

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0000006 (43) 공개일자 2013년01월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07D 493/04</i> (2006.01) <i>A61K 8/49</i> (2006.01) <i>A61K 36/50</i> (2006.01) <i>A61Q 17/04</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0057677 (22) 출원일자 2011년06월14일 심사청구일자 2011년06월14일		(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교) (72) 발명자 김세권 부산광역시 동래구 사직로 80, 125동 1402호 (사직동, 사직쌍용예가) 공창숙 부산광역시 연제구 해맞이로 23, 유럽아시아드아파트 114동 2004호 (거제동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 이덕록

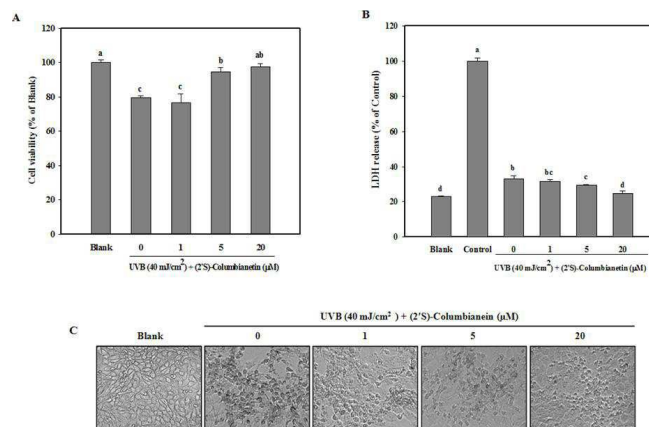
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **코리다리스 헤테로카르파로부터 분리된 (2'S)-콜롬비아네티น 및 이를 포함하는 조성물**

(57) 요약

본 발명은 코리다리스 헤테로카르파로부터 분리된 광보호 효과를 갖는 (2'S)-콜롬비아네티น[(2'S)-columbianetin] 화합물 및 이를 포함하는 화장품 조성물에 관한 것으로, UVB에 의한 피부 손상을 예방하고 치료하는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

서영완

부산광역시 수영구 남천2동 코오롱하늘채골든비치
아파트 103동 603호

김정애

부산광역시 남구 전포대로76번길 17-8 (문현동)

안별님

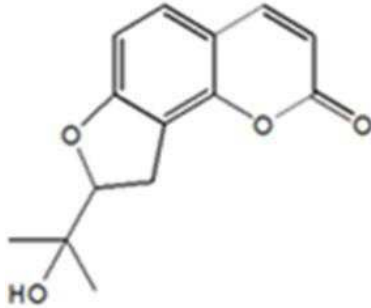
부산광역시 부산진구 백양관문로 7, 개금신주공아
파트 211동 104호 (개금동)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1을 갖는, 코리다리스 헤테로카르파로부터 분리된 (2'S)-콜롬비아네틴[(2'S)-columbianetin] 화합물:

[화학식 1]



청구항 2

코리다리스 헤테로카르파를 MeOH 및 CH_2Cl_2 에 추출하는 단계;

상기 추출물을 감압하에 증발시킨 후 메탄올로 분획하는 단계; 및

상기 분획으로부터 화합물을 분리하는 단계

를 포함하는, 제1항의 (2'S)-콜롬비아네틴의 제조방법.

청구항 3

제1항의 (2'S)-콜롬비아네틴을 함유하는 광보호 화장품 조성물.

청구항 4

제1항의 (2'S)-콜롬비아네틴을 함유하는 피부노화 방지용 화장품 조성물.

청구항 5

제1항의 (2'S)-콜롬비아네틴을 함유하는 피부질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 코리다리스 헤테로카르파로부터 분리된 광보호 효과를 갖는 (2'S)-콜롬비아네틴[(2'S)-columbianetin] 화합물 및 이를 포함하는 광보호 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 피부는 털 및 분비선과 같은 보조 구조를 포함하며, 신체에서 가장 큰 기관이다. 피부는 표피, 진피 및 피하조직의 세가지 층으로 이루어져 있으며, 이중에서 표피는 피부의 가장 바깥층으로, 태양 자외선(UV)과 같은 해로운 외부 인자에 끊임없이 영향을 받고 있다. 태양 UV선은 파장에 따라 3가지로 나뉘어진다: UVA (400-315 nm), UVB (315-280 nm) 및 UVC (280-100 nm). UVC선의 대부분은 오존층을 통과하지 못하므로 지면까지 도달하지 못한다. 그러므로, UVC선에 의한 피부 손상은 미미하다. UVA 및 UVB 영역은 지표면까지 도달하므로 인간의 피부에 상당한 손상을 야기한다. 특히, 중간-파장인 UVB선이 가장 강한 에너지 강도를 가지며 피부 표피에 가장 잘 흡

수되어, 피부의 표피 기저 세포층인 케라틴세포에 우선 작용하여 직, 간접적으로 해로운 생물학적 효과, 특히, 광생성물질의 형성, 세포주기 차단, 광노화, 염증 및 광발암(photocarcinogenesis)을 야기한다. 오존층 파괴에 따라, 태양광 중에서 UVB의 비율이 지난 몇십년 동안 단계적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 주요 피부 질환의 발병이 증가하는 추세이다.

