



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0059042
(43) 공개일자 2010년06월04일

(51) Int. Cl.

A61K 31/195 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0117680

(22) 출원일자 2008년11월25일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

(주)아모레퍼시픽

서울 용산구 한강로2가 181번지 태평양빌딩

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

최현

서울특별시 강남구 청담2동 19-21 102호

여현주

서울특별시 중랑구 묵2동 현대 I-PARK 102-1902

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤동열

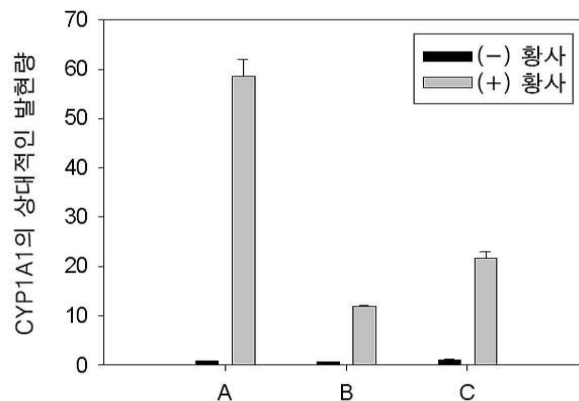
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 황사에 의한 피부 자극 인자, 피부 자극 유도 방법, 상기 피부 자극 인자를 억제시키고 피부 자극을 완화시키는 물질을 스크리닝하는 방법 및 상기 방법으로 스크리닝된 물질을 함유하는 피부 외용제 조성물

(57) 요약

본 발명은 각질형성세포에 황사를 처리하여 발현량이 유의적으로 증가한 물질을 스크리닝함으로써 황사에 의한 피부 자극을 유도하는데 관여하는 물질을 스크리닝하는 방법, 각질형성세포 내에서 AhR 또는 CYP 단백질의 발현량을 증가시켜 황사에 의한 피부 자극을 유도하는 방법, 포유류에서 AhR 또는 CYP의 발현을 억제시킴으로써 황사로 인한 피부 자극을 완화시키는 방법, 상기 황사에 의한 피부 자극 인자의 발현 정도를 측정함으로써 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질을 스크리닝하는 방법, 및 상기 방법으로 스크리닝된 물질, 즉 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공한다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

노민수

서울특별시 서초구 잠원동 73 신반포 2차아파트
110동 606호

신화영

경기도 수원시 영통구 영통동 신나무실 동보아파트
622동 905호

김한곤

경기도 수원시 영통구 매탄동 1260 주공그린빌APT
2단지 201동 903호

도성재

서울특별시 성북구 돈암동 609-1 한신Apt.109-1802

김원년

서울특별시 성북구 안암동5가 103-80 404호

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 각질형성세포에 황사를 처리하는 단계; 및
 - 2) 역전사중합효소반응을 통해 정상 각질형성세포와 비교하여 발현량이 유의적으로 변화된 유전자를 스크리닝하는 단계;
- 를 포함하는, 황사에 의한 피부 자극을 유도하는데 관여하는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 황사에 의한 피부 자극을 유도하는데 관여하는 물질은 AhR 또는 CYP 단백질을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 3

각질형성세포 내에서 AhR 또는 CYP 단백질의 발현량을 증가시켜 황사에 의한 피부 자극을 유도하는 방법.

청구항 4

포유류에 AhR 또는 CYP 억제제를 유효량으로 투여하여 포유류에서 AhR 또는 CYP 발현을 억제시킴으로써 황사로 인한 피부 자극을 완화시키는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 포유류가 아토피 피부염, 여드름 또는 건선을 나타내는 포유류임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 AhR 또는 CYP의 억제제는 전신 또는 국소적으로 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

- 1) 시험세포에 황사를 처리하여 황사에 의한 피부 자극 인자의 과발현을 유도하는 단계;
 - 2) 황사에 의한 피부 자극 인자가 과발현된 세포에 후보 물질들을 처리하는 단계; 및
 - 3) 상기 2) 단계의 세포에서 황사에 의한 피부 자극 인자의 발현 정도 측정하는 단계;
- 를 포함하는, 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 1) 단계에서 시험 세포가 각질형성세포임을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 1) 단계에서 황사의 처리량이 25 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 범위 임을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 1) 단계에서 피부 자극 인자는 AhR 또는 CYP 단백질을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 11

제 7 항에 있어서, 상기 3) 단계에서 황사에 의한 피부 자극 인자의 발현 정도는 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 통하여 측정된 것임을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 12

제 7 항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 기재된 방법으로 스크리닝된 물질로서, 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질이 과루인임을 특징으로 하는 물질.

청구항 14

제 12항에 의한, 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물.

청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 과루인을 0.001~1 중량%로 함유함으로써 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 것임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 각질형성세포에 황사를 처리하여 발현량이 유의적으로 증가한 물질을 스크리닝함으로써 황사에 의한 피부 자극을 유도하는데 관여하는 물질을 스크리닝하는 방법, 각질형성세포 내에서 AhR 또는 CYP 단백질의 발현량을 증가시켜 황사에 의한 피부 자극을 유도하는 방법, 포유류에서 AhR 또는 CYP의 발현을 억제시킴으로써 황사로 인한 피부 자극을 완화시키는 방법, 상기 황사에 의한 피부 자극 인자의 발현 정도를 측정함으로써 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질을 스크리닝하는 방법, 및 상기 방법으로 스크리닝된 물질, 즉 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공한다.

배경 기술

[0002] 피부는 외부 환경에 직접적으로 노출되는 신체 부위로서, 우리 몸의 중요한 기관들을 보호하는 보호막 역할을 할 뿐만 아니라 수분 증발을 조절하고 외부 감염으로부터 몸을 보호하는 역할을 한다. 하지만, 아무리 외부로부터의 바이러스 침투를 막아내는 피부일지라도 과도한 자외선이나 오염물질 등에 노출되면 홍반, 부종 및 가려움 등의 피부 자극 및 염증 반응을 유발하게 되고, 특히 강한 바람과 흙먼지를 동반한 황사에 의해 상처를 입게 된다.

