



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월27일
 (11) 등록번호 10-1167589
 (24) 등록일자 2012년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0082023
 (22) 출원일자 2011년08월18일
 심사청구일자 2011년08월18일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020110068923 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전라남도생물산업진흥재단
 전남 나주시 동수동 산15-1
 (72) 발명자
이동욱
 전라남도 장흥군 장흥읍 건산리 670 수창아트빌 203호
최철웅
 광주광역시 서구 풍암순환로 14, 호반중흥1단지 105동 203호 (풍암동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 3 항

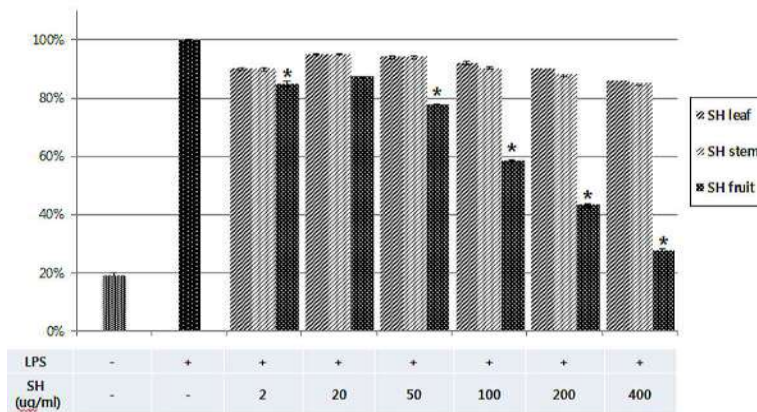
심사관 : 김희수

(54) 발명의 명칭 **멸꼴 열매 추출물을 포함하는 항염증제**

(57) 요약

본 발명은 멸꼴 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물에 관한 것이다. 상기 멸꼴 열매 추출물은 세포 독성이 없을 뿐만 아니라, 염증과 관련된 여러 사이토카인(cytokine)의 mRNA의 전사 수준 및 NO 분비량을 확인한 결과, 멸꼴의 여러 부위 중 멸꼴 열매가 가장 효과적으로 염증을 저해할 수 있으며, 특히 멸꼴 열매의 열수 추출물의 부탄올 분획이 염증 효과가 유의적으로 가장 우수하다는 것을 확인하여 완성한 것으로, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 항염 조성물은 염증과 관련된 질병에서 염증을 억제하는 항염증제 및 항염효과가 있는 화장품 조성물 등으로 응용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

반상오

광주광역시 북구 평교로29번길 23 (문흥동)

설희진

광주광역시 남구 봉선2로 96-14, 무등2차아파트
203동 806호 (봉선동)

장육진

전라남도 장흥군 장흥읍 못골길 32, 102동 402호
(동산빌라)

이규욱

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136, 102동
103호 (성은연립)

김현

광주광역시 북구 서방로31번길 51 (중흥동)

박가현

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136, 성은빌라
102동 103호

김선오

광주광역시 북구 연제동 36-1 현대아파트 101-605

김재갑

경기도 부천시 소사구 송내 589 삼익아파트 2동
507호

특허청구의 범위

청구항 1

멸꿀(*Stauntonia Hexaphylla*) 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 멸꿀 열매 추출물은 멸꿀 열매를 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 추출한 것인 항염 약학적 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항의 항염 약학적 조성물을 유효성분으로 포함하는 항염증제.

청구항 5

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 항염효과가 있는 식물 추출물, 구체적으로 멸꿀 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증은 외부에서 들어온 해로운 물질이나 유기체 등과 같은 여러 요인에 의하여 세포나 조직이 손상을 입거나 파괴되었을 때 그 손상을 최소화하고 손상된 부위를 원상으로 회복시키기 위하여 국소적으로 일어나는 면역반응으로서, 생체를 보호하고 조직 손상으로 생성된 산물들을 제거하는데 유용한 방어 메카니즘이다. 상기 방어 메카니즘에 의해, 결과적으로 통증, 부종, 발적 또는 발열 등이 일어나 기능장애가 유발되기도 한다. 상기 염증을 유발하는 여러 요인에는 외상, 화상, 동상, 방사능 등에 의한 물리적 요인, 산(acid)과 같은 화학물질에 의한 화학적 요인 및 항체반응에 의한 면역학적 요인들이 있으며, 그 외에 혈관이나 호르몬 불균형에 의해 발생되기도 한다.

[0003] 상기 염증은 정상적인 경우에는 생체 내에서 염증반응을 통하여 발병 요인을 중화시키거나 제거하고 상한 조직을 재생시켜서 정상적인 구조와 기능을 회복시키는 작용을 하지만, 염증의 정도가 일정 수준 이상이 되거나 만성화되어 만성염증과 같은 질병 상태로 진행되는 경우 문제가 된다. 임상질환 가운데 거의 모든 질환에서 염증반응을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 암발생과정(carcinogenesis)에서도 염증 반응과 관련된 효소들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 최근 밝혀진 바에 의하면, 체내에서의 염증반응의 진행은 COX(cyclooxygenase) 효소 활성화와 관련된 것으로 알려져 있다. 상기 COX 효소는 생체 내에 존재하는 프로스타그란딘(prostaglandin)의 생합성에 관여하는 주 효소로서(Smith 등, J. Biol.Chem., 271, 33157(1996)), 두 종류의 이성 효소인 COX-1과 COX-2가 존재하는 것으로 알려져 있다. 상기 COX-1은 위나 신장과 같은 조직에 일정하게 존재하며, 정상적인 항상성을 유지하는데 관여하는 반면, 상기 COX-2는 염증이나 기타 면역 반응 시 세포분열인자(mitogen)나 사이토카인(cytokines)류에 의해 세포 내에서 일시적이고 빠르게 발현되는 효소이다.

[0005] 또 하나의 강력한 염증 매개물인 나이트릭 옥사이드(Nitric oxide, NO)는 NO 합성효소(NOS)에 의해 L-알지닌으로부터 생성되며, UV와 같은 외부 스트레스나 엔도톡신 또는 사이토카인과 같은 물질에 의해 많은 종류의 세포

에서 생성된다. 상기와 같은 염증 자극들은 세포 내의 유도성 NOS(iNOS)의 발현을 증가시키고, 이를 통하여 세포내에서 NO 생성을 유도하여, 대식 세포를 활성화시킴으로써 염증 반응을 일으킬 수 있다.

