



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0119085
(43) 공개일자 2009년11월19일

(51) Int. Cl.

A61K 8/60 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0044924

(22) 출원일자 2008년05월15일

심사청구일자 2008년05월15일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

동아대학교 산학협력단

부산 사하구 하단2동 840번지 동아대학교 산학협력단

(72) 발명자

김혜정

경상남도 진주시 주악동 금호아파트 101동 1302호

장기철

경상남도 사천시 정동면 대곡리 255

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

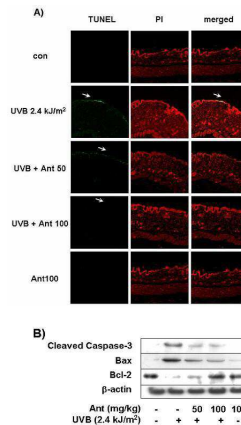
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 안토시아닌을 포함하는 자외선 조사에 의해 유도된아팍토시스 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 안토시아닌, 구체적으로 검정콩에서 유래한 안토시아닌을 포함하는 자외선 조사에 의해 유도된 아팍토시스 억제용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 우수한 아팍토시스 억제 활성을 나타내고 자외선에 의한 염증 과정을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 인체에 독성을 나타내지 않으므로, 식품, 의약품, 화장품 등에 유용하게 사용할 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 피부손상 보호용 화장품 제제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

신성철

경상남도 진주시 평거동 평거한보아파트 101동 609호

정종일

경상남도 진주시 하대동 하대현대아파트 101동 1301호

정영기

경상남도 김해시 장유면 대청리 푸르지오8차아파트 903동 2001호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 307003-03-1-HD140, KRF-2006-311-E00392

부처명 농림부, 한국학술진흥재단

연구사업명 농림기술개발과제, 기초과학 지원사업

연구과제명 생활 습관성 질환개선 제품 개발, 새로운 안토시아닌계활성물질의 자외선 조사에 의한 피부에서의 광노화 및 염증반응에 대한 생리활성 및 보호기전 연구

주관기관 농림부, 한국학술진흥재단

연구기간 2007년 05월 30일 ~ 2008년 05월 29일, 2007년 01월 01일 ~ 2007년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

안토시아닌을 포함하는 자외선 조사에 의해 유도된 아폽토시스 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 안토시아닌은 검정콩에서 유래한 것인 조성물.

청구항 3

제 1항의 조성물을 포함하는 자외선 조사에 의한 피부손상 보호용 화장품 제제.

청구항 4

제 3항에 있어서, 화장품 제제는 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이에센스, 아이크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩 또는 파우더의 제형을 가짐을 특징으로 하는 제제.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 안토시아닌, 구체적으로 검정콩에서 유래한 안토시아닌을 포함하는 자외선 조사에 의해 유도된 아폽토시스 억제용 조성물에 관한 것으로, 특히, 상기 조성물의 피부손상 보호용 화장품 제제로의 이용에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 자외선 B (ultraviolet B: UVB)를 이용한 광선 치료는 세포-매개 면역 반응과 세포 증식에 대한 억제 효과로 인하여, 건선을 포함한 다양한 피부질환을 치료하기 위하여 임상적으로 적용되어 왔다. 그러나, UV 조사는 포유류에서 피부 노화 및 악성 형질전환을 포함하는 햇빛과 관련된 대부분의 유해한 생물학적 결과의 원인으로 작용한다(Elder DE. et al., J Invest Dermatol. 1989;2:297S-303S; Nomura T. et al., Cancer Res. 1997;57:2081-2084). 특히, UVB는 지질, 단백질 및 핵산을 포함하는 생물학적 고분자를 손상시키는 것으로 알려졌다. UVB는 인간 피부암의 발생에 주요한 역할을 하며(Ley RD. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:4337; Matsui MS, deLeo VA. In: Mukhtar H, ed. Boca Raton, FL: CRC Press Inc. 1995;21-30), 암 개시자 및 암 촉진자로 작용하는 것으로 알려졌다(Ananthaswamy HN, Pierceall WE. Photochem Photobiol. 1990;52:1119-36; Staberg B. et al., J Invest Dermatol. 1983;81:517-9). 또한 UVB에 피부각질형성세포가 노출되면 세포 주기 정지, DNA 복구 및/또는 아폽토시스에 관련된 여러 유전자의 발현이 초래된다. UV 조사는 광선에 의한 발암(photocarcinogenesis)의 원인이 되는 많은 생물학적 효과를 피부에 미친다.
- <3> 피부의 급성 UVB 노출에 대한 염증 변화는 홍반, 염증 매개자의 생성, 혈관 반응의 변경 및 염증성 세포 침윤을 포함한다. 피부 및 전신성 면역에서의 변경은 UV-유도 염증 및 손상의 결과로 발생되며, 피부각질형성세포 및 다른 피부-관련 세포에 의한 사이토카인 생성의 변화, 피부에서 부착 분자 발현의 변화 및 항원-제시 세포(antigen-presenting cell) 기능상실을 포함한다(Clydesdale GJ. et al., Immunol Cell Biol. 2001;79:547-68). 이런 사건들은 발암성의 변형세포(carcinogenic-altered cells)를 제거하기 위한 면역계 능력을 복구시킨다. 따라서, 급성 및 만성 UVB 노출에 따른 관찰된 염증 반응은 산화 스트레스 기작에 의한 피부 발암의 원인이 된다. UV 조사-유도 지질 과산화(lipid peroxidation)는 PGE₂를 포함한 프로스타글란딘의 생성을 증가시키고, 이는 피부에서 염증을 유발한다(Hruza LL, Pentland AP. J Invest Dermatol. 1993;100:S35-S4). PGE₂는 COX-2 에 의해 아라키돈산으로부터 생성된다.
- <4> 많은 연구에 의하면, UVB 조사는 배양된 피부각질형성세포 뿐만 아니라 인간 피부에서도 COX-2 유전자 발현을 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 유의성 있게 증가시키는 것으로 알려졌다(Buckman SY. et al., Carcinogenesis 1998;19:723-9; Pentland AP. et al., Carcinogenesis 1999;20:939-44; Athar M. et al.,

Biochem Biophys Res Commun. 2001;280:1042-47; An KP. et al., Photochem Photobiol. 2002;76:73-80). 이에 따른 프로스타글란딘의 합성은 UV 조사에 의해 유도된 피부 발암의 원인이 된다(Grewe M. et al., J Invest Dermatol. 1993;101:528-31). UVB 방사선 만성 노출시 표피에서의 특이적인 상향조절로 인하여, COX-2 수준은 잠재적 피부종양의 초기 마커로 실질적인 사용이 가능하다 (Buckman SY. et al., Carcinogenesis 1998;19:723-9; Athar M et al., Biochem Biophys Res Commun. 2001;280:1042-47). COX-2의 선택적 억제제인 셀레록십의 경구 투여는 태양에 의한 자극성 방사선에 의해 유도된 마우스 피부암의 발병과 수를 유의성 있게 감소시키는 것을 보여주는 설득력 있는 증거들이 존재한다(Pentland AP. et al., Carcinogenesis 1999;20:939-44). 종합할 때, 이러한 결과들은 광선에 의한 발암에서 아라키돈산/프로스타글란딘 경로의 역할을 보여줄 뿐만 아니라, UV 조사에 의해 유도된 피부암의 억제에서 COX-2 억제제의 치료학적 가치를 보여주는 것이다.

<5> 건강한 호기성 기관에서, ROS 및 RNS와 같은 다른 자유 라디칼의 생성은 항산화 방어 시스템에서 대략적인 균형을 맞추게 되나, 초과된 ROS 생성은 ROS/RNS 생성과 항산화 방어 간의 심각한 불균형을 초래한다. 그 결과, 이러한 상황들은 DNA, 단백질 및 지질에 대하여 산화적 손상을 유발하고, UV에 의해 유발된 산화적 스트레스는 염증, 아폽토시스 및 발암의 원인이 된다. 따라서, 이러한 유해한 경로를 효과적으로 감소시키는 항산화제에 대하여 연구하고 있다.

<6> 최근의 연구에 의하면 UVB에 의해 유도된 ROS는 염증을 유발할 수 있고 DNA 손상, 지질 과산화 및 효소 활성의 변형을 포함하는 다수의 기작에 의한 암 촉진자로 작용하는 것으로 증명되었다 (Goldberg HJ. et al., Biochem J. 1990;267:461-5; Miller CC. et al., J Biol Chem. 1994;269:3529-33; Pinnell SR. J Am Acad Dermatol. 2003;48:1-19). 포유류 세포의 UVB 노출은, 다양한 염증성 (pro-inflammatory) 유전자의 발현에 관련된 산화 환원 조절 전사인자인 NF- κ B를 활성화시키는 신호전달 경로를 촉진한다(Corsini E. et al., Photodermatol Photoimmunol Photomed. 1995;11:112-8). I κ B- α 분해와 핵내로의 NF- κ B 이동을 초래하는 모든 활성화 기작은 ROS와 관련된 것으로 알려졌다(Schreck R. et al., EMBO J. 1991;10: 2247-58; Schreck R. et al., J Exp Med. 1992;175:1181-94). UVB는 인간 생체의 피부(Fisher GJ. et al., Nature 1996;379:335-9) 및 배양된 인간 피부자갈형성세포인 HaCaT (Saliou C. et al., Free Radic Biol Med. 2001;30:154-60; Kitazawa M. et al., FEBS Lett. 2002;526:106-10)에서 NF- κ B를 활성화시킨다. 포유류 세포가 UV에 노출되면 신호전달 경로가 촉진되고, 일반적으로 NF- κ B의 활성이 최고에 이루게 된다. UVB에 의해 유도된 COX-2 발현은 홍반 및 단핵세포와 호중성 백혈구와 같은 면역세포가 피부로 침윤되게한다(Katiyar SK. et al., Photochem Photobiol. 1999;69:148-53; Tanaka S. et al., Biochem Pharmacol. 2004;68:433-9). 따라서, COX-2는 광선에 의한 염증(photoinflammation)과 광노화와 종양 형성과 같은 피부 손상을 방지하기 위한 타겟이 될 수 있다.

