



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0086649
(43) 공개일자 2016년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/65 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/65 (2013.01)
A61K 8/498 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0004270
(22) 출원일자 2015년01월12일
심사청구일자 2015년01월12일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
황유식
서울특별시 동대문구 경희대로 24 경희대학교 치의학전문대학원 616호
최수지
서울특별시 동대문구 경희대로 24 경희대학교 치의학전문대학원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김정대

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 케라틴과 EGCG 복합체를 함유하는 조성물 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 피부 각질 재생을 촉진하고 피부내 섬유아세포의 탄성 및 활성을 향상시켜 피부 재생에 우수한 효과가 있고, 또한 구조적으로 안정하여 상온 보관이 가능하며, 또한 인체에 유해하지 않고 우수한 생체 적합성을 갖는 신규 원료 및 이를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은, 케라틴(Keratin)과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)의 복합체를 유효성분으로 포함하는 피부용 조성물을 개시한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61Q 19/00 (2013.01)

(72) 발명자

김소연

서울특별시 동대문구 경희대로 24 경희대학교 치의
학전문대학원

이재형

서울특별시 동대문구 경희대로 24 경희대학교 치의
학전문대학원

한동욱

부산광역시 금정구 금강로335번길 90 금정힐스테이
트아파트 103동 402호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A5A2051387

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 경희대학교 산학협력단

연구사업명 선도연구센터지원사업 (MRC)

연구과제명 치아와 치수조직 재생 연구센터

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2022.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2009706

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 경희대학교 산학협력단

연구사업명 일반연구자 지원사업 (기본연구)

연구과제명 치아줄기세포의 크기에 따른 골형성세포 및 신경세포 분화능 연구와 이를 응용한 마이크로
골/신경조직 구현

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

케라틴(Keratin)과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)의 복합체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 케어용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 피부 보습 증가, 피부 탄력 증진, 피부 두께 증가, 피부 주름 개선, 피부 자극 완화 및 피부 손상 회복 중 어느 하나 이상의 작용을 나타내는 것을 특징으로 하는 피부 케어용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 화장수, 유액, 크림, 젤, 에센스 및 마스크팩으로 이루어지는 군에서 선택되는 화장품인 것을 특징으로 하는 피부 케어용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 케라틴은 사람의 머리카락으로부터 추출된 케라틴인 것을 특징으로 하는 피부 케어용 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)의 복합체는 케라틴에 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)가 수소결합되어 있는 것을 특징으로 하는 피부 케어용 조성물.

청구항 6

케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG) 복합체의 제조 방법으로서,

용매 중에 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)를 각각 첨가하여 교반하면서 반응시키는 단계; 및 상기 반응 후에 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)를 포함하는 용액을 투석함으로써 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)의 복합체를 얻는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피부 각질 재생을 촉진하고 피부내 섬유아세포의 탄성 및 활성을 향상시켜 피부 재생에 우수한 효과가 있고, 또한 구조적으로 안정하여 상온 보관이 가능하며, 또한 인체에 유해하지 않고 우수한 생체 적합성을 갖는 신규 원료 및 이를 유효성분으로 포함하는 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 케라틴은 머리털·손톱·피부 등 상피 조직의 기본을 형성하는 단백질의 일종이며, 모발, 손톱, 발톱, 뿔, 깃털 등을 구성하는 진성 케라틴과 피부 및 소수의 다른 조직에 존재하는 유사 케라틴으로 구분될 수 있다.

[0003] 케라틴은 물과 모든 중성용매에 녹지 않는 불용성이며, 인성(toughness)이 강하여, 공업용 재료 및 생체 고분자 재료로서 적합하게 이용되고 있다.

[0004] 그러나 사람 머리카락 유래의 케라틴을 화장품의 원료로서 사용하는 기술은 알려진 바 없으며, 특히 피부 재생을 위한 화장품의 원료로서 사용하는 것에 대해서는 공지된 바 없다.

[0005] 특허 제10-0923326호에는 모발, 뿔, 깃털 등의 동물 원료로부터 케라틴 유도체를 제조하는 방법이 개시되어 있고, 이와 같이 얻어진 케라틴 유도체 중 일부는 가용성이고, 다양한 생체 고분자 재료를 제조하는데 사용될 수

있음이 개시되어 있다. 그러나 케라틴을 화장품의 원료나 피부 재생용 조성물의 원료로서 사용하는 것은 시사되어 있지 않다.

[0006] 특허 제10-1103571호에는 케라틴을 생체 적합성 재료로서 이용하여 피부 조직 재생용 구조체를 제공하는 기술이 개시되어 있다. 그러나 여기서는 콜라겐의 피부 조직 재생 효과를 실증하고 있을 뿐이고, 다양한 생체 유래 재료의 하나로서 케라틴이 예시된 것에 불과하고, 케라틴의 피부 재생 효과에 대해서는 개시되어 있지 않다.

[0007] 한편, 피부스케일링 등의 미용목적 기술이나 다른 요인으로 인해 손상된 피부 각질층의 재생을 촉진하기 위해, 콜라겐 등의 원료를 이용한 화장품이 사용되고 있다.

[0008] 그러나 주로 소, 돼지 등 동물로부터 추출된 콜라겐을 성분으로 사용하고 있어서, 다른 종의 단백질을 인체에 적용함에 따른 알러지 반응의 문제가 있고, 광우병이나 기타 동물 유래 질병의 위험으로 인해 사용상 제약이 있는 문제가 있다. 또한 화장품의 원료로서 사용되는 대부분의 동물 유래 단백질은, 그 구조적 특성에 따른 열적 불안정성으로 인해 상온 보관이 어려운 문제가 있다.

[0009] 또한 지금까지 피부 재생을 촉진하는 것으로 공지되어 사용되고 있는 대부분의 원료 물질은 주로 수화작용(hydration), 항산화능(antioxidant property), 또는 콜라겐 합성을 간접적으로 촉진시키는 기능에 기반하고 있으며, 직접적으로 피부 각질세포의 이동을 촉진시키거나 각질세포의 활성을 향상시키는 작용, 또는 피부내 섬유아세포의 활성 및 성장을 향상시키는 작용을 하는 화장품의 원료는 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 피부 각질 재생을 촉진하고 피부내 섬유아세포의 탄생 및 활성을 향상시켜 피부 재생에 우수한 효과가 있고, 또한 구조적으로 안정하여 상온 보관이 가능하며, 또한 인체에 유해하지 않고 우수한 생체 적합성을 갖는 신규 원료 및 이를 유효성분으로 포함하는 조성물, 보다 구체적으로 피부 화장료 조성물 기타의 피부 케어용 조성물 및 그 제조방법을 제공하는 것을 기술적 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 상기와 같은 기술적 과제를 해결할 수 있는 원료를 연구한 결과, 사람의 머리카락에서 추출한 케라틴이 피부 각질세포의 이동을 촉진하고 섬유아세포의 활성을 향상시키는 것을 도출하게 되었다.

[0012] 한편, 사람 머리카락 유래의 케라틴에는 프롤린과 시스테인이 다량 함유되어 있다. 이는 시스테인의 다이설파이드 결합(disulfide bond)에 의해 망상으로 이어진 선상 구조를 가지며, 프롤린의 환 구조 간의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의해 자가 조립(self-assembly)되는 특성이 강하기 때문에, 물과 모든 중성용매에 불용성이다. 따라서 인체 피부에 사람 머리카락 유래의 케라틴을 실제로 적용하기 위해서는, 상기 소수성 상호작용을 완화시켜 케라틴의 용해성을 높일 수 있는 해결수단이 더욱 필요하다.

