



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0089099
(43) 공개일자 2020년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61Q 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0005753
(22) 출원일자 2019년01월16일
심사청구일자 2019년01월16일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
강세찬
경기도 수원시 영통구 청명로 16, 405호(영통동)
백현진
서울특별시 동작구 동작대로39가길 55, 101동 201호(동작동, 동작동금강KCC아파트)
권정은
경기도 수원시 영통구 반달로 76, 204호(영통동)
(74) 대리인
위병갑

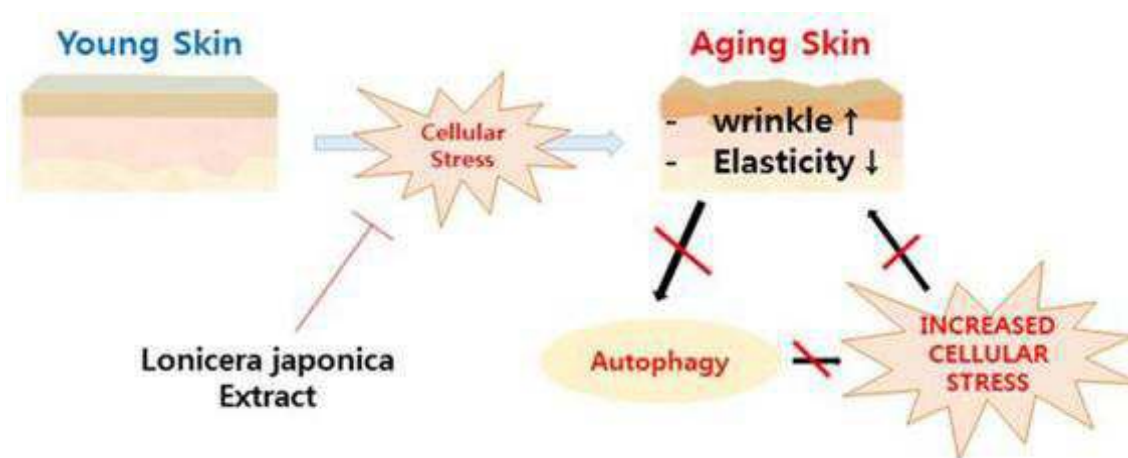
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 피부 개선용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 피부 개선용 화장품 조성물에 관한 것으로 보다 구체적으로는 금은화 추출물을 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 금은화 추출물은 피부세포에서 세포 재생과 지방 축적, 그리고 자가포식 억제를 통해 세포의 재생과 피부 주름개선 효능을 가지고 있기 때문에 화장품의 소재로서 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2800/782 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20150007420042002

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 정보통신기술진흥센터

연구사업명 2019년 Grand ICT연구센터지원사업

연구과제명 Grand ICT 라이프 컴패니온쉽 경험을 위한 지능형 인터랙션 융합 연구

기 여 율 1/1

주관기관 성균관대학교 산학협력단

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

금은화(Lonicera japonica) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 다가 알코올, 탄화수소계 용매 또는 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 추출용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 피부 개선용 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 피부세포의 재생 또는 피부세포의 지방 축적을 증가시키는 것을 특징으로 하는 피부 개선용 화장품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 추출물은 자가포식을 억제시켜 피부세포의 재생을 촉진하는 것을 특징으로 하는 피부 개선용 화장품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 추출물은 콜라겐을 증가시키고 MMP1 또는 MMP3을 감소시키는 것을 특징으로 하는 피부 개선용 화장품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 추출물은 화장품 조성물 전체 중량에 대하여 0.01 내지 20 중량%로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 개선용 화장품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 화장품 조성물은 유연 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 수중유 형 에멀전, 유중수 형 에멀전, 페이스크림 무수 생성물, 고체 무수 생성물, 소구체를 사용한 수성 상에서의 오일분 산물, 이온성 지방 소포체, 비이온성 지방 소포체, 연고, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 보디오일, 수중유 형메

이크업베이스, 유중수 형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도우, 마스카라, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종의 제형인 것을 특징으로 하는 피부 개선용 화장품 조성물.

청구항 8

금은화를 추출용매가 담긴 반응기에 투입하여 추출시키는 단계; 및

상기 추출된 추출물을 여과하고, 여과액을 회전진공농축기를 사용하여 용매를 제거시키는 단계;

를 포함하는 금은화 추출물 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 추출용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 다가 알코올, 탄화수소계 용매 또는 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 금은화 추출물 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피부 개선용 화장품 조성물에 관한 것으로 보다 구체적으로는 금은화 추출물을 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 과학의 발달로 인하여 여러 우수한 성분 및 소재들이 개발되어 피부에 대한 효과가 커져가고 있으며 그로 인해 피부재생 및 주름개선에 효능을 화장품 개발이 이루어지고 있다. 현재 피부 재생 및 주름개선을 위한 화장품은 콜라겐 및 엘라스틴을 주요 타겟으로 출시되어 왔고, 그를 타겟으로 한 연구가 진행되었으나 새로운 기술은 현재 개발되지 않고 있기 때문에 경쟁력이 점차 떨어지고 있는 실정이다. 또한 노화가 진행되며 피부 내 지방의 감소로 인해 피부에 꺼짐과 탄력도 저하가 발생하게 된다. 이때 지방 이식 기술을 통해 피부 탄력도를 회복시키는 방법도 최근 들어 많이 수행되고 있으나 이는 안면비대칭, 이물감, 통증 등 다양한 부작용이 보고되고 있다.