<7> UV 방사선으로의 세포 노출은 “UV 반응” 이라고 알려진 급성 세포성 반응의 복잡한 과정을 유도한다. UV 반응을 자극하는 초기 신호는 대부분 DNA 손상과 관련이 없고, 대신 Ras 경로의 막 관련 성분 및 MAP 키나제의 활성화에 의해 매개된 것으로 보인다(Rosette C. and Karin M. Science 1996;274:1194-7; Devary Y. et al., Cell 1992;71:1081-91; Minden A. et al., Science 1994;266:1719-23; Coso OA. et al., J Biol Chem. 1996;271:3963-6; Smith ML. and Fornace AJ Jr. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:12255-7). Erks는 다양한 성장 인자에 반응하는 생존 신호와 관련되어 있는 반면(Bonni A. et al., Science 1999;286:1358-62; Xia Z. et al., Science 1995;270:1326-31), JNKs 또는 p38 키나제의 활성화는 세포 사멸의 조절에 중대한 역할을 하는 것으로 알려졌다(Xia Z. et al., Science 1995;270:1326-31). UV-생성 ROS는 또한 JNK 및 p38 MAPK 뿐만 아니라 다양한 하부 신호전달 분자 MAPK 및 NF- κ B를 활성화시킬 수 있다. 본 연구에서는 p38 및 MAPK의 ERK1/2, 및 PI3 키나제/Akt가 UVB에 의한 COX-2 및 PGE₂ 생성에 관련되어 있지만, 안토시아닌은 오직 UVB 방사선에 의해 활성화된 PI3 키나제/Akt 경로 성분만 조절하였다. 실제, PI3 키나제/Akt 경로가 생존 경로로 알려져 있다. 이온화(ionizing) 또는 자외선(ultraviolet) 조사에 의해 유도된 세포 생존 신호전달 경로는 세포를 아폽토시스로부터 보호하지만, 동시에 암 발생을 유도한다(Zhan M. and Han ZC. Histol Histopathol. 2004;19:915-23). 따라서, 아폽토시스와 생존사이에서 균형을 유지하는 것이 중요하고 이 두가지를 효과적으로 조절한다는 점에서 본 안토시아닌의 유익성을 이야기할 수 있다.

<8> 발암에서 산화 스트레스의 관련성을 확인시키는 가장 설득력 있는 접근은 광선에 의한 발암을 효과적으로 조절하는 산화방지제(antioxidant)에 대한 연구에서 비롯된다. 산화방지제의 특성을 가지는 생물학적으로 활성인 다수의 분자는 마우스에서 UV 발암을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 녹차의 주요 폴리페놀릭 성분인 EGCG((-)-epigallocatechin-3-gallate)의 국부적인 도포는 인간 피부에서 UVB에 의해 유도된 백혈구의 침윤을 억제시키고, 미엘로퍼옥시다제 활성을 감소시키고 UVB에 의해 유도된 홍반을 감소시켰다(Katiyar SK. et al., Photochem Photobiol. 1999;69:148-53; Afaq F. et al., Oncogene 2003;22:1035-44). 여러 마우스 피부 모델

에서, 녹차 페놀의 처리는 화학적- 및 UVB-유도 피부 발암 및 염증 반응에 대해서도 보호 효과가 보고되었다(Katiyar SK. et al., J Invest Dermatol. 1995;105:39-48; Katiyar SK. et al., Arch Dermatol. 2000;136:989-94). 그러나, 이런 대부분의 화합물은 임상적 시도에서 인간 유효성과 안전성이 충분히 입증되지 않았다.

<9> 상기 언급한 안전성과 효율성 관련하여, 베리류와 포도와 같은 과일에서 추출된 안토시아닌은 매우 장래성이 있다. 안토시아닌은 많은 과일과 꽃의 색의 원인이 되는 폴리페놀로 2-페닐벤조피릴륨 또는 플라빌륨 글리코시드로 이루어진 기본 구조를 가진다. 이들 색소는 UV 손상으로부터 식물을 보호하도록 돕는 강력한 항산화제로 작용한다. 안토시아닌은 우삼바라-바이오렛(Usambara-violet) 뿐만 아니라, 초크베리(chokeberry), 체리, 가지(aubergine), 청포도(blue grape), 백시니움(Vaccinium) 및 적채(red cabbage)에 풍부하게 존재한다. 또한, 안토시아닌은 특히 검정콩 종피(black soybean seed coat)의 표피 책상 조직층(epidermis palisade layer)에 풍부하게 존재하는 것으로 알려졌다(Kuroda C. et al., Proc Imp Acad (Tokyo). 1988;9:17; Manabe T. et al., Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish. 1965;12:472; Yoshikura K. et al., Eiyo To Shokuryo. 1969;22:367; Taylor BH. MStHesis University of Arkansas Fayetteville AR. 1976; Yoshida K. et al., Biosci Biotechnol Biochem. 1996;60:589-93; Choung MG. et al., J Agric Food Chem. 2001;49:5848-51). 3개의 주요 안토시아닌, 즉, 시아니딘-3-글루코시드, 델피니딘-3-글루코시드 및 피투니딘-3-글루코시드는 검정콩 종피에 존재하는 것으로 특징을 나타낸다(Manabe T. et al., Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish. 1965;12:472; Taylor BH. MS Thesis University of Arkansas Fayetteville AR. 197; Choung MG. et al., J Agric Food Chem. 2001;49:5848-5). 지금까지 17개의 천연적으로 발생한 안토시아닌이 알려졌다. 안토시아닌은 높은 항산화 활성을 가지고, 이는 부분적으로 항발암 활성의 원인이 되는 것으로 알려졌다(Kamei H. et al., Cancer Invest. 1995;13:590). 최근에, 안토시아닌은 생체실험에서 허혈/재관류에 의해 유도된 심근 손상(ischemic reperfusion-induced myocardial injury)을 감소시키고, 허혈/재관류 손상의 원인이 되는 것으로 알려진 COX-2와 같은 염증 유전자 뿐만 아니라(Kim HJ. et al., FEBS Lett. 2006;580:1391-7), ICAM-1(intracellular adhesion molecule-1) 및 VCAM-1(vascular adhesion molecule-1)와 같은 부착 분자의 발현을 억제시키는 것으로 알려졌다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<10> UV에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대하여 보호 효과를 가지는 물질을 발굴하고자 한다.

과제 해결수단

<11> UV에 의한 광노화와 종양 형성과 같은 피부 손상을 방지하기 위하여, 안전성이 충분히 입증된 안토시아닌이 UV에 의해 유도된 산화 스트레스에 대하여 보호 효과를 가지는 가지는지를 확인하고 이에 대한 정확한 분자적 기작을 이해하고자 하였다.

<12> 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

<13> 하나의 양태로서 본 발명은 안토시아닌을 포함하는 자외선 조사에 의해 유도된 아폽토시스를 억제하는 조성물에 관한 것이다.

<14> 식물성 천연색소인 안토시아닌에 대하여, 최근 콜레스테롤 저하작용, 시력개선효과, 혈관보호기능, 항염양기능 등의 다양한 기능이 알려지고 있다. 본 발명자는, 안토시아닌이 자외선, 특히, 지질, 단백질 및 핵산을 포함하는 생물학적 고분자를 손상시키고 암 개시자 및 암 촉진자로 작용하여 광노화와 종양 형성과 같은 피부 손상을 초래하는 것으로 알려진 UVB에 의해 유도된 아폽토시스로부터 세포를 보호하는 활성을 가지는 것을 새로 규명하였다.

<15> 안토시아닌은 UVB 노출후 초기 시점에서 ROS 생성을 억제하였으며, UVB에 의해 매개된 아폽토시스의 안토시아닌의 보호 효과는 ROS 생성을 차단하고 카스파제 경로를 억제하는 것을 알 수 있다. 또한, 안토시아닌은 NF- κ B 의존적인 경로를 통하여 발현되는 염증 유전자 COX-2를 효과적으로 발현억제하였다. COX-2 발현 및 PGE₂ 생성에 대한 안토시아닌의 억제 효과는 무모 마우스에서도 확인하였다. 또한, TUNEL 어세이와 웨스턴 블랏 분석으로 측정할 결과, 안토시아닌의 국부적 도포는 마우스 피부에서 아폽토틱 세포 사멸을 효과적으로 보호하였다. 또한, 본 발명은 안토시아닌이 카스파제-3 경로 활성의 억제와 프로아폽토틱 Bax 단백질 수준을 감소시킴

으로써 UVB에 의해 유도된 세포독성 및 아팍토시스를 차단하고 NF- κ B 및/또는 PI3 키나제/Akt 경로 조절을 통하여 COX-2와 같은 염증성 유전자의 발현을 억제함을 밝혔다.