[0013] 본 발명자들은 사람 머리카락 유래 케라틴에 폴리페놀류인 에피갈로카테킨-3-갈레이트(Epigallocatechin-3-Gallate, 이하, 'EGCG')를 첨가하여 처리함으로써 케라틴과 EGCG의 복합체(complex)를 형성하고, 이 복합체가 PBS 용액에 높은 용해성을 나타내어 인체에 사용하기에 적합하다는 것을 도출하였다.

[0014] 따라서, 본 발명의 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 케라틴과 EGCG 복합체를 유효성분으로 포함하는 피부 케어용 조성물, 예를 들면 피부 재생용 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 조성물은 피부 보습 증가, 피부 탄력 증진, 피부 두께 증가, 피부 주름 개선, 피부 자극 완화 및 피부 손상 회복 중 어느 하나 이상의 작용을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0016] 상기 조성물은 화장수, 유액, 크림, 젤, 에센스 및 마스크팩으로 이루어지는 군에서 선택되는 화장품인 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기 유효성분인 케라틴은 사람의 머리카락으로부터 추출된 케라틴인 것을 특징으로 한다.

[0018] 상기 케라틴과 EGCG의 복합체는 케라틴에 EGCG가 수소결합되어 있는 복합체인 것을 특징으로 한다.

[0019] 또한 본 발명은 용매 중에 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)를 각각 첨가하여 교반하면서 반응시키는 단계; 및 상기 반응 후에 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트를 포함하는 용액을 투석함으로써 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)의 복합체를 얻는 단계를 포함하는 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG) 복

합체의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 유효성분인 케라틴과 EGCG의 복합체는, 피부의 주요 세포인 각질세포의 이동 등을 촉진시키고 또한 피부내 섬유아세포의 탄성 및 활성을 향상시킴으로써 피부스케일링 등으로 인한 피부 각질 트러블을 완화하고 피부의 탄성을 높일 수 있다.
- [0021] 또한 상기 유효성분은 열적으로 안정하여 상온보관이 가능하며, 다양한 제형의 화장품에 사용가능하다. 또한, 상기 유효성분은 사람의 머리카락으로부터 추출된 케라틴을 이용함으로써 취득이 용이하며, 사람 유래의 단백질이기 때문에 다른 종의 동물로부터 유래한 단백질에 비해 월등히 우수한 생체적합성을 갖는다.
- [0022] 따라서 개인 맞춤형(customized) 화장품 개발에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 피부필러, 인공피부 등의 생체재료로서 다양한 분야에서 사용될 수 있을 것으로 예상되며, 경제적 파급효과가 클 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 추출에 의해 얻어진 사람 머리카락 유래의 케라틴 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.
- 도 2a는 EGCG-케라틴 복합체의 형성을 확인한 ¹H-NMR 분석 결과이고, 도 2b는 SDS-PAGE 분석 결과이다.
- 도 3은 EGCG-케라틴 복합체의 세포독성 시험 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 EGCG-케라틴 복합체의 항산화능 시험 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 EGCG-케라틴 복합체의 피부 각질세포에 대한 세포활성 분석(Live & Dead Assay) 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 6은 EGCG-케라틴 복합체의 피부 각질세포에 대한 세포증식 분석(Proliferation Assay) 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 EGCG-케라틴 복합체에 의한 피부 각질세포 이동과 관련된 E-카데린 및 비멘틴의 발현을 면역화학적 염색을 통해 관찰한 사진이다.
- 도 8은 EGCG-케라틴 복합체의 피부 각질세포의 이동에 대한 효과를 관찰한 사진이다.
- 도 9는 EGCG-케라틴 복합체에 의한 세포의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 10은 EGCG-케라틴 복합체의 피부 섬유아세포에 대한 세포활성 분석(Live & Dead Assay) 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 11은 EGCG-케라틴 복합체의 피부 섬유아세포에 대한 세포증식 분석(Proliferation Assay) 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 12는 EGCG-케라틴 복합체에 의한 피부 섬유아세포의 크기 증가 및 텐션과 관련된 비멘틴 및 인테그린 베타1의 발현을 면역화학적 염색을 통해 관찰한 사진이다.
- 도 13은 EGCG-케라틴 복합체를 함유하지 않은 보통 배지에서 배양할 경우와 대비하여, 피부 섬유아세포의 크기 증가 및 텐션과 관련된 비멘틴 및 인테그린 베타1의 발현을 면역화학적 염색을 통해 관찰한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)의 복합체를 유효성분으로 포함하는 피부용 조성물, 보다 구체적으로는 피부 재생용 조성물 등의 피부 케어용 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 조성물은 피부 보습 증가, 피부 탄력 증진, 피부 두께 증가, 피부 주름 개선, 피부 자극 완화 및 피부 손상 회복 중 어느 하나 이상의 작용을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 상기 조성물은 화장수, 유액, 크림, 젤, 에센스 및 마스크팩으로 이루어지는 군에서 선택되는 화장품인 것을 특징으로 한다.
- [0027] 상기 유효성분인 케라틴은 사람의 머리카락으로부터 추출된 케라틴인 것을 특징으로 한다.

[0028] 상기 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)의 복합체는 케라틴에 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)가 수소 결합되어 있는 복합체인 것을 특징으로 한다.

[0029] 또한 본 발명은 용매 중에 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)를 각각 첨가하여 교반하면서 반응시키는 단계; 및 상기 반응 후에 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)를 포함하는 용액을 투석함으로써 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG)의 복합체를 얻는 단계를 포함하는 케라틴과 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG) 복합체의 제조 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명에 있어서 조성물의 유효성분은 사람 머리카락 유래의 케라틴과 EGCG의 복합체이다. 이는 사람 머리카락 유래의 케라틴과 EGCG가 단순히 혼합되어 있는 조성물이 아니며, 사람 머리카락 유래의 케라틴에 EGCG가 수소결합(HYDROGEN BONDING)되어 있는 상태의 복합체이다. 복합체의 구조식은 하기와 같다.



[0031]

[0032] <케라틴-EGCG 복합체>

[0033] 사람 머리카락 유래의 케라틴에는 프롤린과 시스테인이 다량 함유되어 있으므로, 시스테인의 다이설파이드 결합(disulfide bond)에 의해 망상으로 이어진 선상 구조를 가지며, 또한 프롤린의 환 구조 간의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의해 자가 조립(self-assembly)되는 특성이 강하기 때문에, 물과 모든 중성용매에 불용성이다. 그러나 상기와 같이 사람 머리카락 유래 케라틴과 EGCG의 복합체를 형성하는 경우, 이 복합체는 PBS 용액에 높은 용해성을 나타낸다.

[0034] 본 발명에 따른 조성물은 피부에 도포하여 적용시, 도포한 부위의 각질 세포의 이동을 촉진시키고 피부내 섬유아세포의 활성화 및 성장을 향상시킴으로써 피부 조직의 재생을 촉진한다.

[0035] 여기에서 피부 재생이란, 피부 보습 증가, 피부 탄력 증진, 피부 두께 증가, 피부 주름 개선, 피부 자극 완화 및 피부 손상 회복 작용을 포함하는 것이다.

[0036] 본 발명에 따른 조성물은 본 발명의 유효성분인 케라틴과 EGCG 복합체를 예를 들어 0.001 ~ 20 중량%, 또는 0.01 ~ 10 중량%, 또는 0.1 ~ 3 중량% 포함할 수 있으며, 조성물 제형의 목적 및 종류에 따라 함량은 적절히 선택할 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 조성물은 화장수, 유액, 크림, 젤, 에센스 및 마스크팩으로 이루어지는 군에서 선택되는 화장품 제형으로 할 수 있다.

