



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0016127

(43) 공개일자 2016년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/532 (2006.01) A61K 36/53 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0099638

(22) 출원일자 2014년08월04일

심사청구일자 2014년08월04일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이태후

서울특별시 강남구 논현로 807 (신사동)

양정은

경기도 용인시 기흥구 흥덕4로30번길 28-14, 303호 (영덕동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

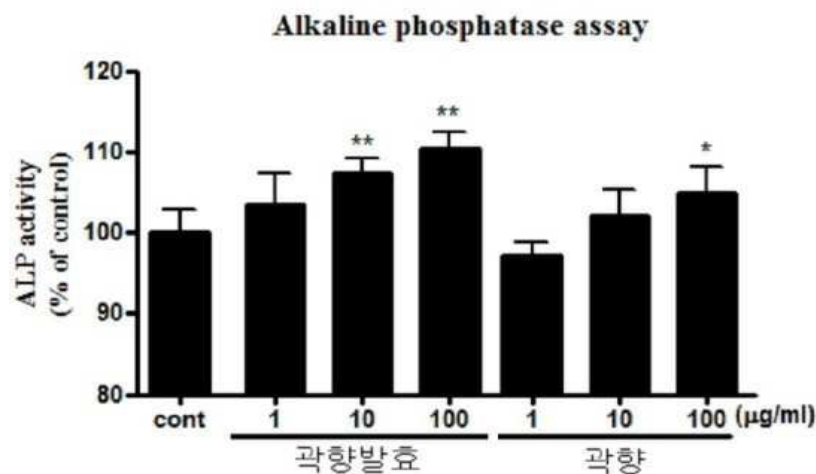
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **곽향 발효 추출물을 포함하는 치주질환 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 곽향 발효 추출물을 포함하는 치주질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 천연물로서 부작용이 적으며, 염증을 완화하고 치주인대세포의 치조골 형성을 활성화시키는 효과가 탁월하다. 따라서 효과적으로 치주질환을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

원경화

경기도 수원시 팔달구 고화로52번길 19-4 (고동동)

이돈길

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

박상용

경기도 수원시 영통구 광고중앙로 247, 3201동 907호 (하동, 휴먼시아아파트)

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

곽향(*Agastache*) 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는, 치주질환(periodontal disease)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

곽향(*Agastache*) 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는, 치주질환(periodontal disease)의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 곽향 발효 추출물은 곽향을 물, C1~C4 알콜, 및 C1~C4 알콜 수용액으로 이루어진 균으로부터 선택된 추출용매로 추출하여 얻어진 추출액을 유산균을 이용하여 발효시킨 발효액, 상기 발효액의 반건조물 또는 건조분말인 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) THK-aD110(수탁번호 KCTC 12638BP)인 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 치주질환은 치은염(gingivitis), 치주염(periodontal inflammation), 치조골 파손(alveolar bone breakage), 또는 치조골형성장애(alveolar bone osteodystrophy)인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 치조골형성장애는 치조골다공증(alveolar bone osteoporosis), 치조골연화증(alveolar bone osteomalacia), 또는 치조골감소증(alveolar bone osteopenia)인 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 경구투여용인 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 곽향 발효 추출물을 포함하는 치주질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 치아는 구조상 인체내 가장 단단한 경조직으로서 치조골(alveolar bone)에 의해 지지되고 있다. 치조골은 악골의 기저골에 단단히 부착되어 있고, 치근에 바로 인접한 2-3mm 부분을 치주골이라 칭하기도 하나, 통상 치조골이라 함은 상기 치주골을 포함한 경조직 모두를 지칭한다. 치조골이 낮아지면 치아 뿌리가 노출되어 풍치라고 부르는 증상이 나타난다. 또한, 치아가 상실되면 치조골도 점차 소실되는 경향이 있다.