- <16> 본 발명의 사용되는 안토시아닌은 천연에서 분리하거나 합성하여 사용될 수 있다. 바람직하게는, 안토시아닌을 함유하는 식물로부터 분리한 것으로, 천연, 잡종 또는 변종 식물체의 모든 기관, 예를 들어 뿌리, 가지, 줄기, 잎, 꽃 및 열매로부터 분리할 수 있다. 안토시아닌을 분리할 수 있는 식물로, 딸기, 체리, 검정콩, 검은깨, 포도, 흑미, 가지, 초크베리(chokeberry), 블랙베리(black berry), 아로니아(chokeberry), 빌베리(bilberry), 블루베리(blue berry), 레드 커런트(red currant) 엘더베리(elderberry), 블랙 커런트(black currant), 백시니움(Vaccinium) 및 적채(red cabbage) 등을 예시할 수 있으며, 가장 바람직하게는 검정콩에서 유래한 안토시아닌이다. 검정콩의 안토시아닌은 UV-유도 손상을 방지 및 치료하기 위한 유용한 제제로 산화적 스트레스에 의해 매개된 질병의 예방과 치료에 기여할 수 있다.
- <17> 안토시아닌은 당분야에서 공지된 방법으로 식물로부터 추출, 분리, 정제될 수 있다. 구체적으로, 물, 또는 알콜 및 산을 첨가한 알콜류를 이용하여 추출할 수 있다. 물로 추출할 경우 여과지로 불용성 물질을 여과하고, 실리카겔 역상 컬럼 크로마토그래피법으로 고순도의 안토시아닌 성분을 분리 정제할 수 있고, 산 가수분해를 통해 당 성분과 염산이 제거된 순수한 안토시아닌을 분리할 수 있다.
- <18> 또한, 알콜 및 산을 첨가한 알콜류를 이용할 경우에는 이온 컬럼 크로마토그래피법, 분취 박층 크로마토그래피법, 분취 고속 액체 크로마토그래피법, 액체분배 추출법, 침전법 등을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.
- <19> 상기한 본 발명의 안토시아닌을 포함하는 자외선 조사에 의해 유도된 아팍토시스를 억제하는 조성물은 의약품, 식품, 화장품 등의 주원료, 부원료 및 첨가제 등으로 광범위하게 사용될 수 있으며, 경구용(내용) 또는 비경구용(외용)의 형태를 취할 수 있다. 경구용의 경우, 예를 들어 의약품 또는 식품의 형태로 제형화 할 수 있으며, 비경구용(외용)의 경우, 화장품, 의약품 등의 형태로 제형화할 수 있다.
- <20> 예를 들어, 본 발명의 안토시아닌을 포함하는 자외선 조사에 의해 유도된 아팍토시스를 억제하는 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하고 인체 또는 수의용의 약제학적 제제로 제형화될 수 있다. 본 발명의 의약품은 그 제형에 있어서 특별히 제한되는 바가 없으며 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 다양한 형태로 목적에 따라 경구용, 비경구용, 국소투여용 등의 제제로 제형화될 수 있다.
- <21> 또한, 예를 들어, 안토시아닌을 포함하는 본 발명의 조성물은 다양한 종류의 식품의 제조에 이용할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 농산물, 축산물 또는 수산물의 특성을 살려 변형시키는 동시에 저장성을 좋게 한 가공 식품에 첨가할 수 있다. 이런 가공식품에는 과자, 음료, 주류, 발효식품, 통조림, 우유가공식품, 육류가공식품 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 조성물을 이용하여 기능성식품, 건강식품 또는 건강보조식품을 제조할 수 있다. 기능성식품, 건강식품 또는 건강보조식품은 정제, 캡슐제, 분말, 과립, 액상제, 환 등의 제형으로 제조될 수 있다.
- <22> 무엇보다, 본 발명의 조성물은 광선에 의한 발암의 원인이 되는 자외선 조사에 의한 피부 손상을 예방하거나 손상된 피부를 호전되게 하거나 보호하기 위한 화장료 제제로 사용할 수 있다.
- <23> 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 안토시아닌을 포함하는 자외선 조사에 의해 유도된 아팍토시스를 억제하는 상기 조성물을 포함하는 자외선 조사에 의한 피부손상 보호용 화장료 제제에 관한 것이다.
- <24> 본 발명의 조성물로 제조되는 화장품 제형은 특별히 제한되지 않으며, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이에센스, 아이크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩 및 파우더 등을 예시할 수 있다.
- <25> 또한, 화장료 제제는 화장료의 제형 또는 사용목적 등에 맞게 정제수, 유분, 계면활성제, 보습제, 고급 알콜, 킬레이트제, 색소, 지방산, 산화방지제, 방부제, 왁스, pH조절제, 향료 등을 임의로 추가할 수 있다. 구체적으로, 유지 성분은 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 사용할 수 있다. 보습제는 수용성 저분자 보습제, 지용성 저분자 보습제, 수용성 고분자 보습제, 지용성 고분자 보습제 등을 사용할 수 있다. 에멀리언트제로는 장쇄아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아린산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 예시할 수 있다. 계면활성제는 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제 등을 사용할 수 있다. 알코올은 세테아릴 알코올 등을 사용할 수 있다.

효 과

<26> 안토시아닌은 UVB-유도 아팍토시스로부터 세포를 보호하고 NF- κ B 및/또는 PI3 키나제/Akt 경로 조절을 통하여 COX-2와 같은 염증성 유전자의 발현을 억제하였으며 안토시아닌의 국부적 도포는 마우스 피부에서 아팍토틱 세포 사멸을 효과적으로 보호하였다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<27> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명이 하기의 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

<28> <실시예 1> 재료 및 방법

<29> 1-1 시약

<30> 검정콩 (*Glycine max* (L.) Merr)에서 추출한(Kim HJ et al., FEBS Lett. 2006;580:1391-7) 안토시아닌은 신성철 박사로부터 제공받았다 (Department of Chemistry, Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University). DMEM(Dulbecco's modified Eagles medium), FBS(fetal bovine serum) 및 항생제 (enicillin/streptomycin)는 Gibco BRL (Rockville, MD)에서 획득하였다. 항-p-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204), 항-p-SAPK/JNK (Thr-183/Tyr-185), 항-phospho-p38 (Thr-180/Tyr-182) 및 항-phospho-Akt (Ser-473), p-I κ B α 의 항체들은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)에서 획득하였다. 항- β -actin, 항-ERK1/2, 항-JNK, 항-p38, 항-Akt, 항-COX-2, 항-NF- κ B p65, 항-Bax, 항-Bcl-2 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. LY294002 와 PD98059, SB203580, 및 SP600125는 Calbiochem (San Diego, CA)에서 구입하였다. 항-카스파제-3 (CPP20) 항체를 포함한 나머지 모든 화합물은 Sigma (St. Louis, MO)에서 제공되었다.

<31> 1-2 동물

<32> 8내지 10주령 성체 암컷 무모 마우스 (HR-1)은 Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan)로부터 제공되었다. 살균된 미국국립보건원의 오픈 포플라 마우스 사료 및 물은 임의적으로 제공되었다. 전반조명(ambient lighting)은 12 시간 광/12시간 암 주기로 제공되도록 조절되었다.

<33> 1-3 세포 배양

<34> 불멸화된 인간 피부각질형성세포 세포주, HaCaT는 N. Fusenig (German Cancer Research, Germany)으로부터 제공받았다. 세포는 10% FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 추가된 DMEM에서 단층으로 배양되었고 5% CO₂를 포함하는 가슴대기에서 37°C에서 유지되었다. 세포를 1×10^6 cells/100-mm dish의 밀도로 시딩하였다. 48시간 후에, 세포를 무혈청 배지로 세척하고 안토시아닌 처리 12 시간 전에 FBS가 무첨가된 배지로 교체하였다.

<35> 1-4 HaCaT으로의 UV 조사

<36> UVB 조사는 혈청을 고갈시키고 단층으로 세포를 배양한 상태에서 FS20 램프(National Biological, Twinsburg, OH)를 이용하여 수행하였다. UVB 광원은 313 nm에서 피크 방출되고 방사선의 약 65%가 UVB (280-320 nm) 파장 내에 있는, 약 270에서 390 nm까지 연속 스펙트럼을 방출하는 2개의 FS20 램프이다. 스펙트로라디오미터(model IL1700A; International Light, Inc., Newburyport, MA, USA)로 측정하였을 때, 튜브에서 표적까지 거리 8cm에서 단일 전구의 조사는 평균하면 6.25 J/m²/sec 이고 두 전구의 조사는 평균하면 12 J/m²/sec이다. 세포는 최소량의 PBS(약 3 ml)에서 UVB로 조사되었다. 대조구 세포는 위장(sham) 조사되었다. UVB 조사후에, 세포를 안토시아닌 또는 다른 제제 존재 또는 무존재하에 무혈청 배지에서 정한 시간동안 배양하였다.