[0003] 황사는 중국 및 몽고 등의 내륙에 위치한 사막에서 작은 모래나 황토가 부유하여 상층바람을 타고 멀리 수송되어, 지면 가까이 낙하하는 현상이다. 우리나라에서도 매년 봄철이면 황사가 주기적으로 발생한다. 황사는 유기물과 무기물의 복합체로 발생시기와 장소에 따라 물리적 특성과 구성성분이 매우 다양하며, 생물학적으로 영향을 줄 수 있는 금속 성분도 포함하고 있다. 황사 중 크기가 큰 입자들은 주로 발원지나 주변에 머물며, 국내에 유입되는 것들은 대개 지름 10 μm 이하의 미세먼지(Particulate matter 10; PM10)이다. 이러한 미세먼지가 흡입시에 하부기관지 및 폐의 가스-교환부분까지 침착하여 호흡기계에 손상을 일으킬 수 있다고 보고된 바 있다(Yanagisawa et al., Gene expression analysis of murine lungs following pulmonary exposure to asian sand dust particles. Exp Biol Med 232:1109-1118, 2007, Kim et al., Cytotoxicity of yellow sand in lung epithelial cells. J Biosci 28(1):77-81, 2003). 황사의 인체 내 유해성에 대한 연구는 호흡기질환 연구에서 많이 이루어졌는데, 실험용 쥐를 이용한 연구에서 실제 황사발생 시 채취된 황사를 흡입시킨 결과 폐에서 염증 반응지표가 상승했다는 동물실험연구가 있다(Donaldson et al., Ultrafine particle. Occup Environ Med 58(3):211-215, 2001).

[0004] 2006년 예방의학회지에 보고된 "황사에 대한 수도권 거주 성인의 위해도 인식조사"에 따르면, 응답자의 40.2%가 황사에 의한 신체적 불편증상을 경험한 적이 있으며(남성 32.5%, 여성 47.1%), 여성응답자의 25.8%가 '가려움증 등의 피부증상'을 경험한 것으로 나타났다. 이 보고에 따르면 황사는 건강에 가장 유해한 환경문제의 하나로 인

식되고 있으며, 피부질환과 관련성이 큰 것으로 보고 있다(Im et al., Public perceptions of the risk of asian dust storms in seoul and its metropolitan area. J Prev Med Public Health 39(3):205-212, 2006). 임상적으로 황사바람이 직접 피부에 닿으면 알레르기 반응을 일으켜 접촉성 피부염이 발생하기 쉬우며, 또 건조하고 세찬 황사바람은 피부의 수분을 앗아가 피부건조증, 각질, 가려움증, 황사여드름 및 아토피 등을 유발한다고 알려져 있지만, 황사에 의한 피부 유해영향은 과학적으로 밝혀져 있지 않다.

[0005] 피부의 최외각층에 존재하는 각질형성세포(또는 각질세포; Keratinocyte)는 섬유아세포, 내피세포 및 진피세포에 주로 있는 면역세포들과 상호작용하여 염증반응의 개시, 조정 및 조절에 중요한 역할을 한다. 피하의 염증반응과 관련하여 피부자극은 가장 일반적인 유해효과이며 임상적으로 접촉성 피부염의 70%는 피부자극으로 설명될 수 있다. 홍반, 부종, 균열, 수분손실, 표피탈락, 간지럼증 및 통증은 자극성 또는 알러지성 접촉성 피부염의 대표적 증상들이다. 이것은 세포의 항상성에 이상이 오고 염증반응이 일어나 생기는 증상들이다. 다시 말해, 이러한 증상들은 피부자극에 의해 생겨나는 복잡한 생화학적, 신경과 혈관 세포 반응들의 연쇄작용에 의한 궁극적 생리학적 소견인 것이다. 알러지 반응과 달리 피부자극은 피부에 대한 직접적인 염증반응으로 시작된다는 점에서 차이가 있다. 그러므로 피부자극은 지엽적으로 일어나며, 비면역성 염증반응으로 자극 후 생겨났다가 수일 내에 사라지는 반응으로 정의할 수 있다(D'errico et al., Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. Mutation Research 614; 37-47, 2007). 황사에 의한 피부 자극반응도 그동안 발표된 임상적 보고들을 볼 때 이러한 피부자극반응과 유사한 반응을 일으킬 것으로 예상이 된다. 그러나, 황사의 피부영향에 관한 실제적인 연구결과와 보고는 아직 없으며, 따라서 이에 대한 치료나 대비책은 명확히 제시되지 않고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 이에, 본 발명자들은 황사로 인한 피부 유해작용을 밝히기 위하여, 피부 조직의 최외각층에 존재하는 각질형성세포에 황사를 처리하였을 때 발생하는 다양한 생물학적 반응들에 근거하여 황사로 인한 피부 유해 작용을 검증한 결과, 황사가 피부각질형성세포에 작용하여 염증을 유발하는 인터루킨과 함께 AhR 및 CYP 단백질의 합성을 증가시킴을 확인하고, AhR 또는 CYP 단백질의 발현을 조절함으로써 황사에 의한 피부 자극을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 피부 자극을 완화시키는 물질을 효율적으로 스크리닝할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 황사에 의한 피부 자극을 유도하는데 관여하는 물질을 스크리닝하는 방법 및 상기 스크리닝 물질을 이용하여 황사에 의한 피부 자극을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또한 본 발명의 목적은 황사에 의한 피부 자극 인자 억제제를 투여하여 황사로 인한 피부 자극을 완화시키는 방법 및 황사에 의한 피부 자극을 완화시킬 수 있는 물질을 효율적으로 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 목적은 상기 방법으로 스크리닝된 물질, 즉 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 1) 각질형성세포에 황사를 처리하는 단계; 및 2) 역전사중합효소 반응을 통해 정상 각질형성세포와 비교하여 발현량이 유의적으로 변화된 유전자를 스크리닝하는 단계;를 포함하는, 황사에 의한 피부 자극을 유도하는데 관여하는 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0011] 또한 본 발명에서는 각질형성세포 내에서 AhR 또는 CYP 단백질의 발현량을 증가시켜 황사에 의한 피부 자극을 유도하는 방법 및 포유류에 AhR 또는 CYP 억제제를 유효량으로 투여하여 포유류에서 AhR 또는 CYP 발현을 억제시킴으로써 황사로 인한 피부 자극을 완화시키는 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명에서는 1) 시험세포에 황사를 처리하여 황사에 의한 피부 자극 인자의 과발현을 유도하는 단계; 2) 황사에 의한 피부 자극 인자가 과발현된 세포에 후보 물질들을 처리하는 단계; 및 3) 상기 2) 단계의 세포에서 황사에 의한 피부 자극 인자의 발현 정도 측정하는 단계; 를 포함하는, 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0013] 마지막으로, 본 발명에서는 상기 방법으로 스크리닝된 물질, 즉 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질을 유

