



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0105853
(43) 공개일자 2015년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/185 (2006.01) A61K 36/18 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0027923

(22) 출원일자 2014년03월10일

심사청구일자 2014년03월10일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

주식회사 두래

경기도 군포시 당정로 56 (당정동)

(72) 발명자

김진주

경기도 과천시 향교말길 23-14 (중앙동)

임다해

서울특별시 송파구 올림픽로 399, 10동 901호 (신천동, 진주아파트)

강영표

서울특별시 강남구 삼성로147길 22, 101동 202호 (청담동, 우성아파트)

(74) 대리인

안소영

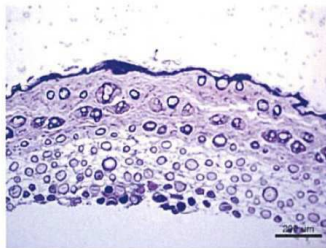
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 백기생 알코올 추출물을 포함하는 피부 염증 예방 또는 치료용 조성물

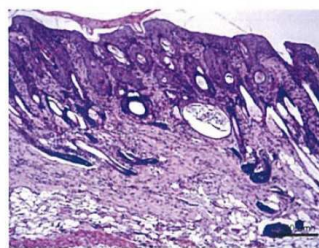
(57) 요약

본 발명은 백기생 알코올 추출물의 피부 염증 예방, 치료, 개선 용도에 관한 것이다. 본 발명의 백기생 알코올 추출물은 피부의 염증 반응을 효과적으로 억제함으로써 피부의 상피 해면증 또는 진피 부종을 감소시키는 효과를 나타내므로 염증성 피부 질환의 예방, 개선 또는 치료에 우수한 효과가 있다.

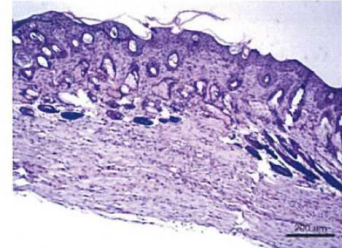
대표도 - 도1



대조군



DNCB 처리군



백기생 에탄올 추출물 처리군

명세서

청구범위

청구항 1

백기생(*Korthalsella japonica*(Thunb.) Engl) 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 백기생 알코올 추출물은 염증성 피부 변성을 완화하는 것인, 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서 상기 알코올은 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올인, 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 백기생 알코올 추출물은 상피 해면층 또는 진피 부종을 감소시키는 것인, 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 백기생 알코올 추출물은 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- α , IL-1 β 의 발현을 감소시키는 것인, 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 백기생 알코올 추출물은 INF- γ 의 발현을 증가시키는 것인, 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 피부 염증은 아토피성 피부염증인 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

백기생(*Korthalsella japonica*(Thunb.) Engl) 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 예방 또는 개선용 건강기능 식품.

청구항 10

백기생(*Korthalsella japonica*(Thunb.) Engl) 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 개선용 화장료 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 피부염증 개선용 화장료 조성물의 제형은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 염모제, 샴푸, 린스 및 바디 세정제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 피부 염증 개선용 화장료 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 백기생 알코올 추출물의 피부 염증 예방, 치료, 개선 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증(inflammation)이란 외부 감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)의 침입에 의하여 형성되는 농양의 병리적 상태를 뜻한다. 구체적으로, 외부 세균이 특정 조직에 침입하여 증식을 하게 되면 생체의 백혈구가 이를 인지하여 증식된 외부 세균을 활발히 공격하게 되는데, 이 과정 중 발생하는 백혈구의 사해가 균에 의하여 침입받은 조직에 축적됨과 동시에 백혈구에 의하여 사멸된 침입균의 세포 파괴물이 침입받은 조직 내로 용해되어 농양이 형성된다. 염증에 의한 농양의 치료는 소염작용을 통하여 촉진될 수 있는데, 소염작용이란 항균제를 이용하여 침입균의 증식을 억제하거나 농양 중에 축적된 이물질들을 탐식하는 대식세포(macrophage)를 활성화하여 상기 이물질들을 소화 및 배설하는 대식세포의 기능을 향진시키는 등의 염증 치료 촉진작용이다.

[0003] 일반적으로 염증반응은 생체의 세포나 조직에 기질적 변화를 가져오는 침습으로 인한 손상을 수복 및 재생하기 위한 생체방어 반응과정이고, 이 반응과정에는 국소의 혈관, 체액의 각종 조직세포 및 면역세포 등이 작용한다. 정상적으로 외부 침입균에 의하여 유도되는 염증반응은 생체를 보호하기 위한 방어 시스템인 반면, 비정상적으로 과도한 염증반응이 유도되면 다양한 질환들이 나타나게 되는데, 이러한 질환들을 염증 질환이라 한다. 상기 염증 질환은 외부자극에 의하여 활성화된 표적세포로부터 분비되는 다양한 염증 매개물질이 염증을 증폭 및 지속시켜 인체의 생명을 위협하는 질환으로서 급성염증, 류마티스관절염과 같은 관절 내에서의 질환, 건선 등의 형태로 나타나는 피부질환 및 기관지 천식 등의 알레르기성 염증질환 등을 포함한다.

[0004] 염증을 유도하는 사이토카인과 매개체들은 핵의 요소에 의해 조절된다. 그 예로 NF- κ B(nuclear factorkappa B)는 Rel 유전자계(Rel gene family)의 핵단백질로서 7가지가 있고, 세포질에서는 I κ B(inhibitory kappa B)와 결합되어 불활성인 형태로 존재하나, 유해산소(reactive oxygen), TNF- α (tumor necrosis factor α) 과 같은 케모카인(chemokines) 및 LPS와 같은 다양한 자극에 의해 I κ B 키나제가 활성화된 후 인산화 과정을 통해 I κ B가 떨어져 나가게 된다. p50과 p65의 헤테로다이어머(heterodimer)로 구성된 NF- κ B는 활성화 된 후, 핵으로 이동하여 염증반응을 유도하는 유전자(종양괴사인자나 사이클로옥사이드 합성효소) 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.

[0005] 겨우살이는 미슬트라고도 불리는 기생식물이며, 어떤 나무에 기생하느냐에 따라 뽕나무 겨우살이인 상기생, 동백나무 겨우살이인 백기생 등으로 나뉠 수 있다. 겨우살이는 약학적으로 생약으로 영국생약 약전(BHP 1996)과 독일약전(DAB 1996)에 수재된 생약이며 국내에서도 식물 생약, 임학학회지에 많은 논문이 실려 있는 등 약효에 관하여 상당한 수준으로 연구되어 있으며 유럽에서는 항암제로 정식 허가되고 처방되고 있다. 산야초 동의보감(장준근 편저)에 의하면 겨우살이는 위장병치료에 생약을 달여서 먹으며 민간약으로 생약 30~40 그램을 물로 달여서 차로 마시며 신경통, 관절염, 이뇨작용, 임신부 영양제 등으로 사용될 수 있다고 되어 있다.

[0006] 대한민국 공개특허 제10-2006-0025423호에서는 한국산 겨우살이 (Viscum album L. var. coloratum)의 추출물이 항염증 및 항산화 효과를 가지고 있다는 것을 밝히고 있다. 그러나 상기 특허문헌에서는 동백나무 겨우살이인 백기생에 관하여 전혀 개시하고 있는 바 없다.