[0006] 따라서, 최근 효과적인 염증 완화를 위하여, NO의 생성을 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 이러한 연구에 의해 개발된 항염물질의 경우 몇 가지 부작용이 문제되고 있다. 일 예로, 급성 또는 류마티스성 관절염과 같은 만성 염증 질환의 치료에 사용되는 비스테로이드성 소염 약물들은 COX-2 효소를 억제할 뿐만 아니라 COX-1 효소도 억제함으로써 위장관 장애와 같은 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0007] 한편, 일상생활에 사용되는 화장품은 피부를 보호하고 미화 청결을 위해 사용되는 제품이지만 화장품 조성물을 살펴보면 피부 보호 목적과는 상이한 성분들이 제품 형성에 필수 불가결한 존재로서 사용된다. 예를 들어, 계면활성제, 방부제, 향료, 자외선 차단제, 색소 및 기타 효능이나 효과를 부여하기 위해 쓰이는 여러 가지 성분들을 들 수 있다. 상기 화장품 제조에 필수적으로 사용되는 성분은 일반적으로 피부에 염증이거나, 뾰루지 또는 부종 등과 여러 가지 부작용을 발생시키는 것으로 알려져 있다.

[0008] 또한, 체내로부터 배출되는 피지 성분, 땀 성분 및 화장품 성분 중의 지방산, 고급 알코올, 단백질 등이 피부 상에 존재하는 피부 상재 균들에 의해 독성이 강한 물질로 분해되면, 이들에 의해 피부 염증이 유발될 수도 있으며, 태양으로부터 나오는 자외선에 의해서도 피부 염증이 유발된다는 것은 잘 알려진 사실이다.

[0009] 이렇듯 화장품에 있어서 피부 부작용 유발요인은 항상 잠재되어 있으며 이를 해결 하고자 여러 가지 연구가 진행되어 왔다. 현재까지 홍반이나 부종 같은 자극완화 및 염증 완화 목적으로 이용되고 있는 물질로는 비스테로이드계로 플루페나믹산(flufenamic acid), 이부프로펜(ibuprofen), 벤지다민(benzdamine), 인도메타신(indomethacin)등이 있고, 스테로이드계로는 프레드니솔론(prednisolone), 텍사메타손(dexamethasone) 등이 있으며, 알란토인, 아즈렌, ε-아미노키프론산, 하이드로코티존, 감초산 및 그 유도체(β-글리칠레친산, 글리칠레친산 유도체) 등이 항염증에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0010] 그러나, 일반적으로 항염제로 쓰이는 상기 인도메타신은 화장료에는 사용할 수 없는 물질이고, 상기 하이드로코티존은 사용량이 제한되어 있으며, 감초산 및 그 유도체는 안정화시키기 어렵거나 용해도가 좋지 않아 실제 적용 시 농도의 제한으로 인하여 실질적인 효과를 거두기가 어려운 점이 있는 등 지금까지 알려진 항염제는 피부 안전성 면이나 화장료 배합시의 안정성 면에서 대부분 문제점을 가지고 있어서 그 사용이 제한되고 있다.

[0011] 그러므로, 천연물질 유래 물질로 이러한 부작용이나 세포독성에 대한 위험이 없거나 적으면서, 효과적으로 NO의 생성을 억제할 수 있어 항염효과가 우수하여, 부작용 없이 염증을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 그 함량의 제한 없이 화장료에 사용될 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다.

[0012] 특히, 최근에는 소비자들의 욕구에 부응하기 위하여 천연 원료를 이용한 화장료에 대한 연구개발이 활발히 진행되고 있는 실정이다.

[0013] 천연 원료, 특히 식물 추출물을 이용한 항염 조성물과 관련하여, 공개특허 제2006-0125489호나 등록특허 제 0786358호 등이 있고, 복합소재를 이용한 공개특허 제2007-0081293호나 공개특허 제2010-0105346호 등이 있으며, 화장료 조성물과 관련하여, 공개특허 제2010-0018813호나 공개특허 제2010-0107826 등이 있으나, 상기 조성물의 유효성분은 멀꿀과 상이한 식물에 해당하여, 멀꿀을 이용한 항염제 또는 멀꿀의 항염효과를 이용한 조성물에 대한 자료는 아직 제시되지 아니하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 부작용과 관련된 문제가 발생될 가능성이 적은 식물 추출물을 유효성분으로 하는 항염 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0015] 또한, 기존의 항염물질과 달리 식용으로 사용될 수 있는 천연식물에서 비롯하여 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수할 뿐만 아니라, 염증과 관련된 NO 생성을 억제할 수 있는 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증제 또는 화장품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 멀꿀 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물을 제공한다.

