



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0052460
(43) 공개일자 2012년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/60 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0113572

(22) 출원일자 2010년11월15일

심사청구일자 2010년11월15일

(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, 유림아시아드아파트 114동 2004호 (거제동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

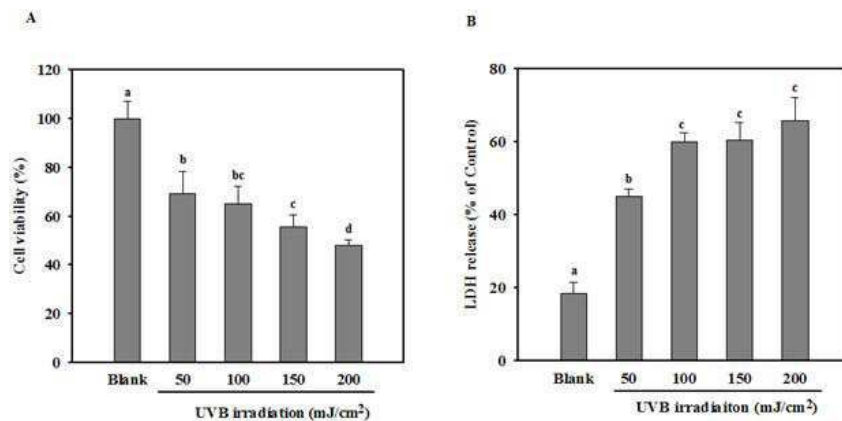
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 키토올리고당을 포함하는 피부 노화 방지용 화장료 조성물

(57) 요약

본 발명은 키토올리고당을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 방지용 화장료 조성물에 관한 것으로, 1-3 kDa, 3-5 kDa 또는 5-10 kDa 분자량의 키토올리고당을 유효성분으로 포함하는 자외선-유래 피부 노화를 방지하기 위한 화장료 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박순선

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

김정애

부산광역시 남구 전포대로76번길 17-8 (문현동)

안별님

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

특허청구의 범위

청구항 1

키토올리고당을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 방지용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 키토올리고당이 1-3 kDa 분자량의 키토올리고당, 3-5 kDa 분자량의 키토올리고당 및 5-10 kDa 분자량의 키토올리고당 중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 피부 노화 방지용 화장품 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 키토올리고당이 3-5 kDa 분자량의 키토올리고당인 것을 특징으로 하는 피부 노화 방지용 화장품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 키토올리고당의 함량은 전체 조성물 중량을 기준으로 0.05 내지 8 중량%인 것을 특징으로 하는 주름 개선용 화장품 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 키토올리고당을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 방지용 조성물에 관한 것으로, 좀더 상세하게는 자외선에 의한 인간 피부 노화를 방지하는 피부 노화 방지용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 모든 장기는 노화가 진행됨에 따라 기능이 서서히 신체 기능이 쇠퇴한다. 신체의 모든 다른 장기와 같이, 피부도 내적으로 노화된다(실제연령 노화). 게다가, 피부가 다양한 해로운 환경 조건에 노출되어 노화가 진행된다(외적 노화). 특히, 태양으로부터의 자외선(UV) 조사가 인간 피부 노화를 촉진하는 주요 환경 요인이다. 이러한 모든 요인에 따라 피부 노화는 두 부류로 나뉜다: 실제연령 노화 및 광피부노화. 노화된 피부의 신호는 주름 형성, 피부톤 손실 및 피부 처짐 등이다. 이러한 현상은 실제연령 노화에서 뿐만 아니라 UV 조사에 의한 광피부노화에서도 관찰된다. 얇고 매끄럽고 부드럽게 주름진 자연적으로 노화된 피부와는 달리, 광피부노화 피부는 두껍고 결이 거친 주름을 나타낸다. 그러므로, 태양 노출로부터 피부를 보호하는 것이 어린 피부를 유지하는데 가장 중요하다.

[0003] 자외선은 파장에 따라 3가지로 나누어진다: UVA (400-315 nm), UVB (315-280 nm) 및 UVC (280-100 nm). 이들 중에서, UVB 영역이 가장 강한 에너지 강도를 갖는다. UVB에 과다 노출되면 주름이 생길 뿐만 아니라 피부암도 발생한다. 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 조사에 의해 발생한 ROS는 MMP-1 (interstitial collagenase) 및 MMP-13 (collagenase 3)와 같은 인간 진피 섬유아세포에서 교원분해성 MMPs(matrix metalloproteinases)의 분비를 증가시켜 천연 원섬유성 콜라겐을 손상시킬 수 있다. 그러므로, 교원분해성 MMPs의 양 증가는 피부 주름 형성 및 피부 탄성 감소의 원인이다.