[0007] 동백나무 겨우살이인 백기생은 우리나라 제주도 및 남부 지방 일부의 섬에서 자생하는 동백나무 겨우살이로 높이가 6-15cm정도 자라는 상록성 기생 식물이다. 잎은 퇴화되어 마디 양 끝에 돌기 모양으로 달려 있으며 가지는 녹색이고 많은 관절이 있으며 납작하고 털이 없는 것으로 일반적으로 겨우살이를 말할 때 지칭하는 뽕나무 겨우살이인 상기생 및 곡기생과는 그 외향이 상이할 뿐만 아니라 성분이 매우 상이한 것으로 알려져 있다. 특히 백기생, 곡기생, 상기생의 알려진 성분은 서로 상이한 것으로 밝혀졌다. 보다 구체적으로 백기생에서 현재까지 분리된 성분은 1989년 T.Fukunaga 등에 의해 밝혀진 chrysoeriol-4'-O-glucoside, fattyacids, phytosterol, oleanolicacid, phytosterol-glucoside가 대표적이며, 곡기생의 성분은 각종 유기산 및 플라보노이드인 homoeriodictyol 7,4-di-O- β -D-glucopyranoside, eriodictyol 7,4-di-O- β -D-glucopyranoside, homoeriodictyol 7-O- β -D-glucopyranoside, eriodictyol 7-O- β -D-glucopyranoside, naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside (Yao H, Liao Z-X, Wu Q, Lei G-Q, Liu Z-J, Chen D-F, Chen J-K, Zhou T-S. Antioxidative flavanone glycosides from the branches and leaves of Viscumcoloratum. Chemical and pharmaceutical bulletin 2006;54(1):133-5) 등으로 밝혀진 바 있고, 상기생의 성분은 terpenoid인 sesquiterpene lactones (Okuda T, Yoshida T, Chen XM, Xie JX, Fukushima M. Corianin from

Coriaria japonica A. Gray and sesquiterpene lactones from Loranthus parasiticus Merr. used for treatment of schizophrenia. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1987;35:182-7)과 페놀성 화합물인 AC trimer, (+)-catechin 등으로 알려져 있다. 즉, 겨우살이과에 속하는 상록 반기생 관목인 공통점이 있음에도 불구하고 백기생, 곡기생, 상기생은 상호간에 상이한 성분들을 함유하고 있는 상이한 식물이다.

[0008] 현재까지 동백나무 겨우살이인 백기생 추출물에 관한 연구는 미흡한 실정이며, 특히 백기생 추출물의 항염증 및 염증성 피부 질환에 대한 효과에 대해서는 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 피부 염증을 치료하기 위한 새로운 치료제 개발을 위하여 천연 생약제를 연구하던 중, 겨우살이과에 속하는 백기생의 알코올 추출물이 뛰어난 피부 염증 억제반응을 나타내는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 백기생(Korthalsella japonica(Thunb.) Engl) 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 목적은 백기생(Korthalsella japonica(Thunb.) Engl) 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공하는 것이다.

[0012] 또한 본 발명의 목적은 백기생(Korthalsella japonica(Thunb.) Engl) 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 백기생 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 백기생 알코올 추출물은 염증성 피부 변성을 완화하는 것인, 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 알코올은 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올인, 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 상기 백기생 알코올 추출물은 상피 해면증 또는 진피 부종을 감소시키는 것인, 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 상기 백기생 알코올 추출물은 염증성 사이토카인 IL6, TNF- α , IL-1 β 의 발현을 감소시키는 것인, 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 상기 백기생 알코올 추출물은 INF- γ 의 발현을 증가시키는 것인, 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 또한 본 발명은 상기 피부 염증은 아토피성 피부염증인 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 또한 본 발명은 백기생 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공한다.

[0022] 또한 본 발명은 백기생 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0023] 또한 본 발명은 상기 피부염증 개선용 화장품 조성물의 제형은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 염모제, 샴푸, 린스 및 바디 세정제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 피부 염증 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 백기생 알코올 추출물은 피부의 염증 반응을 효과적으로 억제함으로써 피부의 상피 해면증 또는 진피 부종을 감소시키는 효과를 나타내므로 피부 염증 질환의 예방, 개선 또는 치료에 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 백기생 에탄올 추출물 전처리군의 염증 유발 피부 변성 완화 효과를 DNCB 처리, 염증 유발 마우스에서 H&E 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 백기생 에탄올 추출물의 세포 독성 여부를 MTT 어세이를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 백기생 에탄올 추출물의 NO 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다(KJ: 백기생 에탄올 추출물).

도 4는 백기생 에탄올 추출물의 i-NOS 및 COX-2 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 백기생 에탄올 추출물의 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다(KJ: 백기생 에탄올 추출물).

도 6는 DNCB로 유도된 피부 염증 유발 마우스의 피부 조직에서 백기생 에탄올 추출물의 IL-6, IL-1 β , MCP-1 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다(DNCB+KJ: 백기생 에탄올 추출물 전처리군).

도 7은 백기생 에탄올 추출물의 NF- κ B 억제 효과를 세포 웨스턴 블랏으로 확인한 결과를 나타낸 도이다(KJ: 백기생 에탄올 추출물).

도 8은 백기생 에탄올 추출물의 NF- κ B 억제 효과를 피부 웨스턴 블랏으로 확인한 결과를 나타낸 도이다(KJ: 백기생 에탄올 추출물).

도 9는 백기생 에탄올 추출물의 INF- γ 증가 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 백기생 에탄올 추출물과 수 추출물의 세포독성을 비교한 결과를 나타낸 도이다(KJW: 백기생 수 추출물, KJE: 백기생 에탄올 추출물).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 백기생 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 백기생 알코올 추출물은 피부의 염증 반응을 효과적으로 억제함으로써 피부의 상피 해면증 또는 진피 부종을 감소시키는 효과를 나타낸다.

[0028] 상기 백기생 알코올 추출물은 피부의 염증 유발 자극에 의해 유발되는 염증성 피부 변성을 완화하는 것일 수 있다.

[0029] 상기 염증성 피부 변성은 외부의 염증 유발 자극에 의하여 유발되는 피부의 변성을 제한 없이 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로 표피층의 두께가 증가하는 극세포증, 세포간 부종, 상피 해면증을 포함한다.

[0030] 상기 피부 염증은, 피부에서 일어나는 염증성 반응을 수반하는 모든 피부 염증성 질환을 제한 없이 포함할 수 있으며, 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 접촉성 피부염(contact dermatitis), 지루성 피부염(seborrhea) 및 여드름으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 극세포증을 주증으로 하는 사마귀, 표피모반, 피지선 모반, 지루각화증, 흑색극세포증, 광선각화증, 피부연성섬유종, 건선, 만성습진, 결핵이나 심부진균증, 전염성 육아종 과립세포종양, 유전분성 태선과 해면증을 주증으로 하는 급성 접촉성 피부염, 화폐상 습진, 한포진, 소수포성 가가감작증, 소수포성 피부사상균증일 수 있다.

[0031] 여기에서, 상기 알코올은 탄소수 1 내지 4의 저급알코올일 수 있으며, 바람직하게는 메탄올, 에탄올, n-프로판올, iso-프로판올, n-부탄올, iso-부탄올, tert-부탄올일 수 있고, 더욱 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올일 수 있다.

[0032] 상기 에탄올은 10 내지 100 부피% 에탄올일 수 있고, 바람직하게는 30, 70 또는 95부피% 에탄올 수용액일 수 있다.

