(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0118550
(43) 공개일자 2016년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/53 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 17/04* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/53 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0046837
(22) 출원일자 2015년04월02일
심사청구일자 2015년04월02일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
김영철
대구광역시 달서구 호산로 125, 209동 1305호(파호동, 삼성명가타운)
황지연
경상북도 상주시 경상대로 2930-10, 110동 114호(낙양동, 명지아파트)
백현기
대구광역시 달성군 다사읍 매곡로4길 9, 101동 602호(한일유앤아이아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

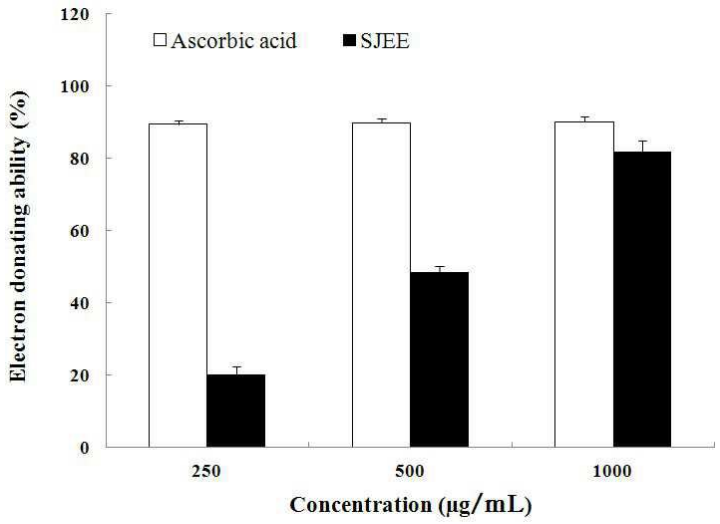
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물**

(57) 요 약

본 발명은 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 천연물인 초석잠 추출물은 정상세포에 세포 독성 없이, 광조사로 인해 발생하는 세포 내 자유라디칼 소거활성이 뛰어날 뿐만 아니라, 자외선 조사에 의해 유발되는 세포자연사(apoptosis) 억제 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 광조사된 세포의 손상을 예방하거나 치료할 수 있는 약학조성물, 건강식품 또는 화장료조성물로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A61Q 17/04 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61K 2236/33 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 광조사는 자외선에 의한 조사인 것을 특징으로 하는 피부 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 초석잠 추출물은 물, C 1 내지 4 알콜 및 이의 혼합 용매에 의해 추출된 것을 특징으로 하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 초석잠 추출물은 광조사에 의한 활성산소종을 감소시키고 미토콘드리아 막 전위 손실을 억제하여 DNA 손상을 저해함으로써, 미토콘드리아 의존성 세포사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 광조사에 의한 피부 세포손상은 피부 노화, 주름, 피부 세포사멸, 홍반 및 피부암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 개선용 건강식품.

청구항 7

초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 개선용 화장료조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 태양은 광범위한 파장을 가진 빛 에너지를 방출하는데, 가시광선의 파란색이나 보라색 광선보다 짧은 파장을 가진 자외선(ultraviolet rays; UV) 복사는 살갗을 태우고 건강에 해로운 영향을 미친다. 성층권에 존재하는 오존층은 대부분의 해로운 자외선이 지구상에 도달하는 것을 막아주고 있으나, 성층권의 오존층이 얇아지면서 지표에 도달하는 자외선 복사량이 증가하고 있다.

[0003] 이러한 자외선(UV)은 UVC, UVB 및 UVA로 분류되는데, UVC는 성층권의 오존층에 완전히 흡수되며, UVB는 대부분 오존층에 흡수되지만 일부는 지표면에 도달하여 동물체의 피부를 태우고 피부조직을 뚫고 들어가 피부암 발생의 원인이 된다.

[0004] UVA는 오존층에 흡수되지 않은 파장으로 피부를 벌겋게 만들거나, 피부면역 체계에 작용하여 피부노화에 따른

장기적인 피부 손상을 일으킬 수 있다.

[0005] 특히, 피부 진피층까지 침투하는 UVA는 발색단(chromophores)과 상호작용함으로써 활성산소를 생성하고 피부 진피층의 주요 구성요소인 콜라겐을 변형을 유도하여 피부 주름 및 탄력 손실과 같은 광노화의 원인이 된다. 또한, UVA의 노출시간이 길어지면 피부암 발생위험이 UVB와 같아진다는 연구 결과가 보고되기도 하였다.

[0006] 따라서, UVA를 포함한 자외선 노출에 의한 세포 손상과 광노화를 예방 및 치료할 수 있는 유용한 항노화제에 대한 연구가 필요하다.

[0007] 꿀풀과에 속하는 초석잠은 다년생 초본 식물이며, 우리나라에서도 자생하는 순형과 식물로 뿌리는 여러 갈래로 퍼져 그 끝에는 골뱅이나 번데기 모양을 하고 줄기는 네모꼴로 약 30 내지 60 cm 높이로 자란다.

[0008] 초석잠은 수렴제, 상처 치유, 설사예방 및 신장염, 요도염과 같은 항 염증제로서 효능이 인정되어 한약재로 이용되고 있으나, 자외선 노출에 대한 세포 보호 효과에 대해서는 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2001-0013415호(2001.02.26 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 천연물인 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 광조사에 따른 피부 세포의 손상을 예방하거나 치료할 수 있는 약학조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0012] 상기 광조사는 자외선에 의한 조사일 수 있다.

[0013] 상기 초석잠 추출물은 물, C 1 내지 4 알콜 및 이의 혼합 용매에 의해 추출된 것일 수 있다.

[0014] 상기 초석잠 추출물은 광조사에 의한 활성산소종을 감소시키고 미토콘드리아 막 전위 손실을 억제하여 DNA 손상을 저해함으로써, 미토콘드리아 의존성 세포사멸을 억제할 수 있다.

[0015] 상기 광조사에 의한 피부 세포손상은 피부 노화, 주름, 피부 세포사멸, 홍반 및 피부암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 광조사에 의한 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물.

[0016] 본 발명은 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 개선용 화장료조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따르면, 천연물인 초석잠 추출물은 정상세포에 세포 독성 없이, 자외선 조사로 인해 발생하는 세포내 자유라디칼 소거활성이 뛰어날 뿐만 아니라, 자외선 조사에 의해 유발되는 세포자연사(apoptosis) 억제 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 광조사에 의한 세포의 손상을 예방하거나 치료할 수 있는 약학조성물, 건강식품 또는 화장료조성물로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 250, 500 및 1000 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(*Stachys japonica* ethanol extract; SJEE) 및

아스코르브산의 자유 라디칼 DPPH에 전자공여 능력을 확인한 결과이다.

도 2는 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE) 및 아스코르브산의 라디칼 양이온 ABTS 소거능을 확인한 결과이다.

도 3은 아스코르브산의 세포 독성을 확인한 결과로, 사람 피부섬유아세포에 25, 50, 100 및 200 μg/mL 농도의 아스코르브산을 처리하고 세포 생존도를 확인한 결과이며, V는 아스코르브산이 처리되지 않은 대조군이다.

도 4는 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)의 세포 독성을 확인한 결과로, 사람 피부섬유아세포에 25, 50, 100 및 200 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물을 처리하고 세포 생존도를 확인한 결과이며, V는 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 대조군이다.

도 5는 아스코르브산이 처리된 사람 피부섬유아세포의 형태변화를 확인한 결과로, A는 아스코르브산이 처리되지 않은 세포군을 확인한 결과이며, B는 25 μg/mL 농도의 아스코르브산이 처리된 세포군을 확인한 결과이며, C는 50 μg/mL 농도의 아스코르브산이 처리된 세포군을 확인한 결과이며, D는 100 μg/mL 농도의 아스코르브산이 처리된 세포군을 확인한 결과이며, E는 200 μg/mL 농도의 아스코르브산이 처리된 세포군을 확인한 결과이다.

도 6은 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포의 형태변화를 확인한 결과로, A는 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리되지 않은 세포군을 확인한 결과이며, B는 25 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리된 세포군을 확인한 결과이며, C는 50 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리된 세포군을 확인한 결과이며, D는 100 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리된 세포군을 확인한 결과이며, E는 200 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리된 세포군을 확인한 결과이다.

도 7은 사람 피부섬유아세포에 UVA 조사 후 세포 내 생성된 활성산소(ROS)를 DCF 형광염색하여 활성산소에 대한 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)의 영향을 확인한 결과로, A는 UVA 및 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포군에서 생성된 ROS을 염색한 결과이며, B는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군에서 생성된 ROS을 염색한 결과이며, C는 UVA 조사 후 100 μg/mL 아스코르브산을 처리한 세포군에서 생성된 ROS을 염색한 결과이며, D는 UVA 조사 후 50 μg/mL 초석잠 에탄올 추출물을 처리한 세포군에서 생성된 ROS을 염색한 결과이며, E는 UVA 조사 후 100 μg/mL 초석잠 에탄올 추출물을 처리한 세포군에서 생성된 ROS을 염색한 결과이며, F는 UVA 조사 후 200 μg/mL 초석잠 에탄올 추출물을 처리한 세포군에서 생성된 ROS을 염색한 결과이다.

도 8은 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포에 50, 100 및 200 μg/mL 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)을 처리한 후, 세포 내 생성된 활성산소(ROS)를 정량하여 활성산소(ROS)에 대한 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)의 영향을 확인한 결과로, V는 UVA 및 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포군에서 생성된 ROS을 정량한 결과이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군에서 생성된 ROS을 정량한 결과이며, PC는 UVA 조사 후 100 μg/mL 아스코르브산을 처리한 세포군에서 생성된 ROS을 정량한 결과이다.