효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공한다.

효 과

[0014] 본 발명에서는 황사에 의한 피부 유해작용에 관여하는 피부 자극 인자로서 AhR 및 CYP 단백질이 중요한 역할을 하는 것을 밝히고, AhR 또는 CYP 단백질의 발현을 감소시킴으로 황사로 인한 피부 자극을 줄일 수 있음을 확인하였다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0015] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명에서는 중요한 환경유해인자인 황사의 피부 유해작용을 밝히기 위하여 고려대학교 지구환경실험실에서 3년간 포집한 서울 시내의 황사를 피부 조직의 최외각층에 존재하는 각질형성세포에 처리했을 때 발생하는 다양한 생물학적 반응들을 관찰하였다.

[0017] 본 발명에서는 정상 사람 각질형성세포에 서울 시내에서 포집한 황사를 처리하여 이에 따른 유전자 발현 변화를 실시간 역전사중합효소 연쇄반응(real time-reverse transcription polymerase chain reaction)을 통하여 황사에 의한 피부 자극 기전의 해명이나 완화제의 개발에 적합하게 이용할 수 있는 스크리닝 방법 및 황사에 의한 피부자극 증상의 유도 방법을 개발하였다. 본 발명자들은 우선 황사를 처리한 사람 정상 각질형성세포에서 대표적인 환경오염인자인 다고리형 방향족 탄화수소(PAHs: Polycyclic aromatic hydrocarbons)에 의해 활성화되는 AhR(Aryl-hydrocarbon receptor) 단백질과 활성화된 AhR에 의해 발현되는 세포내 산화효소 CYP1A1, CYP1B1 및 CYP2A 단백질의 발현 정도 및 피부 염증, 면역 반응에 관여하는 여러 인터루킨 단백질의 발현 정도를 역전사중합효소 연쇄반응 실험법을 통하여 확인한 결과, 황사에 의하여 피부 각질형성세포에서 AhR 및 CYP 단백질의 발현이 증가됨을 확인하였으며, 또한 AhR 및 CYP 단백질과 함께 염증을 유발하는 사이토카인인 IL-6와 IL-8의 발현을 증가시킴을 확인하였고, 황사로 인한 피부 유해 반응 완화에 유효한 물질들을 향후 함께 처리하여 발굴할 수 있는 스크리닝 방법을 확립할 수 있었다.

[0018] 본 발명은 1) 각질형성세포에 황사를 처리하는 단계; 및 2) 역전사중합효소반응을 통해 정상 각질형성세포와 비교하여 발현량이 유의적으로 변화된 유전자를 스크리닝하는 단계;를 포함하는, 황사에 의한 피부 자극을 유도하는데 관여하는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0019] 본 발명에서는 상기 과정을 거쳐 황사에 의한 피부 자극이 AhR 또는 CYP 단백질의 발현량을 증가시키는 것을 확인하고, 황사에 의한 피부 자극 인자로서 AhR 또는 CYP 단백질을 발견하였으나, 이에만 한정되는 것은 아니다.

[0020] 따라서, 이하 본 발명에서 사용하는 "황사에 의한 피부 자극 인자"라는 용어는 상기 스크리닝 방법을 통하여 정상 각질형성세포 보다 황사를 처리한 각질형성세포에서 그 발현량이 유의적으로 증가된 것이 밝혀진 물질을 일컫는다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용하는 황사에 의한 피부 자극 인자는 AhR 또는 CYP 단백질이다.

[0021] 또한 본 발명은 상기 각질형성세포 내에서 황사에 의한 피부 자극 인자, 즉 AhR 또는 CYP 단백질의 발현량을 증가시켜 황사에 의한 피부 자극을 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0022] 또한 본 발명은 포유류에 AhR 또는 CYP 억제제를 유효량으로 투여하여 포유류에서 AhR 또는 CYP 발현을 억제시킴으로써 황사로 인한 피부 자극을 완화시키는 방법에 관한 것이다.