[0003] UV 노출에 대한 피부의 분자성 반응은 활성산소(reactive oxygen species; ROS)의 광화학적 생성에 의해 시작된다. UV-유도 ROS는 지질, 단백질 및 DNA와 같은 피부의 세포 성분의 직접 화학적 산화를 야기한다. 게다가,, UV-유도 ROS는 MMPs(matrix metalloproteinases)의 발현에 밀접하게 관련되어 있다. MMP는 관절염, 염증, 심혈관질환 및 암과 같은 병리학적 진행 동안 세포외 매트릭스(extracellular matrix; ECM) 분해에 실질적 역할을 한다. 다양한 유형의 MMP 중에서, MMP-2 (gelatinase A, 72 kDa) 및 MMP-9 (gelatinase B, 92 kDa)이 표피 기저막을 분해시킬 수 있다. The critical biological feature of UVB 조사된 피부에서 나타나는 해로운 생물학적 특징은 카라틴세포의 아포토시스 세포사로서, 아포토시스 세포사는 세포수축, 염색질 응축, 게놈 DNA 단편화 및 막 수포(blebbing)와 같은 독특한 여러 세포성 변화에 의한 형태학적 특징을 갖는다.

[0004] 코리다리스 헤테로카르파(*Corydalis heterocarpa*; 염주괴불주머니) (Siebold et Zuccarini)는 한국의 해안의 해수 소택지에서 주로 자생하는, 스파이크형의 노란 꽃을 가지는 2년생 허브로 분류된다. 코리다리스 페테로카르파는 내염성 식물의 일종으로 진통 및 경련을 치료하는 민간요법에 사용되어 왔다.

[0005] 대한민국 공개특허 제10-2011-001538호에서는 자주괴불주머니꽃(*Corydalis incisa*), 현호색꽃(*Corydalis turtschaninovii*) 등의 꽃 혼합물로부터 추출한 항산화 및 미백활성을 갖는 꽃 혼합 추출물에 대해 기재하고 있고, 대한민국 공개특허 제10-2009-0120090호에서는 연호색(*Corydalis yanhusuo*) 추출물을 함유하는 피부미백용 화장품 조성물에 대해 기재하고 있으나, 코리다리스 헤테로카르파로부터 분리된 성분의 항산화 및 항-종양 활성에 대하여 아직까지 보고된 바가 거의 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출된 것으로, 코리다리스 헤테로카르파로부터 분리된 광보호 효과를 갖는 (2'S)-콜롬비아네티[(2'S)-columbianetin] 화합물 및 이를 포함하는 광보호 화장품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 상기 목적은 코리다리스 헤테로카르파로부터 (2'S)-콜롬비아네티를 분리하고, UVB-노출 세포에서의 세포독성, LDH 방출수준, ROS 생성, DNA 손상 및 MMP 발현을 측정하여 (2'S)-콜롬비아네티의 광보호 효과를 확인하고, (2'S)-콜롬비아네티의 보호 하의 MAPK 및 AP-1 시그널링 경로에 의한 분자 메커니즘을 조사함으로써 달성하였다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 지금까지 보고되지 않았던 코리다리스 헤테로카르파 유래 화합물의 광보호 효과를 확인하고 이 화합물을 포함하는 광보호 화장품 조성물을 제공함으로써, 피부의 광보호, 항산화, 피부노화방지 효과가 뛰어난 화장품 조성물을 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 다양한 조사 강도의 UVB에 노출된 HaCaT 세포의 생존도 및 형태학적 변화를 나타낸 것이다. (A) MTT 분석 결과, (B) LDH 방출 분석 결과 및 (C) HaCaT 세포의 형태학적 변화의 현미경 이미지. ^{a-d} 다른 문자로 표시된 평균은 Duncan's multiple range test에 의해 유의차($p < 0.05$)를 나타내는 것이다. 블랭크: UVB에 노출되지 않음, 대조: Triton X-100의 첨가에 의해 용균된 세포.

도 2는 40 mJ/cm²의 UVB 조사에 노출된 HaCaT 세포의 세포독성 및 형태학적 변화에 대한 (2'S)-콜롬비아네티의 효과를 나타낸 것이다. MTT (A) 세포독성에 대한 MTT 분석 및 (B) LDH 방출 분석 결과. 블랭크: UVB에 노출되지 않음, 대조: Triton X-100의 첨가에 의해 용균된 세포. (C) UVB 조사에 반응하는 HaCaT 세포의 형태학적 변화의

현미경 이미지이다.

도 3은 UVB 조사에 의해 유도된 세포내 ROS 발생에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 효과를 나타낸 것이다. ^{a-d} 다른 문자로 표시된 평균은 Duncan's multiple range test에 의해 유의차($p<0.05$)를 나타내는 것이다. 블랭크: UVB에 노출되지 않음.

도 4는 UVB 조사에 의해 유도된 DNA 산화 손상에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 효과를 나타낸 것이다.

도 5는 40 mJ/cm²의 UVB에 노출된 HaCaT 세포에서의 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 및 TIMP-2의 유전자 및 단백질 발현 수준에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 효과를 나타낸 것이다. (A) RT-PCR 및 (B) 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출된 MMP 및 TIMP의 발현수준. GAPDH 및 β -액틴을 내부 표준으로 사용하였다.

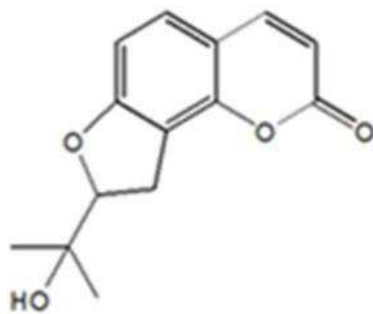
도 6은 UVB-노출 HaCaT 세포에서의 MAPK의 인산화 (A) 및 ASK-1 (B) 활성화에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 효과를 나타낸 것이다.

도 7은 UVB-노출 HaCaT 세포에서의 p53 및 Bax의 인산화 (A) 및 AP-1 활성화 (B)에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 하기 화학식을 갖는, 코리다리스 헤테로카르파로부터 분리된 (2'S)-콜롬비아네틴[(2'S)-columbianetin] 화합물을 제공한다.

