

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0126809
(43) 공개일자 2024년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/23 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61K 8/9789 (2017.01) A61P 1/02 (2006.01)

A61Q 11/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/23 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2024-0009443

(22) 출원일자 2024년01월22일

심사청구일자 2024년01월22일

(30) 우선권주장

1020230019094 2023년02월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

정길생

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 152, 311호

나민균

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 208동 602호(전민동, 엑스포아파트)

김은남

대전광역시 유성구 문화원로 133(봉명동, 스톤빌), 505호

(74) 대리인

특허법인 공간

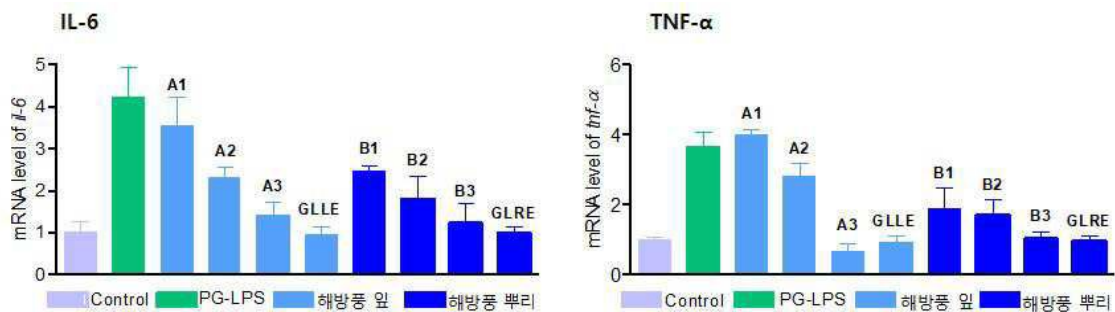
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 치조골 형성 및 치주염 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 치조골 형성 및 치주염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 인간 치주인대세포에서 염증성 사이토카인 및 전염증성 매개체를 억제하고 골 형성에 주요 바이오마커를 증가시켜 인간 치주인대세포의 조골분화를 유도하며, 결찰 또는 PG-LPS로 유도한 치주염 동물 모델에서 IL-6, IL-1 β 또는 TNF- α 의 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고, 골밀도를 증가시키고 CEJ-ABC 거리를 감소시키는 한편, 염증성 침윤 면적을 감소시켜 치조골 형성 및 치주염 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A61P 1/02 (2018.01)

A61Q 11/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/312 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 치조골 형성용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

해방풍 추출물을 해방풍의 잎 또는 뿌리 추출물인 것을 특징으로 하는 치조골 형성용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 해방풍 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 디메틸설폭사이드 및 헥산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물을 용매로 하여 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 치조골 형성용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 해방풍 추출물은 70~95%(w/w) 에탄올을 용매로 하여 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 치조골 형성용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 치주염 유발 조직에서 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP) 또는 오스테오칼신(osteocalcin, OCN)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 치조골 형성용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항의 조성물을 포함하는 치주염 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조성물은 인간 치주인대세포에서 IL-6 또는 TNF- α 의 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 치주염 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 조성물은 치약, 구강세정제, 구강청정제, 껌, 캔디류, 구강스프레이, 구강용 젤, 구강용 연고제, 구강용 바니쉬, 잇몸 마사지 크림 및 구강용 패치로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나인 것을 특징으로 하는 치주염 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 치주염 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 치조골 형성 및 치주염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 치주질환은 성인 10명 중 7명 이상이 이환되어 있는 매우 유병률이 높은 만성질환으로, 치주염, 치은염 등을 포함한다. 치주염(periodontitis)은 치아 주위 조직의 염증으로 인해 잇몸(치은)과 치아를 지지해 주는 뼈(치조골)가 파괴되는 질환을 의미한다. 치주염은 진지발리스와 같은 치주염균에 의한 복합적인 유발원인으로 발생되며, 치근막의 염증을 수반하여 치근막염, 치주위염이라고도 한다. 치주염은 치아 주위조직(치근막)의 세균감염으로 인해 염증으로 치아의 손실로까지 진행될 수 있다.

[0003] 치주염은 미국에서는 4천 900만 이상의 사람들이, 또한 한국인의 90%이상이 치주염을 갖고 있다고 보고되고 있다. 그러나, 다른 만성질환과 마찬가지로 치주질환은 통증을 느끼거나 치아가 들리는 등 심각하게 진행된 단계가 되기 전에는 이상을 느끼지 못하기 때문에 '침묵의 질환'으로 불리기도 한다.

[0004] 구강 내에는 수십억개에 달하는 세균이 살고 있으며, 이러한 세균은 평소에는 해로운 균이 아니나, 구강위생이 철저하지 못하거나 칫솔질을 게을리 할 때는 그 숫자가 급격히 증가하여 치아면에 무색의 얇은 막을 형성하며 이것을 프라그(치태)라고 한다. 프라그 내의 세균들이 증식하여 독성물질을 내게 되어 잇몸에 염증을 일으킨다. 프라그는 빨리 제거되지 않으면 서서히 누렇게나 갈색의 딱딱한 석회물질인 치석으로 변하여 잇몸에 나쁜 영향을 미친다. 염증이 잇몸에만 국한된 잇몸병을 치은염이라 하는데 사춘기 전후에 잘 발생한다. 치은염의 초기 증상은 출혈인데 칫솔질할 때나 사과를 먹을 때 피가 나오며 점점 진행되면서 잇몸이 약간 붓고 색깔이 푸르게 변한다. 치은염이 오래 방치되면 염증이 치아를 둘러싸서 보호해 주는 치조골로 확산되며 치조골의 흡수가 일어난다. 치료방법은 치조골의 흡수정도에 따라 달라지는데 치석제거와 치근활택술로부터 치조골 이식, 치은 이식, 치주조직 재생 유도술등 다양하며 치료비도 엄청난 차이가 난다. 그러나, 치조골이 원래 높이의 2분의 1 이상이 파괴된 경우에는 치료가 불가능하며 치아를 빼야만 하는 경우가 된다.

[0005] 치주염은 치아지지지구조의 염증과 동시에 치주인대의 파괴와 치조골의 소실을 초래한다. 때문에, 치주염의 치료에는 항균 및 항염증, 조골세포 분화의 촉진 등의 복합적 치료 방법이 필요하다.

[0006] 현재 치주염의 가장 효과적인 치료법은 약물치료와 외과적 수술을 병행하는 것이나 이러한 치료 방법은 치료 후가 좋지 않고 환자에게 통증과 부작용을 유발할 수 있다. 또한 항균, 항염제 등 구강질환의 치료에 사용되는 약물은 근본적인 치주질환의 치료제가 아니며 장기복용에 따른 부작용을 동반하고 있다. 이에 따라 치주염 예방 및 치료를 위한 천연물 소재를 확보 및 생약/천연물 신소재 발굴이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1207214호, 해방풍 추출물로부터 제조한 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물, 2012년11월27일, 등록.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-2481239호, 세라마이드 생합성을 유도하는 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물, 2022년12월21일, 등록.