[0023] 본 발명에서 사용하는 "AhR 또는 CYP 억제제"라는 용어는 황사에 의한 AhR 또는 CYP의 활성을 저해하거나, 또는 AhR 또는 CYP의 발현을 유도하는 기작에 대하여 길항작용을 함으로써 AhR 또는 CYP의 발현을 억제시키는 물질을 의미한다. 본 발명에서 사용할 수 있는 AhR 또는 CYP 억제제로는 황사가 AhR 또는 CYP의 발현을 유도하는 기작에 대해 길항작용을 하는 물질이 활성부위에 결합하는 경쟁적 저해제(competitive inhibitor), 활성부위가 아닌 부위에 결합하여 활성부위의 기능을 방해하는 비경쟁적 저해제(noncompetitive inhibitor), 세포 내 특정 위치로의 이동(localization)을 방해하는 물질, AhR 또는 CYP를 분해(degradation)하거나 분해를 유도하는 물질,

황사가 AhR 또는 CYP의 과발현을 유도하는 기작에 대한 차단제(blocking agent) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된다.

[0024] 상기 포유류는 아토피 피부염, 여드름 또는 건선을 나타내는 포유류이고, 상기 AhR 또는 CYP 억제제는 당업계에 잘 알려진 통상적인 투여 경로를 통하여 전신 또는 국소적으로 투여된다.

[0025] 또한 본 발명은 하기 단계를 포함하는 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0026] 1) 시험세포에 황사를 처리하여 황사에 의한 피부 자극 인자의 과발현을 유도하는 단계;

[0027] 2) 황사에 의한 피부 자극 인자가 과발현된 세포에 후보 물질들을 처리하는 단계; 및

[0028] 3) 상기 2) 단계의 세포에서 황사에 의한 피부 자극 인자의 발현 정도 측정하는 단계.

[0029]

[0030] 상기 1) 단계에서 시험 세포는 황사에 의한 피부 자극 인자의 발현이 유도할 수 있는 세포라면 모두 사용이 가능하며, 바람직하게는 각질형성세포(keratinocytes)를 사용하나, 이에만 한정되지 않는다. 상기 황사에 의한 피부 자극 인자는 AhR 또는 CYP 단백질을 들 수 있으나, 이에만 한정되지 않는다. 이 때, 황사의 처리량은 25 내지 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 범위가 바람직하다.

[0031] 또한 상기 3) 단계에서 황사에 의한 피부 자극 인자의 발현 정도는 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 통해 측정하여 확인할 수 있다.

[0032] 본 발명에서는 상기 방법으로 스크리닝된 물질, 즉 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서는 상기 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질로서 과루인이 스크리닝되었으나, 이에만 한정되지 않는다.

[0033] 따라서, 본 발명에 따른 황사에 의한 피부 자극 완화용 피부 외용제 조성물은 황사에 의한 피부 자극을 완화시키는 물질, 예를 들면, 과루인을 조성물 총 중량에 대하여 0.001~1 중량%로 함유하는 것이 바람직하다. 상기 과루인의 함량이 0.001 중량% 미만인 경우에는 원하는 피부 자극 완화 효능을 얻을 수 없고, 1 중량%를 초과하는 경우에는 피부 자극 완화 효과가 오히려 감소하여 함량 초과에 따른 상승 효과를 기대할 수 없으므로 바람직하지 않다.

[0034] 본 발명에 의한 피부 외용제 조성물은 그 제형에 특별히 한정되지 않으며, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징로션, 클렌징폼, 클렌징 워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 바디세정제, 염모제, 헤어토닉, 모발 영양화장수, 헤어에센스, 헤어세럼 스칼프트리트먼트, 헤어트리트먼트, 헤어컨디셔너, 헤어샴푸, 헤어로션, 치약, 구강 청정제, 정발제, 양모제, 로션, 연고, 젤, 크림, 패취 또는 분무제 등으로 제형화될 수 있다.

[0035]

[0036] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 사상과 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있다.

[0037] **[실시예 1] 사람 각질형성세포에서 황사에 의한 AhR, CYP 유전자의 발현 변화**

[0038] 사람 피부 각질형성세포주(Human epidermal neonatal keratinocyte cells)는 상용적으로 확보되어 권장하는 방법으로, 론자사(Lonza, Inc., 미국 메릴랜드주 워커스빌(Walkersville) 소재)에서 구입하여 계대배양한 후 CO₂ 배양기(incubator)에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 세포를 배양하였다. 세포 배양액은 론자사의 지침서에 따라 배양하였다. 500 ml의 KBM-2(Clonetics CC-3103) 배지에 KGM-2 볼렛 키트(Bullet kit)[BPE(Bovine pituitary extract) 2ml, hEGF(human epidermal growth factor) 0.5 ml, 인슐린(Insulin) 0.5 ml, 하이드로코티손(Hydrocortisone) 0.5 ml, 트랜스페린(Transferrin) 0.5 ml, 에피네프린(Epinephrine) 0.5 ml 및 젠타마이신

설페이트+암포페리신-B(Gentamycin Sulfate + Amphotericin-B: GA-1000) 0.5 ml)]를 첨가하여 사용하였다.