[0038] "화장수"는 일반적으로 피부를 청결하고 건강하게 유지하기 위해서 피부 표면에 도포하는 투명 액상의 화장품이며, 화장수에는 물에 녹기 어려운 물질을 용해시키고 안정시켜 외관을 투명상태로 한 것, 마이크로에멀전이나 리피드나노스피어를 이용한 투명 또는 반투명의 것, 수%의 유분을 O/W형, W/O형 또는 W/S형으로 유화한 불투명 화장수, 및 수용성 고분자를 배합한 것 등을 들 수 있다.

[0039] 화장수에는 본 발명의 유효성분인 케라틴과 EGCG 복합체 이외에, 예를 들어 이온 교환수 등의, 수용성 성분을 용해하여 각질층에 수분을 공급하기 위한 정제수; 에탄올, 프로판올 등의, 유용성 성분을 용해하고 살균하여 청량감을 주기 위한 알코올; 글리세린, PEG, 히알론산 등의, 각질층의 보습을 위한 보습제; 에스테르유, 식물유 등의, 보습성이나 사용감의 향상을 위한 에모리엔트제(수분이 증발하는 것을 막는 기름 성분); 폴리옥시에틸렌오레일알코올 에테르 등의, 원료 성분을 가용화하기 위한 가용화제; 구연산, 유산, 아미노산류 등의, 제품의 pH를 조정하기 위한 완충제; 바니린, 오렌지플라이버, 레몬플라이버, 밀크후레이버게라니올, 리나롤 등의, 향을 부가하기 위한 향료; 메틸파라벤, 페녹시 에탄올 등의, 미생물을 억제하여 부패를 방지하기 위한 방부제; 착색하기 위한 착색제; 금속 이온 봉쇄제, 자외선 흡수제 등의, 퇴색이나 변색을 방지하기 위한 퇴색 방지제;

및 수렴제, 살균제, 활력제, 소염제, 또는 미백제 등을 1종 또는 2종 이상 포함할 수 있다.

- [0040] 본 발명의 실시 예에서, 상술한 화장수의 전체량을 100 중량%로 했을 경우에, 본 발명의 유효성분을 0.00 ~ 20 중량%, 또는 0.01 ~ 10 중량%, 또는 0.1 ~ 3 중량% 정도 포함할 수 있다.
- [0041] "유액"은 화장수와 크림의 중간적인 성질을 가지는 것이며, 일반적으로는 유동성이 있는 에멀전이다. 유액에 포함되는 성분은 후술하는 크림에 포함되는 성분과 유사하지만, 유액은 유동성이 있으므로, 크림에 비해 고형 유분이나 납류의 양이 적다. 유액은 본 발명의 유효성분을 예를 들어, 1 ~ 20 중량%, 또는 1 ~ 10 중량%, 또는 1 ~ 5 중량% 정도 포함할 수 있다.
- [0042] "크림"은 물과 기름처럼 서로 섞이지 않는 액체의 한쪽을 분산상으로서, 다른쪽 분산매에 안정적인 상태로 분산시킨 에멀전의 일종이다. 이러한 크림으로는 피부의 보습이나 유연을 위한 에모리엔트 크림, 혈행을 촉진하기 위한 맛사지 크림, 피부의 세정을 위한 클렌징 크림, 탈모를 위한 헤어 리무버, 냄새제거를 위한 데오도란트 크림, 및 각질연화를 위한 각질연화 크림 등을 들 수 있다.
- [0043] 크림에는 수상 성분으로서 예를 들면, 이온 교환수 등의 정제수; 에탄올, 프로파놀 등, 유용성 성분을 용해하고 살균하여 청량감을 주기 위한 알코올; 글리세린, PEG, 히알론산 등, 각질층의 보습을 위한 보습제; 및 키토산, 펙틴, 셀룰로오스 유도체 등의 점액질을 포함할 수 있다.
- [0044] 또한 유상성분으로서 스쿠알렌, 유동 파라핀, 마셀린, 고형 파라핀 등의 탄화수소; 올리브유, 아몬드유, 카카오지방, 피마자유 등의 유지; 밀납, 라놀린, 호호바유 등의 납; 스테아린산, 올레인산, 팔미틴산 등의 지방산, 세타놀, 스테아릴알코올 등의 고급 알코올; IPM, 글리세린트리에스테르, 펜타에리스리톨테트라에스테르 등의 에스테르; 및 폴리실록산류 등의 실리콘유 등을 포함할 수 있다. 크림에 포함되는 각 성분의 양은 그 종류나 용도에 따라 크게 다르지만, 공지된 것을 적절히 이용하면 된다. 크림은 본 발명의 유효성분을 1 ~ 100 중량%, 또는 1 ~ 20 중량%, 1 ~ 10 중량%, 또는 5 ~ 10 중량% 정도 포함할 수 있다.
- [0045] "젤"은 겔 또는 졸 등 외관 상태가 균일하고 투명에서부터 반투명의 화장료이다. 피부에 수분을 보급하고, 보습하기 위한 수성젤, 피부의 보습을 유지하고, 유분을 보급하기 위한 유성 젤, 혈행을 촉진하기 위한 맛사지용 수성 젤 및 세정용의 젤 등을 들 수 있다. 젤로는 카르복시비닐폴리머, 메틸셀룰로오스 등의 수용성 고분자를 포함한 겔화제를 이용해 제조하는 것을 들 수 있다. 또한, 젤상의 맛사지 오일을 이용해도 된다.
- [0046] "미용액(에센스)"은 기본적으로는 상기의 화장수, 유액 및 크림과 같은 성분이며, 유제, 가용화제, 보습제, 물 및 그 외의 약제를 포함할 수 있다. 미용액에 포함되는 유제로는 올리브유, 동백유, 참기름, 해바라기유, 스위트아몬드유, 호호바유 등의 천연 식물유; 카프린산, 미리스틴산, 올레인산, 이소스테아린산 등의 지방산의 디글리세린 에스테르 또는 트리글리세린에스테르 등을 들 수 있다. 이러한 유제는 주로 에모리엔트제로서 기능한다.
- [0047] 미용액에 포함되는 가용화제로는 글리세린지방산에스테르, 폴리글리세린지방산에스테르, 솔비탄지방산에스테르, 및 모노스테아린산프로필렌 글리콜 등의 프로필렌글리콜지방산에스테르류, 글리세린, 디글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 1, 3-부틸렌글리콜 등의 다가 알코올 등을 들 수 있다. 한편, 가용화제는 글리세린 또는 디글리세린을 사용하는 것과, 맛사지에 있어서 온열 효과를 높이므로 바람직하다.
- [0048] 미용액에 포함되는 물로는 증류수, 및 탈이온수를 들 수 있다. 기타 약제로는 살균제, 방부제, 비타민류, 식물로부터의 천연 엑기스, 색소, 향료 등을 들 수 있다. 미용액을 구성하는 각 성분의 양은 공지 성분량을 채용할 수 있다.
- [0049] 예를 들면, 미용액 전체량을 100 중량%로 했을 경우에, 본 발명의 유효성분을 1 ~ 20 중량%, 또는 1 ~ 10 중량%, 또는 1 ~ 5 중량% 정도 포함하면 된다. 또한, 유제 65 ~ 90 중량%, 가용화제 1 ~ 10 중량%, 보습제 1 ~ 30 중량%, 기타 약제 0 ~ 10 중량% 정도, 및 나머지는 물을 들 수 있다. 미용액은 공지 제조 방법에 따라 제조하면 된다.
- [0050] "팩 화장료"는 피부의 보습, 혈행 촉진, 청정을 목적으로, 대상 부위에 도포하는 것이다. 팩 화장료에는 일반적으로, 젤리상, 페이스트상, 분말상, 크림상 액상 등을 들 수 있으며, 안면에 도포하여 피막을 형성시킨 후 박리하는 것이나, 도포 후에 닦아내는 것, 도포 후 씻어내는 것 등이 있다. 분말상의 것은 사용시에 물 등에 균일하게 녹이든지 현탁해서 사용한다. 또한, 아이마스크 등의 형상의 부직포나 콜라겐 시트에 화장료를 함침시킨 팩 화장료나 상기 부직포 등을 사용시에 화장료에 침지해 이용하는 팩 화장료 등이어도 된다.
- [0051] 팩 화장료는 본 발명의 유효성분을 1 ~ 20 중량%, 또는 1 ~ 10 중량%, 또는 1 ~ 5 중량%, 가장 바람직하게는 2 ~ 3 중량% 정도 포함할 수 있다. 기타 조성은 팩 화장료에 이용되는 공지 조성으로 하면 되고, 공지 제조 방법