[0004] 금은화(Lonicera japonica)는 인동과의 인동덩굴의 꽃봉오리를 말하며, 항산화 효능과 항염증 효능이 있는 것으로 알려져 있어 항염증 및 항산화 효능을 입증한 논문과 특허가 많은 천연물이다. 기존의 기술에서는 금은화의 각질세포 형성 손상에 대한 보호효과, 아토피 피부염 개선효능, 피부 미백 효능, 피부 주름 개선, 가려움증 개선, 피부 노화 방지 등 피부재생 및 주름개선에 대한 효능이 밝혀진 바 있다.

[0005] 이에 금은화를 이용해 기존에 알려진 기술이 아닌 새로운 피부재생 및 주름개선 효능을 가진 기술을 개발하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1515443호

(특허문헌 0002) 일본 공개특허 제2009-269900호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에, 본 발명자들은 피부재생 및 주름개선에 효능이 있는 천연물을 발굴하고자, 금은화로부터 추출물을 제조하였으며 제조된 금은화 추출물이 피부세포인 NIH3T3 세포에서 농도 의존적으로 세포 재생과 지방 축적을 유도하여 세포내 지방축적에 우수한 효능을 확인하였고, 피부노화로 인해 진행된 자가포식(autophagy)을 금은화 추출물이 억제함과 동시에 피부 탄력 관련 인자들을 통해 피부세포의 재생 및 주름개선 효능을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은, 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 목적을 달성하기 위해 본 발명의 일실시예에 따르면 금은화(Lonicera japonica) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0012] 여기서 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 다가 알코올, 탄화수소계 용매 또는 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 추출용매로 추출될 수 있다.
- [0013] 또한, 상기 추출물은 피부세포의 재생 또는 피부세포의 지방 축적을 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 또한, 상기 추출물은 자가포식을 억제시켜 피부세포의 재생을 촉진하는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 또한, 상기 추출물은 콜라겐을 증가시키고 MMP1 또는 MMP3을 감소시키는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 또한, 상기 추출물은 화장품 조성물 전체 중량에 대하여 0.01 내지 20 중량%로 함유할 수 있다.
- [0017] 여기서, 상기 화장품 조성물은 유연 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 수중유 형에멀전, 유중수 형 에멀전, 페이스크림, 무수 생성물, 고체 무수 생성물, 소구체를 사용한 수성 상에서의 오일분산물, 이온성 지방 소포체, 비이온성 지방 소포체, 연고, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 보디오일, 수중유 형메이크업베이스, 유중수 형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨케어, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이 케익, 아이섀도우, 마스크라, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종의 제형일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면 금은화를 추출용매가 담긴 반응기에 투입하여 추출시키는 단계; 및 상기 추출된 추출물을 여과하고, 여과액을 회전진공농축기를 사용하여 용매를 제거시키는 단계;를 포함하는 금은화 추출물 제조 방법을 제공한다.
- [0019] 여기서, 상기 추출용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 다가 알코올, 탄화수소계 용매 또는 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 전술한 바와 같은 본 발명에 따르면, 본 발명의 금은화 추출물은 피부세포에서 세포 재생과 지방 축적, 그리고 자가포식 억제를 통해 세포의 재생과 피부 주름개선 효능을 가지고 있어, 이를 통해 본 발명은 화장품의 소재로서 활용할 수 있다.
- [0022] 이상에서의 본 발명에 따른 효과는 상기에 한정되는 것은 아니며, 기타 본 발명의 효과들은 후술할 실시예 및 청구범위에 기재된 사항을 통하여 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 분명하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 본 발명의 금은화 추출물의 피부 개선 효과를 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 금은화 추출물의 용매 별 세포 증식 효과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 금은화 분획물의 용매 별 세포 증식 효과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 금은화 추출물의 용매 별 지방 축적 효과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 금은화 분획물의 용매 별 지방 축적 효과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 에탄올 농도별 금은화 추출물의 세포 증식 효과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 에탄올 농도별 금은화 추출물의 지방 축적 효과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명의 금은화 추출물과 인슐린의 세포 증식 및 지방 축적을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 본 발명의 금은화 추출물의 자가 포식 관련 인자 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 본 발명의 금은화 추출물의 자가포식 관련 LC3-II와 I의 비율을 나타낸 것이다.
- 도 11은 본 발명의 금은화 추출물의 자가포식 유도된 세포의 세포 증식 및 지방 축적 효과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 본 발명의 금은화 추출물의 콜라겐 발현 증가 효과를 나타낸 것이다.
- 도 13은 본 발명의 금은화 추출물의 MMP1과 MMP3의 발현 감소 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명하도록 한다.
- [0026] 본 발명은 피부 개선용 화장품 조성물에 관한 것으로 보다 구체적으로는 금은화 추출물을 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 따르면 금은화(Lonicera japonica) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0028] 여기서 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 다가 알코올, 탄화수소계 용매 또는 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 추출용매로 추출될 수 있다. 다만, 상기 금은화로부터 추출물을 추출하기 위한 용매로는 화장품에서 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 제한되지 않으나 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 에탄올(주정)을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 30 내지 100% 에탄올을 사용하는 것이 좋다.
- [0029] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 금은화 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0030] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 금은화 추출물은 상기한 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획물을 얻을 수도 있다.
- [0031] 따라서 본 발명에 있어서 금은화 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 의미이다.
- [0032] 본 발명에서 제조된 금은화 추출물은 피부세포의 재생 또는 피부세포의 지방 축적을 증가시킬 수 있으며, 또한, 자가포식을 억제시켜 피부세포의 재생을 촉진할 수 있다. 또한, 상기 추출물은 콜라겐을 증가시키고 MMP1 또는 MMP3발현을 감소시켜 피부탄력을 증가시킬 수 있다.