[0039] 사람 각질형성세포를 배양한 무처리군(control)과 실험군의 경우, 사람 각질형성세포 배양액에 2004년 4월 12일, 2006년 3월 11일 및 2006년 4월 8일에 각각 포집한 황사시료 또는 TiO_2 를 25 $\mu g/ml$ 씩 첨가한 후 24시간 세포를 배양하였다. 상기 황사시료는 2004년 4월 12일, 2006년 3월 11일 및 2006년 4월 8일의 3회의 황사기간에 서울 동북부(37° 35'N, 127° 01'E)에 위치한 고려대학교 과학관 옥상에서 포집한 것을 사용하였다. 황사기간 동안에, 6시간 동안 깨끗한 표면에 황사를 모았고, 5 cc의 폴리에틸렌 큐브(cube)에 압축시켰으며 5 $\mu g/\mu l$ 용액으로 조제한 다음 사용하였다. 황사 처리 24시간 후, 10 ml의 인산염 완충액(PBS: Phosphate Buffered Saline)으로 세포를 두 번 세척하고, 트라이졸(Trizol reagent; 인비트로젠사(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스배드(Carlsbad) 소재)을 이용하여 세포 내의 전체 RNA(total RNA)를 분리하였다. 분리된 RNA를 RNA 키트(Qiagen RNeasy kit; 키아젠사(Qiagen), 미국 캘리포니아주 발렌시아(Valencia) 소재)를 사용하여, 한번 더 정제한 후 바이오어널라이저 2100 모델 기기(Agilent 2100 BioAnalyzer; 애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies), 미국 캘리포니아주 산타 클라라(Santa Clara) 소재)를 이용하여 RNA의 질(quality)을 확인하였다. 역전사키트(Superscript Reverse Transcriptase (RT) II kit; 인비트로젠사)를 이용하여 상기 분리된 RNA로부터 cDNA를 합성하였고, 이를 실시간역전사증합효소연쇄반응(Q-RT-PCR)으로 정량적으로 분석하였다. AhR(Hs00907314_m1), CYP1A1(Hs01054797_g1), CYP1A2(Hs01070374_m1) 및 CYP1B1(Hs00164383_m1)의 발현 패턴 변화는 택맨 유전자발현시스템(TaqMan® gene expression assay kit; 어플라이드 바이오시스템사(Applied Biosystems), 미국 캘리포니아주 포스터시티(FosterCity) 소재)을 이용하여 평가하였으며, 그 결과를 도 1a 및 1b에 도시하였다.

[0040] 도 1a의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 사람정상각질형성세포에서 2006년 3월 11일의 황사가 AhR, CYP1A1, CYP1B1 및 CYP1A2 단백질의 발현을 확연히 증가시켰다.

[0041] 도 1b의 결과에서는 각기 다른 세 기간의 황사시료에서 CYP1A1의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 따라서, 본 실시예의 방법이 황사에 의한 피부 자극 기전의 해명이나 연구에 적합하게 이용할 수 있는 스크리닝 방법임을 알 수 있었다[A: 무처리군, B: TiO_2 (25 $\mu g/ml$) 처리군, C: 황사 2004/4/12 (25 $\mu g/ml$) 처리군, D: 황사 2006/3/11 (25 $\mu g/ml$) 처리군, E: 황사 2006/4/8 (25 $\mu g/ml$)]. TiO_2 는 입자의 크기와 성질이 황사와 비슷하나 상대적으로 생물학적 화학적 유해영향이 적어 대조군으로 사용하였다.

[실시예 2] 사람 각질형성세포에서 황사에 의한 IL-6 및 IL-8 의 발현 변화

[0043] 사람 피부 각질형성세포주는 상용적으로 확보되어 권장하는 방법으로, 론자사에서 구입하여 계대배양한 후 CO_2 배양기에서 37°C, 5% CO_2 조건하에서 세포를 배양하였다. 세포 배양액은 론자사의 지침서에 따라 배양하였다. 500 ml의 KBM-2(Clonetics CC-3103) 배지에 KGM-2 볼렛 키트[BPE 2 ml, hEGF 0.5 ml, 인슐린 0.5 ml, 하이드로코티손 0.5 ml, 트랜스페린 0.5 ml, 에피네프린 0.5 ml 및 젠타마이신 설페이트+암포페리신-B(GA-1000) 0.5 ml]를 첨가하여 사용하였다.

[0044] 사람 각질형성세포를 배양한 무처리군과 실험군의 경우, 사람 각질형성세포 배양액에 2004년 4월 12일, 2006년 3월 11일 및 2006년 4월 8일에 각각 포집한 황사시료 또는 TiO_2 를 25 $\mu g/ml$ 씩 첨가하여, 24시간 세포를 배양하였다. 황사시료는 2004년 4월 12일, 2006년 3월 11일 및 2006년 4월 8일의 3회의 황사기간에 서울 동북부(37° 35'N, 127° 01'E)에 위치한 고려대학교 과학관 옥상에서 포집한 것을 사용하였다. 황사기간 동안에, 6시간 동안 깨끗한 표면에 황사를 모았고, 5 cc의 폴리에틸렌 큐브에 압축시켰고 5 $\mu g/\mu l$ 용액으로 조제한 후 사용하였다. 황사 처리 24시간 후, 10 ml의 인산염 완충액으로 세포를 두 번 세척하고, 트라이졸(인비트로젠사)을 이용하여 세포 내의 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 RNA 키트(키아젠사)를 사용하여, 한번 더 정제한 후, 바이오어널라이저 2100 모델 기기(애질런트 테크놀로지스)를 이용하여, RNA의 질을 확인하였다. 역전사키트(Superscript Reverse Transcriptase (RT) II kit; 인비트로젠사)를 이용하여 상기 분리된 RNA로부터 cDNA를 합성하였고, 이를 실시간역전사증합효소연쇄반응(Q-RT-PCR)으로 정량적으로 분석하였다. IL-6(Hs99999032_m1), IL-8(Hs00174103_m1) 및 IFN- γ (Hs00194264_m1)의 발현 패턴 변화는 택맨 유전자발현시스템(TaqMan® gene expression assay kit; 어플라이드 바이오시스템사)을 이용하여 평가하였으며, 그 결과를 도 2a 내지 2c에 도시하였다.

[0045] 도 2a 내지 2c의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 사람 정상 각질형성세포에서 황사가 IL-6 및 IL-8 유전자의

발현을 확연히 증가시키는 반면, IFN- γ 의 발현에는 영향을 주지 않았다. 따라서, 본 실시예의 방법이 황사에 의한 피부 염증반응의 해명이나 연구에 적합하게 이용할 수 있는 스크리닝 방법임을 알 수 있다[A: 무처리군, B: TiO₂ (25 μ g/ml) 처리군, C: 황사 2004/4/12 (25 μ g/ml) 처리군, D: 황사 2006/3/11 (25 μ g/ml) 처리군, E: 황사 2006/4/8 (25 μ g/ml)].