- [0017] 상기 멸균 열매 추출물은 멸균의 다른 부위에 비하여, NO 분비를 효과적으로 억제할 수 있고, 염증과 관련된 여러 사이토카인(cytokine)의 mRNA의 전사량을 제어할 수 있으며, 멸균 열매의 열수 추출물의 부탄올 분획은 다른 분획에 비하여 NO 분비를 효과적으로 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 천연물로부터 유래된 것으로 부작용이 문제 될 가능성도 낮고, MTT 분석 결과 세포 독성도 없는 것으로 확인되었다.
- [0018] 따라서, 본 발명의 항염 조성물은 항염증제의 유효성분 또는 염증을 억제하기 위한 목적으로 화장료 조성물의 유효성분으로 제공될 수 있다.
- [0019] 본 발명자들은 멸균 추출물이 항염효과가 있으며, 특히 멸균 열매 추출물이 다른 부위에 비하여 염증을 직접적으로 유도할 수 있는 NO의 분비를 효과적으로 억제할 수 있고, 상기 NO의 분비 및 염증을 유발하는 염증과 관련된 사이토카인의 mRNA 전사를 효과적으로 억제할 수 있으며, 상기 멸균 열매의 열수 추출물의 부탄올 분획물은 다른 분획용매를 이용한 분획물에 비하여 현저하게 우수한 NO 생성 억제 효과가 있다는 결과를 통하여, 멸균 열매 열수 추출물, 특히 멸균 열매 열수 추출물의 부탄올 분획물이 항염효과가 우수하다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0021] 본 발명은 멸균 추출물, 바람직하게는 멸균 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 상기 멸균(*Stantonia hexapillya*)은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 으름덩굴과의 상록 덩굴 식물으로, 멸균나무라고도 한다. 상기 멸균은 암수 한그루로 원줄기는 약 5 m 정도 뻗어가고, 잎은 어긋나며 5개 내지 7개의 작은잎으로 된 손바닥모양 겹잎이다. 작은 잎은 두껍고 달걀모양 또는 타원형이며, 가장자리가 밋밋하다. 잎자루는 길이가 6 cm 내지 8 cm 정도이고, 작은 잎자루는 약 3 cm 정도이다. 꽃은 5월에 피고, 황백색이던 총상꽃차례에 달린다. 암꽃의 작은 꽃가지는 가을에 적갈색으로 되고, 많은 피목이 있어 거칠다. 열매는 장과로 달걀모양 또는 타원형이고 길이가 5 cm 내지 10 cm이며, 10월에 적갈색으로 익고 과육은 으름보다 맛이 좋다. 종자는 달걀모양의 타원형으로 흑색이다. 상기 멸균은 주로 한국, 일본, 타이완 또는 중국 등지에 분포한다. 우리나라에서는 주로 전라남도, 경상남도 및 충청남도 등의 남쪽지방의 계곡이나 숲 속에서 잘 생육한다.
- [0023] 상기 멸균 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 멸균의 열매, 꽃, 잎, 가지, 줄기, 뿌리 또는 껍질이나 이의 분쇄물, 바람직하게는 멸균의 열매에 추출용매를 가하여 추출함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다.
- [0024] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 회석수, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 회석수는 알코올을 50%(v/v) 내지 99.9%(v/v)로 물에 희석한 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 멸균 열매 추출물의 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 회석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 물일 수 있다. 상기 추출과정은 일 예로, 50℃ 내지 150℃, 또는 75℃ 내지 120℃, 또는 90℃ 내지 110℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간, 또는 30분 내지 6시간, 또는 2시간 내지 4시간일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 멸균 열매 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 열수추출법을 포함한 열 추출법, 냉침추출법, 온침추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 부탄올, 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매, 바람직하게는 부탄올로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다.
- [0028] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일예로 회전 증발기를 이용하여 감압

농축할 수 있으며, 상기 건조는 일예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

- [0029] 본 발명의 멸균 열매 열수 추출물을 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 경우 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 약 80% 수준으로 감소시키고, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 경우 약 78% 수준을 감소시켜, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 경우 약 60% 수준으로 감소시키고, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 경우 50% 미만으로 감소시켜, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 경우에도 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 80% 미만으로 감소시키지 못하는 멸균 잎(leaf) 열수 추출물 및 멸균 줄기(stem) 열수 추출물에 비하여 현저하게 우수한 항염 효과를 갖는 것으로 확인되었다. 또한, 멸균 열매 열수 추출물은 다양한 염증 유발 사이토카인의 mRNA 전사도 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0030] 또한, 상기 멸균 열매 열수 추출물에 대한 분획물에 대하여 실험을 수행한 결과, 멸균 열매 열수 추출물의 부탄올 분획물은 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 30% 정도로 감소시켜, 60% 수준의 NO가 생성된 핵산 분획물이나, 50% 수준의 클로로포름 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물에 비하여 항염효과가 매우 우수한 것으로 확인되었다.
- [0031] 한편, 멸균 열매 열수 추출물은 MTT 분석결과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 처리한 경우에도 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다.
- [0032] 따라서 상기 항염 조성물은 염증을 억제하거나 염증을 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 상기 염증은 일반적인 염증질환을 포함하는 개념이며, 일 예로 상기 염증질환은 각종 피부염, 알레르기, 전신성 홍반성 낭창, 망막염, 위염, 간염, 장염, 췌장염 및 신장염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 상기 알레르기는 과민증(anaphylaxis), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 천식(asthma), 알러지성 결막염, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 접촉성 피부염, 두드러기(urticaria), 곤충 알러지, 식품 알러지 및 약물 알러지를 포함한다. 따라서, 본 발명의 항염 조성물은 염증질환의 치료 또는 예방용 조성물로 응용되거나, 상기 염증질환의 예방 또는 개선용 식품조성물로 응용될 수 있다. 상기 식품조성물은 일 예로 상기 염증질환의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [0033] 상기 건강기능식품은 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가 가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 상기 멸균 열매 추출물을 전체 식품 중량의 0.001 중량% 내지 99.9 중량% 또는 0.01 중량% 내지 50 중량% 또는 0.1 중량% 내지 30 중량% 또는 0.1 중량% 내지 15 중량% 포함될 수 있다.
- [0035] 상기 멸균 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0036] 상기 멸균 열매 추출물은 상기 항염 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 멸균 열매 추출물을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 멸균 열매 추출물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.
- [0037] 이 경우 상기 조성물 내 멸균 열매 추출물의 함량은 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 화합물의 함량은 바람직한 함량으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.
- [0038] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 또한, 상기 약학 조성물은 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로이드,

글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 멸골 열매 추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

- [0039] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지된 항염효과가 있는 것으로 인정된 물질, 일 예로 COX-2 저해제, NO 저해제 또는 항염증제 등으로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캡셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSPENSIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0042] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.
- [0043] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.
- [0044] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성물 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명은 또한, 상기 멸골 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물 또는 멸골 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증제를 제공한다.
- [0046] 상기 멸골 열매 추출물은 바람직하게는 멸골 열매 열수 추출물, 더욱 바람직하게는 멸골 열매 열수 추출물의 부탄올 분획물일 수 있다.
- [0047] 상기 항염증제는 상기 유효성분을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 혼합물로 제공되는 경우, 상기 유효성분은 항염증제 전체에 대해 0.1 중량% 내지 99.9 중량%로 포함될 수 있으나, 통상 0.001 중량% 내지 50 중량%의 함량으로 포함되는 것이 일반적이다.
- [0048] 상기 항염제는 류마티스 관절염, 루푸스, 다발성 경화증과 같은 각종 만성 염증 질환, 패혈증, 쇼크, 장기이식의 거부반응과 같은 각종 급성 염증 질환, 안과질환, 기관지염, 또는 염증성 장질환의 예방 및 치료의 목적으로 사용가능하다.
- [0049] 상기 담체 또는 부형제의 일예로는 물, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 락토스, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 담체 또는 부형제는 2종이상 사용될 수 있다.
- [0050] 또한 항염증제를 약제화하는 경우, 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있다.
- [0051] 또한 본 발명의 항염증제는, 상기 유효성분 이외에 공지된 항염활성을 갖는 화합물 또는 식물 추출물을 더욱 포

함할 수 있으며, 상기 유효성분 100 중량부에 대하여 각각 5 중량부 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.

