



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0078859
(43) 공개일자 2012년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/34 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 7/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0000141

(22) 출원일자 2011년01월03일

심사청구일자 2011년01월03일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

김세권

부산광역시 동래구 사직로 80, 쌍용예가아파트 125동 1402호 (사직동)

박순선

부산광역시 서구 꽃마루로 43, 남성한빛아파트 102동 1003호 (서대신동3가)

(74) 대리인

이덕록

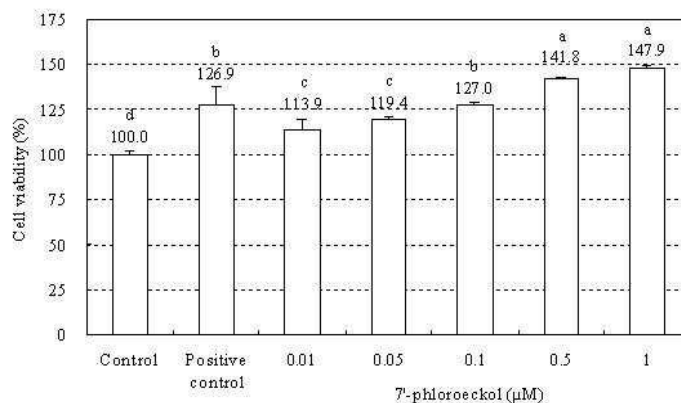
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 모발 증식을 위한 7'-플로로에콜 화합물 및 이를 함유하는 화장료 조성물

(57) 요약

감태(*Ecklonia cava*: *E. Cava*)로부터 분리한 7'-플로로에콜 (1-(3', 5'-다이하이드록시페녹시)-7-(2', 4'-다이하이드록시페녹시)-2,4,9-트리하이드록시다이벤조-1,4-다이옥신)이 인체 모발 성장에 대해 갖는 효과에 대하여 세포 시스템내에서 연구되었다. 세포증식 및 항세포사멸사의 효과를 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이하이드록시 테트라졸륨 브로마이드(MTT) 분석 및 웨스턴 블롯(western blot)에 의해 인체 모낭 모유두 세포(hair follicle dermal papilla cell: HFDPC) 및 인체 각질형성세포(human epidermal keratinocyte: HaCaT)에 대하여 실시하였다. 7'-플로로에콜은 HFDPC 및 HaCaT의 증식을 유의하게 증식시켰다. HFDPC와 HaCaT에서 PI3K 및 인산화-AKT 단백질 발현이 7'-플로로에콜 처리량에 의존적으로 증가하였다. 또한, 세포 증식에 관련된 MEK1/2, 인산화-ERK 및 c-Fos의 단백질 수준은 7'-플로로에콜 처리량 의존적으로 증가하였다. 한편, 세포사멸사에 관련된 Bcl-2/Bax 비가 증가하여 세포사멸사를 저해하였고, p53 및 카스파아제(caspase)-3, 카스파아제-9은 유의하게 감소하였다. 이들 결과는 7'-플로로에콜이 세포사멸사를 저해하고 HFDPC 및 HaCaT의 증식을 자극시킴으로써 인체 모발 성장을 촉진할 수 있음을 시사한다.

대표도 - 도1



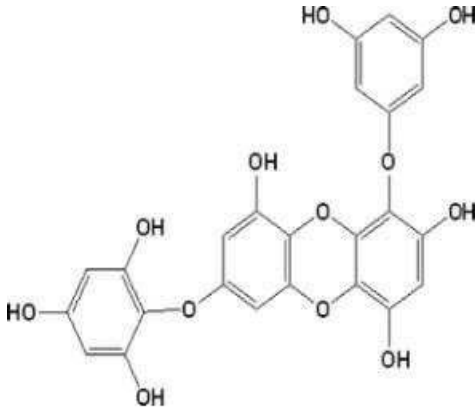
이 발명을 지원한	국가연구개발사업
과제고유번호	없음
부처명	국토해양부
연구사업명	해양생명공학 기술개발사업
연구과제명	해양바이오프로세스연구단
주관기관	부경대학교
연구기간	2004.10.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

모발 증식을 위한 하기 화학식 1의 7 '-플로로에콜 화합물:

화학식 1



청구항 2

청구항 1에 있어서,

감태로부터 추출된 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 7 '-플로로에콜 화합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 모발 증식을 위한 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 모발 증식을 위한 7 '-플로로에콜 화합물 및 이를 함유하는 화장품 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 인체 모낭 모유두세포(HFDPC) 및 인체 각질형성세포(HaCaT)에 작용하여서 모발이 증식되도록 하는 7 '-플로로에콜 화합물 및 이를 함유하는 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체 모발은 우리 생활에서 피부 및 두피를 보호하기 때문만이 아니라 사회적 및 성적 의사소통에 있어서도 매우 중요하다. 모발은 케라틴 단백질로 구성되어 있으며, 진피에 있는 모낭으로부터 성장한다. 모발 성장은 일정한 주기를 나타내며, 아나겐(성장기), 카타겐(퇴행기 또는 전이기) 및 텔로겐(휴지기)으로 분류된다(문헌[Stenn and Paus, 2001] 참고). 두피 모낭은 모유두세포, 각질형성세포, 내측 및 외측 모근초 세포, 및 멜라노사이트로 구성된다. 인체의 모낭 모유두세포(HFDPC)는 특수 섬유모세포의 하나로, 모낭의 형태형성에 참여한다(문헌[Jahoda 등, 1984, Ferraris 등, 1997]). HFDPC는 정상 및 발병 조건을 포함하여 모발 성장과 관련되어 있으므로(문헌[Inui 등, 2003]), HFDPC 전사인자 및 사이토카인의 변화가 중요하다(문헌[Kwon 등, 2008]). 케라틴 단백질은 인체 각질형성세포로부터 구성되고, 모발의 주요 조직이다(문헌[McGrath 등, 2004]). 최근에는 다양한 분자 분석 시스템에 의해, 아나겐 단계 동안 두피 모낭에서의 세포 성장(증식), 분해 및 세포자멸사 관련 인자가 밝혀졌다. 두피 모유두의 세포 증식에 ERK (Extracellular signal-regulated kinases) 및 AKT (a serine/threonine protein kinase) 경로가 관련한다고 알려져 있다(문헌[Han 등, 2004, Yoo 등, 2007, 및 Kwon 등, 2008]). ERK 신호화 경로는 mitogenesis 또는 세포 성장에 일정 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있으며, AKT는 생존 신호를 중재하는데 중요한 역할을 갖는 것으로 보고된 바 있다. 또한, AKT

는 성장 인자 및 사이토카인에 의해 활성화되며, PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinases)를 포함하는 경로를 통해 자극된다.

- [0003] 또한, p53, Bcl-2, Bax 및 카스파아제-3, -9는 두피 모낭세포 및 각질형성세포의 세포자멸사에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다(문헌[Tsuji 등, 2003, Winiarska 등, 2006, Kwon 등, 2007]). 이 중, Bcl-2 단백질 계열은 항-세포자멸 또는 pro-세포자멸 기능을 가지는 단백질들로 이루어져 있으며, 세포 사멸 과정의 게이트키퍼(gatekeeper)로서 작용한다.
- [0004] 모발 성장 촉진과 관련하여 여러 선행 기술이 보고되어 있으며, 예컨대, 특허출원 10-2008-0096649 “탈모 방지 및 모발 성장 촉진 효과를 위한 모발 또는 두피 화장료 조성물”에는 아연 피치리온, 판테논 및 살리실산을 유효성분으로 포함하는 두피 화장료 조성물이 개시되어 있고, 특허출원 10-1992-0702114 “모발 성장 촉진 및 피부 질환 치료를 위한 방법 및 그 제제”에는 아놀, 아네톨을 포함한 조성물을 환자 국부에 적용시켜서 모발 성장을 촉진하는 방법이 개시되어 있으며, 특허출원 10-1991-0016248호 “모발 성장 촉진 조성물”에는 산수유, 한련초 및 오디의 추출물을 함유함을 특징으로 하는 모발 성장 촉진 조성물이 개시되어 있다.
- [0005] 이와 같이 모발 성장 촉진을 위한 다양한 종류의 허브(herb) 약물이 보고된 반면, 천연 해양생물로부터 기원한 촉진제는 거의 알려져 있지 않은데, 특허출원 10-2008-18124호 “해조류를 이용한 두피의 항균 작용 및 모발의 성장을 촉진하는 발모제 조성물”에 여러 해조류의 추출물을 포함한 조성물이 개시되어 있는 정도이다.
- [0006] 천연 해양생물은 많은 유용한 생리 활성 화합물을 가지므로, 최근에 많은 연구자들이 천연 해양생물의 개발 및 응용에 대하여 연구하고 있다. 천연 해양생물 중 해조류는 색소에 근거하여 갈조류(Phaeophyceae), 적조류(Rhodophyceae) 및 녹조류(Chlorophyceae)로 분류된다.
- [0007] 갈조류의 하나인 감태(*Ecklonia cava*: *E. cava*)는 대한민국 및 일본 주변 바다에 서식하고, 항응고제, 항산화제, 항암제 및 매트릭스 메탈로프로테이나아제(matrix metalloproteinase: MMP) 억제 활성을 갖는 것으로 보고되었다. 선행 기술에서는 감태에서 분리된 생리 활성 화합물의 하나인 7 ‘-플로로에콜이 지방세포 분화, MMP 및 멜라닌 형성의 억제 효과를 갖는다고 보고된 바 있다.
- [0008] 본 발명자들은 7 ‘-플로로에콜에 의한 인체 모낭 모낭모두유세포 및 각질형성세포의 증식 및 항-세포자멸사 활성의 효과를 검증하고, 작용 메커니즘을 통하여 연구한 결과, 7 ‘-플로로에콜의 모발 성장 촉진제로서의 용도를 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