[0046] [실시예 3] 과루인 처리시 황사로 인한 AhR, CYP 및 염증인자의 발현 억제 확인

[0047] 사람 피부 각질형성세포주는 상용적으로 확보되어 권장하는 방법으로, 론자사에서 구입하여 계대 배양한 후 CO₂ 배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 세포를 배양하였다. 세포 배양액은 론자사의 지침서에 따라 배양하였다. 500 ml의 KBM-2(Clonetics CC-3103) 배지에 KGM-2 볼렛 키트[BPE 2 ml, hEGF 0.5 ml, 인슐린 0.5 ml, 하이드로코티손 0.5 ml, 트랜스페린 0.5 ml, 에피네프린 0.5 ml 및 젠타마이신 설페이트+암포페리신-B(GA-1000) 0.5 ml]를 첨가하여 사용하였다.

[0048] 사람 각질형성세포를 배양한 무처리군과 실험군의 경우, 사람 각질형성세포 배양액에 10 ppm의 과루인 추출물을 30분간 전처리한 후(과루인 처리군) 2006년 3월 11일에 포집한 황사시료 25 μ g/ml를 첨가하여 24시간 세포와 함께 배양하였다(황사 처리군). 황사시료는 2006년 3월 11일 황사기간에 서울 동북부(37° 35'N, 127° 01'E)에 위치한 고려대학교 과학관 옥상에서 포집한 것을 사용하였다. 황사기간 동안에, 6시간 동안 깨끗한 표면에 황사를 모았고, 5cc의 폴리에틸렌 큐브에 압축시켰고 5 μ g/ μ l 용액으로 조제한 후 사용하였다. 황사 처리 24시간 후, 10 ml의 인산염 완충액으로 세포를 두 번 세척하고, 트라이졸(인비트로젠사)을 이용하여 세포 내의 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 RNA 키트(키아젠사)를 사용하여, 한번 더 정제한 후, 바이오어널라이저 2100 모델 기기(애질런트 테크놀로지스)를 이용하여 RNA의 질을 확인하였다. 역전사키트(Superscript Reverse Transcriptase (RT) II kit, 인비트로젠사)를 이용하여 상기 분리된 RNA로부터 cDNA를 합성하였고, 이를 실시간 역전사중합효소연쇄반응(Q-RT-PCR)으로 정량적으로 분석하였다. CYP1A1(Hs01054797_g1), IL-6(Hs99999032_m1) 및 IL-8(Hs00174103_m1)의 발현 패턴 변화는 택맨 유전자발현시스템(TaqMan® gene expression assay kit, 어플라이드 바이오시스템사)을 이용하여 평가하였으며, 그 결과를 도 3a 내지 3c에 도시하였다.

[0049] 도 3a 내지 3c의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 사람정상각질형성세포에서 황사가 증가시킨 염증을 유발하는 사이토카인들인 IL-6와 IL-8의 유전자 발현을 과루인이 억제시켰다. 따라서, 본 발명에 의한 스크리닝 방법으로 황사에 의한 피부염증반응의 완화시키는 물질을 용이하게 스크리닝할 수 있음을 알 수 있었다[A: 무처리군, B: 황사 2006/3/11 (25 μ g/ml) 처리군, C: 무처리군 + 과루인 10 ppm 처리군, D: 황사 2006/3/11 (25 μ g/ml) + 과루인 10 ppm 처리군].

[0050] [실시예 4] 과루인 처리시 황사로 인한 CYP의 발현 억제 농도별 효과 확인

[0051] 사람 피부 각질형성세포주는 상용적으로 확보되어 권장하는 방법으로, 론자사에서 구입하여 계대 배양한 후 CO₂ 배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 세포를 배양하였다. 세포 배양액은 론자사의 지침서에 따라 배양하였다. 500 ml의 KBM-2(Clonetics CC-3103) 배지에 KGM-2 볼렛 키트[BPE 2 ml, hEGF 0.5 ml, 인슐린 0.5 ml, 하이드로코티손 0.5 ml, 트랜스페린 0.5 ml, 에피네프린 0.5 ml 및 젠타마이신 설페이트+암포페리신-B(GA-1000) 0.5 ml]를 첨가하여 사용하였다.

[0052] 사람 각질형성세포를 배양한 무처리군과 실험군의 경우, 사람 각질형성세포 배양액에 10 ppm의 과루인 추출물을 30분간 전처리한 후(과루인 처리군) 2006년 3월 11일에 포집한 황사시료 25 μ g/ml를 첨가하여 24시간 세포와 함께 배양하였다(황사 처리군). 황사시료는 2006년 3월 11일 황사기간에 서울 동북부(37° 35'N, 127° 01'E)에 위치한 고려대학교 과학관 옥상에서 포집한 것을 사용하였다. 황사기간 동안에, 6시간 동안 깨끗한 표면에 황사를 모았고, 5 cc의 폴리에틸렌 큐브에 압축시켰고 5 μ g/ μ l 용액으로 조제한 후 사용하였다. 황사 처리 24시간 후, 10 ml의 인산염 완충액으로 세포를 두 번 세척하고, 트라이졸(인비트로젠사)을 이용하여 세포 내의 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 RNA 키트(키아젠사)를 사용하여, 한번 더 정제한 후, 바이오어널라이저 2100 모델 기기(애질런트 테크놀로지스)를 이용하여 RNA의 질을 확인하였다. 역전사키트(Superscript Reverse Transcriptase (RT) II kit, 인비트로젠사)를 이용하여 상기 분리된 RNA로부터 cDNA를 합성하였고, 이를 실시간 역전사중합효소연쇄반응(Q-RT-PCR)으로 정량적으로 분석하였다. CYP1A1(Hs01054797_g1)의 발현 패턴 변화는 택

맨 유전자발현시스템(TaqMan[®] gene expression assay kit, 어플라이드 바이오시스템사)을 이용하여 평가하였으며, 그 결과를 도 4에 도시하였다.