- [0052] 항염증제의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다. 구체적인 제형의 예로는 경고제, 과립제, 로션제, 리니멘트제, 리모나데제, 산제, 시럽제, 안연고제, 액제, 에어로솔제, 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제, 연고제, 유동엑스제, 유제, 현탁제, 전제, 침제, 점안제, 정제, 좌제, 주사제, 주정제, 캡셀제, 크림제, 환제, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 등이 있다.
- [0053] 본 발명에 따른 항염증제는 경구 또는 비경구로 사용될 수 있으며, 예컨대 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내, 코안, 경막외 및 구강경로를 통하여 사용될 수 있으며, 이의 투여량은, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일례로, 본 발명의 항염증제는 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.1 mg/kg(체중) 내지 100 mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여가능하다. 그러나 상기한 투여량은 예시하기 위한 일례에 불과하며 상기 범위에 한정되지는 않는다.
- [0054] 본 발명은 또한, 상기 멸균 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물 또는 멸균 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0055] 상기 멸균 열매 추출물은 천연물질 유래이므로 부작용이 문제되지 아니하고, 세포독성도 없을 뿐만 아니라, 염증 억제 효과가 뛰어나기 때문에 항염 및 항자극 활성이 뛰어나므로, 화장품에 포함된 성분들에 의해 유도되는 염증 및 외부 환경에 의해 유도되는 염증을 효과적으로 제어할 수 다. 따라서, 상기 멸균 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물 또는 멸균 열매 추출물은 염증 개선 및 완화효과를 갖는 화장료 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.
- [0056] 상기 멸균 열매 추출물은 바람직하게는 멸균 열매 열수 추출물, 더욱 바람직하게는 멸균 열매 열수 추출물의 부탄올 분획물일 수 있다.
- [0057] 상기 화장료 조성물은 기초 화장료, 메이크업 화장료, 바디 화장료, 두발용 화장료, 두피용 화장료, 면도용 화장료 또는 구강용 화장료의 용도로 제공될 수 있다.
- [0058] 상기 기초 화장료의 예로는 크림, 화장수, 팩, 마사지 크림, 유액 등이 있고, 상기 메이크업 화장료의 예로는 파운데이션, 메이크업 베이스, 립스틱, 아이섀도, 아이라이너, 마스크라, 아이브로우 펜슬 등이 있으며, 상기 바디 화장료의 예로는 비누, 액체 세정제, 입욕제, 선스크린 크림, 선 오일 등이 있고, 상기 두발용 화장료의 예로는 샴푸, 린스, 헤어 트리트먼트, 헤어 무쓰, 헤어 리퀴드, 포마드, 헤어 칼라제, 헤어 블리치제 또는 칼라 린스 등이 있으며, 상기 두피용 화장료의 예로는 헤어 토닉 또는 스칼프 트리트먼트 등이 있고, 상기 면도용 화장료의 예로는 애프터셰이브로션 또는 셰이빙 크림 등이 있으며, 상기 구강용 화장료의 예로는 치약 또는 마우스 워셔 등이 있다.
- [0059] 상기 화장료 조성물에는 유효성분 외에 사용용도 및 화장료 조성물의 성질에 따라 통상 화장료 조성물에 배합되고 있는 성분, 일례로 보습제, 자외선 흡수제, 비타민류, 동식물 추출성분, 소화제, 미백제, 혈관확장제, 수렴제, 청량제, 호르몬제 등을 추가로 배합될 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 약물 또는 유효성분을 피부조직으로 침투 또는 이행시키기 위해서 필요한 기제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0060] 상기 화장료 조성물의 제형은 사용용도 및 화장료 조성물의 성질에 따라 적절한 형태를 취할 수 있으며, 일례로 수용액계, 가용화계, 유화계, 유액계, 겔계, 페이스트계, 연고계, 에어졸계, 물-기름 2층계 또는 물-기름-분말 3층계일 수 있으며, 상기 제형의 예는 단순한 예시일 뿐, 상기 예시에 의해 본 발명의 화장료 조성물의 제형 및 형태가 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 상기 유효성분은 상기 화장료 조성물 총 중량을 기준으로 0.001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하기로는 0.01 중량% 내지 20 중량%일 수 있으나, 상기 함량은 제형 또는 화장료 조성물에 함유되는 유효성분 외의 성분의 함량에 따라 적절히 조절할 수 있으며, 상기 함량에 의해 본 발명에 포함되는 유효성분의 함량이 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0062] 본 발명의 멸균 열매 추출물은 식용으로 사용되는 식물 유래 추출물로서 부작용이나 안전성에 대한 문제가 없고, MTT 분석 결과, 세포 독성이 없을 뿐만 아니라, 염증과 관련된 NO 분비량 및 여러 사이토카인(cytokine)의 mRNA의 전사여부에 미치는 영향을 통하여 확인한 결과, 효과적으로 염증을 저해할 수 있는 것으로 확인되었

