



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0014356

(43) 공개일자 2016년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/28 (2006.01) A61P 1/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0096473

(22) 출원일자 2014년07월29일

심사청구일자 2014년07월29일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이태후

서울특별시 강남구 논현로 807 (신사동)

손홍민

경기도 하남시 대성로 271 (덕풍동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 7 항

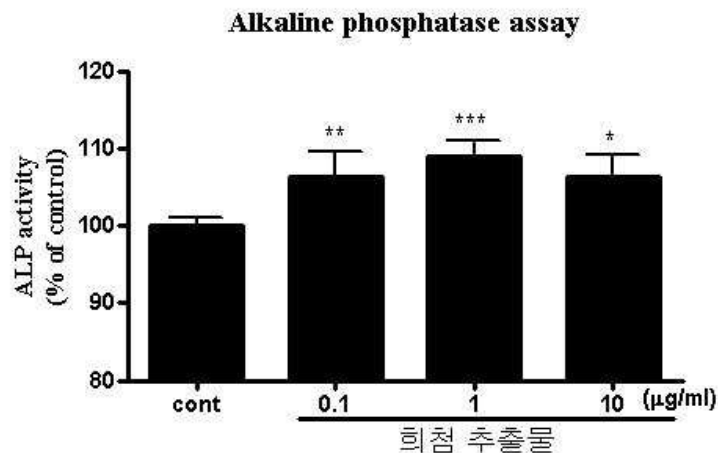
(54) 발명의 명칭 희침 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 희침 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 조성물을 제공한다.

본 발명의 희침 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 치주 세포의 분화를 유도하고, 골의 광화작용(mineralization)을 증진하며, 치조골의 재생하고, 항염증 및 항균 효과를 촉진함으로써 치주 질환 예방 및 치료에 효과적이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이돈길

경기도 용인시 수지구 성북1로164번길 13, 203동
1103호 (성북동, 성북힐스테이트2차)

박상용

경기도 수원시 영통구 광고중앙로 247, 3201동 90
7호 (하동, 휴먼시아아파트)

박재희

서울특별시 송파구 풍성로14길 15-1, 102호 (풍납
동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 N019400021

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원(Kiat)

연구사업명 산업융합기반구축사업

연구과제명 천연물 의약·소재 개발 및 표준화 지원 사업

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2018.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

회침 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 회침은 털진득찰(*Siegesbeckia pubescens Makino*) 또는 진득찰(*Siegesbeckia glabrescenes Makino*)인 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 치주 질환은 치은염(gingivitis), 치주염(periodontal inflammation), 치조골 파손(alveolar bone breakage) 또는 치조골형성장애(alveolar bone osteodystrophy) 중 선택되는 어느 하나인 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 치주 질환의 예방 및 치료는 광화 작용 증진, 항균 활성 또는 치조골에서의 항염증 효과 중 선택되는 어느 하나 이상에 의한 예방 및 치료인 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1~4의 알코올, 탄소수 1~4의 알코올 수용액 중에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출한 것인 약학 조성물.

청구항 6

회침 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주 질환의 예방 및 개선을 위한 경구용 조성물.

청구항 7

회침 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 치주 질환을 예방 또는 치료하는 회침 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 치아는 구조상 인체내 가장 단단한 경조직으로서 치조골(alveolar bone)에 지지되고 있다. 치조골은 악골의 기저골에 단단히 부착되어 있고, 치근에 바로 인접한 2-3 mm 부분을 치주골이라 칭하기도 하나, 통상 치조골이라 함은 상기 치주골을 포함한 경조직 모두를 지칭한다. 치조골은 연령이 증가함에 따라 점차 낮아지면서 치아 뿌리가 노출되는 현상을 보이기도 한다. 또한, 치아를 상실하면 치조골도 점차 소실되는 상관관계를 갖는다. 이러한 구강내 치조골은 평균 0.2mm 정도 두께의 치주인대(periodontal ligament)라는 미분화 간엽세포가 존재하는 층에 의해서 치아를 부착하고 지지하면서, 치아가 음식의 저작시 완충 작용할 수 있도록 치조골에 힘을 분산시키기도 하며, 치아의 감각을 치주인대를 통하여 치조골에 전달하기도 한다. 또한, 치주인대는 미분화 간엽세포가 존재하는 층으로 계속하여 전체섬유의 구조와 기능을 소실시키지 않고, 골개조를 계속하면서, 압력에 적응하도록 구조화되어있다. 치주인대 내 미분화 간엽세포는 인접조직으로 이동하는데, 치조골 쪽으로 이동하여 치조골개조를 담당하며, 다른 한편으로는 치아 쪽으로 이동하여 교원섬유를 만들어내어 치아를 더욱 단단히 붙들 수 있도록 지속적으로 개조된다. 이러한 치아는 치조골에서 조골세포에 의한 골형성과 파골세포에 의한 골흡수가 함께 일어나, 지속적인 리모델링(remodeling)을 통해 균형을 유지하고 있다.

