



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월11일
 (11) 등록번호 10-1663809
 (24) 등록일자 2016년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 8/49 (2006.01) A61K 31/409 (2006.01)
 A61P 17/00 (2006.01) A61Q 17/04 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0067083
 (22) 출원일자 2014년06월02일
 심사청구일자 2014년06월02일
 (65) 공개번호 10-2015-0139128
 (43) 공개일자 2015년12월11일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020090093448 A*
 WO1999026589 A2*
 JP2009091349 A*
 KR1020140047247 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 광주과학기술원
 광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동)
 (72) 발명자
 김용철
 광주광역시 북구 첨단과기로 123 B동 302호 (오룡동, 광주과학기술원)
 한정현
 광주광역시 남구 제중로 11 108동 706호 (양림동, 휴먼시아1차아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 양부현

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **클로로필 a 또는 페오포르비드 a를 포함하는 피부 상태 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 클로로필 a 또는 페오포르비드 a를 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따르면, 클로로필 a 또는 페오포르비드 a는 자외선으로 인한 피부 주름 개선 및 염증 반응 완화 효과를 나타낸다. 본 발명의 조성물은 경구 투여하는 것을 특징으로 하며, 화장료 조성물, 약제학적 조성물 또는 식품 조성물로 제공될 수 있다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

유현

충청북도 청주시 청원구 내수읍 내수로 639 108동
604호 (내수리, 삼일아파트)

김민정

부산광역시 사하구 제석로 126 908호 (당리동, 혜
성4차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NN11700

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업(기본)

연구과제명 급성 골수성 백혈병 치료를 위한 경구용 FLT3 저해제의 개발에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 광주과학기술원

연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

페오포르비드 a(Pheophorbide a)를 유효성분으로 포함하는 일광화상(sunburn) 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 페오포르비드 a는 경구로 투여하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 유효성분은 MMP-1 (matrix metalloproteinase- 1) 및 MMP-3를 억제하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

페오포르비드 a(Pheophorbide a)를 유효성분으로 포함하는 일광화상(sunburn) 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

페오포르비드 a(Pheophorbide a)를 유효성분으로 포함하는 일광화상(sunburn) 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 클로로필 a 또는 페오포르비드 a를 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 주름, 처짐 및 이완은 자외선(UV), 적외선 및 호르몬의 변화와 같은 환경적 요인과 유전적 요인 등 여러 가지 측면에 의한 피부 노화의 특징이다 [1,2]. 노화된 피부의 구조적 특징은 주로 진피(dermis)의 변화에 의해 설명되는데, 진피는 콜라겐(collagen), 히알루론산(hyaluronic acid), 엘라스틴(elastin), 피브로넥틴(fibronectin), 프로테오글리칸(proteoglycan) 및 다른 세포외기질 단백질(extracellular matrix protein)로 구성되어 있다. 이러한 구조적인 구성 요소 중, 주로 섬유아세포(fibroblast)에 의해 합성되는 제 1형 콜라겐은 피부의 결합 조직에서 가장 풍부한 단백질로서 피부에 강도와 탄력성을 지원하는 역할을 한다[3].

[0003] 자외선에 지속적으로 노출되는 것은 조기 피부노화나 광노화의 주요한 원인이 된다[23]. 광노화는 자외선으로 인한 반복적인 염증과정에 의한 것으로 설명될 수 있다. 피부 염증은 다양한 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase, MMP)를 생산해내는데, 이는 진피 및 표피 에서 비정상적으로 세포 외 기질을 분해하고 기능을 상실한 매트릭스 구성요소들의 축적을 일으킨다[24]. 매트릭스 분해와 피부 염증 등에 의해 누적된 피부 손상은 과도한 MMP 생성을 야기하고 이는 주름의 형성과 관계된다.

[0004] 여러 화합물 및 식물 추출물이 피부에서 염증 억제 및 주름 개선 효과를 가지고 있는 것으로 보고되었다. 동물모델(털이 없는 마우스)에서 비타민 C, E, 피크노제놀 및 달맞이꽃 오일(evening primrose oil) 복합체를 경구 투여하는 경우, 지속적인 UV 노출에 의해 생긴 주름을 완화시키는 효과가 있다는 것이 밝혀졌다[27]. 인삼 성분, 엘라그산(ellagic acid) 및 녹차의 폴리페놀(polyphenol) 역시 UV에 의한 피부 노화를 개선시키는 효과가 있다는 것이 보고되었다[28, 29, 30]. 대부분의 폴리페놀의 주름개선 효과는 항산화작용과 관계가 있으며 [30], 주름개선 효과를 나타내는 작용기작은 MMP의 생산 억제와 관계있는 것으로 설명되고 있다.

[0005] 본 발명에서, 본 발명자들은 클로로필 a(Chlorophyll a) 및 페오포르비드 a(Pheophorbide a)가 자외선으로 인한 피부 염증 완화 및 주름개선에 효과가 있음을 발견하였다. 또한, 페오포르비드 a가 자외선에 의해 유도되는 MMP의 생산을 억제하는 효과를 나타냄을 발견하였다. 이러한 연구결과는 클로로필 a 및 페오포르비드 a가 피부 상태 개선용 물질로 사용될 수 있음을 보여주는 것이다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 자외선과 같은 외부 자극에 의한 피부 손상을 효과적으로 개선할 수 있는 물질을 개발하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 클로로필 a 및 페오포르비드 a가 피부 주름 개선 및 피부 염증 완화 등과 같은 피부 상태 개선에 매우 효과적이라는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 피부 상태 개선용 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 클로로필 a 또는 페오포르비드 a를 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 클로로필 a 또는 페오포르비드 a를 유효성분으로 포함하는 자외선에 의한 피부 손상 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 클로로필 a 또는 페오포르비드 a를 유효성분으로 포함하는 일광화상(sunburn) 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

- [0013] 본 발명자들은 자외선과 같은 외부 자극에 의한 피부 손상 상태를 효과적으로 개선할 수 있는 물질을 개발하고 자 연구 노력하였고, 그 결과 클로로필 a 및 페오포르비드 a가 피부 주름 개선 및 피부 염증 완화 등과 같은 피부 상태 개선에 매우 효과적이라는 것을 확인하였다.
- [0014] 클로로필(Chlorophyll)은 식물에서 가장 풍부한 성분으로서, 일반적으로 고등식물에 3:1 내지 3:2의 비율로 a, b형이 존재한다. 전통적으로, 식물의 클로로필은 항-염증 효과를 통해 상처, 화상 및 궤양 등 부상의 관리에 사용되었으며[4], 건강증진을 위한 건강식품으로도 사용되었다[5]. 이 외에도 클로로필을 포함하는 식물 추출물의 화장료 조성물은 피부 손상 관리를 위해 사용되고 있기도 하다[6].
- [0015] 클로로필은 여러 종류의 파생물을 생성해내는데, 여기에는 페오피틴(pheophytin), 페오포르비드(pheophorbide), 클로린(chlorin) 및 피탄산(phytanic acid)이 포함된다. 기존 연구자들은 클로로필, 페오피틴 및 페오포르비드를 포함하는 클로로필 파생물이 잠재적인 화학적 암 예방기능을 가지고 있음을 밝혀내었다[7,8]. 또한, 통조림된 녹색 야채에 공통적으로 포함되어 있는 페오피틴, 파이로페오피틴(pyropheophytin) 및 페오포르비드 파생물이 잠재적인 종양억제효과를 가지고 있다는 것을 밝혀내기도 하였다[9,10]. 페오포르비드는 암에 대한 광역학치료에 사용되는 광독성(phototoxic) 물질로도 알려져 있다[11]. 그러나 페오포르비드 또는 클로로필이 피부 주름 개선에 어떠한 효과를 가지고 있는지는 아직 충분히 밝혀지지 않고 있다.
- [0016] 본 명세서에서의 피부 상태 개선은 피부 주름 개선, 피부 염증 완화 또는 피부 노화 방지를 의미하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 피부 주름은 햇빛을 포함하여 여러 가지 요인에 의해서 진피 속의 콜라겐섬유, 탄력섬유 등에 변성이 일어나고, 피부 수분이 감소하여 피부의 탄력이 떨어져 피부가 접히게 되면서 만들어진다. 여러 가지 요인들 중에서 자외선이 가장 주요한 원인이다.
- [0018] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 마우스에 자외선(UV)을 조사한 후 클로로필 a 또는 페오포르비드 a를 경구 투여하면 주름이 개선되는 효과가 나타났다.
- [0019] 피부 염증반응에서는 면역세포의 활성이 중요한 역할을 한다. 활성화된 면역세포 또는 면역세포가 생산하는 사이토카인 등이 주변보조세포를 지속적으로 자극하여 세포의 과도한 활성화나 세포 사멸을 통한 조직의 파괴 등의 부작용을 유발시킴으로써 염증반응이 일어난다. 피부 염증 반응에서 접합분자(adhesion molecule)는 각 질세포(keratinocyte), 단핵백혈구(monocyte) 및 림프구(lymphocyte)간의 결합에서 중요한 역할을 하는데, 접합분자에는 Intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular adhesion molecules-1(VCAM-1), E-selection 등이 있다. 이와 같은 접합분자들이 다양한 면역관련 세포를 피부조직으로 침윤시킴으로써 피부세포와 면역세포간의 다양한 상호반응을 통하여 염증 반응이 일어나게 된다. 따라서, 이러한 접합분자들의 발현을 억제함으로써 피부 염증 반응을 완화시킬 수 있다.
- [0020] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 마우스에 자외선(UV)을 조사한 후 클로로필 a 또는 페오포르비드 a를 경구 투여한 경우, ICAM-1의 발현이 감소하였으며 진피에서 염증 세포의 침윤이 감소하였다. 이러한 결과는 클로로필 a 또는 페오포르비드 a가 자외선에 의한 피부 염증 반응을 완화시키는 효과가 있다는 것을 나타낸다.
- [0021] 피부노화는 노화에 미치는 요인에 따라 내인성 노화(intrinsic aging)와 외인성 노화(extrinsic aging)로 구분할 수 있다. 내인성 노화는 나이가 들어감에 따라 피부의 구조와 생리기능이 환경변화와는 무관하게 감퇴하는 것이고, 외인성 노화는 피부가 태양광선 등의 외부환경에 지속적으로 노출되기 때문에 나타나는 것이다. 특히, 광에 의한 노화를 광노화(photoaging)라고 하며 자외선은 피부 노화의 생리학적 및 형태학적 변화의 주된 원인이 된다. 자외선에 의하여 유해한 활성산소가 만들어진 후 몸속에 있는 여러 가지 보호 장치에 의하여 효과적으로 제거되지 못하게 되면 일련의 염증반응이 일어나 피부 손상이 초래된다.
- [0022] 본 발명의 클로로필 a 또는 페오포르비드 a는 자외선으로 인한 피부 주름 개선 및 피부 염증 완화 효과를 나타내는데, 이는 피부노화 중 광노화로 인한 피부 상태를 개선하는 효과를 가지고 있다는 것을 의미한다.
- [0023] 자외선(UV)에는 UVA(200-280nm), UVB(280-320nm), UVC(320-400nm)의 세 가지가 있는데, UVC는 오존층에 의해 거의 흡수되고, UVA와 UVB만이 지표에 도달하게 되고, 피부에 영향을 주게 된다. 특히 이 중에서 UVB는 UV 중 피부에 가장 심각한 손상을 초래한다. UVB는 진피 상부까지 도달하여 급속한 화상이나 홍반을 일으키고, 더욱 진행되면 멜라닌 색소 형성과 색소 침착이 일어나며, 상피 세포의 증식, DNA 손상 등을 야기하여 피부 주름 및 피부암을 유발하게 된다. 또한 피부 세포에 염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다.