도 9는 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포에 초석잠 추출물 처리에 따른 미토콘드리아 막 전위를 JC-1으로 염색하여 확인한 결과로, A는 아스코르브산이 처리되지 않은 세포군의 막 전위 결과이며, B는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군의 막 전위 결과이며, C는 100 μg/mL 농도의 아스코르브산이 처리된 세포군의 막 전위 결과이며, D는 50 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리된 세포의 막 전위 결과이며, E는 100 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리된 세포의 막 전위 결과이며, E는 200 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리된 세포의 막 전위를 확인한 결과이다.

도 10은 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포에 50, 100 및 200 μg/mL 초석잠 추출물 처리에 따른 DNA 단편화의 효과를 확인한 RT-PCR 결과로, M은 마커이며, V는 UVA 및 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포군이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군이며, PC는 UVA 조사 후 100 μg/mL 아스코르브산을 처리한 세포군의 DNA 단편화를 확인한 결과이다.

도 11은 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포에 50, 100 및 200 μg/mL 초석잠 추출물 처리에 따른 카스파제-3 활성을 확인한 결과로, V는 UVA 및 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포군이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군이며, PC는 UVA 조사 후 100 μg/mL 아스코르브산을 처리한 세포군의 카스파제-3 활성을 나타내는 결과이다.

도 12는 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포에 50, 100 및 200 μg/mL 초석잠 추출물 처리에 따른 Bcl-2 mRNA 발

현을 확인한 결과로, 도 A는 초석잠 추출물 처리에 따른 Bcl-2 전사물 수준을 확인한 RT-PCR 결과이며, 도 B는 Bcl-2 전사물 발현을 정량한 결과로, V는 UVA 및 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포군이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군이며, PC는 UVA 조사 후 100 μg/mL 아스코르브산을 처리한 세포군의 Bcl-2 mRNA 발현을 확인한 결과이다.

도 13은 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포에 50, 100 및 200 μg/mL 초석잠 추출물 처리에 따른 Bcl-2 단백질 발현을 확인한 결과로, 도 A는 초석잠 추출물 처리에 따른 Bcl-2 단백질 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 B는 Bcl-2 단백질 발현을 정량한 결과로, V는 UVA 및 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포군이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군이며, PC는 UVA 조사 후 100 μg/mL 아스코르브산을 처리한 세포군의 Bcl-2 단백질 발현을 확인한 결과이다.

도 14는 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포에 50, 100 및 200 μg/mL 초석잠 추출물 처리에 따른 Bax mRNA 발현을 확인한 결과로, 도 A는 초석잠 추출물 처리에 따른 Bax 전사물 수준을 확인한 RT-PCR 결과이며, 도 B는 Bax 전사물 발현을 정량한 결과로, V는 UVA 및 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포군이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군이며, PC는 UVA 조사 후 100 μg/mL 아스코르브산을 처리한 세포군의 Bax mRNA 발현을 확인한 결과이다.

도 15는 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포에 50, 100 및 200 μg/mL 초석잠 추출물 처리에 따른 Bax 단백질 발현을 확인한 결과로, 도 A는 초석잠 추출물 처리에 따른 Bax 단백질 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 B는 Bax 단백질 발현을 정량한 결과로, V는 UVA 및 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포군이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군이며, PC는 UVA 조사 후 100 μg/mL 아스코르브산을 처리한 세포군의 Bax 단백질 발현을 확인한 결과이다.

도 16은 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포에 50, 100 및 200 μg/mL 초석잠 추출물 처리에 따른 사이토크롬 c mRNA 발현을 확인한 결과로, 도 A는 초석잠 추출물 처리에 따른 사이토크롬 c 전사물 수준을 확인한 RT-PCR 결과이며, 도 B는 사이토크롬 c 전사물 발현을 정량한 결과로, V는 UVA 및 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포군이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군이며, PC는 UVA 조사 후 100 μg/mL 아스코르브산을 처리한 세포군의 사이토크롬 c mRNA 발현을 확인한 결과이다.

도 17은 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포에 50, 100 및 200 μg/mL 초석잠 추출물 처리에 따른 사이토크롬 c 단백질 발현을 확인한 결과로, 도 A는 초석잠 추출물 처리에 따른 사이토크롬 c 단백질 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 B는 사이토크롬 c 단백질 발현을 정량한 결과로, V는 UVA 및 초석잠 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포군이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 세포군이며, PC는 UVA 조사 후 100 μg/mL 아스코르브산을 처리한 세포군의 사이토크롬 c 단백질 발현을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0021] 상기 초석잠 추출물은 물, C 1 내지 4 알콜 및 이의 혼합 용매에 의해 추출된 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 상기 초석잠 추출물은 광조사에 의한 활성산소종을 감소시키고 미토콘드리아 막 전위 손실을 억제하여 DNA 손상을 저해함으로써, 미토콘드리아 의존성 세포사멸을 억제할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 따르면, 도 1 및 도 2와 같이 초석잠 추출물은 UVA 조사로 생성되는 활성산소를 소거하는 능력이 우수한 것으로 확인되었으며, 활성산소에 의한 세포손상시 도 12 내지 17을 참고하면 초석잠 추출물이 Bcl-2의 mRNA 및 단백질의 발현을 증가시키고, Bax 및 사이토크롬 c의 mRNA 및 단백질의 발현을 저해함으로써, 미토콘드리아 의존성 세포 사멸을 억제하는 효과를 나타었다.

[0024] 또한, 도 9 및 도 10과 같이 광조사에 의한 미토콘드리아 막 전위 손실을 억제하여 DNA 분절을 저해하는 효과가 확인되었다.

[0025] 상기 결과로부터 초석잠 추출물은 자외선 노출에 의한 세포의 DNA 손상을 억제함으로써 세포를 보호하는 효과를

나타낼 수 있으므로, 본 발명의 초석잠 추출물은 자외선 노출로부터 세포를 보호할 수 있는 천연 세포보호제 또는 치료제로 사용될 수 있다.

[0026] 상기 광조사에 의한 피부 세포손상은 피부 노화, 주름, 피부 세포사멸, 홍반 및 피부암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 구체예에서, 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 세포손상 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 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 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[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 초석잠 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 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0034] 상기 건강식품은 상기 초석잠 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적 예를들어 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, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 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 초석잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 광조사에 의한 피부 세포손상 예방 또는 개선용 화장료조성물을 제공할 수 있다.

[0038] 상기 화장료조성물은 유효성분인 초석잠 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] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 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.

[0045] <참고예> 시약 및 기구

[0046] 디메틸 설폭사이드[Dimethyl sulfoxide; DMSO], 1,1-디페닐-2-피크릴 하이드라질[1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl; DPPH], 2,2'-아지노-(3-에틸벤조티아졸린-6-설포닉산)[2,2'-azino-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); ABTS], 탄닌산[tannic acid], 아스코르브산[ascorbic acid], Folin-Ciocalteu's 페놀 시약, 및 3-(4,5-디메틸-티아졸-2-일)-2,5-디페닐-테트라졸리움 브로마이드[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; MTT]를 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), 태아소혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; P/S)을 Lonza Company(Cascade, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0047] UV 조사는 UVA 선램프(Sankyo Denki, Japan)에서 수행되었다. CO_2 배양기(MCO-17AC, SANYO electric, Japan)를 사용하여 세포를 배양하고, 세포성장을 도립현미경(CKX41, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 시료 추출에는 회전식 감압농축기(BUCHI R-205, BUCHI Labortechnik AG, Switzerland)를 이용하였다.

[0048] **<실시예 1> 초석잠 에탄올 추출물(*Stachys japonica* ethanol extract; SJEE)**

[0049] 초석잠 뿌리를 대한민국 경상남도 산청의 농장에서 구입하여 사용하였다.

[0050] 분쇄된 시료 50g을 플라스크에 넣고 80% 에탄올 500 mL로 25 ℃에서 24시간 동안 추출하였으며, 상기 방법을 3번 반복하여 추출물을 얻었다.

[0051] 필터 페이퍼에 상기 추출물을 여과하고 동결건조에 의한 회전식 감압농축기를 이용하여 추출물을 농축하여 46.7% 수율로 초석잠 에탄올 추출물을 얻었다.

[0052] **<실시예 2> 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)의 항산화 활성 확인**

[0053] 1. 전자공여능력(Electron donating ability) 확인

[0054] 이전에 보고된 방법(Blois, 1958)으로 전자공여능력을 확인하였다.

[0055] 250, 500 및 1000 μg/mL SJEE가 되도록 증류수로 희석하고, 각각 1 ml씩 테스트 튜브에 담고, 각 튜브에 0.4 mM DPPH 4 mL을 첨가하였다. 상기 혼합물을 강하게 흔들어 혼합하고 60 ℃에서 10초간 인큐베이션한 후, 525 nm에서 각 혼합용액의 흡광도를 측정하였으며, 아스코르브산을 양성대조군으로 사용하였다.

[0056] 각 용액의 DPPH 라디칼 소거 능력은 하기식에 따라 억제 백분율로 계산되었다.

[0057] % 공여 능력 = $[1-(A_{sample}/A_{control})]\times100$

[0058] $A_{control}$은 대조군의 흡광도로 테스트 화합물이 포함되어 있지 않은 시약을 대조군으로 사용하였다.