(특허문헌 0003) 한국공개특허 제10-2022-0048892호, 해방풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품, 2022년04월20일, 공개.

(특허문헌 0004) 한국등록특허 제10-0919852호, 해방풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 부종 또는 피부염예방 및 치료용 조성물, 2009년09월24일, 등록.

(특허문헌 0005) 한국등록특허 제 10-2011639호, 해방풍 및 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 피부 미백 및 주름개선용 조성물, 2019년08월12일, 등록.

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Bonaldo, P. et al., Cellular and molecular mechanism of muscle atrophy, Dis Model Mech., 6(1), 25-39, 2013.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 치조골 형성 및 치주염 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제의 해결을 위하여 본 발명은 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 치조골 형성 및 치주염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 해방풍 추출물은 해방풍(*Glehnia littoralis*)의 전초, 잎, 뿌리, 꽃 또는 열매 추출물일 수 있으며, 바람직하게는 해방풍의 뿌리와 잎 추출물이다.

[0012] 상기 해방풍 추출물은 해방풍의 물, 저급알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올), 저급알코올 수용액, 또는 유기용매(클로로포름, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 디메틸설폭사이드, 헥산등)의 추출 농축물일 수 있으며, 상기 해방풍의 추출 용매로 바람직하게는 물, 저급알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올), 저급알코올 수용액이며, 더욱 바람직하게는 70% 또는 95% 에탄올이다.

[0013] 상기 해방풍 추출물은 해방풍 뿌리와 잎을 70% 또는 95% 에탄올로 80℃에서 4시간 동안 환류냉각추출기를 이용하여 추출할 수 있으며, 필요에 따라서 적합한 여과지로 여과하거나 동결건조한 후 파우더 형태로 사용할 수 있다.

[0014] 본 발명에 있어서 “치주염(periodontitis)”은 치아를 받치고 있는 치은과 치주인대 및 골조직에 염증이 생기는 질환이다. 상기 치주염을 일으키는 원인균으로, 구체적으로는 악티노바실루스 악티노마이세템코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), 포피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 타네렐라 포르시시아(*Tannerella forsythia*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*) 및 푸소박테리움 누클리아툼(*Fusobacterium nucleatum*)으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 균일 수 있으며, 보다 구체적으로는 포피로모나스 진지발리스일 수 있다.

[0015] 본 발명의 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주염 예방 또는 치료용 조성물은 PG-LPS로 유도한 치주인대세포에서 염증성 사이토카인(IL-6, TNF- α)의 발현을 억제할 수 있다. 또한 상기 조성물은 PG-LPS로 유도한 치주인대세포에서 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)와 Osteocalcin(OCN)의 발현을 증가시킴으로써 조골세포의 분화를 유도할 수 있다.

[0016] 본 발명의 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주염 예방 또는 치료용 조성물은 결찰 또는 PG-LPS로 유도한 치주염 동물 모델에서 IL-6 또는 TNF- α 의 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고, 치조골의 골밀도를 증가시키고 CEJ-ABC 거리를 감소시키는 한편, 염증세포의 치주조직 내 침윤 면적을 감소시킬 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 조성물은 약학 조성물로 제공될 수 있으며, 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. “약학적으로 허용 가능”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 또한, 상기 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0018] 바람직하게 본 발명의 조성물은 치약, 구강세정제, 구강청정제, 껌, 캔디류, 구강스프레이, 구강용 젤, 구강용 연고제, 구강용 바니쉬, 잇몸 마사지 크림 및 구강용 패치로 이루어진 균으로부터 1이상 선택되는 형태로 제형화할 수 있다.

[0019] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로즈, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아라비아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 파라옥시벤조산메틸, 파라

옥시벤조산프로필, 탈크, 스테아르산마그네슘 및 광물유를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 안정화제, 결합제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 진세노사이드에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 미결정셀룰로오스, 수크로스 또는 락토오스, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 히프로멜로오스 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아르산마그네슘, 탈크 같은 활택제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 유동과라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 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, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 진세노사이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 멸균되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질과 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다.

[0020] 상기 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여시간, 투여경로, 약물의 흡수, 분포 및 배설률, 사용되는 다른 약물의 종류 및 처방자의 판단 등에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 5000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0021] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 치조골 형성 및 치주염 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0022] 상기 건강기능식품은 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 또는 가공한 식품을 지칭하는 것으로, 예를 들어 건강보조식품, 기능성 식품, 영양제, 보조제 등을 모두 포함한다.

[0023] 상기 해방풍 추출물은 전체 건강기능식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001중량% 내지 50중량%, 더 바람직하게는 0.001중량% 내지 40중량%, 가장 바람직하게는 0.001중량% 내지 30중량%로 하여 첨가될 수 있다. 상기 첨가량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 및 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명 진세노사이드를 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명은 해방풍 추출물을 유효성분으로 포함하는 치조골 형성 및 치주염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 치주인대세포에서 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- α 를 억제하고 iNOS 및 COX-2와 같은 전염증성 매개인자의 발현을 억제하였다. 또한 PG-LPS에 의해 손실된 ALP와 OCN을 증가시키며, 인간치주인대세포의 조골세포로의 분화를 유도하였다. 또한 해방풍 추출물은 산화스트레스를 하향조절함으로써 치주염 예방 또는 치료효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 PS-LPS로 자극한 인간 치주인대세포에서 해방풍의 뿌리 및 잎 추출물의 염증성 사이토카인 IL-6 및 TNF- α 의 발현에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 PS-LPS로 자극한 인간 치주인대세포에서 해방풍의 뿌리 및 잎 추출물의 전염증성 매개체인 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 PS-LPS를 처리한 인간 치주인대세포에서 해방풍의 뿌리 및 잎 추출물의 광물화된 결절 형성에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 PS-LPS를 처리한 인간 치주인대세포에서 해방풍의 뿌리 및 잇 추출물의 ALP와 OCN에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 PS-LPS를 처리한 인간 치주인대세포에서 해방풍의 뿌리 및 잇 추출물의 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 PS-LPS를 처리한 인간 치주인대세포에서 해방풍의 뿌리 및 잇 추출물의 항산화효소 SOD 및 CAT의 발현에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 *Porphyromonas gingivalis*에 대한 해방풍 뿌리 및 잇 추출물의 최소억제농도(MIC)를 확인한 실험 결과이다.

도 8은 *Porphyromonas gingivalis*에 대한 해방풍 뿌리 및 잇 추출물의 최소 살균 농도(MBC)를 확인한 실험 결과이다.