[0003] 치주인대(periodontal ligament)는 평균 0.2mm 정도 두께의 층이며, 치아에 부착되어 치아를 치조골에 부착하고 지지하는 역할을 한다. 또한 치주인대는 치아가 음식을 씹을 때 치조골에 힘을 분산시켜 완충 작용을 하고, 치아의 감각을 치조골에 전달한다. 치주인대에는 미분화 간엽세포가 존재하고 있기 때문에 전체적인 구조와 기능이 변화되지 않으면서 지속적으로 골개조를 계속할 수 있다. 치주인대 내의 미분화 간엽세포는 치조골쪽으로 이동하여 치조골을 개조시키거나, 치아쪽으로 이동하여 교원섬유를 생산하여 치아를 더욱 단단히 지지하기도 한다.

[0004] 치주질환은 연령이 증가할수록 발병이 증가한다. 잇몸에만 치주질환이 국한된 경우 치은염이라고 하며, 이러한

염증이 잇몸과 잇몸뼈 주변까지 진행된 경우 치주염이라고 한다. 치주염이 진행되면 치주인대, 더 나아가 치조골까지 손상시킨다. 치조골 손상의 한 예로 치조골형성장애(alveolar bone osteodystrophy)가 있는데, 더욱 세분화하면 치조골다공증(alveolar bone osteoporosis), 치조골연화증(alveolar bone osteomalacia), 치조골감소증(alveolar bone osteopenia) 등을 포함한다. 치조골이 손상되면 결국 치아가 손실된다.

[0005] 현재 치주질환은 비외과적 혹은 외과적인 치석제거술, 치근활택술, 치은소파술, 치주 조직 재생술 등 외과적인 방법으로 주로 치료되고 있다. 그러나 이런 외과적인 치료 방법은 환자에게 고통을 주고 번거로울 뿐 아니라 질환을 예방하기보다는 질환이 어느 정도 진행된 경우에만 적용되는 것이다. 외과적인 치료 방법에 더하여 약물 치료로서 전신적으로 작용하거나 또는 국소 부위에서 서방출되는 항생제가 사용되고 있으나, 이 경우 불필요한 부위에도 약물이 너무 많이 전달되어 부작용이 발생할 수 있고 항생제 내성 박테리아에는 효과가 없다는 문제점이 있다.

[0006] 치주질환을 효과적으로 치료하기 위해서는 감염, 염증, 치주인대 및 치조골 손상이 복합적으로 치료되어야 하나, 현재까지 이러한 치료를 위한 약물이나 치료 방법에 개발되어 있지 않은 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 곱향 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는, 치주질환(periodontal disease)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 곱향 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는, 치주질환(periodontal disease)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 곱향 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는, 치주질환(periodontal disease)의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명에 있어서, 상기 곱향은 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 배초향속(genus *Agastache*)의 식물을 의미한다. 배초향속은 *Agastache aurantiaca*, *Agastache breviflora*, *Agastache cana*, *Agastache cusickii*, *Agastache foeniculum*, *Agastache mexicana*, *Agastache nepetoides*, *Agastache pallida*, *Agastache pallidiflora*, *Agastache pringlei*, *Agastache parvifolia*, *Agastache parvifolia*, *Agastache rugosa*, *Agastache rupestris*, *Agastache scrophulariifolia*, *Agastache wrightii*, *Agastache urticifolia* 등을 포함한다. 배초향속의 식물들은 다년생 초본이며 40~100cm로 곧게 자라며 많은 가지를 치고 있다. 줄기는 꿀풀과 식물의 특유의 모난줄기를 지니고 있으며 잎은 대상하는 난형 또는 난상심형으로 톱니가 있으며 끝은 뾰족하다. 꽃은 7월부터 9월 사이에 자주색으로 핀다. 그 화서는 윤산화서로서 독특하며, 과기는 10월이다. 본 발명의 곱향은 바람직하게는 *Agastache rugosa*이나, 이에 제한되지 않고 상기 배초향속에 속하는 식물들 중 임의의 것이 될 수 있다.