[0004] 키틴 및 키토산은 갑각류 껍질, 곤충 표피 및 일부 미생물의 세포벽에 존재하는 천연 양이온성 다당류이다. 키토산은 키틴의 알칼리성 탈아세틸화에 의해 생산된 것으로, $\beta(1\rightarrow4)$ -결합 N-아세틸-D-글루코사민 유닛으로 구성되어 있으며 다양한 생물학적 활성을 갖는다. 키토올리고당(COS)은 키토산 유도체로 가수분해된다. 키토산과 달리, COS는 D-글루코사민 유닛에서 더 짧은 사슬 길이 및 유리 아미노기를 갖는다. 이러한 이유로, COS는 천연 수용액에서 가용성이므로 생체외 및 생체내 시스템에 쉽게 적용시킬 수 있다. COS는 이들의 분자량 범위에 따라 항-종양, 항-진균, 항균, 항-바이러스 및 ROS 소거능을 갖는 것으로 알려져 있다.

[0005] 키토올리고당과 관련한 종래 기술을 살펴보면, 주로 키토올리고당을 함유하는 식품에 관한 기술이 주를 이루

고 있다. 대한민국 공개특허번호 제 10-2008-0049175호에서는 키토올리고당을 함유하여 AMPK 및 지방대사 관련 효소에 영향을 줌으로써 간세포에서의 에너지 대사를 촉진시키는 피로 개선용 조성물에 대하여 기재하고 있으며, 대한민국 공개특허번호 제 10-2010-0062137호에서는 항산화 활성을 갖는 COS 유도체인 아미노에틸 키토올리고당을 유효성분으로 함유하는 항산화 활성 약학 조성물에 관하여 기재하고 있으나, 키토올리고당의 피부노화 방지 효능에 대하여는 아직 연구가 미흡한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출된 것으로, 키토올리고당을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 방지용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 상기 목적은 UV에 노출시킨 인간 진피 섬유아세포에 키토올리고당을 처리하여 세포독성 효과, ROS 소거능, DNA 산화 손상 보호 효과, MMP 발현 억제 효과 및 콜라겐 분해 억제 효과를 측정하고 분석하여 피부 노화 방지 효과를 확인함으로써 달성되었다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 키토올리고당의 피부 노화 방지 효과를 규명하고 이를 이용하여 우수한 피부 노화 방지 효능을 제공하는 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 다른 조사 강도의 UVB 조사에 노출된 인간 진피 섬유아세포의 세포독성을 나타낸 것이다. 세포를 50-200 mJ/cm²의 UVB 조사에 노출시킨 후 세포독성 수준을 MTT (A) 및 LDH 방출(B) 검정으로 측정하였다. 다른 문자로 표시된 평균들은 Duncan's multiple range test에 의한 유의적 차이를 나타낸다 ($p < 0.05$). Blank: UVB에 노출시키지 않음.

도 2는 100 mJ/cm²의 UVB 조사에 노출된 인간 진피 섬유아세포의 생존율에 대한 다양한 분자량의 COS의 효과를 나타낸 것이다. 세포를 100 mJ/cm²의 UVB 조사에 노출시킨 후 다른 분자량의 COS (1-3 kDa, 3-5 kDa 및 5-10 kDa)를 처리하였다. 세포 생존율을 MTT (A) 및 LDH 방출 (B) 검정으로 측정하였다. Blank: UVB에 노출시키지 않음, control: UVB에만 노출시킴.

도 3은 UVB 조사에 의해 유도된 세포내 ROS 생성에 대한 다양한 분자량의 COS의 효과를 나타낸 것이다. 100 mJ/cm²의 UVB 조사에 노출된 세포를 COS를 처리한 후 48시간 동안 배양하고 DCFH-DA를 첨가시켰다. ROS를 DCFH-DA 염색 후에 형광 분광광도측정법을 사용하여 검출하였다.

도 4는 UVB-유도 DNA 산화 손상에서의 다양한 분자량의 COS의 효과를 나타낸 것이다. 세포를 100 mJ/cm²의 UVB 조사에 노출시킨 후 다양한 분자량의 COS를 처리하였다. COS를 처리 또는 비처리한 UVB-자극 세포로부터 DNA를 분리하고 이를 1% 아가로스겔에 전기영동하였다.