[0033] 상기 백기생 알코올 추출물은 염증에 의하여 유발된 극세포증, 세포간 부종을 완화시킬 수 있으며, 상피의 해면증과 진피의 부종을 모두 감소시킬 수 있어 염증성 자극에 의한 피부 변성을 효과적으로 완화시킬 수 있으며,

염증성 사이토카인 IL6, TNF- α , IL-1 β 의 발현을 감소시킬 수 있어 피부에서의 염증 반응을 효과적으로 억제하여 피부 염증을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0034] 또한 상기 백기생 알코올 추출물은 아토피 피부염증에서 감소되는 INF- γ 발현을 증가시킬 수 있으며, 이에 따라 피부 염증 중 아토피성 피부 염증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0035] 상기 백기생 알코올 추출물은 하기의 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0036] (1) 백기생을 건조 후 분쇄하는 단계;

[0037] (2) 분쇄한 백기생에 추출용매로 알코올을 가하여 추출하고 추출물을 얻는 단계;

[0038] (3) 추출물을 식힌 후 여과 및 농축하는 단계;

[0039] 상기 단계 (1)에 사용되는 백기생은 직접 재배한 것 또는 시판되는 것 등을 제한 없이 사용할 수 있다.

[0040] 상기 단계 (2)의 추출은 진탕 추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출 방법을 이용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 추출온도는 10 내지 100 $^{\circ}\text{C}$ 인 것이 바람직하며, 10 내지 50 $^{\circ}\text{C}$ 인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 추출시간은 10 내지 30 시간인 것이 바람직하며, 상기 추출은 1 내지 5회 수행할 수 있다.

[0041] 상기 (3) 단계의 여과는 감압여과를 이용하는 것이 가장 바람직하다.

[0042] 또한 본 발명의 고사리삼 추출물은 상기 (3) 단계 이후, -100 $^{\circ}\text{C}$ 내지 -30 $^{\circ}\text{C}$ 의 초저온 냉동고에서 동결시킬 수 있으며, 동결건조기를 이용하여 건조할 수 있다.

[0043] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 첨가하여 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA의 문헌을 참조할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 의약 발명 부분에 속하는 통상의 기술자에게 의약 조성물 제조시 통상적으로 사용되는 것을 의미한다. 예를 들어, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 또한, 약학적으로 허용되는 담체는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함한다.

[0044] 예를 들어, 국소투여에 적합한 약학적 담체 및/또는 부형제는 본 발명에 따르면 피부 투여용 약학제제(예를 들어 피부질환 치료제)와 관련하여 해당 기술 분야의 당업자에 공지된 통상적인 담체 및/또는 부형제인 것이 바람직하다.

[0045] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스테레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다.

[0046] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0047] 피부 투여를 위해 언급할 수 있는 예로는 더스팅 파우더, 에멀전, 현탁액, 오일, 스프레이, 연고, 그리지 연고, 크림, 페이스트, 젤, 폼, 또는 용액을 생성시키는데 적합하고, 경피 약물 전달체(TTS: Transdermal therapeuticsystem)에 적합한 담체 및/또는 부형제가 있다. 본 발명의 국소용 약학제제는 반고체상 제형일 수 있으며 특히 연고(용액 연고, 현탁액 연고), 크림, 젤 또는 페이스트가 있다. 유상에 주로 사용되는 것은 지방 알콜, 예를 들면 라우릴 알코올, 세틸 알코올, 스테아릴 알코올, 지방산, 예를 들면 팔미트산 또는 스테아르산, 액상 또는 고체상 파라핀 또는 오조케라이트, 액상 내지 고체상 왁스, 예를 들면 이소프로필 미리스테이트, 천연 지방 또는 일부 합성 지방, 예를 들면 코코넛 지방산 트리글리세라이드, 경화유, 예를 들면 수소화된 피넛 또는 캐스터 오일, 또는 글리세롤의 지방산 부분 에스테르, 예를 들면 글리세롤 모노스테아레이트 또는 글리세롤 디스테아레이트가 있다. 적합한 유화제로는 계면활성제, 예를 들어 비이온성 계면활성제, 예를 들면 폴리알코올 또는 이것의 산화에틸렌 부가물의 지방산 에스테르, 예컨대 폴리글리세롤 지방산 에스테르 또는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 올레에이트 및/또는 소르비탄

이소스테아레이트등, 이소스테아레이트, 스테롤, 또는 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르 또는 지방산 에스테르, 예를 들어 음이온성 계면활성제, 예를 들면 지방 알코올 설포네이트의 알칼리 금속염, 예컨대 나트륨라우릴 설페이트, 나트륨 세틸 설페이트 또는 나트륨 스테아릴 설페이트가 있으며 이들은 상기 지방 알코올, 예를 들면 세틸 알코올 또는 스테아릴 알코올의 존재 하에서 일반적으로 사용된다. 이 중에서도 특히 크림 건조를 방지하는 제제, 예를 들면 폴리알코올, 예컨대 글리세롤, 소르비톨, 프로필렌 글리콜 및/또는 폴리에틸렌 글리콜을 수상에 첨가하거나 또는 보존제, 향료 등을 수상에 첨가하는 것이 가능하다.

[0048] 본 발명의 약학제제는 무수상태의 연고일 수 있고, 국소용도에 적합하고 체온상태에서 액체인 파라핀, 특히 저점도 파라핀을 함유하거나, 또는 상기 천연지방 또는 부분합성 지방, 예를 들면, 코코넛 지방산 트리글리세라이드, 경화유, 예를 들면 수소화된 피넛 또는 캐스터 오일, 글리세롤의 지방산 부분 에스테르, 예를 들면 글리세롤 모노스테아레이트 및 디스테아레이트, 실리콘, 예를 들면 폴리메틸실록산, 예컨대 헥사메틸디실록산 또는 옥타메틸트리실록산을 함유할 수 있으며, 예를 들어 수성크림과 관련되어 있고 수분 흡수 용량을 증가시키는 지방 알코올, 그리고 스테롤, 울 왁스, 다른 유화제 및/또는 기타 첨가제를 함유할 수 있다.

[0049] 그러나 상기 열거된 약제학적으로 허용되는 담체 등으로 본 발명이 한정되는 것은 아니며, 이들은 단지 예시에 불과하다.

[0050] 상기 약학적 조성물에 함유되는 백기생 알코올 추출물의 적용량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기 백기생 알코올 추출물은 1일 0.0001 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.1 내지 1000 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있으며, 상기 적용은 하루에 한번 또는 수회 나누어 적용할 수도 있다. 또한, 상기 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 백기생 알코올 추출물을 0.0001 내지 50 중량%로 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경피, 경구, 정맥, 근육, 또는 피하 주사에 의해 적용될 수 있다.

[0051] 또한 본 발명의 약학적 조성물은 백기생 알코올 추출물 외에 피부 염증의 개선, 완화, 치료 또는 예방을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0052] 또한 본 발명의 약학적 조성물은 피부 염증의 개선, 완화, 치료 또는 예방을 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0053] 또한 본 발명은 백기생(*Korthalsella japonica*(Thunb.) Engl) 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공한다.

[0054] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있고, 그 밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0055] 상기 건강기능식품은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0056] 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0057] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고분색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0058] 본 발명의 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명의 백기생 알코올 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 전체 식품 100 중량%에 대하여 1 내지 15 중량% 포함되도록 첨가하는 것이 바람직하다.

[0059] 또한 본 발명은 백기생 알코올 추출물을 포함하는 피부 염증 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명에서, 상기 화장료 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센

스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 옴모제, 샴푸, 린스 및 바디 세정제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형일 수 있다.

[0061] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 백기생 알코올 추출물을 사용하여 통상의 화장료 제조방법에 따라, 다양한 형태로 제조될 수 있으며, 화장료 조성물 분야에서 통상적으로 사용되는 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.