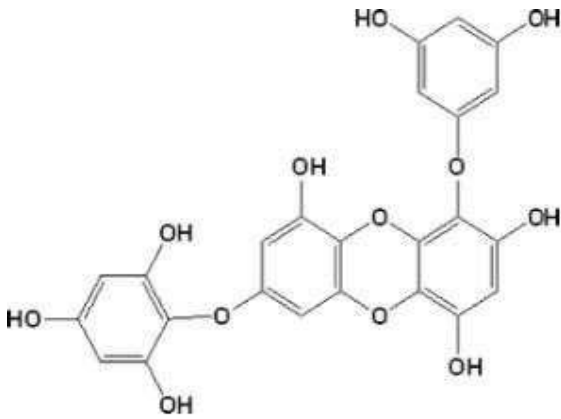
해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 피부 및 두피를 보호하고 사회적 및 성적 의사소통에 있어 중요한 역할을 하는 인체 모발의 증식을 촉진하고 탈모를 방지하기 위하여, 모발 성장주기 중에서 모낭 형태형성에 참여하는 인체 모낭 모낭모두세포 및 인체 각질형성세포의 증식을 유도하는 한편, 원료 공급이 용이하고 인체에 유해하지 않은 화합물을 밝혀내는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명에서는 모발 증식을 효과를 갖는 하기 화학식 1의 7 ‘-플로로에콜 화합물을 제공한다:

화학식 1



발명의 효과

또한, 본 발명에서는 감태로부터 추출된 것을 특징으로 하는 상기 화합물을 제공한다.

또한, 본 발명에서는 7'-플로로에콜 화합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 모발 증식을 위한 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 인체 모낭 모유두세포(HFDPC) 증식에 대한 7'-플로로에콜 효과를 MTT 분석에 의해 나타낸 그래프이다.

도 2는 인체 각질형성세포(HaCaT) 증식에 대한 7'-플로로에콜 효과를 MTT 분석에 의해 나타낸 그래프이다.

도 3은 배양된 HFDPC (a) 및 HaCaT (b)에서 ERK (Extracellular signal-regulated kinases) 경로에 대한 7'-플로로에콜 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 배양된 HFDPC (a) 및 HaCaT (b)에서 AKT 경로에 대한 7'-플로로에콜 효과를 나타낸 그래프이다.

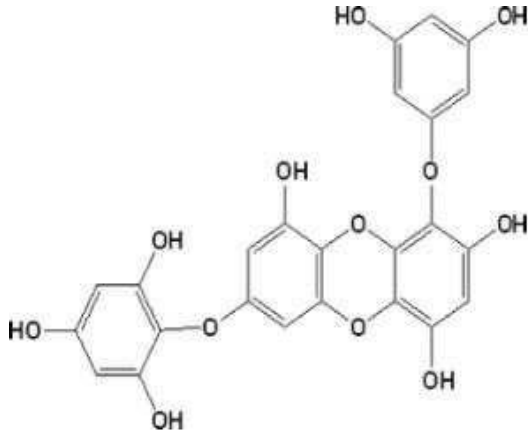
도 5는 HFDPC (a) 및 HaCaT (b)에서 세포자멸사 관련 인자에 대한 7'-플로로에콜 효과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 HFDPC (a) 및 HaCaT (b)에서 카스파아제-3 및 카스파아제-9에 대한 7'-플로로에콜 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명에서 사용되는 7'-플로로에콜은 하기 화학식으로 표시되며, 1-(3',5'-다이하이드록시페녹시)-7-(2",4",6-트리하이드록시페녹시)-2,4,9-트리하이드록시다이벤조-1,4-다이옥시의 IUPAC 명칭을 갖는다:

[0016] 화학식 1



[0017]

[0018] 7 '-플로로에콜은 감태에서 발견되는 폴리페놀 복합물의 하나인데, 감태는 다양한 종류의 생물학적 효과, 예컨대 항암, 항-HIV-1, 소염, 항-알레르기 및 항-지방세포 분화와 같은 효과를 갖는 것으로 알려져 있다.

[0019] 본 발명에서 7 '-플로로에콜의 제조방법이나 입수처는 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 감태로부터 추출된다. 더욱 바람직하게는 동결 건조한 감태를 에탄올로 추출한 후, 추출물을 n-hexane, dichloromethane, EtOAc, n-butanol, H₂O를 이용하여 분획하고, 이 중 활성이 가장 높은 층인 EtOAc 분획층을 column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 활성물질을 분획, 분리한다. 활성물질인 7 '-플로로에콜은 이미 검증된 방법을 이용하여 구조분석을 실행한다.

[0020] 본 발명에 따르면, 7 '-플로로에콜을 모발 증식을 위한 화장품 조성물에 유효 성분으로 포함시킬 수 있다. 바람직하게, 7 '-플로로에콜은 화장품 조성물에 0보다 크고 1.0 μM 이하의 유효 농도 범위로 포함된다.

[0021] 화장품 조성물의 제형은 두피에 적용시킬 수 있는 형태라면 특별히 제한되지 않으며, 예컨대, 크림, 연고, 액상, 에멀전, 현탁액, 스프레이 등의 형태일 수 있으며, 본 발명의 화합물을 포함시켜서 당업계에서 상기 제형을 제조하는 통상적인 방식으로 화장품 조성물을 제조할 수 있다.

[0022] 화장품 조성물은 당업계에서 통상적인 방식으로 통상적인 양을 두피에 적용시킬 수 있다.