도 5는 UVB-노출 인간 진피 섬유아세포에서의 MMP 발현에 대한 다양한 분자량의 COS의 효과를 나타낸 것이다.

도 6은 UVB-노출_인간 진피 섬유아세포에서의 콜라겐 분해 (A), MAPK 활성화 (B) 및 AP-1 활성화 (C)에 대한 COS(3-5 KDa)의 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 키토올리고당(Chitooligosaccharide; COS)을 유효성분으로 포함하는 자외선으로 인한 피부 노화 방지용 화장품 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 피부노화 방지용 화장품 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 키토올리고당을 0.05-8 중량%, 바람직하게는 1 내지 2 중량%로 포함한다.

[0012] 통상적으로 화장품 조성물에 이용되는 성분, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와

같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

- [0013] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 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.
- [0014] 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.
- [0015] 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.
- [0016] 본 발명의 조성물이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용된다.
- [0017] 본 발명의 조성물이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정질 셀룰로오스 등이 이용될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 제형이 계면활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트 등이 이용될 수 있다.

[0019] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이므로, 본 발명을 이에 한정하는 것으로 해석해서는 안 된다.

[0020] 다양한 분자량의 키토올리고당(COS)(1-3 kDa, 3-5 kDa 및 5-10 kDa)은 Kitto Life Co. (Seoul, Korea)에서 입수하였다. COS는 반응기 시스템(reactor system)에서의 효소 반응 및 다양한 분자량 컷-오프(cut-offs) (MWCO of 1-3 kDa, 3-5 kDa and 5-10 kDa)를 갖는 UF(ultra-filtration) 막을 통과시키는 여과를 통해 키토산을 가수분해하였다. 다양한 분자량의 COS를 세포 배양을 위해 물에 용해시켰다.

[0021] 데이터는 평균 $\pm$ SD (n=5)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. 세포 배양

[0023] 인간 진피 섬유아세포(Human dermal fibroblasts; HDF)($\varnothing$ MCTT, Modern Cell & Tissue Technologies, INC)를 37 °C, 5% CO₂의 습도 대기 조건 하에서 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM 글루타민 및 100 μ g/ml 페니실린-스트렙토마이신(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 포함하는 DMEM 배지 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD USA)에 배양하였다.

[0024] 실시예 2. UVB-노출 세포의 생존율 및 세포독성에서 COS의 효과

[0025] UVB 조사의 적절한 에너지 수준을 결정하기 위해, 배양된 인간 진피 섬유아세포를 50-200 mJ/cm² 범위 내에서 다양한 UVB 에너지원에 노출시킨 후 MTT 및 LDH 방출 검정에 의해 얻어진 데이터를 비교하여 세포독성을 측정하였다.

[0026] UVB 조사

[0027] UVB 조사 강도의 최적 수준을 결정하기 위해, 1 x 10⁵ 세포/웰 밀도의 세포를 10% FBS, 2 mM 글루타민 및 100

$\mu\text{g/ml}$ 페니실린-스트렙토마이신 함유 DMEM를 포함하는 24-웰 플레이트에서 37°C , 5% CO_2 의 습도 대기 조건 하에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후, 세포를 각 웰의 $200\ \mu\text{l}$ 인산염 완충 식염수(PBS) 내에서 $50\text{--}200\ \text{mJ/cm}^2$ 범위(312 nm UVB light source, Bio-Sun lamp, Vilber Lourmat, Marine, France)의 UVB 에너지에 노출시켰다. 조사 후에, 세포를 48시간 동안 무혈청 DMEM에서 배양하였다.

[0028] MTT 검정

[0029] HDF 세포의 생존도 수준을 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드 (MTT) 를 불용성 포르마잔 산물로 전환시키는 미토콘드리아의 능력을 통해 결정하였다. 세포를 1×10^4 cells/well의 밀도로 96-웰 플레이트에 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후, 세포에 UVB 조사 ($100\ \text{mJ/cm}^2$)하여 자극하고 37°C , 5% CO_2 의 습도 대기 조건 하에서 COS 시료와 함께 또는 COS 시료 없이 48시간 동안 배양하였다. 상층액 배지를 제거하고 $100\ \mu\text{l}$ 의 $1\ \text{mg/ml}$ MTT 시약을 각 웰에 첨가한 후 4시간 동안 배양하였다. 전환되지 않은 MTT를 제거한 후, DMSO (dimethyl sulfoxide)를 첨가하고 마이크로플레이트 판독기(Tacan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 사용하여 540 nm에서 OD(optical density)를 측정하여 세포 내의 포르마잔 양을 결정하였다. 상대적 세포 생존율을 대조군인 비처리 세포의 생존율에 대한 백분율로 계산하였다.