- [0024] 상술한 바와 같이, 본 발명의 클로로필 a 또는 페오포르비드 a는 자외선으로 인한 피부 주름 개선 및 피부 염증 완화에 효과를 나타내는 바, 자외선에 의한 피부 손상 예방, 개선 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서의 일광화상(sunburn)의 주된 원인은 자외선으로서, 자외선이 피부에 도달하면 직접 혈관벽에 작용하기도 하고, 대부분은 피부세포에 흡수되어 히스타민, 프로스타글란딘 등의 염증물질이 분비되도록 자극하게 된다. 이 염증 물질은 혈관벽의 투과성을 증가시켜 염증세포가 혈관에서 피부조직으로 이동하게 한다. 즉, 자외선으로 인해 피부에 염증반응이 일어나서 홍반, 열감, 통증, 부종 등의 증상이 나타나게 된다. 따라서, 염증세포가 혈관에서 피부조직으로 침윤되는 것을 억제한다면, 피부 염증 반응을 억제하여 일광화상을 예방 또는 치료할 수 있게 된다.
- [0026] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 마우스에 자외선(UV)를 조사한 후 클로로필 a 또는 페오포르비드 a를 경구 투여한 경우, 진피에서 염증 세포의 침윤이 감소하였다.
- [0027] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 인간 피부 섬유아세포에서 UV 조사 후 페오포르비드 a를 처리하는 경우, MMP-1 및 MMP-3의 생산이 감소되었다.
- [0028] 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase, MMP)는 아연-의존적인 엔도펩티다아제이다. 이들은 모든 종류의 세포외기질을 분해할 수 있으며, 세포의 증식, 분화, 이동, 혈관생성 및 세포자살에서 중요한 역할을 하고 있다. 특히, 자외선은 피부에서 MMP의 생산을 증가시켜 콜라겐을 분해함으로써 주름이 형성되는 등의 피부 노화반응이 일어나게 한다. 즉, 자외선에 노출된 피부에서 MMP의 생산을 억제하게 되면 자외선에 의한 피부 손상을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0029] MMP-1은 정상적인 생리반응 뿐 아니라 질병의 진행과정에서도 세포외 기질을 분해하는데 관여하는 것으로 알려져 있으며 특히, 제 1, 2 및 3형 콜라겐을 분해하는 작용을 한다.
- [0030] MMP-3는 콜라겐 타입 II, III, IV, IX 및 X, 프로테오글리칸(proteoglycans), 파이브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin) 및 엘라스틴(elastin)을 분해하는 기능을 하며, 또한 MMP-1, MMP-7 및 MMP-9과 같은 다른 MMP를 활성화시키기도 한다. 따라서 MMP-3는 피부조직의 재구성에 있어 가장 주요한 인자로 여겨지고 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 경구용 피부 개선용 화장품 조성물로 제공될 수 있다. 본 발명의 화장품 조성물은 유효 성분으로서 상술한 클로로필 a 또는 페오포르비드 a 이외에 식품 조성물 또는 경구용 의약에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있으며, 또한 담체를 포함한다.
- [0032] 본 발명의 경구용 화장품 조성물에 포함되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 경구용 화장품 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 본 발명의 클로로필 a 또는 페오포르비드 a의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 본 명세서에서 용어 약제학적 유효량은 클로로필 a 또는 페오포르비드 a의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0035] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [0036] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구로 투여할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 조성물은 식품 조성물로 제공될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 본 발명의 클로로필 a 또는 페오포르비드 a의 식품학적 유효량; 및 (b) 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 식품학적 조성물이다.
- [0041] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 클로로필 a 또는 페오포르비드 a 뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 토복령 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0043] (a) 본 발명은 클로로필 a 또는 페오포르비드 a를 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물을 제공한다.
- [0044] (b) 본 발명에 따르면, 클로로필 a 또는 페오포르비드 a는 자외선에 의한 피부 주름을 개선하는 효과를 나타낸다.
- [0045] (c) 본 발명에 따르면, 클로로필 a 또는 페오포르비드 a는 자외선에 의한 염증 반응을 완화하는 효과를 나타낸다.
- [0046] (d) 본 발명의 조성물은 경구 투여하는 것을 특징으로 하며, 화장료 조성물, 약제학적 조성물 및 식품 조성물로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1a는 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 마우스의 등쪽 피부에서 주름이 감소된 것을 보여주는 사진이다.
- 도 1b는 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 마우스 집단에서 시각적인 주름 등급이 UV만을 조사한 집단에 비해 유의미하게 감소한 것을 보여주는 도표이다.
- 도 1c는 마우스에서 음성적인 복제물에 의해 나타나는 주름이다.
- 도 1d는 등쪽 피부의 주름 영역을 그림자 영역을 이용하여 계산한 도표이다.
- 도 2a는 페오포르비드 a를 투여한 마우스의 진피에서 UV만을 조사한 마우스에 비해 염증세포의 침윤이 감소한 것을 보여주는 사진이다.
- 도 2b는 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 마우스에서 표피의 두께가 유의미하게 감소하고 진피에서 콜라겐 번들이 더 두꺼워진 것을 보여주는 사진이다.
- 도 2c는 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 마우스에 UV만을 조사한 마우스에 비해 표피의 두께가 감소한 것을 보여주는 도표이다.

도 3a는 페오포르비드 a를 투여한 마우스의 진피에서 UV만을 조사한 마우스에 비해 염증세포의 침윤이 감소한 것을 보여주는 사진이다.

도 3b는 UV를 조사한 마우스의 진피 상부와 표피에서 vehicle만을 투여한 마우스에 비해 ICAM-1이 상당히 높게 발현되는 것을 보여주는 사진이다. 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 마우스에서는 UV를 조사한 마우스에 비해 ICAM-1의 발현이 감소하였다.

도 3c는 표피에서 염증세포의 침윤을 현광 현미경으로 관찰하여 계산한 결과, 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 마우스에서 UV를 조사한 마우스에 비해 염증 세포의 침윤이 감소한 것을 보여주는 도표이다.

도 4a는 hDF 세포에 UV를 조사하고 다양한 농도의 페오포르비드 a를 처리한 후, 세포생존율을 분석한 도표이다.

도 4b는 hDF 세포에 UV를 조사하고 다양한 농도의 페오포르비드 a를 처리한 후, MMP-1, 2, 3 단백질의 발현 레벨 변화를 웨스턴 블랏팅으로 분석한 사진이다.

도 4c는 hDF 세포에 UV를 조사하고 다양한 농도의 페오포르비드 a를 처리한 후, MMP-1의 mRNA 발현 레벨을 실시간 RT PCR로 분석한 도표이다.

도 4d는 hDF 세포에 UV를 조사하고 다양한 농도의 페오포르비드 a를 처리한 후, MMP-2의 mRNA 발현 레벨을 실시간 RT PCR로 분석한 도표이다.

도 4e는 hDF 세포에 UV를 조사하고 다양한 농도의 페오포르비드 a를 처리한 후, MMP-3의 mRNA 발현 레벨을 실시간 RT PCR로 분석한 도표이다.

도 5a는 hDF 세포에 UV를 조사하고 다양한 농도의 페오포르비드 a를 처리한 후, pJNK, JNK, pERK1/2 및 ERK1/2 단백질의 발현 레벨 변화를 웨스턴 블랏팅으로 분석한 사진이다.

도 5b는 hDF 세포에 페오포르비드 a를 처리하고 2 시간 동안 confocal 현미경으로 관찰하여 페오포르비드 a가 농도에 비례하여 세포질에 위치하는 것을 보여주는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049] **실시예**

[0050] **실험재료 및 실험방법**

[0051] **세포 배양**

[0052] 인간 피부 섬유아세포(primary human dermal fibroblast, hDF) 세포주는 전남대학교 의과대학 김성진 교수로부터 제공받았다. 세포배양은 5% 소태아 혈청(fetal bovine serum, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) 및 1% 페니실린(penicillin, 100 units/ml)/스트렙토마이신(streptomycin, 100mg/ml)을 첨가한 Dulbeccos Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 37, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0053] **UV 조사방법**

[0054] UV 소스로 발광 스펙트럼 280nm 및 380nm를 가지고 있는 Philips TL 20W/12 RS fluorescent sun lamp를 사용하였다. 피부표면에서의 UV 강도를 UV 측정기(GUVx-T1xGS5-LA2, Genicom Daejeon, Korea)를 사용하여 측정하였다. UV 조사 강도는 UV 소스로부터 30cm 떨어진 곳에서 1.0mW/cm²이었다. 세포를 배양접시의 75-80% 까지 배양한 다음, PBS 버퍼로 두 번 세척한 후, UV를 조사하고 시험물질을 처리하였다. 그 후, 빛을 차단한 상태에서 다음 분석을 할 때까지 계속해서 배양하였다.

[0055] 동물에 UV 조사를 하기 위해, 우선 마우스의 등쪽 피부에 대한 최소 홍반량(minimal erythema dose, MED)을 조

사하였다. 최소 홍반량이란, 조사하고 24시간 후에 뚜렷한 경계선을 가진 홍반(erythema)을 유도할 수 있는 최소량을 의미한다. 마우스에 일주일에 3회씩, 8주 동안 UV를 조사하였다. 처음 3주 동안은 조사량을 1 MED(본 발명에서 1 MED = 30mJ/cm²)씩 증가하였으며, 그 이후로는 3 MED를 유지하였다.

