



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0054345
(43) 공개일자 2017년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/488 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 8/97 (2017.01) A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/488 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0055397(분할)
(22) 출원일자 2017년04월28일
심사청구일자 2017년04월28일
(62) 원출원 특허 10-2015-0122773
원출원일자 2015년08월31일
심사청구일자 2015년08월31일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
김영철
대구광역시 달서구 호산로 125, 209동 1305호 (파
호동, 삼성명가타운)
이채명
대구광역시 서구 새방로25길 16-1, B동 301호 (상
리동, 경원하이츠2차)
(74) 대리인
특허법인태백

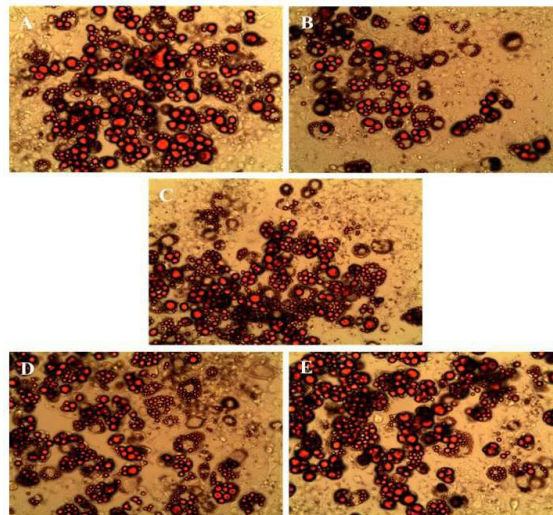
전체 청구항 수 : 총 4 항

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

(57) 요약

본 발명은 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 천연물인 갈근 추출물은 자외선 조사에 의한 염증성 사이토카인의 발현을 억제시킴으로써, 지방세포 분화 및 지방합성 인자의 유전자 및 단백질의 발현을 증가시키고 지방분해 인자의 발현을 저해시키는 효과를 나타내는 것으로 확인됨에 따라, 본 발명의 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 자외선에 의한 피부 피하 지방 조직의 지방 합성 저해효과와 지방 분해 촉진효과를 개선하여 지방함량을 증가시킴으로써 피부탄력 및 주름 생성과 같은 광노화를 예방하거나 치료하는데 사용될 수 있다.

대표도 - 도20



(52) CPC특허분류

A61K 8/97 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

김상남

경상북도 성주군 벽진면 수촌2길 12-8

박민아

인천광역시 연수구 새말로 49번길 14, 203호

명세서

청구범위

청구항 1

사람으로부터 분리된 자외선 조사 사람피부섬유아세포에 갈근 에탄올 추출물을 처리하는 단계를 포함하며, 상기 갈근 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 HSL(Hormone-sensitive lipase) 단백질 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 생체 외 HSL 단백질 발현 억제 방법.

청구항 2

사람으로부터 분리된 자외선 조사 사람피부섬유아세포에 갈근 에탄올 추출물을 처리하는 단계를 포함하며, 상기 갈근 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 PPAR γ , ACC(Acetyl-CoA carboxylase) 및 FAS(Fatty acid synthase) 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 생체 외 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질 발현 증가 방법.

청구항 3

갈근 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하며, 상기 갈근 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 HSL 단백질 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, HSL 단백질 발현 억제 용 시약 조성물.

청구항 4

갈근 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하며, 상기 갈근 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질 발현 증가용 시약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하여 자외선에 의한 피부 광노화를 예방 또는 치료에 사용될 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지속적인 자외선 노출은 피부 광노화의 원인이 되며, 피부 노화는 일반적으로 주름 및 탄력 저하와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 자외선에 의한 피부 손상 원인 중 하나는 자외선에 의해 형성된 활성 산소종이다. 이러한 활성 산소종이 세포 신호체계에 신호를 보내어 결국 피부의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 성분인 콜라겐이나 젤라틴 등의 생성을 감소시키고 이들을 분해하는 효소인 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)를 생성하여 콜라겐이나 젤라틴을 파괴함으로써 피부에 주름을 형성시킨다.

[0004] 만성적인 자외선의 영향을 받은 피부에서는 외형적으로 피부의 색이 검고 촉감이 뻣뻣하며 깊은 주름이 생긴다. 이 상태가 더욱 심해지면 피부암을 유발하는데 이러한 피부의 변화를 자연노화와 구분하여 광노화라고 한다.

[0005] 이러한 광노화를 억제할 목적으로 지금까지 많은 기능성 화장품들이 개발되었으며 이들 중에는 비타민 A 계통의 레티놀을 사용하는 것과 비타민 C 계통의 아스코르브산을 사용하는 것이 대부분이다. 그러나 이들 두 가지 성분은 실온에서 불안정하여 화장품을 장기 보존할 경우 쉽게 분해되어 그 효능을 잃게 된다.

[0006] 현재까지 자외선 흡수제나 산란제, 알부틴(arbutin), 코지산(kojic acid), 하이드로퀴논(hydroquinone) 등과 같은 티로시나아제 활성 저해제, 활성산소종을 소거하는 아스코르브산(ascorbic acid) 및 유도체, 코엔자임 Q10(coenzyme Q10)등이 미백효과가 있다고 알려졌으나, 피부 안정성, 제형 안정성 등의 문제로 사용되지 않거나

제한된 양만 사용되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2013-0043872호(2013.05.02 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 천연물인 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 자외선 조사에 의한 피부노화를 예방하거나 치료할 수 있는 피부 광노화 개선용 조성물로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 갈근 추출물은 자외선에 의한 피부주름 및 피부탄력을 예방 또는 개선시킬 수 있다.

[0011] 상기 갈근 추출물은 자외선에 의한 염증성 사이토카인 IL-6 및 TNF- α 의 발현을 억제시킴으로써 PPAR γ , C/EBP α , ACC 및 FAS 유전자 및 단백질의 발현을 증가시켜 피부피하지방 생성을 촉진할 수 있으며, 지방분해 인자인 HSL 단백질의 발현을 감소시켜 피부피하지방의 감소를 저해시킬 수 있다.

[0012] 본 발명의 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물은 약학조성물, 건강식품 및 화장품 조성물로 제공될 수 있다.

[0013] 본 발명은 사람으로부터 분리된 자외선 조사 사람피부섬유아세포에 갈근 에탄올 추출물을 처리하는 단계를 포함 하며, 상기 갈근 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 HSL(Hormone-sensitive lipase) 단백질 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 생체 외 HSL 단백질 발현 억제 방법을 제공할 수 있다.

[0014] 본 발명은 사람으로부터 분리된 자외선 조사 사람피부섬유아세포에 갈근 에탄올 추출물을 처리하는 단계를 포함 하며, 상기 갈근 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 PPAR γ , ACC(Acetyl-CoA carboxylase) 및 FAS(Fatty acid synthase) 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 생체 외 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질 발현 증가 방법을 제공할 수 있다,

[0015] 본 발명은 갈근 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하며, 상기 갈근 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 HSL 단백질 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, HSL 단백질 발현 억제용 시약 조성물을 제공할 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 갈근 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하며, 상기 갈근 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질 발현 증가용 시약 조성물을 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따르면, 천연물인 갈근 추출물은 자외선 조사에 의한 염증성 사이토카인의 발현을 억제시킴으로써, 지방세포 분화 및 지방합성 인자의 유전자 및 단백질의 발현을 증가시키고 지방분해 인자의 발현을 저해시키는 효과를 나타내는 것으로 확인됨에 따라, 본 발명의 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 자외선에 의한 피부 피하지방 조직의 지방합성 저해 효과와 지방분해 촉진효과를 개선하여 피부탄력 및 주름 생성과 같은 광노화를 예방하거나 치료하는데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 갈근 에탄올 추출물(PLREE)의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 확인한 결과이다.

도 2는 갈근 에탄올 추출물(PLREE)의 전자공유능을 확인한 결과이다.

도 3은 3T3-L1 지방전구세포에서 갈근 에탄올 추출물(PLREE)의 세포독성을 확인한 결과로, 100-1,000 $\mu\text{g/mL}$ PLREE를 3T3-L1 지방전구세포에 48시간 동안 처리하고 MTT 분석하였다.

도 4는 3T3-L1 지방전구세포에서 갈근 에탄올 추출물(PLREE)의 지방세포 분화 유도효과를 확인한 결과로, 도 4A는 분화를 유도시키지 않은 3T3-L1 지방전구세포사진이며, 도 4B는 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포사진이며, 도 4C는 PLREE 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리하고 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포사진이며, 도 4D는 PLREE 250 $\mu\text{g/mL}$ 처리하고 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포사진이며, 도 4E는 PLREE 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리하고 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포사진이다.($\times 200$)

도 5는 3T3-L1 지방전구세포가 3T3-L1 지방세포로 분화하는 동안 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 지질 축적에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 5A는 분화를 유도시키지 않은 3T3-L1 지방전구세포를 오일 레드 O 염색한 세포사진이며, 도 5B는 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포를 오일 레드 O 염색한 세포사진이며, 도 5C는 PLREE 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리하고 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포를 오일 레드 O 염색한 세포사진이며, 도 5D는 PLREE 250 $\mu\text{g/mL}$ 처리하고 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포를 오일 레드 O 염색한 세포사진이며, 도 5E는 PLREE 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리하고 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포를 오일 레드 O 염색한 세포사진이다.($\times 200$)

도 6은 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 동안 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 지질 함량에 미치는 영향을 확인한 결과로, 3T3-L1 지방전구세포에 PLREE를 8일 동안 처리하고 오일 레드 O 염색 후 이소프로판올로 추출하여 지질 함량을 490nm에서 정량하였다. 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포 대조군(C)과 비교하여 PLREE 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(* $p<0.05$), PLREE 250 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(** $p<0.001$), PLREE 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(** $p<0.001$)은 지질 함량이 유의하게 감소하였다.