[0030] LDH 검정

[0031] 세포 손상을 시판되는 LDH 세포독성 검출 키트 (TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan)를 사용하여 락테이트 디하이드로게나아제(LDH)-방출량을 정량하여 측정하였다. 세포를 실험 설계에 따라 노출시켰다. UVB-노출 세포의 조건 배지를 LDH 측정을 위해 수집하였다. 기질 믹스 용액을 1:1 비율로 상층액 배지와 동량으로 첨가한 후 37°C 에서 30분 동안 광차단 조건하에서 배양하였다. 그런 다음, 마이크로플레이트 판독기 (Tacan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 사용하여 1N HCl 정지액(최종 농도 0.2 N)의 첨가 후 즉시 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 100% LDH 방출로서 규정되는 0.1% (w/v) Triton X-100으로 대조를 제조하였다.

[0032] LDH는 많은 장기 기관에서 안정한 세포질 효소이다. 세포로부터 배양 배지로 LDH가 방출되는 것은 세포 손상을 암시하는 것이다. UVB 에너지에 세포를 노출시키면 세포 생존율이 상당히 감소하며(도 1의 A) 투여량-의존 방식으로 LDH 방출을 증가시킨다 (도 1의 B). $100\ \text{mJ/cm}^2$ 이상의 UVB 에너지에 노출시킨 세포는 UVB-노출 세포에서와 유사한 세포독성을 유도한다.

[0033] 이러한 결과에 근거하여, UVB-노출 HDF 세포의 생존율 및 손상 정도에서 다양한 분자량의 COS의 효과를 $100\ \text{mJ/cm}^2$ 에서 실험하였다. COS의 농도를 증가시킴에 따라 세포의 생존율은 UVB에만 노출시킨 세포에 비해 투여량-의존 방식으로 실질적으로 증가하였다(도 2의 A). LDH 방출 검정은 COS가 투여량-의존 방식으로 UVB 노출에 의해 야기되는 세포 손상 정도를 실질적으로 감소시킴을 나타낸다 (도 2의 B). UVB 노출에 의한 세포 손상에서의 저해 효과는 다른 COS에 비해 COS (3-5 kDa)-처리 인간 섬유아세포에서 좀더 효과적이다.

[0034] **실시예 3. UVB-노출 세포에서 세포내 ROS 소거능에 대한 COS의 효과**

[0035] 세포내 ROS 생성 수준을 산화-민감성 염료인 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 사용하여 검출하였다. HDF 세포를 24시간 동안 96-웰 마이크로플레이트에서 배양한 후 UVB ($100\ \text{mJ/cm}^2$)에 노출시켰다. 노출된 세포를 COS 시료로 48시간 동안 처리한 후 PBS에 용해된 $20\ \mu\text{M}$ DCFH-DA를 충전하고 37°C , 5% CO_2 의 습도 대기 조건의 암실에서 30분 동안 배양하였다. 최종적으로, 세포를 PBS로 2회 세척하고 PBS에 용해된 DCF의 형광을 형광 마이크로플레이트 판독기(Tacan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 사용하여 485 nm의 여기 파장 및 535 nm의 방사 파장에서 검출하였다. 결과는 도 3에 나타났다.

[0036] UVB 노출에 따라 DCF 형광이 증가하는 것이 관찰되었다. UVB 노출은 UVB에 노출시키지 않은 blank 그룹에 비해 3.5배 더 높은 형광 강도를 나타냈다. COS의 존재는 UVB-노출 세포에서 투여량-의존 방식으로 DCF 형광 강도를 상당히 감소시켰으며, 이는 세포내 ROS 생산에 대한 증가된 소거능을 증명하는 것이다 ($p < 0.05$). COS 중에서, 3-5 kDa의 COS가 UVB 조사에 의한 UVB-매개 ROS 생성을 효과적으로 억제시킨다. 1-3 kDa의 COS 및 5-10

kDa의 COS는 3-5 kDa의 COS보다 약간 더 낮은 UVB-자극 ROS의 소거능을 나타냈다.

