



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0125234
(43) 공개일자 2014년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/736 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0043148
(22) 출원일자 2013년04월18일
심사청구일자 2013년04월18일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
김영철
대구 달서구 호산로 125, 209동 1305호 (파호동,
삼성명가타운)
김상남
경북 성주군 벽진면 수촌2길 12-8,
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

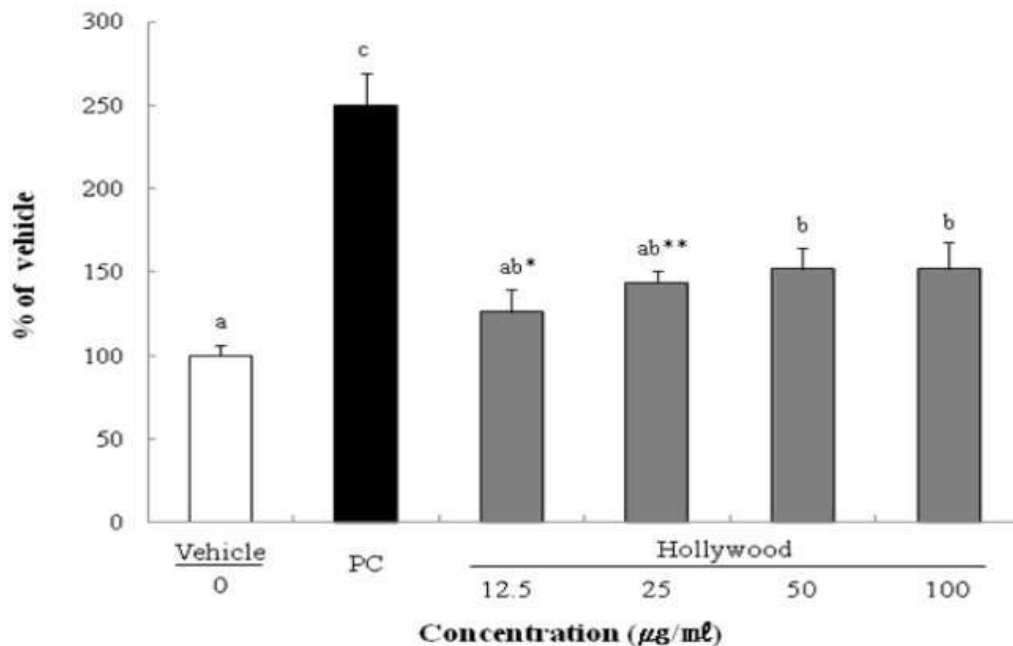
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 자두 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 자두 추출물을 포함하는 피부 상태 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 자두 추출물은 인체 피부섬유아세포에서 독성이 거의 없으며, 콜라겐의 합성을 촉진시키고, 콜라겐 분해 작용을 하는 MMP-2(matrix metalloproteinase-2)의 활성을 억제하고, MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 유전자의 발현도 억제하는 활성을 가지므로, 피부 주름 형성 억제, 피부 주름 개선, 피부 노화 방지, 피부 감촉 개선에 효과적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 피부 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 원료 소재로 개발될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

박은예

대구 달서구 한들로 70, 402동 305호 (장기동, 장
기파랑새마을아파트)

이채명

대구 서구 새방로25길 16-1, B-301 (상리동, 경원
하이츠2차)

박민아

대구 북구 구리로 26, 102동 1008호 (동천동, 칠곡
우방하이츠)

유용기

서울특별시 강남구 논현로 4길 41 3층

특허청구의 범위

청구항 1

자두 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 피부 상태 개선은 피부 노화 억제, 피부 주름 형성 억제, 또는 피부 감촉 개선인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 자두 추출물은 자두의 과육 또는 과피 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 자두는 서양자두 또는 동양자두인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 자두 추출물은 조성물 총 중량에 대해 0.0001 - 30 중량%으로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 자두 추출물은 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 클로로포름, 헥산(Hexane) 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 자두 추출물은 피부 섬유아세포에서 프로콜라겐(procollagen)의 합성 증가, MMP-2(matrix metalloproteinase-2) 활성의 저해, 또는 MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 유전자 발현의 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 화장품학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 자두 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 환경오염으로 인해 지표면에 도달하는 자외선 양의 증가와 함께 야외 활동시간의 증가, 서구화된 생활습관 및 스트레스와 같이 피부건강을 위협하는 요인들 또한 증가하고 있어 기능성 화장품에 대한 관심이 날로 증가하고 있다. 각종 유해물질의 지속적인 접촉으로 인해 체내에 축적되는 활성산소는 세포 유전자 변형, 세포성장 억제, 세포노화, 세포자멸사 등을 촉진시키기 때문에 활성산소를 효율적으로 제거하는 것이 피부노화 및 각종 만성 피부질환을 예방하는 핵심적인 기전으로 알려져 있다(Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005). 이에 따라 최근에는 기능성 화장품 개발을 위한 천연 항산화 물질 탐색 연구가 활발히 이루어지고 있다(배인순 등, 2012; 이경옥 등, 2011).