화학식 1



- [0011]
- [0012] 본 발명은 상기 (2'S)-콜롬비아네틴[(2'S)-columbianetin] 화합물을 포함하는 광보호 또는 노화방지용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0013] 통상적으로 화장품 조성물에 이용되는 성분, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 조성물이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 조성물이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 스프레이인 경우에는 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 다이메틸 에테르와 같은 추진제를 추가로 함유할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 조성물이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용된다.

[0018] 본 발명의 조성물이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정질 셀룰로오즈 등이 이용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 제형이 계면활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트 등이 이용될 수 있다.

[0020] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 이므로, 본 발명을 이에 한정하는 것으로 해석해서는 안 된다.

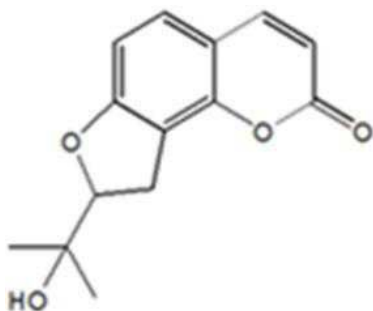
[0021] 데이터는 평균 $\pm$ SD (n=3)로 나타냈으며 Statistical Analysis System (SAS v9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 분산 분석(ANOVA) 방법을 사용하여 분석하였다. 처리 평균 간의 유의차는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range tests를 사용하여 결정하였다.

[0022] 실시예 1. (2'S)-콜롬비아네틴의 식물재료 및 분리

[0023] 코리다리스 헤테로카르파를 2003년 7월에 한국 전라남도 무안도에서 수집하였다. 수집된 코리다리스 헤테로카르파 시료를 잘게 썰어 MeOH (3 L X 2) 및 CH₂Cl₂ (3 L X 2) 각각으로 2일 동안 추출하였다. 혼합된 조추출물 (41.1 g)을 감압 하에서 증방시킨 후 *n*-헥산 (7.3 g), 85% 수성 (aq.) MeOH (12.0 g), *n*-BuOH (4.3 g) 및 물 (20.0 g)로 분획하였다. 콜롬비아네틴을 85% aq. MeOH 분획 부분으로부터 분리하였다

[0024] 역상 크로마토그래피 (C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography)를 이용하여 상기 85% MeOH 분획물로부터 6종류의 분획들을 얻었으며, 이 중 분획 1 이 Si 겔 상에서 10 % 의 MeOH 이 포함된 CH₂Cl₂ 용매 조건을 이용하여 분리되어 하기 화학식을 갖는 (2'S)-콜롬비아네틴 (658.2 mg)을 수득하였다.

[0025] [화학식 1]



[0026]

[0027] (2'S)-콜롬비아네틴 무정형 백색 고체, mp. 160-163 °C; $[\alpha]_D^{25} + 264^\circ$ (c 1.1, MeOH); HREI-MS m/z 246.0892 (calcd. for C₁₄H₁₄O₄, 246.0892); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.82 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-4), 7.36 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5), 6.76 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-6), 6.15 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-3), 4.79 (1H, t, J = 9.0 Hz, H-2'), 3.30 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-1'), 1.30 (3H, s, H-4'/-5'), 1.25 (3H, s, H-4'/-5'); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 165.5 (C-7), 163.0 (C-2), 152.3 (C-9), 146.1 (C-4), 130.2 (C-5), 115.0 (C-10), 114.2 (C-8), 112.1 (C-3), 107.8 (C-6), 92.5 (C-2'), 72.3 (C-3'), 28.1 (C-1'), 25.4 (C-4'/-5'), 25.3 (C-4'/-5').

[0028] 실시예 2. 세포 배양

[0029] 인간 케라틴세포 (HaCaT) (한국세포 주은행, Seoul, Korea)를 37°C, 5% CO₂의 습도 분위기에서 10% 우태아혈청

(FBS), 2 mM 글루타민 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD USA)에 성장시켰다. 세포를 트립신-EDTA 용액으로 검출하여 90-95% 컨플루언스까지 아-배양하였다.

[0030] 실시예 3. 최적 UVB 조사 수준의 결정

[0031] UVB 조사 강도의 최적 수준을 결정하기 위해, 세포를 37°C, 5% CO₂의 습도 분위기에서 10% 우태아혈청(FBS), 2 mM 글루타민 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 함유하는 DMEM을 갖는 24-웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰의 농도로 배양하였다. 24시간 후, 세포를 각 웰의 200 μL 의 인산염 완충 식염수 (PBS) 10-3000 mJ/cm^2 (312 nm UVB light source, Bio-Sun lamp, Vilber Lourmat, Marine, France)의 범위로 UVB 에너지에 노출시켰다. UVB 조사 후, 세포를 6, 12, 24 및 48시간 동안 무혈청 DMEM에서 배양하였다.

[0032] 실시예 4. MTT 및 LDH 검정에 의한 세포독성 결정

[0033] MTT 검정

[0034] 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드 (MTT)를 불용성 포르마잔 산물로 전환하는 미토콘드리아의 능력에 의해 케라틴세포의 생존도 수준을 결정하였다. 간략하게 설명하자면, 세포를 1×10^4 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 성장시키고, 24시간 동안 배양한 후 세포를 UVB 조사 ($40 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)하여 자극하고 37°C, 5% CO₂ 습도 분위기 하에서 (2'S)-콜롬비아네틴의 존재 또는 부재 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상청액 배지를 제거하고 100 μL 의 1 mg/mL MTT 시약을 각 웰에 첨가한 후 4시간 동안 배양하였다. 변환되지 않은 MTT를 제거한 후, DMSO (dimethyl sulfoxide)을 각 웰에 첨가하고 540 nm에서 OD(optical density)를 마이크로플레이트 판독기 (Tacan Austria GmbH, Salzburg, Austria)로 측정하여 세포 내의 포르마잔의 양을 결정하였다. 상대적 세포 생존도를 대조군인 비처리 세포의 생존도의 백분율로서 계산하였다.