도 9는 PS-LPS 주사 또는 결찰(Ligature)로 유도한 치주염 동물 모델에서 해방풍의 잇 추출물이 염증성 사이토카인 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 세포 내 농도에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 PS-LPS 주사 또는 결찰(Ligature)로 유도한 치주염 동물 모델에서 해방풍의 뿌리 추출물이 염증성 사이토카인 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 세포 내 농도에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 PS-LPS 주사 또는 결찰(Ligature)로 유도한 치주염 동물 모델에서 해방풍의 뿌리 추출물이 치조골의 골밀도 및 시멘트질-에나멜 접합부와 치조골 능선 간(Cementum-enamel junction to alveolar bone crest, CEJ-ABC) 거리에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 PS-LPS 주사 또는 결찰(Ligature)로 유도한 치주염 동물 모델에서 해방풍의 잇 추출물이 치조골의 골밀도 및 시멘트질-에나멜 접합부와 치조골 능선 간(Cementum-enamel junction to alveolar bone crest, CEJ-ABC) 거리에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 PS-LPS 주사 또는 결찰(Ligature)로 유도한 치주염 동물 모델에서 해방풍의 뿌리 및 잇 추출물이 염증성 침윤에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 연구자들은 치주염으로 인한 치주조직의 손실을 막고, 치주조직의 재생을 촉진할 수 있는 물질을 연구하던 중, 해방풍(*Glehnia littoralis*) 추출물이 높은 항산화 활성으로 치주조직의 손상과 치주조직의 염증을 억제하여 치주염을 예방, 치료할 뿐만 아니라 치조골(alveolar bone)의 형성을 유도하는 골형성 촉진 활성이 있는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0028] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 여기서 소개되는 내용은 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0029] <실시예 1. 해방풍 추출물의 제조>

[0030] 해방풍(*Glehnia littoralis* F.Schmidt ex Miq.)은 경상북도 울진군 농업기술센터로부터 제공받았다. 해방풍은 잇 및 뿌리를 각각 분리하여 45℃에서 24시간 건조하였으며, 분쇄기(SHMF-3500TG, HANIL Electric Co., Ltd, Korea)로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

[0031] 상기 건조 및 분쇄한 해방풍의 잇 및 뿌리 분말 각 40g을 30, 50, 70, 95%(w/w) 에탄올 600ml을 첨가하고 80℃에서 4시간 동안 환류냉각추출기(MS-EAMSD 9704-06, MISUNG SCIENTIFIC CO., LTD, Korea)를 이용하여 추출하였고, 각각의 추출물은 불순물을 제거하기 위해 여과지(Whatman No. 4)를 이용하여 여과하였다. 여과된 용액은 감압농축기(Model N-1200AV-W, Eylea Co., Tokyo, Japan)로 농축한 다음, 동결건조기(ORD-FDCF-12012, Operon Co., Ltd., Korea)로 건조하여 -70℃ 이하의 압소에 보관하면서 이후 실험에 사용하였다. 상기 에탄올 수용액 추출물 중 70, 95%(w/w) 에탄올의 치주골 형성 효과가 가장 좋았으며, 이후 70%(w/w) 에탄올 추출물을 이용하여 실험에 사용하였다.

[0032] <실시예 2. 인간 치주인대세포에서 해방풍 추출물의 염증성 사이토카인 및 전염증성 매개체에 미치는 효과 확인>

- [0033] 해방풍 추출물이 치주염이 유도된 인간 치주인대세포에서 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- α 및 전염증성 매개체 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0034] 구강 세균 중 대표적인 치주질환 병원균(periodontal pathogens)에는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*), 아그레가티박터 액티노미세템코미탄스(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) 등이 있으며, 이들 미생물이 형성하는 lipopolysaccharides (LPS) 내 독소 혹은 대사산물은 조직과 면역세포에서부터 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 분비를 증가시킨다. 이러한 전염증성 사이토카인은 치주조직을 손상시키며 매트릭스 메탈로프로테나제(Matrix metalloproteinase, MMP)와 같은 효소 활성을 유도함으로써 결합조직 파괴하여 치주조직을 손상시킨다. 이에 따라 인간 치주인대세포에 PS-LPS(Lipopolysaccharides from *P. gingivalis*)로 염증을 유도하고 해방풍 추출물의 효과를 확인하였다.
- [0035] 인간 치주인대세포는 경북대학교 치과대학에서 기증받아 사용하였다. 인간 치주인대 (Human preiodontal ligament, HPDL) 세포를 3×10^3 cell/mL의 농도로 96-well plate에 시딩하고, 37°C의 온도, 5% CO₂ 배양조건 하에 24시간 배양하였다. 이후, 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물을 각각 100 및 200 μ g/mL의 농도로 처리하고 37°C의 온도, 5% CO₂ 배양조건하에 6시간 배양하였다. 이후 PG-LPS로 6시간 자극한 다음, 세포를 트립신(Trypsin)-EDTA 처리하여 회수하고 총 RNA를 트리졸(TRIZole: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 분리한 다음, 역전사 반응으로 cDNA를 합성하고(All-inOne first-Strand cDNA Synthesis SuperMix), 합성된 cDNA를 qRT-PCR에 대한 주형으로 사용하였으며, 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- α 에 해당하는 유전자를 증폭하였다.
- [0036] 해당 유전자에 대한 해리곡선분석(dissociation curve analysis)을 시행한 결과, 각각 단일 피크를 확인하였으며, 각 목표 유전자에 대한 발현량은 증폭 측정하여 정량화한 후 GAPDH에 대하여 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용해 보정하고 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.
- [0037] 도 1 및 도 2에서 보는 바와 같이, 해방풍의 뿌리 및 잎 추출물은 PG-LPS로 염증 유도된 인간 치주인대 세포에서 증가된 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- α 및 전염증성 매개체 iNOS와 COX-2의 발현이 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물에 의하여 농도 의존적으로 억제되었다.
- [0038] <실시예 3. 해방풍 추출물의 인간 치주인대세포에서 조골분화 유도 효과 확인>
- [0039] 초기 치은염이 만성염증으로 장기화되면 잇몸뿐만 아니라 잇몸 아래 치조골까지 침식하게 되며, 일단 치조골이 소실되면 원래 상태로의 회복이 어렵고, 치주염이 진행될수록 치조골 소실이 증가하게 된다. 골세포의 활성 지표로 활용되는 ALP (alkaline phosphatase) 및 OCN(osteocalcin)의 발현은 인간 치주인대세포의 치조골 형성에 중요한 요인으로 알려져 있으며, 이에 따라 치주염으로 손실된 골세포 분화 활성지표의 회복은 치주염 치료에 또 하나의 중요한 치료전략이 되고 있다. 따라서 PG-LPS로 자극된 인간 치주인대세포에서 해방풍 추출물에 의한 조골분화능을 평가하여 인간 치주인대세포의 재생에 미치는 영향을 평가하였다.
- [0040] 먼저, 인간 치주인대 (Human preiodontal ligament, HPDL) 세포를 5×10^2 cell/mL의 농도로 24-well plate에 37°C의 온도, 5% CO₂ 배양조건하에 24시간 배양하였다. 그 후 배양액을 제거한 다음, 10% fetal bovine serum, 100U/ml penicilline, 100 μ g/mL streptomycin, 50 μ g/mL ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate가 함유된 α -MEM으로 배양액을 교체하여 조골분화를 유도하였다. 조골분화 유도와 함께 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물을 0, 50, 150, 100, 및 200 μ g/mL의 농도로 각각 처리한 다음, PG-LPS (1 μ g/mL)을 처리 후 37°C의 온도, 5% CO₂ 배양조건하에 14일간 배양하였다. 배양 종료 후 세포를 4 % formaldehyde로 30분 동안 고정하고 0.1 % Alizarin Red S (pH 4.3)로 1시간 염색 후 실온에서 30 분 동안 탈이온수로 세척한 다음, 현미경을 통해 광물화된 결절(mineralized nodules) 형성을 확인 후 10% 세틸피리디늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride) 400 μ L로 녹여 흡광 (570nm)을 측정하여 도 3에 나타내었다.
- [0041] 도 3에서 보는 바와 같이, PG-LPS로 인해 인간 치주인대 세포에서 광물화된 결절 형성이 현저히 저해되었으며, 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물 모두 농도 의존적으로, 광물화된 결절을 증가시켰다.
- [0042] 또한, 골세포의 활성 지표로 활용되는 ALP (alkaline phosphatase) 및 OCN(osteocalcin)의 발현을 상기 실시예 2의 방법과 동일한 방법으로 확인하고 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서 보는 바와 같이, PG-LPS에 의하여 인간 치주인대 세포에서 조골분화 유도 및 뼈의 광물화를 조절하는 ALP 및 OCN의 발현이 현저히 억제되었으