[0003] 피부의 표피층은 피부의 물리, 화학적 성질을 결정하는 피부장벽 역할을 하고, 진피층은 모세혈관과 신경이 분포되어 있어 표피에 영양분을 공급해 주는 역할을 하기 때문에 피부노화와 밀접한 관련이 있다(Chung, 2003). 피부 진피의 주요 구성성분인 교원섬유의 변성과 결핍은 광노화와 내인성 노화에 의한 주름 생성의 원인이 되며, 자외선에 의해 유도된 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)는 과도한 기질 분해를 일으켜 주름 생성을 포함하는 피부조직의 손상을 가져온다(Varani *et al.*, 2000).

[0004] 피부가 과량의 자외선에 노출되면 활성산소의 과다 생성으로 인해 항산화 방어 기전이 손상되고 이로 인해 산화 스트레스에 의한 각종 피부 단백질을 포함하는 고분자 물질들의 손상을 일으켜 광노화를 야기한다(Vayalil *et al.*, 2004). 더욱이, 활성산소의 축적은 DNA, 단백질과 지질을 포함한 다양한 생체 분자의 건전성을 손상시켜 인체에 질병을 일으키기도 한다(Jeong *et al.*, 2005). 콜라겐은 피부 진피층의 기질을 이루는 성분 중 가장 많은 부분을 차지하며 섬유아세포(fibroblast)에 의해 합성되고 콜라게나아제(collagenase)에 의해 분해된다. 따라서 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 노화가 진행됨에 따라 진피층에 존재하는 섬유아세포의 기능과 수가 감소하여 콜라겐, 엘라스틴 등의 구조 단백질의 합성량이 감소하고, 피부 세포 내 수분이 손실되며, 각질층의 구조가 변화된다. 또한, 노화된 피부의 섬유아세포에서 제1형 콜라겐 mRNA의 전사활동이 유의하게 감소하고, 노년기에는 콜라겐 유전자의 활성이 감소함으로써 콜라겐 합성이 저하되어 피부의 노화현상을 초래한다(Furth, 1991).

[0005] 자두는 장미과 벚나무속 자두아속에 속하며 원산지에 따라 동양계자두(*Prunus salicina*), 유럽계자두(*Prunus domestica*) 및 북미 원산의 미국자두(*Prunus americana*)로 나뉜다. 자두에는 플라보노이드와 페놀산과 같은 페놀성 파이토케미칼(phytochemical)이 풍부하게 존재하고, 주로 네오클로로젠산(neochlorogenic acid)와 루틴(rutin)이 다량 함유되어 있으며, 붉은 색 자두 품종의 경우 안토시아닌(anthocyanin)이 소량 함유된 것으로 알려져 있다(Donovan *et al.*, 1998). 자두의 항산화능은 포도보다는 낮으나 사과에 비해서는 4배 이상 높으며(Wang *et al.*, 1996), 과피가 과육보다 항산화물질이 많이 함유되어 있는 것으로 보고되었다(박은예 등, 2012).

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

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 강성례, 박은예, 박미순, 박지현, 김영철. (2011). 치자와 삼백초 열수추출물의 항산화능 및 콜라겐 합성능. 대한미용학회지, 7(2), 165-171.

(비특허문헌 0002) 김상남. (2011). 녹차 백차 홍차의 콜라겐 합성능과 분해능 비교 연구. 계명대학교 대학원 석사학위논문.

