(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0066789
(43) 공개일자 2020년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/539 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 8/9789 (2017.01) *A61P 17/16* (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/539 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0153308
(22) 출원일자 2018년12월03일
심사청구일자 2018년12월03일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
이승호
인천광역시 남구 노적산로 43, 103동 2405호
(74) 대리인
차준용

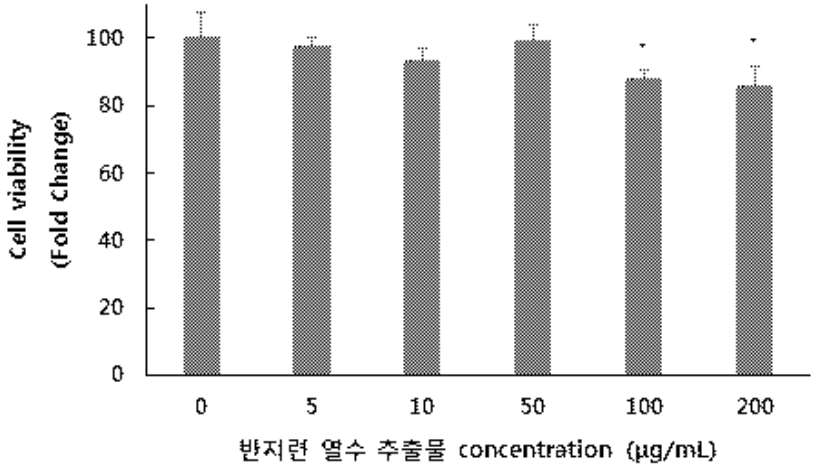
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **반지련 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 반지련(*Scutellaria Barbata* D. Don) 열수 추출물을 유효성분으로 함유하여 자외선에 의한 피부 광노화를 예방 또는 치료에 사용될 수 있는 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 반지련 열수 추출물은 UVB 처리된 마우스 피부 섬유아세포(NIH 3T3 세포)에서 프로콜라겐 합성 유전자(procollagen type-1)의 발현을 증대시키고 extracellular matrix(ECM) 분해 효소(MMP-1)의 발현을 감소시키는 효과가 있으며, UVB선 처리에 의해 증가된 염증성 사이토카인(IL-6, IL-8)의 발현을 억제할 수 있는 것으로 확인되어 이에 따라 본 발명의 반지련 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 자외선에 의한 광노화를 예방하거나 치료하는데 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61P 17/16 (2018.01)
A61Q 17/04 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A61K 2236/331 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 201601610003
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기본연구지원사업
연구과제명 광노화에 현상에 대한 한의학적 치료기술 개발 및 기전연구
기 여 율 1/1
주관기관 인천대학교 산학협력단
연구기간 2016.06.01 ~ 2022.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

반지련(*Scutellaria Barbata* D. Don) 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 반지련 열수 추출물은 80~ 100℃의 물에 의해 추출된 것을 특징으로 하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 반지련 열수 추출물은 자외선에 의한 피부주름 및 피부탄력을 예방 또는 개선시키는 것을 특징으로 하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 반지련 열수 추출물은 메탈로프로티나제-1(metalloproteinase, MMP-1) 발현을 억제시켜 자외선에 의해 유도되는 피부의 콜라겐 또는 젤라틴의 파괴를 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 반지련 열수 추출물은 프로콜라겐 타입-1(procollagen type-1) 발현을 증가시켜 자외선에 의해 유도되는 피부의 콜라겐 또는 젤라틴의 합성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약학조성물, 건강식품 또는 화장료 조성물로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

반지련(*Scutellaria Barbata* D. Don) 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 자외선에 의한 피부 염증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 반지련 열수 추출물은 염증성 사이토카인 IL-6 및 IL-8 발현을 억제시켜 자외선에 의해 유도되는 염증 인자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 염증 예방 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 반지련(*Scutellaria Barbata* D. Don) 열수 추출물을 유효성분으로 함유하여 자외선에 의한 피부 광노화를 예방 또는 치료에 사용될 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 피부노화는 요인에 따라 내인성 노화(Intrinsic aging)와 외인성 노화(Extrinsic aging)로 구분할 수 있다. 내인성 노화는 나이에 따른 피부 표피 및 진피의 생리적 기능 변화가 원인이며, 외인성 노화는 대기오염, 자외선 노출, 스트레스 등의 환경으로부터 발생하는 피부의 생리적 기능 변화가 원인으로 알려져 있다.