[0023] 본 발명을 하기의 구체적인 실시예를 들어 설명하지만, 하기 실시예는 예시를 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 재료 준비

[0025] 7 '-플로로에콜을 선행 기술에 따라 감태로부터 분리하였다. 즉, 동결 건조한 감태를 에탄올로 추출한 후, 추출물을 n-hexane, dichloromethane, EtOAc, n-butanol, H₂O를 이용하여 분획하였다. 이 중 활성이 가장 높은 층인 EtOAc 분획층을 column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 활성물질을 분획, 분리하였다. 활성물질인 7 '-플로로에콜은 이미 검증된 방법을 이용하여 구조분석을 실행하였다.

[0026] 인산화-ERK-1/2(Thr202/Tyr204), 전체 ERK-1/2, p53 및 c-Fos를 인지하는 항체를 Cell Signaling Technology, Inc. (미국 매사추세츠주 베벌리 소재)에서 구입하였다.

[0027] Bcl-2, 카스파아제-3 및 카스파아제-9에 대한 항체를 BD Biosciences Pharmingen (미국 캘리포니아주 산호세 소재)에 주문하고, 인산화-Akt(Ser473), 전체 Akt, PI3K, MEK-1/2, Bax 및 β-액틴 항체를 Santa Cruz Biotech Inc.(미국 캘리포니아주 산타크루즈 소재)에 주문하였다.

[0028] 세포배양

[0029] 인체의 모낭 모유두세포(HFDPC)를 Promo Cell (독일 하이델베르그 소재)에서 구입하였다. 세포를 ready-to-use HFDPC 배지로 배양하였으며, 상기 배지는 기초 배지(Basal Medium), FCS(소태아혈청:fetal calf serum), 기본 FGF 및 인슐린을 함유한 보충 키트(Promo cell, 독일 하이델베르그 소재)로 이루어져 있다. 계대 배양을 위해서는 HBSS(HEPES 완충 생리식염수), 트립신/EDTA 용액 및 중화액(Promo Cell, 독일 하이델베르그

소재)을 함유한 키트를 사용하였다. 4-6번째 계대 배양된 HFDPC를 실험에 사용하였다. HaCaT (인체 각질형성세포)는 10% 소태아혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함한 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM, Gibco BRL, 미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재)에서 배양하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5 mL 배지를 함유한 T-25 플라스크에서 세포를 배양하였다.

[0030] 통계 분석

[0031] 이하 실험에서 수득된 데이터는 평균 $\pm$ SEM로 표기하였다. 통계 소프트웨어 패키지, SAS v9.1 (SAS Institute Inc. 미국 노오쓰 캐롤라이나주 캐리 소재)를 이용하여 던컨 다중 검정(Duncan's multiple range test)에 의한 일원분산분석(one-way ANOVA)에 의해 각 군의 평균 편차를 측정하였다. 편차는 $p < 0.05$ 에서 유의한 것으로 간주하였다.

[0032] 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐 테트라졸륨 브로마이드(MTT) 분석

[0033] HFDPC 및 HaCaT의 세포증식을 MTT 방법을 이용하여 측정하였다. 세포를 무혈청 배지와 함께 96웰에 씨딩(seeding)한 후 1일 동안 배양시켰다(1.0×10^4 세포/웰). 이어서, 새로운 배지로 교체하고, 0.01 μ M, 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.5 μ M 및 1 μ M 농도의 시료로 처리한 후 5일 동안 배양시켰다. MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가하고, 37°C 배양기에서 3시간동안 배양하였다. 이어서, 배지를 제거하고, 포르마잔 결정을 다이메틸 설펡사이드(DMSO)와 함께 용해시키고, 그 결과를 흡광도로 측정하여 나타내었다.

[0034] 도 1과 2에서 결과값은 처리된 시료를 함유하지 않은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM이다. 그래프 위에 기재된 상이한 영문자는 던컨 다중 검정에서 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타낸다.

[0035] HFDPC에서 7 '-플로로에콜은 시료 처리량에 의존적으로 세포 증식을 증가시켰다($p > 0.05$). 1 μ M 의 7 '-플로로에콜은 양성 대조군(Positive control)으로 사용된 1 μ M 의 미녹시딜(발모제로 잘 알려져 있음)보다 유의적으로 높은 세포 생존도를 나타내었다. 0.5 내지 1 μ M 의 7 '-플로로에콜에서 세포 증식은 차이를 나타내지 않았다(도 1).

[0036] HaCaT에서도 7 '-플로로에콜은 시료 처리량에 의존적으로 세포 증식을 증가시켰다($p > 0.05$). 0.1 μ M 에서 7 '-플로로에콜은 양성 대조군으로 사용된 0.1 μ M 의 미녹시딜보다 높은 세포 생존도를 나타내었다(도 2). 1 μ M 의 미녹시딜에서 세포 생존도는 0.1 μ M에 비해 감소되었다(데이터는 도시되어 있지 않음).