[0037] **실시예 4. UVB-유도 DNA 손상에서 COS의 저해 효과**

[0038] 계능 DNA를 약간 변형시킨 표준 페놀/프로테나아제 K 방법을 사용하여 HDF 세포로부터 분리하였다. COS 시료의 존재 또는 부재 하의 UVB-자극 세포를 PBS로 2회 세척한 후 10 mM EDTA를 함유하는 PBS 1 ml를 사용하여 수집하였다. 4 °C에서 $13,400 \times g$ 으로 5분간 원심분리한 후, 침전된 세포를 RNase A (0.5 mg/ml), 프로테나아제 K (10 mg/ml), SDS (10%) 및 NaOAc (0.2 M)를 포함하는 410 μ l 용액에 재현탁시켰다. 이 혼합물을 37 °C에서 30분간, 그리고 55 °C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 페놀:클로로포름:이소아밀알콜(25:24:1)을 1:1 비율로 첨가하고 혼합물을 4°C에서 5분간 $13,400 \times g$ 으로 원심분리하였다. 그런 다음, 상층을 새로운 에펜도르프 튜브로 옮기고 100% 냉 에탄올을 1:1.5 비율로 첨가한 후 -20 °C에서 30분 동안 배양하였다. 4°C에서 5분간 $5,900 \times g$ 으로 원심분리한 후, 상층액을 조심스럽게 제거하고 남아있는 펠렛을 20 μ l의 TE 완충용액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시켰다. DNA의 순도를 분광광도측정 검정을 사용하여 260 및 280 nm에서 흡광도 비율을 측정하였다.

[0039] 1 μ g의 DNA를 포함하는 분취량 (20 μ l)의 반응 혼합물을 100 V에서 10분간 1% 아가로스겔 전기영동하여 분리하였다. 겔을 1 mg/ml의 EtBr(ethidium bromide)로 30분 동안 염색하고 AlphaEase® 겔 이미지 분석 소프트웨어 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 사용하여 UV 조명 하에서 사진을 찍었다. 결과는 도 4에 나타났다.

[0040] DNA 손상이 UVB-노출 세포에서 DNA 손상이 관찰되었는데, COS의 존재 하에서는 DNA 손상이 투여량-의존 방식으로 감소하였다. 이러한 결과는 UVB-매개 DNA 손상에 적절한 보호 효과를 나타냄을 보여주는 것이다. 특히, 3-5 kDa의 COS가 UVB 노출에 의한 DNA 손상을 효과적으로 보호했다.

[0041] **실시예 5. RT-PCR(reverse transcriptase polymerase chain reaction) 분석**

[0042] 총 세포성 RNA를 Trizol 시약(Invitrogen Co., CA, USA)을 사용하여 분리하였다. 2 μ g의 분리된 RNA를 올리고-(dT) 프라이머 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 cDNA 내로 역-전사하였다. 표적 cDNA를 하기와 같은 정방향 프라이머 서열 및 역방향 프라이머 서열을 사용하여 증폭시켰다: MMP-1에 대하여 정방향 프라이머 5'-GAT-GTG-GAG-TGC-CTG-ATG-TG-3' 및 역방향 프라이머 5'-TGC-TTG-ACC-CTC-AGA-GAC-CT-3'; MMP-13에 대하여 정방향 프라이머 5'-GGA-GCC-TCT-CAG-TCA-TGG-AG-3' 및 역방향 프라이머 5'-TTG-AGC-TGG-ACT-CAT-TGT-CG-3'; GAPDH에 대하여 정방향 프라이머 5'-GAG-TCA-ACG-GAT-TTG-GTC-GT-3' 및 역방향 프라이머 5'-GAC-AAG-CTT-CCC-GTT-CTC-AG-3'. 95 °C에서 45초, 60 °C에서 50초, 72 °C에서 60초를 35사이클 반복하여 증폭시켰다. 증폭 후에, 연장 단계를 72 °C에서 5분간 연속적으로 진행하였다. PCR 산물을 100 V에서 10분 동안 1% 아가로스겔 상에서 전기영동하여 분리하였다. 겔을 1 mg/ml의 EtBr로 염색하고 AlphaEase® 겔 이미지 분석 소프트웨어 (Alpha Innotech., San Leandro, CA, USA)를 사용하여 UV 조명 하에서 사진을 찍었다. 최종적으로, 상대적 밴드 밀도를 LAS3000® 발광 이미지 분석기(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 사용하여 결정하였다.