(비특허문헌 0003) 박은예, 신수진, 최소영, 김현순, 장병수, 김영철. (2012). 자두품종(대석조생, 퍼플킨, 포

- 모사, 헐리웃, 홍로센)에 따른 부위별(과피, 과육) 열수추출물의 항산화능 비교. 대한미용학회지, 8(2), 107-113.
- (비특허문헌 0004) 배인순, 심미자, 이주영, 김영철. (2012). 황백 열수추출물의 기능성 화장품 천연소재로서의 활용 시험. 대한미용학회지, 8(1), 1-8.
- (비특허문헌 0005) 유정민, 강여진, 표형배, 정의수, 박신영, 최지호, 한귀정, 이충환, 김택중. (2010). 양조 부산물인 주박의 주름개선 효과. 한국생명과학회지, 20(12), 1838-1843
- (비특허문헌 0006) 이경옥, 김영철, 장병수. (2011). 백차 열수추출물의 자외선 조사로 형성된 피부주름 개선 효과. 대한미용학회지, 7(4), 349-357.
- (비특허문헌 0007) Bateman JF, Lamand SR and Ramshaw JAM. (1996). Collagen superfamily extracellular matrix. Harwood, New York, pp. 22-67.
- (비특허문헌 0008) Chung JH. (2003). Photoaging in Asians. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 19(3), 109-121.
- (비특허문헌 0009) Collier IE, Wihelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA and Goldberg GL. (1988). H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. J. Biol Chem., 263(14), 6579-6587.
- (비특허문헌 0010) Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, Carrard G, Friguet B, de Longueville F, Boffe S, Remacle J and Toussaint O. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF- β 1 signaling pathway. J. Cell Sci., 118(4), 743-758.
- (비특허문헌 0011) Donovan JJ, Meyer AS and Waterhouse AL. (1998). Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). J. Agric. Food Chem., 46(4), 1247-1252.
- (비특허문헌 0012) Fligiel SE, Varani J, Datta SC, Kang S, Fisher GJ and Voorhees JJ. (1998). Collagen degradation of in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. J. Invest. Dermatol., 120(5), 842-848.
- (비특허문헌 0013) Furth JJ. (1991). The steady-state levels of type I collagen mRNA are reduced in senescent fibroblasts. J. Gerontol., 46(3), 122-124.
- (비특허문헌 0014) Kondo SJ. (2000). The roles of cytokines in photoaging. J. Dermatol. Sci., 23(1), S30-S36.
- (비특허문헌 0015) Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. J. Immun. Methods, 65(1), 55-63.
- (비특허문헌 0016) Varani J, Warner RL, Gharaee-Kermani M, Phan SH, Kang S, Chang JH, Wang ZQ, Datta SC, Fisher GJ and Voorhees JJ. (2000). Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulated collagen accumulation in naturally aged human skin. J. Invest. Dermatol., 114(3), 480-486.
- (비특허문헌 0017) Vayalil PK, Mittal A, Hara Y, Elmets CA and Katiyar SK. (2004). Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. J. Invest. Dermatol., 122(6), 1480-1487.
- (비특허문헌 0018) Wang H, Cao G and Prior RL. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Food Chem., 44(3), 701-705.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 피부의 노화방지 또는 주름개선과 같은 피부 상태 개선 효과를 갖는 물질을 천연물로부터 개발하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 자두 추출물이 인간 피부섬유아세포에 처리한 경우 콜라겐의 합성을 촉진하며, 콜라겐 분해 효소의 활성화와 발현을 억제함으로써, 피부 상태 개선 효과를 가진다는 사실을 실험적으로 증명하여 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 자두 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 자두 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명에서 "자두(plum)"은 장미과 벚나무속 자두아속에 속하는 자두나무의 열매를 의미한다. 본 발명에서의 자두는 동양계 자두와 서양계 자두를 모두 포함하며, 예를 들어 동양계 자두(*Prunus salicina*), 유럽계 자두(*Prunus domestica*) 및 북미 원산의 미국 자두(*Prunus americana*)를 포함한다. 자두에는 플라보노이드와 페놀산과 같은 페놀성 파이토케미칼이 풍부하게 존재하고, 주로 네오클로로겐산과 루틴이 다량 함유되어 있으며, 붉은 색 자두 품종의 경우 안토시아닌이 소량 함유된 것으로 알려져 있다(Donovan et al., 1998). 본 발명에서 사용되는 자두는 바람직하게는 동양계 자두(*Prunus salicina*) 이고, 보다 바람직하게는 홍로센(Hongrosen) 또는 헐리웃(Hollywood) 품종의 자두이다.
- [0013] 본 발명에서 자두 추출물은 바람직하게는 자두의 과육 또는 과피 추출물이며, 보다 바람직하게는 자두의 과피 추출물이다.
- [0014] 본 발명의 자두 추출물은 당업계에 공지된 다양한 추출방법에 의해 제조될 수 있으며, 바람직하게는 추출용매와 접촉시키는 공정을 통해 제조된다. 추출 단계 전에 상기 자두의 과육 또는 과피는 건조 및/또는 분쇄될 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 자두 추출물을 얻기 위해 사용할 수 있는 추출용매는 천연물 추출 공정에서 일반적으로 사용할 수 있는 용매이며, 둘 이상의 서로 다른 용매를 혼합하여 사용하거나 순차적으로 사용할 수도 있다.
- [0016] 바람직하게는, 본 발명의 추출 용매는 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올), 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 클로로포름, 헥산(Hexane) 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는, 메탄올, 에탄올, n-헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 또는 물을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 물이다. 한편, 본 발명의 추출물은 상기한 추출용매에 의해 얻은 추출물 뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여 얻은 추출물도 실질적으로 동일한 효과를 나타낸다는 것은 당업자에게 자명하다.
- [0017] 추출공정은 추출 용매를 부분적으로 또는 완전히 제거하는 단계를 통해 완성되며, 부분적 제거는 상당한 양의 유기용매가 없는 수성 농축물이 얻어질 때까지 농축하는 것을 의미하며, 완전한 제거에 의해서는 건조 잔류물을 얻을 수 있다.
- [0018] 본 발명의 자두 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다. 분말상태로 제조된 추출물은 화장료 조성물에 포함되어 사용되거나 또는 용매 또는 혼합용매에 재분산시켜 사용된다. 상기 추출물이 용해되거나 분산되는 용매 또는 혼합용매는 상기 추출에 사용된 것과 동일하거나 또는 상이한 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 자두 추출물은 화장료 조성물 중에 피부 상태의 개선 효과를 얻기에 유효한 양으로 포함된다.
- [0020] 본 발명의 자두 추출물은 바람직하게는 조성물 총 중량에 대해 0.0001 - 30 중량%의 함유량, 보다 바람직하게는 0.001 - 20 중량%의 함유량으로 포함된다.