[0004] 특히 피부 건강을 위협하는 요인 중의 하나인 UV는 자연환경에서 쉽게 피부에 직접적으로 폭로될 수 있어 이에 대한 관심이 급증하고 있다. UV는 그 파장에 따라 UVA(320-400nm), UVB(280-320nm), UVC(200-280nm)로 나누어지며, UVC는 대부분 성층권에서 흡수되어 지표에 도달하지 못하므로 대기 중의 자외선은 UVA와 UVB로 구성된다.

[0005] UVA와 UVB 모두 피부 조사시 그 양과 질적인 면에서 염증반응이 달리 나타날 수 있다. UVA는 표피 내에서의 흡수가 적고, UVB보다 좀 더 피부 깊숙이 침투할 수 있으며 홍반을 유발시키기 위해서는 UVB보다 1000배의 광량이 필요하다. 또한 UVA의 홍반유발용량은 주로 혈관의 손상과 진피 내 세포침윤을 일으키는 반면, 동량의 홍반을 유발할 수 있는 UVB는 주로 일광화상세포와 같은 표피에 변화를 일으킨다.

[0006] 이러한 노화의 메커니즘 중 UV에 의해 유도되는 산화적 스트레스(Oxidative Stress)는 체내의 자유라디칼(Free Radical)을 증가시키고, 콜라겐(Collagen)을 분해하는 MMP-1의 활성 증가 및 히아루론산(Hyaluronic acid)을 분해는 히아루론라제(Hyaluronidase)의 활성 증가로 피부 표피 및 진피 손상을 야기한다.

[0007] 피부노화는 원인에 따라 크게 내인성 노화와 광노화로 나뉜다. 피부노화를 일으키는 원인에는 스트레스, 환경, 유전 등 다양한 원인이 있지만 그 중에서도 가장 피부건강을 해치는 원인은 자외선이다. 환경오염과 야외활동의 증가로 자외선 노출량이 많아지면서 자외선에 의한 피부노화가 증가하고 있다. 자외선으로 인한 피부노화를 광노화(photoaging)라고 부르는데, 광노화로 인한 피부의 임상 및 조직학적 특징을 살펴보면, 먼저 임상적 특징은 내인성 피부노화에 의한 주름보다 굵고 깊으며 잔주름이 많이 발생한다. 또 피부가 건조하고, 거칠어지며, 탄력성이 감소한다.

[0008] 조직학적 특징으로는 피부의 결합조직을 구성하는 주요 구성 단백질인 콜라겐의 양이 감소하며, 콜라게나제의 발현이 더욱 증가된다. 또한 피부 진피층의 기질 단백질 중 콜라겐은 90% 이상을 차지하고, 콜라겐 전구체인 프로콜라겐의 합성이 감소하며 분해효소인 MMPS의 발현이 증가한다. 주름 형성에 있어서 피부에 탄력을 나타내는 구성성분 중 하나인 엘라스틴은 MMPs에 속하는 elastase-1에 의해 분해되는데 자외선은 elastase-1의 활성을 증가시켜 엘라스틴의 분해를 증가시켜 진피의 두께가 얇아지며 피부의 탄력성이 저하된다.