[0059] 그 결과, 도 1과 같이 1000 μg/mL SJEE의 전자공여 능력이 82.0%로 나타났으며, 전자공여 능력이 90.2%로 확인된 아스코르브산과 유사한 수준으로 확인되었다.

[0060] 2. ABTS 라디칼 소거 능력 확인

[0061] 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)과 아스코르브산의 항산화 활성을 비교하기 위해, ABTS 양이온 탈색 분석(Re et al. 1999)을 수행하였다.

[0062] ABTS 라디칼 양이온($ABTS^{\cdot+}$)을 생산하기 위해, 7 mM 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설포닉산) 용액과 2.4 mM 과산화이중황산칼륨(potassium peroxodisulfate)을 실온 및 암조건에서 12시간 동안 반응시켰다. 그 후, 734 nm 에서 0.7±0.02의 흡광도까지 에탄올로 희석하였다.

[0063] 아스코르산 및 SJEE를 각각 31.25-1,000 μg/mL의 농도로 희석하고 96-웰 플레이트에 3번 반복되도록 분주한 후, 동일한 부피의 ABTS 라디칼 양이온($ABTS^{\cdot+}$) 용액을 첨가하였다. 그 후, 실온 및 암조건에서 7분 동안 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 하기식을 이용하여 % 소거능을 계산하였다.

[0064] % 소거능 = $[1-(A_{sample}/A_{control})]\times100$

[0065] 그 결과, 도 2를 참고하면 1,000 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)의 경우 ABTS 라디칼 소거능이 78.8%로 나타났으며, 100.1%로 나타난 아스코르브산과 유사한 수준으로 확인되었다.

[0066] **<실시예 3> 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)처리에 의한 세포 활성 확인**

[0067] 1. 세포 배양

[0068] 사람 피부섬유아세포를 Amore Pacific Company(Korea)에서 얻어 사용하였다. 8번 내지 15번 계대 배양된 세포를 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37 ℃, 5% CO_2 가습 조건에서 72시간 동안 배양하였다.

[0069] 2. 세포 생존도 분석(Cell viability assay)

[0070] 아스코르브산과 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)의 최대허용수준(maximum permissible level; MPL)을 결정하기 위해, MTT 분석을 수행하여 세포 생존도를 확인하였다.

[0071] 사람 피부섬유아세포를 웰당 1×10^4 세포로 96웰 플레이트에 분주하고 37 ℃, 5% CO_2 가습 조건에서 24시간 동안 배양한 후, SJEE(200 μL)를 PRF-DMEM(phenol red-free DMEM)에 희석하여 25, 50, 100 및 200 μg/mL의 농도로 각 웰에 첨가한 후, 48시간 동안 추가 배양하였다.

[0072] 그 후, MTT 0.5 mg/mL을 각 웰에 첨가하여 3시간 동안 추가 배양하고, 1,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 DMSO 200 μL를 각 웰에 첨가하였다. 그 다음, 플레이트 진탕기에서 15분 동안 세포를 용해시킨 후, ELISA를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0073] 세포 생존도의 백분율은 하기식에 따라 계산되었다.

[0074] % 세포 생존도 = $(A_{sample}/A_{control})\times100$

[0075] 대조군의 흡광도인 $A_{control}$은 테스트 화합물이 포함되어 있지 않은 시약을 사용하였다.

[0076] 그 결과, 도 3과 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교하여 100 및 200 μg/mL 농도의 아스코르브산을 처리한 세포군의 세포 생존도가 각각 9.9 % 및 31.3 % 감소된 것으로 나타났으므로, 사람 피부섬유아세포에 대한 아스코르브산의 최대허용수준(MPL)은 100 μg/mL인 것으로 확인되었다.

[0077] 또한, 도 4와 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교하여 100 및 200 μg/mL 농도의 SJEE를 처리한 세포군의 세포 생존도가 각각 2.7 % 및 9.9 % 감소된 것으로 나타났으므로, 사람 피부섬유아세포에 대한 SJEE의 최대허용수준(MPL)은 200 μg/mL 이상인 것으로 확인되었다.

[0078] 3. 세포 형태학적 분석

[0079] 25-200 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE) 또는 아스코르브산을 사람 피부섬유아세포에 처리하고 상기 세포 배양 방법으로 48시간 동안 인큐베이션하였다.

[0080] 배지 교체 후, 세포를 현미경으로 관찰하고 촬영하였다.

[0081] 그 결과, 도 5와 같이 낮거나, 중간 농도의 아스코르브산을 처리한 섬유아세포는 아무것도 처리되지 않은 대조군과 유사한 방추형을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 200 μg/mL 농도로 처리된 세포는 불규칙적이거나 둥근 모양을 나타내었으며, 세포 밀도가 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0082] 이와 대조적으로, 도 6과 같이 25-200 μg/mL 농도의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리된 섬유아세포는 대조군과 유사한 방추형을 유지하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0083] 상기 결과들로부터, 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)의 세포 독성이 아스코르브산보다 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[0084] **<실시예 4> 자외선 조사된 세포에서 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)의 효과 확인**

[0085] 1. UVA 조사 및 SJEE 처리

[0086] 사람 피부섬유아세포가 배양 디쉬에 80% 정도 분열 성장하면 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지로 교체하여 1.5×10^5 세포당 6.3 J/cm^2 의 UVA를 조사하였다.

[0087] (UVA 조사 후, 세포에 SJEE(200 μL)를 PRF-DMEM(phenol red-free DMEM)에 희석하여 50, 100 및 200 μg/mL의 농도로 각 웰에 첨가한 후, 48시간 동안 추가 배양하였다.)

[0088] 2. 활성산소종(Reactive oxygen species; ROS) 발생에 대한 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)의 효과 확인

[0089] DCFH-DA(dichlorofluorescein diacetate)형광을 이용하여 활성산소종(ROS) 발생을 확인하였다.

[0090] 신선한 DCFH-DA 10 μM를 미리 따뜻하게 준비한 후, 상기 방법으로 UVA 조사 및 SJEE를 처리한 세포에 첨가하고 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척한 후, 세포 내 활성산소종의 수준에 해당되는 녹색 형광을 520 nm 롱-패스 필터가 장착된 Olympus FV-1000 레이저 형광현미경(Tokyo, Japan)으로 확인하였다.

[0091] 480 nm 여기 파장 및 530 nm 방출 파장을 이용한 형광측정기로 사람 피부섬유아세포 내 활성산소종(ROS)의 수준을 정량하였다.

[0092] 그 결과, UVA가 조사된 대조군(B)의 경우, 도 7과 같이 매우 많은 양의 형광이 나타났으며, 도 8과 같이 활성산소종(ROS)의 발생이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0093] 반면, 도 7 및 도 8과 같이 50, 100 및 200 μg/mL의 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)을 처리한 세포군의 활성산소종(ROS) 발생량은 대조군과 비교하여 각각 6.7%, 24.0% 및 30.1% 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0094] 상기 결과로부터 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)은 용량의존적으로 UVA 노출에 따른 활성산소종(ROS)의 발생을 감소시키는 것으로 확인되었다.

[0095] 3. 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)의 미토콘드리아 막 전위에 미치는 영향 확인

[0096] 상기 방법으로 UVA 조사 및 SJEE를 처리한 세포에 JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1'3,3'-tetrathylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide)염색을 수행하여 미토콘드리아 막 전위를 시각화하였다.

[0097] 미토콘드리아를 축적시키고 미토콘드리아 내막의 막 전위를 확인하기 위해 사용되는 JC-1는 비율 계량 형광 염료로, JC-1의 응집 및 단량체는 높고 낮은 미토콘드리아 막 전위를 나타내며 각각 적색 및 녹색 형광으로 나타

낸다.

[0098] UVA 조사 후, 세포에 5㎍/ml JC-1을 처리하고 37℃에서 30분간 인큐베이션한 후, JC-1 단량체는 499 nm(녹색)의 방출 파장에서, JC-1 응집은 561 nm(적색)에서 확인하였다. 이미지는 Olympus FV- 1000 레이저 형광 현미경(Tokyo, Japan)을 이용한 20 배율 렌즈로 얻었다.

[0099] 그 결과, 도 9와 같이 낮은 막 전위를 나타내는 JC-1 단량체(녹색) 및 높은 막 전위를 나타내는 JC-1 응집(적색)이 확인되었는데, UVA만 조사된 대조군(B)의 경우, 주로 녹색으로 염색된 것을 확인할 수 있었다.

[0100] 상기 결과로부터 대조군의 미토콘드리아 막 전위가 UVA에 의해 상당히 손실된 것을 확인할 수 있었다.

[0101] 반면, SJEE가 처리된 세포군에서는 SJEE의 용량의존적으로 미토콘드리아 막 전위 손실이 억제된 것을 확인할 수 있었다.

[0102] 4. 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 DNA 단편화에 미치는 영향 확인

[0103] 상기 방법으로 UVA 조사 및 SJEE를 처리한 세포를 수집하고 용해버퍼[0.3 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.2 M sucrose]를 이용하여 세포를 용해시키고 4℃에서 1,500 rpm으로 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다.

[0104] 그 다음, 세포를 PBS 1 mL로 세척하고 4℃에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전시켰다. 원심분리 후, RNase A(Sigma-Aldrich, USA)를 각 시료에 첨가하고 30 내지 60분간 인큐베이션한 후, 페놀-클로로포름으로 DNA를 추출하였다.