도 7은 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 동안 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 지방세포 분화, 지방 합성 및 지방 분해 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인한 결과로, 3T3-L1 지방전구세포에 PLREE를 8일 동안 처리하고 지방세포 분화, 지방 합성 및 지방 분해 유전자의 mRNA 수준을 RT-PCR로 확인하였다.

도 8은 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 동안 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 PPAR γ , ACC, FAS, ATGL 및 HSL 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 8A는 3T3-L1 지방전구세포에 PLREE를 8일 동안 처리 또는 비처리하고 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 확인하였으며, 도 8B는 ATGL 및 HSL 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

도 9는 분화된 3T3-L1 지방세포에 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 지질 축적에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 9A는 분화를 유도시키지 않은 3T3-L1 지방전구세포를 오일 레드 O 염색한 세포사진이며, 도 9B는 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포를 오일 레드 O 염색한 세포사진이며, 도 9C는 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포에 PLREE 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 24시간 동안 처리하고 오일 레드 O 염색한 세포사진이며, 도 9D는 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포에 PLREE 250 $\mu\text{g/mL}$ 를 24시간 동안 처리하고 오일 레드 O 염색한 세포사진이며, 도 9E는 8일 동안 분화 유도시킨 3T3-L1 지방세포에 PLREE 500 $\mu\text{g/mL}$ 를 24시간 동안 처리하고 오일 레드 O 염색한 세포사진이다($\times 200$).

도 10은 분화된 3T3-L1 지방세포의 지질 함량에 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 미치는 영향을 확인한 결과로, 분화된 3T3-L1 지방세포에 PLREE를 24시간 동안 처리하고 오일 레드 O로 염색한 후 염색시료를 이소프로판올로 추출하여 OD 490nm에서 지질 함량을 측정하였다. N은 분화시키지 않은 3T3-L1 지방전구세포군, C는 분화시킨 3T3-L1 지방세포 대조군이며, 분화시킨 3T3-L1 지방세포 대조군(C)과 비교하여 PLREE 100-500 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 지질 함량이 유의하게(** $p<0.01$) 감소하였다.

도 11은 분화된 3T3-L1 지방세포의 글리세롤 분비에 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 미치는 영향을 확인한 결과로, 분화된 3T3-L1 지방세포에 PLREE를 24시간 동안 처리하고 세포에서 배양액으로 유리된 글리세롤 분비량을 측정하였다. 분화시킨 3T3-L1 지방세포 대조군(C)과 비교하여 PLREE 250 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(* $p<0.05$), PLREE 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(** $p<0.01$)은 글리세롤 분비량이 유의하게 증가하였다.

도 12는 분화된 3T3-L1 지방세포에서 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 지방세포 분화, 지방 합성 및 지방 분해 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인한 결과로, 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 PLREE를 처리하고 지방세포 분화, 지방 합성 및 지방 분해 유전자의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 확인하였으며, N은 분화시키지 않은 3T3-L1 지방전구세포군, C는 분화시킨 3T3-L1 지방세포 대조군이다.

도 13은 분화된 3T3-L1 지방세포에서 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 PPAR γ , ACC, FAS, ATGL 및 HSL 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 13A는 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 PLREE를 처리하고 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 확인하였고, 도 13B는 ATGL 및 HSL 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 확인하였으며, N은 분화시키지 않은 3T3-L1 지방전구세포군, C는 분화시킨 3T3-L1 지방세포 대조군이다.

도 14는 사람피부섬유아세포에서 아스코르빅산의 세포독성을 확인한 결과로, 사람피부섬유아세포에 0-200 μ g/mL 아스코르빅산을 48시간 동안 처리하고 MTT 분석을 수행하였다.

도 15는 아스코르빅산이 처리된 사람피부섬유아세포의 형태학적 분석을 수행한 결과로, 도 15A는 배지 처리한 세포사진이며, 도 15B는 25 μ g/mL 아스코르빅산을 48시간 동안 처리한 세포사진이며, 도 15C는 50 μ g/mL 아스코르빅산을 48시간 동안 처리한 세포사진이며, 도 15D는 100 μ g/mL 아스코르빅산을 48시간 동안 처리한 세포사진이며, 도 15E는 200 μ g/mL 아스코르빅산을 48시간 동안 처리한 세포사진이다.($\times 100$)

도 16은 사람피부섬유아세포에서 갈근 에탄올 추출물(PLREE)의 세포독성을 확인한 결과로, 사람피부섬유아세포에 0-200 μ g/mL 갈근 에탄올 추출물(PLREE)을 48시간 동안 처리하고 MTT 분석을 수행하였다.

도 17은 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 처리된 사람피부섬유아세포의 형태학적 분석을 수행한 결과로, 도 17A는 배지 처리한 세포사진이며, 도 17B는 25 μ g/mL PLREE를 48시간 동안 처리한 세포사진이며, 도 17C는 50 μ g/mL PLREE를 48시간 동안 처리한 세포사진이며, 도 17D는 100 μ g/mL PLREE를 48시간 동안 처리한 세포사진이며, 도 17E는 200 μ g/mL PLREE를 48시간 동안 처리한 세포사진이다. ($\times 100$)

도 18은 자외선을 조사한 사람피부섬유아세포에 아스코르빅산(AA) 또는 갈근 에탄올 추출물(PLREE)을 24시간 동안 처리하고 RT-PCR 분석을 수행하여 IL-6, TNF- α mRNA 발현 수준을 확인한 결과로, V는 배지처리 사람피부섬유아세포군, C는 6.3 J/cm² UVA 조사 대조군, AA는 100 μ g/mL 아스코르빅산 처리군이다.

도 19는 자외선을 조사한 사람피부섬유아세포에 갈근 에탄올 추출물(PLREE) 25, 50, 100 및 200 μ g/mL를 24시간 동안 처리하고 RT-PCR 분석을 수행하여 IL-6 mRNA 발현 수준을 정량적으로 확인한 결과로, V는 배지처리 사람피부섬유아세포군, C는 6.3 J/cm² UVA 조사 대조군, AA는 100 μ g/mL 아스코르빅산 처리군이며, UV 조사 대조군(C)과 비교하여 PLREE 50 μ g/mL 처리군(*p<0.05), 100 및 200 μ g/mL 처리군(**p<0.01)은 IL-6 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다.

도 20은 사람피부섬유아세포에 UV 조사 후 PLREE를 처리하여 24시간 동안 배양시킨 배지상청액을 75%로 희석시켜 분화된 3T3-L1 지방세포에 처리하여 지질 축적 수준을 오일 레드 O 염색하여 확인한 결과로, 도 20A는 24시간 동안 DMEM 배지를 처리한 3T3-L1 지방세포사진이며, 도 20B는 사람피부섬유아세포에 UV 조사 후 24시간 동안 배양시킨 75% 배지 상청액을 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 처리한 세포사진이며, 도 20C는 사람피부섬유아세포에 UV 조사 후 100 μ g/mL 아스코르빅산을 처리하여 24시간 동안 배양시킨 75% 배지 상청액을 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 처리한 세포사진이며, 도 20D는 사람피부섬유아세포에 UV 조사 후 100 μ g/mL PLREE를 처리하여 24시간 동안 배양시킨 75% 배지 상청액을 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 처리한 세포사진이며, 도 20E는 사람피부섬유아세포에 UV 조사 후 200 μ g/mL PLREE를 처리하여 24시간 동안 배양시킨 75% 배지 상청액을 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 처리한 세포사진이다.($\times 200$)

도 21은 사람피부섬유아세포에 UV 조사 후 PLREE를 처리하여 24시간 동안 배양시킨 75% 배지 상청액을 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 처리하여 오일 레드 O로 염색한 후 염색시료를 이소프로판올로 추출하여 OD 490nm에서 지질 함량을 정량적으로 확인한 결과이며, N은 DMEM 배지 처리군, C는 6.3 J/cm² UVA 조사 대조군, AA는 100 μ g/mL 아스코르빅산 처리군이다. UV 조사 대조군(C)과 비교하여 PLREE 100 μ g/mL 처리군(*p<0.05), PLREE 200 μ g/mL 처리군(**p<0.01)은 유의하게 지질 함량이 증가하였다.

도 22는 사람피부섬유아세포에 UV 조사 후 PLREE를 처리하여 24시간 동안 배양시킨 75% 배지 상청액을 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 처리하여 지방세포 분화, 지방 합성 및 지방 분해 유전자의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 확인한 결과로, N은 DMEM 배지 처리군, C는 6.3 J/cm² UVA 조사 대조군, AA는 100 μ g/mL 아스코르빅산 처리군이다.

도 23은 사람피부섬유아세포에 UV 조사 후 PLREE를 처리하여 24시간 동안 배양시킨 75% 배지 상청액을 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 처리하여 ACC mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 정량적으로 확인한 결과로, N은 DMEM

배지 처리군, C는 6.3 J/cm^2 UVA 조사 대조군, AA는 $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 아스코르빅산 처리군이다. UV 조사 대조군(C)에 비해 PLREE $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 처리군(* $p<0.05$), PLREE $200 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 처리군(** $p<0.01$)은 ACC mRNA 발현을 유의하게 증가시켰다.