[0009] 반지련(*Scutellaria barbata* D. Don)은 꿀풀과(Labiatae)의 여러해살이풀로서 지상부를 사용하는 생약이다. 길이는 15 내지 35cm로 뿌리는 가늘며, 줄기는 네모지고 직경은 2 내지 5mm이다. 표면은 홍록색에서 암자색이며 잎은 마주나고 주름지며 혹 말려 있거나 펴보면 달걀 모양의 피침형이고, 잎의 길이는 1.5 내지 3cm, 너비는 0.5 내지 1cm로, 잎에는 부드러운 털이 있고 윗면은 짙은 녹색이며 아랫면은 회녹색이다. 반지련은 예로부터 해열, 해독, 지혈, 이뇨의 목적으로 사용되어 왔다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0992088호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 천연물인 반지련(*Scutellaria Barbata* D. Don) 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 자외선 조사에 의한 피부노화를 예방하거나 치료할 수 있는 피부 광노화 개선용 조성물로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 실시예로 반지련(*Scutellaria Barbata* D. Don) 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 반지련 열수 추출물은 80~100℃의 물에 의해 추출된 것을 특징으로 하며, 보다 바람직하게는 상기 반지련 열수 추출물은 100℃의 물에 의해 추출된 것을 특징으로 한다.

[0016] 상기 반지련 열수 추출물은 자외선에 의한 피부주름 및 피부탄력을 예방 또는 개선시키는 것으로 메탈로프로티나제-1(metalloproteinase, MMP-1) 발현을 억제시켜 자외선에 의해 유도되는 피부의 콜라겐 또는 젤라틴의 파괴를 억제하고, 상기 반지련 열수 추출물은 프로콜라겐 타입-1(procollagen type-1) 발현을 증가시켜 자외선에 의해 유도되는 피부의 콜라겐 또는 젤라틴의 합성을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0017] MMP-1 expression pathway는 피부가 자외선을 받았을 때 생기는 ROS 에 의해 시작된다. 자외선에 의해 cell membrane 내 ROS(Reactive Oxygen Species)가 증가하게 되고, 이는 MMP-1의 과발현을 유도하여 최종적으로 콜라겐, 젤라틴 등을 분해하여 그 합성을 막아 피부 광노화를 유도하게 된다. UV를 받은 후 시간이 지나 MMP1의 양이 줄어들면 콜라겐, 젤라틴 등이 다시 합성되게 된다. 결론적으로 UV에 의한 피부자극은 MMP-1을 과발현 시키게되고, 콜라겐, 젤라틴 등을 잘라 피부 노화를 유발한다.

[0018] 진피(dermis)는 표피와 피하지방 사이에 위치하여 유두층(papillary layer)과 망상층(reticularlayer)두 층으로 구분된다. 이는 구조적으로 표피를 지지하고 영양분을 공급하며, 피부에 유연성, 탄력성, 장력 등을 제공한다. 섬유아세포(fibroblast)에서 대부분 만들어지는 ECM은 콜라겐, 엘라스틴, 프로테오글리칸(proteoglycan), 피브로넥틴(fibronectin) 및 라미닌(laminin)으로 구성되어 있다. 콜라겐은 진피층의 90%를 차지하며, type Ⅰ이 80～85%, type Ⅲ이 10～15%, type Ⅴ, Ⅵ, Ⅶ이 소량 존재하며, 나머지 5% 정도가 type Ⅵ 콜라겐으로 표피와 진피 경계 부분에 분포한다. 이중 collagen type Ⅰ에서 세 가닥의 콜라겐 묶음이 해체·파열·분열·확산되는 것은 광노화 피부에서 가장 대표적으로 일어나는 현상으로 결과적으로 이는 깊은 주름의 형태로 보여진다.

[0019] 따라서 본 발명의 반지련 열수 추출물은 자외선에 의해 증가한 MMP-1의 발현을 억제하고, 감소한 procollagen type 1 유전자의 발현을 증가시켜 자외선에 의한 피부탄력이 감소되는 것을 보호하고 나아가 주름이 형성되는 것을 억제한다.

[0021] 본 발명의 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물은 약학조성물, 건강식품 및 화장료 조성물로 제공될 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시 예에서, 상기 반지련 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0023] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 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, 마그

네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시 예에서, 반지련 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명은 반지련 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다. 상기 건강식품은 상기 반지련 열수 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0029] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0030] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 반지련 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공할 수 있다. 상기 화장료 조성물은 유효성분인 반지련 열수 추출물 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0033] 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 썬 크림, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0034] 상기 제형이 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.