- [0033] 본 발명에서 상기 추출물은 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.01 내지 20 중량%로 함유할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에서 상기 금은화 추출물은 화장료 조성물에 1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ (또는 1~1000ppm)의 농도로 포함될 수 있다.
- [0035] 여기서, 상기 화장료 조성물은 유연 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 수중유 형에멀전, 유중수 형 에멀전, 페이스크림 무수 생성물, 고체 무수 생성물, 소구체를 사용한 수성 상에서의 오일분산물, 이온성 지방 소포체, 비이온성 지방 소포체, 연고, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 보디오일, 수중유 형메이크업베이스, 유중수 형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨케어, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이 케익, 아이섀도우, 마스크라, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종의 제형일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 화장료 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 수렴화장수, 유연화장수, 영양화장수, 각종 크림, 에센스, 팩, 파운데이션 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 유효성분(금은화 추출물)의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001 내지 40중량%이며, 바람직하게는 0.0005 내지 40%이며, 보다 바람직하게는 0.01 내지 20중량%이다. 상기 유효성분(금은화 추출물)의 함량이 0.00001중량% 미만이면 피부 주름개선 효과가 크게 감소되고, 40중량%를 초과하는 경우에는 피부 자극을 초래할 수 있으며, 제형상의 문제점이 발생할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 일실시예에 따른 화장료 조성물은 추가의 보조 또는 첨가 물질로서, 순한 계면활성제, 오일 보디(oil body), 에멀션화제, 고지방화제(hyperfating agent), 진주 러스터 왁스, 점조도 부여 물질(consistency substance), 증점제, 중합제, 실리콘 화합물, 지방, 왁스, 안정화제, 생물기원 활성 물질, 탈취제, 비듬억제제, 막 형성제, 팽윤제, 향산화제, 무기 착색 안료, 굴수성유발물질, 방부제, 방충제, 자기 탄닌제(self tanning agent), 가용성화제, 향료 기름, 착색제 등을 함유할 수 있다.
- [0039] 구체적인 본 발명의 일실시예에 따른 금은화 추출물을 이용하는 화장료 조성물의 제형화의 예를 하기에 나타내었다. 다만, 하기 제형화는 본 발명을 구체화하기 위한 것으로, 이에 국한되지 않을 것이다.

[0041] 제형예 1. 크림

표 1

원료	함량 (% , w/w)
금은화 추출물	5.0
카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	7.0
시어버터	2.0
토코페릴 아세테이트	0.6
스테아린산	2.0
세테아릴알코올/폴리소르베이트60	4.0
잔탄검	0.1
글리세린	3.0
1,3-부틸렌글리콜	3.0
트리에탄올아민	0.5
방부제	미량
정제수	잔량

[0044] 제형예 2. 로션

표 2

원료	함량 (% , w/w)
금은화 추출물	5.0
카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	6.0
토코페릴 아세테이트	0.4

세테아릴알코올/세테아레스-20	3.0
글리세릴스테아레이트/피이지-100 스테아레이트	3.0
잔탄검	0.2
글리세린	2.0
1,3-부틸렌글리콜	3.0
방부제	미량
정제수	잔량

[0047] 제형예 3. 스프레이

표 3

원료	함량 (% w/w)
금은화 추출물	5.0
부틸옥틸살리실레이트	5.0
토코페릴 아세테이트	1.0
아크릴레이트/옥틸아크릴아마이드 코폴리머	3.0
에틸알코올	잔량

[0050] 제형예 4. 스틱

표 4

원료	함량 (% w/w)
금은화 추출물	5.0
부틸옥틸살리실레이트	5.0
토코페릴 아세테이트	1.0
비즈왁스	22.0
소르비탄올리베이트	10.0
실리카	5.0
방부제	미량
아이소프로필미리스테이트	잔량

[0053] 한편, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면 금은화를 추출용매가 담긴 반응기에 투입하여 추출시키는 단계;를 포함하는 금은화 추출물 제조 방법을 제공한다.