[0062] 또한, 화장료 조성물이 상기 백기생 알코올 추출물을 함유하는 향장 제품, 샴푸, 헤어로션, 헤어크림, 헤어젤 등의 형태로 제조될 경우, 통상의 클렌징액, 수렴액 및 보습액으로 희석하여 사용될 수 있다.

[0063] 본 발명의 화장료 조성물은 특히 화장수, 로션, 크림, 에센스 형태로 제조되는 것이 바람직하다.

[0064] 본 발명의 화장료 조성물에서 백기생 알코올 화장료 조성물의 총 액상 중량에 대하여 0.1중량%~10중량%의 양을 화장료에 첨가될 수 있고, 또한 화장료 조성물의 총 건조중량에 대하여 0.001~5중량%, 바람직하게는 0.01~3중량%의 양으로 화장료에 첨가될 수 있다.

[0065] 이상 본 명세서에 기재된 수치값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0066] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 제제예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예, 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 또는 제제예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0067] 백기생 추출물의 제조

[0068] 백기생 추출물을 제조하기 위하여 백기생 600g 을 나눔허브 주식회사로부터 구입하였다. 백기생 200g을 분쇄기를 이용하여 분쇄 한 후 백기생 분쇄물 50g에 70%의 에탄올을 500ml 첨가하고 진탕배양기를 이용하여 상온에서 20시간 동안 추출하였다. hyundai micro N0.100(3um)을 이용하여 감압여과한 후 감압농축기를 이용하여 에탄올을 모두 제거하고 -80℃ 초저온냉동고에서 동결 시켰다. 동결 시킨 백기생 에탄올 추출물을 동결건조기를 이용하여 건조하여 백기생 에탄올 추출물 7.5g을 제조하였다. 제조된 백기생 에탄올 추출물을 10mg/ml 로 물에 녹여서 여과한 다음 4℃에서 보관하였다.

[0069] 실시예 1. 백기생 추출물의 피부변성 완화 효과

[0070] 1.1 염증성 피부변성 유발 마우스의 제조

[0071] 백기생 추출물의 피부 변성 완화 효과를 확인하기 위하여, 체중 20 내지 25g의 6주령 암컷 BALB/c (Nara Bio Inc, South Korea)를 DNCB(dinitrochlorobenzene) 처리군 3마리 및 미처리 대조군 3마리로 나눴다. 물과 사료는 자유롭게 식이할 수 있도록 하였으며, 사육실 내 온도는 21 내지 24℃, 습도는 40 내지 60%로 유지하였다. 낮과 밤 주기는 각각 12시간이 되도록 하였다. 염증성 피부변성을 유발하기 위한 DNCB 처리군은 구체적으로 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 먼저 BALB/c 마우스의 등 부위를 제모하고 1차로 1% DNCB 용액 100 μl를 하루에 한번씩 3일 동안 제모 부위에 도포하여 등 부위를 자극시켰다. 이후 4일 내지 7일 동안 아무런 처리를 하지 않았으며 마우스에서 염증 유발 반응을 확인하였다. 2차 자극은 8일 내지 21일 동안 하루에 한번씩 0.5% DNCB 용액 100 μl를 도포하여 수행하였다. 백기생 에탄올 추출물의 피부변성 완화효과를 확인하기 위하여, DNCB 용액을 처리한 3 마리의 마우스에는 1 w/v % 백기생 에탄올 추출물 100 μl을 DNCB 처리 4시간 전에 도포하였다. 실험 시작 21일 후 실험동물들을 희생시켜 피부변성을 확인하였다.

[0072] 1.2 조직학적 분석 결과

[0073] 상기 실시예 1.1에서 피부 변성을 유발한 마우스에서 등 피부를 적출하고 피부조직을 제거하여 4% 포르말린에 고정하여 고정액에서 고정한 후 알코올로 탈수하고 파라핀 블록(paraffin block)을 제작하였다. 파라핀에 고정된 조직을 4 μm 두께로 얇게 자른 후, 슬라이드 글라스에 부착하고 파라핀을 제거하였으며 H&E로 염색하였다. 이 후 100x 배율로 피부 표피 및 진피의 두께를 살펴 DNCB로 염증 유발 피부변성을 유발한 마우스에서 백기생 에탄올 추출물의 피부변성 완화 효과를 확인하였다.

[0074] 결과를 도 1에 나타내었다.

[0075] 도 1에 나타난 바와 같이, 백기생 에탄올 추출물 없이 DNCB로 염증을 유발한 군에서는 미처리군인 대조군과 비교하여 표피층의 두께가 두꺼워진 극세포증, 세포간 부종, 상피 해면증이 유발된 것을 확인하였다. 그러나 백기

생 에탄올 추출물을 DNCB 처리된 도포한 실험군에서는 DNCB 군과 비교하여 현저한 극세포증 완화, 세포간 부종 완화, 상피 해면증 감소를 확인하였다. 이를 통해 백기생 에탄올 추출물이 염증 반응에 의해 유도되는 상피의 해면증과 진피의 부종을 효과적으로 억제하여 피부 변성을 완화할 수 있음을 확인하였다.

[0076] 실시예 2. 백기생 에탄올 추출물의 염증 억제 효과

[0077] 백기생 에탄올 추출물의 피부변성 완화효과가 염증 억제 효과에 기인한 것인지 확인하기 위하여, 피부 염증 질환에 관여하는 염증 조절인자의 발현에 미치는 백기생 에탄올 추출물의 효과를 세포수준 및 피부 조직에서 확인하였다. 세포주 Raw 264.7 대식세포(ATCC, Manassa, VA, USA)를 100% 습도, 5% CO₂, 37℃에서 DMEM (10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신)을 사용하여 배양하였다.

[0078] 2.1 세포독성 확인

[0079] 먼저 백기생 에탄올 추출물이 세포 독성이 있는지 여부를 확인하기 위하여 BALB/c 마우스 유래의 Raw 264.7 대식세포에 백기생 에탄올 추출물을 1, 10, 100 µg/ml 농도로 처리하고 24시간 후 MTT 어세이를 통해 세포 생존율을 확인하였다.

[0080] 결과를 도 2에 나타내었다.

[0081] 도 2에 나타낸 바와 같이, 백기생 에탄올 추출물은 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.

[0082] 2.2 NO 생성 억제 효과 확인

[0083] NO 는 전염증 매개 물질로 다양한 염증성 자극에 의해 생성되며, 연속적인 염증 반응을 유도하고 조직 손상에 기여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 백기생 알코올 추출물이 NO 생성을 억제하는지 여부를 확인하였다. Raw 264.7 대식세포를 백기생 에탄올 추출물 1, 10, 100 µg/ml 농도로 2시간 동안 전처리한 후, 자극원인 리포폴리사카라이드(LPS)를 1 µg/ml 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 그 후 상등액을 수거하고 Griess 시약을 사용하여 NO 농도를 측정하였다.

[0084] 결과를 도 3 에 나타내었다.

