 날부터 매일 상처부위에 하기와 같이 4가지 그룹으로 나뉘어 각 그룹별로 약물을 처리하였는데, 10 ul의 부피의 약물을 각각 상처부위에 도포하면서 동시에 치유 정도를 조직 염색을 통해 관찰하였다. 실시예에서 수행한 동물실험은 전남대학교 동물실험 윤리위원회(IRB)의 승인(CNU IACUC-YB-R-2012-12)을 얻어 수행하였고, 조직염색은 상기 4개 그룹으로 나눠 실험을 수행한 마우스의 상처 조직을 절편화 하고 hematoxylin-Eosin (H&E)을 이용하여 염색하였으며, 염색된 조직을 현미경 (40 x)을 이용하여 상처가 회복된 거리를 측정하였다, 또한 상처간의 측정된 거리로 상처 치유 효율을 계산하였다.

[209] 표 8

[Table 8]

그룹	처리 약물	도면 표기
1	베히클(대조군)	A1
2	TGF-β1 (20 ng/day), 양성대조군	A2
3	DMHE (16.5 μg/day, 황칠 헥산추출물)	A3
4	DMHE (66 μg/day, 황칠 헥산추출물)	A4

[210] 분석 결과, 실험군 간에 조직염색으로 나타난 상처 치유정도는 도 19에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 황칠 헥산 추출물을 처리한 군(A3 & A4)이 다른 군에 비해 상처 간 거리가 줄어든 것으로 보였는데(도면에서 화살표는 상처가 치유되는 동안 상피세포의 재상피화(reepithelialization) 되는 끝 지점을 나타낸 것임), 즉, 도 19에서 각 도면에 표시된 두 화살표 지점간의 거리를 측정한 결과를 도 20에 나타내었고, 측정된 거리를 대조군에 비교하여 이를 치유효율로 계산하여 도 21에 나타내었다.

[211] 보다 구체적으로 도 20에 나타낸 바와 같이, 약물 처리 후 4일 째 대조군의 경우 상처간 거리는 2.55 mm로 초기 상처 낸 직경 (5mm)과 비교하여 약 49 %가 치유된 것으로 나타났고, 양성대조군으로 사용한 TGF-β1 (20 ng) 그룹의 경우는 1.72 mm 으로 65.6% 치유된 것으로 나타났다. 또한 본 발명의 황칠 헥산 추출물(DMHE)을 16.5 μg으로 처리한 경우 2.02 mm 으로 59.5%가 치유된 것으로 나타났고, 66 μg을 처리한 경우에는 0.13 mm로서 97.4% 의 치유력을 보여 주었다.

[212] 특히 DMHE (66 μg) 경우는 음성 대조군과 비교하여 198% 의 치유 효능을 나타내었고, 양성 대조군에 비해서도 148% 정도의 치유효능을 보임으로써 본 발명의 황칠나무 추출물은 상처치유제로서 매우 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[213]

[214] 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.

[215]

청구범위

[청구항 1] 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는,
15-PGDH(15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase) 활성 또는 PGE_2 활성 관련 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 황칠나무 추출물은 황칠나무의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 조추출물은 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매를 사용하여 수득한 추출물인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 극성용매 가용추출물은 물, 에탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택되어진 용매를 사용하여 수득한 추출물인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 5] 제2항에 있어서,
상기 비극성용매 가용 추출물은 헥산, 클로로 포름, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트를 사용하여 수득한 추출물인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 약학조성물은
(i) 15-PGDH 효소활성 억제;
(ii) 세포내 및 세포외에서 PGE_2 증가;
(iii) COX-1(cyclooxygenase-1) 및 MRP4(multidrug resistance-associated protein4) 유전자 발현 증가;
(iv) PGT (prostaglandin transporter) 발현 억제; 및
(v) 5α 리덕타아제 발현 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 15-PGDH 활성 또는 PGE_2 활성 관련 질환은 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염으로 구성된 군에서 선택된 1 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

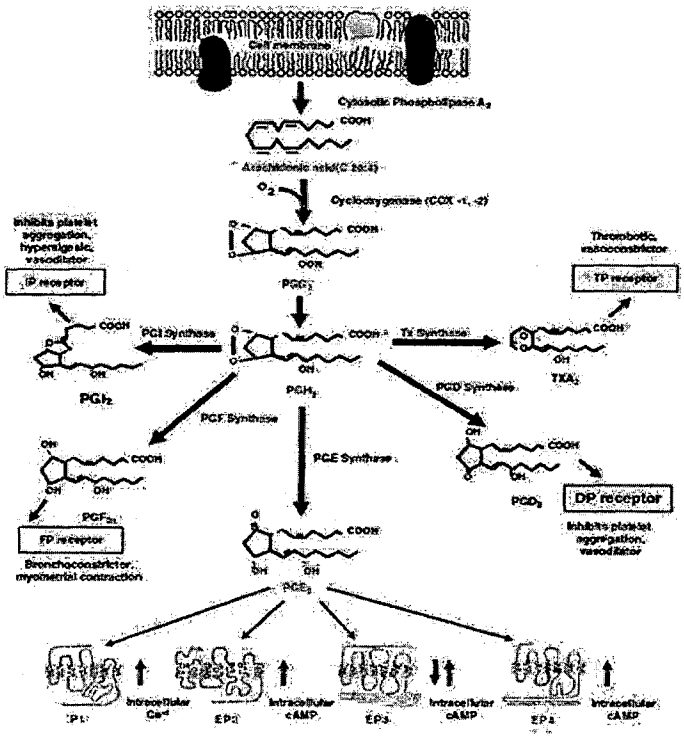
[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 창상은 찰과상, 열상, 자상, 절상, 결출상, 관통상 및 피부궤양으로 구성된 군에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 9] 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 15-PGDH 활성 또는

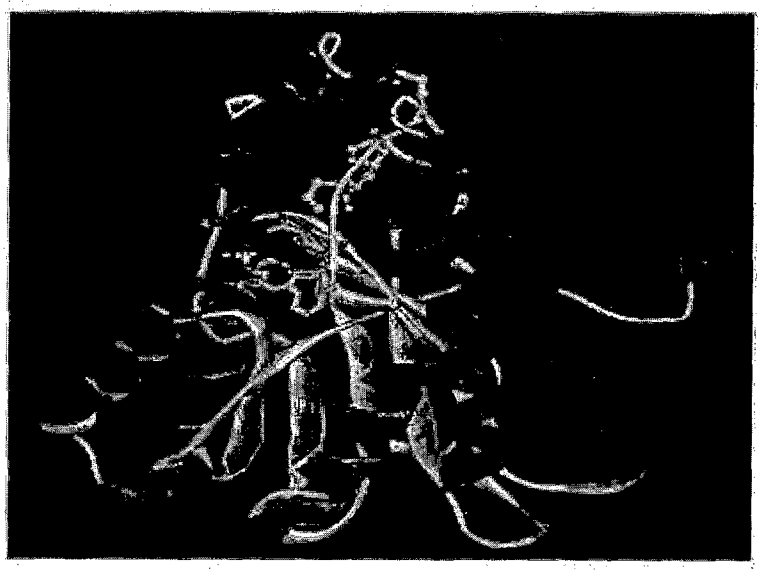
PGE_2 활성 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능성 식품.

[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 15-PGDH 활성 또는 PGE_2 활성 관련 질환은 창상, 화상, 구강궤양, 소화성궤양 및 위염으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

[Fig. 1]


Cell membrane
Cytosolic Phospholipase A2
COOH
Arachidonic acid(C 20:4)
O2
Cyclooxygenase (COX -1, -2)
PGG2
PGH2
Inhibits platelet aggregation, hyperalgesic, vasodilator
IP receptor
PGI Synthase
PGI2
Thrombotic, vasoconstrictor
TP receptor
TX Synthase
TXA2
PGF Synthase
PGE Synthase
PGD Synthase
PGF2α
FP receptor
Bronchoconstrictor, myometrial contraction
PGE2
PGD2
DP receptor
Inhibits platelet aggregation, vasodilator
IP
Intracellular Ca2+
EP2
Intracellular cAMP
EP3
Intracellular cAMP
EP4
Intracellular cAMP