<37> 1-5 동물의 UVB 조사 및 피부 샘플의 준비

<38> 15개의 무모 마우스를 각 3마리씩 5그룹으로 나누고 UVB 조사에 노출시켰다. 동물에 대한 UVB 조사는 이전 연구에서 기재된 바에 따랐다 (Kim HJ et al. Apoptosis 2004;9:449-56). UVB 조사한 뒤 즉시, 안토시아닌(평균 수 100 μ l에 50 또는 100 mg/kg의 양을 포함시켜)을 마우스에 처리하였다. 24시간 후에, 마우스를 마취시키고 (펜토바르비탈 나트륨, 50mg/kg) 안후 충(retro-orbital plexus)으로부터 방혈(exsanguination)시켜 희생시켰다. 각 마우스로부터 등쪽 피부(약 1 $\times$ 2 cm)를 절제하고 두 부분으로 절단하였다. 한 조각은 파라핀 포매(paraffin embedding)를 위하여 10% 중성 완충 포르말데하이드(10% neutral buffered formaldehyde)에서 즉시 고정하였다. 다른 한 조각은 웨스턴 블랏 및 PGE₂ ELISA 어세이를 위하여 사용전까지 -80°C에 냉동보관하였다.

<39> **1-6 세포 생존 평가**

<40> 상이한 처리 후에 세포 생존을 평가하고자, 각 플레이트에서 모아진 10 μ l의 세포에 10 μ l의 트리판 블루 용액을 첨가하고 세포를 2분간 배양하였다. 염색되지 않은 생존 세포를 헤모사이토미터로 계수하였다.

<41> **1-7 웨스턴 블랏 분석**

<42> 세포를 모아서 0.5% SDS, 1% NP-40, 1% 쇼덤 디옥시콜레이트, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 7.5) 및 단백질을 분해효소 억제제를 포함하는 버퍼로 용해시켰다. 각 샘플의 단백질 농도를 BCA 단백질 어레이 키트 (Pierce, Rockford, IL)을 이용하여 측정하였다. COX-2를 검출하고자 20 μ g의 총 단백질을 8% 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동하고, phospho-MAPKs를 검출하기 위하여 30 μ g의 총 단백질을 12% 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동하였다. NF- κ B (p65)를 검출하고자, 핵 및 세포질 분획을 이전 기재된 방법에 따라 분리하고(Tsoy-Nizamutdinova I et al., Int Immunopharmacol. 2007;7:343-50), 분리된 세포질 또는 핵 단백질의 30 μ g 분취액(aliquot)을 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔을 이용하여 전기영동시켜 단백질을 크기별로 분리시켰다. 분리된 단백질은 폴리비닐리덴 플로라이드 멤브레인 (Amersham)으로 SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad)을 이용하여 20 mA에서 2시간 동안 이동되었다. 멤브레인은 0.05% 트윈 20을 포함하는 TBS(Tris-buffed saline) (TBS-T)에서 5% 탈지우유로 실온에서 2시간 동안 블러킹시켰다. 멤브레인을 TBS-T에서 1:500의 농도인 1차 항체로 밤새 4 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 결합된 항체를 호스래디쉬 퍼록시다제-콘주게이트된 2차 항체로 검출하고 신호를 ECL(enhanced chemiluminescence)(Amersham, Piscataway, NJ)법으로 검출하였다.

<43> **1-8 형질전환**

<44> NF- κ B-루시페라제 DNA 벡터(보존 NF- κ B 결합 서열이 pGL3 기본 루시페라제 발현 벡터로 클론된)은 G. Koretzky (University of Pennsylvania)으로부터 제공받았다. NF- κ B-루시페라제의 일시적 형질전환은 리포펙틴(Gibco-BRL)을 이용하여 수행하였다 (Kim HJ et al., FEBS Lett. 2006;580:1391-7). 간략히, 형질전환 전에 5×10^5 세포를 60 mm 디쉬로 플레이트팅하고 디쉬의 약 70%를 차지하도록 배양시켰다. 세포를 공벡터 (pGL3) 또는 1 μ g의 NF- κ B-루시페라제 + 0.5 μ g의 pRL-TK-루시페라제로 형질전환시켰다. 형질전환은 12시간 동안 계속 진행되었다. 형질전환된 세포를 4 ml의 PBS로 세척하고 24시간동안 안토시아닌으로 처리하고 UVB로 조사하였다. 세포를 모우기 전까지 무혈청 DMEM에서 계속 배양하였다. 루시페라제 활성은 각 샘플에서의 pRL-TK-루시페라제 활성 (Renilla luciferase activity)을 이용하여 평균화하였다.

<45> **1-9 루시페라제 활성**

<46> 실험적 처리후에, 세포를 차가운 PBS로 두 번 세척하고, 듀얼 루시페라제 키트 (Promega, Madison, WI)에서 제공되는 패시브 라이시스 버퍼로 세포를 용해시키고 제조사의 프로토콜에 따라 TD-20/20 루미노미터 (Turner Designs, Sunnyvale, CA)를 이용하여 루시페라제 활성을 측정하였다. 모든 형질전환은 3번 수행하였다. 데이터는 파이어플라이와 레닐라 루시페라제 활성간의 비로 나타내었다.

<47> **1-10 정량적 인간 PGE₂ 면역어레이**

<48> 배양 배지로 분비되는 PGE₂의 양은 정량적이고 특이적인 샌드위치 효소 면역 어레이를 위하여 제조사의 설명서에 따라, 키트(Quantikine human PGE₂ chemiluminescence kit: R&D Systems)을 이용하여 측정하였다. 모든 샘플과 표준시료는 동시에 측정하였다.

<49> **1-11 TUNEL 어레이**

<50> 염색제 DNA 단편을 측정하고자 상용화된 "In Situ Cell Death Detection Kit"을 이용하여 TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labelling) 어레이를 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

<51> **1-12 세포내 ROS의 측정**

<52> 세포내 ROS 생성은 공초점 레이저 스캐닝 현미경을 이용하여 2',7'-디클로로플루오레스세인 형광으로 측정하였다. 세포를 세척하고 10 μ M DCFH-DA(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) 존재하에 30분간 어두운 곳에서 배양하였다. 배양 디쉬를 공초점 이미징 시스템(confocal imaging system) (Olympus, Tokyo, Japan)의 도립현미경(inverted microscope)으로 옮기고, ROS 생성을 FITC(fluorescein isothiocyanate) 필터 세트를 이용한 DCFH의 산화로 검출하였다. 화소 이미지를 단일 고속 스캔으로 수집하였다. 형광 이미지는 SigmaGel 1.0 (Jandel Scientific, Germany)으로 계산하였다. 분석은 동일 영역에 걸쳐 3번 반복하였고 결과

는 3번의 독립적 실험의 평균이다.

<53> **1-13 유세포 측정 분석(Flow Cytometric Analysis)**

<54> FACS 분석은 이전 보고된 방법(Telford WG et al., J Immunol Methods 1994;172:1-16) 약간 변형하여 수행하였다. 간략히, 세포를 1500 rpm에서 원심분리하여 펠렛으로 얻은 후, 10 ml의 차가운 PBS (phosphate-buffered saline)로 세척하였다. 펠렛을 70% 에탄올에서 재현탁시키고 60분간 얼음에 보관하였다. 세포를 PBS에서 0.5% 트리톤 X-100, 230 µg/ml RNaseA 및 프로피디움 요오다이드 50 µg/ml을 포함하는 시약으로 투과시켰다. 샘플을 37°C에서 30분간 유지한 후, 유세포 분석(Becton Dickinson FACScan) 하고 아팍토틱의 개체(sub-G1 phase)는 CellQuest program을 이용하여 분석하였다. 비처리 세포에 존재하는 G0/G1 양보다 적은 DNA 양을 가지는 세포는 아팍토틱 세포인 것으로 간주되었다.

<55> **1-14 데이터 분석**

<56> 스캐닝 밀도법은 Image MasterVDS Pharmacia Biotech Inc.(San Francisco, CA)을 이용하여 수행하였다. 처리군들은 ANOVA(one-way analysis of variance)를 이용하여 비교하고, 뉴만-쿨 검정은 ANOVA에서 밝혀진 유의한 차이를 밝히고자 사용되었다. $P < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 는 유의성이 있는 것으로 인정되었다.

<57> **<실시예 2> 인간 피부각질형성세포 세포주, HaCaT에서 UVB에 의해 매개된 COX-2 유전자 발현에 미치는 안토시아닌의 효과**

<58> 안토시아닌이 UVB 피해를 받은 피부각질형성세포에서 항염 효과를 발휘할 수 있는지를 조사하고자, HaCaT를 UVB 자극 후에 면역 마커, 특히 UVB에 의해 유도된 항염 반응에 관련된 COX-2를 측정하였다. HaCaT 세포는 다양한 농도의 안토시아닌으로 24 시간동안 전처리하고 UVB (100 J/m^2) 으로 조사하고 안토시아닌을 포함하는 신선한 배지로 16시간 동안 배양하였다. UVB 조사는 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 COX-2 발현을 증가시켰다(도 1A, 1B). 나아가 COX-2의 생성물, PGE_2 는 안토시아닌 농도가 증가함에 따라 효과적으로 감소되었다.