[0085] 도 3에 나타낸 바와 같이, 백기생 에탄올 추출물은 LPS 만을 처리한 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 유의성 있는 NO 감소효과를 나타내었다. 이러한 결과를 통해 백기생 에탄올 추출물이 효과적으로 전염증성 매개인자인 NO를 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0086] 2.3 i-NOS 및 COX-2 억제 효과 확인

[0087] i-NOS, COX-2 또한 피부에서 염증 반응을 유도하므로, 추가적으로 백기생 에탄올 추출물이 i-NOS, COX-2 의 발현을 억제시킬 수 있는지 여부를 세포 웨스턴 블랏을 통해 추가적으로 확인하였다. Raw 264.7 대식세포에 백기생 에탄올 추출물을 1, 10, 100 µg/ml 의 농도로 2시간 전처리하고 LPS 1 µg/ml를 5시간 처리한 후 세포를 수거하여 lysis 완충액을 사용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Dc 단백질 어세이 키트(Bio-Rad Laboratories, USA)의 방법으로 정량하여, 각 시료 당 20mg의 단백질을 실험에 사용하였다. SDS 12%-폴리아크릴아미드겔을 이용한 전기영동을 통해 단백질을 분리한 후, 분리한 단백질을 니트로셀룰로오스막으로 이동시켰다. 항체의 비 특이적인 결합을 막기 위해 TBS-T로 용해한 5% 스킵 밀크를 이용하여 차단시킨 후, TBS-T로 15분간 3회 세척하고, β-actin, i-NOS, COX-2 항체를 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 넣고, 4℃에서 하룻밤동안 결합시켰다. TBS-T로 15분간 3회 세척하고 HRP (horseradish-peroxidase)가 붙어있는 2차 항체를 TBS-T에 1:2,000으로 희석하여 넣고 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 다시 TBS-T 15분 정도의 세척을 한 후, AB signal kit의 용액을 1:1로 섞어 NC 필터에 부어 1분간 흔들어 준 다음, LAS Image Gauge 프로그램을 이용하여 현상하였다. i-NOS, COX-2 밴드의 밀도 측정은 β-액틴 항체 밴드를 대조군으로 하여 정량 하였다.

[0088] 결과를 도 4에 나타내었다.

[0089] 도 4에 나타낸 바와 같이, 백기생 에탄올 추출물은 용량 의존적으로 i-NOS의 발현을 억제하였으며, 100 µg/ml 처리군에서는 i-NOS의 발현이 LPS 미처리군과 유사한 수준으로 감소하였다. 또한 COX-2 역시 백기생 에탄올 추출물 미처리군과 비교하여 유의성 있는 감소를 보여 백기생 에탄올 추출물이 매우 뛰어난 염증 억제 효과가 있음을 확인하였다.

[0090] 2.4 Raw 264.7 세포에서 사이토카인 생성 억제 효과 확인

[0091] TNF-α와, IL-6, IL-1β는 염증성 사이토카인으로 대식세포에 의해 주로 생산되며, 염증반응을 촉진하고 조직손

상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 염증 관련 유전자들은 NF- κ B에 의해 전사되는 것으로 보고되어 있다. 따라서 백기생 에탄올 추출물이 염증성 사이토카인을 억제하는 활성이 있는지 ELISA 방법을 이용하여 확인하였다. 먼저 Raw 264.7 세포에 백기생 에탄올 추출물을 1, 10, 100 μ g/ml 농도로 2시간 전처리하고 LPS 1 μ g/ml를 24시간 처리한 후 상등액을 수거하였다. ELISA 방법을 이용하여 TNF- α 와, IL-6, IL-1 β 의 양을 양적 샌드위치 효소-연결 면역분석 키트(BD,USA)를 이용하여 측정하였다. ELISA 는 OptEIA(BD Bioscience, 샌디에이고, CA,USA) 의 프로토콜에 따라 수행하였으며, 캡처 항체를 코팅 완충액 (0.1M 카르보네이트, pH 9.5)로 희석하여 96-웰 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 4℃에서 하룻밤동안 코팅하였다. 코팅한 플레이트를 세척 완충액(PBS/트윈-20,0.05%)로 3번 세척한 후 Assay diluent(BD Bioscience, 샌디에이고, CA, USA)를 200 μ l/웰 씩 분주하고 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 다시 세척 완충액으로 3회 세척하고 표준(standard) 및 시료를 100 μ l 씩 분주한 후 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 세척 완충액으로 5회 세척하고 Working Detector (검출항체+아비딘-HRP)를 100 μ l씩 각 웰에 첨가하였다. 이후 실온에서 1시간 추가 반응시킨후 세척 완충액으로 10회 세척하였으며 기질 용액 셋트(TMB 기질 시약; Pharmingen, BD science, 샌디에이고, CA, USA)를 각 웰마다 100 μ l씩 첨가하였다. 실온의 어두운 곳에서 30분 동안 반응시킨 후 2N H₂SO₄를 50 μ l 첨가하고 30분 이내에 마이크로 플레이트리더 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450nm/570nm 파장에서 읽었다.

[0092] 결과를 도 5에 나타내었다.

[0093] 도 5에 나타난 바와 같이, LPS 만을 처리한 실험군에서는 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 가 급격하게 증가한 것으로 나타났으나, 백기생 에탄올 추출물을 전처리한 실험군에서는 모든 염증성 사이토카인이 농도 의존적으로 매우 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 백기생 에탄올 추출물은 피부의 염증 반응을 매우 효과적으로 억제할 수 있는 것을 확인하였다.

[0094] **2.5 피부 조직에서 사이토카인 생성 억제 효과 확인**

[0095] 백기생 에탄올 추출물의 도포가 DNCB로 유도된 마우스 조직에서 염증반응에 관여하는 사이토카인 발현에 미치는 정도를 평가하기 위해서 피부 ELISA 어세이를 실시하여 IL-6, IL-1 β , MCP-1 발현 분석을 수행하였다. 먼저 실시예 1.1 과 같이 DNCB 의해 염증을 유발시킨 마우스와 백기생 에탄올 추출물 전처리 마우스의 등으로부터 피부 조직을 얻고 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 2 mM Na₃VO₄, 2 mM Na₄P₂O₇, 50 mM NaF, 2 mM EDTA (pH 7.4)와 NP-40 lysis 완충액을 사용하여 균질화하였으며, 15분 간격으로 5회 보텍스(vortex)를 이용하여 교반하고 실험에 사용할 최종 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Dc 단백질 어세이 키트 (Bio-Rad Laboratories, USA)의 방법으로 정량하였다. IL-6, IL-1 β 의 양을 Quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay kit (BD,USA)을 이용하여 측정하였다.

[0096] 결과를 도 6에 나타내었다.

[0097] 도 6에 나타난 바와 같이, DNCB로 유도된 피부 염증 유발 마우스의 피부 조직에서는 IL-6, IL-1 β , MCP-1 이 모두 과발현 되었으나, 백기생 에탄올 추출물 100 μ l를 전처리한 마우스에서는 모두 유의성 있는 감소를 나타내는 것을 확인하였다.

[0098] **2.6 NF- κ B 발현 분석**

[0099] DNCB로 유도된 마우스 조직에서 백기생 에탄올 추출물의 도포 전처리가 염증반응에 직접적으로 관여하는 대표적인 단백질인 NF- κ B에 발현 정도에 미치는 영향을 평가하기 위하여 세포 수준 및 피부에서의 웨스턴 블랏 어세이를 실시하였다.

[0100] 세포 웨스턴 실험을 위하여 Raw 264.7 대식세포에 백기생 에탄올 추출물을 1, 10, 100 μ g/ml 의 농도로 2시간 전처리하고 LPS 1 μ g/ml를 2시간 처리한 후 세포를 수거하여 lysis 완충액을 사용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Dc 단백질 어세이 키트 (Bio-Rad Laboratories, USA)의 방법으로 정량하여, 각 시료 당 20mg의 단백질을 실험에 사용하였다. SDS 12%-폴리아크릴 아마이드겔을 이용 전기영동을 통해 단백질을 분리한 후, 분리한 단백질은 니트로셀룰로오스 막으로 이동시켰다. 항체의 비 특이적인 결합을 막기 위해 TBS-T로 용해한 5% 스킵밀크를 이용하여 차단시킨 후, TBS-T로 15분간 3회 세척하였으며, PCNA, NF- κ B 항체를 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 넣고, 4℃에서 하룻밤동안 결합시켰다. TBS-T로 15분간 3회 세척하고 HRP (horseradish-peroxidase)가 붙어있는 염소-항-토끼 2차 항체를 TBS-T에 1:2,000으로 희석하여 넣고 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 다시 TBS-T 15분 정도의 세척을 한 후, AB 신호 키트용액을 1:1로 섞어 NC 필터에 붓고 1분간 흔들어 준 다음, LAS Image Gauge 프로그램을 이용하여 현상하였다. NF- κ B 밴드의 밀도 측정은 PCNA 항체 밴드를 대조

군으로 하여 정량하였다.