며, 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물 모두 농도 의존적으로 ALP 및 OCN의 발현을 증가시켰다. 즉, 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물은 인간 치주인대세포에서 조골분화 유도 특이적 유전자 수준을 증가시켰으며, 광물화(mineralization)를 직접적으로 유도하는 것을 확인하였다.

[0043] <실시예 3. 인간 치주인대세포에서 해방풍 추출물의 항산화 효과 확인>

[0044] 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성은 치주 조직을 손상시켜 치주질환을 유발하거나 진행 중인 치주질환을 악화시킨다. 따라서 항산화 작용을 통한 산화적 스트레스의 생성 억제는 치주염 개선의 중요 작용기전으로 알려져 있다. 이에 따라 PG-LPS로 자극된 인간 치주인대 세포에서 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물이 항산화 효소인 초과산화물 불균등화효소(Superoxide Dismutase, SOD) 및 카탈라아제(Catalase, CAT)의 활성에 미치는 영향을 평가하였다.

[0045] 먼저, 인간 치주인대 (Human preiodontal ligament, HPDL) 세포를 5×10^2 cell/mL의 농도로 24-well plate에 37℃의 온도, 5% CO₂ 배양조건하에 24시간 배양하였다. 그 후, 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물을 0, 50, 150, 100, 및 200 µg/mL의 농도로 각각 처리한 다음, PG-LPS (1 µg/mL)을 처리하고 37℃의 온도, 5% CO₂ 배양조건하 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 37℃에서 30분간 10 µM 2', 7' -dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) 염색을 실시했다. 방출파장 513nm과 여기파장 488nm 조건으로 공초점 현미경(confocal microscopy)으로 ROS를 관찰하고, 형광광도계(Synergy, BIO TEK, US)로 형광도를 측정하여 도 5에 나타내었다.

[0046] 도 5에서 보는 바와 같이, PG-LPS는 인간 치주인대세포에서 ROS의 수준을 현저히 증가시켰다. 또한 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물은 PG-LPS에 의하여 증가된 ROS 수준을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 특히 해방풍 뿌리 추출물의 경우, 200 µg/mL의 농도에서 PG-LPS를 처리하기 전의 수준까지 인간 ROS의 수준을 감소시켰다.

[0047] 상기 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물을 농도별로 처리하고, PG-LPS로 유도된 인간 치주인대세포에서 항산화 효소 SOD 및 CAT의 발현을 실시예 2와 동일한 방법으로 분석하고 그 결과를 역시 도 6에 나타내었다. 도 6에서 보는 바와 같이, 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물은 인간 치주인대세포에서 모두 PG-LPS로 인해 생성된 ROS의 수준을 하향조절 하였으며, 손실된 항산화 효소를 회복시키는 결과를 나타내었다.

[0048] <실시예 4. 해방풍 추출물의 항균 효과 확인>

[0049] 치주질환의 예방과 치주질환의 진행을 억제하기 위해서는 구강 세균을 제거하는 것이 중요하다. 따라서 치주질환을 일으키는 원인 세균 중 대표적인 치주질환의 원인균인 *P. gingivalis*에 대하여 항균력을 측정하는 기초적인 지표로 시험관 내 세균 감수성 검사에서 미생물의 번식을 억제할 수 있는 해방풍 추출물의 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 및 병원균의 양을 적어도 99.9% 이상 감소시키는 해방풍 추출물의 최소 살균 농도(minimal bactericidal concentration, MBC)를 측정하여 해방풍 추출물의 항균효과를 탐색하였다. 먼저 미생물의 번식을 억제할 수 있는 해방풍 추출물의 최저농도를 측정하기 위하여 배양 접시에 *P. gingivalis* 균주를 5×10^2 cell/mL의 농도로 24-well plate에 접종하고, 해방풍 잎 및 뿌리 추출물을 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 및 320 µg/ml 농도로 처리한 후, 37℃의 온도, 5% CO₂ 배양조건하에 24시간 배양하고 600 nm에서 흡광도를 측정하여 도 7에 나타내었다. 도 7에서 보는 바와 같이, 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물은 치주 질환의 원인균인 *P. gingivalis*에 대한 농도 의존적으로 항균효과를 나타내었으며, 해방풍 잎 및 뿌리 추출물 모두에서 *P. gingivalis* 균주에 대하여 2.5 µg/ml 농도에서 유의한 항균효과를 나타내었다. 상기 실험을 통하여 *P. gingivalis* 균주에 대하여 항균 활성이 현저한 해방풍 추출물 농도 160 내지 320 µg/ml에서 99.9% 이상 감소시키는 해방풍 추출물의 최소억제농도를 확인한 결과, 도 8에서 보는 바와 같이, 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물 모두에서 240 µg/ml 농도에서 *P. gingivalis* 균를 99.9% 이상 감소시키는 것을 확인하였다.