[0053] 도 4의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 사람정상각질형성세포에서 황사가 증가시킨 CYP1A1 유전자 발현 억제에 대한 과루인의 효과를 농도별로 확인하였다. 그 결과 과루인 1 ppm을 처리했을 때, 가장 높은 효과를 나타내었다. 따라서, 본 발명에 의한 스크리닝 방법으로 황사에 의한 피부유해반응을 완화시키는 물질과 그 물질의 적정 농도를 용이하게 스크리닝할 수 있음을 확인할 수 있었다[A: 무처리군, B: 과루인 1 ppm 처리군, C: 과루인 10 ppm 처리군].

[0054] 이상의 결과를 통하여, 황사에 의한 피부 자극 인자로서 AhR 및 CYP 단백질의 과발현과 함께 IL-6와 IL-8의 발현을 유도함으로써 염증반응을 일으킬 수 있음을 확인하였으며, AhR 또는 CYP 단백질의 발현 억제 정도를 측정함으로써 황사로 인한 피부염증반응을 유의적으로 감소시킬 수 있는 후보물질을 효율적으로 스크리닝할 수 있으며, 이 때 상기 유효물질의 적정농도도 함께 스크리닝할 수 있음을 확인하였다.

산업이용 가능성

[0055] 본 발명에서는 황사에 의한 피부 자극을 유도하고, 이러한 피부 자극에서 AhR 또는 CYP 단백질이 중요한 역할을 하고 있음을 밝힘으로써 AhR 또는 CYP 단백질의 발현을 조절하는 물질을 스크리닝하는 방법을 확립할 수 있었고, 이러한 스크리닝 방법을 통해 얻어진 물질을 황사로 인한 피부 트러블을 방지하고 피부 염증을 완화시키는 약학 또는 화장품 조성물에 유효성분으로 적용하여 황사로 인한 피부 자극을 줄일 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1a 및 1b는 사람정상각질형성세포에서 각기 다른 세 시기에 포집된 황사에 의한 AhR, CYP 단백질의 발현을 확인한 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석 결과이다[A: 무처리군, B: TiO₂ (25 µg/ml) 처리군, C: 황사 2004/4/12 (25 µg/ml) 처리군, D: 황사 2006/3/11 (25 µg/ml) 처리군, E: 황사 2006/4/8 (25 µg/ml)].

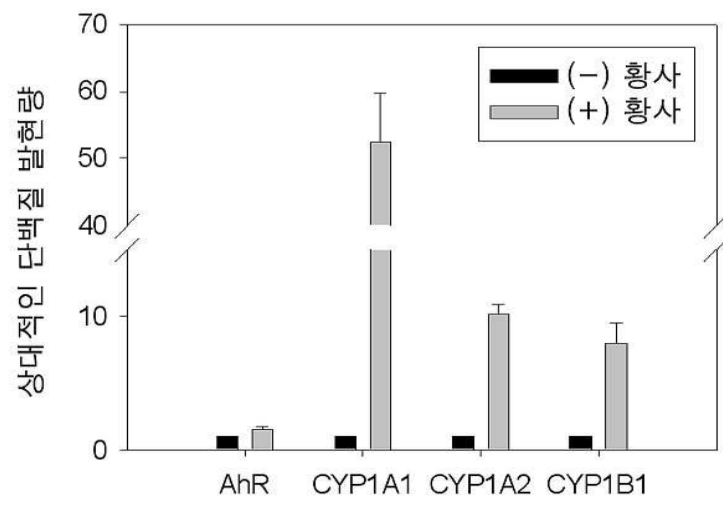
[0057] 도 2a 내지 2c는 사람정상각질형성세포에서 각기 다른 세 시기에 포집된 황사에 의한 염증유발인자인 IL-6, IL-8 및 IFN-γ의 발현을 확인한 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석 결과이다[A: 무처리군, B: TiO₂ (25 µg/ml) 처리군, C: 황사 2004/4/12 (25 µg/ml) 처리군, D: 황사 2006/3/11 (25 µg/ml) 처리군, E: 황사 2006/4/8 (25 µg/ml)].

[0058] 도 3a 내지 3c는 사람정상각질형성세포에서 황사에 의해 발현되는 유해인자의 발현을 억제시키는 후보 물질 과루인을 처리하여 CYP1A1, IL-6 및 IL-8의 발현 억제 정도를 확인한 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석 결과이다[A: 무처리군, B: 황사 2006/3/11 (25 µg/ml) 처리군, C: 무처리군 + 과루인 10 ppm 처리군, D: 황사 2006/3/11 (25 µg/ml) + 과루인 10 ppm 처리군].

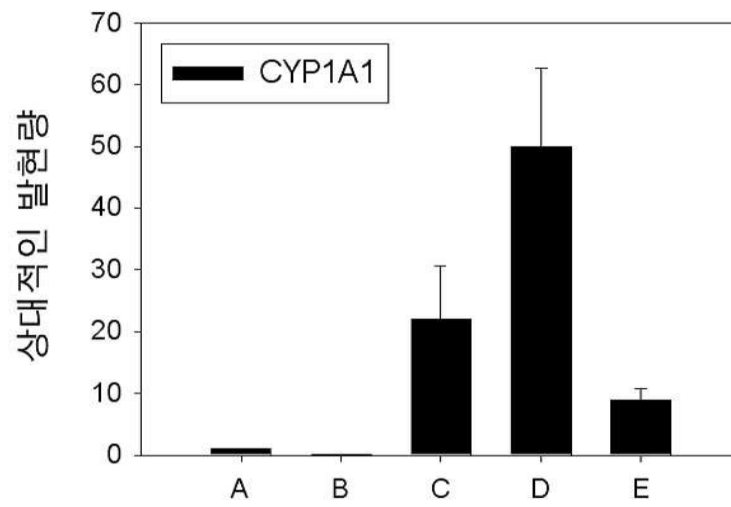
[0059] 도 4는 사람정상각질형성세포에서 황사에 의해 발현되는 유해인자의 발현을 억제시키는 후보 물질 과루인을 처리하여 CYP1A1의 발현 억제 정도를 농도에 따라 확인한 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석 결과이다[A: 무처리군, B: 과루인 1 ppm 처리군, C: 과루인 10 ppm 처리군].