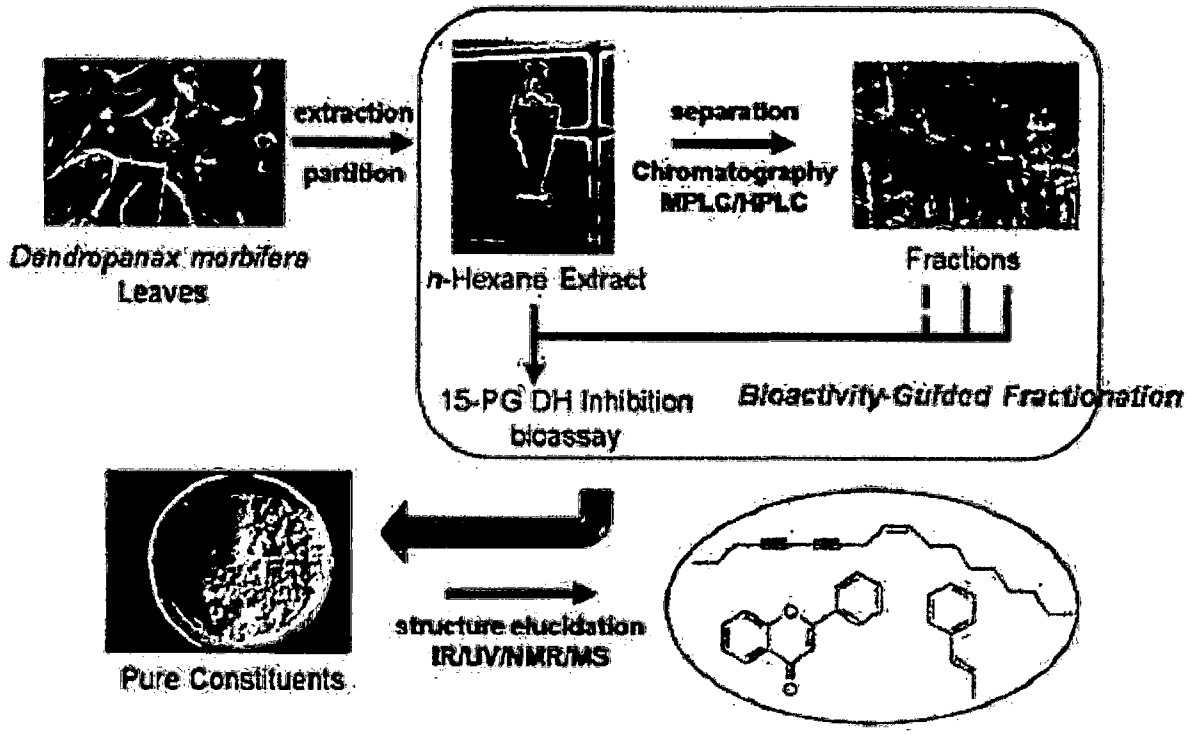
[Fig. 2]



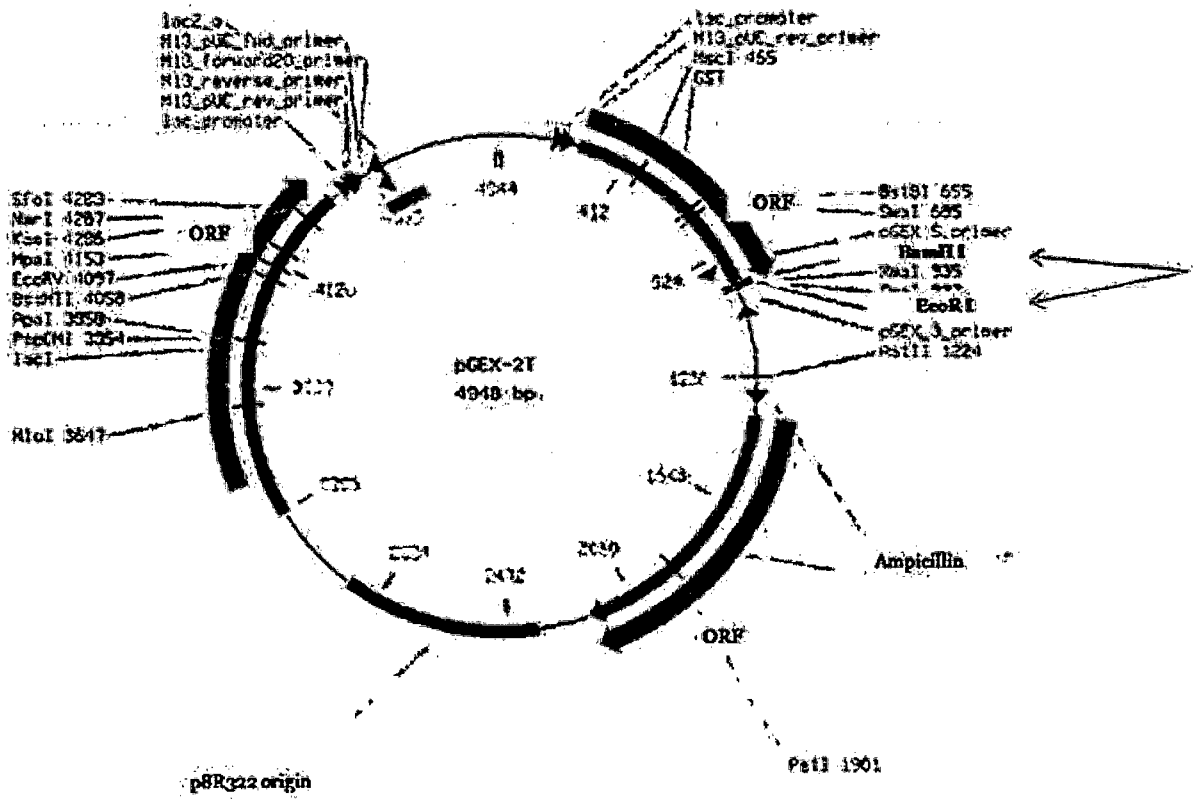
[Fig. 3]



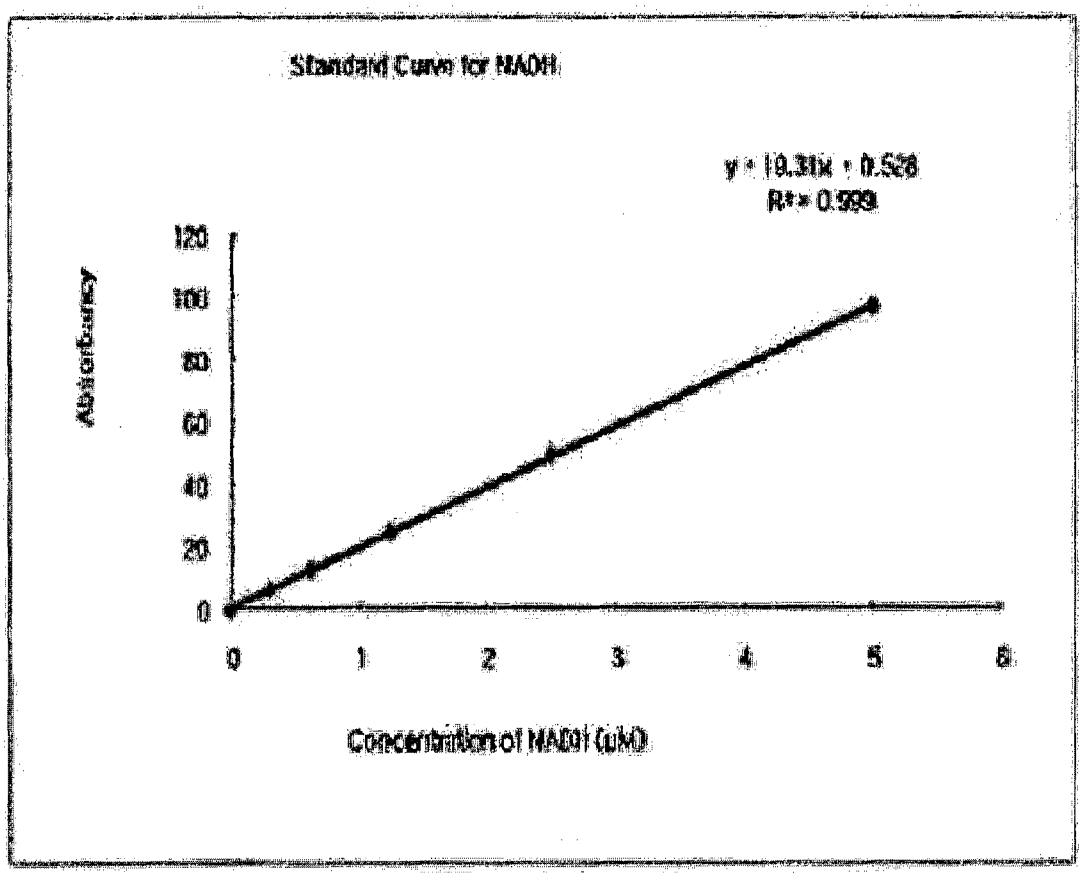
[Fig. 4]


extraction
partition
separation
Chromatography
MPLC/HPLC
Dendropanax morbifera
Leaves
n-Hexane Extract
Fractions
15-PGDH Inhibition
bioassay
Bioactivity-Guided Fractionation
structure elucidation
IR/UV/NMR/MS
Pure Constituents