[0056] **세포 생존율 분석(Cell viability assay)**

[0057] 세포 생존율 분석을 위해 물에 용해되는 테트라졸륨검사(water soluble tetrazolium test) 방법을 사용하였다. 살아있는 세포의 정량은 Ez-cytox Cell Viability Assay Kit (Daeil Lab Co, Seoul, Korea)를 이용하여 분석하였다. Chameleon multi-label plate reader (Hidex Personal Life Science, Hidex Oy, Finland)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정함으로써 포르마잔 염료(formazan dye)를 분광측정법으로 분석하였다.

[0058] **실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR)**

[0059] 전체 RNA를 Trizol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 분리하였다. ImProm-IITM Reverse Transcription system (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 2.5g의 전체 RNA로 cDNA를 합성하였다. 각 유전자의 발현레벨 분석을 위해 DNA Engine Opticon1 (MJResearch, Waltham, MA, USA)을 이용하여 상기 합성된 cDNA로 PCR 증폭을 하였다. PCR 증폭 과정 중의 형광 탐지를 위해 SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio, Otsu, Japan)을 이용하였으며, 전체 볼륨은 10 로 하고, 여기에 1 의 cDNA/control 및 각 유전자에 특이적인 프라이머를 포함시켜 PCR 증폭을 수행하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다:

[0060] MMP-1

[0061] 정방향: CTG AAG GTG ATG AAG CAG CC

[0062] 역방향: AGT CCA AGA GAA TGG CCG AG

[0063] MMP-2

[0064] 정방향: GAT ACC CCT TTG ACG GTA AGG A

[0065] 역방향: CCT TCT CCC AAG GTC CAT AGC

[0066] MMP-3

[0067] 정방향: ATT CCA TGG AGC CAG GCT TTC

[0068] 역방향: CAT TTG GGT CAA ACT CCA ACT GTG

[0069] GAPDH

[0070] 정방향: CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT

[0071] 역방향: AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC

[0072] PCR 증폭반응의 수행 조건은 다음과 같다:

[0073] (1) 95 C, 10분간 denaturation

[0074] (2) 40 사이클: denaturation(95 C, 1초), annealing(60 C, 5초), extension(72 C, 25초).

[0075] **웨스턴 블랏팅 분석**

[0076] 샘플로부터 전체 단백질 추출물을 용해 버퍼 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, and phosphatase inhibitor mixture (Sigma, St Louis, MO, USA)에 준비한 후 5분 동안 끓였다. 용해된 단백질을 Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량한 다음, SDS-PAGE로 분리하고 polyvinylidene difluoride (PVDF) 멤브레인(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)으로 옮기었다. 멤브레인을 특정한 일차 항체로 4C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후, horseradish peroxidase (HRP)가 연결되어 있는 이차 항체와

chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 단백질 밴드를 시각화하였다. 사용된 각각의 일차항체는 다음과 같다: MMP-1 (Chemicon, Bedford, MA, USA), MMP-2 (Chemicon, Bedford, MA, USA), MMP-3(Epitomics, Burlingame, CA, USA), phospho c-Jun N-terminal kinase (pJNK), JNK, phospho extracellular signal-regulated kinase (pErk) 및 Erk (모두 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA).

[0077] **공초점 현미경 (Confocal microscopy)**

[0078] hDF 세포를 510⁴/well 로 커버슬립(coverslip) 위에서 배양한 다음 페오포르비드 a를 37에서 빛에 노출되지 않은 상태에서 2 시간 동안 처리하였다. 그리고 세포를 PBS에서 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 페오포르비드 a의 형광을 FV1000 confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 440 nm 여기파장 (excitation wavelength) 및 655 nm 방출파장(emission wavelength)에서 시각화하였다. 페오포르비드 a의 세포 내 흡수여부는 형광 강도에 의해 결정되었다.

[0079] **실험동물**

[0080] 6주령된 암컷 SKH-1 털이 없는 마우스를 Charles River Laboratories (Wilmington, MA)로부터 구입하여 1 주일간 적응시켰다. 마우스를 냉방장치가 된 방에서 12 시간 빛/ 12시간 어둠 주기로 물과 음식을 자유롭게 먹을 수 있도록 한 조건에서 사육하였다. 방의 온도는 23, 습도는 55%로 유지하였다. 모든 실험들은 광주과기원 동물실험윤리위원회(animal care and use committee)에 의해 승인되었다.

[0081]

[0082] **시험물질의 경구 투여**

[0083] 적응 기간이 지난 후, 마우스를 각 집단에 6 마리씩 4 집단으로 분리하였다. 각 집단은 다음과 같다:

- [0084] (a) 음성 대조군
- [0085] (b) UV만을 조사한 양성 대조군
- [0086] (c) UV 조사와 함께 클로로필 a를 매일 5mg/kg 투여한 집단
- [0087] (d) UV 조사와 함께 페오포르비드 a를 매일 5mg/kg 투여한 집단

[0088] 클로로필 a(Ca, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 또는 페오포르비드 a(Pa, Frontier Scientific, Logan, UT, USA)는 각각 40%의 폴리에틸렌 글리콜 400 용액(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)에 용해시켜 사용하였다. 컨트롤로서 vehicle을 40%의 폴리에틸렌 글리콜 400 용액만으로 제조하여 음성 대조군 및 양성 대조군 집단의 마우스에 투여하였다. 시험물질의 투여는 UV 조사 후 즉시 이루어졌다.

[0089] **등쪽 피부의 주름 평가**

[0090] 계속적으로 저용량의 UV에 노출시킨 후, 등쪽 피부의 임상의 이미지(clinical)를 얻기 위해 디지털 카메라(Sony Cybershot DSC-W570, 5optical zoom, 16.1 megapixels, Sony Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 확대된 주름은 디지털 카메라에 부착된 DermLiteIIHybridM (3Gen, LLC, San Juan Capistrano, CA, USA)를 사용하여 얻을 수 있었다. 마우스의 등쪽 피부의 주름을 Bissett 등[20]에 의해 기술된 방법에 따라 등급을 매기었다. 이에 따른 등급은 다음과 같다:

- [0091] 등급 0 - 굵은 주름이 전혀 없는 경우;
- [0092] 등급 1 - 소수의 얇은 굵은 주름이 있는 경우;
- [0093] 등급 2 - 약간의 굵은 주름이 있는 경우;
- [0094] 등급 3 - 여러 개의 깊은 굵은 주름이 있는 경우.

[0095] 피부의 주름을 분석하기 위해서 음성적으로 각인된 복제물을 사용하였는데, 이 방법은 류 등[21]에 의해 기술된

방법이다. 즉, 반유동체의 실리콘 폴리머를 촉매제 (Imprint II GarantTM Light Body, 3M)와 혼합한 다음, 윤곽선을 넘어 주름 안으로 침투하기에 충분할 정도로 등쪽 피부에 적용시켰다. 복제물이 형성되었고, 주름의 높이에 비례하는 반사 그림자를 생성하도록 설정된 입사각(incident angle)을 가진 표준 조명아래에서 이 복제물을 분석하였다. 캡처된 이미지를 이미지 분석 소프트웨어(ImageJ software, NIH Image, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; online at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)를 사용하여 이미지의 그림자 영역으로부터 측정하였다.

[0096] **조직학적 검사**

[0097] UV 조사된 마우스의 등쪽 피부로부터 채취한 조직 샘플을 4% 파라포름알데히드에 고정시킨 다음, 파라핀에 포함시켰다. 4 두께의 얇은 절편을 헤마토실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin) 용액으로 염색하였다. 콜라겐의 침적을 시각화하기 위해, 절편을 Accustain trichrome stain (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)으로 염색하였다. 과립형 각막층의 접합부위부터 진피-표피의 접합부위까지의 표피 두께를 i-Solution DT image acquisition and analysis program (IMT i-solution, Vancouver, Canada) 및 Leica microscope (Leica, Wetzlar, Germany)를 사용하여 측정하였다. 표피의 두께를 평가하기 위해, 슬라이드에서 열 개의 임의의 부위를 측정하였다. 5 고성능 필드에서 표피부터 피하지방층까지의 염증세포를 계산하였다.

[0098] **면역조직화학법 (Immunohistochemistry)**

[0099] 5 두께의 파라핀 조직 절편을 사용하여 MMP-1 (Chemicon International, Temecula, CA, USA), ICAM-1 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) 및 Type 1 Collagen (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 면역조직화학적 염색을 수행하였다. 자일렌(xylene) 및 알콜을 사용하여 슬라이드 절편에서 파라핀을 제거하고 수화하였다. 절편에서 내생적인(endogenous) peroxidase를 제거하기 위해 3% H₂O₂에 배양한 다음, 비특이적인 항체 결합 부위를 차단하기 위해 3% 소혈청 알부민으로 배양하였다. MMP-1, type 1 collagen 및 ICAM-1을 검출하기 위해, 각각 마우스 항-인간 MMP-1 단일클론항체(1:100), 염소 항-인간 type 1 collagen 다중클론항체(1:100) 및 마우스 항-인간 ICAM-1 단일클론항체 (1:100)를 준비하였다. 그 다음, 각 항체의 특정 타겟을 시각화하기 위해, DAKO LSAB+ system-HRPkit (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA)를 사용하여 avidinbiotinperoxidase complex 방법을 적용하였다. 헤마토실린(hematoxylin)을 대조염색으로 사용하였다.

[0100] **통계분석**

[0101] 각각의 *in vitro* 실험은 삼중으로 수행되었으며, 모든 데이터는 평균표준오차로 나타내었다. 집단 사이의 유의미한 차이는 Student T test 및 ANOVA로 분석하였다. p-value<0.05를 통계학적으로 유의미한 것으로 간주하였다.

[0102] **실험결과**

[0103] **폐오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 집단에서 주름의 임상 점수(clinical score)가 개선되었다**

[0104] 8주 동안 UV를 반복적으로 조사한 털 없는 마우스에서 피부 주름을 평가하였다. 마우스의 등쪽에서 주름 및 음성적인 복제 이미지(negative replica image)의 피부 특성을 디지털 카메라로 촬영하고, 이미지 분석 소프트웨어로 분석하였다(도 1). 마우스의 등쪽 피부를 UVB에 장기간 반복적으로 노출시킬 경우, 광노화의 대표적인 특징인 주름과 피부가 거칠게 되는 현상이 유도되었다. UV 조사 후 바로 폐오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 마우스의 경우, 대조군에 비해 현저하게 주름의 두께가 감소하였으며 미세한 주름을 나타내었다. 또한, 두 명의 숙련된 전문가가 임상 사진에 대한 시각적인 주름 등급을 확인한 결과, 폐오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 집단에서 주름 등급이 낮아진 것으로 나타났다. 복제 이미지에서도 폐오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 집단이 대조군에 비해 주름 영역이 감소하였음을 보여주었다.