[0105] 추출된 DNA 단편을 1.5% (w/v) 아가로스 수평 겔 위에 로딩한 뒤 TBE 버퍼(pH 8.0)에서 15 V/cm로 전기영동을 수행하고, 겔을 에티듐 브로마이드로 염색하여 시각화하고 촬영하였다.

[0106] 염색체 DNA의 절단은 세포자연사(apoptosis) 세포 사멸의 주요 생화학적 특징으로 뉴클레오좀 내에서 약 200bp의 배수로 절단된 조각이 나타난다.

[0107] 이러한 세포자연사(apoptosis)의 DNA 분절을 나타내는 전형적인 패턴을 1 % 아가로스 겔 전기영동으로 확인한 결과, 도 10과 같이 SJEE의 뉴클레오좀 DNA 단편화를 감소시키는 능력이 확인되었다.

[0108] 5. 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 카스파제-3(caspase-3) 활성에 미치는 영향 확인

[0109] 제조사의 설명서에 따라 비색 카스파제-3 분석 키트(colorimetric caspase-3 assay kit; Millipore, USA)을 이용하여 사람 피부섬유아세포에서 카스파제-3의 활성을 확인하였다.

[0110] 먼저, 세포를 수집하고 용해 버퍼로 세포를 용해시켰다. 세포 용해물 20 μL과 20 μL 분석 버퍼 내 10 μL 카스파제-3 기질 아세틸-Asp-Glu-Val-Asp-p-나이트로아닐라이드가 포함된 반응 혼합물을 총 100 μL이 되도록 96-웰 플레이트에 넣고 분석을 수행하였다.

[0111] 혼합물을 37℃에서 90분간 인큐베이션하고 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0112] 그 결과, 도 11을 참고하면 100 ㎍/mL 아스코르브산을 처리한 대조군의 경우, UVA만 조사된 대조군과 비교하여 카스파제-3 활성이 16.6% 감소된 반면, 50, 100 및 200 ㎍/mL SJEE가 처리된 세포군에서는 카스파제-3 활성이 각각 30.6% ($p<0.05$), 29.9% ($P<0.01$) 및 45.9% ($P<0.01$)로 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0113] 상기 결과로부터 SJEE가 아스코르브산보다 효과적으로 카스파제-3 활성을 억제하는 것으로 확인되었다.

[0114] **<실시예 5> 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 유전자에 미치는 영향 확인**

[0115] 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 및 웨스턴 블롯 분석을 통하여 유전자 발현 변화를 확인하였다.

[0116] 1. 웨스턴 블롯 분석

[0117] 50, 100 및 200 ㎍/mL 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포를 1 % Nonidet P-40, 0.01% SDS 및 단백질분해효소 억제제 칵테일(Roche, Mannheim, Germany)이 포함된 0.1 M 트리스-HCl(pH 7.2) 버퍼를 이용하여 용해시켰다.

[0118] 세포 용해물의 단백질 함량은 BSA를 기준으로 Pierce Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc.,

Rockford, USA)으로 측정하였다.

[0119] 동일한 양의 단백질(10 mg)을 전기영동하여 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 분리시키고 니트로셀룰로스 막으로 옮긴 후 각각 단백질에 대한 특이적 항체인 항-Bax(1:500, ab7977; Abcam, UK), 항-Bcl-2(1:1,000, ab7973; Abcam, UK) 및 항-사이토크롬 c(1:500, sc-13561; Santa Cruz Biotechnology, USA)로 인큐베이션한 후, 막을 항-래빗 IgG (1:1,000; Santa Cruz Boitechnology, USA)로 인큐베이션하였다.

[0120] 면역 반응성 밴드를 ECL Western blotting detection reagents (Amersham, Bucks, UK)로 검출하고 Image J program (NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 밴드 강도를 정량하였으며, β-액틴을 내부 대조군으로 사용하였다.

[0121] 2. 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 Bcl-2 mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향 확인

[0122] 사람 피부섬유아세포에서 1 mL TRIzol(Invitrogen, CA)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라, 전체 RNA를 추출하였다.

[0123] 동일한 양의 전체 RNA(5 μg)를 5×몰로니 쥐 백혈병 바이러스 역 전사효소(Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; M-MLV RT) 버퍼 8 μL, dNTPs(10 mM) 3 μL, RNase 억제제(40 U/μL) 0.45 μL, M-MLV RT (200 U/μL; Promega, Madison, WI, USA) 0.3 μL 및 올리고 dT(20 μM; Bioneer, Daejeon, Korea) 3.75 μL이 포함된 반응 혼합물 40 μL로 역전사 시켰다.

[0124] 5×Green Go-Taq® Flexi reaction buffer 4 μL, 10 mM dNTPs 0.4 μL, 5 U/μL Taq polymerase, 25 mM $MgCl_2$ (Promega, USA) 1.2 μL 및 20 pM/μL의 Bcl-2 또는 β-액틴 프라이머 0.4 μL를 이용한 PCR을 수행하여 단일 가닥 cDNA를 증폭하였다. 각 프라이머의 염기서열은 표 1에 나타내었다.

[0125] 94℃에서 60초, 56℃에서 90초, 72℃에서 120초 38 싸이클 조건으로 PCR을 수행하였으며, PCR 산물을 1.2% 아가로스 젤에서 에티듐 브로마이드 염색을 통하여 시각화하였다.

[0126] DNA 밴드 밀도는 KODAK Gel Logic 100 image analysis system (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA)을 이용하여 정량적으로 분석되었다.

[0127] 목적 유전자의 상대적인 mRNA 발현 수준은 내부 대조군인 β-액틴으로 표준화하여 계산되었다.

[0128] 그 결과, 도 12와 같이 UVA만 조사된 대조군과 비교하여 50, 100 및 200 μg/mL SJEE가 처리된 세포에서 각각 107.4%, 127.8% 및 129.6% 씩 SJEE의 용량의존적으로 Bcl-2 mRNA의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0129] 또한, 도 13의 웨스턴 블롯 분석결과에서도 UVA만 조사된 대조군과 비교하여 50, 100 및 200 μg/mL SJEE가 처리된 세포에서 각각 52.1% ($p<0.01$), 77.6% ($p<0.001$) 및 96.8% ($p<0.001$) 씩 SJEE의 용량의존적으로 Bcl-2 단백질의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0130] 3. 초석잠 에탄올 추출물(SJEE)이 Bax mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향 확인

[0131] 상기 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하여 Bax mRNA의 발현을 확인하였으며, 웨스턴 블롯을 수행하여 Bax 단백질의 발현량을 확인하였다.

[0132] 사람 피부섬유아세포로부터 분리된 전체 RNA를 표 1의 Bax 또는 β-액틴 특이적 프라이머로 역전사 시켰다.

[0133] 94℃에서 60초, 58℃에서 90초, 72℃에서 120초로 35 싸이클 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 1.2% 아가로스 젤에서 확인하였으며, 내부 대조군인 β-액틴에 대한 Bax의 상대적 발현량을 확인하였다.

[0134] 그 결과 도 14와 같이 UVA만 조사된 대조군과 비교하여 50, 100 및 200 μg/mL SJEE가 처리된 세포에서 각각 47.2%, 48.6% 및 76.5%씩 SJEE의 용량의존적으로 Bax mRNA의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0135] 또한, 도 15의 웨스턴 블롯 분석결과에서도 UVA만 조사된 대조군과 비교하여 50, 100 및 200 μg/mL SJEE가 처리된 세포에서 각각 27.6% ($p<0.01$), 57.7% ($p<0.001$) 및 60.7% ($p<0.001$)씩 SJEE의 용량의존적으로 Bax 단백질의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0136] 4. 사이토크롬 C(cytochrome c) 발현 확인

[0137] 상기 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하여 사이토크롬 c 발현을 확인하였으며, 웨스턴 블롯을 수행하여 사이토크롬 c 단백질의 발현량을 확인하였다.

[0138] 사람 피부섬유아세포로부터 분리된 전체 RNA를 표 1의 사이토크롬 c 또는 β-액틴 특이적 프라이머로 역전사 시켰다.

[0139] 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 60초로 30 싸이클 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 1.2% 아가로스 젤에서 확인하였으며, 내부 대조군인 β-액틴에 대한 사이토크롬 C의 상대적 발현량을 확인하였다.

[0140] 그 결과, 도 16와 같이 UVA만 조사된 대조군과 비교하여 50, 100 및 200 μg/mL SJEE가 처리된 세포에서 각각 6.6%, 8.5% 및 31.1% ($p<0.001$)씩 SJEE의 용량의존적으로 사이토크롬 c mRNA의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0141] 또한, 도 17의 웨스턴 블롯 분석결과에서도 UVA만 조사된 대조군과 비교하여 50, 100 및 200 μg/mL SJEE가 처리된 세포에서 각각 11.2%, 13.6% 및 38.8% ($p<0.05$)씩 SJEE의 용량의존적으로 사이토크롬 c 단백질의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

표 1

[0142]

유전자		프라이머	예상 크기(염기쌍)
Bcl-2	정방향(5'→3')	CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC(서열번호 1)	318
	역방향(3'→5')	CCGCATGCTGGGCCGTACAGTTCC(서열번호 2)	
Bax	정방향(5'→3')	GGCAATCTGACCTTCAACTG(서열번호 3)	306
	역방향(3'→5')	AGTCTCTTGAGGACCCAACC(서열번호 4)	
cytochrome c	정방향(5'→3')	ATGGGTAAAGGATCTGATTCAGGAAG(서열번호 5)	298
	역방향(3'→5')	AACTTTCACGGTTCTTCGGTAGAATT(서열번호 6)	
β-액틴	정방향(5'→3')	CCCACTAACATCAAATGGGG(서열번호 7)	478
	역방향(3'→5')	ACACATTGGGGGTAGGAACA(서열번호 8)	

[0143] 한편, 본 발명에 따른 초석잠 추출물은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기에서는 본 발명에 따른 초석잠 추출물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0144] **<제제예 1> 약학조성물의 처방예**

[0145] <제제예 1-1> 주사제의 제조

[0146] 초석잠 에탄올 추출물 10 mg, 소디움 메타비설파이트 3.0 mg, 메틸파라벤 0.8 mg, 프로필파라벤 0.1 mg 및 주사용 멸균증류수 적량을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2 ㎖이 되도록 제조한 후, 2 ㎖ 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

[0147] <제제예 2-1> 정제의 제조

[0148] 초석잠 에탄올 추출물 10 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

[0149] <제제예 3-1> 캡슐제의 제조

[0150] 초석잠 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.