[0011] 본 발명의 곱향 발효 추출물은 상기 배초향속에 속하는 식물들의 지상부를 사용하여 제조할 수 있다.

[0012] 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 곱향 추출물을 추출한다. 곱향 추출물은 물, 탄소수 1~4의 알코올, 탄소수 1~4의 알코올 수용액으로 이루어진 군으로부터 선택된 추출용매로 추출하여 얻어질 수 있으며, 이렇게 얻어진 추출물, 그 추출물의 반건조물 또는 건조 분말이 될 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 추출 용매의 양은 곱향 건조 중량의 2 내지 15 배로 한다. 본 발명의 곱향 추출물은 곱향 추출물을 포함하는 조성물의 총중량에 대하여 0.1 중량% 내지 95 중량%의 함량을 가진다.

[0013] 본 발명의 곱향 발효 추출물은 곱향을 추출하고 발효시킨 것을 말한다. 본 발명의 일 구현예로서, 상기 곱향 발효 추출물은 유산균을 이용하여 발효시킨 발효액, 또는 상기 발효액의 반건조물 또는 건조 분말일 수 있다.

- [0014] 본 발명에 있어서 유산균(lactic acid bacteria)이란 당류를 발효하여 에너지를 획득하고 다량의 젖산을 생성하는 세균을 총칭하는 것으로, 예를 들어 락토바실러스(*Lactobacillus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 류코노스톡(*Leuconostoc*), 페디오코커스(*Pediococcus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 등이 유산균에 속한다. 바람직하게는 상기 유산균은 락토바실러스가 될 수 있고, 보다 바람직하게는 상기 유산균은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)가 될 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 유산균은 본 발명자들이 김치에서 분리 동정한 신종균인 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) THK-aD110(수탁번호 KCTC 12638BP)일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 약학적 조성물 또는 식품 조성물은 치주질환을 예방, 개선 또는 치료하는 데 사용할 수 있다. 치주질환(periodontal disease)은 잇몸뼈 및 인접 조직의 질환을 말한다. 치주질환은 세균 감염으로부터 시작되어 세균의 독소에 의해 염증반응이 진행되면 잇몸과 치아 사이에 치주낭(periodontal pocket)이 형성되고, 질환이 심해질수록 치주낭의 깊이가 깊어져서 치주인대로 염증이 파급되며 골소실이 일어나게 된다. 또는 치조골에서 골형성과 골흡수의 균형이 깨어져 골흡수가 골형성을 초과하여 골량이 한계 이하로 감소하면 치주질환의 일종인 치조골형성장애가 발생한다.
- [0016] 본 발명의 약학적 조성물 또는 식품 조성물이 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 치주질환은 치은염(gingivitis), 치주염(periodontal inflammation), 치조골 파손(alveolar bone breakage), 또는 치조골형성장애(alveolar bone osteodystrophy)일 수 있다. 치조골형성장애는 치조골다공증(alveolar bone osteoporosis), 치조골연화증(alveolar bone osteomalacia), 치조골감소증(alveolar bone osteopenia) 등을 포함한다.
- [0017] 상기 약학적 조성물은 상기 광학 발효 추출물을 유효성분으로 함유하고, 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 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 광물유 등을 포함한다.
- [0018] 또한, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함한다. 경구용 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구용 액상 제제는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 비경구용 제제는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함한다.
- [0019] 본 발명의 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 조성물은 경구 또는 피하로 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로는 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 조성물 및 방법에 있어서, 유효성분의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기 광학발효 추출물은 1일 0.0001 내지 500 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 광학발효 추출물을 0.001 내지 50 % 중량백분율로 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.
- [0022] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제672호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0023] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정 이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한

규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0024] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0025] 본 발명의 건강 기능성 식품 조성물은 치주질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 환 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다. 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태일 수 있다.

[0026] 본 발명의 식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.