[0035] LDH 검정

[0036] 세포 손상을 시판되는 LDH 세포독성 검출 키트 (TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan)를 사용하여 LDH(lactate dehydrogenase)-방출량을 정량하여 측정하였다. 세포를 실험 설계에 따라 노출시켰다. UVB-노출 세포의 조정배지를 LDH 측정을 위해 수집하였다. 기질 믹스 용액을 1:1 비율로 분취량의 상청액 배지에 첨가한 후 광-보호 조건 하에서 30분 동안 37°C에서 배양하였다. 그런 다음, 1N HCl 스탑 용액(stop solution) (최종 농도, 0.2 N)를 첨가한 후 바로 490 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기(Tacan Austria GmbH, Salzburg, Austria)로 검출하였다. 0.1% (w/v) Triton X-100으로 제조된 대조군은 100% LDH 방출을 규정하였다.

[0037] 세포독성에 대한 UVB 조사 수준 결정

[0038] UVB 조사의 적절한 수준을 결정하기 위해, 상기와 같이 배양된 케라틴세포의 세포독성을 10 내지 3000 mJ/cm^2 의 UVB 조사 후 6, 12, 24 및 48시간 동안의 MTT 및 LDH 누출로부터 수득된 데이터와 비교하여 결정하였다. UVB 에너지에 노출된 세포에서는 세포 생존도의 유의성 있는 감소(도 1의 A) 및 UVB 노출-유도 방식으로 LDH 방출의 증가(도 1의 B)가 유도되었다. 10-3000 mJ/cm^2 범위에서 세포의 UVB 노출 후의 다양한 배양 기간(6, 12, 24 및 48시간) 동안의 케라틴세포의 형태학적 변화를 비교하였다(도 1의 C). 세포의 가장 큰 부분을 투여량-의존 방식 및 시간-의존 방식으로 팽창시키고 염색하였다. 24시간 40 mJ/cm^2 이상에서 24시간 동안 배양한 UVB 노출 세포가 극적으로 감소된 케라틴세포 생존도를 나타냈다.

[0039] UVB-노출 세포의 생존도에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 효과

[0040] 상기 결과에 기초하여, UVB-노출 케라틴세포의 생존도 및 손상 정도에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 효과를 mJ/cm^2 의 UVB 노출 후에 24시간 동안 배양하여 측정하였다. 화합물의 농도가 증가함에 따라 노출된 세포의 생존도는 UVB에만 노출시킨 세포에 비해, 투여량-의존 방식으로 실질적으로 증가하였다(도 2의 A). LDH 방출 검정은 화합물 존재 하에서 UVB 노출 세포가 투여량-의존 방식으로 UVB 노출에 의한 세포 손상 정도를 실질적으로 감소시킴을 나타낸다(도 2의 B). 게다가, UVB 노출에 의한 세포 손상에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 저해 효과를 현미경 이미지 데이터를 통해 확인하였으며(도 2의 C), 화합물의 존재 하에서 UVB-노출 세포가 UV에 의한 세포의 형태학적 변화를 효과적으로 억제함을 확인하였다.

[0041] 실시예 5. 세포내 반응 산소종(ROS) 생성

[0042] 세포내 ROS 생성 수준을 산화 민감성 염료 DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)(입수처 기재해주세요)를 사용하여 검출하였다. 세포를 형광과 함께 96-웰 마이크로플레이트에서 24시간 동안 배양한 후 UVB ($40 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)에 노출시켰다. 노출된 세포를 (2'S)-콜롬비아네틴으로 24시간 동안 처리한 후 PBS에 용해된 $20 \mu\text{M}$ 의 DCFH-DA와 함께 충전하여 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 습도 분위기 하에서 암실에서 30분 동안 배양하였다. 최종적으로, 세포를 PBS로 2회 세척하고 PBS에 용해된 DCF의 형광을 형광 마이크로플레이트 판독기(Tacan Austria GmbH, Salzburg, Austria)을 사용하여 485 nm 의 여기 파장 및 535 nm 의 방출 파장을 검출하고 그 결과를 도 3에 나타냈다.

[0043] UVB 노출에 의한 DCF 형광 강도의 증가는 UVB에 노출되지 않은 블랭크 그룹과 비교하여 관찰하였다. 화합물의 존재 하에서 UVB-노출 세포는 투여량-의존 방식으로 DCF 형광 강도를 유의성있게 감소시켰으며, 이는 UVB 노출에 의한 ROS 생성에 대한 증가된 ROS 소거능을 나타내는 것이다.