[0101] 피부 조직에서의 NF- κ B에 발현 정도를 확인하기 위한 피부 웨스턴을 수행하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다. DNCB 염증 반응 유도 및 백기생 에탄올 추출물 전처리 실험에 1.1 과 같은 방법으로 수행하였다. 마우스 피부 등 조직은 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 2 mM Na_3VO_4 , 2 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 50 mM NaF, 2 mM EDTA (pH 7.4)와 NP-40 lysis 완충액을 사용하여 균질화하였으며, 15분 간격으로 5회 볼텍스(vortex)를 이용하여 교반하고 실험에 사용할 최종 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Dc 단백질 어세이 키트 (Bio-Rad Laboratories, USA)의 방법으로 정량하여, 각 시료당 20mg의 단백질을 실험에 사용하였다. SDS 12%-폴리아크릴아미드겔을 이용 전기영동을 통해 단백질을 분리한 후, 분리한 단백질을 니트로셀룰로오스 막으로 이동시켰다. 항체의 비 특이적인 결합을 막기 위해 TBS-T로 용해한 5% 스킵 밀크를 이용하여 차단 시킨 후, TBS-T로 15분간 3회 세척하였으며, 항-토끼 β -액틴, NF- κ B 항체(Cell signaling, USA)를 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 넣고, 4℃에서 하룻밤동안 결합시켰다. TBS-T로 15분간 3회 세척하고 HRP (horseradish-peroxidase)가 붙어있는 염소-항-토끼 2차 항체 (Santa cruz biotechnology Inc, USA)를 TBS-T에 1:2,000으로 희석하여 넣고 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 다시 TBS-T 15분 정도의 세척을 한 후, AB signal kit의 용액을 1:1로 섞어 NC 필터에 부어 1분간 흔들어 준 다음, LAS Image Gauge 프로그램을 이용하여 현상을 하였다. NF- κ B 밴드의 밀도를 측정은 항-마우스 β -액틴 항체(Santa cruz biotechnology Inc, USA) 밴드를 대조군으로 하여 정량 하였다.

[0102] 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0103] 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, 세포 웨스턴 블랏에서 백기생 에탄올 추출물은 농도의존적으로 NF- κ B의 발현을 억제하였으며, 피부 웨스턴 블랏에서도 100 μ l의 백기생 에탄올 추출물이 염증성 인자인 NF- κ B의 발현을 DNCB 군과 비교하여 현저하게 억제하였음을 확인할 수 있었다.

[0104] **실시예 3. 피부 염증 질환 인자의 변화 확인**

[0105] 피부 염증 질환으로 염증성 피부 변성을 야기하는 대표적인 예로 아토피 피부염을 들 수 있으며 이의 면역 병리학적 특징은 IgE가 증가되고 Th1/Th2 세포가 불균형해지는 것이다. IgE는 IL-4의 자극에 의해서 생성되고, IFN- γ 는 이러한 IL-4의 분비를 저해하는 데 아토피 피부염의 발병기에는 IFN- γ 의 농도가 감소되므로 IL-4에 의한 IgE의 생성이 더욱 증가되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명의 백기생 에탄올 추출물이 대표적 피부 염증 질환인 아토피 피부염을 완화시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 피부 염증 질환 인자인 IFN- γ 가 백기생 에탄올 추출물의 처리에 의해 변화되는지 여부를 확인하였다. 구체적인 방법은 다음과 같다.

[0106] 6주령의 Balb/C 생쥐를 오리엔트(Seungnam, Kyunggido, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였으며, RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) 배지, FBS (fetal bovine serum)과 페니실린(10,000 U/ml)/스트렙토마이신(10,000 U/ml)은 Hyclone (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA)회사 제품을 사용하였다. IFN- γ 측정에 필요한 ELISA 키트(enzyme linked immunosorbent assay kit)는 BD Pharmingen(San Diego, CA, USA) 회사제품을 사용하였다. 또한 적혈구 용해 완충액과 콘카나발린 A(concanavalin A; Con A)는 Sigma(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0107] 6주령의 Balb/C 생쥐의 비장세포에서 적혈구를 제거하고 세척한 후 24 웰 편평 바닥 배양 플레이트에 2×10^6 /ml 농도의 비장세포를 분주하였다. 모든 웰에 대조군으로 Con A (1 μ g/ml) 또는 백기생 에탄올 추출물 100 μ g/ml을 첨가하여 48시간 동안 배양한 후, 각 웰로부터 상층액을 얻어 -20℃에서 보관하였으며 이후 실험에 사용하였다. 상층액에 포함된 IFN- γ 의 생성량을 ELISA 키트 (BD Pharmingen, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 항-마우스 IFN- γ 모노클로날 항체를 250배 희석하여 96 웰 플레이트 (Corning, NY, USA)에 100 μ l씩 넣고 4℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 이를 세척 완충액 (PBS 포함 0.05 % 트윈 20)으로 3번 세척한 후, 2 % BSA(bovine serum albumin)인 PBS를 200 μ l씩 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 3번 세척한 후 표준(standard)과 50배 희석한 시료들을 100 μ l씩 넣고 2시간 동안 반응시키고 다시 5번 세척하였다. 그 후 working detector 세척 완충액으로 250배 희석한 검출 항체와 스트렙타아비딘-호스레이시 페록시다아제-접합 검출 항체를 100 μ l씩 넣고 1시간동안 반응시켰다. 7번 세척 후, TMB (tetramethylbenzidine) 기질 시약 A와 B를 동량 섞은 것을 100 μ l씩 넣고 어두운 곳에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 1M H_2SO_4 를 각 50 μ l씩 넣고 즉시 ELISA reader (EL800, Bio-Tek, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량은 표준 곡선을 만들어 측정하였으며, 이 때 측정 한계치는 15.6 ng/mL이었다. 통계 처리는 Prism 5 software (GraphicPad Software Inc., CA, USA)을 사용하여 post test (Dunnett)을 포함한 one-way ANOVA 테스트로 유의성을 측정하였다. 결과는 mean $\pm$ S.E.M으로 표시하였고, 통계적 유의성 차이는 * p <0.05, ** p <0.001로 정의하였다.