[0027] 본 발명은 광항 발효 추출물을 환자에게 투여하여 치주질환을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 천연물로서 부작용이 적으며, 염증을 완화하고 치주인대세포의 치조골 형성을 활성화시키는 효과가 탁월하다. 따라서 효과적으로 치주질환을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 NO 생성 억제 활성을 평가하여 나타낸 그래프이다.

도 2는 치주인대세포의 알칼리성 포스파타아제의 활성 증가를 평가하여 나타낸 그래프이다.

도 3은 치주인대세포의 광화(mineralization) 활성 증가를 평가하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0031] 제조예. 광항 발효 추출물의 제조

[0032] 김치로부터 신종균을 동정하고 락토바실러스 브레비스(Lactobacillus brevis) THK-aD110(이하 aD110)로 명명하였다. 상기 aD110을 MRS 브로스 1%(w/v) 농도로 접종하여 30℃ 배양기에서 48시간 동안 배양하여 aD110 배양액을 제조하였다.

[0033] 건조된 광항(베스트허브, KR)을 10-20 mm로 분쇄하여 무게 대비 10배 부피의 물을 첨가하여 고루 섞은 후 85℃에서 4시간동안 정치하여 열수 추출하였다.

[0034] 증류수에 상기 광항 추출물 20%, 2% 수크로스, 1% 효모 추출물, 및 상기 aD110 배양액(w/v)을 첨가하고, 이를 30℃ 배양기에서 5일간 배양한 후 여과하여 균체를 제거하고, 동결건조하여 광항 발효 추출물을 제조하였다.

[0035] 대조군인 광항 추출물은 aD110을 접종하여 배양하는 단계를 제외하고 열수 추출물을 바로 동결 건조하여 제조하였다.

[0036] 실시예 1. 광항 발효 추출물의 NO 생성 억제 활성 평가

[0037] 높은 농도의 NO는 염증반응을 유발하여 치주인대세포의 증식과 분화를 억제하나, 낮은 농도의 NO는 염증반응을 억제하여 치주인대세포의 기능을 자극하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 발명의 광항 발효 추출물이 NO 생성을 억제하는지 여부를 평가하였다.

[0038] Sherman et al.에 개시된 방법(Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, p1301 - 1308, 1993)을 변형하여 수행하였다.