[0054] 여기서, 상기 추출용매는 상기에서 개시된 화장료 조성물에서 이용한 추출용매를 동일하게 이용할 수 있다.

[0055] 보다 구체적으로는 건조한 금은화를 70% 에탄올을 추출용매로 사용하여 환류냉각 추출한다.

[0056] 또한, 상기 추출된 추출물을 여과하고, 여과액을 회전진공농축기를 사용하여 용매를 제거시키는 단계;를 포함하여 금은화 추출물을 제조할 수 있다.

[0057] 이러한 금은화 추출물은 에탄올, n-헥산(n-hexane), 클로로포름 또는 물을 이용하여 추가적으로 분획과정을 더 거쳐 순도 높은 금은화 추출물이나 분획물을 수득할 수 있고, 바람직하게는 에탄올 분획물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명의 금은화 추출물의 피부 개선 효과를 도 1에 도시하였다. 도 1에 따르면 본 발명에서 제조된 금은화 추출물은 피부세포에서 세포 증식과 지방 축적, 그리고 자가포식 억제제를 통해 세포의 재생과 피부 주름개선 효과를 가진다.

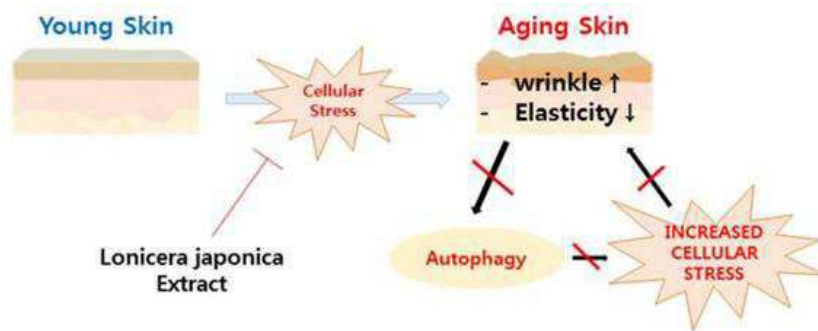
- [0060] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.
- [0062] <실시예 1> 금은화 추출물 및 분획물의 제조
- [0063] 본 발명의 추출에 쓰인 금은화는 시판중인 건조된 금은화를 이용하였다. 금은화 추출은 반응기에 금은화를 투입하고, 추출용매로 에탄올, 헥세인, 클로로포름, 물을 각각 이용하여 추출하였다. 추출용매는 건조 금은화 부피 대비 10 내지 20 배로 사용하였으며, 상온에서 24시간동안 교반추출 하였다. 추출 후 감압여과기를 이용하여 여과를 진행하고, 여과액은 회전진공농축기를 사용하여 용매를 제거하여 추출물을 제조하였다. 용매가 제거된 추출물은 물로 희석한 후 에탄올, 헥세인, 클로로포름 순으로 순차 분획하였으며, 회전진공농축기로 용매를 제거하여 분획물을 제조하였다.
- [0065] <실시예 2> 금은화 용매별 추출물 및 분획물의 세포 증식 실험(cell proliferation test)
- [0066] -실험방법
- [0067] 96well cell culture plate에 NIH3T3 cell을 5×10^3 cells/well로 분주한 뒤 농도 별 (0-100 μ g/ml) 로 금은화 용매별 추출물 또는 분획물을 각각 처리하고 72시간 뒤 세포 증식(cell proliferation)을 측정하였다.
- [0068] -실험결과
- [0069] 금은화 용매별 추출물을 이용하여, 세포 증식 실험 결과, 에탄올, 헥세인 추출물에서 세포 증식 효과가 있는 것을 확인하였다 (도 2).
- [0070] 금은화 분획물을 이용하여 세포 증식 실험 결과, 에탄올, 헥세인, 클로로포름, 물 분획물 모두에서 세포 증식 효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히, 에탄올 추출물에서 세포증식 효과가 높은 것을 확인하였다 (도 3).
- [0072] <실시예 3> 금은화 용매별 추출물 및 분획물의 지방 축적 실험(lipid accumulation test)
- [0073] -실험방법
- [0074] 96well cell culture plate에 NIH3T3 cell을 5×10^3 cells/well로 분주한 뒤 농도 별 (0-100 μ g/ml) 로 금은화 용매별 추출물 또는 분획물을 각각 처리하고 72시간 뒤 AdipoRed 시약을 이용해 지방 축적(lipid accumulation)을 측정하였다.
- [0075] -실험결과
- [0076] 각각의 금은화 추출물을 이용한 지방 축적 실험결과, 에탄올 추출물에서 유의적으로 지방 축적 효능이 뛰어난 것을 확인하였다(도 4).
- [0077] 금은화 분획물을 이용한 지방 축적 실험결과에서는, 에탄올 분획물에서 지방축적(lipid accumulation) 효능이 뛰어난 것을 확인했다(도 5).
- [0078] 상기 실시예 2 및 실시예 3의 세포 증식 결과와 지방축적 결과에서 금은화 에탄올 추출물에서, 에탄올 추출을 통해 지방 축적 효능을 가진 활성물질이 존재하는 것으로 확인하였으며, 이후, 금은화 에탄올 추출물을 이용하여 금은화 추출물의 주름 개선 및 세포 재생 효과를 확인하였다.
- [0080] <실시예 4> 금은화 EtOH %별 추출물 세포 증식 실험(cell proliferation test)
- [0081] -실험방법
- [0082] 96well cell culture plate에 NIH3T3 cell을 5×10^3 cells/well로 분주한 뒤 농도 별 (0-100 μ g/ml) 로 금은화 EtOH %별 추출물을 처리하고 72시간 뒤 세포 증식(cell proliferation)을 측정하였다.
- [0083] -실험결과