[0051] <실시예 5. 치주염 동물 모델에서 해방풍 추출물의 염증성 사이토카인에 미치는 효과 확인>

[0052] 상기 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물이 결찰(ligature) 유발 치주염 모델 및 PG-LPS 유도 치주염 모델 랫드의 혈청에서 염증성 사이토카인 농도에 영향을 줄 수 있는지 확인하였다. 결찰(ligature) 유발 치주염 모델은 6주령된 수컷 SD 랫드를 졸레틴과 케타민을 1:2 비율 (1.5ml/kg)로 섞어 복강내 주사하여 마취시킨 후, 아래턱 왼쪽 제2대구치 치경부에 silk 봉합사 (0.5mm)를 결찰시켜 치주염을 유발하였다. 치실을 묶지 않은 하악 오른쪽 제2대구치를 대조군으로 설정하였다. PG-LPS 유도 치주염 모델은 6주령된 수컷 SD 랫드에 25G 멸균 피하 주사 바늘과

1mL 주사기를 사용하여 멸균 식염수에 40 μ L의 Pg-LPS를 근위-구개 쪽에 있는 치은연하 조직에 주사하였다. 치주염을 유발시킨 날을 0일로 하였으며, 결찰을 유발한 날부터 2주 후에 쥐의 꼬리로부터 혈액을 수집하였다. 시험기간 동안 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물을 0, 50, 100, 250 mg/kg의 농도로 1일 1회씩 경구투여 하였으며, 대조군에는 vehicle (DW)만 경구투여하였다. 2주 후 수집한 혈액으로부터 혈청을 분리하고, IL-6, TNF- α ELISA kit(Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 검량선을 작성하고 각 시료의 흡광도 값을 대입하여 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 농도(pg/mL)를 도 9 및 도 10에 나타내었다.

[0053] 도 9 및 도 10에서 보는 바와 같이, 결찰 유발 치주염 모델 및 PG-LPS 유도 치주염 모델 랫드 모두에서 치주염 유발에 의하여 염증성 사이토카인 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 농도가 증가하였으며, 이러한 증가는 해방풍 뿌리 및 잎 추출물에 농도의존적으로 감소하였다.

[0055] <실시예 6. 치주염 동물 모델에서 해방풍 추출물의 골밀도 및 CEJ-ABC 거리에 미치는 효과 확인>

[0056] 상기 결찰 유발 치주염 모델 및 PG-LPS 유도 치주염 모델 랫드 모델에서 치주염 유발 부위 치조골의 골밀도 (bone mineral density) 및 백악-법랑질 경계면 (CEJ: Cemento-Enamel Junction)에서 치조골 최상부 (ABC:Alveolar bone crest)까지의 거리(CEJ-ABC)에 해방풍 추출물이 미치는 효과를 측정하였다. 골밀도는 동물용 CT (Micro cat II, Simense, USA)장치를 이용하여 X선 조사 (60 kvp, 400 uA)를 통하여 조직의 3차원 입체영상을 얻은 후, AmiraR software (Konarad-Zuse-Zentrum fur Informationstechnik Berlin, Germany)를 이용하여 골밀도를 측정하여 도 11 및 도 12에 나타내었다.

[0057] 도 11 및 도 12에서 보는 바와 같이, 결찰 유발 치주염 모델 및 PG-LPS 유도 치주염 모델 랫드 모두에서 치주염 유발에 의하여 치조골의 골밀도가 급격히 감소하였으며, 해방풍 잎 및 뿌리 추출물 처리에 의하여 치주염에 의하여 감소한 골밀도가 농도 의존적으로 회복되었다.

[0058] 상기 이미지 분석을 이용하여 PG-LPS 유도 치주염 모델 랫드의 백악-법랑질 경계면 (CEJ: Cemento-Enamel Junction)에서 치조골 최상부 (ABC:Alveolar bone crest)까지의 거리(CEJ-ABC)를 측정하여 역시 도 11 및 도 12에 나타내었다. 도 11 및 도 12에서 보는 바와 같이, 치주염 유발에 의하여 CEJ-ABC 거리가 급격히 증가하였으며, 이는 해방풍 잎 추출물 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소하여 해방풍 뿌리 또는 잎 추출물이 치조골 흡수 억제 효과를 갖는 점을 확인하였다.

[0060] <실시예 7. 치주염 동물 모델에서 해방풍 추출물의 염증세포의 침윤 면적에 미치는 효과 확인>

[0061] 상기 결찰 유발 치주염 모델 및 PG-LPS 유도 치주염 모델 랫드의 치주염 유발 부위에서 염증세포의 침윤 면적을 확인하였다. 상기 실시예 6의 동물용 얻어진 치주조직에 H&E 염색을 실시하여 염증세포의 침윤 면적을 측정하고 이를 도 13에 나타내었다.

[0062] 도 13에서 보는 바와 같이, 결찰 유발 치주염 모델 및 PG-LPS 유도 치주염 모델 랫드 모두에서 치주염 유발에 의하여 염증세포의 침윤 면적이 급격히 증가하였으며, 해방풍 잎 또는 뿌리 추출물 처리에 의해 모두 농도의존적으로 감소하였다.

[0064] 상기와 같이, 해방풍 잎 추출물은 치주염에서 증가하는 염증성 사이토카인의 발현 및 농도를 억제하였으며, ALP(alkaline phosphatase)활성을 증가시킴으로써 조골세포 분화 촉진을 확인하였다. 또한 해방풍 잎 추출물은 치조골의 골밀도를 증가시키고 백악-법랑질 경계면 (CEJ: Cemento-Enamel Junction)에서 치조골 최상부 (ABC:Alveolar bone crest)까지의 거리(CEJ-ABC)를 감소시키는 것을 확인하였으며, 치주염 유발에 의하여 증가한 염증세포의 침윤 면적을 감소시켜 치주염 조절에 중요한 역할을 할 것이라 판단된다.

[0066] <제제예 1. 정제의 제조>

[0067] 본 발명 해방풍 잎 또는 뿌리 추출물 20g을 각각 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0068] <제제예 2. 파우더의 제조>

[0069] 본 발명 해방풍 잎 또는 뿌리 추출물 20g에 텍스트린 50g과 혼합한 후 통상의 파우더 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 스프레이 드라이하여 파우더를 제조하였다.