[0151] <제제예 4-1> 연고제의 제조

[0152] 초석잠 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.

[0153] **<제제예 2> 화장료 조성물의 제제예**

[0154] <제제예 2-1> 영양 로션의 제조

[0155] 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 세스퀴올레

이트 0.5 중량부, 유동 파라핀 10.0 중량부, 솔비탄 스테아레이트 1.0 중량부, 친유형 모노스테아린산 글리세린 0.5 중량부, 스테아린산 1.5 중량부, 글리세릴스테아레이트/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 초석잠 에탄올 추출물을 투입하여 25℃까지 냉각한 뒤 숙성시켰다.

[0156] <제제예 2-2> 영양 크림의 제조

[0157] 카르복시폴리머 0.3 중량부, 부틸렌글리콜 5.0 중량부, 글리세린 3.0 중량부

[0158] 및 잔량의 정제수를 혼합교반하면서 80 내지 85℃로 가열하여 제조부에 투입한 후 유화기를 작용시키고, 스테아린산 2.0 중량부, 세틸알콜 2.0 중량부, 글리세릴모노 스테아레이트 2.0 중량부, 폴리옥시에틸렌솔비탄모노스테아레이트 0.5 중량부, 솔비탄세스퀴올레이트 0.5 중량부, 글리세릴모노스테아레이트/글리세릴스테아레이트/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 초석잠 에탄올 추출물을 투입하여 25℃까지 냉각한 뒤 숙성시켰다.

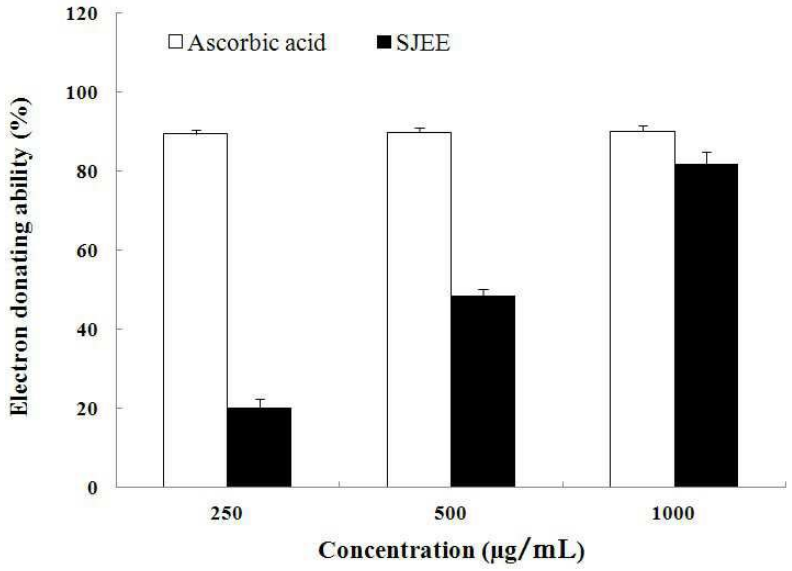
[0159] **<제제예 3> 건강식품의 제조**

[0160] 초석잠 에탄올 추출물 0.5 ㎎, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트 70 ㎍, 비타민 E 1.0 ㎎, 비타민 B 1 0.13 ㎎, 비타민 B 2 0.15 ㎎, 비타민 B 6 0.5 ㎎, 비타민 B 12 0.2 ㎍, 비타민 C 10 ㎎, 비오틴 10 ㎍, 니코틴산아미드 1.7 ㎎, 엽산 50 ㎍, 판토텐산 칼슘 0.5 ㎎) 및 무기질 혼합물 적량(황산제1철 1.75 ㎎, 산화아연 0.82㎎, 탄산마그네슘 25.3 ㎎, 제1인산칼륨 15 ㎎, 제2인산칼슘 55 ㎎, 구연산칼륨 90㎎, 탄산칼슘 100 ㎎, 염화마그네슘 24.8 ㎎)을 혼합한 다음 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다.

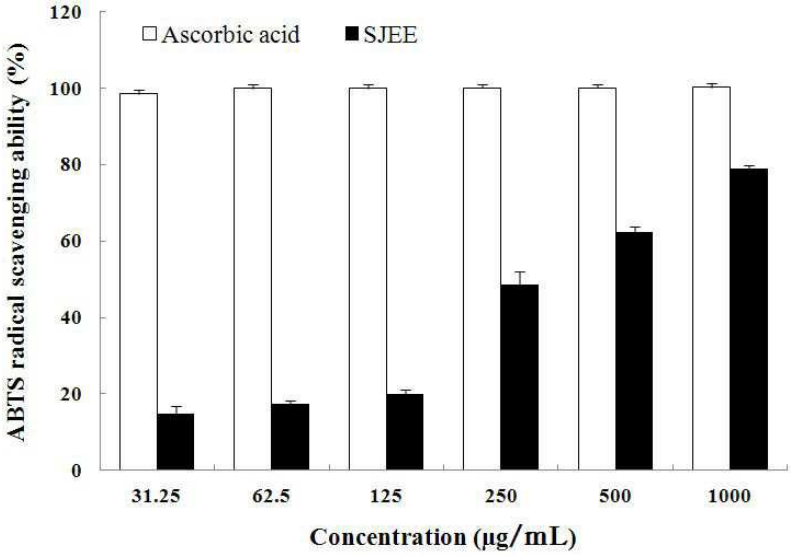
[0161] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

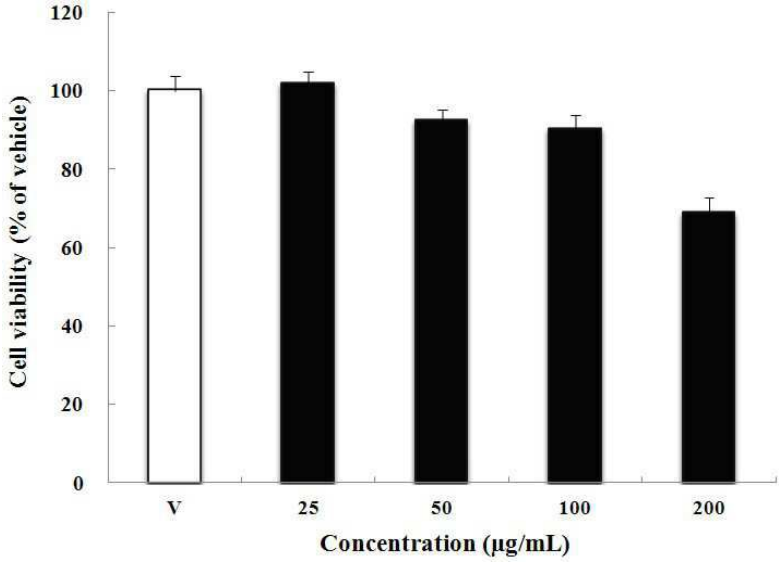
도면1



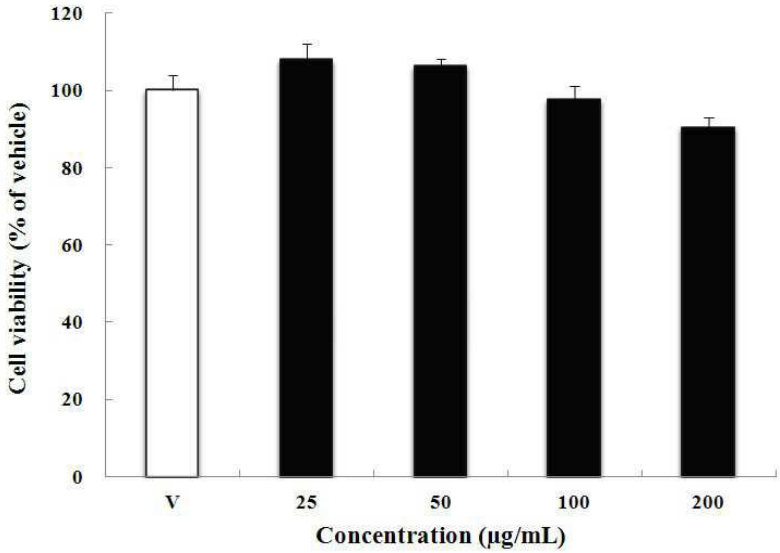
도면2


Ascorbic acid
SJEE
ABTS radical scavenging ability (%)
120
100
80
60
40
20
0
31.25
62.5
125
250
500
1000
Concentration (μg/mL)