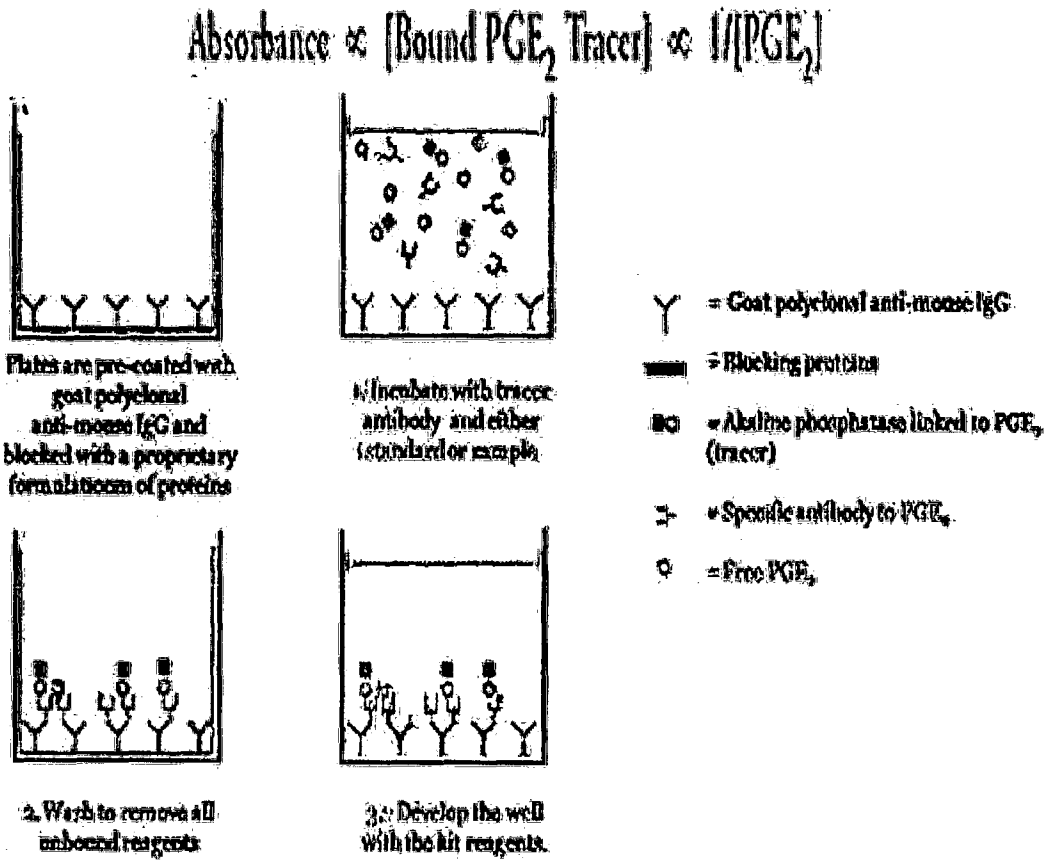
[Fig. 5]


ORF
ORF
ORF
pGEX-2T
4948 bp
Ampicillin
p8R322 origin
PstI 1901
EcoRI
BamHI
SfoI 4283
NarI 4287
MpaI 4153
EcoRV 4097
PstI 1224
MloI 3647
GST

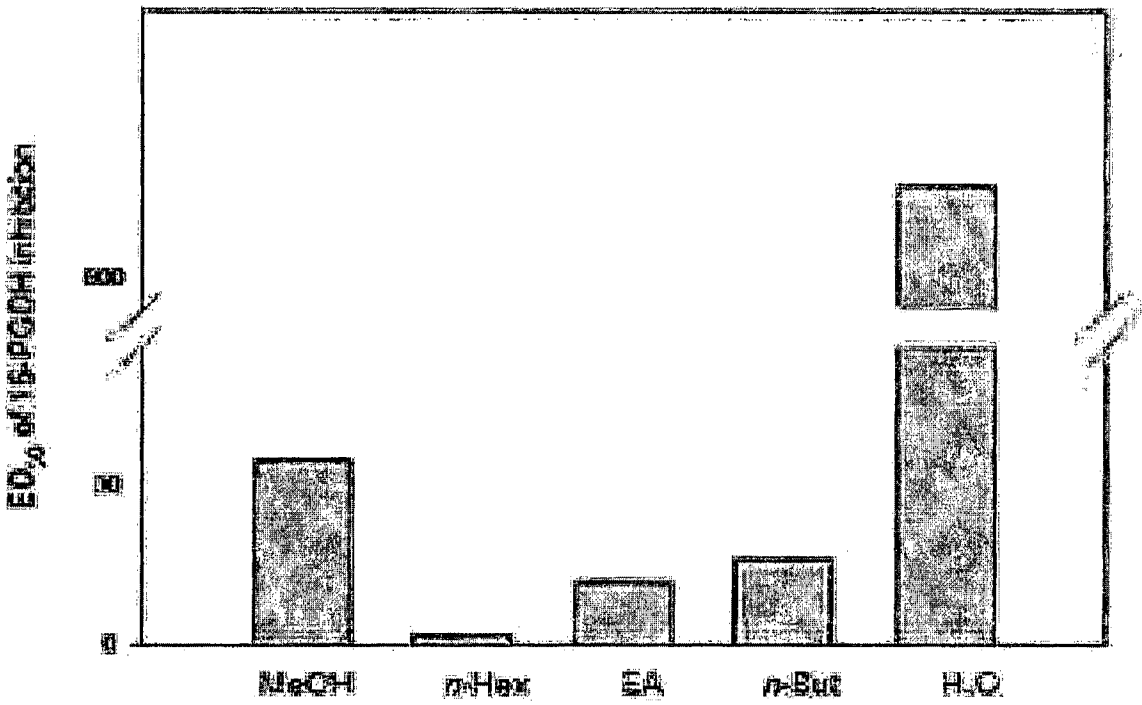
[Fig. 6]


Standard Curve for NADH
y = 19.31x + 0.526
R² = 0.999
Absorbancy
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Concentration of NADH (uM)

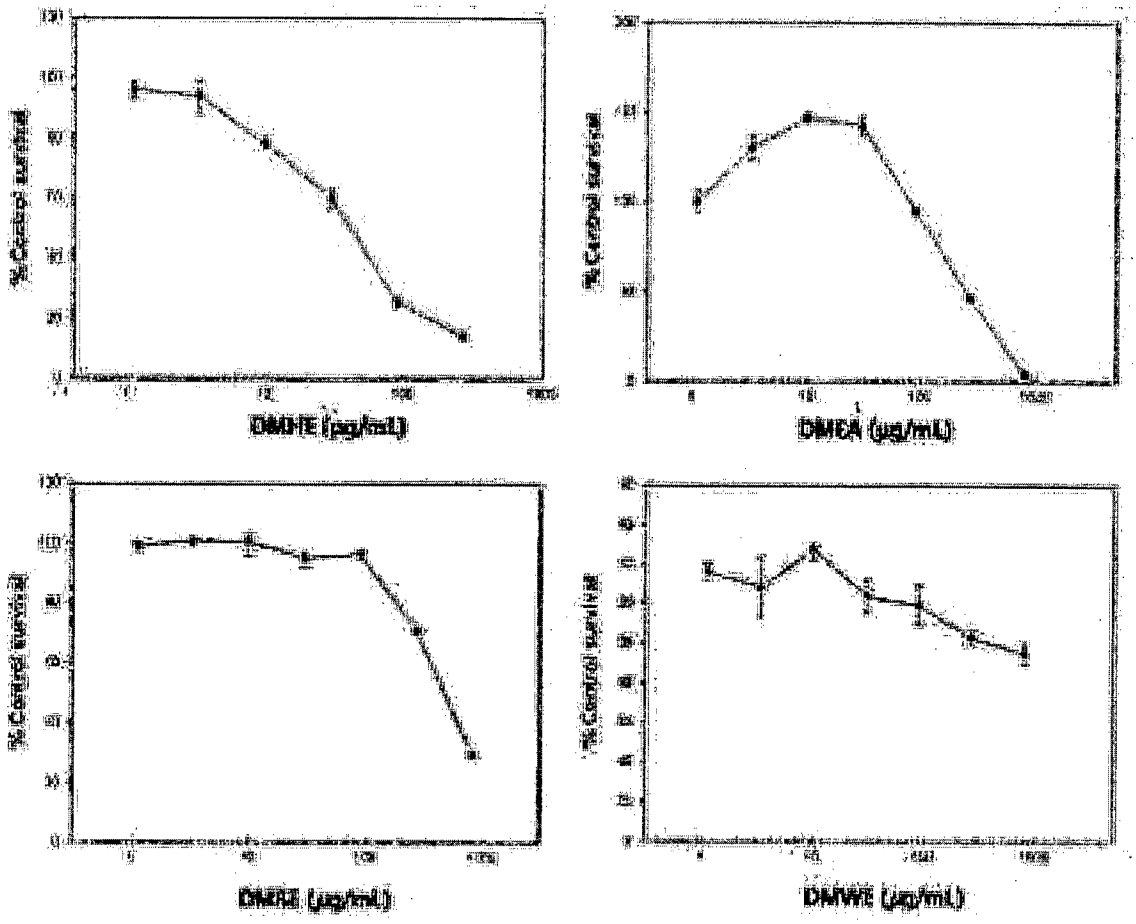
[Fig. 7]