[0043] **실시예 6. 웨스턴 블롯 분석**

[0044] 전체 세포를 RIPA 완충용액 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA)에 용해시켰다. 원심분리 후, 세포 용해물의 총 단백질 함량을 Lowry method (BioRad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 결정하였다. 동량의 단백질 (20 μ g)을 포함하는 분취량의 상층액을 10% 또는 12% SDS-PAGE 겔에 전기영동한 후 니트로셀룰로스 멤브레인 (Amersham Pharmacia Biotech., England, UK)으로 옮기고, 0.1% Tween 20 (TBS-T)을 포함하는 TBS에 용해된 5% 스킴밀크로 적어도 1시간 동안 차단시킨 후 MMP-1, MMP-13, 1형 프로콜라겐, 1형 콜라겐, pERK, pJNK, pp38, c-Jun, c-fos 및 pp53 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)와 같은 일차 항체와 하이브리드화 시켰다. 모든 일차 모노클로날 항체를 1:1000 비율로 TBS-T로 희석시켰다. 결합된 항체를 1시간 동안 실온에서 호스래디쉬 퍼옥시다아제-결합 이차 항체로 검출하고, 면역반응성 단백질을 제조업자의 지시에 따라 화학형광 ECL 검정 키트(Amersham Pharmacia Biosciences, England, UK)를 사용하여 검출하였다. 웨스턴 블롯팅 밴드를 LAS3000® 발광 이미지 분석기(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 사용하여 시각화시켰다.

[0045] **실시예 7. UVB-매개 MMP 발현에서의 COS의 효과**

[0046] UVB-노출 세포에서 교원분해성 MMPs의 발현에 대한 COS의 효과를 실시예 5 및 실시예 6에 기재된 바와 같이 RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅 분석을 사용하여 결정하였다(도 5). MMP-1 및 MMP-13 유전자의 발현 수준은 UVB에만 노출시킨 세포에서 상당히 증가하였다. 그러나 COS를 처리한 UVB 노출 세포에서는 UVB-매개 교원분해성 MMP 유전자 발현이 감소하였다. 특히, MMP-1 유전자 발현은 1-3 kDa의 COS 및 3-5 kDa의 COS에 의해 투여량-의존 방식으로 상당히 감소되었으며 3-5 kDa의 COS에 의해서도 투여량-의존 방식으로 감소되었다.

[0047] 이러한 실험 데이터에 따라, 3-5 kDa의 COS가 모든 COS 중에서도 UVB-매개 광노화(photoaging)에 가장 우수한 보호 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0048] **실시예 8. UVB-노출 세포에서 콜라겐 분해에서의 COS (3-5 kDa)의 효과**

[0049] UVB-노출 세포에서의 프로콜라겐 합성 및 콜라겐 파괴에 대한 COS (3-5 kDa)의 효과를 실시예 6에서와 같이 실험하였다(도 6의 A). 세포내 1형 프로콜라겐 및 콜라겐 단백질의 조절은 UVB에만 노출된 세포에서 감소하였다. UVB 노출에 의해 감소된 1형 프로콜라겐 및 콜라겐 단백질의 세포내 수준은 3-5 kDa의 COS의 존재시 투여량-의존 방식으로 증가된다.

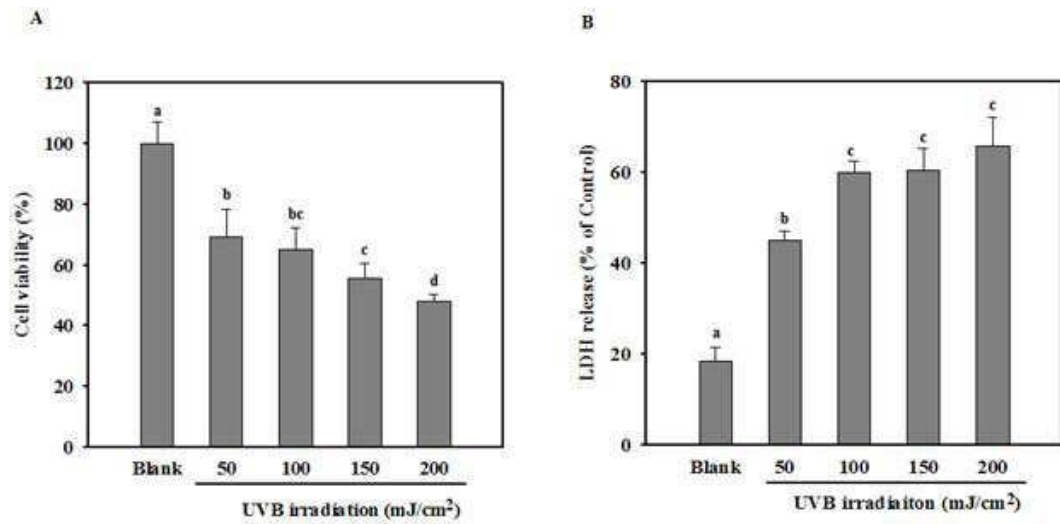
[0050] **실시예 9. MAPK 활성화에서 3-5 kDa COS의 저해 효과**