도 24는 사람피부섬유아세포에 UV 조사 후 PLREE를 처리하여 24시간 동안 배양시킨 75% 배지 상청액을 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 처리하여 PPAR γ , ACC, FAS, ATGL 및 HSL 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과로, 도 24A는 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질 발현 수준을 확인한 결과이며, 도 24B는 ATGL 및 HSL 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다. N은 DMEM 배지 처리군, C는 6.3 J/cm^2 UVA 조사 대조군, AA는 $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 아스코르빅산 처리군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0020] 상기 갈근 추출물은 자외선에 의한 피부주름 및 피부탄력을 예방 또는 개선시킬 수 있다.
- [0021] 상기 갈근 추출물은 자외선에 의한 염증성 사이토카인 IL-6 및 TNF- α 의 발현을 억제시킴으로써 PPAR γ , C/EBP α , ACC 및 FAS 유전자 및 단백질의 발현을 증가시켜 피부 피하지방 생성을 촉진하고, 지방분해 인자인 HSL 단백질의 발현을 감소시켜 피부 피하지방의 감소를 저해시킬 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 따르면, 갈근 에탄올 추출물은 3T3-L1 지방전구세포의 분화과정(도 7 및 도 8)과 분화된 3T3-L1 지방세포에서(도 12 및 도 13) 지방세포 분화 및 지방합성 전사인자인 SREBP-1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 유전자와 단백질 발현을 증가시켜 지방세포 분화를 증가시켰으나(도 4), 지방합성 인자인 ACC, FAS 및 렙틴(leptin) 발현을 저해시키고 지방분해 인자인 ATGL 및 HSL 발현을 증가시키고 글리세롤 분비를 증가시켜 궁극적으로 지방 방울 생성과 지방축적을 유의하게 감소시켰다(도 5, 도 6, 도 9, 도 10 및 도 11). 반면, 자외선이 조사된 사람피부섬유아세포에 갈근 에탄올 추출물을 처리한 경우, 도 18 및 19와 같이 자외선으로 유도된 염증성 사이토카인인 IL-6 및 TNF- α 유전자의 유의한 발현 감소가 확인되었으며, 상기 갈근 에탄올 추출물을 처리한 사람피부섬유아세포의 배양액을 3T3-L1 지방세포에 처리한 경우, 자외선만 조사한 대조군의 배양액에 비해 도 22, 23 및 24와 같이 PPAR γ , ACC 및 FAS 유전자와 단백질 발현이 증가하였고 HSL 단백질 발현이 감소되어 궁극적으로 도 20 및 21과 같이 지방축적이 유의하게 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0023] 상기 결과로부터 갈근 추출물은 3T3-L1 지방전구세포와 3T3-L1 지방세포에서 분화를 촉진하는 반면 지방합성을 억제하고 지방분해를 증가시켜 각 중 성인병의 원인으로 작용하는 내장지방 축적을 감소시킴으로써 성인병을 예방하거나 개선하는 효과를 나타낼 수 있으며, 자외선이 조사된 인체피부섬유아세포에서는 자외선에 의해 유도되는 염증인자의 발현을 억제시킴으로써 피부지방조직에서 염증인자에 의해 저해되는 지방합성은 증가시키고 염증인자에 의해 촉진되는 지방분해는 감소시킴으로써 궁극적으로 피부의 피하지방 함량을 증가시켜 광노화에 의한 피부 탄력 및 주름 생성을 예방하거나 개선하는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0024] 상기 갈근 추출물은 물, C1 내지 C4 알콜 또는 이의 혼합용액에 의해 추출된 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물은 조성물 총 100 중량부에 대하여, 갈근 추출물을 0.01 내지 90 중량부로 포함할 수 있다.
- [0026] 상기 피부 광노화 예방 또는 치료용 조성물은 약학조성물, 건강식품 및 화장품 조성물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 구체예에서, 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 분해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 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 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 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, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0030] 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.

[0031] 상기 갈근 추출물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명은 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0034] 상기 건강식품은 상기 갈근 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0035] 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.

[0036] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 갈근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 광노화 예방 또는 개선용 화장료조성물을 제공할 수 있다.

[0038] 상기 화장료조성물은 유효성분인 갈근 추출물 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0039] 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.

[0040] 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.

[0041] 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.

- [0042] 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 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0043] 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.
- [0044] 또한, 본 발명은 사람으로부터 분리된 자외선 조사 사람피부섬유아세포에 같은 에탄올 추출물을 처리하는 단계를 포함하며, 상기 같은 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 HSL 단백질 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 생체 외 HSL 단백질 발현 억제 방법을 제공할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명은 사람으로부터 분리된 자외선 조사 사람피부섬유아세포에 같은 에탄올 추출물을 처리하는 단계를 포함하며, 상기 같은 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 생체 외 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질 발현 증가 방법을 제공할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 같은 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하며, 상기 같은 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 HSL 단백질 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, HSL 단백질 발현 억제용 시약 조성물을 제공할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명은 같은 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하며, 상기 같은 에탄올 추출물이 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절시켜 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질 발현 증가용 시약 조성물을 제공할 수 있다.
- [0049] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 하여 실시예를들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0051] <참고예> 시약 및 기구
- [0052] 디메틸 설펡사이드(DMSO), DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), 탄닌산, 아스코르빅산, 폴린-시오칼토(Folin-Ciocalteu's) 페놀 시약, MTT(3-(4,5-디메틸-티아졸-2-일)-2,5-디페닐-테트라졸리움 브로마이드), 3-아소부틸-1-메틸잔틴(IBMx), 인슐린, 텍사메타손(MDI) 및 오일 레드 O를 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.
- [0053] DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), 태아소혈청(FBS), 및 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; P/S)을 Lonza Company(Cascade, MD, USA)에서 구입하였으며, PPAR γ (catalogue #2435), ACC (Acetyl-CoA carboxylase; catalogue #3662), FAS (Fatty acid synthase; catalogue #3180), ATGL (adipose triglyceride lipase; catalogue #2138) 및 HSL (Hormone-sensitive lipase; catalogue #4107) 특이적 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서, β -action (catalogue sc-47778) 특이적 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 모든 시약은 분석용 등급으로 사용하였다.
- [0054] 세포 성장을 도립현미경(CKX41, Olympus, Japan)으로 확인하였으며, 세포 배양에는 CO₂ 배양기(MCO-17AC, SANYO Electric, Japan)를 사용하였다.
- [0056] <실험예 1> 같은 에탄올 추출물(PLREE) 준비
- [0057] 김천에서 생산한 쑥의 뿌리인 같은(Pueraria lobata root)을 대한민국, 대구, 약령시장에서 구입하였다. 분말 시료 100g을 플라스크에 넣고 80% 에탄올 1000 mL로 24시간 동안 25℃에서 3번 추출하였다.

- [0058] 여과지를 이용하여 상기 추출물을 여과하고 회전 진공 증발기를 이용하여 농축한 후 동결건조시켰다(수득율 27.5%).
- [0059]
- [0060] <실험예 2> 세포 배양 및 시료 처리
- [0061] 1. 3T3-L1 세포
- [0062] 3T3-L1 지방전구세포를 장병철교수(Keimyung University, Daegu, Korea)로 부터 얻었으며 이전에 보고된 방법 (Fasshauer et al., 2001)으로 배양 및 분화시켰다.
- [0063] 세포를 37℃, 5% CO₂ 대기하에서 10% 송아지 혈청(BCS) 및 5% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)이 포함된 DMEM 배지에서 성장시켰다. 지방전구세포를 10% FBS 및 5% P/S (FBS/DMEM)가 포함된 DMEM 배지에서 배양하여 2일 동안 confluency를 유도한 후, 0.5 mM IBMX, 1 μM DEX (MDI) 및 10 μg/mL 인슐린을 보충하여 2일간 배양하였다. 그 후 세포 배양 배지를 10 μg/mL 인슐린이 포함된 DMEM 배지로 교체하고 3일간 추가 배양하였다. 그 다음, 세포를 DMEM에서 유지시켰으며, 2일마다 배지를 교체하였다.
- [0064] 지방 분화에 있어서 PLREE의 영향을 확인하기 위해, 다양한 농도의 PLREE가 첨가되거나 첨가되지 않은 MDI에서 3T3-L1 지방전구세포를 배양하였다. 지방세포화 마커의 발현 및 지방방울의 출현으로 확인된 분화는 8일 후 완성되었다.
- [0065] 완전히 분화된 지방세포(day 8) 내 지질 대사에 있어, PLREE의 영향을 확인하기 위해, 분화된 지방세포에 24시간 동안 PLREE를 처리 또는 비처리하고, 지방세포화, 지방생성화 및 지방분해화 마커의 발현 및 지질 축적 정도를 확인하였다.
- [0066] 또한, 분화된 지방세포 내 지질축적에 있어 UV 조사 및 PLREE가 처리된 사람피부섬유아세포로부터 분비된 사이토카인의 영향을 평가하기 위해, UV 조사 및 PLREE가 처리된 사람피부섬유아세포로부터 얻은 75% 배양 상청액을 분화된 지방세포에 24시간 동안 처리하고 지방 축적 정도를 확인하였다.
- [0067] 2. 사람피부섬유아세포
- [0068] Amore Pacific Company (Osan, Korea)로부터 얻은 사람피부섬유아세포를 37℃, 5% CO₂ 조건으로 10% FBS 및 1% P/S가 포함된 DMEM 배지에서 72시간 동안 배양하였다.
- [0069] 사람피부섬유아세포에서 PLREE의 항염증활성을 통하여 분화된 3T3-L1 지방세포 내 지방대사에 미치는 PLREE의 영향을 확인하기 위해, 100 mm 세포 배양 접시에 사람피부섬유아세포를 약 80% confluency까지 배양하고 배지를 제거한 후, PBS로 세포를 세척하고 FBS가 없는 DMEM 배지로 교체한 후, 시료를 처리하기 전에 UVA를 6.3 J/cm²로 세포 (4×10⁵ cells/mL)에 조사하였다.
- [0070] 그 후 세포를 24시간 동안 추가 배양하여 IL-6 및 TNF-α 유전자 발현 분석에 사용하였으며, 배양 배지는 3T3-L1 지방전구세포 내 지질 축적 분석에 사용되었다.
- [0071] <실험예 3> 세포 생존능 분석
- [0072] 1. MTT 분석
- [0073] PLREE의 최대 허용 수준(MPL)을 확인하기 위해, MTT 분석을 수행하여 3T3-L1 지방전구세포의 생존능에 있어 PLREE의 영향을 확인하였다.
- [0074] 3T3-L1 지방전구세포를 96-웰 플레이트에 웰 당 1.5×10⁴ 세포를 분주하고 37℃, 5% CO₂ 대기하에서 24시간 동안 배양하였다.
- [0075] 100-1,000 μg/mL의 농도가 되도록 DMEM로 희석한 PLREE를 각 웰에 200 μL씩 첨가하고, 48시간 동안 추가 배양하였다. 그 후, MTT (0.5 μg/mL)시약을 각 웰에 첨가하고 3시간 동안 추가 배양하고 1,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 침전시키고 배지를 제거한 후, DMSO 200 μL를 각 웰에 첨가하여 15분 동안 흔들어 세포를 재부유시켰다.
- [0076] ELISA reader (680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)를 이용하여 540 nm 흡광도에서 세포 생존능을 측정하였다.