Absorbance ∝ [Bound PGE2 Tracer] ∝ 1/[PGE2]
Plates are pre-coated with goat polyclonal anti-mouse IgG and blocked with a proprietary formulation 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

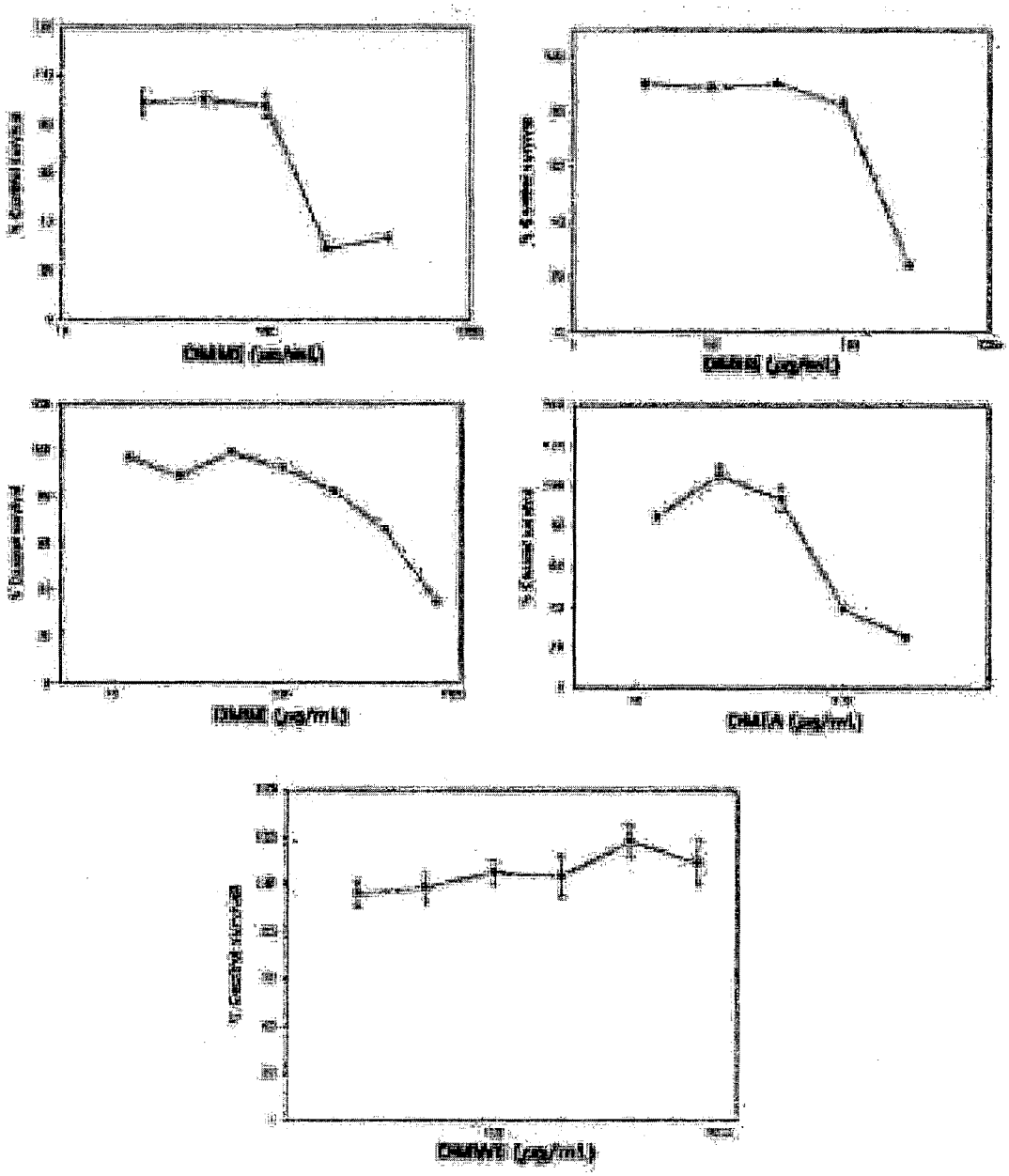
[Fig. 8]



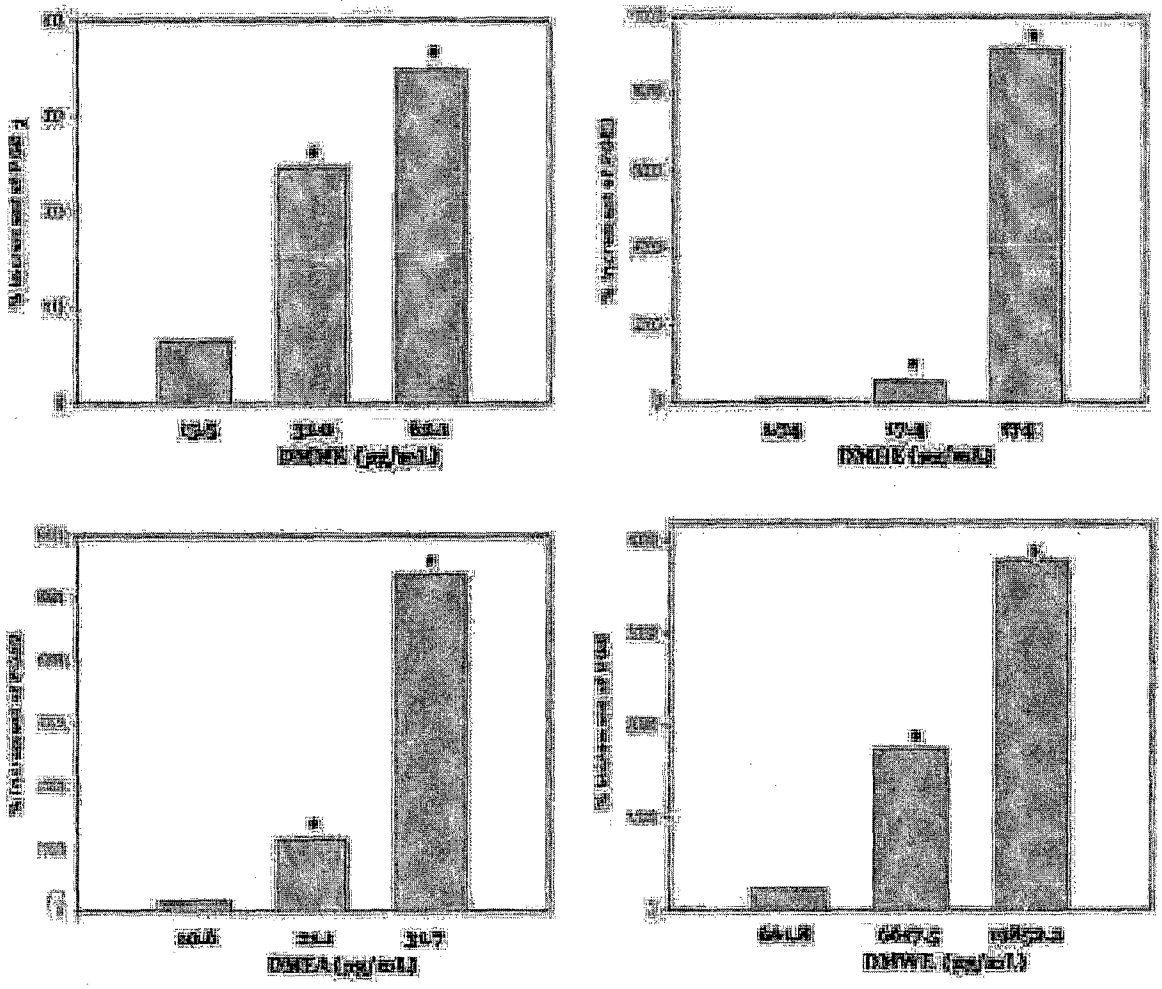
[Fig. 9]