<59> **<실시예 3> HaCaT에서 UVB에 의해 활성화된 NF-κB 경로에 미치는 안토시아닌의 효과**

<60> COX-2와 같은 염증-관련 유전자는 NF-κB를 포함하여 다수 주요 전사 인자에 대한 결합 부위를 가진다(Appleby SB et al., Biochem J. 1994;302:723-7). NF-κB는 UVB를 포함하는 다양한 염증 자극에 의해 활성화된다. 따라서, UVB에 의해 활성화된 NF-κB가 안토시아닌 처리에 의해 억제되는지를 측정하고자, NF-κB의 핵내로의 이동실험 및 루시퍼라제 리포터 어세이를 수행하였다. 도 2A에서 볼 수 있는 바와 같이, UVB는 세포질에서 핵으로의 NF-κB (p65) 이동을 유발하였다. 이런 효과는 안토시아닌 전처리에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. NF-κB 활성 억제자인 IκBα가 키나아제에 의해 인산화된 후 분해되어 NF-κB가 IκBα로부터 방출되어 NF-κB는 유전자 전사 조절에서 활성을 나타내는 핵으로 이동된다. 따라서, 안토시아닌이 UVB에 의한 IκBα의 인산화를 억제하는지를 측정하였다. 안토시아닌은 용량 의존적으로 IκBα의 인산화를 억제하였다(도 2B). 나아가, UVB에 의해 증가된 NF-κB-루시퍼라제 활성은 비처리 대조군과 비교하여 약 4배 높았다(도 2C). 그러나, 돌연변이 pcDNA/IκBα-SR이 형질전환되면, UVB에 의해 유도되는 루시퍼라제 활성이 변화되지 않았다. 또한, 안토시아닌은 UVB에 의한 NF-κB-루시퍼라제 활성을 효과적으로 억제하였다(도 2C). 이런 결과는 안토시아닌이 IκBα 인산화의 억제 방지를 통하여 TNF-α에 의한 NF-κB 활성을 억제시킨다는 것을 의미하는 것이다.

<61> **<실시예 4> HaCaT에서 UVB에 의해 유도된 COX-2 발현에 대한 MAPK 또는 PI3 키나제/Akt의 차별적인 역할 및 UVB에 의해 유도된 분열촉진신호전달 (mitogenic signaling)에 미치는 안토시아닌의 효과**

<62> 염증 반응 (pro-inflammatory responses)과 발암과정에 관련하여 가장 잘 알려진 세포내 신호전달 캐스캐이드는 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 및/또는 PI3 키나제/Akt 경로이다. MAPK 패밀리 및 PI3 키나제/Akt 경로가 COX-2 유전자 발현에 역할을 한다는 증거가 많이 있다(Hwang D et al., Biochem Pharmacol.1997;54:87-96; Pouliot M et al., J Immunol. 1997;158:493-07; Dean JL et al., J Biol Chem. 1998;274:26-49). 따라서, UVB에 의한 증가된 COX-2 발현을 매개하는 신호전달 경로로서 MAPK 및 PI3 키나제/Akt 경로를 조사하였다. 나아가 UVB에 의해 활성화된 MAPK 및 PI3 키나제/Akt 경로에 미치는 안토시아닌의 효과를 조사하였다. UVB 조사후에 증가된 COX-2 단백질 수준은 특이적 ERK1/2 억제제인 PD98059 (40 µmol/L), P38 억제제인 SB203580 (5 µmol/L) 및 PI3 키나아제 억제제인 LY294002 (5 µmol/L)의 추가에 의해 유의하게 감소되었다. 반대로, JNK의 특이적 억제제인 SP600125의 전처리는 UVB-유도 COX-2 발현에 아무 효과를 나타내지 않았다(도 3A). UVB에 의한 PGE_2 의 생성은 또한, PD98059, SB203580 및 LY294002에 의해 억제되었으나, SP600125에 의해서는 억제되지 않았다(도 3B). 이런 결과는 UVB에 의한 COX-2 유도 기작에 MAPK 경로가 차별

적으로 연관되어 있다는 것을 의미한다. 그들 중에서 ERK 및 p38는 UVB에 의해 매개된 COX-2 유전자 발현 및 PGE₂ 유도에 관련되어 있으나, JNK는 관련되어 있지 않다.

<63> <실시예 5> HaCaT에서 UVB-유도 분열촉진신호전달에 미치는 안토시아닌의 효과

<64>

<65> 안토시아닌이 UVB에 의해 유도된 MAPK 활성화에 영향을 미치는지 확인하고자, UVB (100 J/m²)에 노출되기 전에 세포를 안토시아닌(10, 50, 100 μg/mL)으로 24시간 동안 전처리하였다. UVB에 의해 유도된 Akt 인산화는 농도의존적으로 안토시아닌에 의해 억제되었다. 그러나, ERK1/2 인산화, P38 인산화 및 SAPK/JNK 인산화는 안토시아닌에 의해 영향받지 않았다 (도 3C). 이런 결과들은 안토시아닌이 PI3 키나제/Akt 신호전달 경로의 조절을 통하여 UVB에 의해 유도된 COX-2 발현을 조절한다는 것을 의미한다.

<66> <실시예 6> 피부각질형성세포에서 안토시아닌에 의한 UVB에 의해 생성된 ROS의 감소

<67> 안토시아닌이 UVB에 의해 유도된 ROS 생성에 미치는 효과를 조사하였다. 공촛점 현미경 분석결과, 대조군과 비교할 때 UVB (100 J/m²)는 ROS 생성을 발생시켰고(UVB 37.4% 대 대조군 1.1%), 반면에 10 또는 100 μg/mL의 안토시아닌 전처리는 UVB에 의해 유도된 ROS 생성을 억제하였으며(37.4% 에서 11.1% 또는 13.1%, 각각), 이는 안토시아닌이 ROS 생성을 조절함으로써 UVB에 의해 매개된 아파토시스를 일부 억제할 것이라는 것을 의미하는 것이다(도 4).

<68> <실시예 7> 피부각질형성세포에서 UVB에 의해 매개된 세포독성에 안토시아닌이 미치는 효과

<69> 안토시아닌에 대한 피부각질형성세포의 세포 생존을 조사하고자, 세포에 용량의존적으로 안토시아닌을 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 트리판 블루 어세이에 의하면 안토시아닌은 고농도(~ 100 μg/mL)에서도 배양된 HaCaT의 세포 생존에 영향을 주지 않았다(도 5A). 대신, 안토시아닌은 UVB에 의해 유도된 세포독성으로부터 HaCaT 세포를 보호하였다. 세포 생존률은 UVB 100 J/m² 또는 200 J/m²에 의해 약 57% 또는 80%가 각각 감소하였으며 이는 안토시아닌 전처리에 의해 농도의존적으로 (1, 10, 50, 100 μg/mL) 유의하게 증가하였다 (도 5A). 안토시아닌이 피부각질형성세포에서 UVB에 의해 유도된 아파토틱 세포 사멸에 대하여 보호 효과를 발휘할 수 있는지를 측정하고자, HaCaT에서 TUNEL 어세이와 FACS 분석을 수행하였다. 세포를 UVB 조사 전에 안토시아닌 10 또는 100 μg/mL로 24시간 동안 전처리하고 UVB (100 J/m² 또는 200 J/m²) 조사 후에 다시 안토시아닌을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. TUNEL 어세이 결과, 안토시아닌은 피부각질형성세포에서 UVB에 의해 유도된 아파토틱 세포 사멸에 대하여 보호 효과를 보여주었다. TUNEL-양성 세포는 100 J/m²에서 UVB-조사된 세포의 약 25%에서 관찰되었으며, 이는 100 μg/mL의 안토시아닌에 의하여 6%까지 감소하였다(도 5B). 도 5C는 100 J/m² UVB가 sub-G1의 비율을 18.7%까지 증가시키는 것을 증명하고, 이는 안토시아닌 (10, 100 μg/mL)에 의해 감소되었다. 특히, 100 μg/mL의 안토시아닌은 UVB (100 J/m²)에 의해 증가된 세포독성에 대하여 현저한 보호 효과를 보였다(UVB에 의한 아파토시스가 18.7%에서 4.1%로 감소).