- [0077] 또한, 아스코르빅산 및 PLREE의 세포 생존능을 사람피부섬유아세포에서 확인하였다.
- [0078] 96-웰 플레이트의 각 웰 당 사람 피부 섬유아세포를 1×10^4 세포로 분주하고 37℃, 5% CO₂ 대기하에서 24시간 동안 배양하고, 페놀 레드-프리 DMEM (PRF-DMEM)로 PLREE를 0-200 μg/mL 농도가 되도록 희석한 후, 각 웰에 200 μL씩 첨가하고 48시간 동안 추가 배양하였다. 그 후, 상기 동일한 방법으로 MTT 분석을 수행하여 세포 생존능을 확인하였다.
- [0080] <실험예 4> 오일 레드 O 염색
- [0081] 8 일째, 3T3-L1 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 10% (v/v) 신선한 포르말린으로 2시간 동안 고정시킨 후 오일 레드 O 작업 용액으로 세포를 염색하였다.
- [0082] 그 후, 염색 용액을 제거하고 3T3-L1 세포 내 염색된 지질 방울을 증류수로 4번 세척하였다. 오일 레드 O 흡수량을 정량하기 위해, 웰 당 아이소프로판올 1 mL을 첨가하고 10분 동안 세포를 배양한 후, 용해된 반응물을 96-웰 플레이트에 옮겨 담고 multi-well plate reader (Model 680, Biorad, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0084] <실험예 5> 글리세롤 분석
- [0085] 배양되고 분화된 3T3-L1 세포가 배지로 방출한 글리세롤을 측정하였다.
- [0086] 효소 시약인 free glycerol reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 GPO-TRINDER (Sigma-Aldrich)의 설명서대로 글리세롤 수준을 확인하였다.
- [0088] <실험예 6> 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)
- [0089] 1. 3T3-L1 세포
- [0090] TRIzol 시약(Life Technologies, CA, USA)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 24 시간 또는 8일 동안 PLREE가 처리된 3T3-L1 세포에서 전체 RNA를 추출하였다.
- [0091] 8 μL의 Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT) 5×버퍼, 3 μL의 10 mM dNTPs, 0.45 μL의 40 U/μL RNase 억제제, 0.3 μL의 200 U/μL M-MLV RT (Promega, Madison, WI, USA) 및 3.75 μL의 20 μM oligo dT (Bioneer, Daejeon, Korea)가 포함된 반응 혼합물 40 μL을 이용하여 전체 RNA 5 μg을 역전사 하였다.
- [0092] 단일 가닥 cDNA를 주형으로 사용하고 5×green Go Taq Flexi buffer 4 μL, 10 mM dNTPs 0.4 μL, 5 U/μL Taq polymerase 0.1 μL, 25 mM MgCl₂ 1.2 μL 및 각각의 20 μM 프라이머 0.4 μL를 사용하여 PCR로 증폭하였다.
- [0093] 사용된 프라이머 서열 및 PCR 조건을 하기 표 1 및 2로 정리하였다.
- [0094] PCR 산물을 에티디움 브로마이드로 염색하고 1.2% 아가로스 겔에서 시각화하였다. KODAK Gel Logic 100 image analysis system (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA)을 이용하여 DNA 밴드 밀도를 반정량적으로 분석하였다.
- [0095] GAPDH를 내부 대조군으로 이용하여 표준화하고 목적 유전자의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정하였다.

표 1

유전자	프라이머	예상 크기(bp)	서열번호
SREBP-1c	정방향(5' → 3') GCG CTA CCG GTC TTC TAT CA	234	1
	역방향(5' → 3') TGC TGC CAA AAG ACA AGG G		2
C/EBP β	정방향(5' → 3') GAC TAC GCA ACA CAC GTG TAA CT	488	3
	역방향(5' → 3') CAA AAC CAA AAA CAT CAA CAA CCC		4
PPAR γ	정방향(5' → 3') GGT GAA ACT CTG GGA GAT TC	268	5
	역방향(5' → 3') CAA CCA TTG GGT CAG CTC TC		6

C/EBP α	정방향(5' → 3') TTA CAA CAG GCC AGG TTT CC	232	7
	역방향(5' → 3') CTC TGG GAT GGA TCG ATT GT		8
ACC	정방향(5' → 3') TGA CCG TGG GCA CAA AGT T	351	9
	역방향(5' → 3') AGG AGG AAC CGC ATT TAT CGA		10
FAS	정방향(5' → 3') GGT TCG GAA TGC TAT CCA GG	301	11
	역방향(5' → 3') CTG CGG AAA CTT CAG GAA AT		12
Leptin	정방향(5' → 3') CCA AAA CCC TCA TCA AGA CC	352	13
	역방향(5' → 3') CTC AAA GCC ACC ACC TCT GT		14
ATGL	정방향(5' → 3') TTC ACC ATC CGC TTG TTG	155	15
	역방향(5' → 3') AGT TCC ACC TGC TCA GAC		16
HSL	정방향(5' → 3') GTC GCC TTT CTC CTG ATG AC	410	17
	역방향(5' → 3') CTT GCT GCT TCT CTT GGC TC		18
GAPDH	정방향(5' → 3') GTA TGA CTC CAC TCA CGG CAA A	248	19
	역방향(5' → 3') GGT CTC GCT CCT GGA AGA TG		20

표 2

유전자	구성	온도	시간	사이클
SREBP-1c	초기변성(Predenaturation)	95℃	10 분	1
	변성(denaturation)	95℃	1 분	30
	풀림(Annealing)	54℃	1 분	
	확장(Extension)	72℃	1 분	
	확장 후	72℃	10 분	1
PPAR γ	초기변성(Predenaturation)	95℃	10 분	1
	변성(denaturation)	94℃	30 초	30
	풀림(Annealing)	53℃	30 초	
	확장(Extension)	72℃	30 초	
	확장 후	72℃	7 분	1
C/EBP α	초기변성(Predenaturation)	94℃	10 분	1
	변성(denaturation)	94℃	30 초	30
	풀림(Annealing)	62℃	30 초	
	확장(Extension)	72℃	30 초	
	확장 후	72℃	7 분	1
ACC	초기변성(Predenaturation)	94℃	5 분	1
FAS	변성(denaturation)	94℃	30 초	30
	풀림(Annealing)	56℃	1 분	
	확장(Extension)	72℃	1 분	
	확장 후	72℃	5 분	1
Leptin	초기변성(Predenaturation)	94℃	1 분	1
	변성(denaturation)	94℃	1 분	33
	풀림(Annealing)	57℃	1 분	
	확장(Extension)	72℃	2 분	
	확장 후	72℃	7 분	1
ATGL	초기변성(Predenaturation)	94℃	5 분	1
HSL	변성(denaturation)	94℃	45 초	29
	풀림(Annealing)	53℃	45 초	
	확장(Extension)	72℃	90 초	
	확장 후	72℃	5 분	1

2. 사람피부섬유아세포

상기 동일한 RT-PCR 방법을 이용하여 IL-6, TNF- α 및 β -actin mRNA의 수준을 확인하였다. β -actin을 내부 대조군으로 사용하였으며, 하기 표 3 및 4로 사용된 프라이머 서열 및 PCR 조건을 정리하였다.

표 3

유전자	프라이머	예상크기(bp)	서열번호
IL-6	정방향(5' →3')CTC CTT CTC CAC AAG GGC C	559	21
	역방향(5' →3')GCC GAA GAG CCC TCA GGC		22
TNF- α	정방향(5' →3')GAC AGA CAG AGA GGA CAG GA	445	23
	역방향(5' →3')CAG ATA GAT GGG CTC ATA CC		24
β -actin	정방향(5' →3')ACC GTG AAA AGA TGA CCC AG	528	25
	역방향(5' →3')TAC GGA TGT CAA CGT CAC AC		26

표 4

유전자	구성	온도	시간	사이클
IL-6	초기변성(Predenaturation)	94℃	3 분	1
	변성(denaturation)	94℃	30 초	26
	폴림(Annealing)	50℃	30 초	
	확장(Extension)	72℃	30 초	
	확장 후	72℃	5 분	1
TNF- α	초기변성(Predenaturation)	95℃	10 분	1
	변성(denaturation)	95℃	30 초	36
	폴림(Annealing)	50℃	30 초	
	확장(Extension)	60℃	30 초	
	확장 후	72℃	10 분	1

<실험예 7> 웨스턴 블롯 분석

60 mm 세포 배양접시에서 3T3-L1 세포에 PLREE를 8일 또는 24시간 동안 처리한 후, 차가운 PBS로 세포를 세척하고 세포 급개로 세포를 수집하였다.