에 따라 제조하면 된다.

[0052] 그러나, 상기 설명에 제한받지 않고, 상기의 화장품 제형은 각각이 통상 이용되는 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0053] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1 : 케라틴의 추출 및 확인

[0055] 사람의 머리카락을 약한 세제를 이용해서 깨끗하게 세척한 후 3차 증류수로 여러 번 세정했다. 머리카락에 함유되어 있는 지방성분을 제거하기 위해, 머리카락 샘플을 비이커에 담고, 클로로포름과 메탄올을 2:1의 비율로 섞은 혼합액에 머리카락이 잠기도록 넣었다. 24시간 반응시킨 후 머리카락을 3차 증류수로 여러 번 세척하여 잔류하고 있는 클로로포름과 메탄올 혼합액을 완전히 제거한 후, 머리카락을 상온에서 건조시켰다.

[0056] 2% 과초산(peracetic acid, Sigma제품) 800ml에 20g의 머리카락을 넣고 37℃에서 12시간 동안 300rpm의 속도로 교반하며 반응시켰다. 12시간 반응 후, 머리카락을 체에 걸르고 증류수로 여러 번 세척하여 남아있는 과초산을 제거하였다. 그런 다음 머리카락 샘플을 400ml의 신다이 용액 [5% 2-메르캅토에탄올(Sigma), 5M 우레아(Sigma), 2.6M 티오우레아(Sigma) 및 25mM 트리스-HCl (pH 8.5)]에 넣고, 50℃, 400rpm의 조건에서 72시간 동안 반응시켰다.

[0057] 녹여진 머리카락 용액은 50ml 튜브에 넣고 3500rpm으로 20분 동안 원심분리했다. 모아진 상등액은 12-14kDa 컷 오프 스펙트라/프로4 투석막(Spectrum)을 이용해서 투석하였다. 투석이 끝난 후 얻어진 케라틴 단백질은 동결 건조를 통해 파우더 상태로 만들어 보관하였다.

[0058] 추출에 의해 얻어진 사람 머리카락 유래의 케라틴 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 약 50kDa(모노머)의 분자량을 가진 α-케라틴이 주성분인 것으로 분석되었다(도 1).

[0059] 실시예 2 : 케라틴과 EGCG 복합체의 제조 및 확인

[0060] PBS에 2% (w/v)의 농도로 녹인 케라틴 용액에 농도 0.1 - 5.0 mM 농도의 EGCG를 첨가하고, 24시간 동안 상온에서 교반하면서 반응시켰다. 24시간 반응 후, EGCG-케라틴 용액을 12-14 kDa 컷오프 투석막에 넣어 투석을 수행하여 EGCG가 결합된 EGCG-케라틴 복합체를 추출하였다. 투석이 끝난 후 동결 건조를 통해 파우더 형태로 보관하였다.

[0061] EGCG-케라틴 복합체의 형성은 ¹H-NMR 분석을 통해 확인하였다. ¹H-NMR 분석 결과, 케라틴과 EGCG 간의 수소 결합에 의한 EGCG에 존재하는 프로톤의 가리움 효과(shielding effect)를 확인하였다(도 2a). 또한, EGCG-케라틴 복합체를 SDS-PAGE를 통해 분석한 결과, 케라틴 단독일 때의 상태와 마찬가지로 약 50kDa(모노머)의 분자량을 가진 α-케라틴이 주성분인 것으로 분석되었으며(도 2b), EGCG의 처리에 의한 케라틴 분자의 분해나 변형은 없는 것으로 확인되었다.

[0062] 실시예 3 : EGCG-케라틴 복합체의 세포독성 시험

[0063] 48 웰 플레이트에 NIT 3T3 섬유아세포(fibroblast)를 1x10⁴개의 농도로 접종하고 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배양배지에서 24시간 동안 배양하여 안정화시켰다. 24시간 후에 5 mg/ml 또는 10 mg/ml 농도로 케라틴을 처리하였다. 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 배양 후, 배양배지를 흡인(aspiration)하고 DPBS로 세척한 후, 각각의 웰에 500μl의 기본 배지(basal media)로 10배 희석된 세포 계수 키트-8 솔루션(Dojindo laboratory)을 첨가하고, 알루미늄 호일로 빛을 차단한 후, 37℃ 1시간 30분 동안 배양하였다. 각각의 웰에서 30분 동안 반응시킨 200μl 용액을 96웰 플레이트에 옮긴 후 96웰 포맷 플레이트 리더(ELX 800 universal microplate REader, Bio Tek, Inc.) 기기를 이용하여 파장 450nm (O.D 450nm)에서 흡광도를 측정하였다.

[0064] 그 결과, EGCG-케라틴 복합체는 5mg/ml 및 10mg/ml의 농도에서 어떠한 독성도 관찰되지 않았다(도 3).

[0065] 실시예 4 : EGCG-케라틴 복합체의 항산화능 시험

[0066] 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산) (ABTS) 라디칼 양이온 소거능은 디암모늄염(ABTS)과 과황화칼륨(Potassium persulfate)과의 반응으로 ABTS 라디칼이 생성되면 특유의 색인 청록색을 띄게 되는데, 항산화효과가 있는 시료를 첨가함에 따라 연한 녹색으로 탈색(decolorization)되는 것을 측정하는 방법이다.

[0067] ABTS 라디칼을 이용한 항산화능 측정 시험은 7 mM 2,2'-아지노-bis(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)과 2.4 mM 과황화칼륨을 혼합하여 사용 전 16시간 동안 빛을 차단하고 실온에서 반응시켰다. 반응 후 ABTS 1ml(in PBS, pH 7.4)에 미처리된 케라틴과 EGCG-케라틴 복합체(in PBS, pH 7.4) 10 μ l를 첨가하여 반응시킨 후 10분 뒤 원심분리하여 상층액만 취득하여 734nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0068] 미처리된 케라틴과 EGCG-케라틴 복합체는 각각 0.25%(w/v) 내지 1.5%(w/v) 농도의 용액으로 첨가하여 실험하였다. 측정 결과, EGCG-케라틴 복합체의 경우 0.5%의 농도에서 50%의 라디칼 제거(scavenging) 효과를 나타내었으며, 그 이후의 농도에서는 거의 100%에 가까운 효과를 나타냈다. EGCG와 복합체를 이루지 않은 미처리된 케라틴의 경우, 농도에 상관없이 라디칼 제거 효과를 거의 나타내지 않았다(도 4). 이로부터 EGCG-케라틴 복합체가 항산화능(free radical scavenging activity or antioxidation activity)이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

[0069] 실시예 5 : EGCG-케라틴 복합체의 피부 각질세포 활성 및 성장에 대한 효과 시험

[0070] 사람 피부 각질세포(Human Keratinocyte: HACAT 세포주)의 활성 및 성장에 대한 EGCG-케라틴 복합체의 영향을 분석하기 위해, 각질세포의 배양시 배양액에 케라틴과 EGCG-케라틴 복합체를 각각 처리하였으며, 또한 화장품의 원료로 널리 사용되는 타입 I 콜라겐을 처리하여 세포의 활성 및 성장을 비교하였다.