<70> 카스파제들(caspases)은 상이한 자극에 의해 유도되는 아파토시스에 연관되어 있으며 UVB는 카스파제-의존적 경로로 아파토시스를 유도한다. 따라서, 절단된 카스파제-3는 아파토시스의 마커로 검출된다. 도 5D는 절단된 카스파제가 UVB (100 J/m²) 조사된 세포에서 확실하게 검출되고, 이의 수준은 안토시아닌에 의해 감소되는 것을 보여준다. 특히, 50 또는 100 μg/mL의 안토시아닌은 절단된 카스파제-3의 수준을 완전히 감소시켰다. 프로-아파토틱 Bax 및 항-아파토틱 Bcl-2의 생성을 웨스턴 블랏 분석으로 측정할 때, UVB 조사는 프로-아파토틱 Bax 생성을 유도하였으나, 항-아파토틱 Bcl-2는 아니었으며, 증가된 프로-아파토틱 Bax 생성은 안토시아닌에 의해 효과적으로 억제되었다. 프로-아파토틱 Bax 및 항-아파토틱 Bcl-2간의 균형이 미토콘드리아에서 사이토크롬 c(cytochrome c)의 방출을 조절하기 때문에, UVB 조사가 항-아파토틱 Bcl-2의 수준에 영향을 미치지 않는다 하더라도 UVB에 의한 Bax 단백질 수준의 증가는 아파토시스를 유도하기에 충분하다(도 5D). 종합하면, UVB는 카스파제 경로 활성화와 프로-아파토틱 Bax 단백질의 유도를 통하여 아파토시스를 유도하고, 이는 안토시아닌에 의해 차단되었다.

<71> <실시예 8> UVB-조사된 마우스 피부에서 COX-2 및 PGE₂ 생성에 미치는 안토시아닌의 효과

<72> 생체실험에서, COX-2 단백질 및 PGE₂ 생성에 미치는 안토시아닌의 효과를 더 확인하고자, UVB (2.4 kJ/m²)로

조사된 무모 마우스 피부에서 COX-2 단백질 수준과 PGE₂ 생성을 조사하였다. 예상했던 바와 같이, 안토시아닌은 UVB-조사된 마우스 피부에서 COX-2 단백질 유도과 PGE₂ 생성을 용량 의존적으로 감소시켰다 (도 6A, 6B).

<73> <실시예 9> 무모 마우스에서 UVB에 의해 유도된 아팍토시스에 미치는 안토시아닌의 효과

<74> 생체실험에서 UVB에 의해 유도된 아팍토시스에 미치는 안토시아닌의 효과를 조사하기 위하여 무모 마우스를 UVB로 처리하고, UVB 조사 후 바로, 안토시아닌을 (평균수 100 μ l에 50 또는 100 mg/kg을 포함) 마우스에 도포하였다. TUNEL 어세이 결과, UVB는 표피에서 TUNEL-양성 세포를 증가시켰으며, 이는 안토시아닌(50, 100 mg/kg)에 의해 억제되었다(도 7A). 또한, TUNEL-양성 세포가 아팍토시스를 실제 겪게 되는지를 측정하고자, 무모 마우스의 피부에서 총 단백질을 추출하고, 절단된 카스파제-3 및 아팍토시스 관련된 단백질, Bcl-2 및 Bax를 측정하였다. 예상한 바와 같이, 절단된 카스파제-3 및 Bcl-2 프로-아팍토틱 단백질 수준은 UVB-처리 마우스 피부에서 증가하였다. 그러나, 항-아팍토틱 단백질, Bax는 UVB 및/또는 안토시아닌 처리 후에 약간의 변화만을 보였다(도 7B).

산업이용 가능성

<75> 본 발명의 안토시아닌을 포함하는 자외선 조사에 의해 유도된 아팍토시스 억제용 조성물은 이를 원료로 하는 의약품, 식품, 화장품 등의 다양한 분야에서 폭넓은 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

<76> 도 1은 HaCaT에서 안토시아닌이 UVB에 의해 유도된 COX-2 발현 및 PGE₂ 생성을 억제하는 것을 보여준다. (A) HaCaT 세포는 안토시아닌(10, 50, 100 μ g/mL)으로 24시간 동안 전처리되고 UVB 조사(100 J/m²)로 자극받았다. 그런다음, 배지를 안토시아닌을 포함하는 신선한 배지로 교체하고 세포를 16시간 동안 추가로 배양하였다. 처리 후 세포에서 단백질을 추출하고, COX-2 단백질을 웨스턴 블랏 분석으로 측정하였다. (B) 세포를 공벡터 또는 COX-2 프로모터-루시페라제 + pRL-TK-루시페라제로 일시적으로 공동형질전환시켰다. 형질전환된 세포를 안토시아닌으로 전처리하고 UVB로 조사하였다. 안토시아닌으로 16시간 동안 추가 배양한 후에, 세포 라이세이트(cell lysates)로부터 루시페라제 활성을 측정하고 비처리 세포에 상대적인 활성화 비로 나타내었다. 데이터는 세 번의 독립적 실험의 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었다. 뉴만-컬 검정 후에 다수 그룹의 평균을 비교하기 위하여 일원분산분석(One-way analysis of variance)을 사용하였다 (대조구와 비교한 유의성, **p<0.01; UVB와 비교한 유의성, ^{††}p<0.01) (대조구 수준=1). (C) 세포를 안토시아닌으로 전처리하고 상기 기술한 바와 같이 UVB 조사로 자극하였다. 24시간 추가 배양한 후에, 상등액을 모우고 PGE₂ 생성을 측정하였다. 결과는 반복 실험으로 확인하였다.

<77> 도 2는 안토시아닌은 HaCaT에서 UVB에 의한 NF- κ B의 핵내로 이동 (A), I κ B α 인산화 (B) 및 NF- κ B-루시페라제 활성을 억제함을 보여준다. (A, B) 세포를 안토시아닌(10, 50, 100 μ g/mL)으로 24시간 동안 전처리하고 UVB 조사(100 J/m²)로 자극하였다. 1시간 배양후에, 핵 및 세포질 분획을 추출하여 단백질을 수준을 웨스턴 블랏 분석으로 측정하였다. 데이터는 두 번의 독립적 실험으로 확인하였다. (C) 세포를 1 μ g의 NF- κ B-루시페라제로 형질전환하고, 24시간 동안 유전자를 발현시키도록 배양하고, UVB (100 J/m²)로 자극하였다. 조사 후에, 세포를 안토시아닌 존재 (10, 50, 100 μ g/mL) 또는 부재하에 배양하였다. 세포를 처리 6시간 후에 모우고 루시페라제 활성을 측정하였다. 루시페라제 활성은 비처리 세포에 상대적인 활성화 비로 나타내었다. 데이터는 세 번의 독립적 실험의 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었다. 뉴만-컬 검정 후에 다수 그룹의 평균을 비교하기 위하여 일원분산분석(One-way analysis of variance)을 사용하였다 (대조구와 비교한 유의성, **p<0.01; UVB와 비교한 유의성, [†]p<0.05, ^{††}p<0.01).

<78> 도 3은 HaCaT 세포에서 UVB에 의한 COX-2 발현과 PGE₂ 생성과 관련된 신호전달경로와 UVB에 의해 매개된 분열촉진신호전달 (MAPKs 및 Akt)에 미치는 안토시아닌의 효과를 보여준다. PD98059 (ERK1/2 억제제, 40 μ mol/L), SB203580 (p38 억제제, 5 μ mol/L), SP600125 (JNK 억제제, 50 μ mol/L), 또는 LY294002 (PI3 키나제 억제제, 10 μ mol/L)으로 세포를 전처리하고 UVB (100 J/m²)로 조사하였다. COX-2 단백질 수준 (A) 또는 PGE₂ 생성

(B)을 UVB 조사 16시간 또는 24 시간 후에 각각 검사하였다. 데이터는 세 번의 독립적 실험의 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었다. 뉴만-쿨 검정 후에 다수 그룹의 평균을 비교하기 위하여 일원분산분석(One-way analysis of variance)을 사용하였다 (대조구와 비교한 유의성, $^{**}p<0.01$; UVB와 비교한 유의성, $^{+}p<0.01$)(대조구 수준=1). (C) UVB에 의해 활성화된 신호전달 과정에 미치는 안토시아닌의 효과를 측정하고자, 세포를 다양한 농도에서 (10, 50, or 100 $\mu\text{g/mL}$)에서 안토시아닌으로 24시간 동안 전처리하고 UVB를 조사하였다. UVB 조사후, 15분 또는 3시간 추가 배양 후에, phospho-MAPKs 및 총-MAPK, 또는 phospho-Akt 및 총-Akt의 단백질 수준들을 웨스턴 블랏 분석으로 측정하였다. 데이터는 두 번의 독립적 실험으로 확인하였다.

<79> 도 4는 HaCaT에서 UVB에 의해 유도되는 ROS 생성에 안토시아닌이 미치는 효과를 살펴본 결과이다. 세포를 안토시아닌으로 (10 또는 100 $\mu\text{g/mL}$) 24시간 전처리하고 UVB (100 J/m^2)로 조사하였다. 안토시아닌 존재/부재하의 배양 1시간 후에, ROS 생성을 공촛점 현미경(밝은 초록) 분석으로 수행하였다. 실험은 3번 수행하였으며 데이터는 세 번의 독립적 실험의 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. 막대 그래프와 대표도로 나타내었다 (대조구와 비교한 유의성, $^{**}p<0.01$; UVB 조사와 비교한 유의성, $^{++}p<0.01$).