다. 따라서, 상기 멸균 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물은 염증을 억제하여 염증과 관련된 질병을 치료 또는 예방하기 위한 항염증제 및 특정 체형 등과 관련하여 화장품 제조에 필수적으로 사용되는 성분 또는 외부환경으로 인한 피부의 염증을 효과적으로 억제할 수 있는 특징을 갖는 화장품 조성물 등에 응용될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 염증과 관련된 질병에 대한 치료와 관련된 의료산업 및 피부염증의 제어와 관련된 화장품 산업의 분야에서 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW 264.7 세포주를 이용하여, 멸균 열매 추출물의 세포독성을 MTT assay 법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 +는 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 또는 추출물을 처리한 것을 의미하고, -는 처리하지 않은 것을 의미하며, 가로축의 SH 수치는 멸균 열매 열수 추출물의 투여량($\mu\text{g}/\text{mL}$)을 나타내는 수치이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 멸균 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, NO 분비량을 측정한 결과를 나타낸 그래프로, +는 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함께 처리하였다는 것을 의미하고, -는 LPS를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축의 SH 수치는 멸균 열수 추출물의 투여량($\mu\text{g}/\text{mL}$)을 의미하고, 세로축은 NO 분비량을 나타내는 것이며, SH leaf은 멸균 잎 열수 추출물을 의미하고, SH stem은 멸균 줄기 열수 추출물을 의미하며, SH fruit은 멸균 열매 열수 추출물을 의미한다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 멸균 열매 열수 추출물의 분획물의 항염효과를 분획용매의 종류에 따라 확인하기 위하여, NO 분비량을 측정한 결과를 나타낸 그래프로, +는 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함께 처리하였다는 것을 의미하고, -는 LPS를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축은 멸균 열매 추출물의 분획물의 종류(분획용매별)를 나타내고, 세로축은 NO 분비량을 나타내는 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 대식세포(Macrophage primary cell)을 이용하여, 멸균나무 열매 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, 염증과 관련된 사이토카인의 mRNA 전사량을 RT-PCR법을 통하여 확인한 결과를 나타낸 사진으로, 상기 사진에서 +는 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함께 처리하였다는 것을 의미하고, -는 LPS를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축은 멸균 열매 열수 추출물의 투여량($\mu\text{g}/\text{mL}$)을 나타내는 수치이고, 세로축은 사이토카인의 종류를 나타내는 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 대식세포(Macrophage primary cell)을 이용하여, 멸균나무 열매 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, 염증과 관련된 사이토카인 중, TNF- α 의 생산량을 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 +는 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함께 처리하였다는 것을 의미하고, -는 LPS를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축은 멸균 열매 열수 추출물의 투여량($\mu\text{g}/\text{mL}$)을 나타내는 수치이고, 세로축은 TNF- α 의 생산량을 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 구체적인 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 보다 상세히 설명하기로 한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 보다 명확하게 이해시키기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 보호 범위는 특허청구범위에 의하여 해석되어야 하고, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0065] **<실시예 1> 멸균 열매추출물 및 분획물의 제조**

[0066] 멸균(*Stauntonia hexaphylla*)의 열매, 잎 및 줄기 각각 2,100g 을 열수 40L를 이용하여 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 열수추출법을 수행하여 열수 추출물을 제조하였다.

[0067] 보다 구체적으로, 증류수로 수세한 멸균 열매, 잎 및 줄기 각각 2,100g에 증류수 40L를 가한 후, 전기약탕기를 이용하여 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 가열하면서, 열수추출을 수행하였다. 상기 추출을 수행한 후, 400 메쉬 여과포로 여과한 다음, 수득한 여액을 감압회전농축기를 이용하여 농축하였다. 여과 후 남은 잔사에 다시 동량의 증류수를 사용하여 동일 과정으로 2번 더 추출, 여과 및 감압과정을 수행하였다. 상기 과정을 통해 제조된 멸균 부위별 열수추출액을 동결건조기(Freeze dryer)에서 동결건조 하였다. 상기 동결건조를 통하여, 148 g의 멸균 열매 열수 추출물을 얻었다(수율 7%).

[0068] 멸균 열매 열수 추출물의 분획물은 상기 열수 추출물 40g을 25배의 증류수 즉, 1 L의 증류수에 완전히 용해시킨

후, 분획여두에 넣고 헥산(Hexane) 1L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 헥산 층과 헥산 불용성층인 수층을 분리하고, 헥산 층만을 수득함으로써, 헥산 분획액을 제조하였고, 나머지 용액(수층)에 클로로포름 1L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 클로로포름 층과 클로로포름 불용성층인 수층을 분리하고, 클로로포름 층만을 수득함으로써, 클로로포름 분획액을 제조하였으며, 나머지 용액(수층)에 에틸아세테이트 1L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 에틸아세테이트 층과 에틸아세테이트 불용성층인 수층을 분리하고, 에틸아세테이트 층만을 수득함으로써, 에틸아세테이트 분획액을 제조하였으며, 나머지 용액(수층)에 부탄올 1L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 부탄올 층과 부탄올 불용성층인 수층을 분리하고, 부탄올 층만을 수득함으로써, 부탄올 분획액을 제조하였으며, 상기 얻어진 각각의 분획액을 감압여과 장치로 여과하여 농축한 후, -20℃에서 동결건조하여 용매를 완전히 제거한 뒤 본 실험에 사용하였다. 상기 과정을 통하여 0.1 g의 헥산 분획물, 0.6 g의 클로로포름 분획물, 2 g의 에틸아세테이트 분획물, 15 g의 부탄올 분획물을 수득하였다.

[0069] 상기 수득한 추출물 및 분획물은 실험에 사용하기 전까지 냉동보관하였다.

[0070] <실시예 2> 세포 독성 실험

[0071] 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물의 세포 독성을 측정하기 위하여, 쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 ATCC에서 구입하여 이용하였다.

[0072] 상기 세포의 배양(Cell culture)에 사용된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/ Nutrient Mixture Ham's F12), FBS(fetal bovine serum), L-글루타민(L-glutamine) 및 페니실린-스트렙토마이신은 Gibco/BRL(USA)에서 구입하였다.

[0073] 상기 RAW264.7 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 1% 페니실린 스트렙토마이신 및 1% L-글루타민을 첨가한 배양액을 사용하여 배양하였고, 37℃ 습윤한 CO₂ 배양기(5% CO₂ /95% air)에서 배양하였다. 상기 세포가 배양접시의 약 80%가 차게 배양시킨 후, PBS(pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 세척하고, 0.25% 트립신 및 2.56 mmol/L EDTA를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다.

[0074] 상기 배양한 세포는, 50,000 cells/well의 밀도로 48 well-plate에 분주하여, 24시간 더 배양하였다. 상기 24시간 경과 후, 아무런 처리를 하지 않고 LPS만 처리한 대조군과 LPS와 상기 실시예 1의 멸균 열매 추출물을 세포 생존에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 확인된 DMSO를 사용하여 다양한 농도로 제조된 멸균 열매 추출물을 처리한 실험군으로 나누어, 24시간 동안 더 배양시킨 후, 배양액을 제거하고 MTT 분석(MTT assay) 방법으로 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

[0075] 상기 MTT 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 우선, 세포배양 배지를 제거한 후 MTT를 1 mg/ml로 포함하는 DMEM/F12 배지를 웰 당 1 ml씩 처리하고, 37℃ 습윤한 CO₂ 배양기에서 4시간 더 배양하였다. 이후 배지를 제거한 후, tetrazolium bromide salt를 제거하고, DMSO 200 μl를 분주하여 각 웰에 생성된 포르마잔 크리스탈을 용해시키고, 마이크로 플레이트리더(BIO-RAD)에서 540 nm파장으로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다. 상기 멸균 열매 추출물로 처리한 결과는 상기 실험을 동일하게 3회 수행하여, 측정된 값의 평균 값으로 도 1에 나타내었다.