[0071] EGCG-케라틴 복합체의 세포활성 분석(Live & Dead Assay)은 다음과 같이 수행하였다. 4웰 플레이트에 사람 각질세포(Keratinocyte, HACAT 세포주)와 사람 진피 섬유아세포(Dermal Fibroblast cell)를 1x10⁴ cells/ml로 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배양배지에서 24시간 동안 배양하여 안정화시켰다.

[0072] 24시간 안정화 후, 0.5%(w/v: in culture medium)의 농도로 케라틴, 타입 I 콜라겐, EGCG-케라틴 복합체(EhhKC)를 각각 처리하였다. 배양 후, HACAT 세포는 1일째와 3일째가 되었을 때, Live/Dead viability kit (Invitrogen)를 사용하여 생사 분석을 수행하였다. DPBS 1ml에 0.5 μ l의 칼세인(Calcein) AM과 2.0 μ l의 에티뮴 호모다이어머(Ethidium Homodimer)를 넣어 섞어 준 후, 배지(medium)를 제거하고 DPBS로 세척한 각각의 웰에 200 μ l씩 넣어줬다. 알루미늄 호일로 빛을 차단한 후 37℃에서 10분 동안 반응시킨 후 DPBS로 세척해 주고, 형광현미경(Olympus BX51)으로 관찰하였다. 그 결과는 도 5와 같다.

[0073] EGCG-케라틴 복합체의 세포증식 분석(Proliferation Assay)은 다음과 같이 수행하였다. 48웰 플레이트에 각각의 웰에 0, 500, 1000, 5000, 10000, 30000, 50000개의 농도로 사람 진피 섬유아세포 또는 HACAT 세포를 접종하고 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배양배지에서 24시간 동안 배양하여 안정화시켰다. 24시간의 안정화 후, 세포 계수 키트-8 솔루션을 이용하여 파장 450nm(O.D 450nm)에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값으로 세포 계수를 위한 표준 곡선(standard curve)를 만들었다.

[0074] 48웰 플레이트의 각각의 웰에 사람 진피 섬유아세포 또는 HACAT 세포를 2x10⁴ cells/ml를 접종하고 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배양배지에서 24시간 동안 배양하여 안정화시켰다. 24시간의 안정화 후, 5mg/ml의 농도로 케라틴, 타입 I 콜라겐, EGCG-케라틴 복합체(EhhKC)를 각각 처리하였다. 배양 후, 1일, 2일, 4일, 6일이 되었을 때 세포 계수 키트-8 솔루션(CCK solution)을 이용하여 앞에서와 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값의 평균은 표준 곡선에 대입하여 세포 계수를 실시하였다. 그 결과는 도 6과 같다.

[0075] 측정 결과, 미처리된 케라틴(Natural keratin), 콜라겐, EGCG-케라틴 복합체 처리군에 있어서 세포의 활성(Cell viability) 및 성장(Cell Proliferation)에는 차이가 없었으며 모두 세포의 활성 및 성장이 잘 유지되었다(도 5 및 도 6). 하지만 EGCG-케라틴 복합체 처리시 각질세포의 경우 세포의 형태변화(from epithelial morphology to mesenchymal(fibroblastic) morphology)가 관찰되었다.

[0076] 실시예 6 : EGCG-케라틴 복합체에 의한 피부 각질세포 이동과 관련된 분자발현 분석

- [0077] EGCG-케라틴 복합체의 처리시 상피 세포 계열인 사람피부 각질세포(Human Keratinocyte: HACAT 세포주)의 섬유모세포의 모양으로의 형태변화를 분석하기 위해 EMT(Epithelial-Mesenchyme transition)시 특징인 E-카데린(E-cadherin) 및 비멘틴(vimentin)의 발현을 면역화학적 염색을 통해 분석하였다. 분석은 다음과 같이 수행하였다.
- [0078] 타입 I 콜라겐 및 EGCG-케라틴 복합체(EhhKC)를 처리하거나 처리하지 않은 HACAT 세포 및 사람 진피 섬유아세포를 일정기간 배양 후, 배양배지를 제거하고 DPBS로 세척한 후, 4% 파라포름알데시드(Sigma)를 넣고 30분 동안 실온에서 고정시켰다. 고정 후 DPBS로 3번 세척하고, 0.1% 트리톤-X-100 (Sigma)를 넣고, 45분 동안 실온에서 배양한 후 DPBS로 3번 세척하였다. 단백질을 블록 버퍼(DPB-125, Spring Bioscience)를 넣고 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 1차 항체(Primary antibody)로는 안티-베타 1 인테그린(Santa Cruz Biotechnology), E-카데린(Cell signaling), 비멘틴(Abcam)이 사용되었으며, 각각의 1차 항체를 항체 희석제(Abcam)로 1:200으로 희석하여 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 24시간 반응 후, DPBS로 3번 세척하였다.
- [0079] 2차 항체(Secondary antibody)로는 Alexa Fluor 594 항-마우스 IgG (Invitrogen), Alexa Fluor 488 항-랫비트 IgG (Invitrogen)을 항체 희석제(Abcam)로 1:1000의 비율로 희석하여 사용하였으며, 실온에서 1~2시간동안 반응시켰다. 1차 및 2차 항체를 반응시킨 후, DPBS로 3번 세척하고 세포의 핵을 염색하기 위해서 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI, Sigma)를 사용하였다. 염색된 세포를 형광현미경(Olympus BX51)으로 관찰하였다. 그 결과는 도 7과 같다.
- [0080] 그 결과 케라틴(Natural keratin)을 처리했을 경우 정상 각질세포에서 발현되는 E-카데린이 잘 발현되었으나, EGCG-케라틴 복합체의 처리시 섬유모세포의 형태로 변화는 각질세포는 E-카데린의 발현이 관찰되지 않았으며, 이와 더불어 케라틴(Natural keratin)을 처리했을 경우 정상 각질세포에서 발현되지 않는 비멘틴이 EGCG-케라틴 복합체의 처리시 섬유모세포의 형태로 변화는 각질세포는 발현이 고도로 상향조절(upregulation)되는 현상을 관찰하였다.
- [0081] 이러한 E-카데린(E-cadherin) 하향조절과 비멘틴(Vimentin) 상향조절 현상은 각질세포의 이동(migration)시 수반되는 EMT시 일어나는 현상으로 알려져 있으며, 각질세포 이동 및 EMT를 효과적으로 유도하며 화장품의 원료중 하나인 성장인자로 알려진 EGF(Epithelial Growth Factor)를 처리한 결과와 비슷한 현상이 일어남을 확인하였다. 특히, EGCG-케라틴 복합체를 처리한 경우 EGF를 처리한 경우보다 효과가 더 뛰어남을 확인할 수 있었다.
- [0082] **실시예 7 : EGCG-케라틴 복합체의 피부 각질세포의 이동에 대한 효과 분석**
- [0083] EGCG-케라틴 복합체 처리에 의한 각질세포의 형태변화 및 EMT와 연관된 비멘틴 분자의 상향조절(upregulation)과 E-카데린의 하향조절(downregulation)에 기인하여 EGCG-케라틴 복합체의 각질세포 이동을 분석하였다. 분석은 다음과 같이 수행하였다.
- [0084] 세포의 증식에 의한 이동 가능성을 배제하기 위해 우선 HACAT 세포에 미토마이신 C(Sigma)를 10 µg/ml의 농도로 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배양배지에 섞어 1시간 동안 처리하여 증식을 하지 않는 HACAT 세포를 준비하였다.
- [0085] 4개의 배양 삽입 플레이트(ibidi)에 미토마이신 C를 처리한 HACAT 세포 또는 처리하지 않은 HACAT 세포를 각각의 웰에 7×10^5 cells/ml로 접종하고, 최종 부피가 70 µl가 되도록 배양배지를 넣어주었다. 24시간 후에 배양배지를 제거한 후, Culture Insert를 살균된 집게(sterile tweezer)를 이용해 조심스럽게 떼어냈다. 미토마이신 C를 처리하거나 처리하지 않은 HACAT 세포가 접종된 각각 1개의 플레이트에는 보통 배지(Normal media)를 넣어주고, 나머지 두 개의 플레이트에는 0.5%(w/v) EGCG-케라틴 복합체(EhhKC)가 함유된 배지를 넣어주어 배양하였다. 37℃에서 24시간 배양 후에 이동 정도를 확인하였다. 그 결과는 도 8과 같다.
- [0086] 그 결과 EGCG-케라틴 복합체를 처리한 각질세포 배양에서는 방추형(spindle shape)으로 형태적 변화를 나타내며 비멘틴(Vimentin)을 발현하며 이동(migration)을 하는 세포들을 관찰할 수 있었다. 대조군인 미처리된 각질세포군에서는 이러한 현상이 관찰되지 않았다.
- [0087] **실시예 8 : EGCG-케라틴 복합체의 피부 각질세포 활성화 및 성장에 대한 효과 분석**
- [0088] RT-PCR을 통해 EGCG-케라틴 복합체 처리에 의한 세포의 mRNA 발현을 분석하였다. 분석은 다음과 같이 수행하였