1×RIPA (Sigma, CA, USA), 2 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate (G) 및 1×단백질효소 억제제(PI)가 포함된 용해 버퍼를 이용하여 얼음에서 10분 동안 인큐베이트하여 수집된 세포를 용해시켰다.

세포 용해물을 4℃에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하고 얻어진 상층액에서 BSA Protein Assay Reagent Kit (Bio Rad, CA, USA)를 이용하여 단백질 함량을 측정하였다.

동일한 양의 단백질(30 μ g)을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하여 분리시키고 니트로셀룰로스 막 위에 옮긴 후 PPAR γ (1:1,000), ACC (1:1,000), FAS (1:1,000), ATGL (1:1,000), or HSL (1:1,000)에 대한 특이적 항체와 인큐베이트하였다.

그 후, 항-래빗 IgG (1:1,000)와 인큐베이트하고 ECL Western blotting detection reagents (Bio Rad, CA, USA)를 이용하여 면역 반응성 밴드를 검출하였다.

Image J program (NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 밴드 강도를 반정량적으로 측정하였으며, β -actin을 내부 대조군으로 사용하였다.

<실시예 1> 갈근 에탄올 추출물(PLREE)의 항산화 활성 확인

1. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 확인

Folin-Denis assay (Folin and Denis 1912)를 수행하여 갈근 에탄올 추출물(PLREE)의 총 폴리페놀 함량을 확인하였다.

PLREE 및 Folin 시약을 각각 1 mL 씩 테스트 튜브에 넣고 3분 동안 정치시킨 후 Na₂CO₃ 1 mL을 첨가하여 세게

흔들었다. 상기 튜브를 실온에서 1시간 동안 인큐베이트하고 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선으로는 탄닌산을 사용하였다.

[0115] 또한, 변형된 Davies method (Davies et al. 1980)을 수행하여 같은 에탄올 추출물(PLREE)의 총 플라보노이드 함량을 확인하였다.

[0116] PLREE 100 μ L를 테스트 튜브에 담고 디에틸렌 글리콜 시약 1 mL 및 1 N NaOH 100 μ L를 첨가하였다. 상기 혼합물을 세계 흔들고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이트하고 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선으로는 루틴(rutin)을 사용하였다.

[0117] 그 결과, 도 1과 같이 PLREE의 총 폴리페놀 함량은 47 mg/g으로 확인되었으며, 총 플라보노이드 함량은 29 mg/g으로 확인되었다.

[0119] 2. 전자 공여 능력 확인

[0120] 이전에 보고된 방법(Blois 1958)으로 전자 공여능을 확인하였다. 증류수에 250, 500 또는 1,000 μ g/mL로 용해시킨 PLREE를 1 mL 씩 테스트 튜브에 담고 4 mL의 0.4 mM DPPH를 첨가하였다.

[0121] 상기 혼합물을 세계 흔들고 60°C에서 10초간 인큐베이트하고 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아스코르빅산양성 대조군으로 사용하였으며, 각 용액의 DPPH 라디칼 소거능으로 억제 백분율로 계산하였다.

[0122] 그 결과, 도 2와 같이 아스코르빅산 및 PLREE가 1,000 μ g/mL 농도일 때, 전자 공여 능력이 각각 90.2% 및 48.8%로 나타났으며, 상기 결과로부터 PLREE의 전자 공여 능력은 아스코르빅산 보다 낮은 것으로 확인되었다.

[0124] <실시예 2> 같은 에탄올 추출물(PLREE)의 세포 독성 확인

[0125] 1. 3T3-L1 지방전구체세포에서 PLREE의 세포독성 확인

[0126] PLREE의 세포 독성을 확인하기 위해, 100-1,000 μ g/mL 농도의 PLREE를 3T3-L1 지방전구체세포에 48시간 동안 처리하고 MTT 분석을 수행하였다.

[0127] 그 결과, 도 3과 같이 아무것도 처리되지 않은 대조군과 비교하여 PLREE의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았으며, PLREE의 최대 허용 수준(MPL)은 1,000 μ g/mL 이상인 것을 확인할 수 있었다.

[0128] 또한, 200-1,000 μ g/mL 농도의 PLREE가 처리된 3T3-L1 지방전구체세포 형태를 도립 현미경으로 확인한 결과, 형태적으로 어떠한 변화도 나타나지 않았다.

[0130] 2. 사람피부섬유아세포에서 PLREE의 세포독성 확인

[0131] 아스코르빅산 및 PLREE의 세포독성을 확인하기 위해, 사람피부섬유아세포에 0-200 μ g/mL 농도의 PLREE를 48시간 동안 처리하고 MTT 분석을 수행하였다.

[0132] 그 결과, 도 14와 같이 100 및 200 μ g/mL 농도의 아스코르빅산이 처리된 실험군의 세포 생존도는 아무것도 처리되지 않은 대조군과 비교하여 각각 5.0% 및 32.6% 감소하였다.

[0133] 상기 결과로부터 아스코르빅산의 최대 허용 수준(MPL)은 100 μ g/mL인 것을 확인할 수 있었다.

[0134] 형태학적 관찰을 수행한 결과, 도 15와 같이 아무것도 처리되지 않은 세포군과 25, 50 및 100 μ g/mL 아스코르빅산이 48시간 동안 처리된 섬유아세포군의 세포는 평평하고 방추형 모양을 나타낸 반면, 200 μ g/mL의 농도가 처리된 세포군은 불규칙하거나 둥근 모양이었으며 세포 밀도가 감소되었다.

[0135] 또한, 도 16을 참고하면 200 μ g/mL 농도의 PLREE가 처리된 세포군에서는 세포 생존도가 아무것도 처리되지 않은 세포군과 비교하여 16.6% 감소하였으므로, PLREE의 최대 허용 수준(MPL)은 200 μ g/mL 이상인 것으로 확인되었다.

[0136] 상기 결과로부터 PLREE는 아스코르빅산보다 낮은 세포독성을 나타내었으며, 형태학적 관찰에서도 도 17과 같이 섬유아세포에 25-200 μ g/mL 농도의 PLREE가 처리되어도 대조군과 유사한 평평하고 방추 모양의 세포가 유지되

는 것을 확인할 수 있었다.

- [0138] <실시예 3> 3T3-L1 지방전구세포에서 갈근 에탄올 추출물(PLREE)의 지방세포 분화(adipogenesis), 지방 합성(lipogenesis) 및 지방 분해(lipolysis)효과 확인
- [0139] 1. 갈근 에탄올 추출물(PLREE)의 지질 축적 효과 확인
- [0140] PLREE의 지방생성 효과를 확인하기 위해, 3T3-L1 지방전구세포를 충분히 성장시키고 100, 250 또는 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 PLREE의 존재 또는 비존재 하에서 분화유도제인 아이소부틸메틸잔틴(IBMx), 덱사메타손(DEX), 인슐린이 함유된 엠디아아(MDI)를 처리 또는 비처리하여 분화를 유도하였다.
- [0141] 8일 후, 현미경관찰을 통하여 지방 세포 분화 정도를 확인하였다.
- [0142] 그 결과, 도 4와 같이 분화되지 않은 세포는 방추(spindle)와 같은 모양이었으며, 적은 양의 지방 방울이 확인된 반면, 분화된 대조군 세포는 둥근 모양과 많은 양의 지방 방울이 관찰되었다.
- [0143] 또한, PLREE가 처리된 세포에서는 분화된 대조군 세포와 비교하여 PLREE 용량의존적으로 세포수는 많았지만 적은 양의 지방 방울이 생성되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0144] 분화 8일 후 오일 레드 O 염색을 수행하여 지질 축적 정도를 확인하였다.
- [0145] 그 결과, 도 5와 같이 분화되지 않은 세포에서는 아주 적은 양의 지질 축적이 확인된 반면, 분화된 대조군 세포에서는 아주 많은 지질 축적이 확인된 되었다.
- [0146] 그러나, PLREE가 처리된 세포에서는 분화된 대조군 세포와 비교하여 PLREE의 용량의존적으로 적은 양의 지질 축적이 확인되었다.
- [0147] 또한, 정량적 분석 결과 도 6과 같이 PLREE가 처리된 세포의 지질 함량이 분화된 대조군 세포와 비교하여 PLREE의 100, 250 또는 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리 농도에 따라, 각각 7.8% ($p<0.05$), 35.6% ($p<0.001$) 및 42.2% ($p<0.001$) 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0149] 2. 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 지방생성, 지방산 합성 및 지방 분해 유전자의 mRNA 발현 및 단백질 발현에 미치는 영향 확인
- [0150] 도 7을 참고하면 지방생성 유전자 발현에 있어서, 대조군과 비교하여 PLREE는 PPAR γ mRNA의 발현을 매우 증가시킨 반면 SREBP-1c mRNA 발현은 약하게 증가시켰다. 대조적으로, C/EBP β 및 C/EBP α mRNA 발현에는 영향을 나타내지 않았다.
- [0151] 또한, 지방산 합성 유전자 발현에 있어서는 PLREE가 ACC 및 랩틴 mRNA 발현을 감소시켰으며, FAS mRNA 발현에는 영향을 나타내지 않았다.
- [0152] 마지막으로 지방분해 유전자 발현에서는 ATGL mRNA 발현을 약하게 증가시켰으나, HSL mRNA 발현에는 어떠한 영향도 나타내지 않았다.
- [0153] 또한, 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 PPAR γ , ACC, FAS, ATGL 및 HSL 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, 도 8과 같이 대조군과 비교하여 PLREE는 PPAR γ , ATGL 및 HSL 단백질의 발현을 증가시킨 반면, ACC 및 FAS 단백질 발현은 감소시켰다.
- [0155] <실시예 4> 분화된 3T3-L1 지방세포에서 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 지질 대사에 미치는 영향 확인
- [0156] 1. 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 지질 축적에 미치는 영향 확인
- [0157] 분화된 지방세포에서 PLREE의 지질 대사 조절 효과를 확인하기 위해, 3T3-L1 지방전구세포를 충분히 성장시키고 분화유도제인 MDI를 처리하여 지방세포로 분화를 유도하였다.
- [0158] 8일 후, 3T3-L1 지방세포에 PLREE 0-500 $\mu\text{g/mL}$ 을 24시간 동안 처리하고 오일 레드 O 염색을 수행하여 지질 축적 정도를 확인하였다.