- [0108] 결과를 하기 도 9에 나타내었다.
- [0109] 도 9 에 나타낸 바와 같이, 백기생 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 실험군에서는 conA 만 처리한 대조군과 비교하여 INF- γ 의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 백기생 에탄올 추출물은 아토피 피부염에서 관찰되는 INF- γ 의 발현 감소를 개선시킬 수 있으므로 백기생 에탄올 추출물이 대표적인 피부염증 질환인 아토피 피부염을 개선할 수 있음을 확인하였다.
- [0110] **비교예 1. 백기생 에탄올 추출물과 수 추출물의 비교**
- [0111] 추출물은 추출용매에 따라 성분이 달라질 수 있으며, 이에 따라 효과가 상이하게 나타날 수 있다. 따라서 백기생 에탄올 추출물의 항염증 효과가 다른 추출용매로 추출한 추출물에서도 동일하게 확인되는지 여부를 확인하기 위하여, 백기생 수 추출물과 에탄올 추출물의 세포 독성을 비교하였다. 백기생 수 추출물은 백기생 분쇄물 50g에 물 500ml을 첨가하고 진탕배양기를 이용하여 60℃에서 15시간 동안 추출하였다. hyundai micro NO.100(3um)을 이용하여 감압여과한 후 -80℃ 초저온냉동고에서 동결 시켰다. 동결 시킨 백기생 수 추출물을 동결건조기를 이용하여 건조하여 백기생 수 추출물 10.7g을 제조하였다. 백기생 에탄올 추출물과 백기생 수 추출물의 세포독성 확인을 위한 실험은 실시예 2.1과 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0112] 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0113] 도 10에 나타낸 바와 같이, 백기생 에탄올 추출물은 세포독성을 나타내지 않는 반면, 백기생 수 추출물은 세포독성이 있는 것을 확인하였다. 세포 독성이 있는 경우, 이를 의약, 식품, 화장품 등으로 활용할 수 없고 이를 제거하기 위한 추가적인 공정이 필요하므로 효과적인 피부 염증 완화를 위해서는 백기생 에탄올 추출물이 바람직하고 백기생 에탄올 추출물이 수 추출물에 비하여 산업상 가치가 있는 물질임을 확인하였다.
- [0114] **제제예 1. 의약품의 제조**
- [0115] **1.1 산제의 제조**
- [0116] 백기생 알코올 추출물 100mg
- [0117] 유당 100mg
- [0118] 탈 10mg
- [0119] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0120] **1.2 정제의 제조**
- [0121] 백기생 알코올 추출물 100mg
- [0122] 옥수수전분 100mg
- [0123] 유당 100mg
- [0124] 스테아린산 마그네슘 2mg
- [0125] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0126] **1.3 캡슐제의 제조**
- [0127] 백기생 알코올 추출물 100mg
- [0128] 옥수수전분 100mg
- [0129] 유당 100mg
- [0130] 스테아린산 마그네슘 2mg
- [0131] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 정제를 제조한다.
- [0132] **1.4 주사제의 제조**
- [0133] 백기생 알코올 추출물 100mg
- [0134] 주사용 멸균 증류수 적량

[0135]	pH 조절제	적량
[0136]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0137]	1.5 액제의 제조	
[0138]	백기생 알코올 추출물	100mg
[0139]	설탕	20g
[0140]	이성화당	20g
[0141]	레몬향	적량
[0142]	정제수를 가하여 전체 1,00ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0143]	제제예 2. 건강기능식품의 제조	
[0144]	백기생 알코올 추출물	100mg
[0145]	비타민 혼합물	적량
[0146]	비타민 A 아세테이트	70 μ g
[0147]	비타민 E	1.0 mg
[0148]	비타민 B1	0.13 mg
[0149]	비타민 B2	0.15 mg
[0150]	비타민 B6	0.5 mg
[0151]	비타민 B12	0.2 μ g
[0152]	비타민 C	10 mg
[0153]	비오틴	10 μ g
[0154]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0155]	엽산	50 μ g
[0156]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0157]	무기질 혼합물	적량
[0158]	황산제1철	1.75 mg
[0159]	산화아연	0.82 mg
[0160]	탄제1인산칼륨	15 mg
[0161]	제2인산칼슘	55 mg
[0162]	구연산칼륨	90 mg
[0163]	탄산칼슘	100 mg
[0164]	염화마그네슘	24.8 mg
[0165]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조(예, 영양캔디 등)에 사용할 수 있다.	
[0166]	제제예 3. 건강기능성 음료의 제조	
[0167]	백기생 알코올 추출물	100mg

[0168]	구연산	1000 mg
[0169]	올리고당	100 g
[0170]	매실농축액	2 g
[0171]	타우린	1 g
[0172]	정제수를 가하여 전체	900 ml

[0173] 통상의 건강기능성 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.

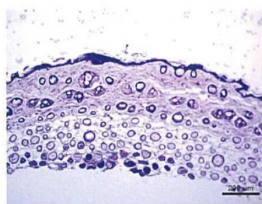
[0174] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조정하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0175] **제제예 4. 화장료의 제조**

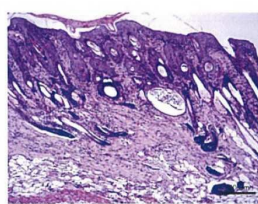
[0176]	백기생 알코올 추출물	100mg
[0177]	글리세린	3.0 mg
[0178]	하이드로제네이티드 레시친	1.0 mg
[0179]	세토스테아릴알콜	2.0
[0180]	폴리소르베이트 60	1.5
[0181]	항산화제	0.3
[0182]	방부제	적량
[0183]	정제수	적량