[0044] 실시예 6. 게놈 DNA 여기 및 DNA산화

[0045] 약간 변형된 표준 페놀/프로테나아제 K 과정(J. Sambrook, D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor. 2001)을 사용하여 게놈 DNA를 케라틴세포로부터 분리하였다. 시료의 존재 또는 부재 하에서 UVB-자극 세포를 PBS로 2회 세척한 후 10 mM EDTA를 포함하는 1 mL PBS를 사용하여 수집하였다. 4°C 에서 $13,400 \times g$ 에서 5분 동안 원심분리한 후, 침전된 세포를 RNase A ($0.5 \text{ mg}/\text{mL}$), 프로테나아제 K ($10 \text{ mg}/\text{mL}$), SDS (10%) 및 NaOAC (0.2 M)을 포함하는 $410 \mu\text{L}$ 의 용액에 재현탁하였다. 그 후에, 혼합물을 37°C 에서 30분 동안, 그리고 55°C 에서 1시간 동안 배양하였다. 배양한 후에, 페놀:클로로포름:이소-아밀알콜($25:24:1$)을 $1:1$ 비율로 첨가하고 4°C 에서 5분 동안 $13,400 \times g$ 로 혼합물을 원심분리하였다. 그런 다음, 상층을 새로운 에펜도르프 튜브로 옮기고 100% 빙수 에탄올을 $1:1.5$ 비율로 첨가한 후 30분 동안 -20°C 에서 배양하였다. 4°C 에서 $5,900 \times g$ 로 5분 동안 원심분리한 후, 상청액을 조심스럽게 제거하고 남아있는 펠렛을 $20 \mu\text{L}$ 의 TE 완충용액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시켰다. DNA의 순도를 분광광도 분석을 사용하여 260 및 280 nm 에서의 흡광도 비율을 결정하였다. $1 \mu\text{g}$ 의 DNA를 포함하는 분취량($20 \mu\text{L}$)의 반응 혼합물을 100 V 에서 10분 동안 1% 아가로스겔 전기영동으로 분리하였다. 겔을 $1 \text{ mg}/\text{mL}$ 의 EtBr(ethidium bromide)으로 30분 동안 염색하고 AlphaEase®

겔 이미지 분석 소프트웨어(Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 사용하여 UV 조명 하에서 사진촬영하고 그 결과를 도 4에 나타냈다.

[0046] 이러한 결과는 UVB노출에 의한 DNA 손상에 대해 (2'S)-콜롬비아네틴이 적절한 보호 효과를 나타냄을 확인하여준다.

[0047] 실시예 7. UVB-매개 MMP 및 TIMP의 조절에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 효과

[0048] RT-PCR(Reverse transcriptase polymerase chain reaction) 분석

[0049] 총 세포성 RNA를 Trizol 시약 (Invitrogen Co., CA, USA)을 사용하여 분리하였다. $2 \mu\text{g}$ 의 분리된 RNA를 올리고-(dT) 프라이머 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. 표적 cDNA를 포워드 및 리버스 프라이머 서열을 사용하여 증폭시켰다: MMP-2에 대하여 포워드 프라이머 $5'$ -ATG-GCA-AGT-ACG-GCT-TCT-GT-

3' 및 리버스 프라이머 5'-ATA-CTT-CTT-GTC-GCG-GTC-GT-3'; MMP-9에 대하여 포워드 프라이머 5'-CTC-GAA-CTT-TGA-CAG-CGA-CA-3' 및 리버스 프라이머 5'-GCC-ATT-CAC-GTC-GTC-CTT-AT-3'; TIMP-1에 대하여 포워드 프라이머 5'-AAT-TCC-GAC-CTC-GTC-ATC-AG-3' 및 리버스 프라이머 5'-TGC-AGT-TTT-CCA-GCA-ATG-AG-3'; TIMP-2에 대하여 포워드 프라이머 5'-TGA-TCC-ACA-CAC-GTT-GGT-CT-3' 및 리버스 프라이머 5'-TTT-GAG-TTG-CTT-GCA-GGA-TG-3'; GAPDH에 대하여 포워드 프라이머 5'-GAG-TCA-ACG-GAT-TTG-GTC-GT-3' 및 리버스 프라이머 5'-GAC-AAG-CTT-CCC-GTT-CTC-AG-3'. 95℃에서 45초, 60℃에서 50초 및 72℃에서 60초의 30 사이클로 증폭을 실시하였다. 증폭 단계 후에, 72℃에서 5분 동안 연속해서 연장 과정을 실행하였다. PCR 산물을 100 V에서 10분 동안 1% 아가로스겔 상에 전기영동하여 분리하였다. 겔을 1 mg/mL EtBr(ethidium bromide)로 염색한 후 AlphaEase®

겔 이미지 분석 소프트웨어(Alpha Innotech., San Leandro, CA, USA)를 사용하여 UV 조명 하에서 사진촬영을 하였다. 최종적으로, 상대 밴드 밀도를 LAS3000®

형광 이미지 분석기 (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 사용하여 결정하였다.

[0050] 웨스턴 블롯 분석

[0051] 전체 세포를 4℃에서 30분 동안 RIPA 완충용액(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA)에서 용균시켰다. 원심분리한 후, 세포 용균액의 총 단백질량을 Lowry method (BioRad Laboratories, Hercules, CA)으로 측정하였다. 동량의 단백질(10 µg)을 함유한 분취량의 상청액을 10% 또는 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔에 전기영동한 후 니트로셀룰로소막(Amersham Pharmacia Biotech., England, UK)으로 옮겼다. 0.1% Tween 20 (TBS-T)을 함유한 TBS에 용해된 5% 우혈청 알부민으로 적어도 1시간 동안 차단시키고 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, ERK, JNK, pERK, pJNK, p38, pp38, ASK1, p-ASK1, c-jun, c-fos, p53, pp53 및 Bax (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)와 같은 일차 항체와 혼성화시켰다. 모든 일차 모노클로날 항체를 1:1000 비율로 TBS-T에 희석시켰다. 결합된 항체를 실온에서 1시간 동안 호스래디쉬 퍼옥시다아제-결합 이차 항체로 로 검출하고 면역반응성 단백질을 화학형광 ECL 검정 키트(Amersham Pharmacia Biosciences, England, UK)를 제조업자의 지시사항에 따라 검출하였다. 웨스턴 블롯 밴드를 LAS3000®

발광 이미지 분석기(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 사용하여 시각화시켰다.