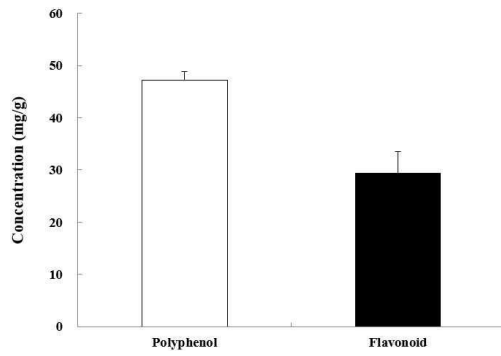
- [0159] 그 결과, 도 9와 같이 분화되지 않은 세포에는 매우 적은 양의 지질 축적이 확인된 반면, 분화된 대조군 세포에서는 매우 많은 양의 지질 축적이 확인되었다.
- [0160] 또한, PLREE가 처리된 세포에서는 분화된 대조군 세포보다 PLREE 용량의존적으로 적은 양의 지질 축적이 확인되었으며, 정량적 분석 결과인 도 10과 같이 PLREE가 처리된 세포의 지질 함량이 PLREE 100, 250 및 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리 농도에 따라 각각 17.0% ($p<0.01$), 18.4% ($p<0.01$) 및 19.4% ($p<0.01$) 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0162] 2. 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 분화된 3T3-L1 지방세포의 글리세롤 분비에 미치는 영향 확인
- [0163] 분화된 3T3-L1 지방세포의 글리세롤 분비에 있어서, PLREE의 영향을 확인한 결과, 도 11과 같이 대조군과 비교하여 100, 250 및 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 PLREE가 처리된 분화된 3T3-L1 지방세포에서 글리세롤 분비가 각각 8.7%, 36.4% ($p<0.05$) 및 74.0% ($p<0.01$) 유의하게 증가하였다.
- [0164] 상기 결과로부터 PLREE는 성숙한 지방세포에서 트리글리세라이드 가수분해를 유도하여 지질 분해 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0166] 3. 갈근 에탄올 추출물(PLREE)이 지방세포 분화, 지방 합성 및 지방 분해 유전자의 mRNA 발현 및 단백질 발현에 미치는 영향 확인
- [0167] 지방생성 유전자 발현에 있어 PLREE의 영향을 확인한 결과, 도 12와 같이 대조군과 비교하여 PLREE가 처리된 분화된 3T3-L1 지방세포에서는 PPAR γ 및 C/EBP α mRNA의 발현이 증가된 반면 지방 합성 유전자인 ACC, FAS 및 랩틴 mRNA 발현은 감소되었다. 또한, PLREE에 의해 지방분해 유전자인 ATGL 및 HSL mRNA의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0168] 또한, 도 13과 같이 대조군과 비교하여 PLREE의 용량의존적으로 PPAR γ , ATGL 및 HSL 단백질의 발현이 증가된 것이 확인된 반면 ACC 및 FAS 단백질은 PLREE 용량의존적으로 감소되었다.
- [0170] **<실시예 5> 사람피부섬유아세포에서 PLREE의 항염증 활성을 통한 분화된 3T3-L1 지방세포의 지질 대사 조절 효과 확인**
- [0171] 1. 사람피부섬유아세포에서 갈근 에탄올 추출물(PLREE)의 항염증 효과 확인
- [0172] PLREE의 항염증 효과를 확인하기 위해, 사람피부섬유아세포에 6.3 J/cm² UVA를 조사하고 0-200 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 PLREE를 24시간 동안 처리하였다.
- [0173] 그 결과, 도 18과 같이 UV만 조사된 대조군과 비교하여 PLREE의 용량의존적으로 염증성 사이토카인인 IL-6 및 TNF- α mRNA의 발현 감소가 확인되었다.
- [0174] 또한, RT-PCR 정량분석 결과, 도 19와 같이 50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 PLREE가 처리된 실험군에서 IL-6 mRNA의 발현이 각각 10.8% ($p<0.05$), 27.5% ($p<0.01$) 및 34.7% ($p<0.01$) 유의하게 감소하였으며, 아스코르빅산 100 $\mu\text{g/mL}$ 이 처리된 실험군에서는 UV만 조사된 대조군과 비교하여 IL-6 mRNA 발현이 18.6%($p<0.05$) 유의하게 감소하였다.
- [0175] 상기 결과로부터 PLREE가 자외선에 의해 유도되는 염증 인자의 발현을 억제하는데 효과적인 것을 확인할 수 있었다.
- [0177] 2. UV 조사된 사람피부섬유아세포에서 PLREE 처리에 의한 사이토카인 분비 억제에 따른 분화된 3T3-L1 지방세포의 지질 축적 조절 효과 확인
- [0178] UV 조사된 사람 피부 섬유아세포에서 PLREE 처리에 의한 사이토카인 분비 억제가 분화된 3T3-L1 지방세포의 지방 축적에 미치는 영향을 확인하기 위해, UV 조사 및 PLREE가 처리된 사람피부섬유아세포의 75% 배양 상청액을 분화된 3T3-L1 지방세포에 24시간 처리하고 오일 레드 O 염색을 수행하여 지질 축적 정도를 확인하였다.

- [0179] 그 결과, 도 20과 같이 분화된 세포에서 많은 양의 지질 축적이 확인된 반면 UV만 조사된 배지가 처리된 대조군 세포에서는 적은 양의 지질 축적이 확인되었다. 또한, PLREE가 투여된 배지를 처리한 세포에서는 대조군 세포와 비교하여 PLREE 용량의존적으로 많은 지질 축적이 확인되었다.
- [0180] 또한, 정량 분석결과, 도 21과 같이 PLREE 배지가 처리된 세포에서는 PLREE 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 용량의존적으로 각각 12.4% ($p<0.05$) 및 16.3% ($p<0.05$) 증가된 지방축적을 확인할 수 있었으며, 아스코르빅산 100 $\mu\text{g/mL}$ 이 처리된 세포군에서도 지질 함량이 17.2% ($p<0.05$) 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0182] 3. UV 조사된 사람피부섬유아세포에 PLREE 처리에 따른 염증성 사이토카인 분비 억제에 분화된 3T3-L1 지방세포의 지방세포 분화, 지방 합성 및 지방 분해 유전자의 mRNA 발현 및 단백질 발현에 미치는 영향 확인
- [0183] 도 22를 참고하면 지방세포 분화 유전자 발현에 있어서, 대조군과 비교하여 UV 조사 및 PLREE가 처리된 사람피부섬유아세포의 75% 배양 상청액이 처리된 세포군에서는 지방세포 분화 및 지방합성 전사인자인 PPAR γ 및 C/EBP α mRNA 발현이 증가되었으며, 지방 합성 유전자인 ACC mRNA의 발현은 증가되었으며, FAS mRNA 발현에서는 변화가 나타나지 않았다.
- [0184] 지방분해 유전자의 경우, UV 조사 및 PLREE가 처리된 사람 피부 섬유아세포의 75% 배양 상청액이 처리된 세포군에서 ATGL 및 HSL mRNA의 발현 변화가 나타나지 않았다.
- [0185] RT-PCR 정량 분석 결과, 도 23과 같이 UV 조사 및 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ PLREE가 처리된 사람피부섬유아세포의 75% 배양 상청액이 처리된 세포군에서는 대조군과 비교하여 ACC mRNA 발현이 각각 11.3% ($p<0.05$) 및 41.9% ($p<0.01$) 유의적으로 증가하였으나, 100 $\mu\text{g/mL}$ 아스코르빅산이 처리된 배지에서는 ACC mRNA 발현이 9.7% 증가하였으며, 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 못하였다.
- [0186] 또한, UV 조사 및 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ PLREE가 처리된 사람피부섬유아세포의 75% 배양 상청액이 처리된 세포군에서도 24와 같이 PPAR γ , ACC 및 FAS 단백질 발현이 PLREE 용량의존적으로 증가한 반면, HSL 단백질의 발현은 감소되었으며, ATGL 단백질 발현에는 어떠한 영향도 나타내지 못하였다.
- [0187] 상기 결과로부터 PLREE는 자외선으로 발현이 유도되는 염증성 사이토카인인 IL-6 및 TNF- α 의 발현을 하향 조절시켜 PPAR γ , ACC 및 FAS 유전자 및 단백질의 발현을 증가시키고 HSL 단백질 발현은 감소시킴으로써 지방합성 억제와 지방분해 증가를 경감시켜 궁극적으로 피부지방함량 감소를 경감시키는 작용을 하는 것을 확인하였다. 따라서, PLREE는 자외선 조사에 따른 광 노화로 인한 지질대사를 개선시켜 피부 지방함량 감소를 경감시키는 데 효과적인 것으로 확인되었다.
- [0189] 한편, 본 발명에 따른 갈근 추출물은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기에서는 본 발명에 따른 갈근 추출물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0190] <제제예 1> 약학조성물의 처방예
- [0191] <제제예 1-1> 주사제의 제조
- [0192] 갈근 에탄올 추출물 10 mg, 소듐 메타비설파이트 3.0 mg, 메틸파라벤 0.8 mg, 프로필파라벤 0.1 mg 및 주사용 멸균증류수 적량을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2 mL이 되도록 제조한 후, 2 mL 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.
- [0193] <제제예 2-1> 정제의 제조
- [0194] 갈근 에탄올 추출물 10 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0195] <제제예 3-1> 캡슐제의 제조
- [0196] 갈근 에탄올 추출물 10 mg, 유당 50 mg, 전분 50 mg, 탈크 2 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