[0035] 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0036] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리

콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0037] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 실시예로, 반지련(*Scutellaria Barbata* D. Don) 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 자외선에 의한 피부 염증 예방 또는 치료용 조성물을 제공하며, 상기 반지련 열수 추출물은 염증성 사이토카인 IL-6 및 IL-8 발현을 억제시켜 자외선에 의해 유도되는 염증 인자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0040] UVB는 피부 각질세포 내에 침투하여 세포에 손상 또는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 생성한다. ROS는 산소기(oxygenradical) 뿐만 아니라 산소의 비자유기 유도체(non-radicalderivatives of O_2)를 총칭하며 정상 산소성 개체(aerobic organism)는 ROS 발생과 항산화 방어계가 서로 균형을 이루고 있으나 슈퍼옥사이드(superoxide), 과산화수소(hydrogenperoxide) 및 지질 퍼옥실 라디칼(lipid peroxyl radical) 등을 포함한 ROS는 피부세포의 염증반응을 야기 시키며 직접적으로 세포 신호전달 과정을 매개하고 조직 손상을 유발한다. 이는 피부염증, 세포사멸 등을 초래하며, 이 과정에 염증성 사이토카인(IL-6, IL-8, IL-10), COX-2와 같은 염증 발현 유전자, 세포사멸 관련 유전자의 발현이 관여한다.

[0041] 따라서 본 발명의 반지련 열수 추출물은 자외선에 의해 증가된 염증성 사이토카인(IL-6 및 IL-8)의 발현을 억제하여 자외선에 노출에 의해 발행될 수 있는 피부 염증을 억제할 수 있다.

발명의 효과

[0043] 본 발명에 따른 반지련 열수 추출물은 UVB 처리된 마우스 피부 섬유아세포(NIH 3T3 세포)에서 프로콜라겐 합성 유전자(procollagen type-1)의 발현을 증대시키고 extracellular matrix(ECM) 분해 효소(MMP-1)의 발현을 감소시키는 효과가 있으며, UVB선 처리에 의해 증가된 염증성 사이토카인(IL-6, IL-8)의 발현을 억제할 수 있는 것으로 확인되어 이에 따라 본 발명의 반지련 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 자외선에 의한 광노화를 예방하거나 치료하는데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 반지련 열수 추출물을 이용한 마우스 피부섬유아세포(NIH 3T3 cells) 세포 독성평가 결과를 나타내는 도면이다(*는 대조군과 유의미한 차이가 있음을 나타냄).

도 2는 반지련 열수 추출물의 UVB 처리된 피부섬유아세포주(NIH 3T3 cells) 에서 MMP-1 및 프로콜라겐 type-1 발현 조절효과를 나타내는 도면이다(상이한 문자는 그룹간에 유의미한 차이를 나타냄, $p<0.05$).

도 3은 반지련 열수 추출물의 UVB 처리된 피부섬유아세포주(NIH3T3 cells) 에서 반지련 열수 추출물의 염증성 사이토카인 IL-6 및 IL-8 발현조절효과를 나타내는 도면이다(상이한 문자는 그룹간에 유의미한 차이를 나타냄, $p<0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0048] **실시예: 반지련 열수 추출물 제조**

[0049] 반지련(*Scutellaria Barbata* D. Don) 생약소재 17.35g을 증류수(distilled water) 1 리터에 넣고 100℃에서 2시간 30분 동안 추출하여 상층액을 여과 및 농축하였다(대웅 약탕기, DW-290). 상기 추출물은 동결건조기

(Biotron, Clean-vac 12)로 24시간 건조하여 2.03g(수율 11.7%)의 추출물 분말을 얻었다. 상기 분말은 2차 증류수에 녹여 사용하였다.