다.

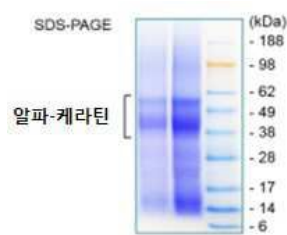
- [0089] 0.5%(w/v) EGCG-케라틴 복합체(EhhKC)를 함유하거나 함유하지 않은 배양배지에서 일정기간 배양한 HACAT 세포로부터 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, CA, USA)을 이용하여 총 RNA를 분리했다. 분리한 RNA 1μg로부터 AccuPower CycleScript RT Premix (Bioneer, Daejeon, Korea) 키트를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 또한 합성된 cDNA와 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 각질세포의 이동과 EMT(epithelial-mesenchyme transition)와 연관된 유전자 발현(gene expression)을 분석하였다.
- [0090] RT-PCR에 사용된 프라이머는 다음과 같다: ITGaV = 5'-GTT GGG AGA TTA GAC AGA GGA-3' (sense), 5'-CAA AAC AGC CAG TAG CAA CAA-3' (antisense), ITGb1 = 5' -TGT TCA GTG CAG AGC CTT CA-3' (sense), 5'-CCT CAT ACT TCG GAT TGA CC-3' (antisense), ITGb6 = 5'-GAA GGG TTG CCC TCC CAG-3' (sense), 5'-GAA GGG TTG CCC TCC AGA-3' (antisense), ITGa5 = 5'-CAT TTC CGA GTC TGG GCC AA -3' (sense), 5'-TGG AGG CTT GAG CTG AGC TT -3' (antisense), GAPDH = 5'-ACT TTG TCA AGC TCA TTT CC -3' (sense), 5'-TGC AGC GAA CTT TAT TGA TG -3' (antisense).
- [0091] PCR 증폭은 94℃에서 5분간의 변성 단계 후에, 94℃에서 30초간, 56~60℃에서 1분간, 그리고 72℃에서 1분간의 조건을 1 사이클로 세팅하였으며 총 30 사이클을 수행하였다. PCR 증폭후 나온 샘플은 1.5% 아가로오즈 겔 매트릭스를 이용하여 구동(running)되었으며 브롬화 에티듐(ethidium bromide)으로 최종 DNA 밴드를 염색하였다.
- [0092] 염색된 DNA 밴드의 강도(intensity)를 측정하고 이미지 J 프로그램을 이용하여 GAPDH의 발현정도에 대한 상대적인 타겟 유전자(target gene)들의 강도(intensity)를 측정하였다. 그 결과는 도 9와 같다.
- [0093] EGCG-케라틴 복합체 처리에 의한 각질세포의 EMT 및 이동과 연관된 세포 부착 분자(cell adhesion molecule)인 인테그린(integrin)의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과, EGCG-케라틴 복합체를 처리한 각질세포의 경우 세포의 이동시 주로 발현되는 인테그린 알파 V(ITGaV)와 5(ITGa5)가 고도로 상향조절(highly upregulation)되는 것을 관찰하였다.
- [0094] **실시예 9 : EGCG-케라틴 복합체의 피부 섬유아세포 활성화 및 성장에 대한 효과 분석**
- [0095] 각질세포와 더불어 사람 피부의 섬유아세포(Human Dermal Fibroblast)의 활성화 및 성장에 대한 EGCG-케라틴 복합체의 영향을 분석하기 위해, 세포활성 분석(Live & Dead Assay) 및 세포증식 분석(Proliferation Assay)을 수행하였다.
- [0096] 세포활성 분석(Live & Dead Assay) 및 세포증식 분석(Proliferation Assay)의 구체적인 방법은 상기 실시예 5와 같다. 단, 세포활성 분석(Live & Dead Assay)의 경우, 2일째와 4일째가 되었을 때, Live/Dead viability kit (Invitrogen)를 사용하여 생사 분석을 수행하였다. 세포활성 분석(Live & Dead Assay) 및 세포증식 분석(Proliferation Assay)의 결과는 각각 도 10, 도 11과 같다.
- [0097] 측정 결과, 미처리된 케라틴(Natural keratin), 콜라겐, EGCG-케라틴 복합체 처리군에 있어서 세포의 활성(Cell viability) 및 성장(Cell Proliferation)에는 큰 차이가 없었으며 전반적으로 세포의 활성 및 성장이 잘 유지되었다(도 10 및 도 11). 하지만 EGCG-케라틴 복합체 처리한 섬유아세포(Human Dermal Fibroblast)의 경우 세포의 크기가 상당히 커지며 더욱 건강한 것이 관찰되었다.
- [0098] **실시예 10: EGCG-케라틴 복합체에 의한 피부 섬유아세포의 크기 증가 및 텐션과 관련된 분자발현 분석**
- [0099] EGCG-케라틴 복합체의 처리시 크기가 커지는 섬유아세포(Human Dermal Fibroblast)의 세포내 액틴 필라멘트(actin filament)의 배열 및 발현을 분석하기 위해 섬유아세포의 대표적인 세포골격(cytoskeleton)인 비멘틴(vimentin)의 발현과 인테그린 베타1(integrin beta1)의 발현을 면역화학적 염색을 통해 분석하였다. 분석의 구체적인 방법은 상기 실시예 6과 같다. 그 결과는 도 12, 도 13과 같다.
- [0100] 미처리된 케라틴(Natural keratin) 또는 콜라겐을 처리했을 경우는 두 그룹사이에 섬유아세포(Human Dermal Fibroblast)의 형태 및 비멘틴의 발현 및 조직(organization)에 큰 차이가 없으나, EGCG-케라틴 복합체를 처리한 섬유아세포(Human Dermal Fibroblast)의 경우 세포의 사이즈가 크게 증가하며 세포의 텐션(tension)과 연관된 비멘틴의 발현 및 조직(organization)이 크게 증가되었으며, 또한 스프레딩된 세포의 형태를 따라 인테그린 베타1의 발현이 증가되어 있음을 관찰하였다(도 12).