도면

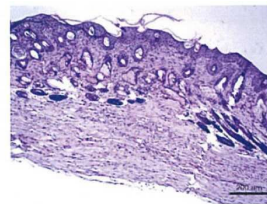
도면1



대조군

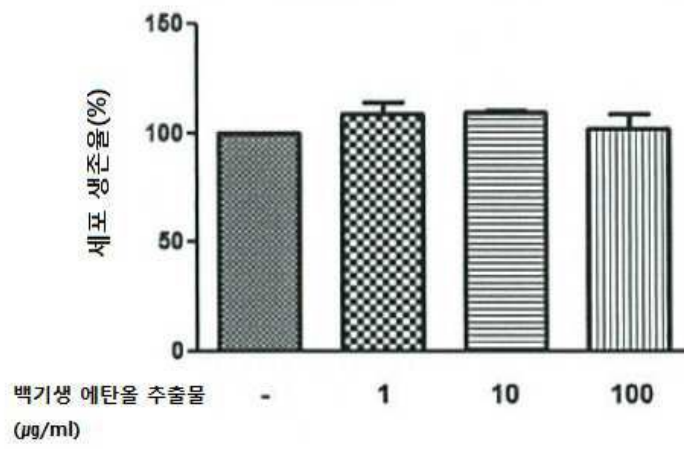


DNCB 처리군

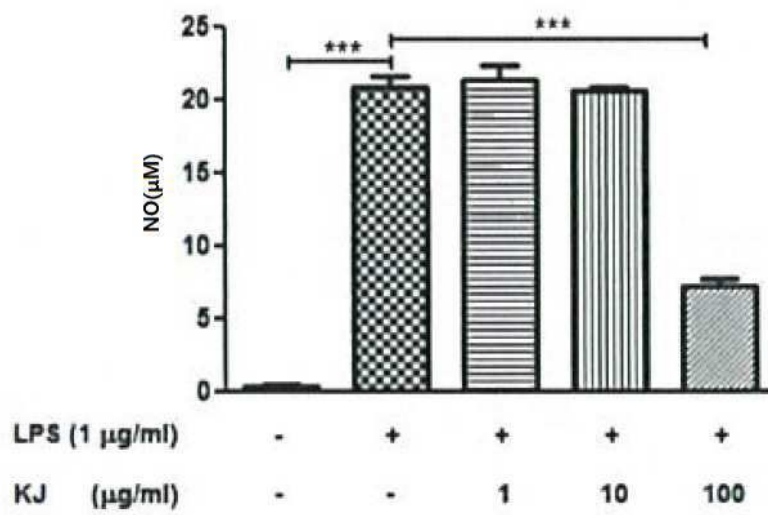


백기생 에탄올 추출물 처리군

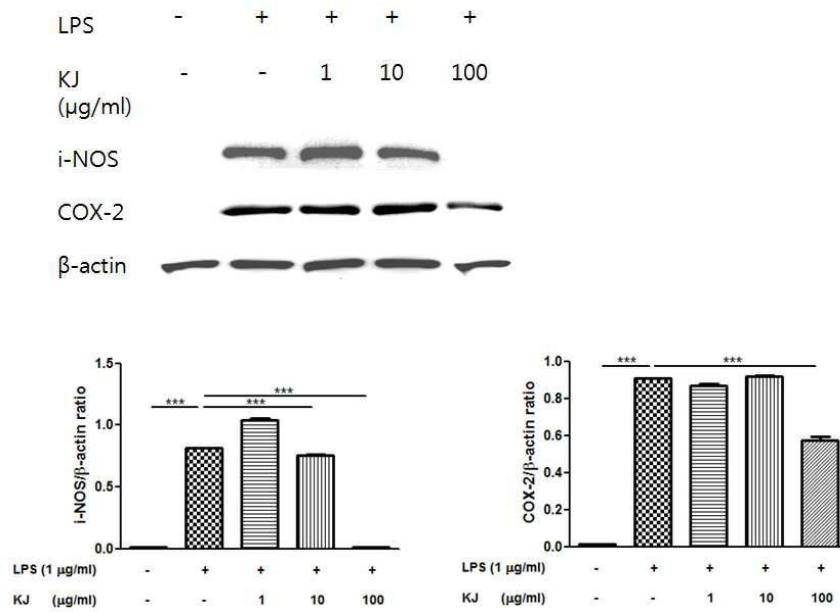
도면2



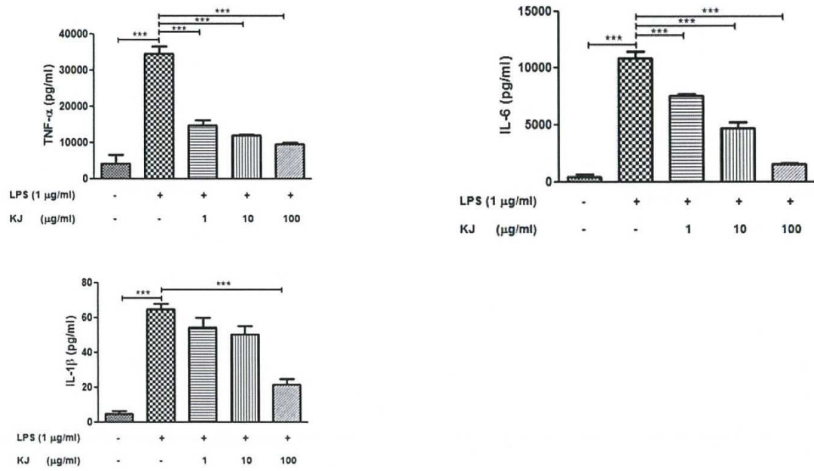
도면3



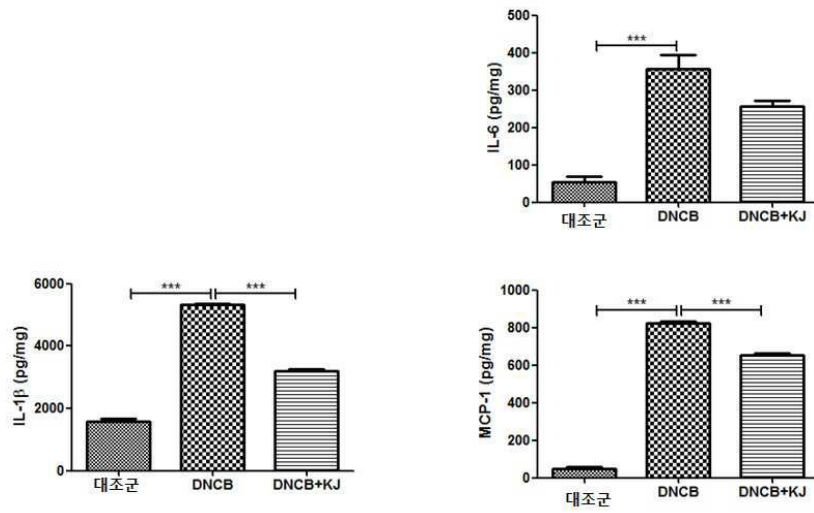
도면4



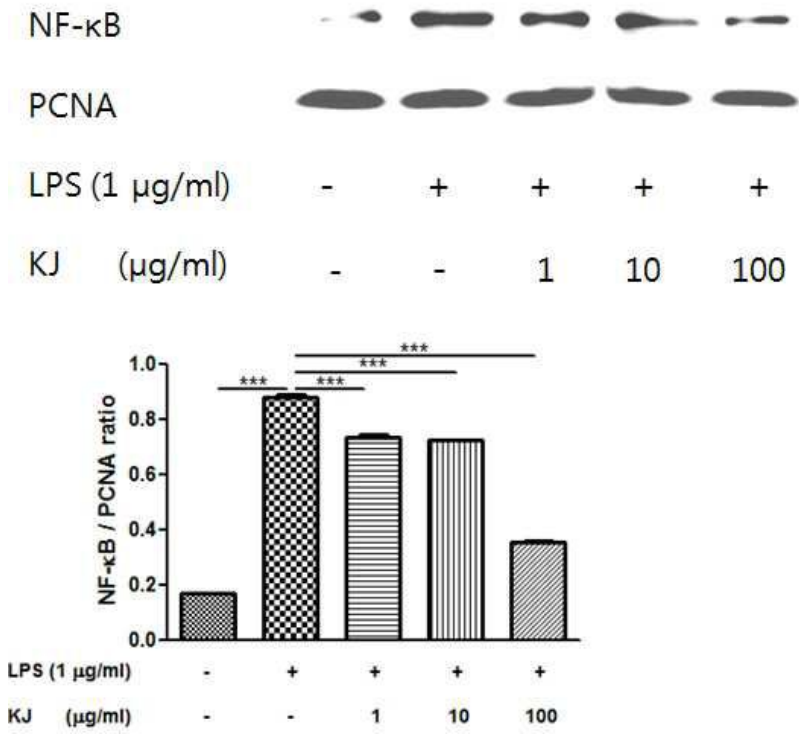
도면5



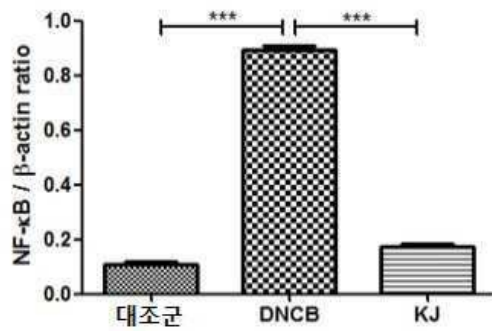
도면6



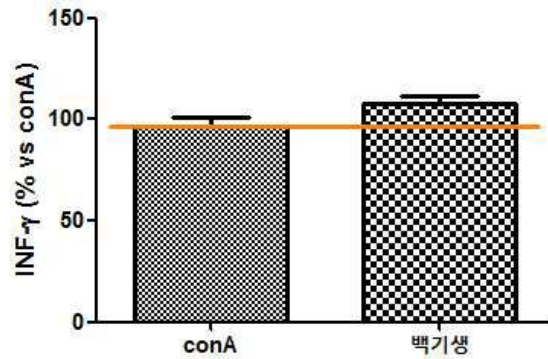
도면7



도면8



도면9



도면10