- [0084] 세포 증식 실험 결과, 30, 50, 및 70% 에탄올 추출물에서 세포 증식 효과가 잇는 것을 확인하였다(도 6).
- [0086] <실시에 5> 금은화 EtOH %별 추출물 지방 축적 실험(lipid accumulation test)
- [0087] -실험방법
- [0088] 96well cell culture plate에 NIH3T3 cell을 5×10^3 cells/well로 분주한 뒤 농도 별 (0-100 μ g/ml) 로 금은화 에탄올 %별 추출물을 처리하고 72시간 뒤 AdipoRed 시약을 이용해 지방 축적(lipid accumulation)을 측정하였다.
- [0089] -실험결과
- [0090] 지방 축적 실험결과, 70, 100% 에탄올 추출물에서 지방축적(lipid accumulation) 효능이 뛰어난 것을 확인했다(도 7). 상기 실시예 4 및 실시예 5의 세포 증식 결과와 지방 축적 결과를 바탕으로 금은화 70% 에탄올 추출물을 선정하고, 추후 실험은 70% 에탄올 추출물로 진행하였다.
- [0092] <실시에 6> 인슐린(insulin)과의 효능 비교
- [0093] 인슐린(insulin)은 포유류의 성장, 태아 세포 분열 및 대사조절에 중요한 역할을 하는 인자로, 피부세포에서도 세포 증식(cell proliferation)과 지방 축적(lipid accumulation)에 영향이 있으며, 자가포식 억제 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 본 실시예에서는 양성대조군으로 인슐린(insulin)을 설정하여 효능을 비교하였다.
- [0094] - 실험방법
- [0095] 96well cell culture plate에 NIH3T3 cell을 5×10^3 cells/well로 분주한 뒤 농도 별 (0-100 μ g/ml) 로 금은화 EtOH %별 추출물과 insulin (1 μ g/ml)을 처리하고 72시간 뒤 cell proliferation과 lipid accumulation을 확인하였다.
- [0096] - 실험결과
- [0097] insulin은 양성대조군으로써 세포 증식과 지방 축적에 효능이 있으며, 금은화 70% EtOH 추출물에서도 세포 증식과 지방 축적 효능을 확인하였다(도 8).
- [0099] <실시에 7> 금은화 70% EtOH 추출물의 자가포식(autophagy) 억제 효능
- [0100] 피부노화로 인해 진행된 자가포식(autophagy)을 금은화 추출물이 억제할 수 있는지를 확인하였다.
- [0101] -실험방법
- [0102] 1) 96well cell culture plate에 NIH3T3 cell을 5×10^3 cells/well로 분주한 뒤 농도 별 (0-100 μ g/ml) 로 금은화 EtOH %별 추출물과 인슐린 (1 μ g/ml), 3-MA (1mM, inhibitor)을 2시간 전처리 후, 자가포식 유도를 위해 500nM rapamycin (inducer) 처리, 72시간 뒤 자가포식(autophagy) 억제 효능을 확인하였다.
- [0103] 2) 6well cell culture plate에 NIH3T3 cell을 1×10^5 cells/well로 분주한 뒤 농도 별 (0-100 μ g/ml)로 금은화 EtOH %별 추출물과 인슐린 (1 μ g/ml)을 각각 2시간 전처리 후 자가포식 유도를 위해 500nM rapamycin 처리, 72시간 뒤 웨스턴 블롯(western blot)으로 자가포식(autophagy) 억제 효능을 확인하였다.
- [0104] -실험결과
- [0105] 실험결과, 금은화 70% EtOH 추출물에서 자가포식 억제 효능이 있는 것을 확인했고(도 9), 자가포식 관련 marker 인 LC3를 확인했을 때, LC3-II와 I의 비율이 감소하는 것을 확인하여 자가포식이 억제되는 것을 확인했다(도 10).
- [0107] <실시에 8> 자가포식이 유도된 상태에서 금은화 70% 에탄올 추출물을 처리시 세포 증식 및 지방 축적의 증가