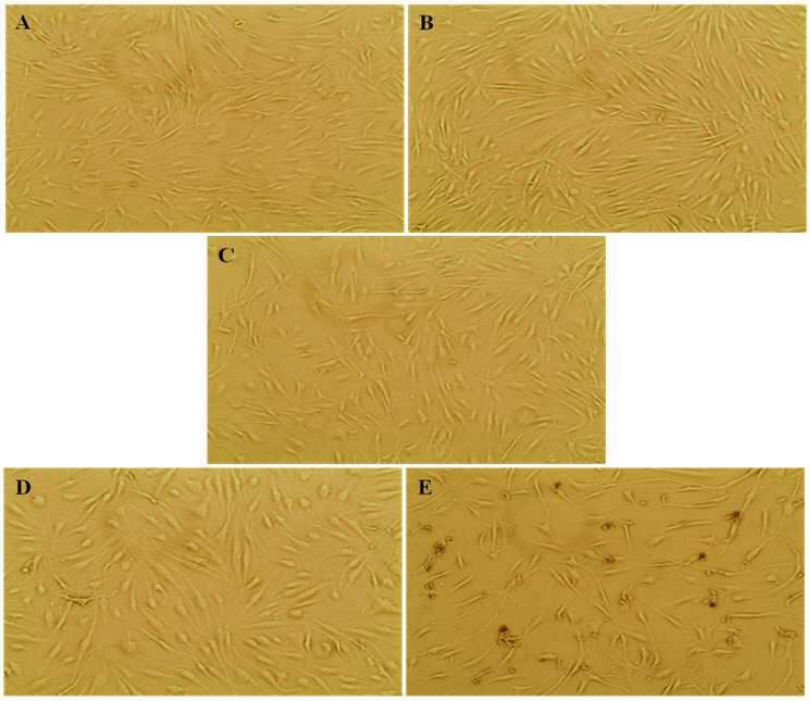
도면3


Cell viability (% of vehicle)
120
100
80
60
40
20
0
V
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

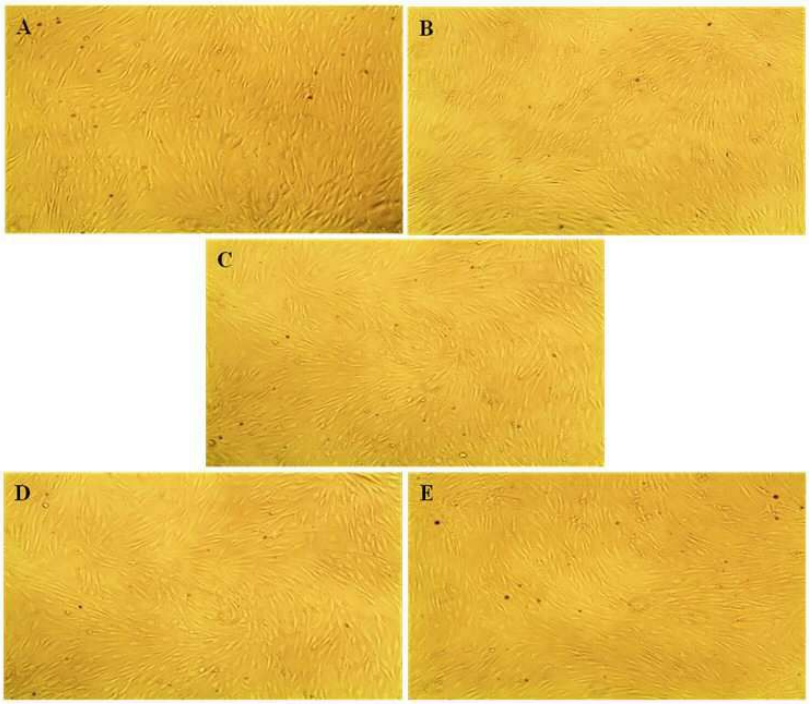
도면4


120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (% of vehicle)
V
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