[0051] UVB-노출 세포에서 COS의 보호 효과에 대해 반응하는 시그널링 캐스케이드를 밝히기 위해, MARK(mitogen-activated protein kinase) 시그널링 경로를 실시예 6에서와 같이 실험하였다(도 6의 B). MAPKs의 주요한 세 클래스인 JNK(c-Jun N-terminal kinase), ERK1/2(extracellular signal-related kinase) 및 p38 MAPK의 조절에서 3-5 kDa COS의 효과를 UVB-노출 세포에서 조사하였다. 인산화 JNK, p38 MAPK 및 ERK1/2 단백질의 발현이 증가되었으나, 이 세포에 COS (3-5 kDa)를 처리했을 때는 효과적으로 발현을 감소시켰다. Jun 및 Fos류에 속하는 전사 인자 AP-1(activator protein-1)은 MMP 발현 및 1형 프로콜라겐의 감소를 포함하는 급성 광손상(photodamage)의 결정적 매개체이다. 그러므로, UVB-유도 AP-1 활성화에서 COS (3-5 kDa)의 효과를 실험하였다. UVB 조사에 의해 활성화된 핵 전사 인자 c-Jun 및 c-fos는 COS (3-5 kDa) 처리에 의해 상당히 약화되었다(도 6의 C). 게다가, 다른 전사인자 p53의 인산화 역시 COS (3-5 kDa)의 처리에 의해 억제되었다.

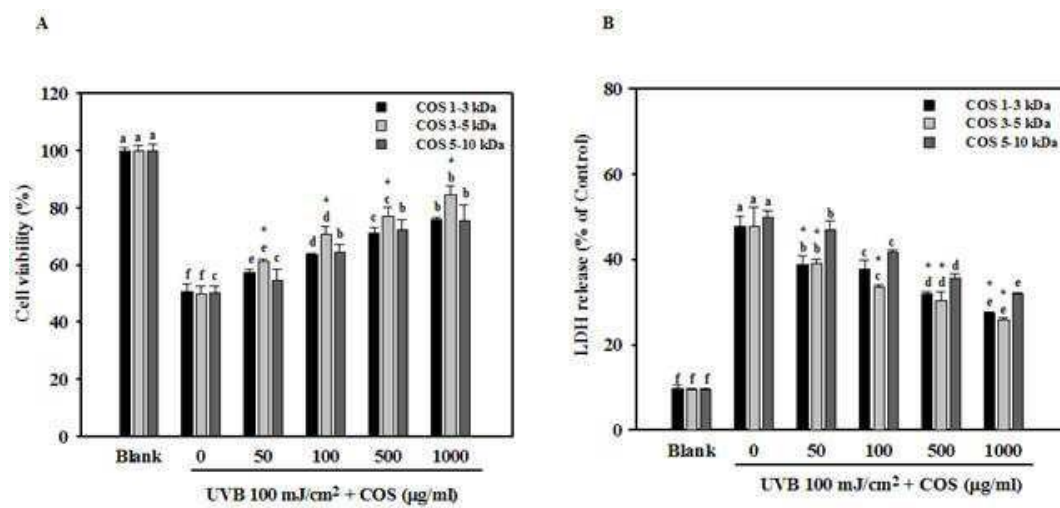
[0052] 상기 여러 실험의 결과로서 UVB-스트레스 인간 섬유아세포의 세포독성에 대한 COS의 보호 효과는 분자량에 의존함을 알 수 있었다. COS는 매트릭스 메탈로프로테인(matrix metalloproteinase; MMP)-1 및 -13의 발현저하를 수반하는 UVB 조사-유도 ROS(reactive oxygen species) 발생 및 DNA 손상을 억제한다. 경쟁 분석에서, COS (3-5 kDa)는 UVB-스트레스 섬유아세포에서 가장 잠재적인 보호 효과를 나타내며, COS (3-5 kDa)의 존재는 UVB-유도 교원분해성 MMP 생산 및 콜라겐 분해를 약화시킨다. COS (3-5 kDa)의 광보호(photoprotective) 활성 역시 MAPK-반응성 시그널링 경로의 전사 인산화로 확인할 수 있었다.