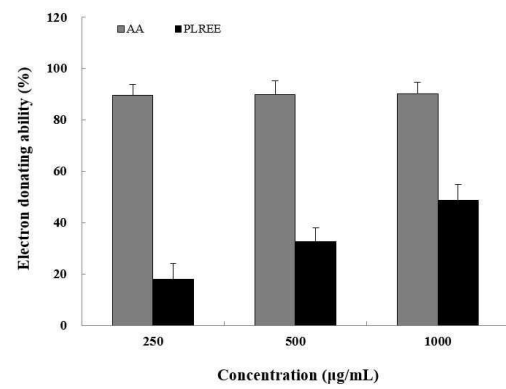
- [0197] <제제예 4-1> 연고제의 제조
- [0198] 같은 에탄올 추출물 100 mg, PEG-4000 250mg, PEG-400 650mg, 백색바셀린 10mg, 파라옥시안식향산메칠 1.44mg, 파라옥시안식향산프로필 0.18mg 및 잔량의 정제수를 혼합한 후 통상의 연고제의 제조방법에 따라서 연고제를 제조하였다.
- [0199] <제제예 2> 화장품 조성물의 제제예
- [0200] <제제예 2-1> 영양 로션의 제조
- [0201] 프로필렌글리콜 3.0 중량부, 카르복시폴리머 0.1 중량부, 방부제 미량과 잔량의 정제수를 혼합교반하면서 80 내지 85℃로 가열하여 제조부에 투입한 후 유화기를 작용시키고, 폴리솔베이트60 1.0 중량부, 솔비탄 세스퀴올레이트 0.5 중량부, 유동 파라핀 10.0 중량부, 솔비탄 스테아레이트 1.0 중량부, 친유형 모노스테아린산 글리세린 0.5 중량부, 스테아린산 1.5 중량부, 글리세틸스테아레이트/PEG-400 스테아레이트 1.0 중량부, 트리에탄올아민 0.2 중량부를 80 내지 85℃로 가열하여 투입한 뒤 유화하였다. 유화가 끝나면 교반기를 이용하여 교반하면서 50℃까지 열 냉각한 뒤 향료 미량을 투입하고, 45℃까지 냉각한 뒤 색소 미량을 투입하고, 35℃에서 같은 에탄올 추출물을 투입하여 25℃까지 냉각한 뒤 숙성시켰다.
- [0202] <제제예 2-2> 영양 크림의 제조
- [0203] 카르복시폴리머 0.3 중량부, 부틸렌글리콜 5.0 중량부, 글리세린 3.0 중량부
- [0204] 및 잔량의 정제수를 혼합교반하면서 80 내지 85℃로 가열하여 제조부에 투입한 후 유화기를 작용시키고, 스테아린산 2.0 중량부, 세틸알콜 2.0 중량부, 글리세틸모노 스테아레이트 2.0 중량부, 폴리옥시에틸렌솔비탄모노스테아레이트 0.5 중량부, 솔비탄세스퀴올레이트 0.5 중량부, 글리세틸모노스테아레이트/글리세틸스테아레이트/폴리옥시에틸렌스테아레이트 1.0 중량부, 왁스 1.0 중량부, 유동파라핀 4.0 중량부, 스쿠알란 4.0 중량부, 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 4.0 중량부를 80 내지 85℃로 가열하여 투입한 뒤 트리에탄올아민 0.5 중량부를 투입하여 유화하였다. 유화가 끝나면 교반기를 이용하여 교반하면서 35℃까지 냉각한 뒤 같은 에탄올 추출물을 투입하여 25℃까지 냉각한 뒤 숙성시켰다.
- [0205] <제제예 3> 건강식품의 제조
- [0206] 같은 에탄올 추출물 0.5 mg, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트 70 µg, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B 1 0.13 mg, 비타민 B 2 0.15 mg, 비타민 B 6 0.5 mg, 비타민 B 12 0.2 µg, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 µg, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 µg, 판토텐산 칼슘 0.5 mg) 및 무기질 혼합물 적량(황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg)을 혼합한 다음 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다.
- [0208] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