[0037] 웨스턴 블롯 분석

[0038] 7 '-플로로에콜에 의한 HFDPC와 HaCaT의 증식의 작용 메커니즘을 알아보려고 표준 절차에 따라 웨스턴 블롯을 실시하였다. 즉, 세포를 무혈청 배지와 함께 6-웰에 씨딩(seeding)한 후 24시간 동안 배양하였다(1.0×10^6 세포/웰). 이어서, 새로운 배지로 교체하고, 다양한 농도의 시료로 1 내지 24시간동안 처리하였다. 세포를 RIPA 세포용해(lysis) 완충액에서 4°C로 10분동안 세포용해시켰다. 세포 용해물(cell lysate) 10 μ g을 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 의해 분리하고, 폴리비닐리덴 플루오라이드 막으로 이동시키고, 5% 탈지유로 브러킹(blocking)하고, 1차 항체로 하이브리드화하였다(1:10000로 희석). 실온에서 호스래디시-퍼옥시다아제(horseradish-peroxidase)-접합된 2차 항체로 배양한 후에, 화학발광 ECL 분석 키트를 사용하여 제조업체 지시에 따라 면역반응성 단백질을 검출하였다. LAS3000(등록상표) Luminescent image analyzer (Fujifilm Life Science, 일본 도쿄 소재)를 이용하여 웨스턴 블롯 밴드를 시각화하였다.

[0039] 단백질 발현을 웨스턴 블롯 분석에 의해 조사하기 위하여 세포를 1시간 내지 24시간동안 7 '-플로로에콜로 처리하고, HFDPC에서의 웨스턴 블롯 결과 및 이에 대한 그래프를 도 3 내지 6의 (a)에 나타내고, HaCaT에서의 웨스턴 블롯 결과 및 이에 대한 그래프를 도 3 내지 6의 (b)에 나타내었다. 세포증식에 관련하는 ERK 및 AKT 경로에 대한 실험에서는 7 '-플로로에콜을 HFDPC와 HaCaT에 1시간동안 처리한 반면, 세포자멸사에 관련된 Bcl-2, Bax, p53, 카스파아제-9 및 카스파아제-3에 대한 실험에서는 7 '-플로로에콜을 HFDPC와 HaCaT에 24시간동안 처리한 후 단백질 발현을 관찰하였다.

[0040] 그래프의 결과값($n=3$)은 처리 시료를 함유하지 않은 대조군의 비(ratio)로서 표기하였으며, 수치는 평균 $\pm$

SEM이며, 그래프 위에 기재된 상이한 영문자는 던컨 다중 검정에서 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타낸다.

[0041] 7 ‘-플로로에콜에 의한 HFDPC 및 HaCaT의 ERK 경로 활성화

[0042] 세포 증식과 관련된 ERK 경로에 대한 7 ‘-플로로에콜의 활성화를 연구하기 위하여 HFDPC 및 HaCaT 상에 7 ‘-플로로에콜을 처리한 후 1시간동안 배양하였다(도 3). 0.05 및 0.5 μM 농도의 7 ‘-플로로에콜은 대조군에 비해 MEK 1/2 단백질 발현을 1.17배 및 1.65배 증가시켰다($p < 0.05$). 0.05 및 0.5 μM 농도의 7 ‘-플로로에콜로 처리된 HFDPC에서 인산화된 ERK(p-ERK) 농도는 대조군에 비해 각각 1.39배 및 1.71배 증가되었다. 그러나, 시료를 처리한 전체 ERK 수준과 시료를 처리하지 않은 전체 ERK 수준은 유의하게 차이를 보이지 않았다. 또한, 상기와 동일한 농도의 7 ‘-플로로에콜은 c-Fos의 단백질 발현을 증가시켰다($p < 0.05$). 이는 HaCaT에서도 유사한 경향을 보여, 7 ‘-플로로에콜 처리된 MEK 1/2, p-ERK, 및 c-Fos 단백질 발현이 7 ‘-플로로에콜 처리량에 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 7 ‘-플로로에콜이 HFDPC 및 HaCaT의 ERK 경로에 영향을 주어 활성화시킴을 시사한다.

[0043] 7 ‘-플로로에콜에 의한 HFDPC 및 HaCaT의 AKT 경로의 활성화

[0044] 세포 증식과 관련된 AKT 경로에 대한 7 ‘-플로로에콜의 활성화를 연구하기 위하여 HFDPC 및 HaCaT 상에 7 ‘-플로로에콜을 처리한 후 1시간동안 배양하였다(도 4). 0.05 및 0.5 μM 농도에서 7 ‘-플로로에콜은 PI3K 수준을 대조군에 비해 각각 1.76배 및 3.07배 증가시켰다. 동일한 농도의 7 ‘-플로로에콜로 처리된 HFDPC에서 인산화된 AKT (p-AKT) 단백질 발현은 대조군에 비해 각각 1.53배 및 2.40배 증가하였다. 그러나, 전체 AKT 수준은 시료로 처리된 경우와 시료로 처리되지 않은 경우에서 거의 차이를 나타내지 않았다. 또한, 7 ‘-플로로에콜은 0.5 μM 농도에서 HaCaT의 PI3K 및 pAKT 농도를 1.75배 및 1.65배로 유도하였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 7 ‘-플로로에콜이 HFDPC 및 HaCaT의 AKT 경로를 활성화시킴을 나타낸다.