[0070] <제제예 3. 캡슐제의 제조>

[0071] 본 발명 해방풍 잎 또는 뿌리 추출물 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0072] <제제예 4. 건강기능식품의 제조>

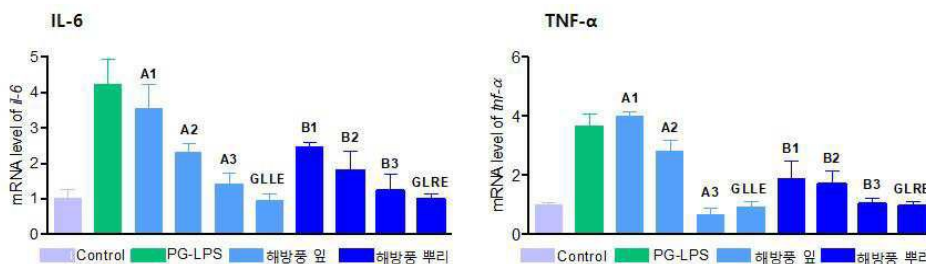
[0073] 본 발명 해방풍 잎 또는 뿌리 추출물 20g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산 마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0074] <제제예 5. 건강기능성 음료의 제조>

[0075] 본 발명 해방풍 잎 또는 뿌리 추출물 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