[0003] 치주질환(Periodontal disease)은 치아를 지지하는 치은과 치골에 영향을 미치는 질환으로 치은염(gingivitis)

과 치주염(periodontitis) 등을 포함한다. 치은염은 잇몸의 연조직에 염증이 생기는 초기 치주질환으로 비교적 증상이 가볍고 회복이 가역적인 상태이다. 치주염은 치은염이 치료되지 않고 염증이 잇몸과 치골 주변까지 진행된 경우로 세균의 독소에 의해 자극된 만성 염증반응이 진전되면 잇몸과 치아 사이에서 분리되어 감염된 치주낭(periodontal pocket)이 형성되고, 치주염이 심할수록 치주낭의 깊이가 깊어져서 결국, 치주인대에 염증이 생기게 되고 골소실이 일어난다. 또한, 치조골에서 조골세포에 의한 골형성과 파골세포에 의한 골흡수의 대사가 여러 가지 요인에 의해 골흡수가 골형성을 초과하여 골량이 한계 이하로 감소하면 치조골다공증과 같은 치조골형성장애가 발생한다.

[0004]

치주질환의 치료는 환자의 개선된 구강위생의 확립, 비외과적 혹은 외과적인 치석제거술, 치근활택술, 치은소파술과 신부착을 응용한 치주 조직의 재생술들이 이용되어져 왔다. 그러나 이런 외과적인 치료 방법은 치료가 번거로우며 효과적인 치료가 어렵고 또한 병의 예방보다는 병이 어느 정도 진행되었을 경우 행하는 치료에 국한되어 있어, 치료를 하지 않을 경우 대부분이 만성으로 진행되는 경우가 대부분이다. 또한, 부가적인 치료로 전신적인 항생제의 복용과 국소 서방형 제제가 사용되어 왔으나, 불필요한 부위에도 약물이 너무 많이 전달되어 그로 인한 부작용과 최근 사용되는 항생제에 대한 내성을 나타내는 치주질환균이 분리된 예가 보고되고 있어 심각한 문제점을 안고 있다. 게다가, 치주 질환은 일반적인 염증, 관절염 등과 다르게 치조골의 손실, 염증, 진지발리스와 같은 치주염균에 의한 복합적인 유발원인을 가지는 특징이 있어, 항균 및 항염증, 조골세포의 골세포로의 촉진 등의 복합적 치료 방법이 필요하나, 이러한 치료를 위한 약물 내지 치료법이 개발되어 있지 않다.

[0005]

이러한 배경하에, 치주질환을 효과적으로 치료할 수 있는 약물 내지 치료제에 대한 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006]

(특허문헌 0001) KR 10-2013-0128953, 2013.11.27

(특허문헌 0002) KR 10-1354923, 2014.01.17

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

본 발명은 회침 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주 질환의 예방 또는 치료를 위한 조성물을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명은 회침 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주 질환의 예방 및 치료를 위한 경구용 조성물을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명은 회침 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주 질환의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능 식품을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008]

본 발명자들은 치주 질환에 대한 치료 및 예방 효과를 갖는 천연 약재 조성물을 개발하기 위하여 연구를 진행하던 중 회침이 치주 질환 치료 및 예방에 현저한 효과를 갖는다는 사실을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0009]

본 발명의 추출물은 부작용이 없으며 안전한 천연 제재인 회침을 이용한 치주 질환 예방 및 치료제이다.

[0010]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 회침 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011]

본 발명의 회침 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 알칼리성 포스파타아제 상승 조절에 따른 광화작용 증진, 항균, 치조골에서의 항염증 효과 등을 통해 치주 질환 예방 및 치료 효과를 가진다.