[0105] **폐오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 마우스에서 등쪽 피부의 조직병리학이 개선되었다**

- [0106] UV 조사에 의해 유도되는 염증반응에 미치는 페오포르비드 a 또는 클로로필 a의 영향을 조사하기 위해, UV를 조사한 마우스의 등쪽 피부를 절편화한 다음, H&E로 염색하였다(도 2). 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 집단의 경우, 대조군에 비해 표피와 진피 상부에 있는 염증 세포의 침윤이 감소되어 있는 것을 확인하였다.
- [0107] 표피가 두꺼워진다는 것은 UV 조사에 의해 유도된 염증반응이 있었다는 것을 의미하는데, 표피의 두께를 Masson-trichrome 염색으로 평가하였다. UV를 조사한 집단의 경우, vehicle만 처리한 대조군 집단에 비해 표피의 두께가 증가하였다. 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 집단에서 두께가 감소하였다는 것은 염증 레벨이 감소하였다는 것을 나타내는 것이다. 또한 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 집단에서는 대조군 집단에 비해 진피에서 콜라겐의 파괴가 더 적게 일어나는 것이 관찰되었다. 즉, UV만을 조사한 집단에서는 표피에서 미세한 콜라겐 번들이 관찰되었고, 진피-표피 접합부위와 상부 진피를 따라 퇴행적인 하이알린화된(hyalinized) 물질들이 침적되어 확산되어 있는 것이 관찰되었다. 반면에, 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 집단에서는 대조군 집단에 비해 진피에서 두꺼운 콜라겐 번들과 상부 진피에서 퇴행적인 물질들이 감소되어 있는 것이 관찰되었다.
- [0108] **페오포르비드 a 또는 클로로필 a 투여 집단에서는 UV만 조사한 대조군 집단에 비해 Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)의 발현이 감소되었다**
- [0109] Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)은 백혈구의 상호작용을 매개하여 염증 세포를 모으는 것에 관계하는 세포 표면의 접착 분자(surface adhesion molecule)이다. UV 조사는 각질 세포에서 ICAM-1을 유도하며, ICAM-1은 염증 세포의 침윤이 일어나는 염증 부위의 세포막에서 높은 레벨로 발현된다는 것이 알려져 있다[22]. ICAM-1에 대해 면역조직화학적 염색을 한 결과, vehicle만을 처리한 집단에 비해 UV를 처리한 집단의 표피와 진피 상부에서 ICAM-1의 발현정도가 증가하는 것을 확인하였다(도 3). 이것은 진피 상부에서 염증 세포의 침윤이 일어났기 때문인 것으로 보인다. 페오포르비드 a 또는 클로로필 a를 투여한 집단에서는 UV만을 조사한 집단에 비해 표피와 진피 상부에서 ICAM-1의 발현정도가 감소하였다.
- [0110] **인간 피부 섬유아세포(hDF)에서 UV 조사 후 페오포르비드 a를 처리하면 매트릭스 메탈로프로테이나아제(matrix metalloproteinase, MMP)의 생산이 감소된다**
- [0111] MMP 생산에 미치는 페오포르비드 a의 영향을 평가하기 위해, hDF 세포를 배양 접시의 80%까지 배양한 다음, UV(20mJ/cm²)를 조사하고 다양한 농도(0, 10, 20, 50M)의 페오포르비드 a를 처리하였다. 그리고 세포를 72시간 동안 빛을 차단한 상태에서 배양한 다음, 세포독성평가를 수행하였다. 세포의 생존능력은 UV 조사 및 시험물질 처리에 의해 영향을 받지 않았다(도 4a).
- [0112] 또한, UV를 조사하고 시험물질을 처리한 후 24시간 동안 배양한 다음, MMP의 mRNA 레벨을 실시간 RT PCR 방법을 이용하여 분석하였다. GAPDH 유전자를 내부적인 컨트롤로 사용하였고, GAPDH에 대한 상대적인 MMP-1의 양을 바(bar)로 나타내었다(도 4c 내지 e). UV만을 조사한 경우, MMP-1/GAPDH mRNA 레벨이 14배 증가하였다. 페오포르비드 a를 처리한 경우, 유의미하게 MMP-1 및 MMP-3 레벨이 감소하였다. MMP-2 mRNA 레벨은 UV 조사에 의해 거의 영향을 받지 않았다.
- [0113] MMP 단백질 발현레벨을 확인하기 위해, 웨스턴 블랏팅 분석을 수행하였다. 각각 MMP-1, MMP-2 및 MMP-3에 대한 일차 항체로 분석한 결과, MMP-1 및 3는 페오포르비드 a를 처리한 양에 비례하여 그 양이 감소하였다(도 4b). 결론적으로, 단백질 레벨은 mRNA 발현 레벨과 일치하는 결과를 나타내었다.
- [0114] **인간 피부 섬유아세포(hDF)에서 페오포르비드 a는 UV 조사에 의해 유도된 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 인산화를 억제한다**
- [0115] MAPK는 UV 조사에 의해 유도되는 MMP 생산과 관계있는 것으로 알려져 있다. 페오포르비드 a가 UV 조사에 의한 MAPK의 인산화에 어떤 영향을 미치는지를 확인하고자 하였다. 이를 위해, UV를 조사한 hDF 세포에 페오포르비드 a를 처리하고 빛을 차단한 상태에서 2시간 동안 배양한 후, 세포를 용해하여 웨스턴 블랏팅 분석을 수행하였다(도 5a). 인산화된 c-Jun N-terminal kinase (pJNK), JNK, 인산화된 extracellular signal-regulated kinase (pErk) 및 Erk 단백질의 발현레벨을 확인하기 위해, 각각의 단백질에 대한 일차 항체를 사용하였다. 웨스턴 블랏팅 분석 결과, 20M 및 50M의 페오포르비드 a를 처리한 세포에서 인산화된 JNK 및 인산화된 Erk의 발

현레벨이 감소하는 것을 관찰하였다. 또한, 기본적인 JNK 단백질 레벨이 페오포르비드 a 양에 비례하여 감소하였다.

- [0116] hDF 세포에서 2시간 동안 페오포르비드 a가 흡수되는 것을 confocal 현미경 이미지를 사용하여 시각화 하였다 (도 5b). MAPK를 웨스턴 블랏팅으로 분석한 결과에서 UV 조사 후 2시간 동안 10M 페오포르비드 a를 처리한 경우에는 MAPK 인산화 억제 효과가 20M 및 50M에서만 나타나는 것 같았는데, 이것은 아마도 20M 및 50M에 비해 10M 페오포르비드 a에서는 세포 흡수가 잘 일어나지 않았기 때문인 것으로 보인다.
- [0117] **참고문헌**
- [0118] [1] Jenkins, G., Molecular mechanism of skin aging. *Mech. Ageing. Dev.* 2002, 123, 801-810.
- [0119] [2] Kim, HH., Lee, MJ., Lee SR., Kim KH., et al., Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech. Ageing. Dev.* 2005, 126, 1170-1177.
- [0120] [3] Gelse, K., Pschl, E., Aigner, T., Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2003, 55, 1531-1546.
- [0121] [4] Ferruzzi, MG., Failla, ML., Schwartz, SJ., Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an in vitro digestion and Caco-2 human cell model. *J. Agric. Food. Chem.* 2001, 49, 2082-2089.
- [0122] [5] Schoefs, B., Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends. Food. Sci. Technol.* 2002, 13, 361-371.
- [0123] [6] Czerpak, R., Pietryczuk, A., Therapeutic, cosmetic and dietary significance of some algae. *Postepy. Fitoterapii.* 2009, 10, 168-174.
- [0124] [7] Negishi, T., Rai, H., Hayatsu, H., Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutat. Res.* 1997, 376, 97-100.
- [0125] [8] Nakamura, Y., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Identification of pheophorbide a and its related compounds in the leaves of *Neptunia oleracea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1996, 60, 1028-1030.
- [0126] [9] Nakamura, Y., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Inhibitory effect of pheophorbide a, a chlorophyll related compound, on skin tumor promotion in ICR mice. *Cancer. Lett.* 1996, 108, 247-255.
- [0127] [10] Harttig, U., Bailey, G. S., Chemoprevention by natural chlorophylls in vivo: inhibition of dibenzo[a, l]pyrene- DNA adducts in rainbow trout liver. *Carcinogenesis* 1998, 19, 1323-1326.
- [0128] [11] Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., et al., Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1998, 90, 889-905.
- [0129] [12] Endo, H., Hosoya, H., Koyama, T., Ichioka, M., Isolation of 10-hydroxypheophorbide a as a photosensitizing pigment from alcohol-treated *Chlorella* cells. *Agric. Biol. Chem.* 1982, 46, 2183-2193.
- [0130] [13] Fujishima, I., Sakai, T., Tanaka, T., Ryu, H., et al., Photodynamic Therapy Using Pheophorbide a and Nd:YAG Laser. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. 1991, 31, 257-263.
- [0131] [14] Matsuura, E., Aoki, K., Hirano, R., Yamada, K., Kawahara, H., Photodynamic action of salted Takana or pheophorbide a in the salted Takana on erythrocyte of rats. *Eiy.o To. Shokuryo.* 1977, 30, 307-311 (in Japanese).
- [0132] [15] Heaton J. W., Marangoni A. G., Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *Trends. Food. Sci. Tech.* 1996, 7, 8-15
- [0133] [16] Heinrich, M., Bork, P. M., Schmitz, M. L., Rimpler, H., et al., Pheophorbide A from *Solanum diflorum* interferes with NF- κ B activation. *Planta. Med.* 2001, 67, 156-157.