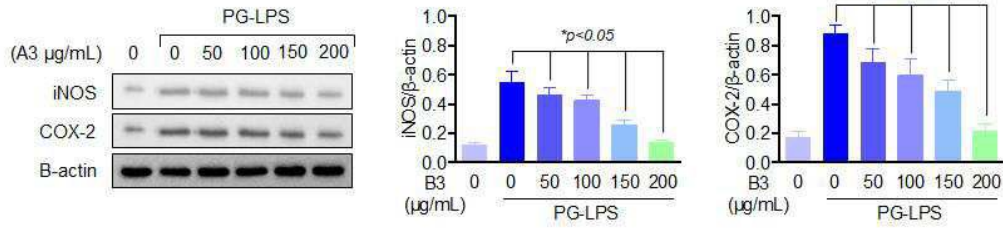
도면

도면1

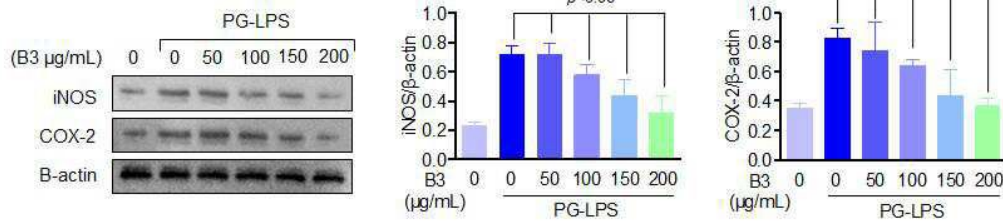


도면2

해방풍 잎

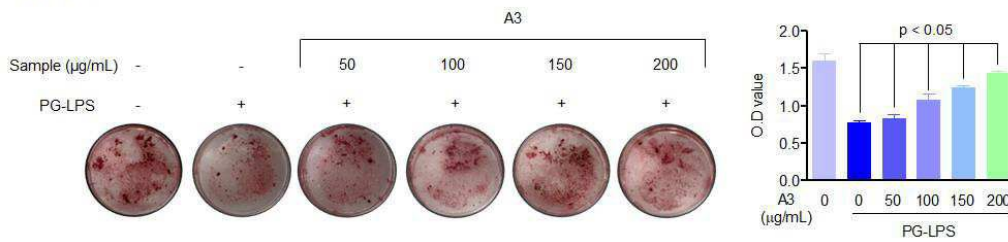


해방풍 뿌리

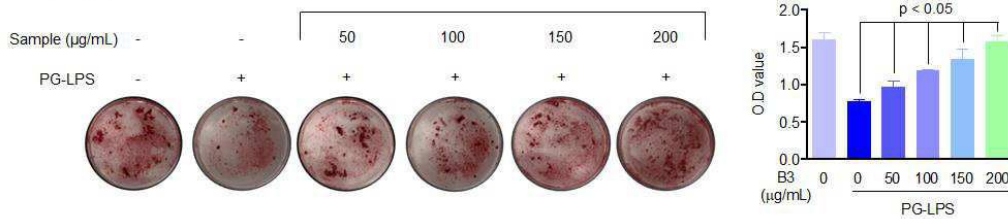


도면3

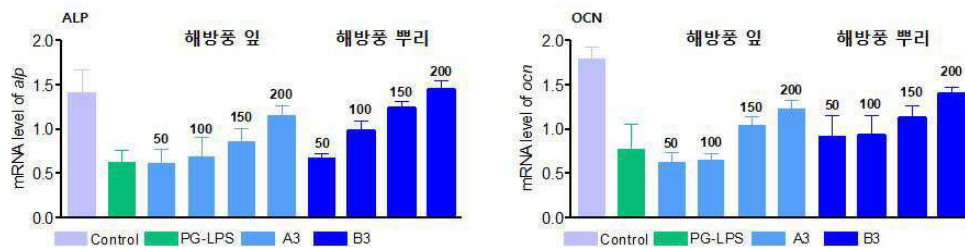
해방풍 잎



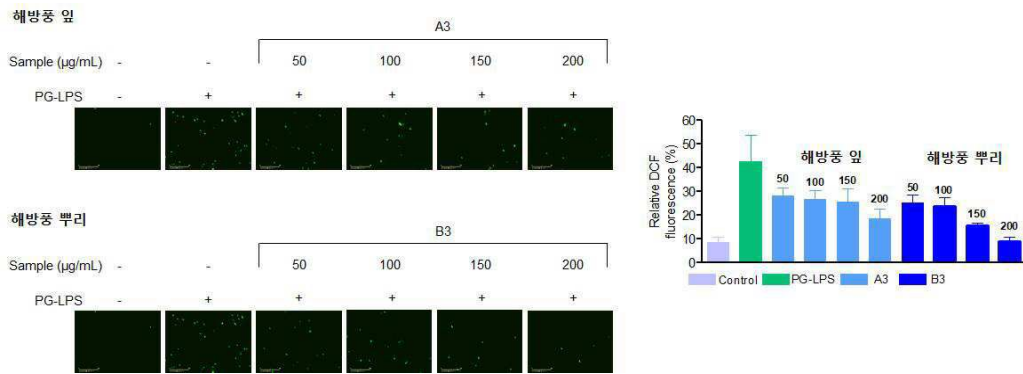
해방풍 뿌리



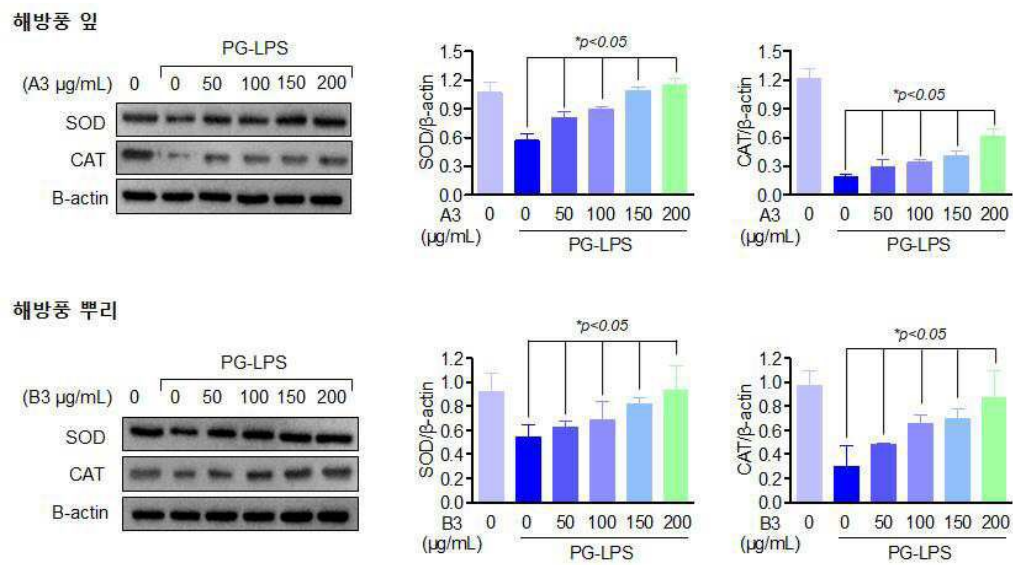
도면4



도면5

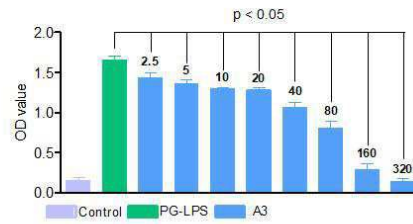
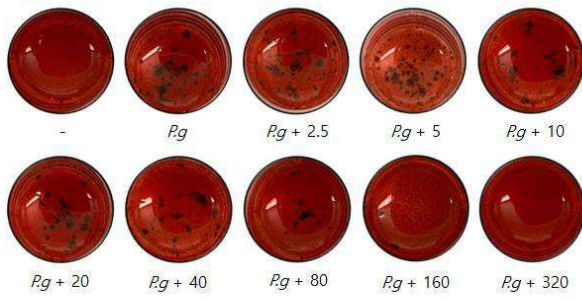


도면6

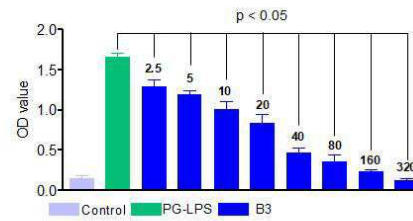
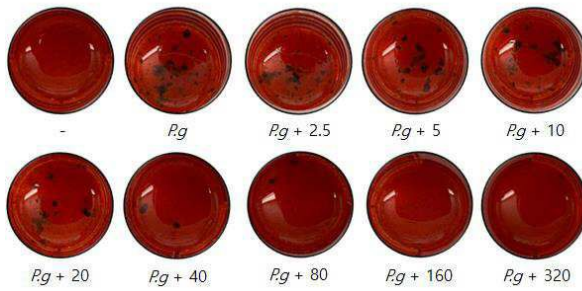