도면

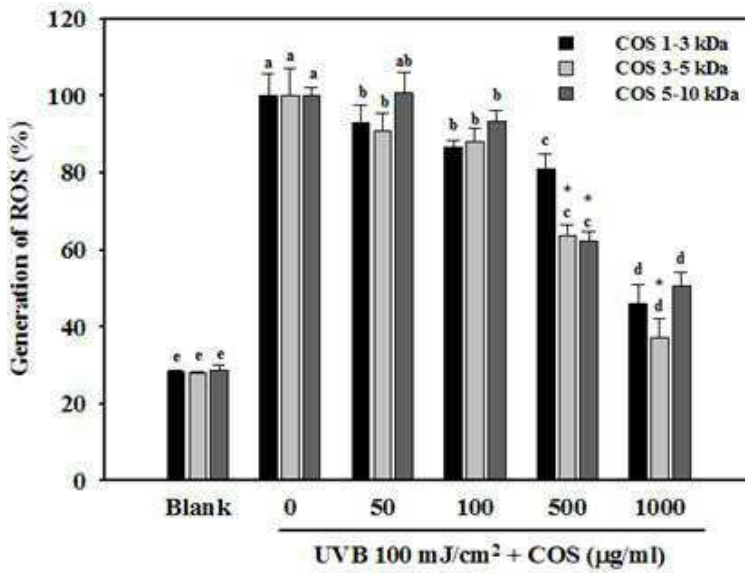
도면1



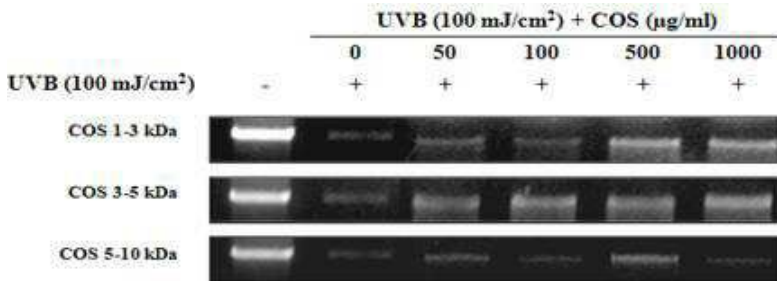
도면2



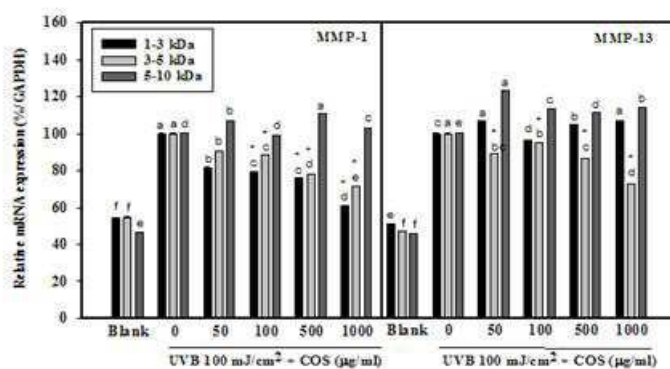
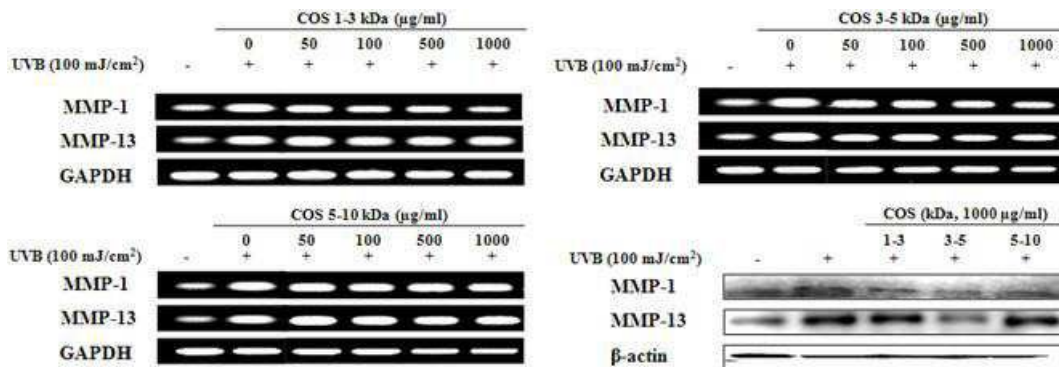
도면3



도면4



도면5



도면6