- [0039] 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum)이 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, Cambrex, USA)를 포함하는 48 웰 플레이트에 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포주를 2.5×10^5 cell/ml로 접종하고, 5개 군으로 나누어 제1군에는 아무것도 첨가하지 않고, 제2군에는 LPS(10 ng/ml)만을 첨가하여 대식세포의 활성화를 유도하였다. 제3군은 다시 3개 군으로 나누어 광항 발효 추출물을 3-1군에는 1 μ g/ml, 3-2군에는 10 μ g/ml, 3-3군에는 100 μ g/ml을 각각 LPS(10 ng/ml)와 함께 첨가하였다. 제4군도 다시 3개 군으로 나누어 광항 추출물을 4-1군에는 1 μ g/ml, 4-2군에는 10 μ g/ml, 4-3군에는 100 μ g/ml을 각각 LPS(10 ng/ml)와 함께 첨가하였다. 각각을 이산화탄소 항온 배양기(5 % 이산화탄소, 95 % 상대습도, 37℃)에서 24시간 동안 배양하였다.
- [0040] 상기 배양액 각각에 그리스 시약 (Griess reagent : 37.5 mM 설파닐릭 산 (sulphanilic acid), 12.5 mM N-(1-나프틸)에틸렌디아민디하이드로클로라이드 [N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydride], 6.5 mM 염산) 50 μ l를 첨가하고, 그 후 분광광도계를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0~50 μ M 농도의 질산염을 사용하여 작성한 NO₂-농도-흡광도 상관 계수를 기준으로, 상기 배양액에서 RAW 264.7 세포에 의해 생성된 NO₂ 농도를 계산하였다.
- [0041] 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1에서 광항 발효 추출물이 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하며, NO 생성 억제 효과는 발효되지 않은 광항 추출물보다 유의하게 높은 것을 알 수 있다(도 1에서, *는 p-value < 0.05, **는 p-value < 0.01, ***는 p-value < 0.001을 나타낸다).
- [0042] 상기 결과로부터 본 발명의 광항 발효 추출물이 NO 생성을 억제하여 염증반응을 억제하고 치주인대세포의 작용을 자극함을 알 수 있다.
- [0043] **실시예 2. 광항 발효 추출물의 알칼리성 포스파타아제 활성화 평가**
- [0044] 알칼리성 포스파타아제(Alkaline phosphatase, ALP)는 치주인대세포 분화의 초기 지표로 알려져 있다. 따라서 본 발명의 광항 발효 추출물이 알칼리성 포스파타아제 활성을 증가시키는지 여부를 평가하였다.
- [0045] 인간 치주인대세포 (Periodontal ligament progenitor cells, PDLC)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 1×10^5 cell/ml로 분주하고 다시 상기 세포 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.
- [0046] 배양된 세포를 3개 군으로 나누어 제1군에는 아무런 처리를 하지 않고, 제2군은 다시 3개 군으로 나누어 2-1군에는 1 μ g/ml, 2-2군에는 10 μ g/ml, 2-3군에는 100 μ g/ml의 광항 추출물을 첨가하고, 제3군은 다시 3개 군으로 나누어 3-1군에는 1 μ g/ml, 3-2군에는 10 μ g/ml, 3-3군에는 100 μ g/ml의 광항 발효 추출물을 첨가하였다. 72시간이 경과한 후, 플레이트에서 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 0.15 % Triton X-100 을 50 μ l 씩 넣은 다음 37℃ 배양기에서 30 분간 배양하여 세포를 용해(lysis)시켰다. 그 후, 3,000 rpm에서 5 분간 원심분리한 다음 40 μ l 의 상등액과 0.1 N glycine 40 μ l, 100 mM p-nitrophenylphosphate(p-NPP) 20 μ l 를 첨가한 뒤 37℃ 배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.1 N NaOH 50 μ l 를 넣어 반응을 정지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP 효소에 의해 p-NPP 가 p-nitrophenol(p-NP) 로 전환된 양을 산출함으로써 ALP 활성을 측정하였다.
- [0047] 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2에서 광항 발효 추출물이 농도 의존적으로 ALP 활성을 증가시키며, ALP 활성 증가 효과는 발효되지 않은 광항 추출물보다 유의하게 높은 것을 알 수 있다(도 2에서, *는 p-value < 0.05을 나타내며, **는 p-value < 0.01을 나타낸다).
- [0048] 상기 결과로부터 본 발명의 광항 발효 추출물이 ALP 활성을 증가시켜 치주인대세포 분화를 촉진함을 알 수 있다.

[0049] **실시예 3. 광항 발효 추출물의 광화 촉진 평가**

- [0050] 치주인대세포는 칼슘을 생산하여 세포 외부로 방출한다. 따라서 치주인대세포를 배양시키는 배지에서 세포 주위로 칼슘이 축적되는 광화작용(mineralization)이 일어난다. 따라서 본 발명의 치주인대세포의 광화작용을 증가

시키는지 여부를 평가하였다.