- [0134] [17] Subramoniam, A., Asha, V. V., Nair, S. A., Sasidharan, S. P., et al., Chlorophyll revisited: Anti-inflammatory activities of chlorophyll a and inhibition of expression of TNF- gene by the same. *Inflammation*. 2012, 35, 959-966.
- [0135] [18] Islam, M.N., Ishita, I.J., Jin, S.E., Choi, R.J., et al., Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Saccharina japonica* and its constituents pheophorbide a and pheophytin a in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Food. Chem. Toxicol.* 2013, 55, 541-548.
- [0136] [19] Lee, J. Y., Zhao, L., Youn, H. S., Weatherill, A. R., et al., Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 16971-16979.
- [0137] [20] Bissett, D. L., Hannon, D. P., Orr, T. V., An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.* 1987, 46, 367-378.
- [0138] [21] Ryu, J. S., Park, S. G., Kwak, T. J., Chang, M. Y., et al., Improving lip wrinkles: lipstick related image analysis. *Skin. Res. Technol.* 2005, 11, 157-164.
- [0139] [22] Krutmann, J., Grewe, M., Involvement of cytokines, DNA damage, and reactive oxygen intermediates in ultraviolet radiation-induced modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Invest. Dermatol.* 1995, 105(1 Suppl), 67S-70S.
- [0140] [23] Fisher, G. J., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Varani, J., et al., Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* 1997, 337, 1419-1428.
- [0141] [24] Lee, Y. M., Li, W. H., Kim, Y. K., Kim, K. H., Chung, J. H., Heat-induced MMP-1 expression is mediated by TRPV1 through PKC alpha signaling in HaCaT cells. *Exp. Dermatol.* 2008, 17, 864870.
- [0142] [25] Saarialho-Kere, U. K., Crouch, E. C., Parks, W. C., Matrix metalloproteinase matrilysin is constitutively expressed in adult human exocrine epithelium. *J. Invest. Dermatol.* 1995, 105, 190196.
- [0143] [26] Ropke, C. D., Sawada, T. C., da Silva, V. V., Michalany, N.S., de Moraes Barros, S. B., Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Clin. Exp. Dermatol.* 2005, 30, 272-276.
- [0144] [27] Cho, H. S., Lee, M. H., Lee, J. W., No, K. O., et al., Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2007, 23, 155-162.
- [0145] [28] Kang, T. H., Park, H. M., Kim, Y. B., Kim, H., et al., Effects of red ginseng extract on UVB irradiation-induced skin aging in hairless mice. *J. Ethnopharmacol.* 2009, 123, 446-451.
- [0146] [29] Bae, J. Y., Choi, J. S., Kang, S. W., Lee, Y. J., et al., Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. *Exp. Dermatol.* 2010, 19, 182-190.
- [0147] [30] Vayalil, P. K., Mittal, A., Hara, Y., Elmets, C. A., Katiyar, S. K., Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* 2004, 122, 1480-1487.
- [0148] [31] Ferruzzi, M. G., Blakeslee, J., Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutr. Res.* 2007, 27, 1-12.
- [0149] [32] Muthusamy, V., Piva, T. J., The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFB and TNF signal transduction pathways. *Arch. Dermatol. Res.* 2010, 302, 5-17.
- [0150] [33] Yarr, M., in: Wolff K (Ed.), Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 7th edn - Aging of Skin, McGraw-Hill, New York, 2008, pp. 963-973.

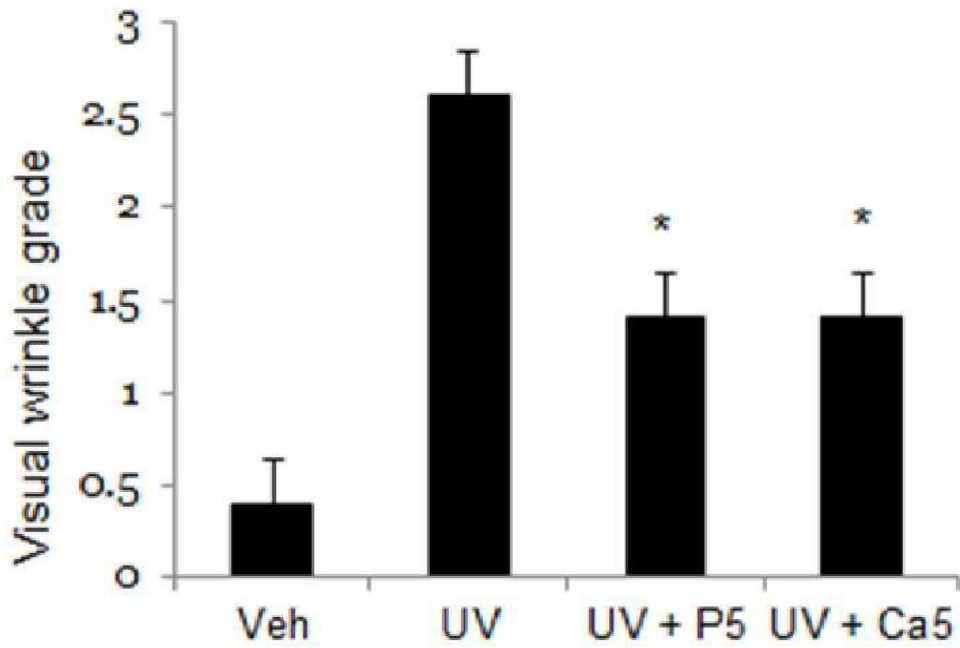
- [0151] [34] Kundu, J. K., Chun, K. S., Kim, S. O., Surh, Y. J., Resveratrol inhibits phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse skin: MAPKs and AP-1 as potential molecular targets. *Biofactors* 2004, 21, 33-39.
- [0152] [35] Sharma, S. D., Meeran, S. M., Katiyar, S. K., Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa B signaling in in vivo SKH-1 hairless mice. *Mol. Cancer Ther.* 2007, 6, 995-1005.
- [0153] [36] Cui, G., Qin, X., Zhang, Y., Gong, Z., et al., Berberine differentially modulates the activities of ERK, p38 MAPK, and JNK to suppress th17 and th1 t cell differentiation in type 1 diabetic mice. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 28420-28429.
- [0154] [37] Wu, L. C., Lin, Y. Y., Yang, S. Y., Weng, Y. T., Tsai, Y. T., Antimelanogenic effect of c-phycocyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways. *J. Biomed. Sci.* 2011, 18, 74