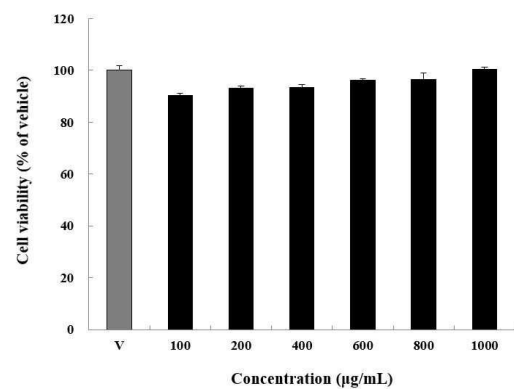
도면1



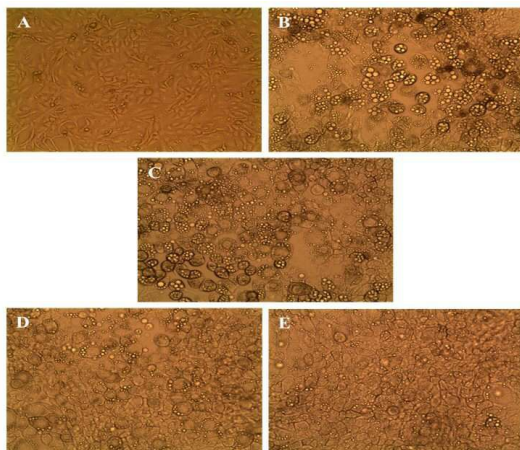
도면2



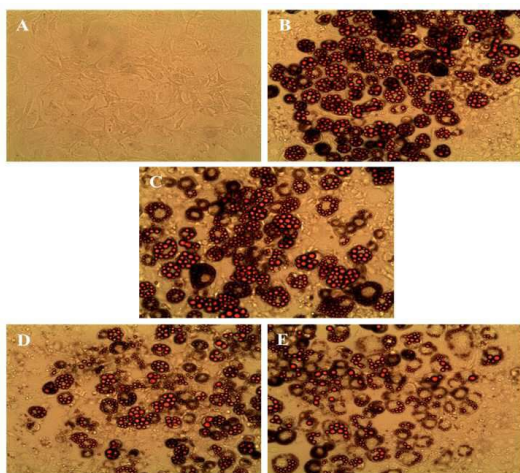
도면3



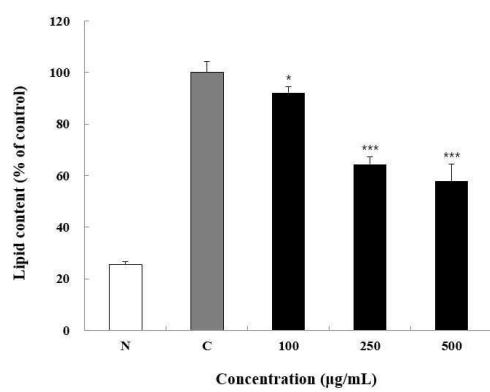
도면4



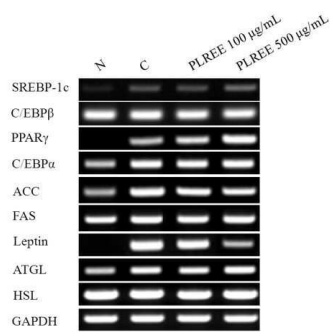
도면5



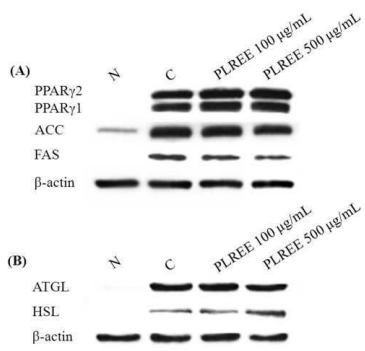
도면6



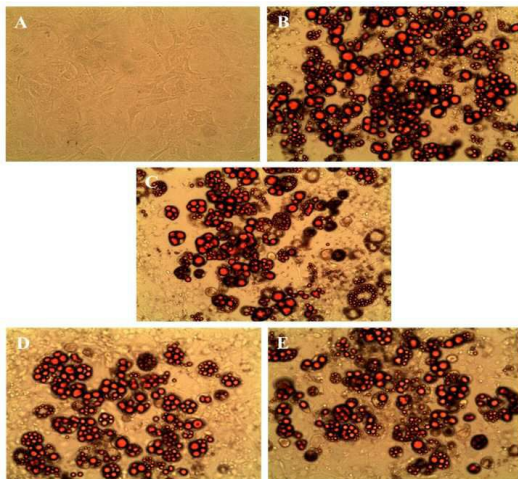
도면7



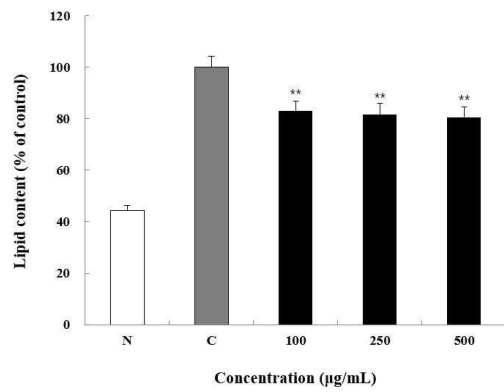
도면8



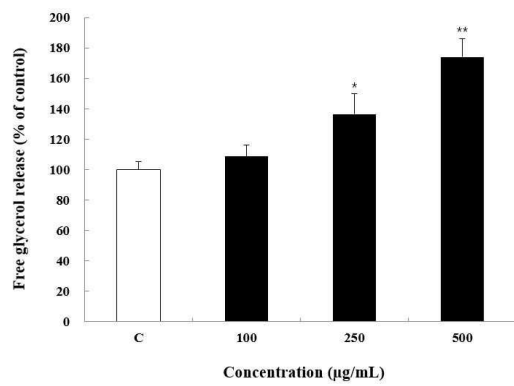
도면9



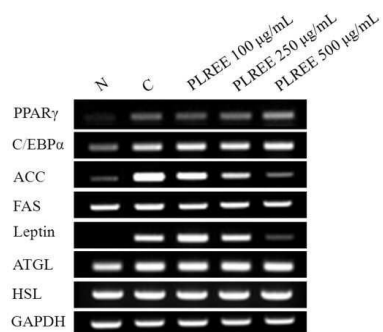
도면10



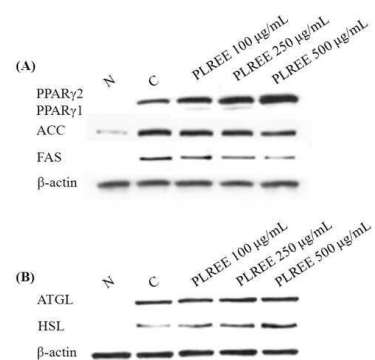
도면11



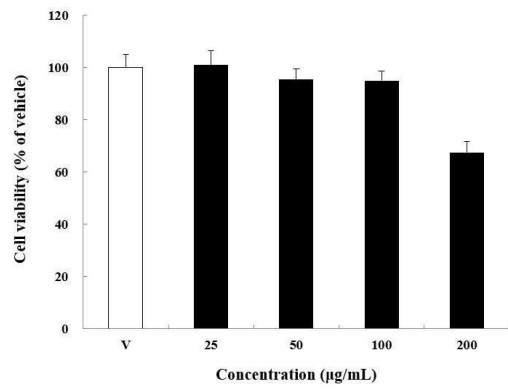
도면12



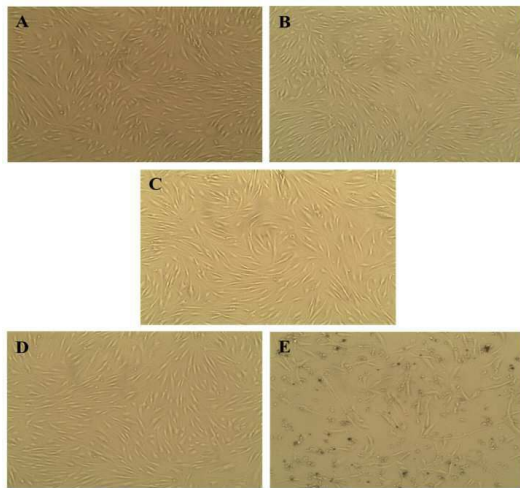
도면13



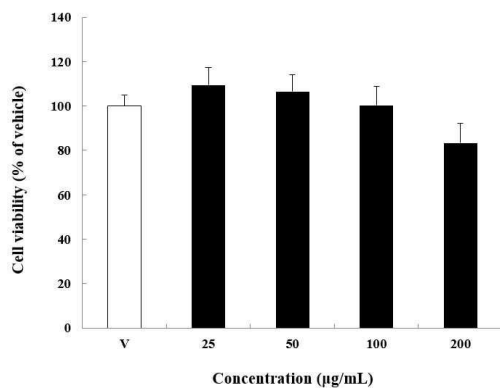
도면14



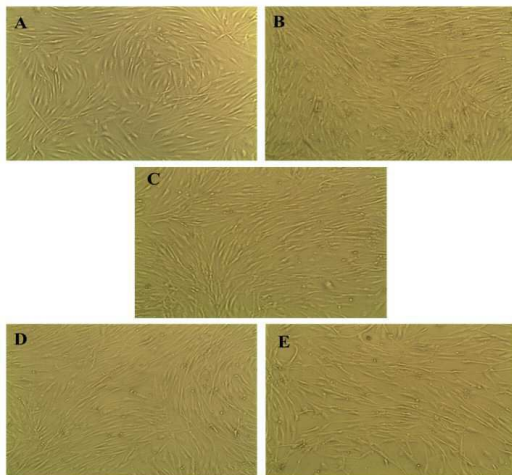
도면15



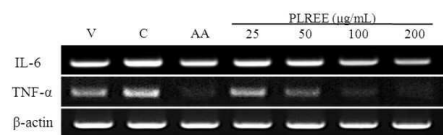
도면16



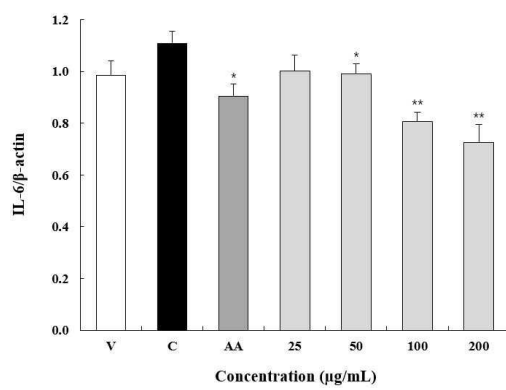
도면17



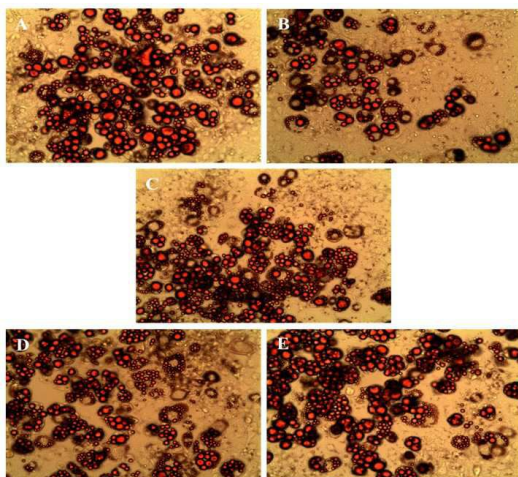
도면18



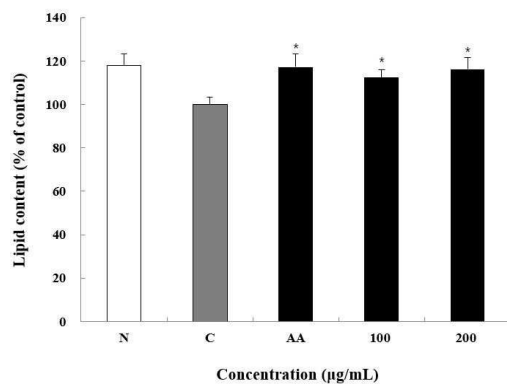
도면19



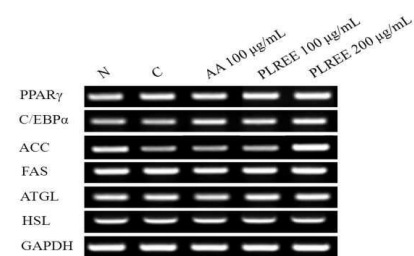
도면20



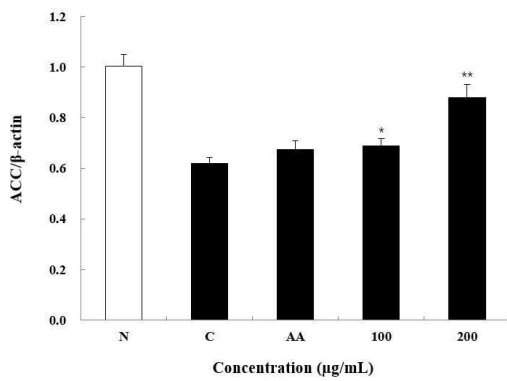
도면21



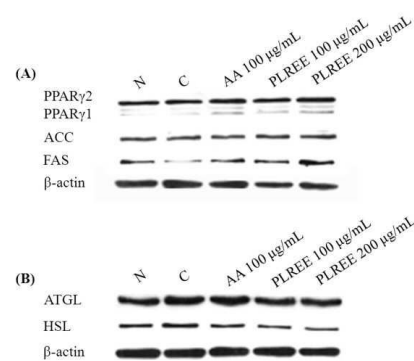
도면22



도면23



도면24



서열 목록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY

<120> Composition for preventing or treating skin photoaging comprising
Pueraria lobata root extract

<130> ADP-2015-0395

<160> 26

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gcgctaccgg tcttctatca 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tgctgccaaa agacaaggg 19

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

gactacgcaa cacacgtgta act 23

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

caaaacaaaa aacatcaaca accc 24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ggtgaaactc tgggagattc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

caaccattgg gtcagctctc 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ttacaacagg ccaggtttcc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ctctgggatg gatcgattgt 20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

tgaccgtggg cacaaagtt	19
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 10	
aggaggaacc gcatttatcg a	21
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 11	
ggttcggaat gctatccagg	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 12	
ctgcggaac ttcaggaaat	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 13	
ccaaaaccct catcaagacc	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 14
 ctcaaagcca ccacctctgt 20
 <210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 ttcacatcc gcttggtg 18
 <210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 agttccacct gctcagac 18
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 gtcgcctttc tcctgatgac 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 cttgctgctt ctcttggtc 20
 <210> 19
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

gtatgactcc actcacggca aa

22

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

ggtctcgctc ctggaagatg

20

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

ctccttctcc acaagggcc

19

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

gccgaagagc cctcaggc

18

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

gacagacaga gaggacagga

20

<210> 24

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	24	
cagatagatg ggctcatacc		20
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	25	
accgtgaaaa gatgaccag		20
<210>	26	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	26	
tacggatgtc aacgtcacac		20