[0101] 특이한 점은 EGCG-케라틴 복합체의 처리시 섬유아세포(Human Dermal Fibroblast) 크기 증가 현상은 EGCG-케라틴 복합체의 처리시에만 관찰되었다. 일정기간의 EGCG-케라틴 복합체가 함유된 배양배지에서 배양후 EGCG-케라틴 복합체가 함유되지 않은 보통 배지(normal medium)에 배양할 경우, 세포의 크기가 다시 원상태로 작아지는 현상을 관찰했으며, 세포의 활성이 잘 유지되어 있음을 관찰하였다(도 13).

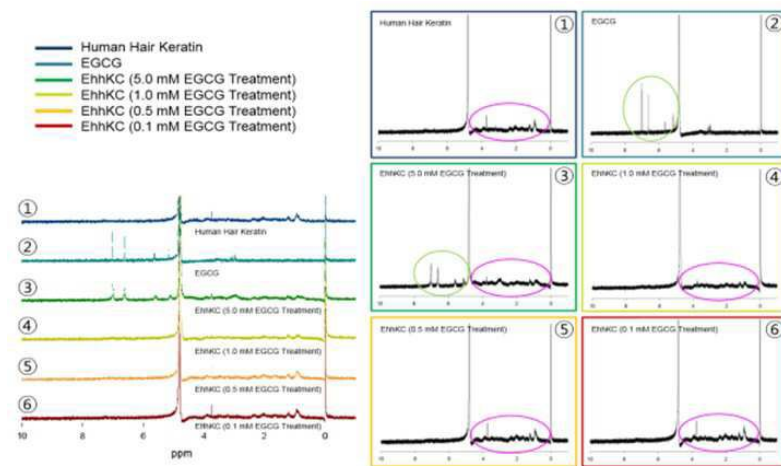
[0102] 이상의 실시예에서 나타난 바와 같이, 케라틴과 EGCG의 복합체는, 세포 독성이 없어 인체에 안전하고, 또한 피부의 주요 세포인 각질세포의 이동 등을 촉진시키고 또한 피부내 섬유아세포의 탄생 및 활성을 향상시킴으로써 피부 재생에 현저한 효과가 있음을 알 수 있다.