[0076] 상기 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물을 다양한 농도, 구체적으로 10 μg/ml 내지 200 μg/ml까지 농도별로 처리하고, 24시간을 처리한 경우에도, 아무런 시료를 처리하지 않고 LPS만 처리한 대조예와 비교한 결과, 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물을 다양한 농도로 처리한 경우 모두 세포의 증식에 별다른 영향을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 결과로부터 멸균 열매 추출물은 200 μg/ml까지는 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

[0077] <실시예 3> 부위별 항염효과 측정

[0078] 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 부위별 추출물의 항염 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 배양한 RAW264.7 세포를 이용하였다.

[0079] 상기 실시예 1에서 제조된 다양한 농도의 멸균 부위별 열수 추출물과 LPS를 함께 첨가한 후, 상기 실시예 2의 방법으로 24시간 배양한 뒤, 상기 24시간 배양하였다. 상기 배양한 배양액을 3,000 rpm으로 5분동안 원심분리하여 상층액을 분리하여, 상기 분리된 상층액에 동량의 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-

ethylenediamine dihydrochloride, 2% phosphoric acid, Promega, USA)을 처리하여 반응시킨 후, NO의 분비량을 540nm에서 측정하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0080] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군의 경우 낮은 NO 분비량이 확인되었다. 반면, LPS를 첨가한 실험군의 경우 LPS로 인해 염증이 유발됨으로써 NO의 함량이 현저하게 증가하는 것이 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고, 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물을 처리한 경우 농도의존적으로 NO 분비량이 감소되었고, 특히 멸균 열매 추출물의 경우 20 µg/ml를 처리하였을 때, LPS로 인해 염증을 유발시킨 대조군의 약 80%로 NO 분비량이 감소하였고, 50 µg/ml를 처리하였을 때, LPS로 인해 염증을 유발시킨 대조군의 80% 미만으로 NO 분비량이 감소하였으며, 100 µg/ml를 처리하였을 때, LPS로 인해 염증을 유발시킨 대조군의 60% 미만으로 NO 분비량이 감소하였고, 200 µg/ml를 처리하였을 때, LPS로 인해 염증을 유발시킨 대조군의 약 40% 수준으로 NO 분비량이 감소하였으며, 전체 농도에서 대조군의 80% 이하로 NO 분비량이 감소되지 않은 멸균 열매 추출물이나 멸균 줄기 추출물과 같은 멸균의 다른 부위 추출물에 비하여, 멸균 열매 추출물의 항염 효과가 더욱 우수한 것으로 확인되었다.

[0081] 멸균 열매 추출물은 상기 실시예 2에서 200 µg/ml를 처리하였을 때도 세포 생존에 영향을 미치지 아니하여, 세포독성이 없는 것으로 확인되었으므로, 본 발명의 멸균 열매 추출물은 세포 독성이 없고 안전할 뿐만 아니라, 항염효과도 우수한 것으로 확인되었다.

[0082] <실시예 4> 분획용매별 항염효과 측정

[0083] 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 부위별 추출물의 항염 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 배양한 RAW264.7 세포를 이용하였다.

[0084] 상기 실시예 1에서 제조된 다양한 농도의 멸균 부위별 열매 추출물과 LPS를 함께 첨가한 후, 상기 실시예 2의 방법으로 24시간 배양한 뒤, 상기 24시간 배양하였다. 상기 배양한 배양액을 3,000 rpm으로 5분동안 원심분리하여 상층액을 분리하여, 상기 분리된 상층액에 동량의 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride, 2% phosphoric acid, Promega, USA)을 처리하여 반응시킨 후, NO의 분비량을 540nm에서 측정하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0085] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군의 경우 낮은 NO 분비량이 확인되었다. 반면, LPS를 첨가한 실험군의 경우 LPS로 인해 염증이 유발됨으로써 NO의 함량이 현저하게 증가하는 것이 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고, 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물을 처리한 경우 농도의존적으로 NO 분비량이 감소되었고, 특히 멸균 열매 추출물의 경우 20 µg/ml를 처리하였을 때, LPS로 인해 염증을 유발시킨 대조군의 약 80%로 NO 분비량이 감소하였고, 50 µg/ml를 처리하였을 때, LPS로 인해 염증을 유발시킨 대조군의 80% 미만으로 NO 분비량이 감소하였으며, 100 µg/ml를 처리하였을 때, LPS로 인해 염증을 유발시킨 대조군의 60% 미만으로 NO 분비량이 감소하였고, 200 µg/ml를 처리하였을 때, LPS로 인해 염증을 유발시킨 대조군의 약 40% 수준으로 NO 분비량이 감소하였으며, 전체 농도에서 대조군의 80% 이하로 NO 분비량이 감소되지 않은 멸균 열매 추출물이나 멸균 줄기 추출물과 같은 멸균의 다른 부위 추출물에 비하여, 멸균 열매 추출물의 항염 효과가 더욱 우수한 것으로 확인되었다.

[0086] 멸균 열매 추출물은 상기 실시예 2에서 200 µg/ml를 처리하였을 때도 세포 생존에 영향을 미치지 아니하여, 세포독성이 없는 것으로 확인되었으므로, 본 발명의 멸균 열매 추출물은 세포 독성이 없고 안전할 뿐만 아니라, 항염효과도 우수한 것으로 확인되었다.

[0087] <실시예 5> 염증관련 사이토카인 mRNA 수준 측정을 통한 항염효과 확인

[0088] 상기 실시예 3에서 NO 분비량을 통하여 항염 효과가 우수한 것으로 확인된 멸균 열매 열수 추출물의 항염효과를 다시 확인하기 위하여, 염증반응과 관련된 사이토카인(cytokine)의 mRNA 함량의 변화를 primary cell을 이용하여 확인하였다.

[0089] 상기 primary cell을 수득하기 위하여, 체중이 15 g 내지 20 g된 4주령의 수컷 생쥐(ICR mouse, male)와 Sprague-Dawley 쥐를 실험용 사에서 각각 32마리씩 구입하여, 각각 16군으로 나누고, 각 군당 4마리씩 배치하여 사육하였다. 상기 실험동물의 사육은 20℃ 내지 24℃의 온도 조건, 60% 내지 70%의 습도조건 및 12시간 주기의 주야조명 조건으로 수행하였고, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 상기 식이는 고탄사료(삼양사료, 대

한민국)를 이용하였다. 상기 실험동물은 상기 조건으로 7일간 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다.