- [0051] 인간 치주인대세포를 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 1×10^5 cell/ml로 분주하고 다시 상기 세포 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.
- [0052] 아스코르브산 (ascorbic acid)과 베타-글리세로포스페이트 (beta- glycerophosphate)를 각각 50 ug/ml과 10 mM의 농도로 배지에 첨가하여 치주인대세포를 활성화시켰다. 활성화된 세포를 3개 군으로 나누어 제1군에는 어떤 물질도 첨가하지 않고(대조군), 제2군은 다시 4개 군으로 나누어 2-1군에는 1 µg/ml, 2-2군에는 5 µg/ml, 2-3군에는 10 µg/ml, 2-4군에는 50 µg/ml의 광향 추출물을 배양 배지에 첨가하고, 제3군은 다시 4개 군으로 나누어 3-1군에는 1 µg/ml, 3-2군에는 5 µg/ml, 3-3군에는 10 µg/ml, 3-4군에는 50 µg/ml의 광향 발효 추출물을 배양 배지에 첨가하였다. 3일 간격으로 상기 광향 발효 추출물 또는 광향 추출물이 포함된 배지로 교환하고 24일 동안 배양하였다.
- [0053] 그 후 각 세포를 10% 포르말데하이드 (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 550nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0054] 결과는 도 3에 나타내었다. 도 3에서 광향 발효 추출물이 농도 의존적으로 치주인대세포의 광화 활성을 증가시킨 것을 알 수 있다.
- [0055] 상기 결과로부터 본 발명의 광향 발효 추출물이 치주인대세포의 광화 활성을 증가시켜 골의 광화를 촉진시킴을 확인할 수 있다.

수탁번호

[0056]

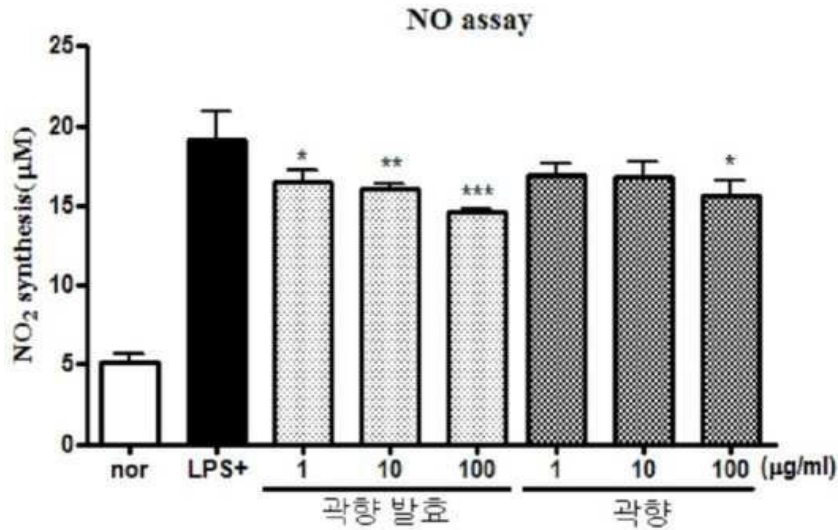
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12638BP

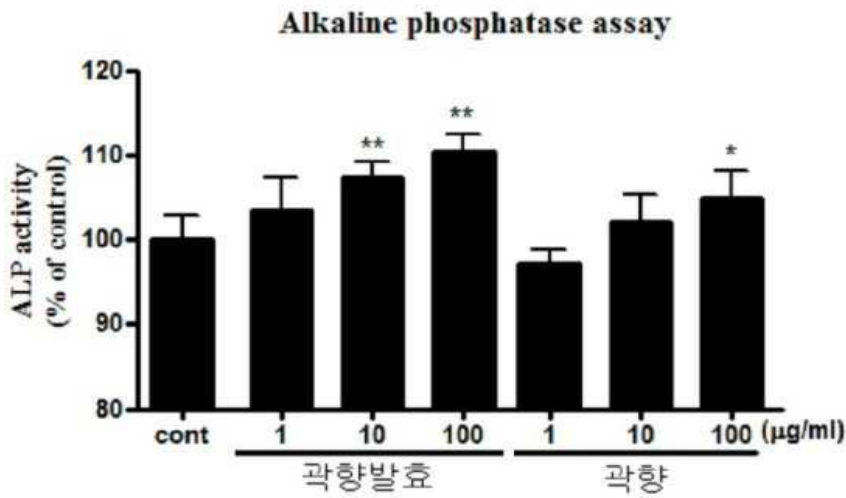
수탁일자 : 20140729

도면

도면1



도면2



도면3