[0051] 실험예

[0052] (1) 세포독성 검증

[0053] NIH-3T3 세포(1.5×10^4)를 96 well에 접종한 후 24h 배양하여 세포 밀도가 70 ~ 80%가 되도록 한다. 배지 조성은 DMEM + 10% Bovine serum + 1% antibiotics이며, 배양 조건은 37℃, 5% CO_2이다. PBS로 2회 세척 후 반지련 열수 추출물을 다양한 농도로 serum free media에 혼합하여 각 well에 분주한 다음 추가적으로 24h 배양한다. 세포 생존율(cell viability)은 WST-1(EZ-Cytox; DoGenBio) 용액을 각 well 당 10㎕씩 첨가하여 1시간 배양한 후, 마이크로플레이트 리더(iMARK™; BIO-RAD)를 사용하여 450nm 파장에서 OD 값을 측정하여 비교한다.

[0054] 세포독성 검증 결과는 도 1에 도시하였다. 도 1을 참조하면, 반지련 열수 추출물은 50 ug/mL 수준까지 세포독성이 없는 것으로 판단되어 이후의 실험을 50 ug/mL수준 이하에서 진행하였다.

[0056] (2) 자외선 처리된 NIH3T3세포에서 반지련 열수 추출물의 MMP-1 발현 억제 효과

[0057] 1) UVB 처리

[0058] 마우스 피부아세포주는 DMEM(10% fetal bovine serum, 1% 페니실린, 스트렙토마이신)배지에서 37℃ CO_2(5%) 환경에서 배양하였다. NIH-3T3 세포(1.2×10^5)를 6 well에 접종한 후 24시간 배양하여 세포 밀도가 70 ~ 80%가 되도록 한다. 무혈청 배지(serum free media)로 3시간 배양한 후 반지련 열수 추출물을 무혈청 배지에 혼합하여 분주한 후 추가로 24시간 배양한다. PBS 세척 후 PBS(0.5mL)을 넣은 상태에서 25mJ/cm^2에 해당하는 UVB를 조사한다(Bio-Link BLX-312; Vilber Lourmat GmbH, France). 이후 완전배지(complete media)를 처리하여 24시간 배양하였다.

[0060] 2) real-time PCR

[0061] UVB 처리 이후 NIH3T3 세포에서 MMP-1 및 procollagen type 1의 발현 상태를 확인하기 위하여 UVB 처리하지 않은 정상 세포(control), 반지련 열수 추출물 없이 UVB 처리한 세포, 반지련 열수 추출물과 함께 UVB 처리한 세포에 대하여 각각 real-time PCR을 수행하였다. 실험방법은 아래와 같다.

[0062] TRIZOL 용액을 처리하여 1,5mL ep-tube에 옮겨 담는다. 1/5 volume의 클로로포름 용액(chloroform:Trizol=1:5)을 처리하여 up & down을 실시하여 잘 섞어준 뒤 3분간 상온에 방치한다. 원심분리(4℃, 15min, 13,000rpm) 후 상층액을 분리하고 이소프로판올을 1:1에 비율로 섞어준다. RNA가 잘 뭉치도록 up & down을 실시한 후 20분간 상온에 방치한다. 원심분리(4℃, 15min, 13,000rpm)후 RNA 펠렛을 75% 에탄올 500㎕를 첨가하여 세척한다. RNA 펠렛은 DEPC water에 녹여 55℃, 10min 변성(denaturation) 시킨 후 cDNA 합성에 사용하였다.

[0063] cDNA를 합성하기 위하여, 5X RTase M-MLV 완충액, dNTP 혼합물 10mM, RTaseM-MLV(Takara, Tokyo, Japan) 4㎕ 및 초순수(ultrapure water)를 총 부피 20㎕로 첨가하고, 37 ℃에서 인큐베이션 한 후 10분 동안 70℃까지 가열하였다. cDNA는 Power SYBR Premix Ex Taq 키트(Takara, Tokyo, Japan)를 사용하여 Thermal Cycler Dice(Takara, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

표 1

[0064]