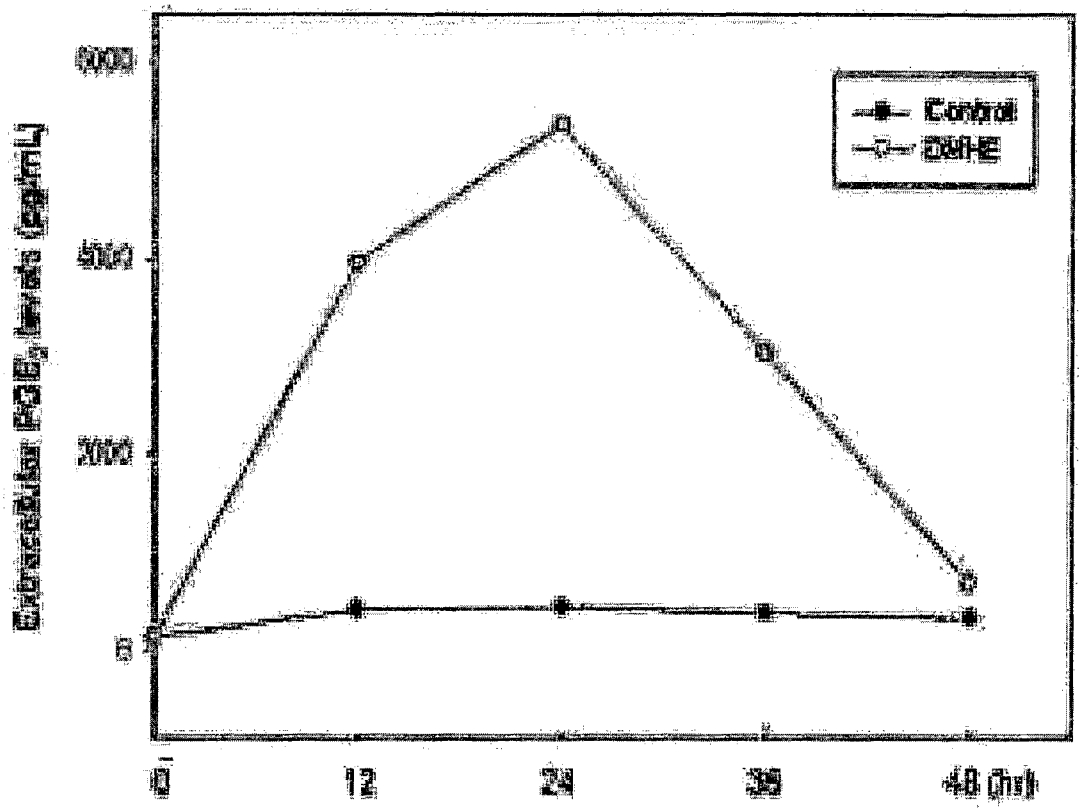
[Fig. 10]



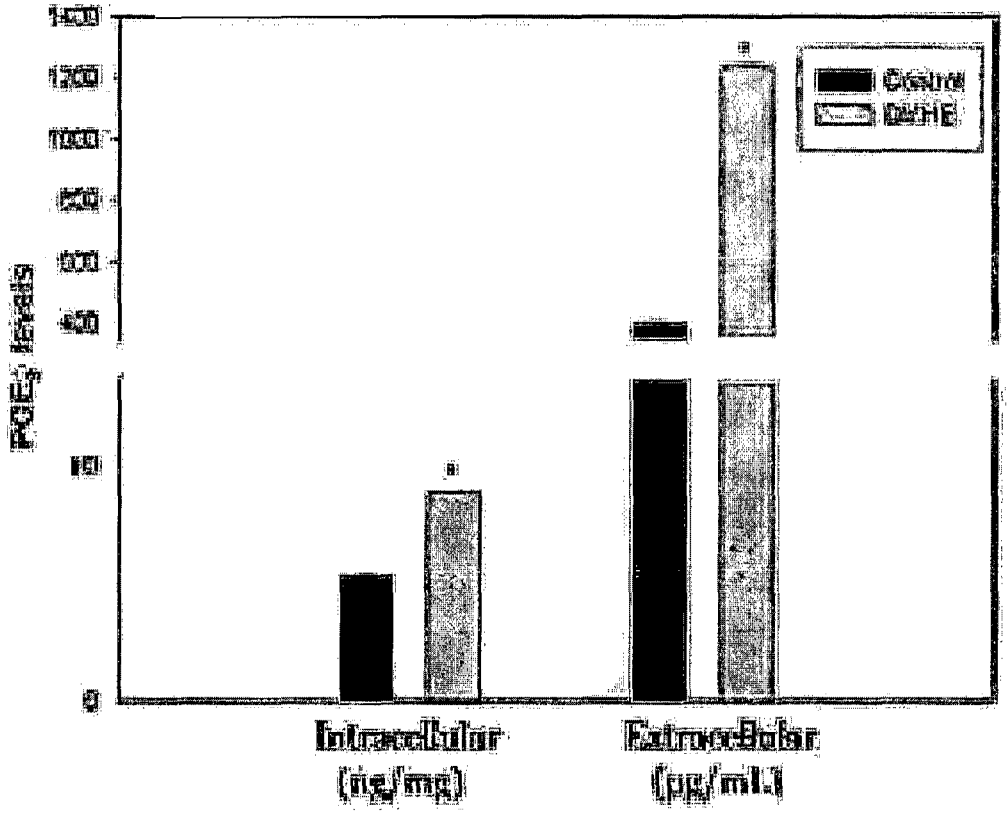
[Fig. 11]



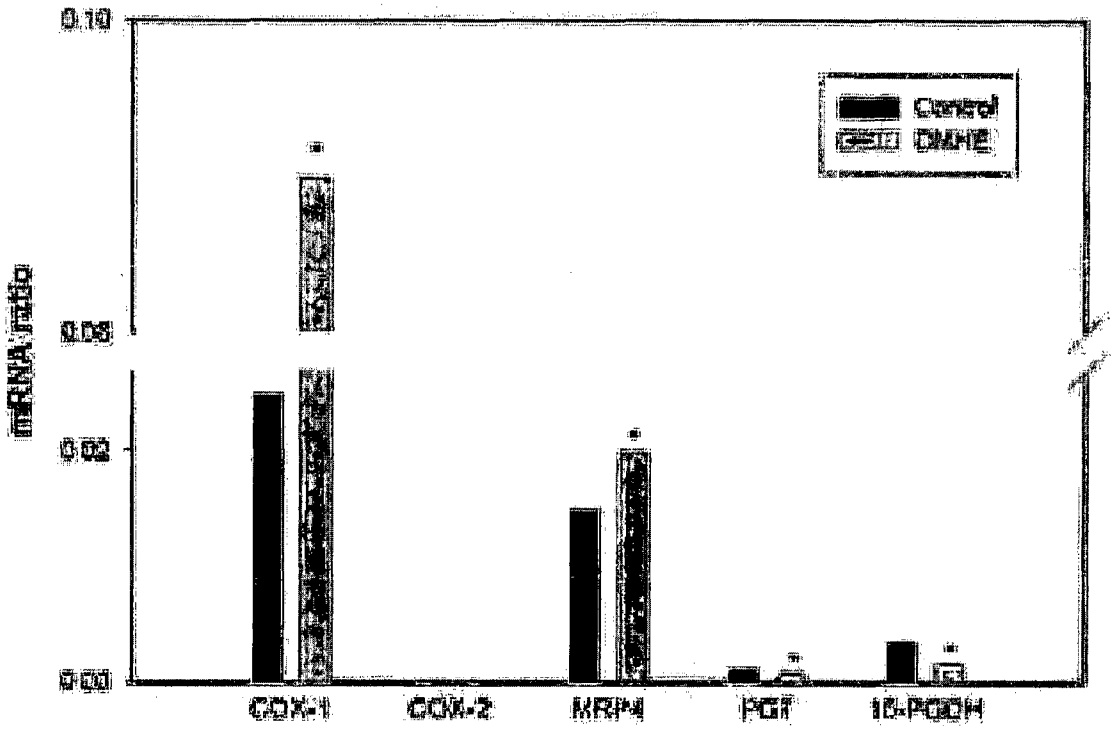
[Fig. 12]



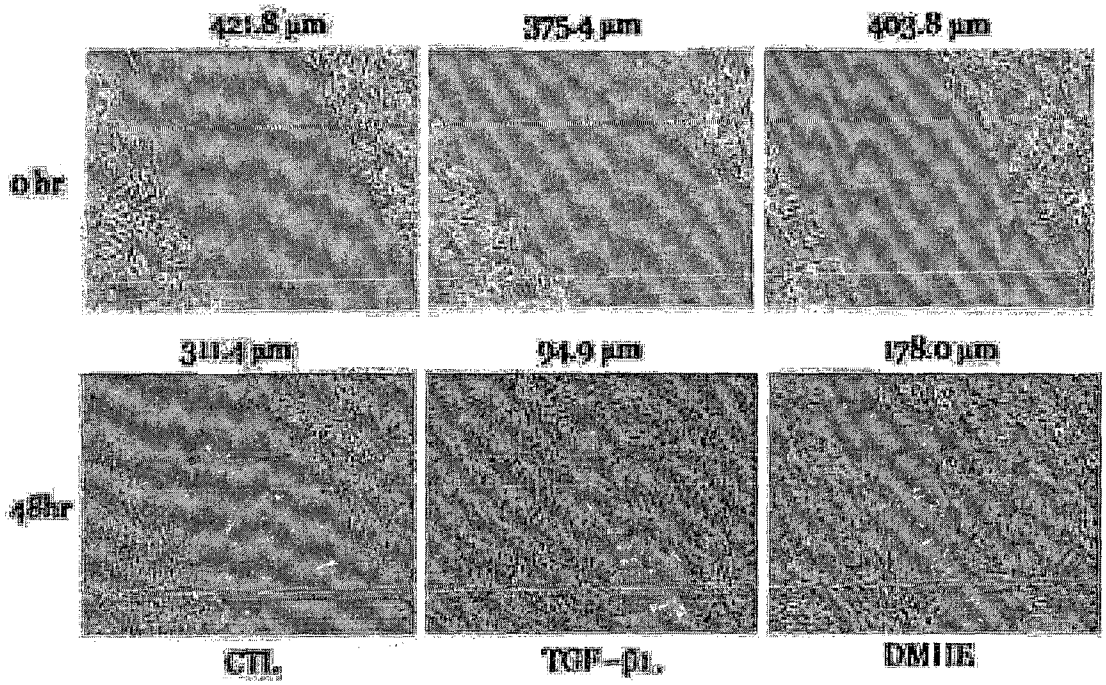
[Fig. 13]