[0045] 7 ‘-플로로에콜에 의한 HFDPC 및 HaCaT의 Bcl-2 증가 및 Bax와 p53의 감소

[0046] 웨스턴 블롯 분석에 의한 세포자멸사 효과를 연구하기 위하여, HFDPC 및 HaCaT 상에 7 ‘-플로로에콜을 처리한 후 24시간동안 배양하였다(도 5).

[0047] 7 ‘-플로로에콜은 HFDPC에서 Bcl-2 단백질 발현 수준을 7 ‘-플로로에콜 처리량에 의존적으로 유의하게 증가시켰다. Bax 및 p53 단백질 발현은 7 ‘-플로로에콜로 처리된 HFDPC에서 감소하였다 ($P < 0.05$). 또한, HaCaT에서 Bcl-2 단백질 발현은 0.05 및 0.5 μM 농도 각각에서 대조군에 비해 2.60배 및 4.21배 증가하였다. 반면에, 7 ‘-플로로에콜은 0.5 μM 농도에서 HaCaT의 Bax 및 p53 수준을 각각 0.67배 및 0.72배 감소시켰다($p < 0.05$). 이러한 실험 결과는 7 ‘-플로로에콜이 HFDPC 및 HaCaT에 대한 항-세포자멸사 효과를 가짐을 보여주는 것이다.

[0048] 7 ‘-플로로에콜에 의한 HFDPC 및 HaCaT중 카스파아제-9 및 카스파아제-3의 감소

[0049] 웨스턴 블롯 분석에 의한 카스파아제-9 및 카스파아제-3의 단백질 발현을 연구하기 위하여, HFDPC 및 HaCaT에 7 ‘-플로로에콜을 처리한 후 24시간동안 배양하였다(도 6). 7 ‘-플로로에콜은 HFDPC 상의 0.5 μM 농도에서 카스파아제-3 및 카스파아제-3 단백질 발현을 대조군에 비해 0.14배 및 0.13배 감소시켰다($p < 0.05$). HaCaT에서, 카스파아제-3의 단백질 발현은 대조군에 비해 7 ‘-플로로에콜 0.05 및 0.5 μM 농도 각각에서 각각 0.88배 및 0.68배 감소되었다. 따라서, 이들 결과는 7 ‘-플로로에콜이 HFDPC 및 HaCaT의 카스파아제-9 및 카스파아제-3과 같은 키나아제에 영향을 주어 활성을 감소시키는 것으로 나타났다.

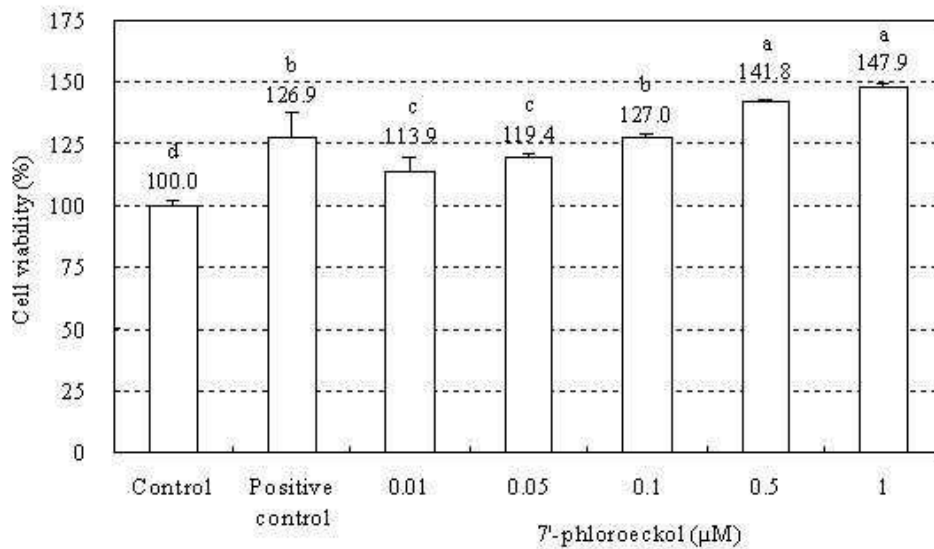
[0050] 상기 실험 결과에서, 7 ‘-플로로에콜은 0보다 크고 1 μM 이하의 농도에서 HFDPC 및 HaCaT의 유의한 증식을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 본 실험결과에 따라, 0.5 및 1.0 μM 농도의 7 ‘-플로로에콜에 의해 HFDPC 및 HaCaT의 증식율을 증식시키고 ERK, AKT 및 Bcl-2 계 단백질 발현 변화에 영향을 준 것으로 나타났다. 즉, 7 ‘-플로로에콜은 ERK 및 AKT의 인산화를 유의하게 증가시키는 것으로 밝혀졌고, 7 ‘-플로로에콜에 의한 세포 증식 관련 인자인 ERK와 AKT 활성화로 인해 HFDPC 및 HaCaP 생존이 연장되는 것으로 판단된다. 모발 주기 중