유전자	방향	서열	서열번호
MMP-1	정방향	ACTTTCCAGCCAGGCCCA	1
	역방향	CACTGCTGTTGGTCCACGT	2
procollagen type-1 (COL1A1)	정방향	CACTGCTGTTGGTCCACGT	3
	역방향	AAAGCACAGCACTCGCCC	4

[0066] 상기 Real-time PCR 실험 결과는 도 2에 도시하였다. 도 2를 참조하면 마우스 피부세포주(NIH-3T3)에서 UVB선 처리시 정상세포주보다 MMP-1은 약 5배 증가되고 procollagen type 1 유전자의 발현은 약 60% 감소되는 것을 확인할 수 있다.

[0067] UVB처리에 따른 MMP-1 및 procollagen type 1 유전자 발현은 반지련 열수 추출물을 처리하는 경우 정상세포주와 비슷한 양으로 발현되는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 반지련 열수 추출물이 자외선에 의한 콜라겐 합성 저해 및 MMP-1 증가현상을 효과적으로 억제할 수 있는 효능을 보유하고 있다는 것을 증명한다.

[0068]

[0069] **(3) 자외선 처리된 피부세포주에서 반지련 열수 추출물의 염증성 사이토카인 합성 억제 효과**

[0070] 마우스 피부아세포주에 대한 UVB처리는 실험예 (2)와 동일하게 수행하였으며, UVB 처리 이후 염증성 사이토카인 IL-6 및 IL-8 발현 상태를 확인하기 위하여 UVB 처리하지 않은 정상 세포(control), 반지련 열수 추출물 없이 UVB 처리한 세포, 반지련 열수 추출물과 함께 UVB 처리한 세포에 대하여 각각 real-time PCR을 수행하였다. 실험방법은 [표 2]의 프라이머를 사용한 것을 제외하고는 실험예 (2)와 동일하다.

표 2

[0072]

유전자	방향	서열	서열번호
IL-6	정방향	ACAACCACGGCCTTCCCT	5
	역방향	AGCCTCCGACTTGTGAA	6
IL-8	정방향	TGTCCCATGCCACTCAGAGA	7
	역방향	AGCAGGTGCTCCGGTTGTAT	8

[0074] 상기 Real-time PCR 실험 결과는 도 3에 도시하였다. 도 3을 참조하면 마우스 피부섬유아세포주(NIH-3T3)에서 UVB선 처리시에 의해 증가된 IL-6 및 IL-8 발현은 반지련 열수 추출물의 전처리에 의해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

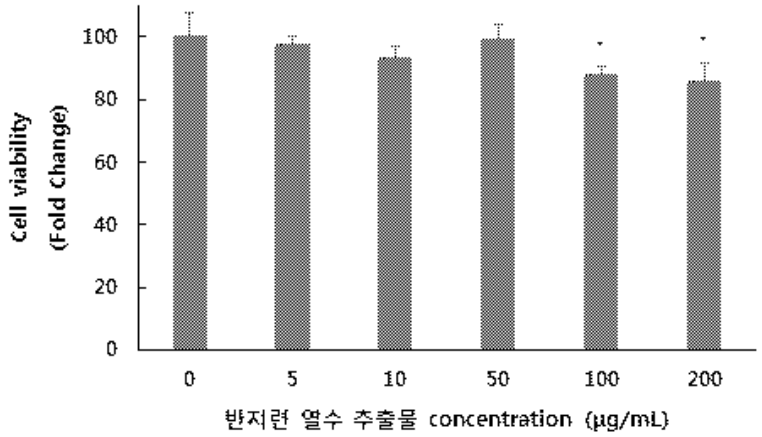
[0075] 이러한 결과는 반지련 열수 추출물이 자외선에 처리에 의해 증가된 염증성 사이토카인(IL-6 및 IL-8)을 억제할 수 있는 효능을 보유하고 있다는 사실을 증명하며, 오랜 기간 자외선 노출에 의해 발생될 수 있는 피부염증반응을 억제하는 데 효과적인 물질로 사용될 수 있다는 것을 증명한다.