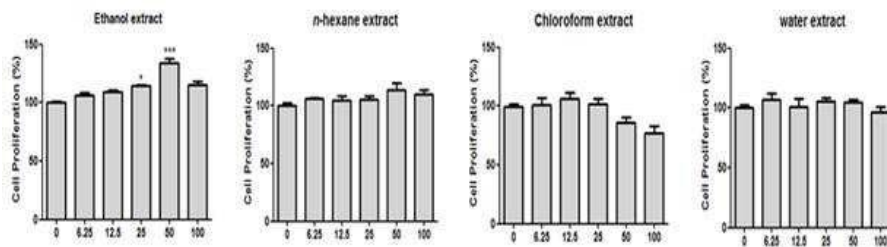
- [0108] -실험방법
- [0109] 96well cell culture plate에 NIH3T3 cell을 5×10^3 cells/well로 분주한 뒤 농도 별 (0-100 μ g/ml) 로 금은화 EtOH %별 추출물과 인슐린 (1 μ g/ml), 3-MA (1mM, inhibitor)을 각각 2시간 전처리 후 자가포식 유도를 위해 500nM rapamycin (inducer) 처리, 72시간 뒤 세포 증식(cell proliferation)과 지방 축적(lipid accumulation)되는지를 확인하였다.
- [0110] -실험결과
- [0111] 실험결과, 자가포식 유도으로 의해 감소했던 세포 증식과 지방 축적이 금은화 70% EtOH 추출물을 처리했을 때 다시 증가하는 것을 확인했다(도 11).
- [0113] <실시예 9> 금은화 70% EtOH 추출물 처리시 MMP1, MMP3, collagen 발현 확인
- [0114] 피부탄력과 관련 있는 marker인 MMP1, MMP3, collagen의 발현 확인을 통해 금은화 70% EtOH 추출물의 피부세포의 재생 및 주름개선 효능을 확인하였다.
- [0115] - 실험방법
- [0116] 6well cell culture plate에 NIH3T3 cell을 5×10^3 cells/well로 분주한 뒤, TNF- α 처리로 손상을 유도, 농도 별 (25-100 μ g/ml)로 금은화 EtOH %별 추출물을 처리, 24시간 뒤 세포수확기(cell harvest) 처리 후 qRT-PCR을 이용해 콜라겐(collagen) 발현 확인, 웨스턴 블롯(western blot)을 이용해 MMP1, MMP3 발현을 확인하였다.
- [0117] - 실험결과
- [0118] 1) collagen 발현 확인
- [0119] TNF- α 처리 군에 비해 금은화 70% EtOH 추출물을 처리한 군에서 collagen발현이 증가하는 것을 확인했다(도 12).
- [0120] 2) MMP1, MMP3 발현 확인
- [0121] TNF- α 처리 군에 비해 금은화 70% EtOH추출물을 처리한 군에서 MMP1과 MMP3의 발현이 감소하는 것을 확인했다(도 13).
- [0123] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