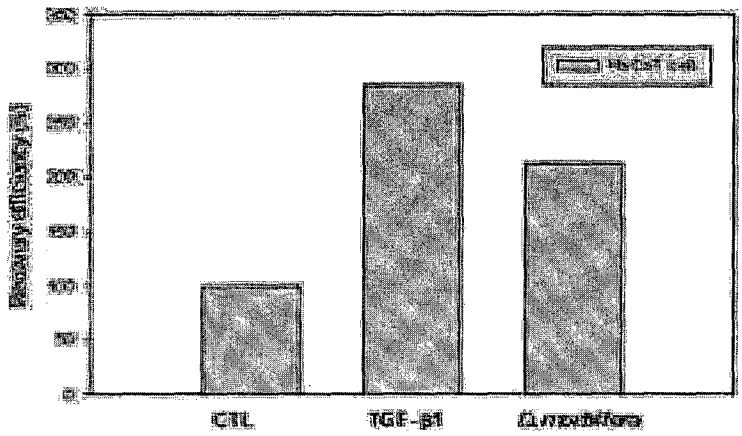


[Fig. 14]

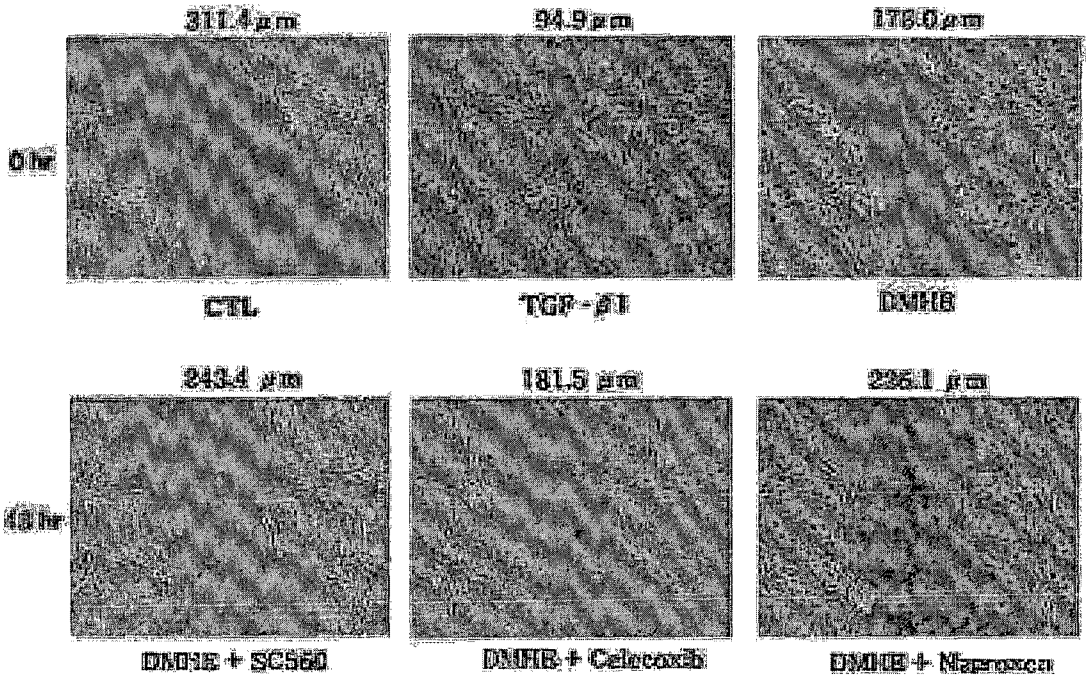

0.10
0.08
0.02
0.00
mRNA ratio
Control
DMHE
COX-1
COX-2
KRP4
PGI
15-PGDH

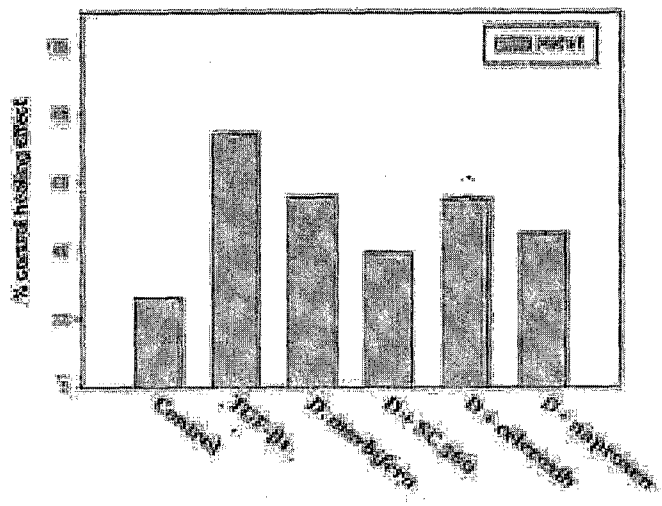
[Fig. 15]


421.8 μm
375.4 μm
403.8 μm
0 hr
311.4 μm
94.9 μm
178.0 μm
48hr
CTL
TGF-β1
DM1E

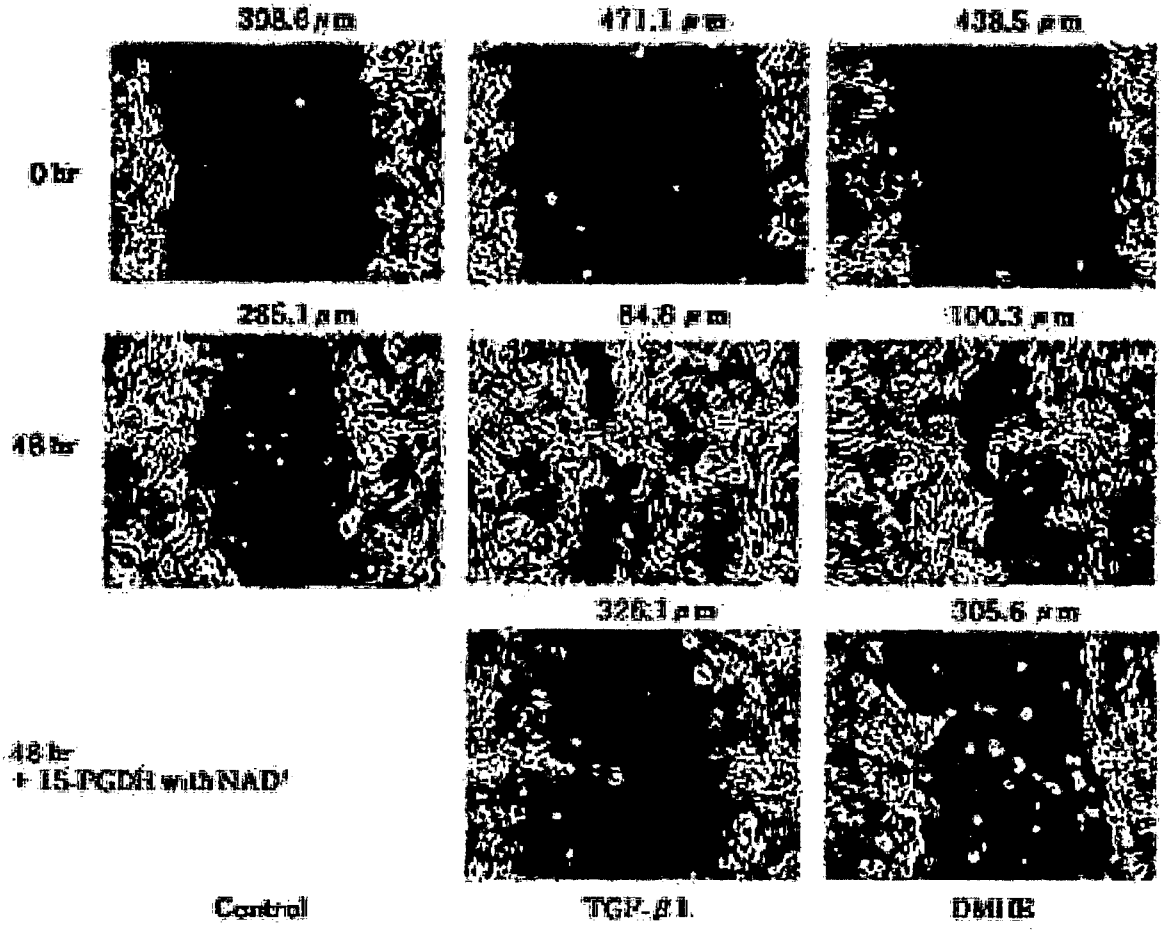

CTL
TGF-β1

[Fig. 16]