[0077] 이처럼 본 발명의 반지련 열수 추출물은 UVB 처리된 마우스 피부 섬유아세포(NIH 3T3 세포)에서 프로콜라겐 합성 유전자(procollagen type-1)의 발현을 증대시키고 extracellular matrix(ECM) 분해 효소(MMP-1)의 발현을 감소시키는 효과를 확인하였다. 또한 UVB선 처리에 의해 증가된 염증성 사이토카인(IL-6, IL-8)의 발현을 억제함을 확인하였다.

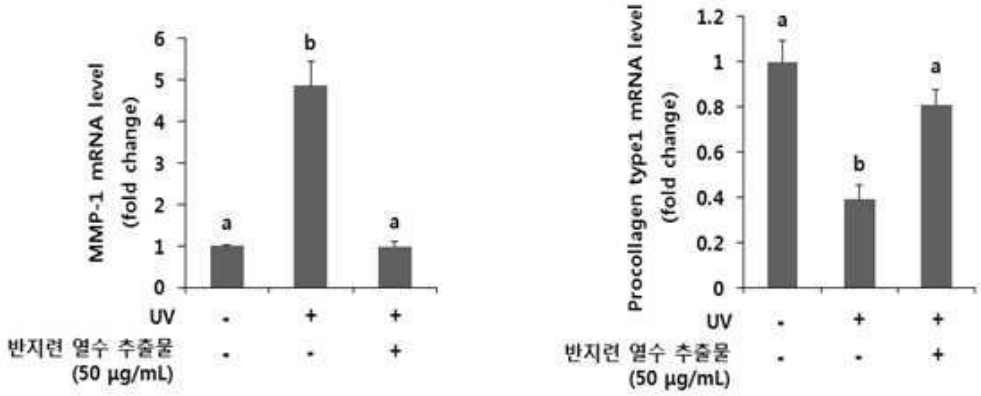
[0078] 따라서 본 발명의 반지련 열수 추출물이 피부세포 광노화를 억제함으로써 UV에 의한 주름 개선효과가 있는 피부 주름 개선 및 예방용 소재 및 화장료의 용도로 사용될 수 있다.

도면

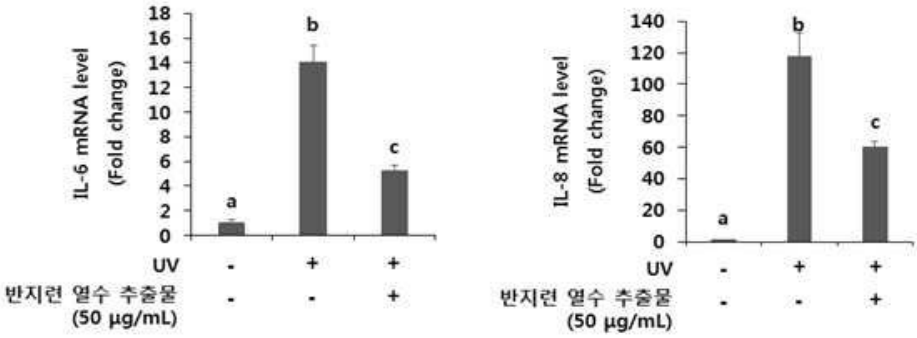
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> INCHEON UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING SKIN PHOTOAGING COMPRISING WATER EXTRACTS OF SCUTELLARIA BARBATA D. DON

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for MMP-1

<400> 1

actttccagc caggccca 18

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for MMP-1

<400> 2

cactgctgtt ggtccacgt 19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for procollagen type-1

<400> 3

cactgctgtt ggtccacgt 19

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for procollagen type-1

<400> 4

aaagcacagc actcgccc 18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for IL-6

<400> 5

acaaccacgg ccttccct 18

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for IL-6

<400> 6

agcctccgac ttgtgaa 17

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for IL-8

<400> 7

tgtcccatgc cactcagaga 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for IL-8

<400> 8

agcaggtgct ccggttgtat 20