[0052] UVB-노출 세포에서 MMP-2, MMP-9 및 메탈로프로테나아제 TIMP-1 및 TIMP-2의 조직 저해제의 조절 수준을 상기와 같이 RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅(도 5의 A 및 B)을 사용하여 결정하였다. UVB에 노출된 세포는 UVB에 노출되지 않은 세포보다 더 높은 MMP-2 및 MMP-9 유전자 발현을 나타냈으나, UVB-매개 젤라티나아제 A 및 B 유전자 및 단백질의 발현 수준은 투여량-의존 방식으로 (2'S)-콜롬비아네틴에 의해 감소되었다. 게다가, UVB-노출 세포에서의 TIMP-1 및 TIMP-2의 발현 수준의 변화를 비교하였다. 화합물의 처리에 의해 TIMP-1 및 TIMP-2 발현이 투여량-의존 방식으로 증가되었다.

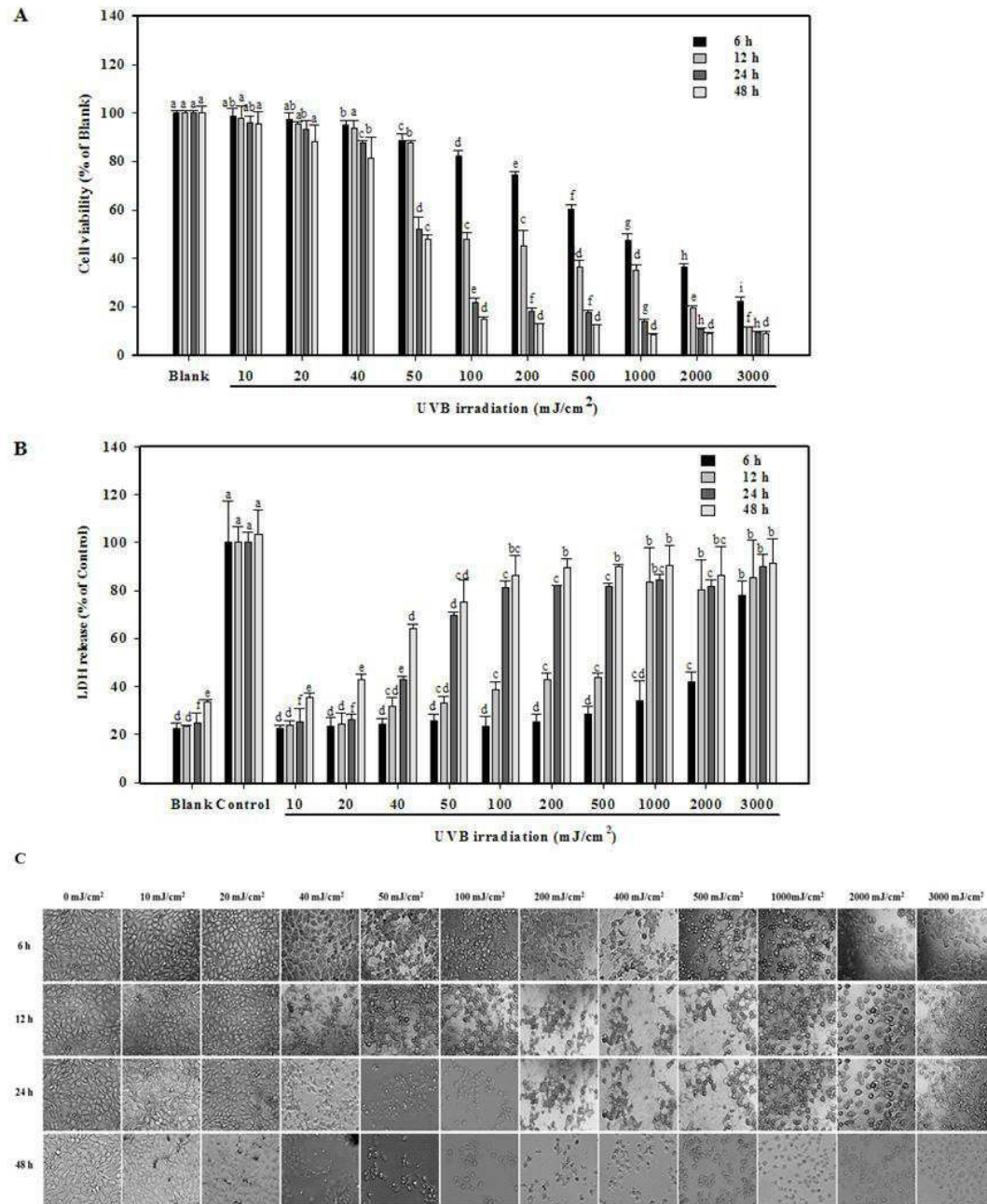
[0053] 실시예 8. MAPK 활성화에서의 (2'S)-콜롬비아네틴의 저해 효과

[0054] UVB-노출 세포에서의 (2'S)-콜롬비아네틴의 보호 효과에 반응하는 시그널링 캐스케이드를 설명하기 위해, 아포토시스 시그널 조절 키나아제 (apoptosis signal regulation kinase-1; ASK1)-미토젠-활성 단백질 키나아제 (mitogen-activated protein kinases; MAPK) 시그널링 경로를 UVB-노출 세포를 연구하였다(도 6). MAPK의 세 가지 주요 클래스인 c-Jun N-말단 키나아제 (c-Jun N-terminal kinase; JNK), 세포외 시그널-방출 키나아제 (extracellular signal-related kinase; ERK1/2) 및 p38 MAPK의 조절에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 효과를 UVB-노출 세포에서 조사하였다. UVB 조사에 노출된 세포는 인산화된 JNK, p38 MAPK 및 ERK1/2 단백질의 발현이 증가되었으나, (2'S)-콜롬비아네틴 존재 하에서 UVB-노출 세포는 효과적으로 조절이 감소되었다.