도면

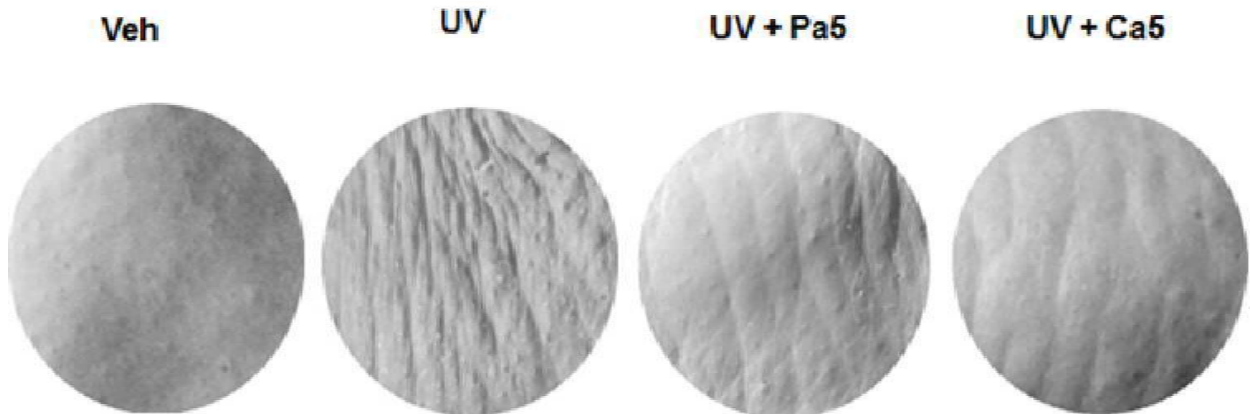
도면1a



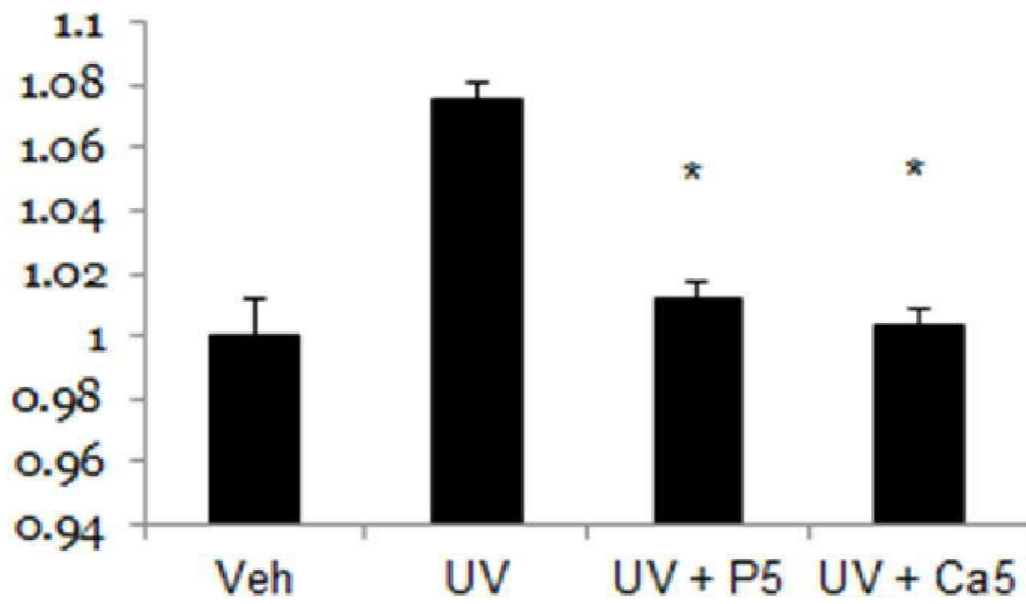
도면1b



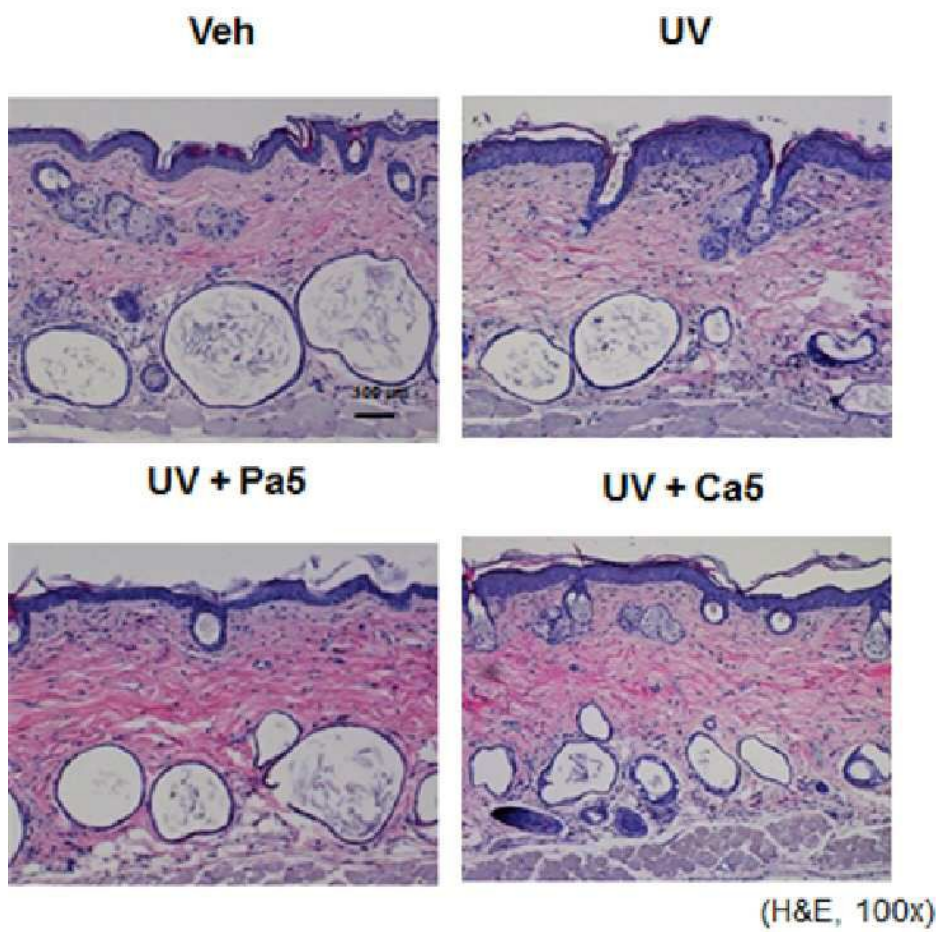
도면1c



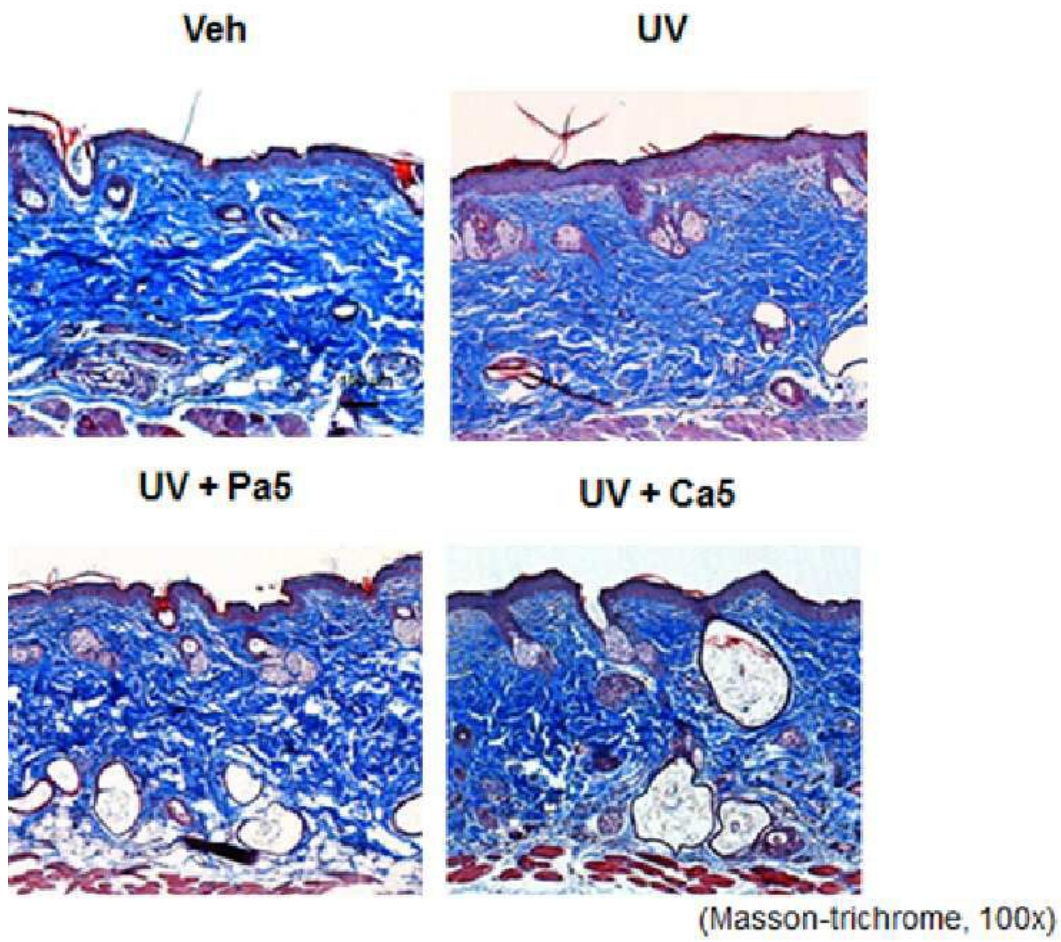
도면1d



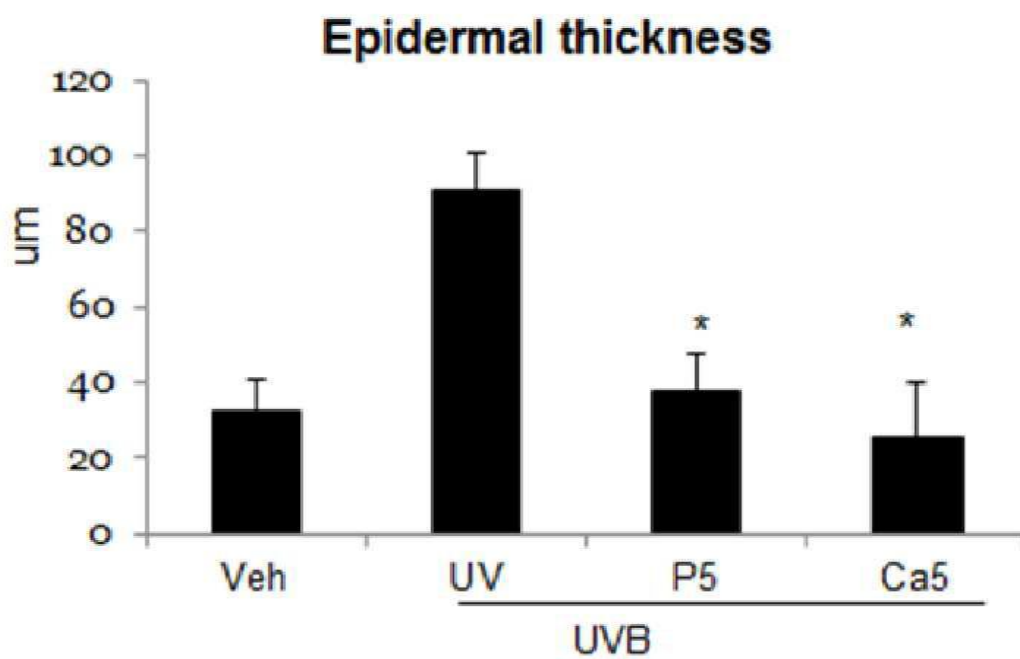