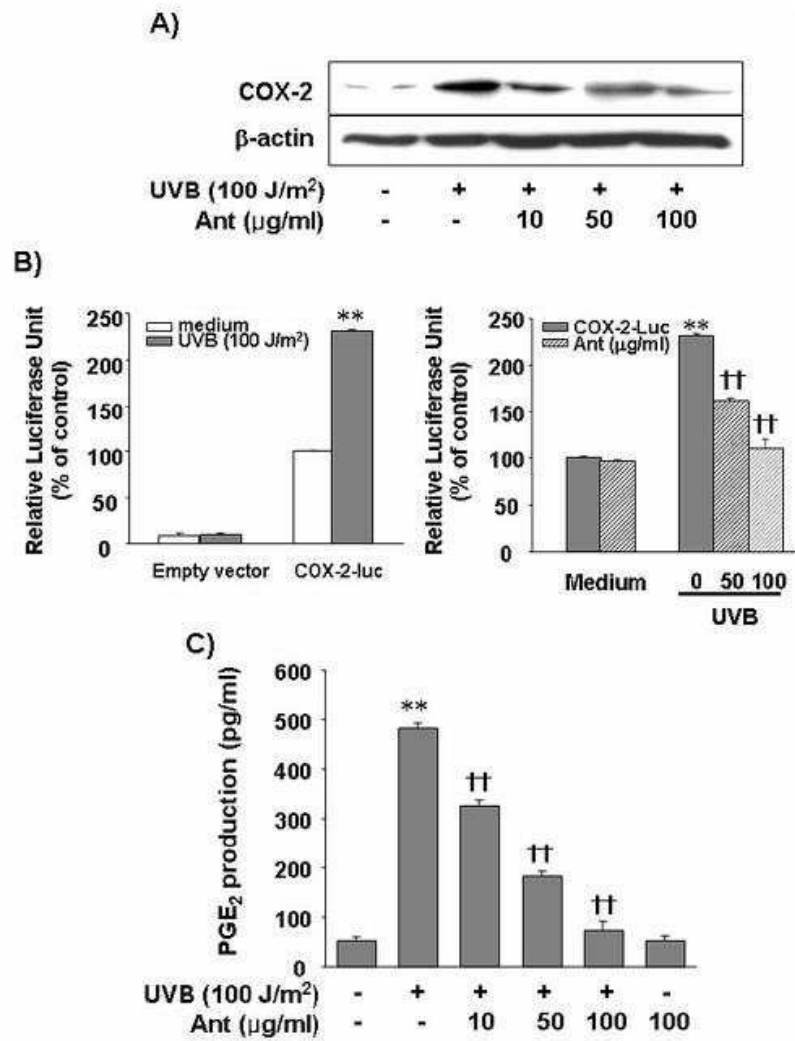
<80> 도 5는 HaCaT에서 UVB에 의해 유도된 아팜토틱 세포 사멸에 미치는 안토시아닌의 보호 효과를 살펴본 결과이다. 세포를 UVB (100 J/m^2) 조사 전에 안토시아닌(ANT)으로 24시간 전처리하였다. UVB 조사후에, 세포를 안토시아닌 존재 또는 부재하에 24시간 동안 추가배양하였다. 세포 생존에 안토시아닌이 미치는 효과를 농도-의존적 방식으로 트립판 블루(A), TUNEL 어세이(B) 및 FACS 분석(C)으로 측정하였다. 트립판 블루 어세이, TUNEL 어세이 및 FACS 분석을 수행하고 데이터는 세 번의 독립적 실험의 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었다 (대조구와 비교한 유의성, $^{**}p<0.01$; UVB 조사와 비교한 유의성, $^{+}p<0.05$, $^{++}p<0.01$). (D) 안토시아닌 존재 및/또는 부재하에 UVB-조사된 세포에서 절단된 카스파제-3, Bcl-2 또는 Bax를 면역 검출한 결과를 나타낸다. 세포를 리파 라이시스 버퍼(RIPA lysis buffer)를 이용하여 추출하고, 30 μg 의 총 단백질을 12% 폴리아크릴아미드 겔로 전기영동하고, 항-절단 카스파제-3 (cpp20), 항-Bcl-2 또는 항-Bax 항체들을 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 결과는 반복 실험으로 확인하였다.

<81> 도 6은 UVB-조사된 무모 마우스 피부에서 COX-발현 (A)과 PGE_2 생성(B)에 미치는 안토시아닌의 효과를 살펴본 결과이다. 무모 마우스는 UVB (2.4 kJ/m^2) 로 조사되었으며, UVB 조사 후 즉시, 안토시아닌(평균수 100 μl 에서 50 또는 100 mg/kg 의 양을 포함하여)을 마우스에 도포하였다. 각 마우스에서 등쪽 피부(약 $1\times 2\text{ cm}$)를 절제하고 얼음위에 두고 웨스턴 블랏 및 PGE_2 ELISA를 위하여 즉시 -80°C 에서 냉동하였다. 데이터는 세 번의 실험의 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었다. 뉴만-쿨 검정 후에 다수 그룹의 평균을 비교하기 위하여 일원분산분석(One-way analysis of variance)을 사용하였다 (대조구와 비교한 유의성, $^{**}p<0.01$; UVB 조사와 비교한 유의성, $^{+}p<0.01$).

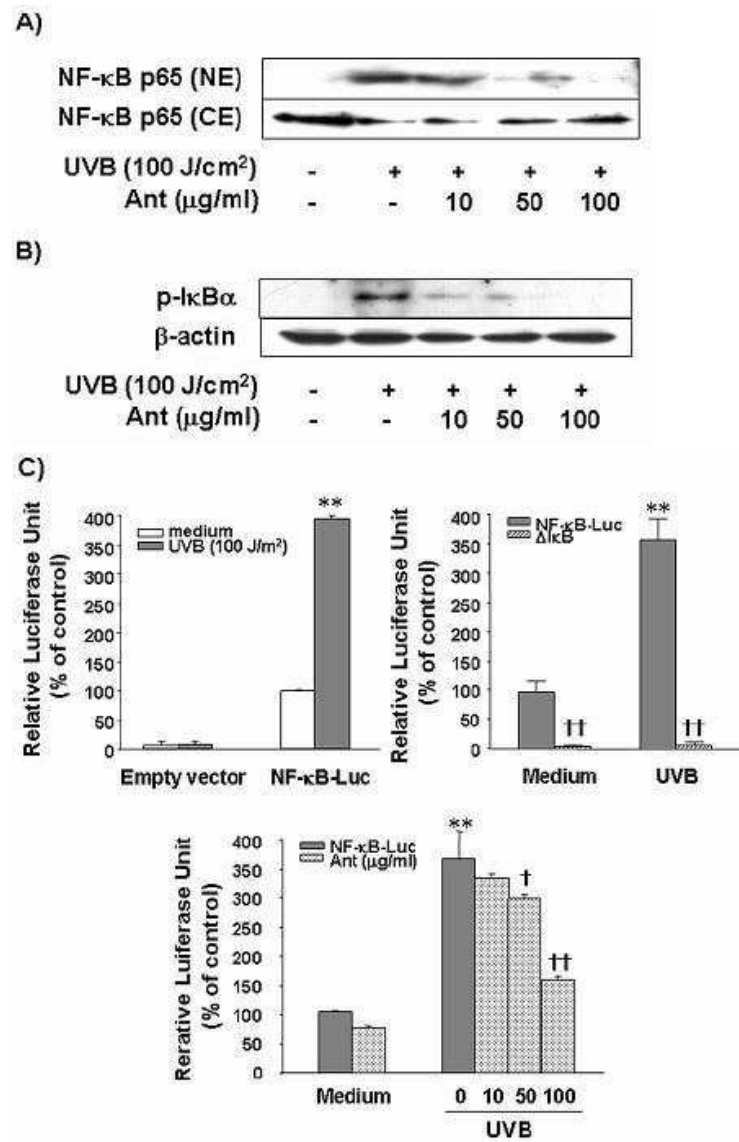
<82> 도 7은 무모 마우스에서 UVB-유도 아팜토틱 세포 사멸에 안토시아닌이 미치는 효과를 나타낸 결과이다. UVB 조사후에 즉시 안토시아닌 (평균수, 100 μl 에서 50 또는 100 mg/kg 의 양으로)을 무모 마우스에 국부적으로 도포하였다. 24시간 후에, 등쪽 피부(약 $1\times 2\text{ cm}$)를 각 마우스에서 절제하고 TUNEL 어세이 (A) 및 웨스턴 블랏 분석 (B)을 수행하였다. 결과는 반복 실험으로 확인하였다.