[0090] 상기 실험동물로부터 수득한 대식세포(Macrophage primary cell, 2×10^6 cells/ml)를 serum starvation medium으로 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, LPS(0.5 mg/ml) 또는 LPS(0.5 mg/ml)와 다양한 농도의 멀꿀 열매 열수 추출물로 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 상기 24시간 후, 상기 배양된 각각의 세포로부터 RNA를 분리하였다. 상기 RNA의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0091] 구체적으로, 상기 배양한 세포를GIT solution(easy BLUE Total RNA extraction kit, (주)인트론바이오테크놀로지)으로 용해(lysis)시키고, 실온에서 10,000 rpm 조건으로 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하고 펠렛(pellet)을 수득하였다. 상기 펠렛에 0.1% DEPC solution(Sigma, USA) 1 ml을 첨가하고, 12,000 rpm 조건으로 2분간 다시 원심분리를 하여 상등액을 제거한 후, 펠렛을 수득하였다. 상기 수득한 펠렛에 구아니디움(guanidinium) 0.5 ml을 첨가하여 볼텍싱(vortexing)하였다. 추가로, phenol/chloroform/iso-amylalchol 혼합용액(25:24:1)을 0.5 ml 첨가하고, 볼텍싱한 후, 12,000 rpm의 조건으로 3분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 상기 상등액과 동량의 이소프로필알코올(iso-propylalcol)을 첨가하고 잘 혼합한 후, -20℃에서 30분간 방치시켰다. 이 후, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상등액을 제거시킨 후, 펠렛을 70% 에탄올 수용액으로 씻어 내고(washing), 진공 하에 건조시켜 RNA를 분리하였다.

[0092] 상기 분리된 RNA는 0.1% DEPC용액 1 ml에 녹여 염증 관련 사이토카인의 mRNA 함량을 측정하기 위해 사용하였다.

[0093] 상기 염증 관련 사이토카인인 IL-1 β , IFN- γ 및 TNF- α 의 mRNA 함량 측정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0094] 상기 분리된 RNA 3 μ g에 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, USA)를 첨가하고, 42℃에서 1시간 45분 동안 incubation한 후, 70℃에서 15분 동안incubation하여, cDNA를 수득하였다. 상기 수득한 cDNA는 real-time PCR법으로 정량하였다. 상기 real-time PCR을 수행하기 위한 Primer의 서열과 실험조건은 하기 표 1에 기재하였다.

표 1

확인대상 mRNA	Primer sequence		Annealing Tm(℃)
TNF- α	sense	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC	62.2
	anti-sense	ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG	
IFN- γ	sense	GCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG	50
	anti-sense	GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG	
IL-1 β	sense	TGCAGAGTTCCTACATGGTCAACC	55
	anti-sense	GTGCTGCCTAATGTCCCTTGAATC	

[0096] 상기 real-time PCR 결과는 β -actin 함량과 함께 비교하여 사진으로 촬영한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0097] 상기 도 4에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군은 염증과 관련된 사이토카인(cytokine)인 IL-1 β 의 mRNA, IFN- γ 의 mRNA 및 TNF- α 의 mRNA가 전혀 확인되지 아니한 반면, LPS만을 처리한 경우 현저하게 높은 IL-1 β 의 mRNA, IFN- γ 의 mRNA 및 TNF- α 의 mRNA가 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고 상기 실시예 1에서 제조된 멀꿀 열매 추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 IL-1 β 의 mRNA, IFN- γ 의 mRNA 및 TNF- α 의 mRNA 함량이 감소되는 것이 확인되었고, 특히 IL-1 β 의 mRNA 함량은 현저하게 감소되는 것으로 확인되었다.

[0098] <실시예 6> 염증관련 사이토카인 TNF- α 수준 측정을 통한 항염효과 확인

[0099] 상기 실시예 4에서 염증반응과 관련된 사이토카인(cytokine)의 mRNA 함량의 변화를 통하여 항염 효과가 우수한 것으로 확인된 멀꿀 열매 열수 추출물의 항염효과를 다시 확인하기 위하여, 염증반응과 관련된 사이토카인(cytokine) 중, TNF- α 의 변화를 primary cell을 이용하여 확인하였다.

[0100] 상기 primary cell은 상기 실시예 5와 같은 방법으로 실험동물을 사육하고 수득하였다. 상기 실험동물로부터 수득한 대식세포(Macrophage primary cell, 2×10^6 cells/ml)는 상기 실시예 5와 같은 방법으로 배양하였다. 상기 TNF- α 의 생산량 변화의 측정은 UVITEC 형광이미지시스템에서 제공되는 이미지 분석 프로그램(UVIband)을 사용하여 수행하였다.

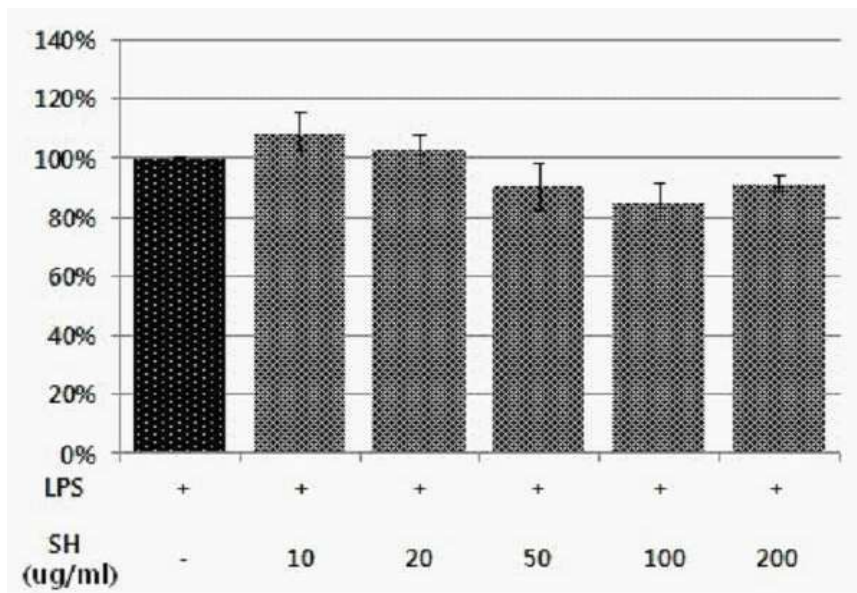
[0101] 구체적으로, 아가로스 젤 전기영동으로부터 분리된 TNF- α 와 β -actin 밴드를UVITEC 형광이미지시스템을 통해 이미지 스캔하였다. 상기 스캔된 이미지로부터 이미지 분석 프로그램(UVIband)을 이용하여 정상군, LPS로 유도된 대조군, 그리고 멸꿀열매 추출물을 농도별로 처리한 실험군의 TNF- α band와 β -actin band의 volume(intensity)을 정량하였다. 상기 측정된 값은 정상군에서 발현된 b-actin에 대한 TNF- α 의 상대적인 함량(relative %, TNF- α / β -actin)을 나타내는 방법으로 TNF- α 의 함량을 측정하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0102] 상기 도 5에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군은 염증과 관련된 사이토카인(cytokine)인 TNF- α 의 mRNA가 소량 확인된 반면, LPS만을 처리한 경우 현저하게 높은 TNF- α 함량이 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고 상기 실시예 1에서 제조된 멸꿀 열매 추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 TNF- α 의 함량이 감소되는 것이 확인되었다.