도면7

해방풍 앞

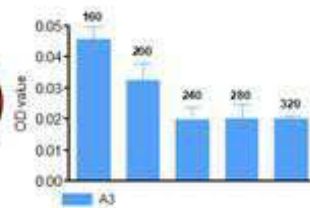


해방풍 뿌리

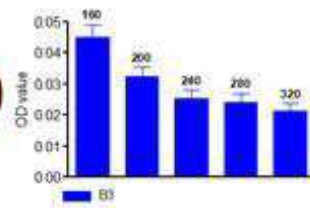


도면8

해방풍 앞



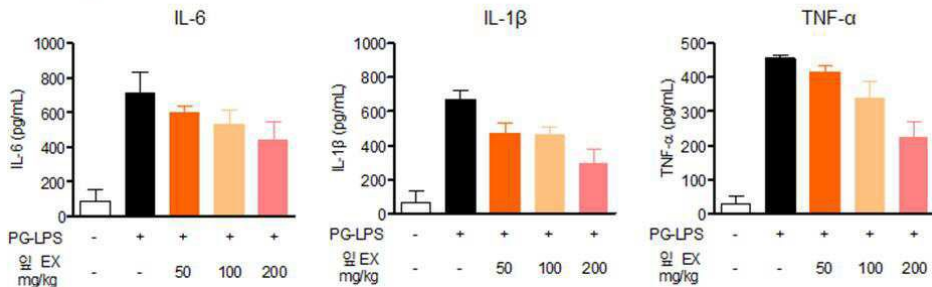
해방풍 뿌리



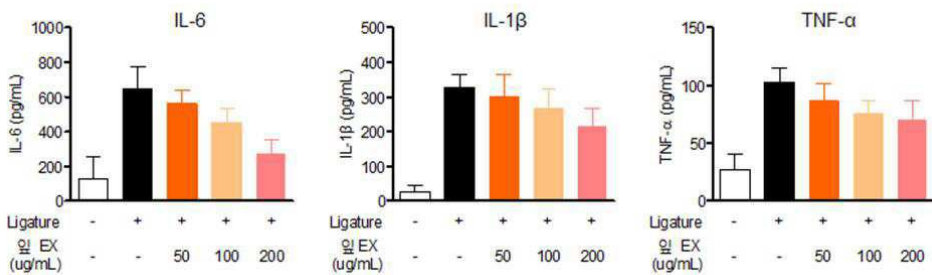
도면9

해방풍 잎

PG-LPS injection 치주염 유도



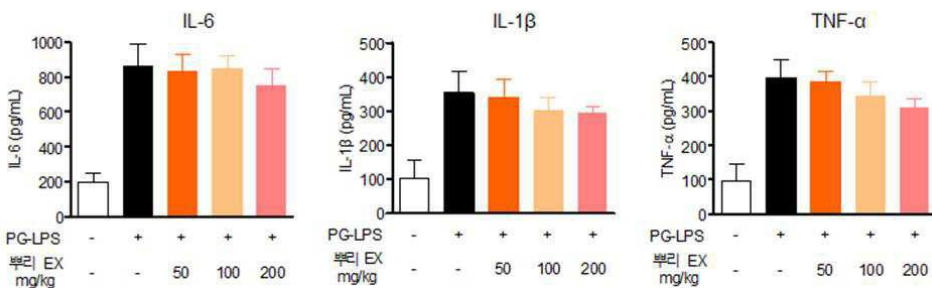
Ligature 치주염 유도



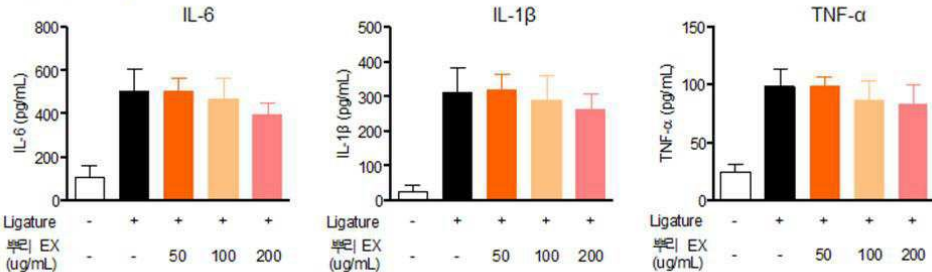
도면10

해방풍 뿌리

PG-LPS injection 치주염 유도



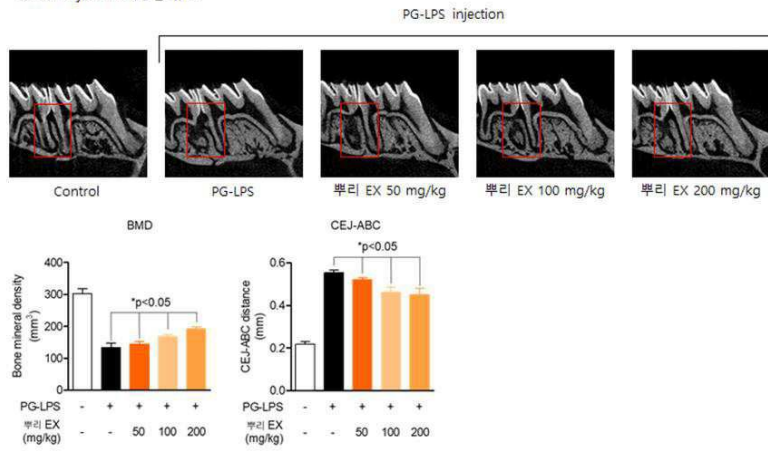
Ligature 치주염 유도



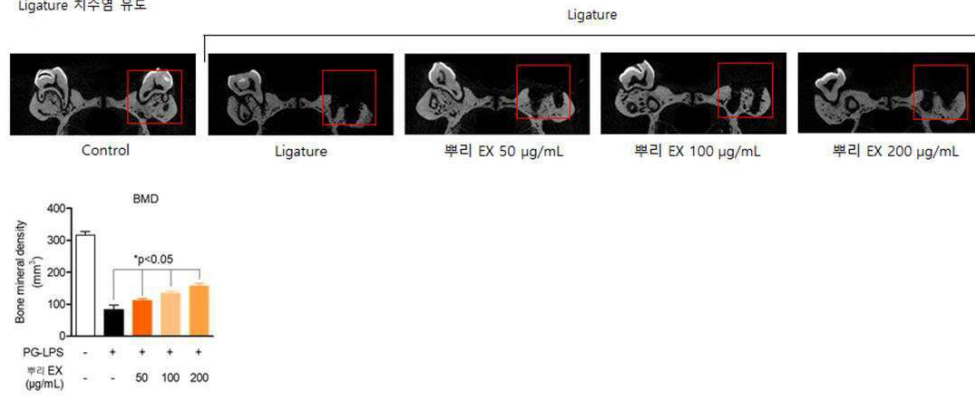
도면11

해방풍 뿌리

PG-LPS injection 치주염 유도



Ligature 치주염 유도

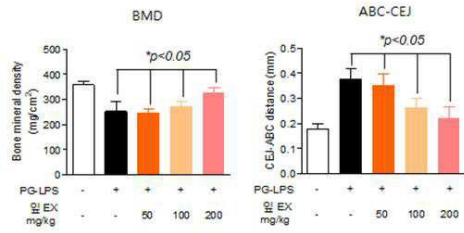
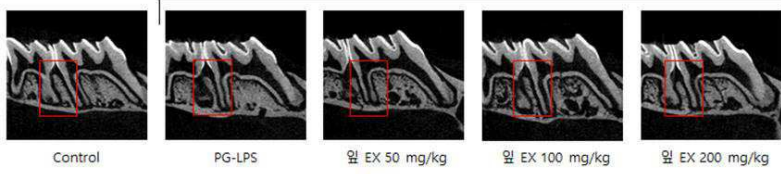


도면12

해방풍 율

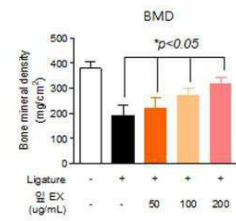
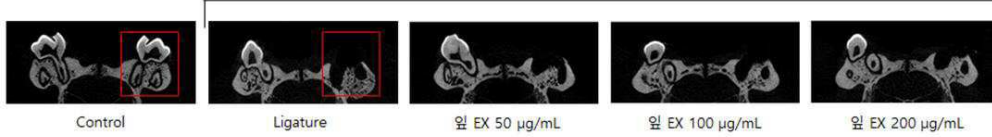
PG-LPS injection 치주염 유도

PG-LPS injection



Ligature 치주염 유도

Ligature

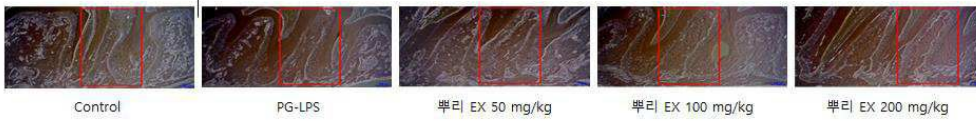


도면13

해방풍 뿌리

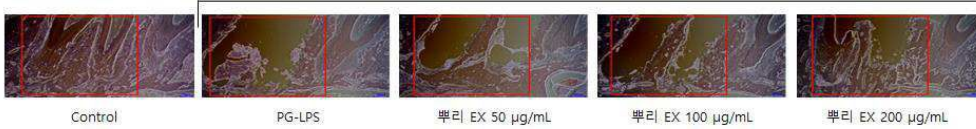
PG-LPS injection 치주염 유도

PG-LPS



Ligature 치주염 유도

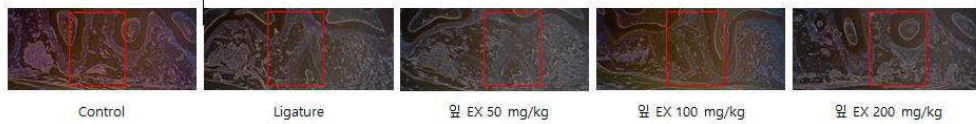
Ligature



해방풍 잎

PG-LPS injection 치주염 유도

PG-LPS



Ligature 치주염 유도

Ligature