[0012]

본 발명에 있어서, 회침은 털진득찰(*Siegesbeckia pubescens* Makino) 또는 진득찰(*Siegesbeckia glabrescens* Makino)의 지상부를 사용하여 제조한 것으로, 구입하거나 직접 채취한 것일 수 있다. 본 발명의 일실시양태에 따른 회침은 진득찰(*Siegesbeckia glabrescens* Makino)이다. 회침은 한국, 일본 중국 등에 널리 분포하고 있어 저비용으로 원료확보가 용이하다. 회침의 외관적 특징으로써, 지상부의 줄기가 네모졌고 가지가 갈라졌으며 길이 30cm에서 60cm, 지름 0.3cm에서 1cm이다. 바깥 면은 황갈색이고 흰색의 털이 많이 나있다. 껍질 면은 흰색

과 녹색이고 속은 넓고 흰색이며 비어있다. 앞은 마주나있으며 쭈그러져 있으나 펴보면 달걀모양 또는 끝은 삼각꼴의 달걀모양이고 끝은 뾰족하다. 윗면은 연한 녹색을 띄며 3줄의 엽맥이 뚜렷하고 아랫면의 엽맥 위에는 털이 촘촘하게 나있다.

[0013] 본 발명에 있어서, 치주 질환은 치은염(gingivitis), 치주염(periodontal inflammation), 치조골 파손(alveolar bone breakage), 또는 치조골형성장애(alveolar bone osteodystrophy)를 포함하며, 바람직하게는 치주염이다. 또한, 상기 치조골 형성 장애는 치조골다공증(alveolar bone osteoporosis), 치조골연화증(alveolar bone osteomalacia), 또는 치조골감소증(alveolar bone osteopenia)를 포함한다.

[0014] 본 발명에 있어서, 치주 질환 예방 또는 치료는 광화작용 증진, 항균 작용, 치조골에서의 항염증 효과에 의한 것일 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 추출 방법은 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있다. 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 이러한 농축에 의해 액상 또는 분말 형태로 희침 추출물을 추출한다. 희침 추출물은 물, 탄소수 1~4의 알코올, 탄소수 1~4의 알코올 수용액으로 이루어진 군으로부터 선택된 추출용매로 추출하여 얻어질 수 있다. 바람직하게는 상기 추출용매는 에탄올 수용액을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게 40 ~ 90% 에탄올 수용액을 사용할 수 있다. 상기 에탄올 수용액을 이용한 추출은 실온에서 1일 내지 7일 동안, 바람직하게는 3일 동안 수행될 수 있다. 또한, 필요에 따라 차광 및/또는 가온(예를 들어, 온침) 조건 하에서 수행될 수도 있다. 상기 추출용매의 양은 희침 건조 중량의 2 내지 15 배로 한다. 본 발명의 희침 추출물은 희침 추출물 총중량에 대하여 0.1중량% 내지 95중량%의 함량을 가진다.

[0016] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알릴리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 희침 추출물 100중량부에 대해 0.1 ~ 90중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 즉, 본 발명의 약학 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 희침 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0020] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 희침 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 500mg/kg 이고, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0021] 본 발명은 희침 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주 질환의 예방 및 개선을 위한 경구용 조성물을 제공한다.

[0022] 본 명세서에서, "경구용 조성물"은 광화작용 증진, 항균, 치조골에서의 항염증 효과를 가지는 경구로 투입되는 조성물이다. 본 발명의 경구용 조성물에 있어서, 그 제형은 예컨대 필름, 치약, 구강양치용액, 연고제, 분무제,

드레싱용액, 도포제, 치실 또는 치주 포대로 제형화될 수 있다.