도면2a



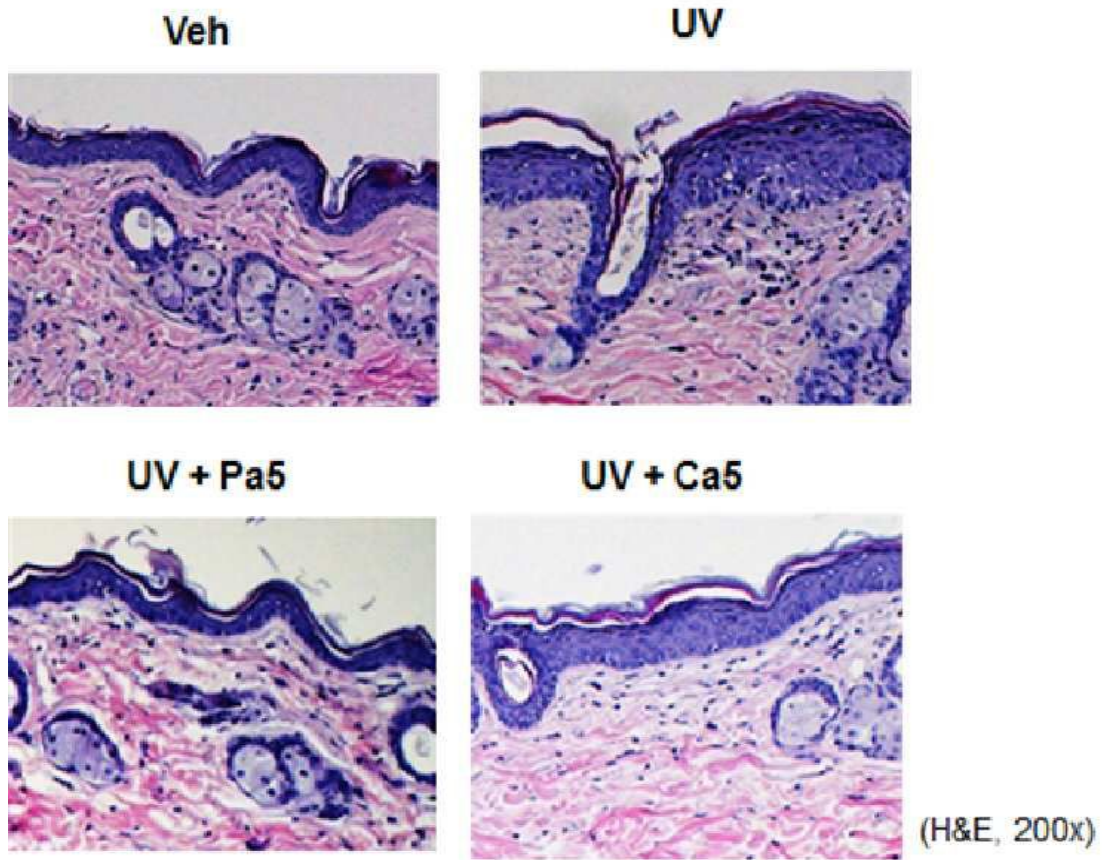
도면2b



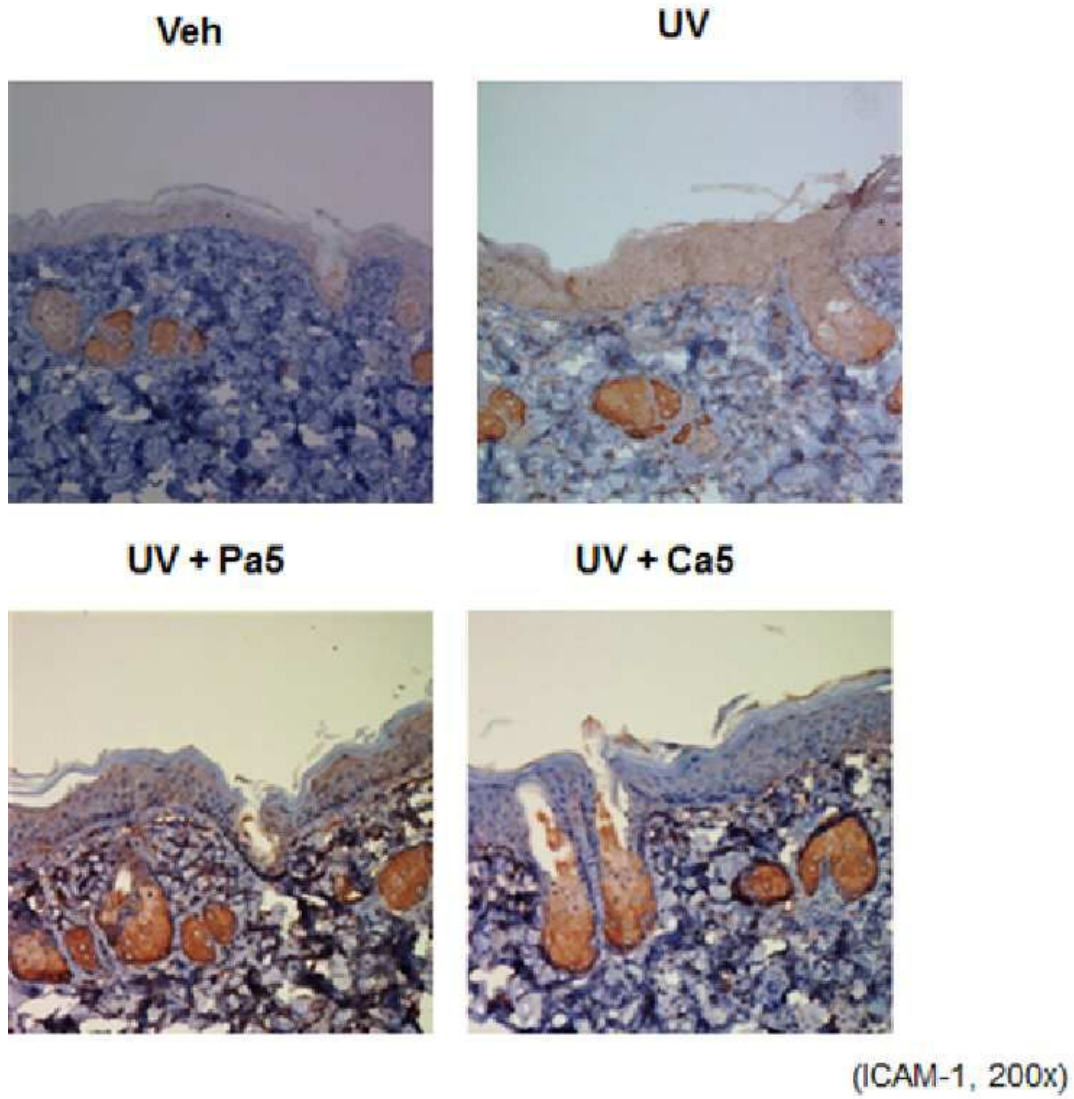
도면2c



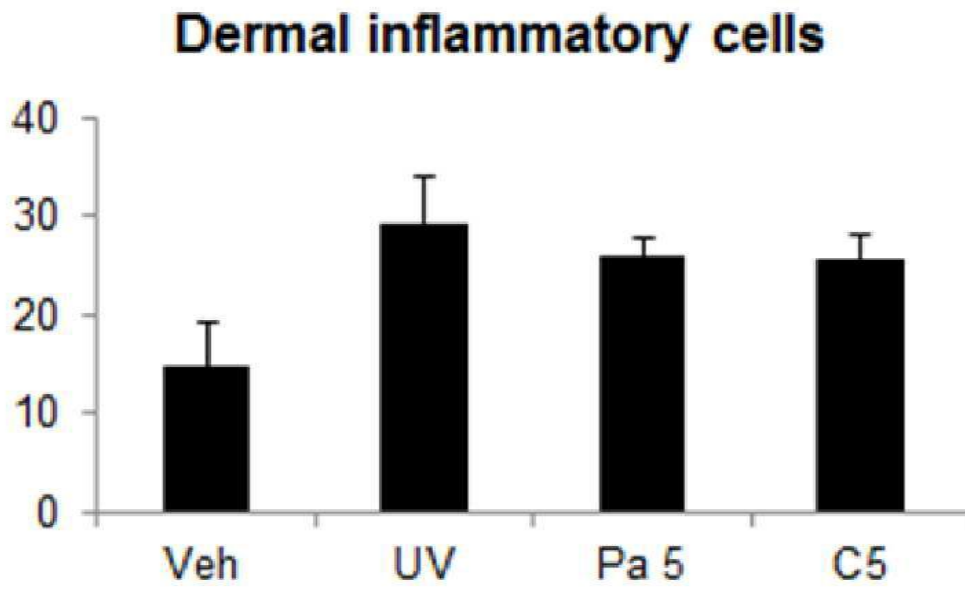
도면3a



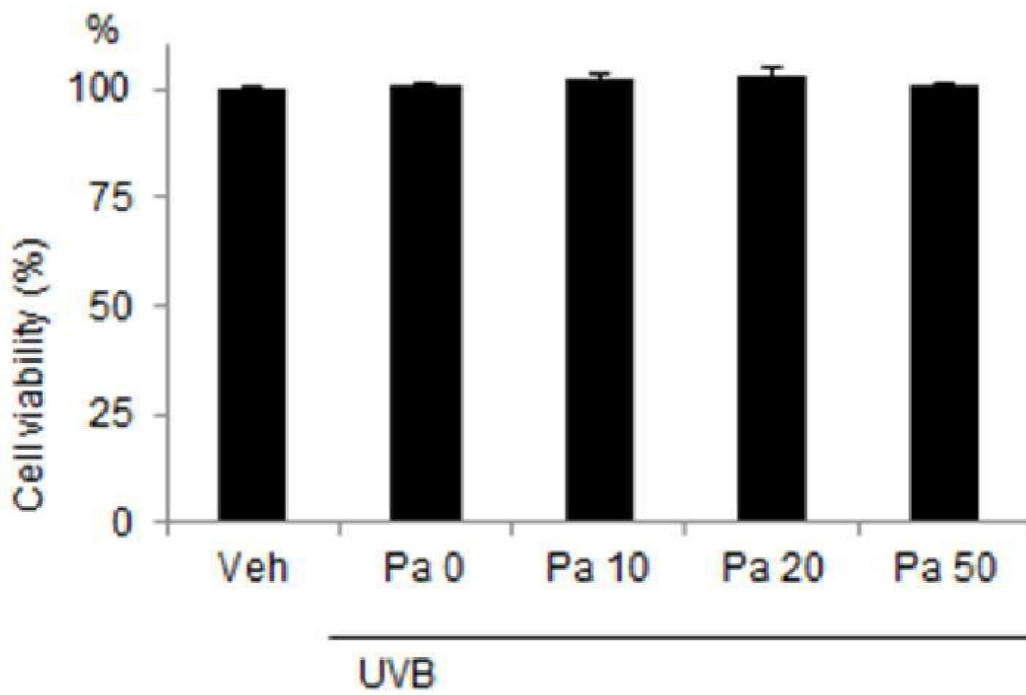
도면3b



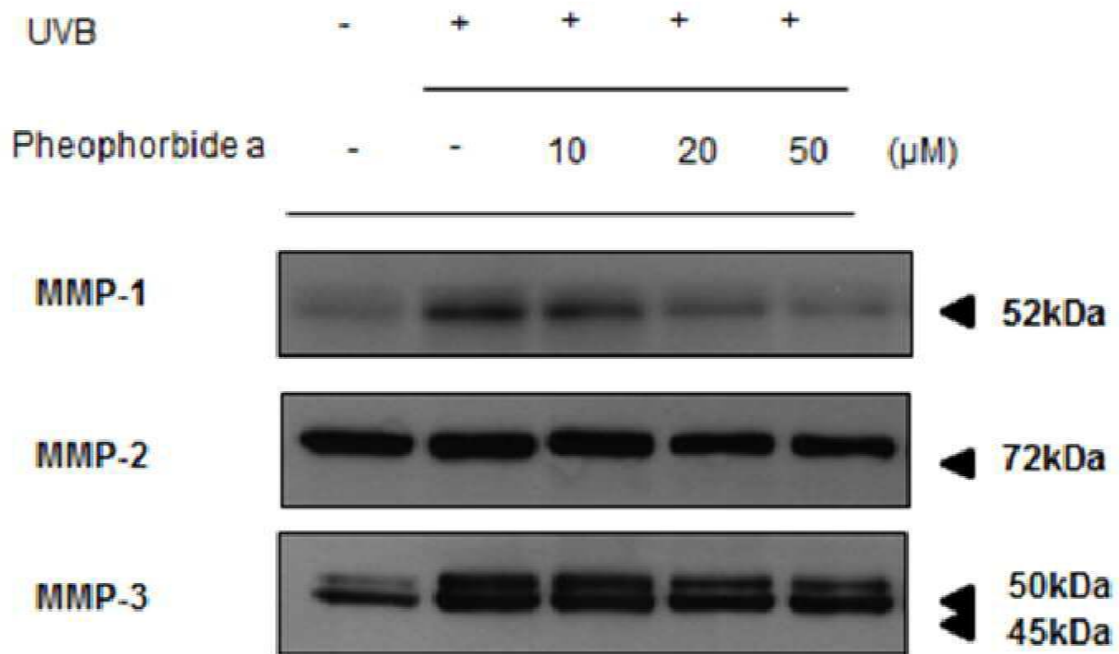