HFDPC는 일관되게 Bcl-2 양성인 유일한 영역으로 특히, HFDPC에서 Bcl-2의 작용은 성장기(아나겐 단계)에서 세포자멸사를 저지하고 세포증식에 도움을 주는 역할을 하는 것으로 생각된다. 린더 등은 모든 연구된 모발 주기동안 HFDPC에서 Bax 착색이 관찰되지 않았다고 보고하였으나, 최근 연구에 따르면 Bax의 발현이 관찰되는 것으로 나타났다. 본 발명자들은 HFDPC 및 HaCaP에서 Bax 단백질의 발현을 관찰할 수 있었으며, 이에 따르면, HFDPC 및 HaCaP에서 7'-플로로에콜이 항-세포자멸 분자인 Bcl-2의 발현을 증가시키는 반면, pro-세포자멸사 중인 Bax 발현을 감소시켰다. 또한, 7'-플로로에콜이 HFDPC 및 HaCaT의 세포사멸에 관계하는 카스파아제-9 및 카스파아제-3의 발현을 저해하여 세포사멸을 저해시키는 것으로 나타낸다. 이러한 결과는 7'-플로로에콜이 HFDPC 및 HaCaP에서 Bcl-2 및 Bax의 비를 조절하고, 카스파아제-9 및 카스파아제-3을 저해시킴으로써 세포 생존을 촉진시킴을 나타낸다.

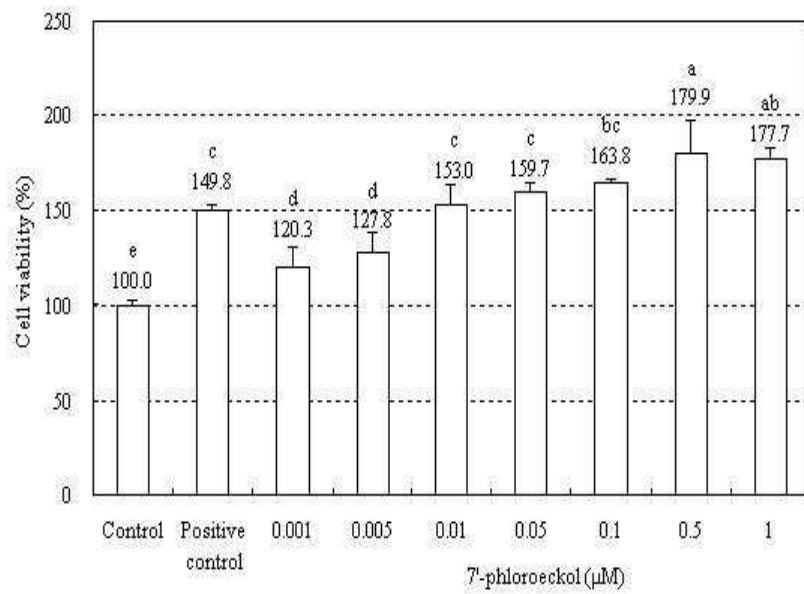
[0051] 결론적으로, 7'-플로로에콜이 HFDPC 및 HaCaP에서 ERK, Akt, Bcl-2, Bax, 카스파아제-9 및 카스파아제-3 발현에 영향을 준다는 것이 처음으로 밝혀졌다. 본 발명은 또한 7'-플로로에콜이 ERK 및 AKT 신호화 경로 모두를 활성화시켜서 HFDPC 및 HaCaP 생존도를 증진시키고, Bcl-2/Bax 비를 증가시키며, 카스파아제-9 및 카스파아제-3의 키나아제를 감소시켜서 세포 증식은 유도하는 반면, 세포 자멸 과정을 더욱 억제함을 증명하였다. 7'-플로로에콜은 HFDPC 및 HaCaP에 대한 이러한 증식 및 항-세포자멸 효과를 통해 인체 모발의 성장을 자극하여서, 아나겐을 연장시킬 수 있으며, HFDPC 및 HaCaP 이외의 다른 세포 유형의 모낭에도 유사한 증식 자극 효과를 줄 수 있을 것으로 생각된다.