- [0023] 본 발명의 경구용 조성물은 회침 추출물을 유효 성분으로 함유하고, 이외에 습윤제, 기포제, 보존제, 감미제, 점증제, 수용성 폴리머, 향료 및 기타 성분 등을 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 첨가제는 회침 추출물 100중량부에 대해 0.1 ~ 90중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 습윤제는 경구용 조성물 내의 물의 증발을 억제하기 위한 성분으로서, 글리세린, 소르비톨액, 비결성소르비톨액, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등 다가 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0025] 상기 기포제는 조성물 내의 수용성 성분과 유용성 성분과의 유화 또는 가용화 효과를 지니며 구강 내에서 세정 효과를 갖도록 하는 성분으로서, 라우릴황산나트륨, N-라우로일살코실산나트륨, N-장쇄아실글루탐산염, 자당지방산에스테르, 폴리옥시에틸렌경화피마자유, 소르비탄 지방산에스테르, 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌코폴리머 등의 음이온 및 비이온 계면활성제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0026] 상기 보존제는 보존기간을 연장하기 위한 성분으로, 파라옥시아닐산향산메틸, 안식향산, 안식향산 나트륨 등을 사용할 수 있다.
- [0027] 상기 감미제 및/또는 향료는 제품 사용시 맛을 좋게 하고 뒷맛을 상쾌하게 하기 위한 성분으로서, 감미제로는 사카린나트륨, 아스파탐, 스테비오사이드, 감초산 등을 사용할 수 있고, 향료로는 페퍼민트, 스페아민트오일, 멘톨, 카르본, 아네톨, 오이게놀 등을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0028] 상기 점증제는 조성물 내의 물에 불용성인 무기분말성분과 액상성분을 결합시켜 시간에 따른 상분리를 방지하며, 조성물에 점성을 부여하는 성분으로서, 카르복시메틸셀룰로오스(CMC), 카라기난, 알긴산나트륨, 아라비아 고무, 잔탄검, 기타 검류 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0029] 수용성 폴리머는 하이드록시프로필 셀룰로오스(Hydroxypropyl cellulose-Klucel™), 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스(Hydroxypropyl methylcellulose), 하이드록시 에틸셀룰로오스(Hydroxy ethylcellulose), 에틸셀룰로오스(ethylcellulose), 카르복시메틸 셀룰로오스(Carboxymethylcellulose), 덱스트란(Dextran), 가우어검(gaur-gum), PVP(polyvinyl pyrrolidone), 펙틴(pectins), 녹말(starches), 젤라틴(gelatin), 카세인(casein), 알긴산 나트륨(sodium alginate), 폴리에틸렌 글리콜(polyethlyene glycol), 및 폴리비닐 글리콜(polyvinyl glycol) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0030] 기타 첨가제로서 pH 조절을 위한 구연산나트륨 등의 안정제, 충치 억제 기능을 지니는 불소제, 염화아연 등의 수렴제, 청색1호와 같은 식용색소를 사용할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 회침 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 회침 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0033] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 회침 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0034] 상기 외에 본 발명의 회침 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 회침 추출물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명의 회침 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 치주 세포의 분화를 유도하고, 골의 광화작용(mineralization)을 증진하며, 치조골의 재생하고, 항염증 및 항균 효과를 촉진함으로써 치주 질환 예방 및 치료에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 회침 추출물을 처리하여 조골세포분화 표식 인자인 알칼리성 포스파타아제의 활성(ALP)을 측정한 결과를 나타낸다.

도 2는 회침 추출물을 처리하여 광화작용 활성을 측정한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0038] <제조예> 회침 추출물의 제조

[0039] 회침(원산지: 중국산, 구입처: 한약재시장(<http://www.hanyakjae.net/>))을 흐르는 물에 세척하여 불순물을 제거한 후, 회침 600 g에 70 % 에탄올 수용액 6 L을 가하여 3 일간 실온에서 교반하여 추출하였다. 상기 과정은 3-Batch로 진행하였다. 얻어진 추출액을 모은 후, 40 °C 이하에서 감압 농축하여 엑기스 형태의 추출물 41g(수득율 6.8%)을 얻었다.

[0040] <실시예 1> 회침 추출물 처리에 따른 알칼리성 포스파타아제 활성(Alkaline phosphatase activity) 확인

[0041] 회침 추출물 처리에 따른 알칼리성 포스파타아제 활성 유도 효과를 확인하여, 조골 세포 분화 및 광화작용 증진 효과를 통한 회침 추출물의 치주 질환 예방 및 치료 효과를 확인하였다.