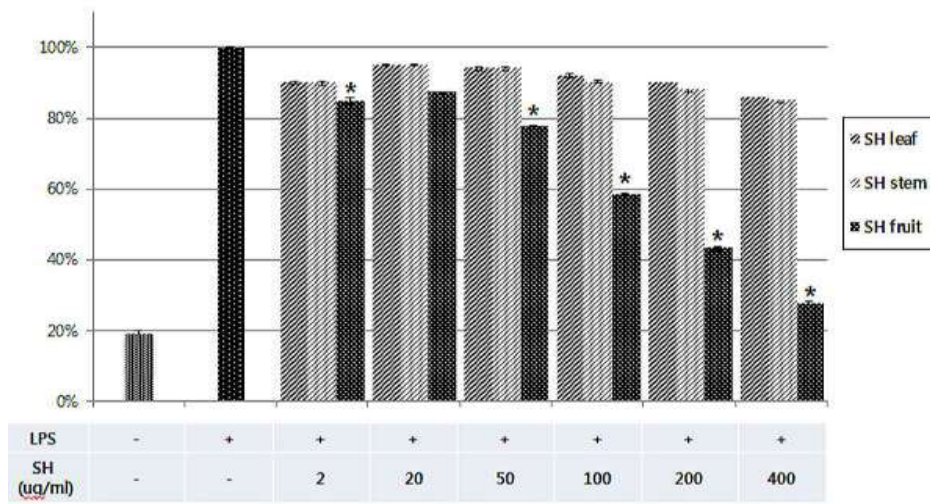
[0103] 상기 실험결과에 의하면, 식용으로 사용가능한 멸꿀 열매의 추출물은 예상한 바와 같이 MTT 분석결과 세포독성이 전혀 없는 것으로 확인되었고, 항염효과와 관련하여 NO에 의해 유발되는 염증과 관련된 결과(NO의 분비량) 및 염증을 유발하는 다양한 사이토카인의 mRNA 전사량과 관련된 결과를 고려하면, 매우 효과적으로 염증을 저해할 수 있을 것으로 확인되었고, 특히 멸꿀 열매 열수 추출물은 다른 부위의 추출물에 비하여 현저하게 우수한 항염 효과를 가지고, 상기 멸꿀 열매 열수 추출물의 부탄올 분획은 다른 용매 분획에 비하여 항염효과가 뛰어난 것으로 확인되었으므로, 본 발명의 멸꿀 열매 추출물 특히, 멸꿀 열매 열수 추출물과 이의 부탄올 분획은 기존 염증 치료제를 대체할 수 있을 뿐만 아니라, 기존 화장품에 사용되는 성분으로 인한 염증 발생을 적절하게 제어할 수 있어 화장품 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면

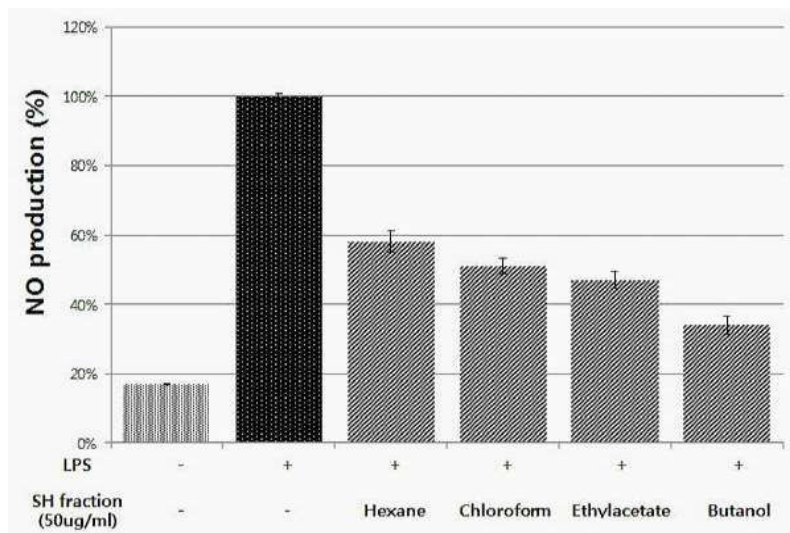
도면1



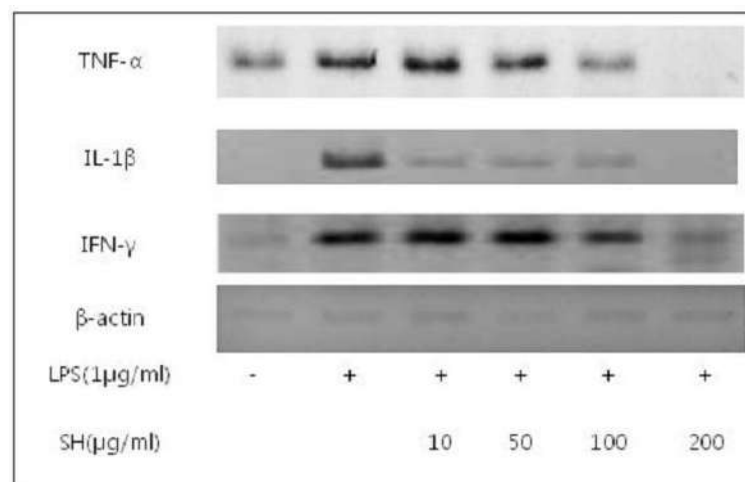
도면2



도면3



도면4



도면5