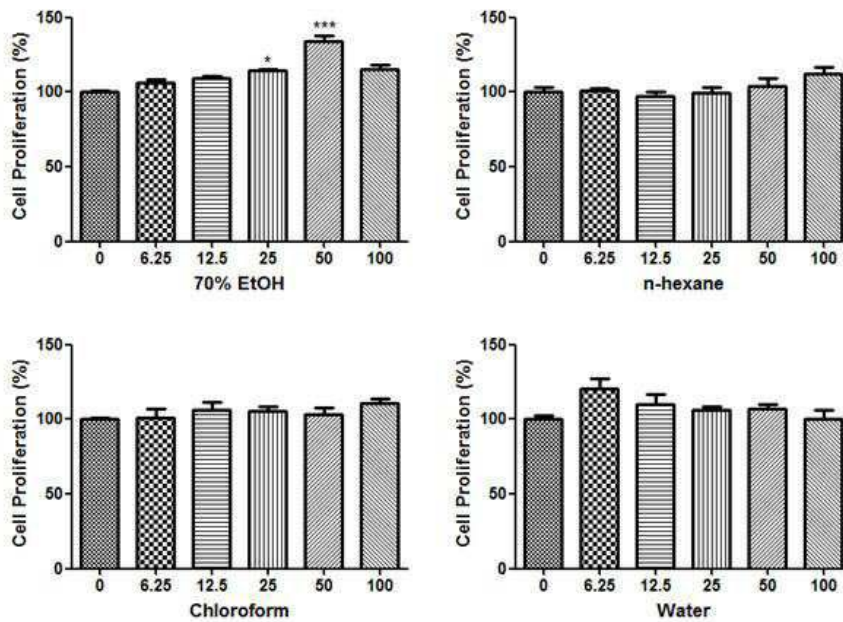
도면1



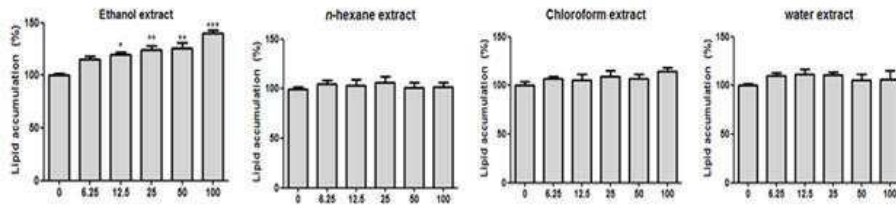
도면2



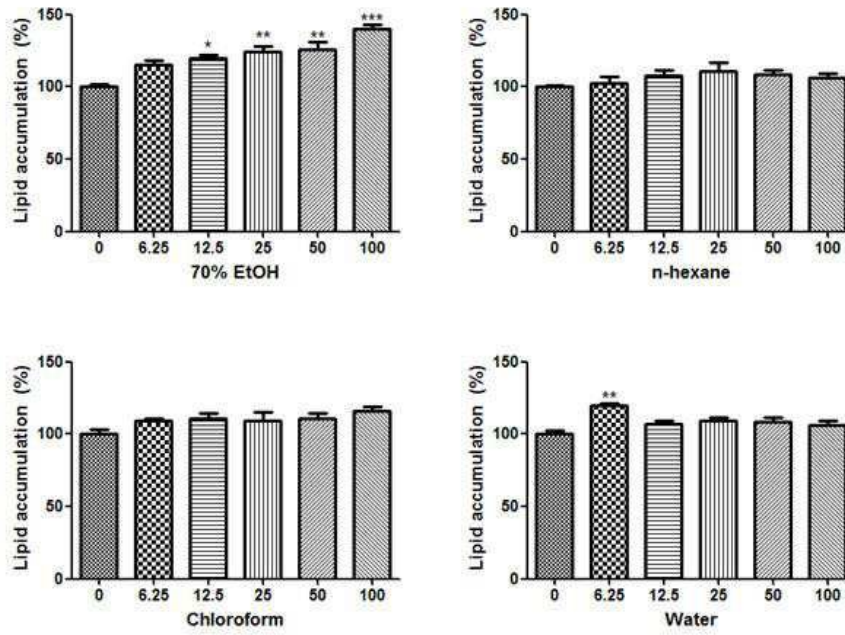
도면3



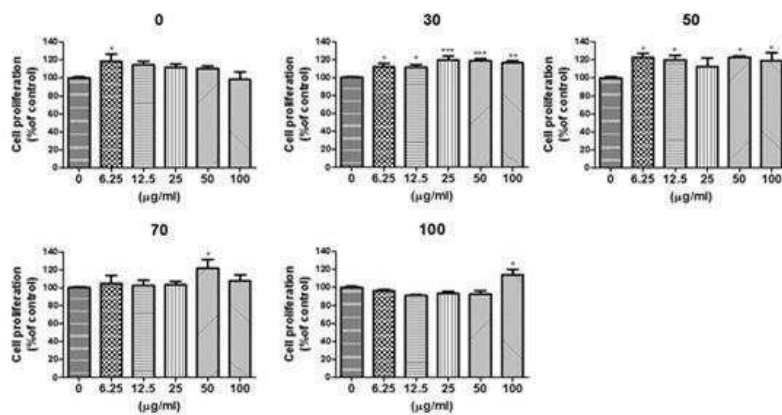
도면4



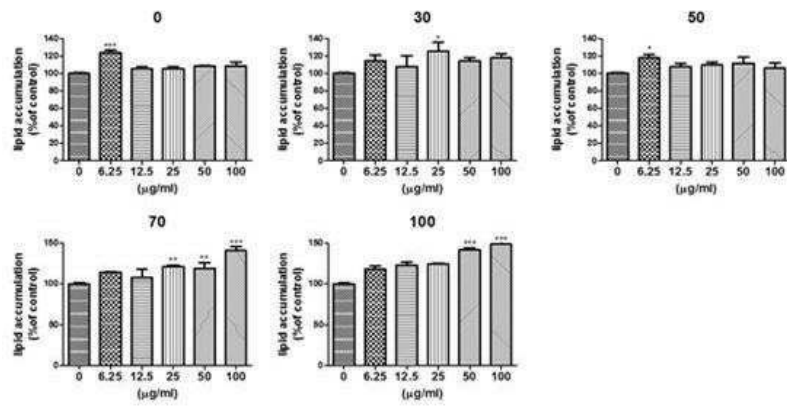
도면5