[0042] 인간 치주 인대 세포 (Periodontal ligament progenitor cells (PDL))를 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum; FBS), 100 IU/ml 페니실린 및 100 ug/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에 넣고 5% CO₂, 37 °C 조건 하에 세포 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포를 24웰 플레이트에 1×10⁵ cell/ml 농도로 처리하고 세포 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0043] 치주인대세포의 알칼리성 포스파타아제 활성을 확인하기 위해 상기 세포에 회침 추출물을 0.1, 1, 10, 100 ug/ml 농도로 처리한 다음 72시간 동안 더 배양하고 농도에 따른 활성 변화를 측정하였다. 알칼리성 포스파타아제 활성 변화 측정을 위하여 플레이트에서 배지를 제거한 후, PBS로 3회 세척하고 0.15 % Triton X-100 을 50 ul 씩 넣은 다음 37°C 인큐베이터에서 30 분간 lysis시켰다. 그 후, 3,000rpm에서 5분간 원심분리한 다음 40 ul 의 상등액과 0.1 N glycine 40 ul, 100mM p-nitrophenylphosphate(p-NPP) 20 ul 를 첨가한 뒤 37°C 인큐베이터에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.1 N NaOH 50 ul를 넣어 반응을 정지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP 효소에 의해 p-NPP 가 p-nitrophenol(p-NP) 로 전환된 양을 산출하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다. (도 1에서, *는 p-value<0.05을 나타내며, **는 p-value<0.01, ***은 p-value<0.001을 나타낸다)

[0044] 도 1에 나타낸 바와 같이, 치주인대세포 분화의 지표인 알칼리성 포스파타아제의 활성이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 즉, 회침 추출물은 알칼리성 포스파타아제의 활성 증가를 유도함으로써 치주질환 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0045] <실시예 2> Mineralization activity 확인

[0046] 치주인대세포는 칼슘을 생산하여 세포 외부로 방출하는바, 치주인대세포를 배양시키는 배지에서 세포 주위로 칼슘이 축적되는 광화작용(mineralization)이 일어난다. 이와 관련하여, 본 발명의 회침 추출물이 치주인대세포의 광화작용을 증가시키는지 여부를 평가하였다.

[0047] 인간 치주인대세포(Periodontal ligament progenitor cells (PDL))를 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum; FBS), 100 IU/ml 페니실린 및 100 ug/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에 넣고 5% CO₂, 37 °C로 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포를 24 웰 플레이트에 1×10⁵ cell/ml로 분주하고 다시 상기 세포 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0048] 치주인대세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있는 아스코르브산 (ascorbic acid)과 베타-글리세로포스페이트 (beta-glycerophosphate)를 각각 50 ug/ml과 10 mM의 농도로 배지에 첨가하여 치주인대세포를 활성화시켰다. 활성화된 세포를 2개 군으로 나누어 제1군에는 어떤 물질도 첨가하지 않고(대조군), 제2군은 다시 3개 군으로

나누어 2-1군에는 1 $\mu\text{g/ml}$, 2-2군에는 5 $\mu\text{g/ml}$, 2-3군에는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 회침 추출물을 배양 배지에 첨가하였다. 3일 간격으로 상기 회침 추출물이 포함된 배지로 교환하고 24일 동안 배양하였다.

[0049]

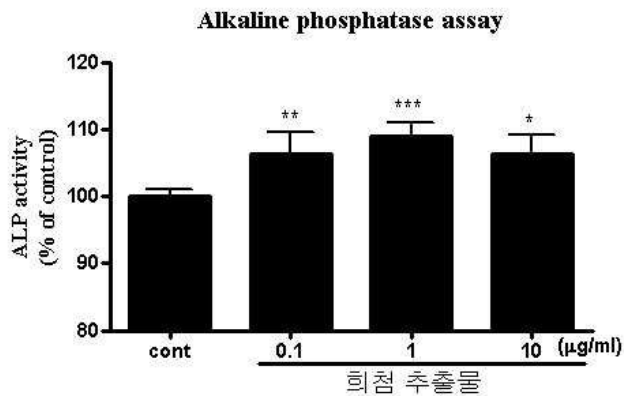
그 후 각 세포를 10% 포르말라이드 (neutral formaldehyde) 용액으로 고정한 후, 알리자린 레드-에스 염색 용액 (Alizarin red-S staining solution)에서 5분간 처리하고 세척하여 육안으로 붉은 색의 석회화 결절의 형성 여부를 관찰하였다. 결절 형성을 확인한 후 10 mM sodium phosphate(10 % cetylpyridinium chloride, pH 7.0)을 1 ml/well로 첨가하여 ELISA 판독기로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다. (도 2에서, ***는 p-value< 0.001를 나타낸다.).

[0050]

도 2에 나타난 바와 같이, 회침 추출물 처리시 광화작용은 대조군과 대비하여 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 110%, 167%, 137% 증가한 것을 확인하였다. 즉, 회침 추출물은 광화작용(mineralization)을 증진시킴으로써, 치주질환 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

도면

도면1



도면2