도면

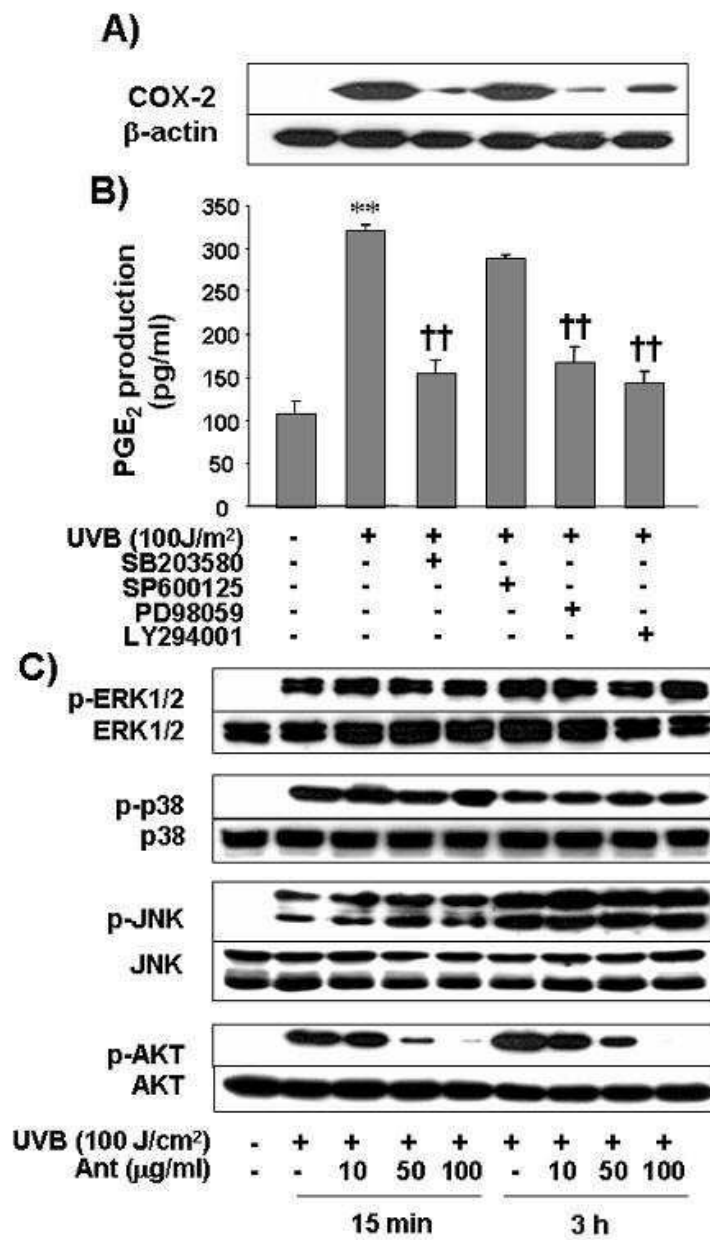
도면1



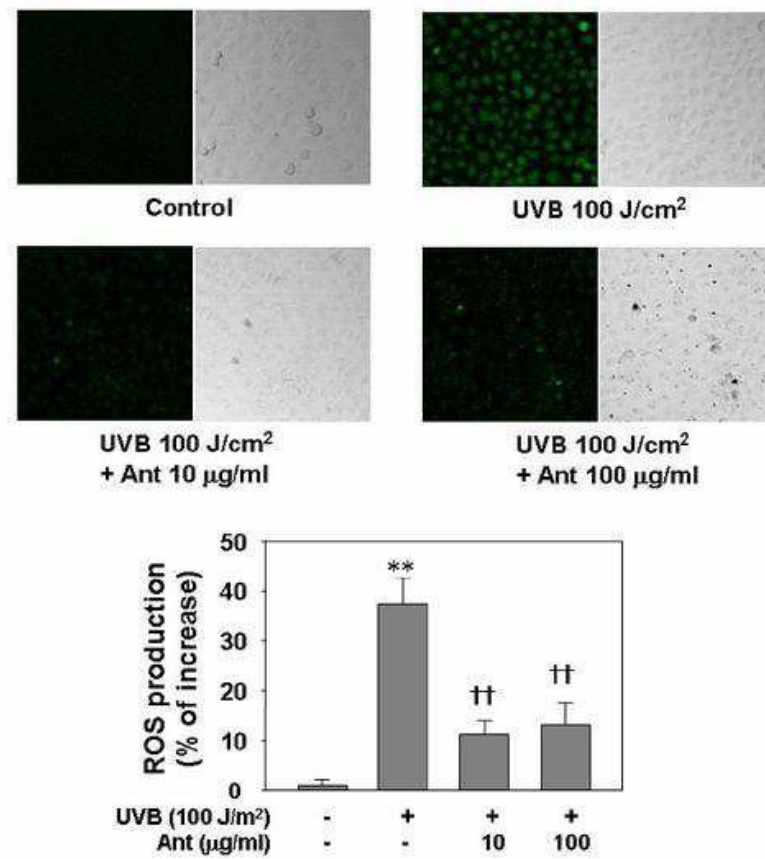
도면2



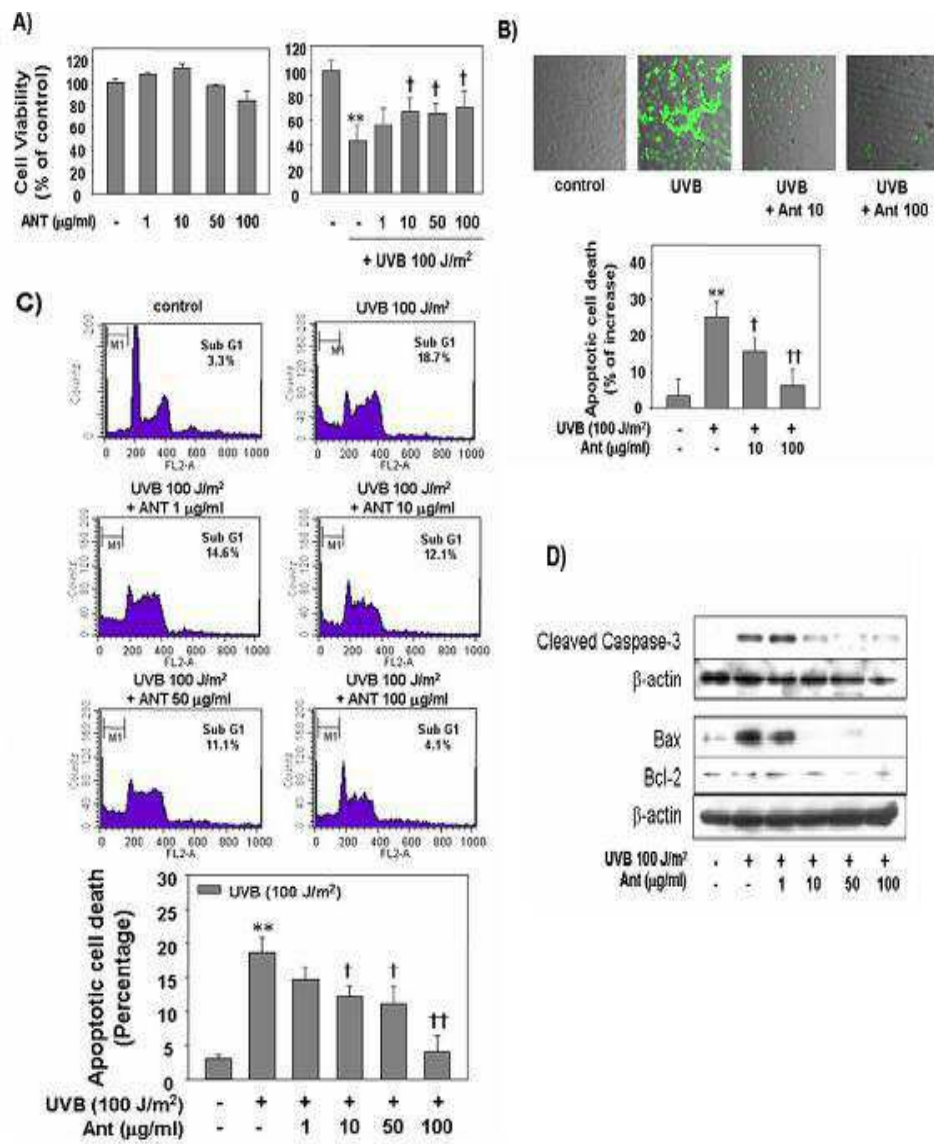
도면3



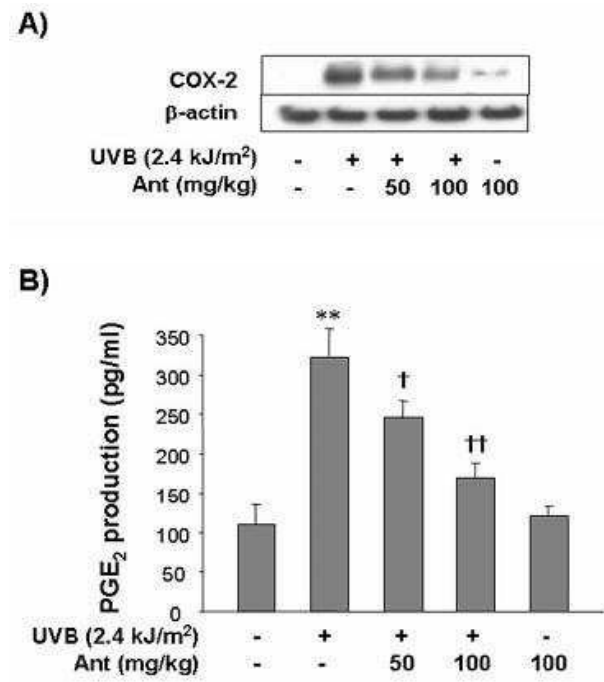
도면4



도면5



도면6



도면7