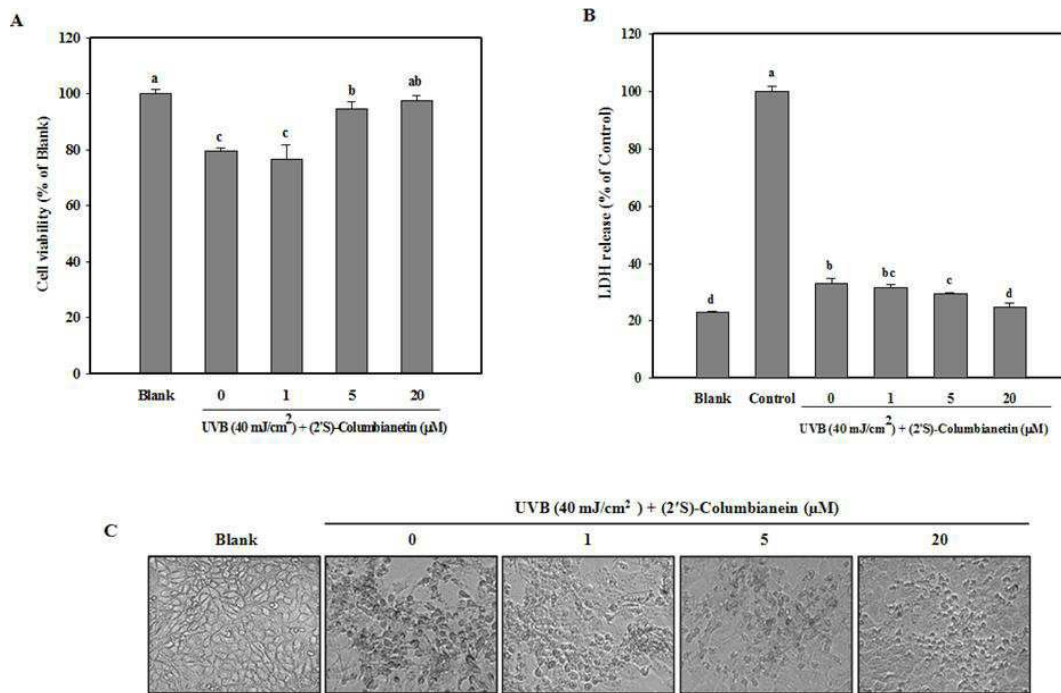
[0055] 전사 인자 활성화 단백질-1 (AP-1)은 Jun 및 Fos과에 속하므로, AP-1의 UVB-유도된 활성화에 대한 (2'S)-콜롬비아네틴의 효과를 실험하였다. UVB 조사에 의해 활성화된 핵 전사 인자인 c-fos가 (2'S)-콜롬비아네틴 처리에 의해 유의성있게 하향조절되었다 (도 7의 A). 게다가, UVB 조사된 케라틴세포에서, 인산화 p53 및 Bax 단백질의 발현 수준이 극적으로 증가되었지만, (2'S)-콜롬비아네틴에 의해 증가는 억제되었다 (도 7의 B).