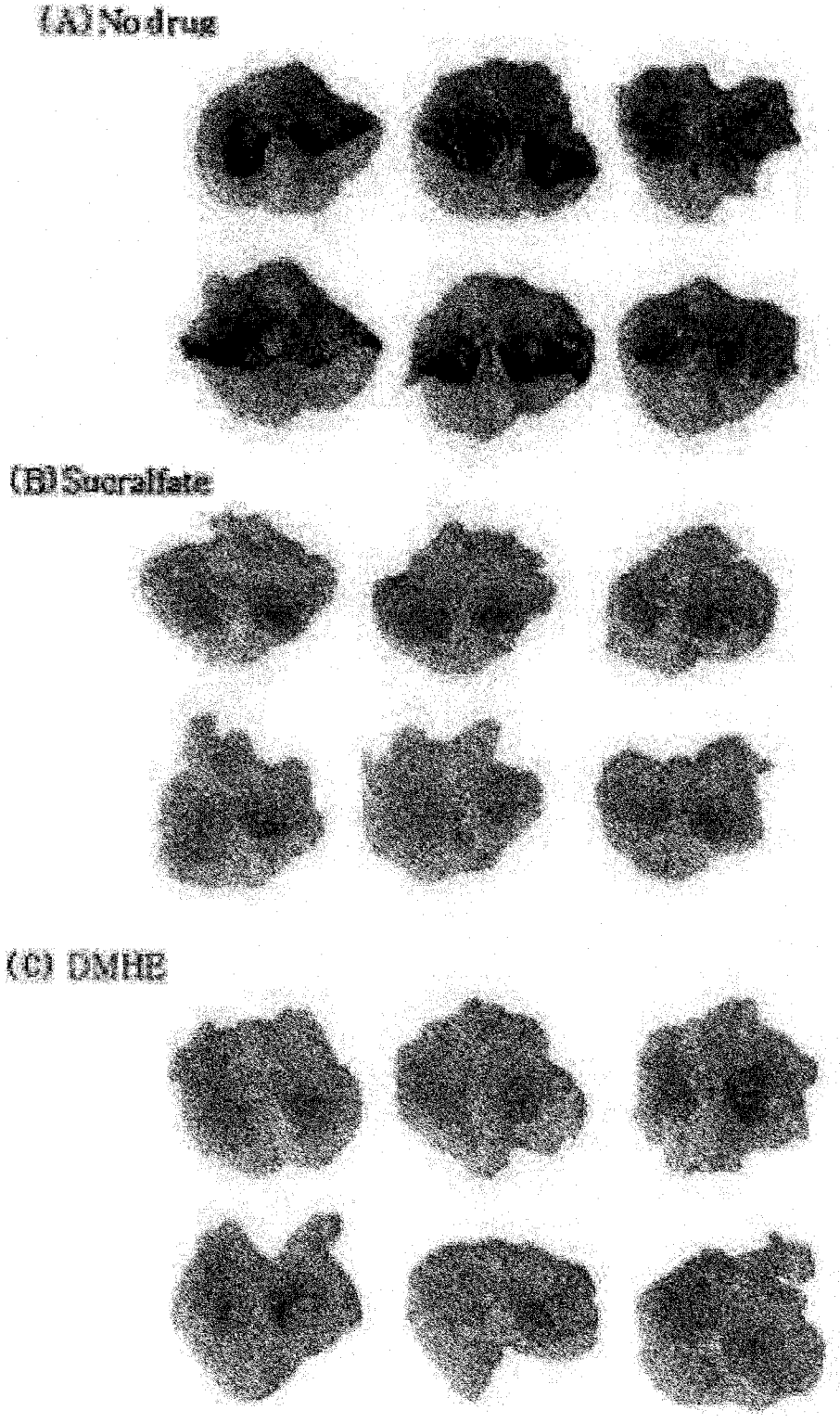

311.4 μm
94.9 μm
176.0 μm
0 hr
CTL
TGF-β1
DMHB
243.4 μm
181.5 μm
236.1 μm
48 hr
DMHB + SC560
DMHB + Celecoxib
DMHB + Naproxen


% wound healing effect

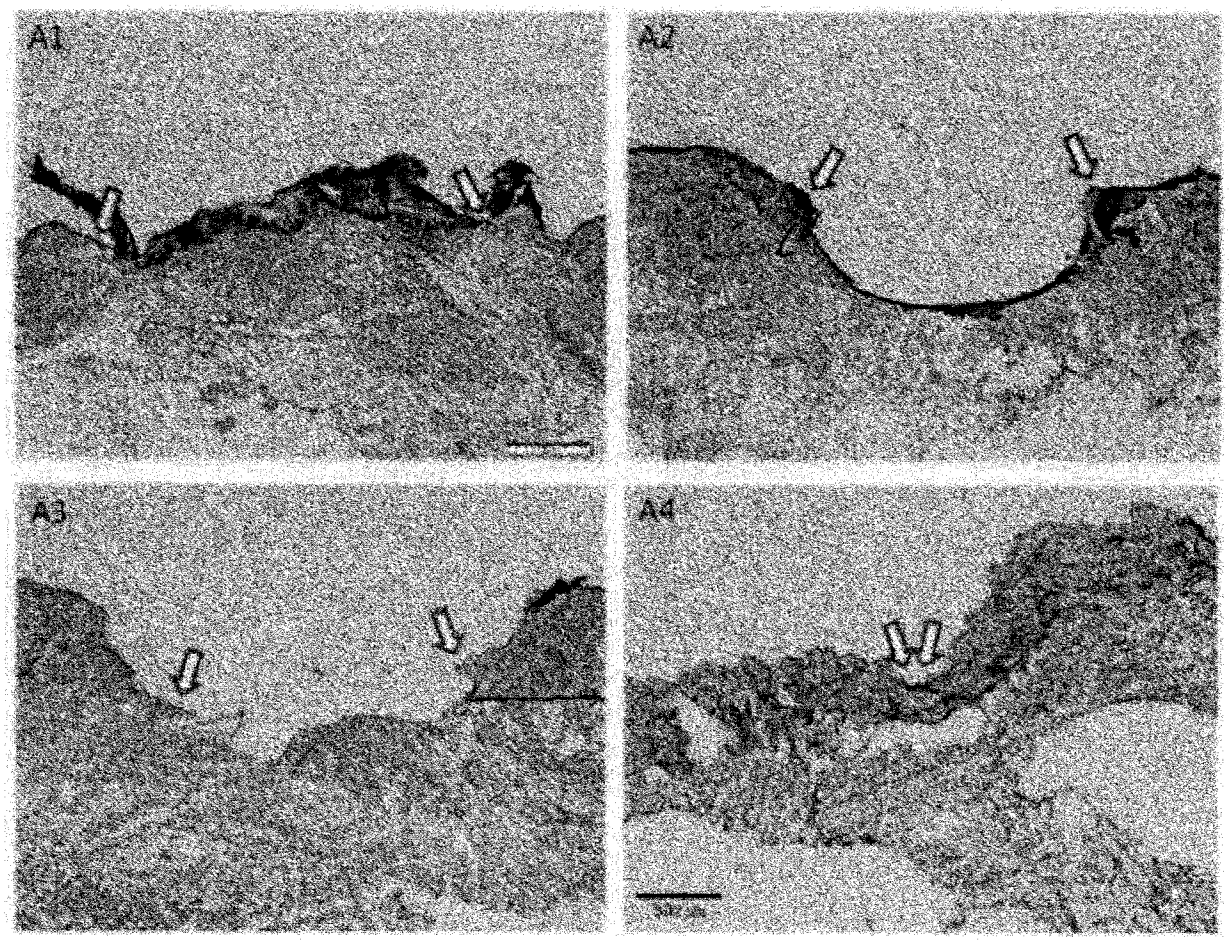
[Fig. 17]


398.6 μm
471.1 μm
438.5 μm
0 hr
285.1 μm
84.8 μm
100.3 μm
48 hr
326.1 μm
305.6 μm
48 hr
+ 15-PGDH with NAD+
Control
TGF-β1
DMH