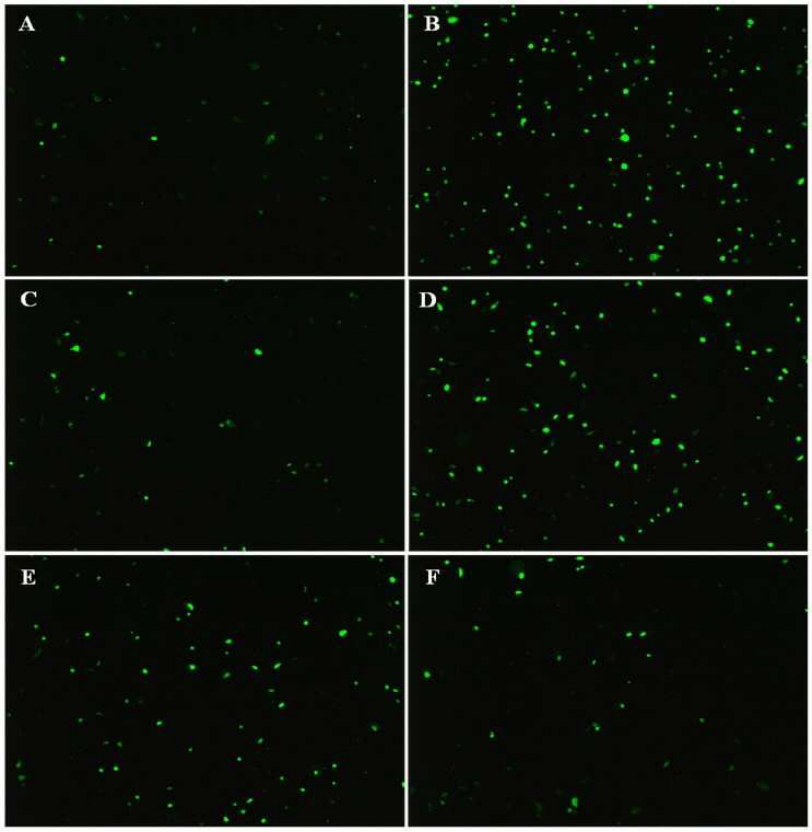
도면5


A
B
C
D
E

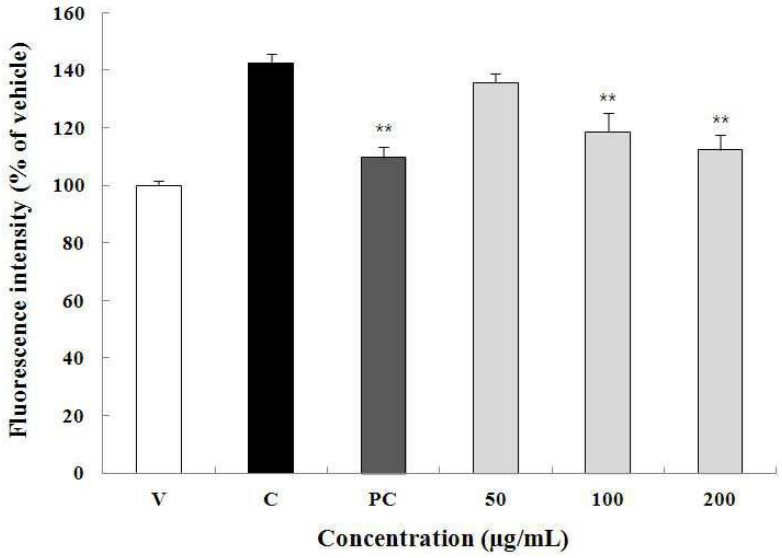
도면6



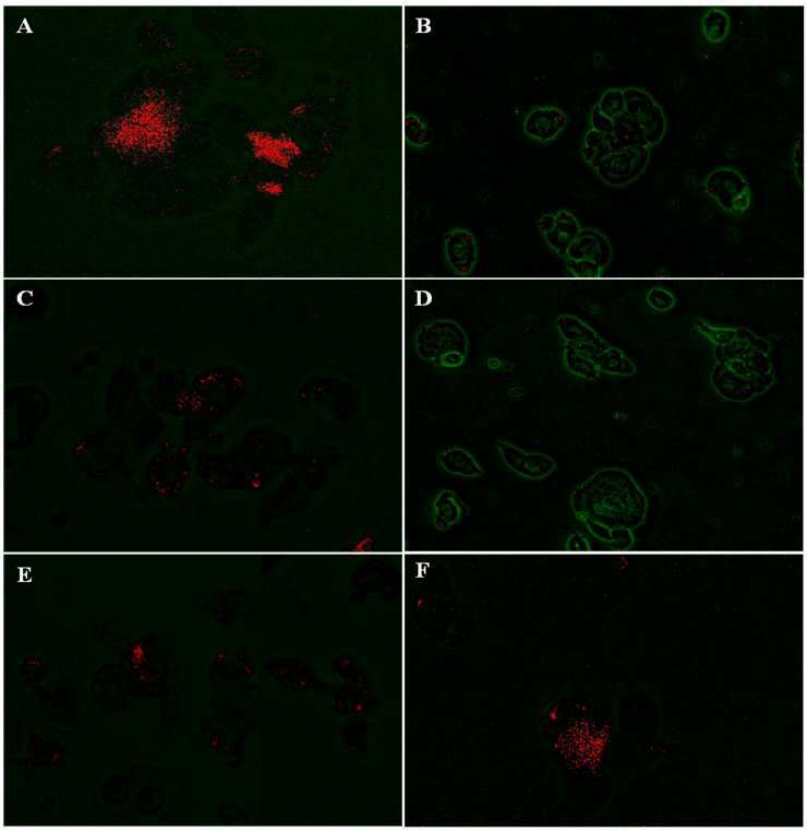
도면7



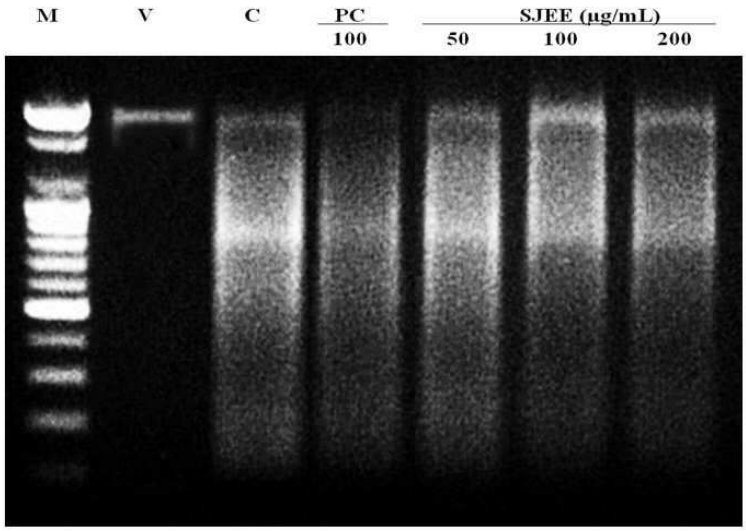
도면8


Fluorescence intensity (% of vehicle)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
V
C
PC
50
100
200
Concentration (μg/mL)

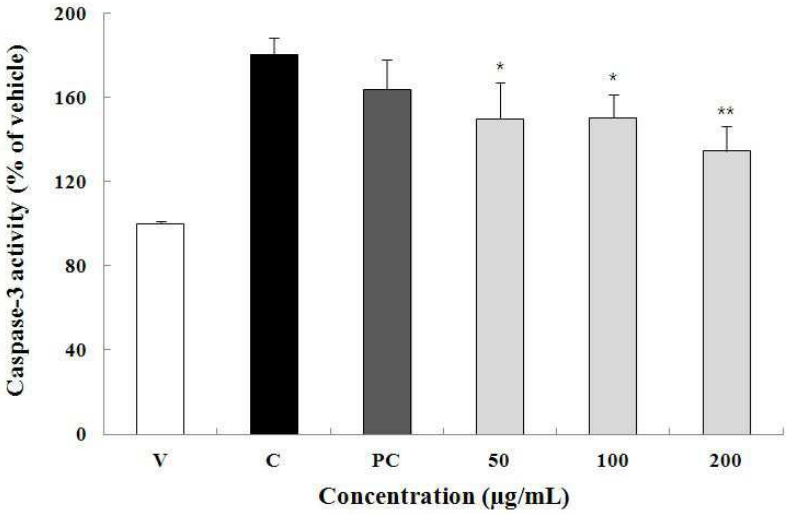
도면9


A
B
C
D
E
F

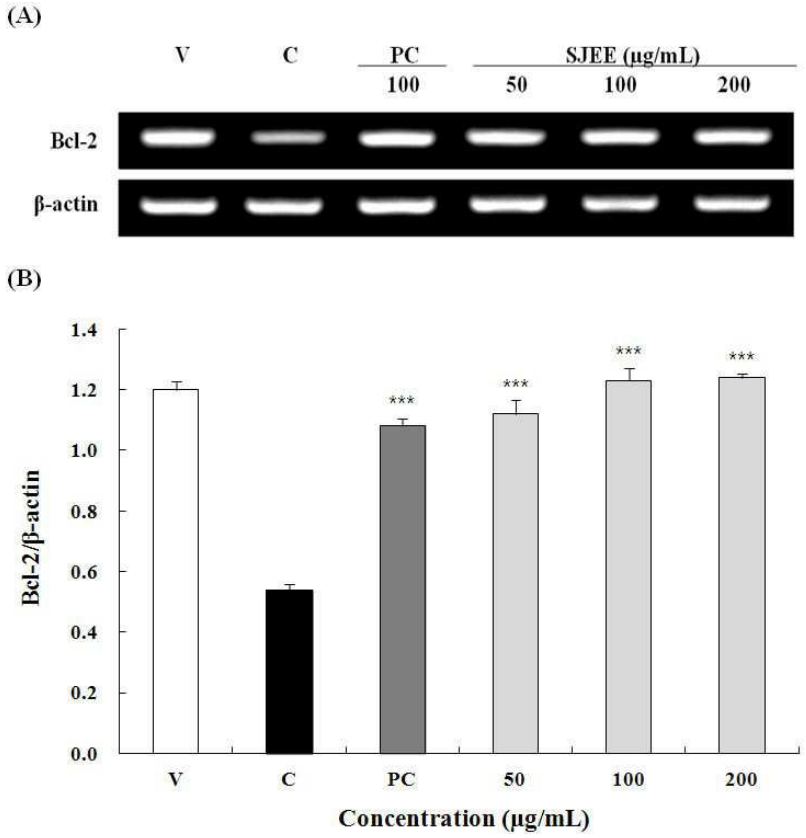
도면10


M
V
C
PC
100
SJEE (μg/mL)
50
100
200

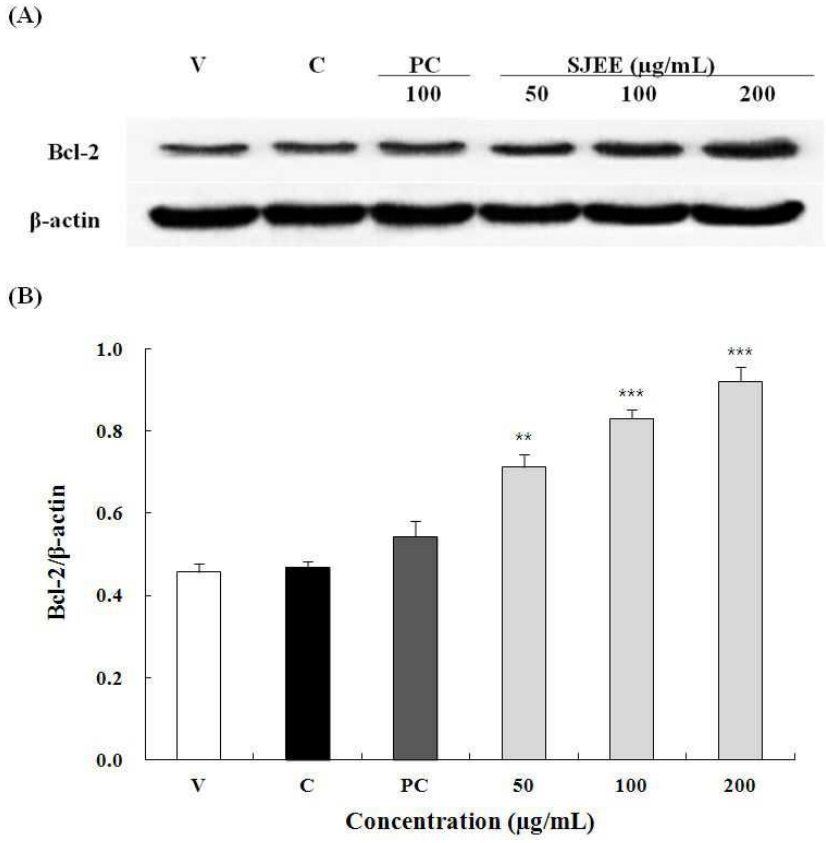
도면11


Caspase-3 activity (% of vehicle)
200
160
120
80
40
0
*
*
**
V
C
PC
50
100
200
Concentration (μg/mL)

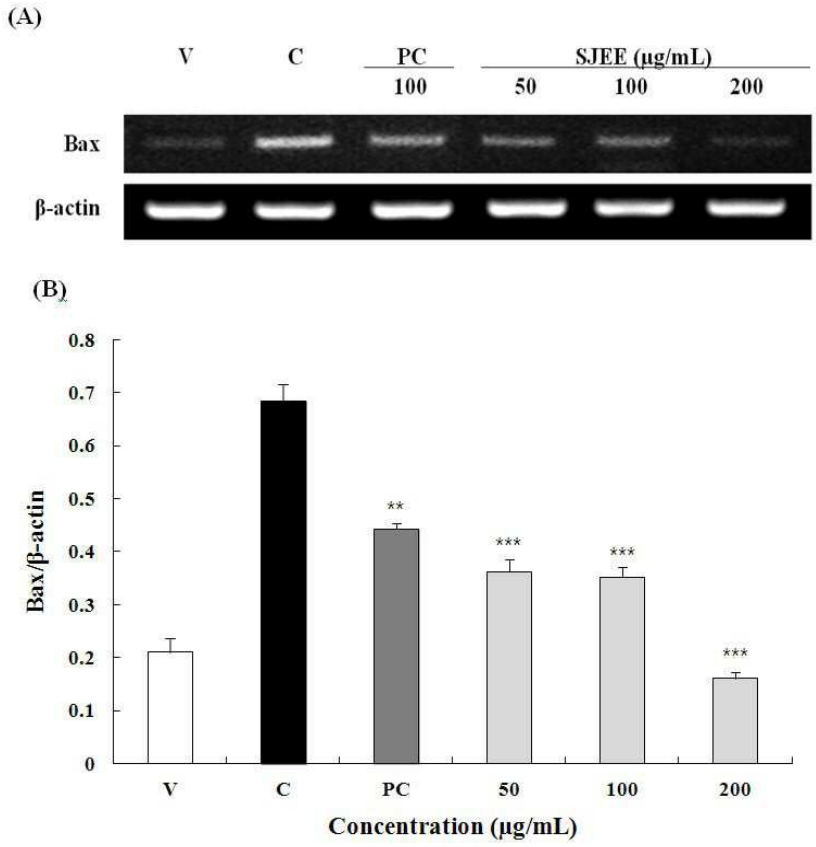
도면12


(A)
V
C
PC
SJEE (μg/mL)
100
50
100
200
Bcl-2
β-actin
(B)
Bcl-2/β-actin
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
***
***
***
V
C
PC
50
100
200
Concentration (μg/mL)