도면

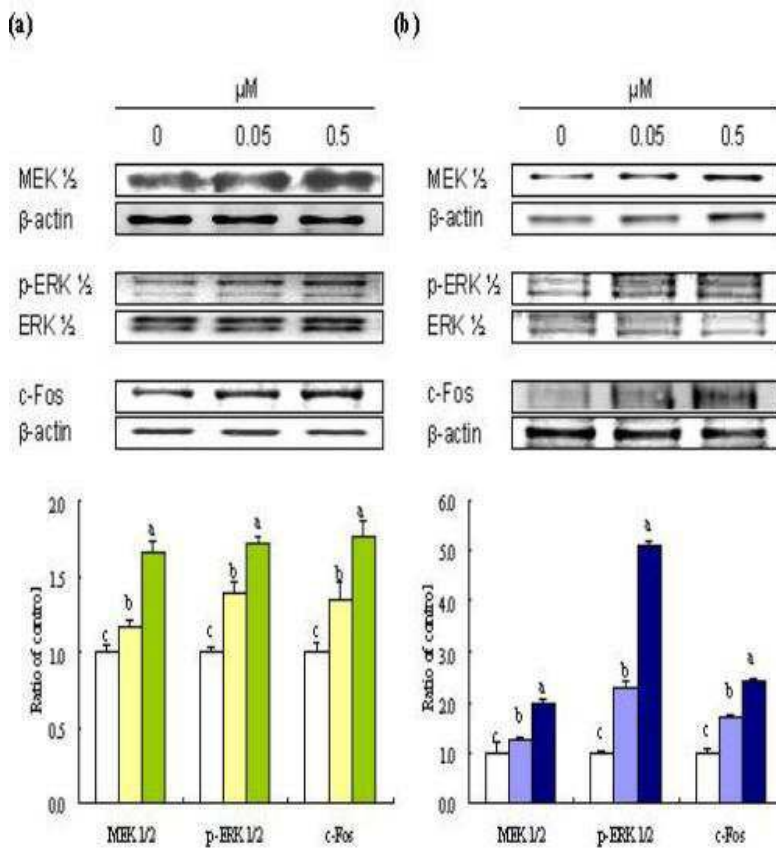
도면1



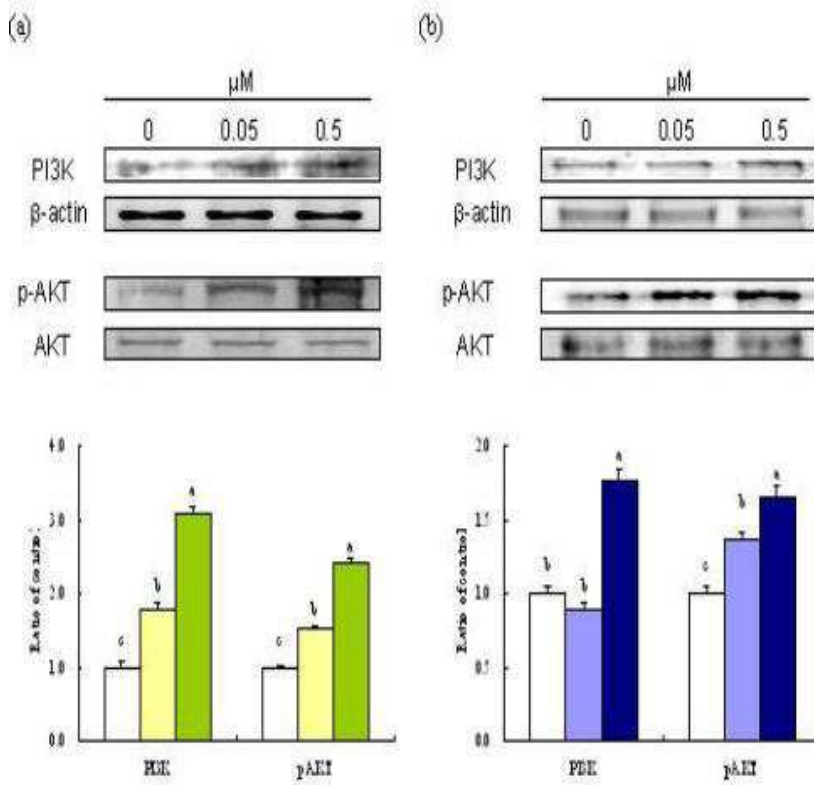
도면2



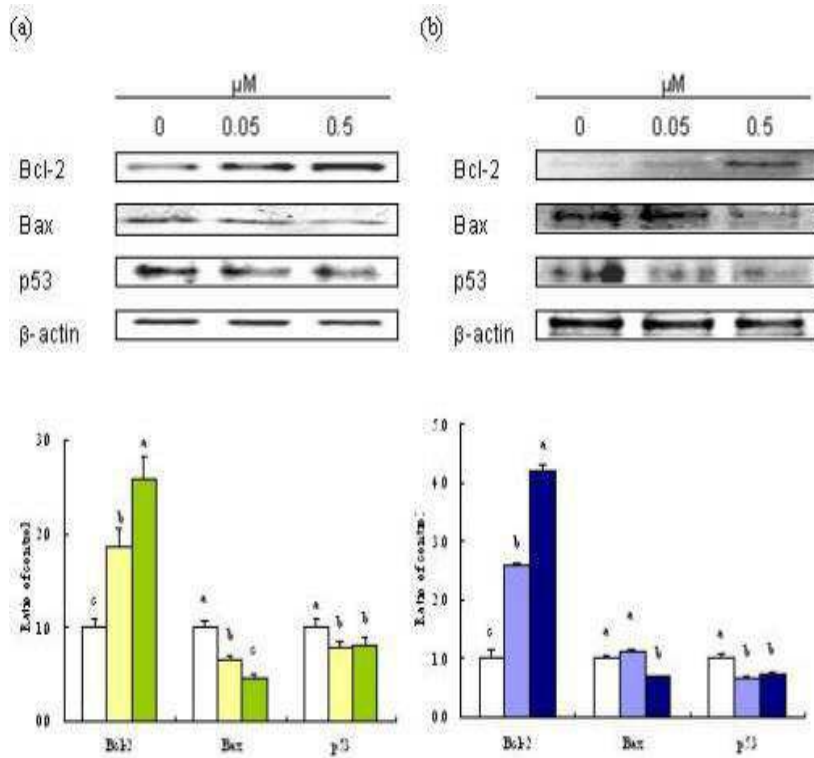
도면3



도면4



도면5



도면6