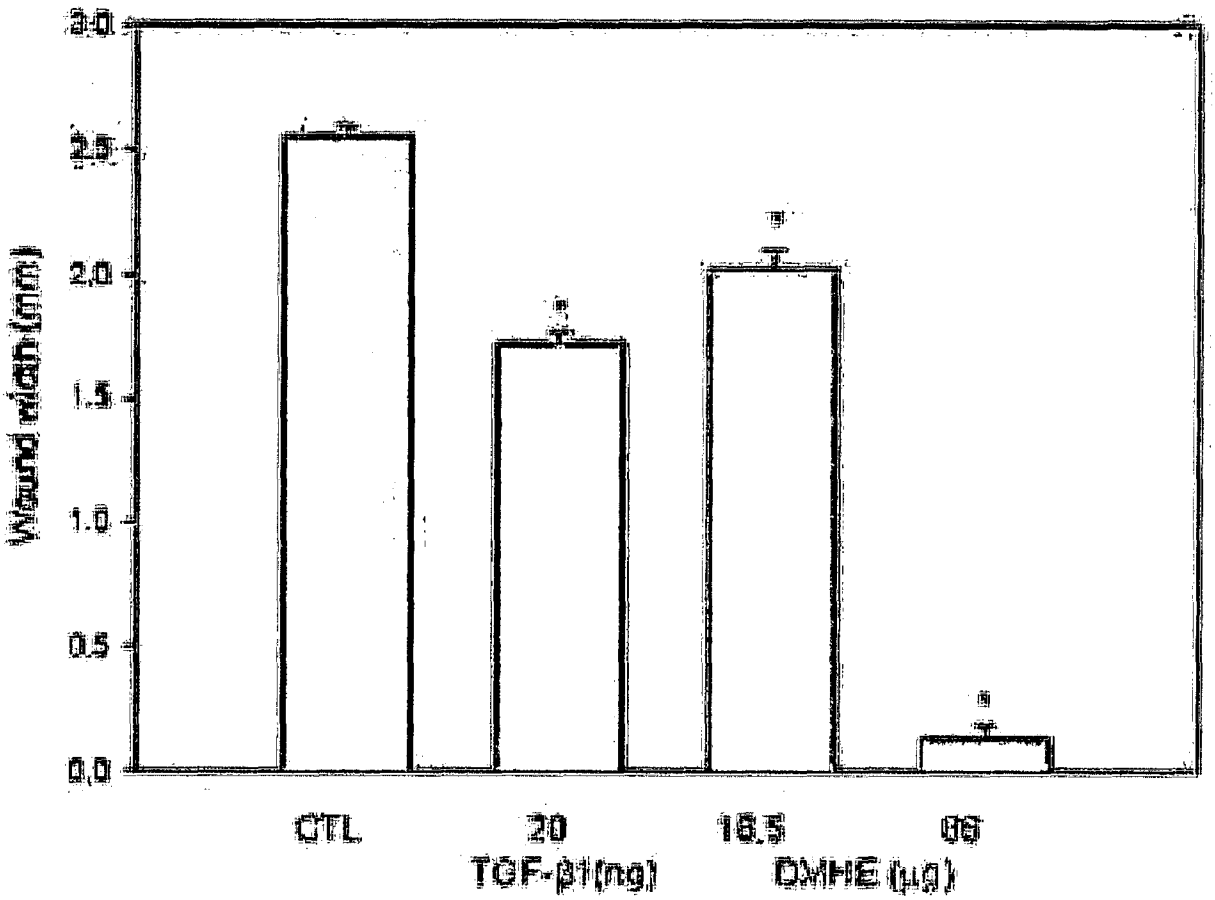
[Fig. 18]



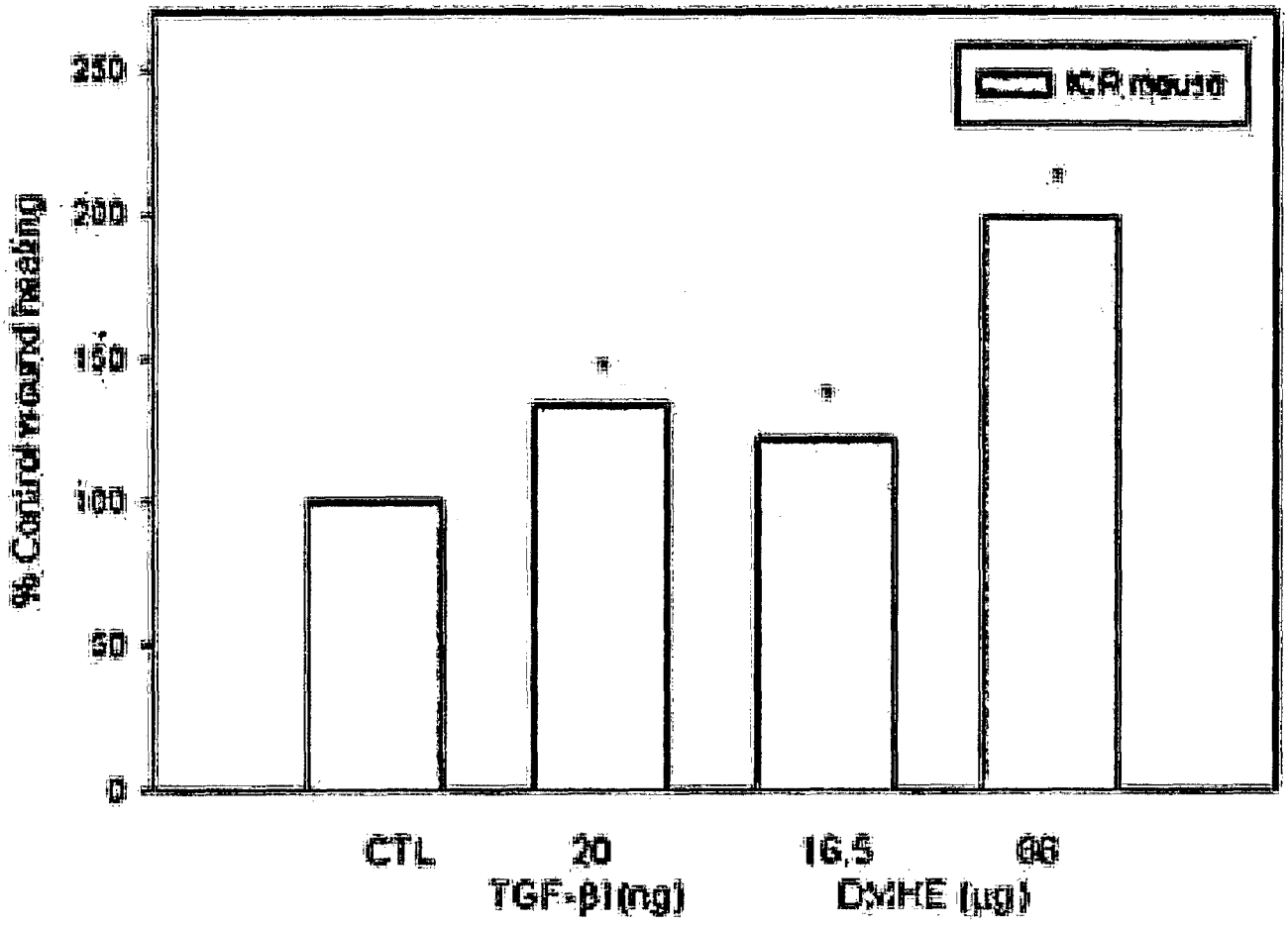
[Fig. 19]



[Fig. 20]



[Fig. 21]


ICR mouse
% Control wound healing
250
200
150
100
50
0
CTL
20
16.5
66
TGF-β1(ng)
DWHE (μg)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2012/006108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/25(2006.01)i, A61P 17/02(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/25; A61Q 19/08; A61K 8/97; A23L 1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Dendropanax morbifera Lev, 15-PGDH, PEG2, wound, picture, ulcer, gastritis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2004-0097112 A (DP BIOTECH CO., LTD.) 17 November 2004 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2004-0107852 A (CHUNG, Se Young) 23 December 2004 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2011-0078527 A (COREANA COSMETICS CO., LTD.) 07 July 2011 See the entire document.	1-10
A	LEE, S. H. et al., Screening of Immune Activation Activities in the Leaves of Dendropanax morbifera Lev., Korean Journal of Medicinal Crop Science, 2002, vol. 10, no. 2, pp. 109-115 See abstract.	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 FEBRUARY 2013 (26.02.2013)	**26 FEBRUARY 2013 (26.02.2013)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2012/006108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2004-0097112 A	17.11.2004	KR 10-0494482 B1	10.06.2005
KR 10-2004-0107852 A	23.12.2004	NONE	
KR 10-2011-0078527 A	07.07.2011	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2012/006108

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/25(2006.01)i, A61P 17/02(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 36/25; A61Q 19/08; A61K 8/97; A23L 1/30

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 황칠, 15-PGDH, PEG2, 창상, 화상, 궤양, 위염

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2004-0097112 A (주식회사 디피바이오텍) 2004.11.17 전문 참조.	1-10
A	KR 10-2004-0107852 A (정세영) 2004.12.23 전문 참조.	1-10
A	KR 10-2011-0078527 A (주식회사 코리아나화장품) 2011.07.07 전문 참조.	1-10
A	LEE,S.H. et al., Screening of Immune Activation Activities in the Leaves of Dendropanax morbifera Lev., Korean Journal of Medicinal Crop Science, 2002, Vol.10, No.2, pp.109-115 초록 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 02월 26일 (26.02.2013)	**2013년 02월 26일 (26.02.2013)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
김강필
전화번호 82-42-481-8393

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2012/006108

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2004-0097112 A	2004.11.17	KR 10-0494482 B1	2005.06.10
KR 10-2004-0107852 A	2004.12.23	없음	
KR 10-2011-0078527 A	2011.07.07	없음	