도면

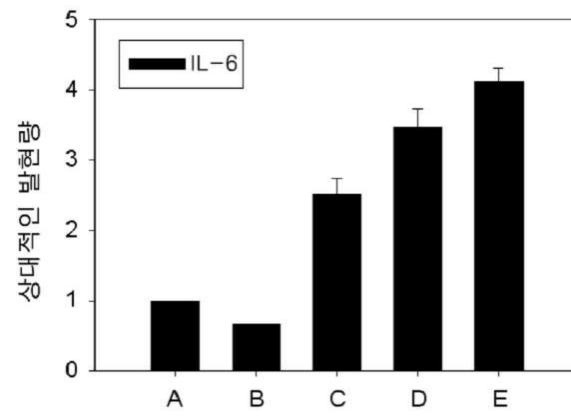
도면1a



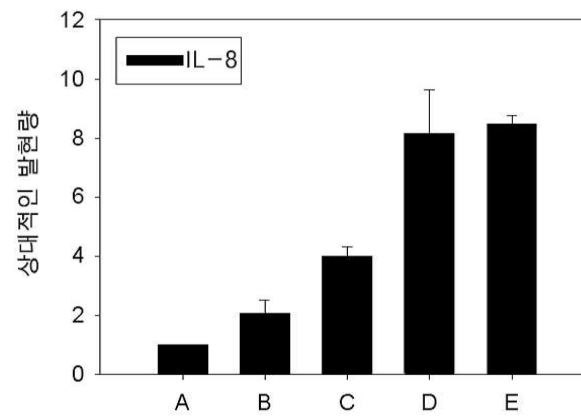
도면1b



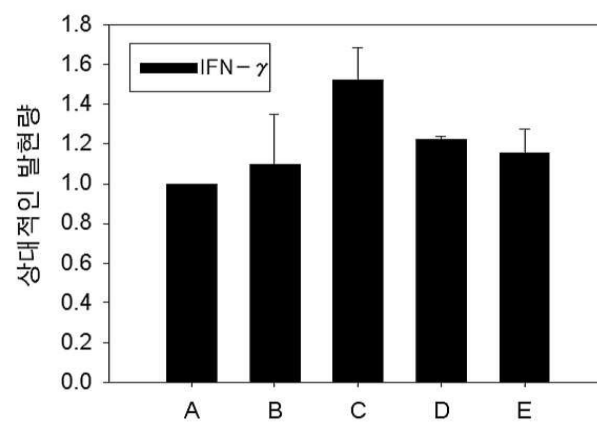
도면2a



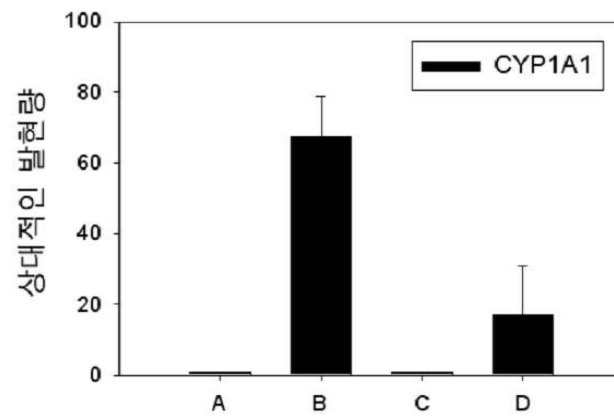
도면2b



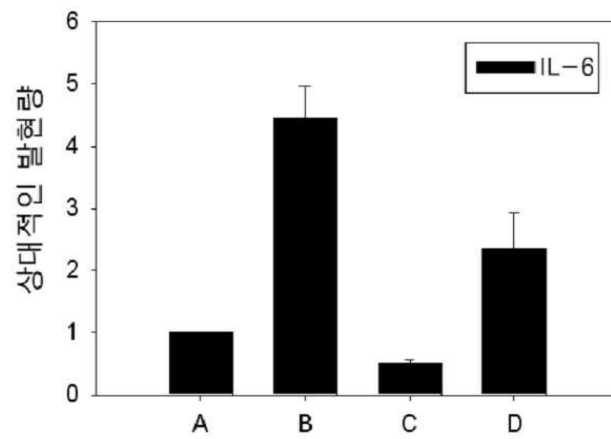
도면2c



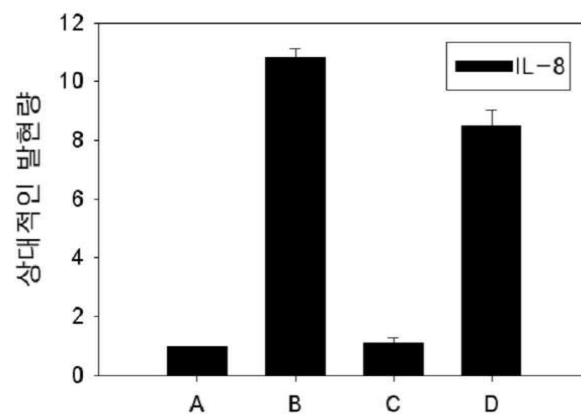
도면3a



도면3b



도면3c



도면4