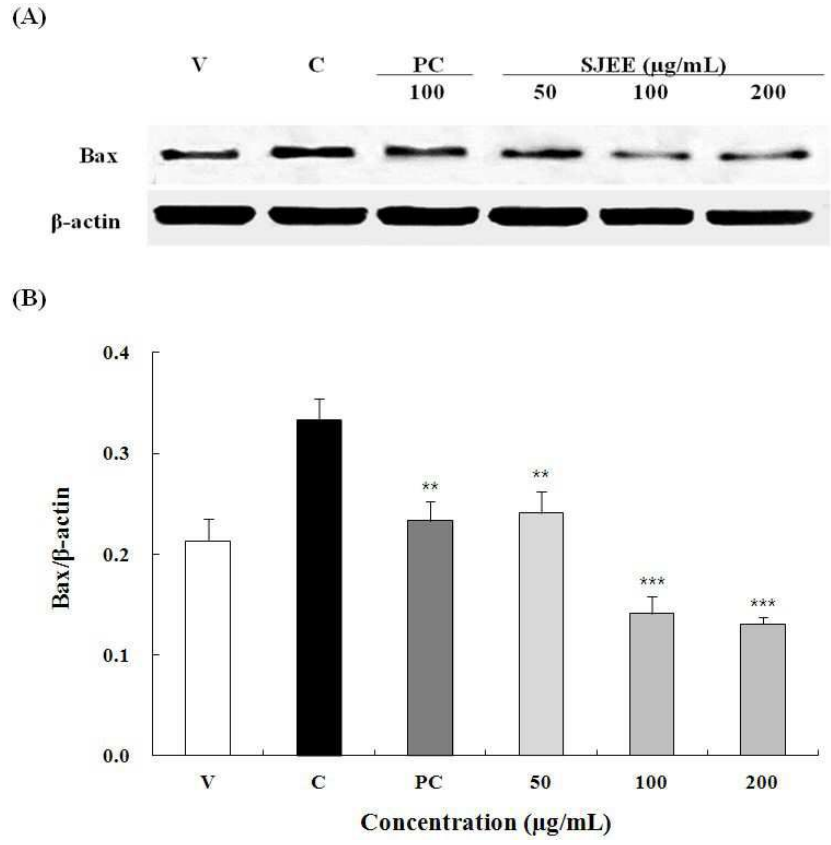
도면13


(A)
V
C
PC
SJEE (μg/mL)
100
50
100
200
Bcl-2
β-actin
(B)
Bcl-2/β-actin
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
***
***
V
C
PC
50
100
200
Concentration (μg/mL)

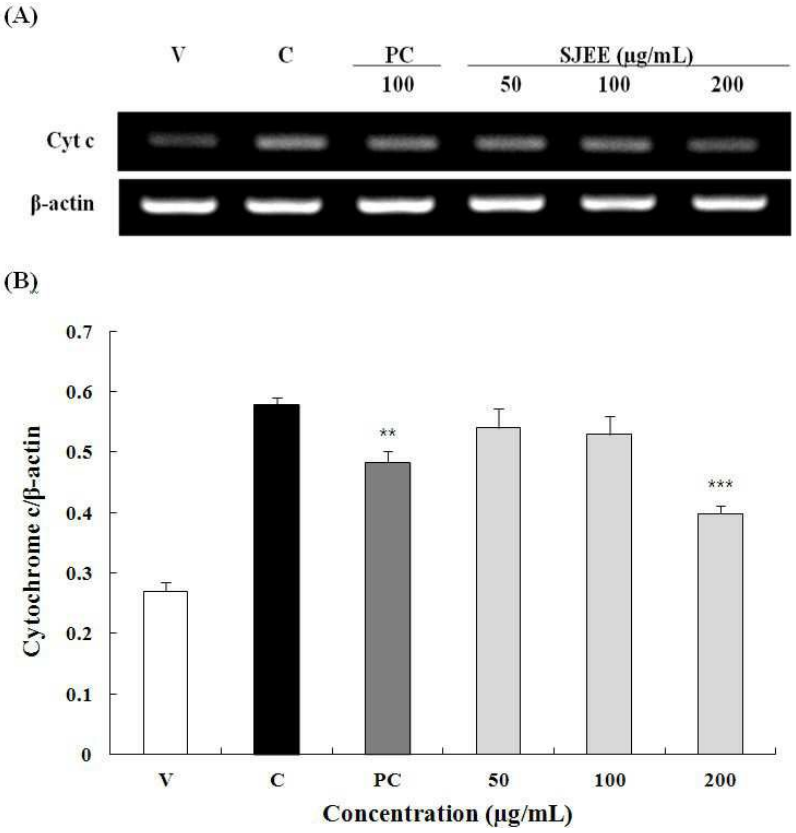
도면14


(A)
V
C
PC
SJEE (μg/mL)
100
50
100
200
Bax
β-actin
(B)
Bax/β-actin
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
**
***
***
***
V
C
PC
50
100
200
Concentration (μg/mL)

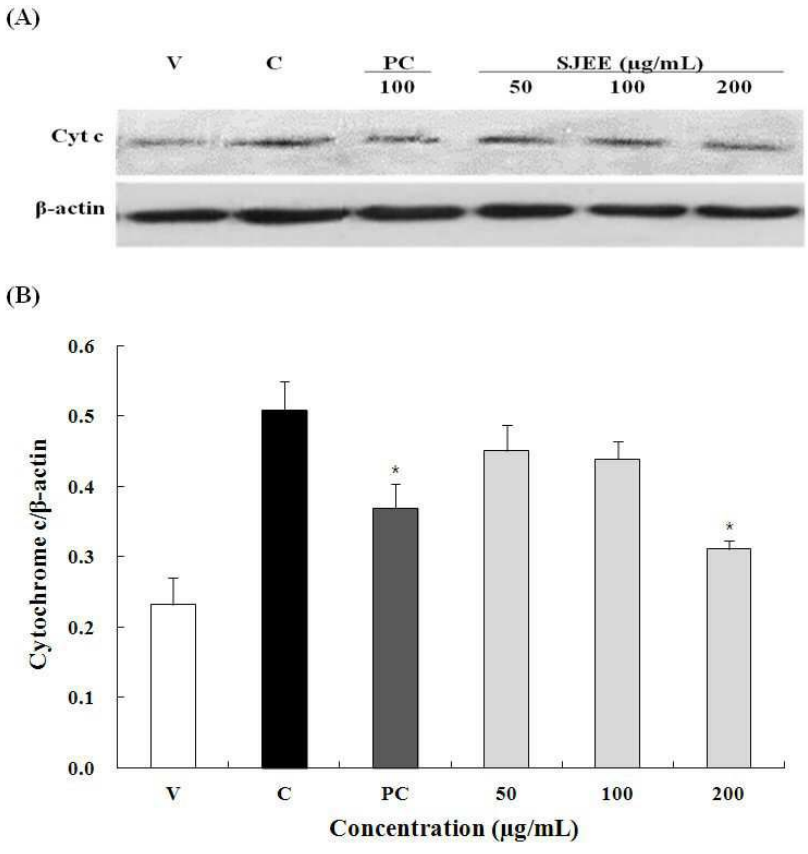
도면15


(A)
V
C
PC
SJEE (μg/mL)
100
50
100
200
Bax
β-actin
(B)
Bax/β-actin
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
**
***
***
V
C
PC
50
100
200
Concentration (μg/mL)

도면16


(A)
V
C
PC
SJEE (μg/mL)
100
50
100
200
Cyt c
β-actin
(B)
Cytochrome c/β-actin
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
**
***
V
C
PC
50
100
200
Concentration (μg/mL)

도면17


(A)
V
C
PC
SJEE (μg/mL)
100
50
100
200
Cyt c
β-actin
(B)
Cytochrome c/β-actin
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
V
C
PC
50
100
200
Concentration (μg/mL)

서 열 목 록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY

<120> Pharmaceutical composition for preventing or treating skin cell damage by light irradiation comprising extract of stachys japonica

<130> ADP-2015-0085

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bcl-2 forward

<400> 1

cgacgacttc tcccgccgct accgc 25

<210> 2

<211>

24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bcl-2 reverse

<400> 2

ccgcatgctg ggccgtacag ttcc 24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bax forward

<400> 3

ggcaatctga ccttcaactg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bax reverse

<400> 4

agtctcttga ggacccaacc 20

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cytochrome c forward

<400> 5

atgggtaaag gatctgattc aggaag 26

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cytochrome c reverse

<400> 6

aactttcacg gttcttcggt agaatt 26

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin forward

<400

> 7

cccactaaca tcaaatgggg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin reverse

<400> 8

acacattggg ggtaggaaca 20