도면

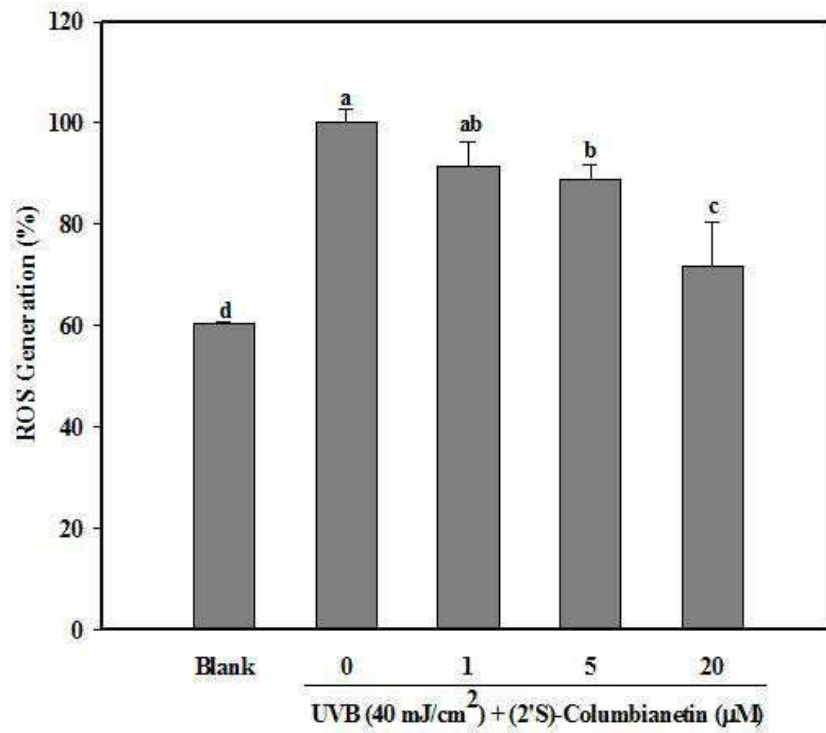
도면1



도면2

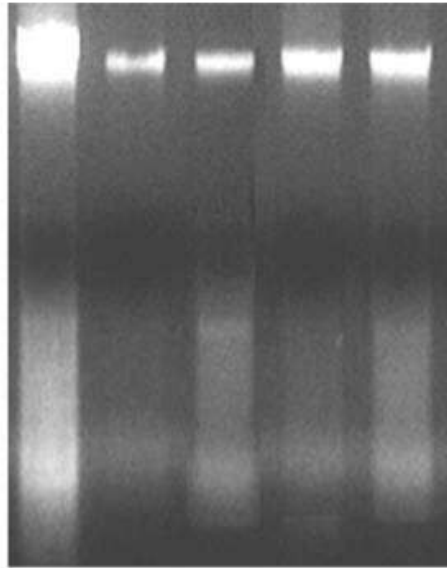


도면3

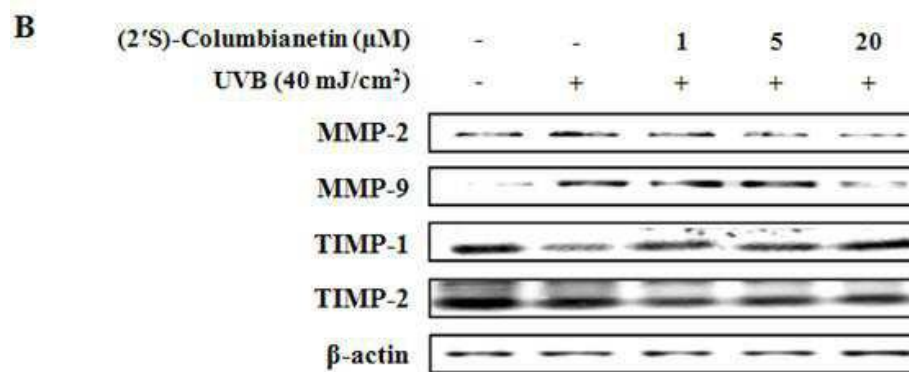
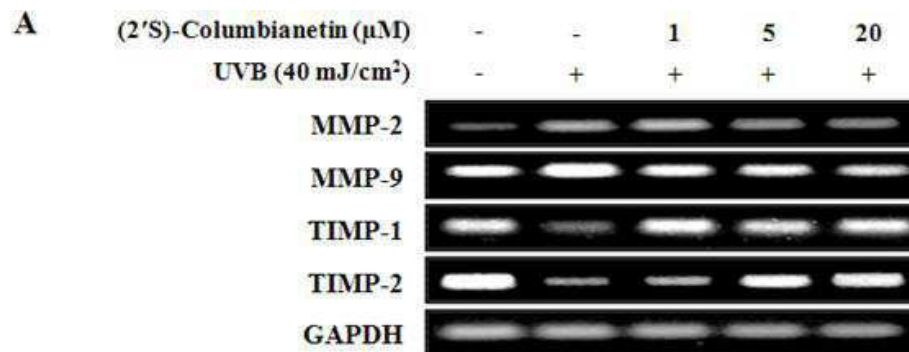


도면4

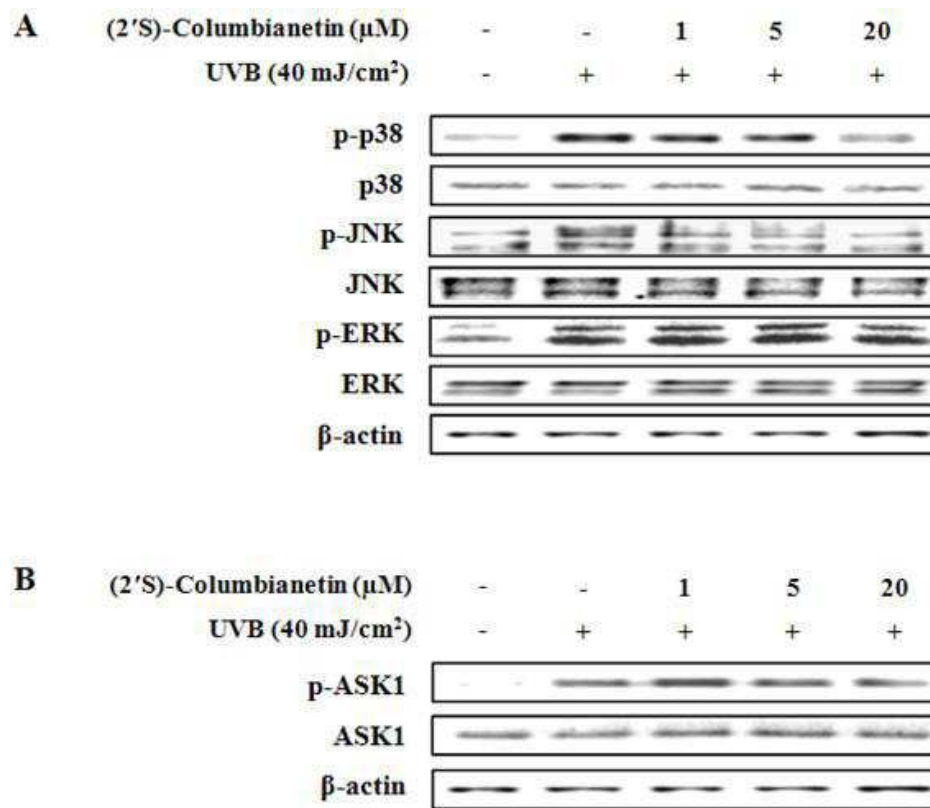
(2'S)-Columbianetin (μM)	-	-	1	5	20
UVB (40 mJ/cm ²)	-	+	+	+	+



도면5



도면6



도면7