도면

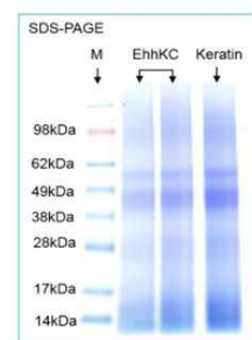
도면1



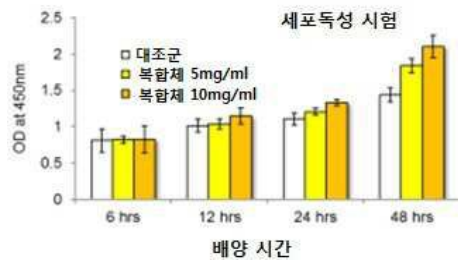
도면2a



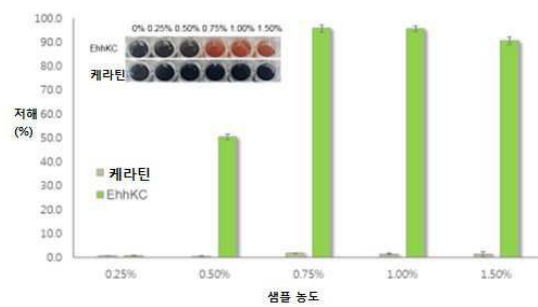
도면2b



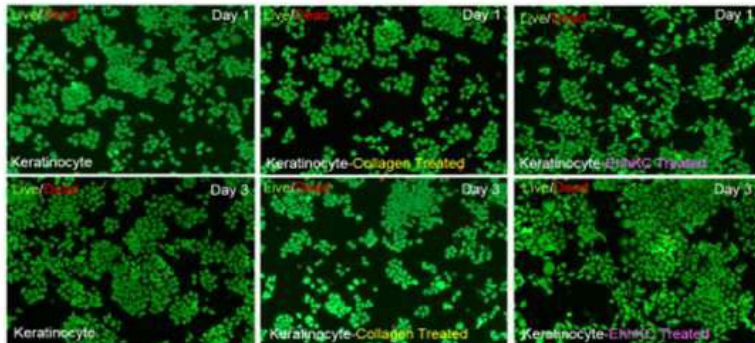
도면3



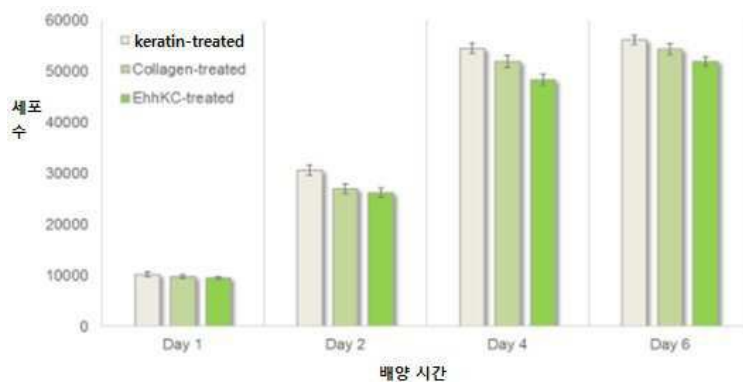
도면4



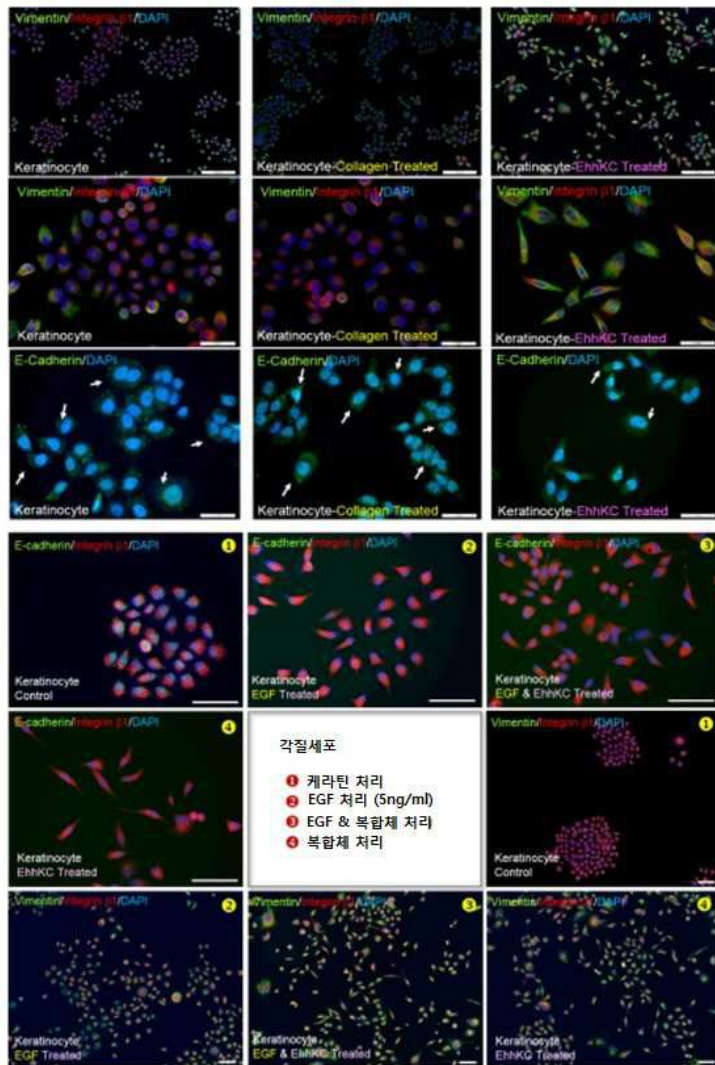
도면5



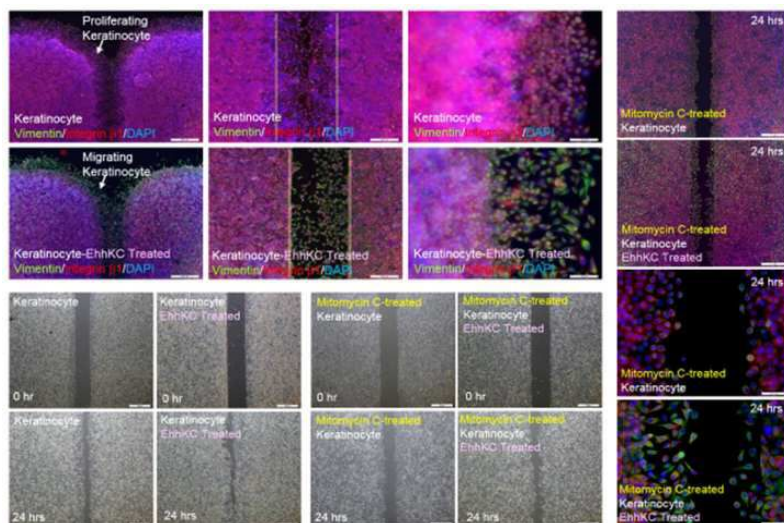
도면6



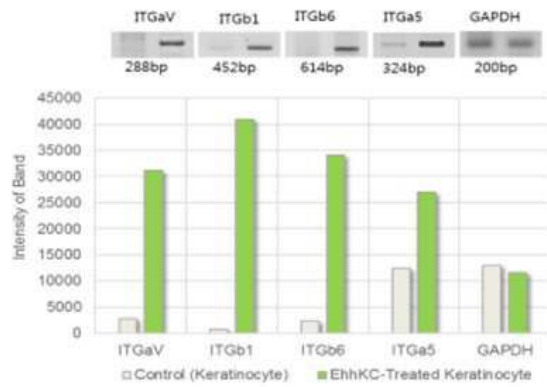
도면7



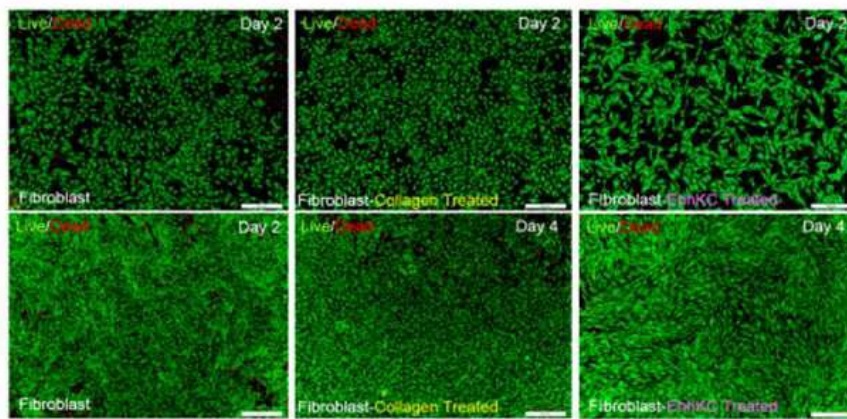
도면8



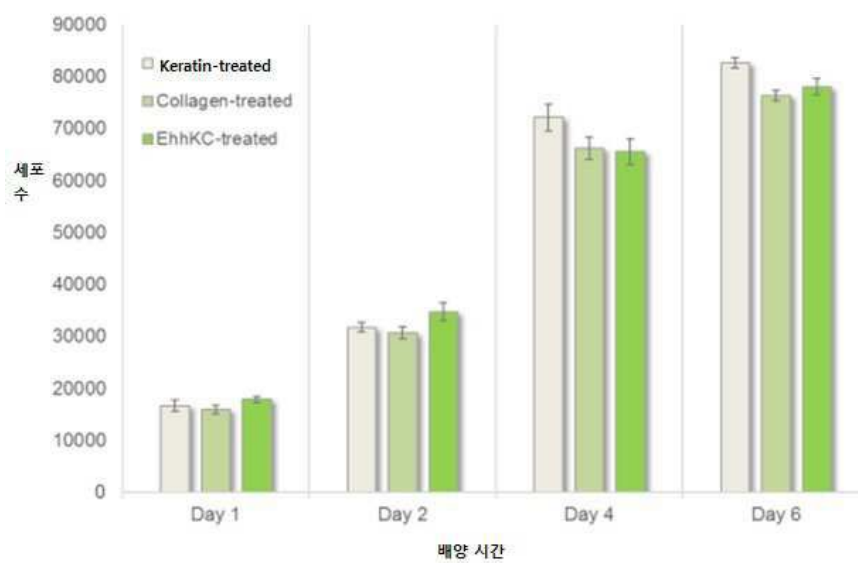
도면9



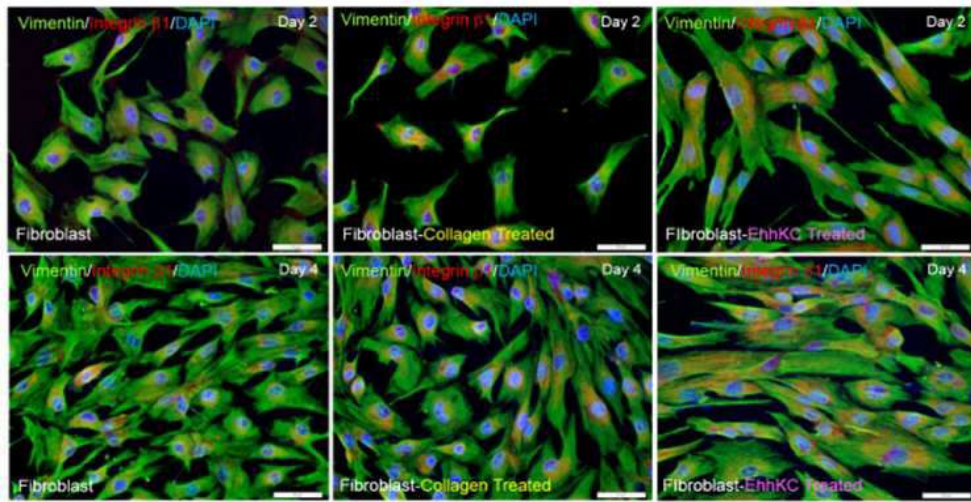
도면10



도면11



도면12



도면13