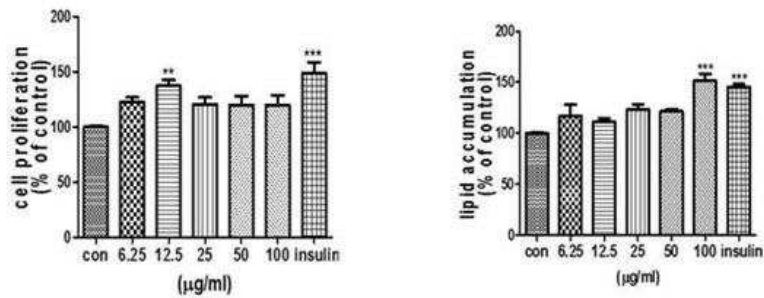
도면6



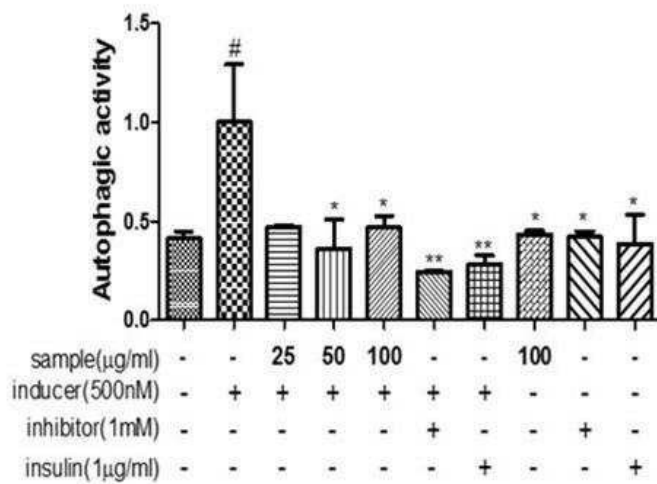
도면7



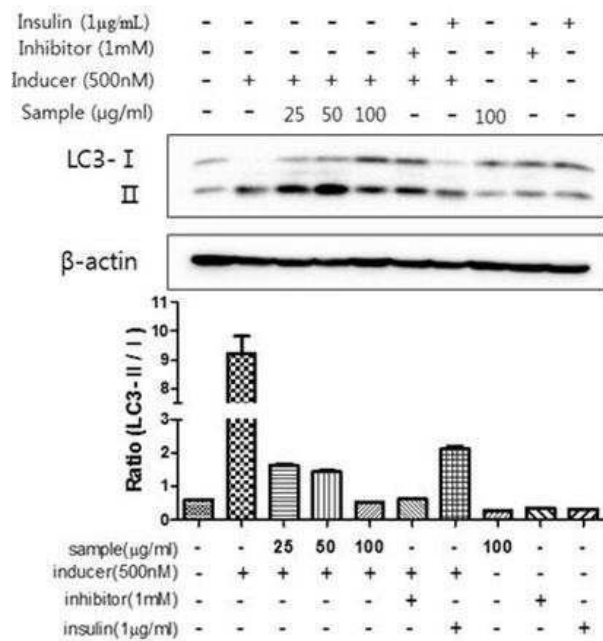
도면8



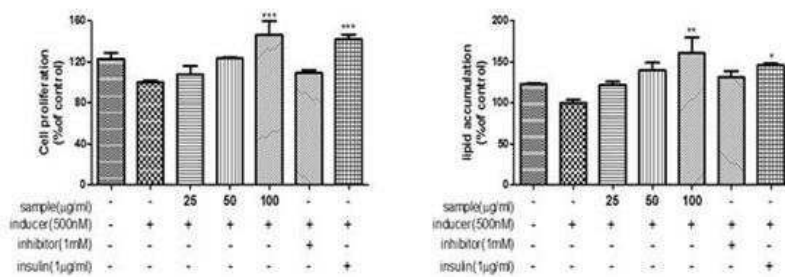
도면9



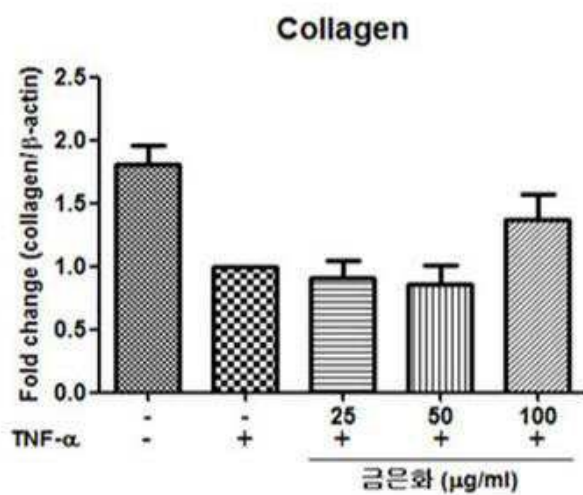
도면10



도면11



도면12



도면13