도면3c



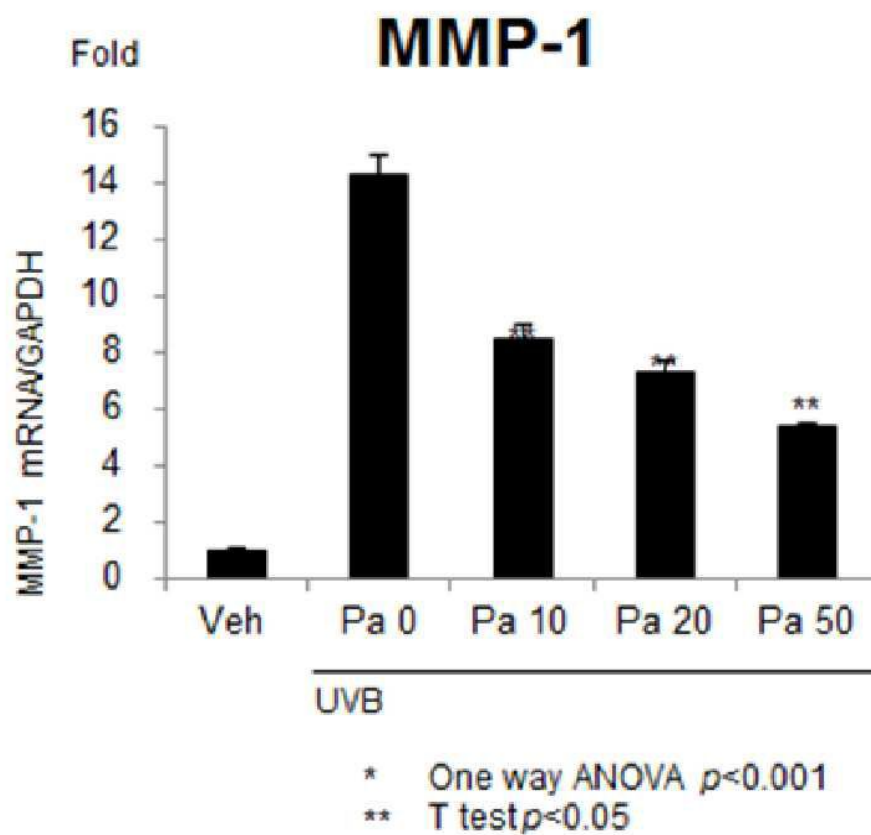
도면4a



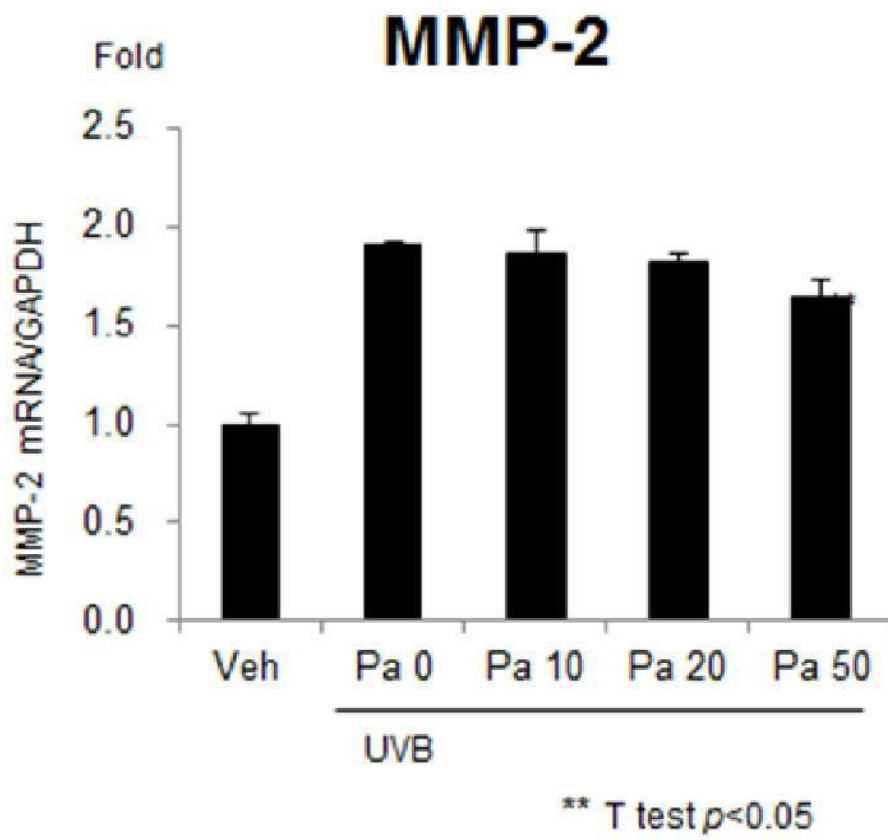
도면4b



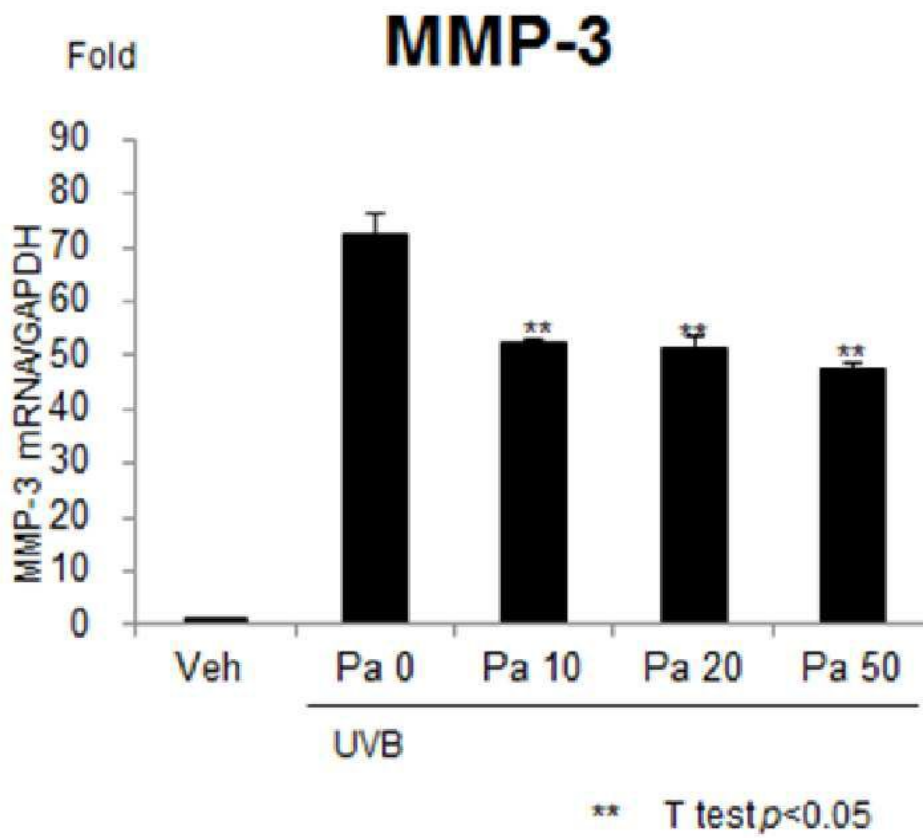
도면4c



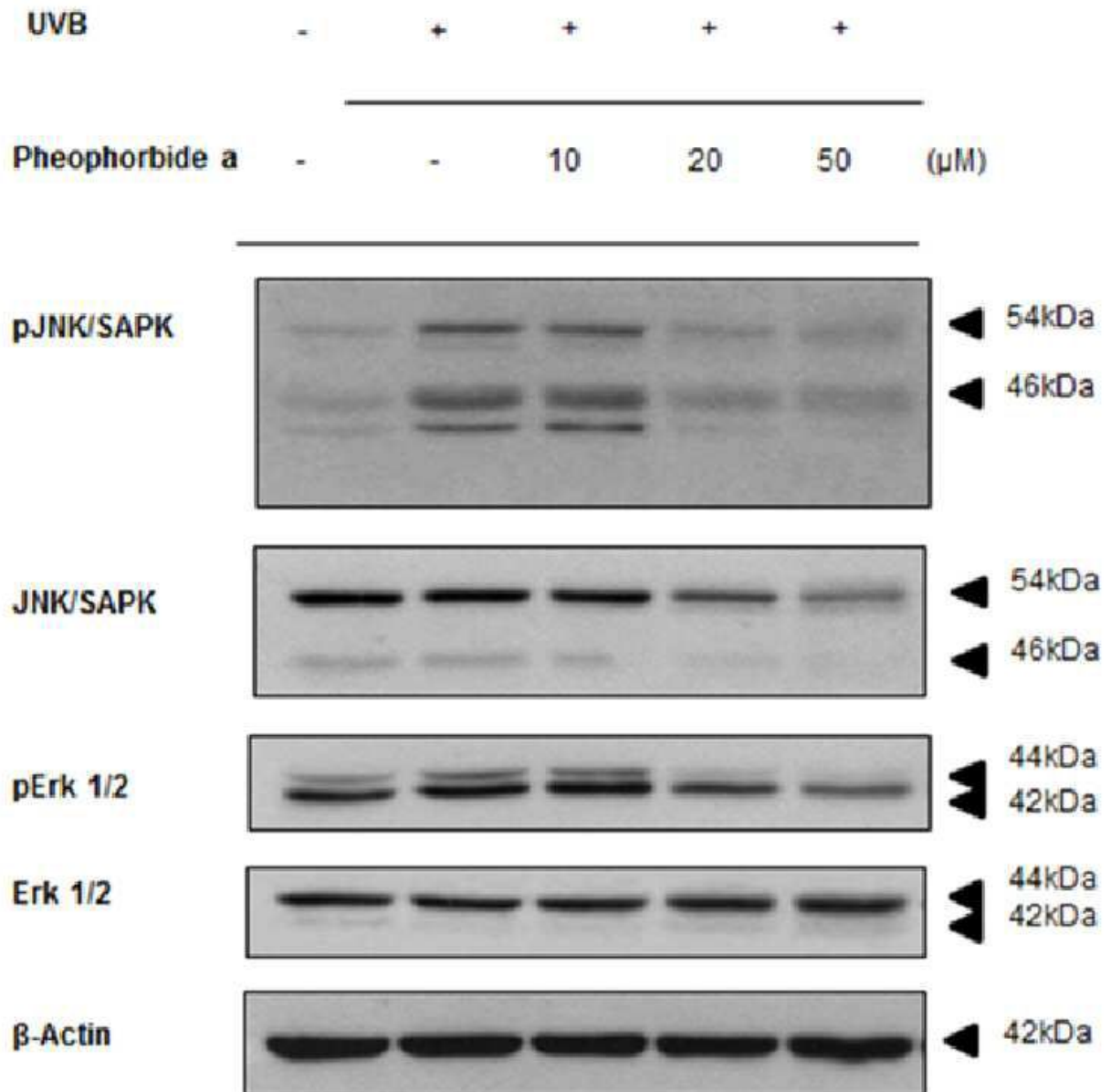
도면4d



도면4e



도면5a



도면5b