- [0021] 본 명세서에서 용어 "피부 상태 개선"은 피부 노화 억제, 피부 주름 형성 억제, 또는 피부 감촉 개선을 포함하는 의미이다.
- [0022] 본 발명의 자두 추출물은 인체 피부섬유아세포에서 독성이 거의 없으며, 콜라겐의 합성을 촉진시키고, 콜라겐 분해 작용을 하는 MMP-2(matrix metalloproteinase-2)의 활성을 억제하고, MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 유전자의 발현도 억제하는 활성을 통해, 인간의 피부 주름 형성 억제, 피부 주름 개선, 피부 노화 방지, 피부 감촉 개선에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 화장품학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 화장품학적 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 로션, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림, 로션, 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 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.
- [0027] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 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.
- [0028] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 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.
- [0029] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 화장품학적 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분인 자두 추출물과 담체 성분 이외에, 화장품학적 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다.
- [0032] (i) 본 발명은 자두 추출물의 피부 상태 개선에 관한 새로운 용도를 제공한다.
- [0033] (ii) 자두 추출물은 인체 피부섬유아세포에서 독성이 거의 없으며, 콜라겐의 합성을 촉진시키고, 콜라겐 분해 작용을 하는 MMP-2(matrix metalloproteinase-2)의 활성을 억제하고, MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 유전자의 발현도 억제하는 활성을 가진다.
- [0034] (iii) 자두 추출물은 인간의 피부 주름 형성 억제, 피부 주름 개선, 피부 노화 방지, 피부 감촉 개선에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0035] (iv) 본 발명의 자두 추출물은 조성물은 피부 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 원료 소재로 개발될 수 있다.

발명의 효과

[0036] 본 발명은 자두 추출물을 포함하는 피부 상태 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 자두 추출물은 인체 피부 섬유아세포에서 독성이 거의 없으며, 콜라겐의 합성을 촉진시키고, 콜라겐 분해 작용을 하는 MMP-2(matrix metalloproteinase-2)의 활성을 억제하고, MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 유전자의 발현도 억제하는 활성을 가지므로, 피부 주름 형성 억제, 피부 주름 개선, 피부 노화 방지, 피부 감촉 개선에 효과적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 피부 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 원료 소재로 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 자두 헐리웃 및 홍로센 과피 열수 추출물의 인간피부섬유아세포에서의 세포생존율에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 측정의 평균±SD으로 나타내었다.

도 2는 배양한 인간피부섬유아세포에서 자두 헐리웃 과피의 열수추출물의 콜라겐 합성에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 측정의 평균±SD으로 나타내었다. PC: TGF-β1 5 ng/ml, Hollywood: 헐리웃 과피의 열수 추출물. 상이한 첨자로 표시한 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range test에 의해 유의한 차이를 보인다(p<0.001). *p<0.05, **p<0.01은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 부형제(vehicle)군과 비교한 결과이다.

도 3은 배양한 인간피부섬유아세포에서 자두 홍로센 과피의 열수추출물의 콜라겐 합성에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 측정의 평균±SD으로 나타내었다. PC: TGF-β1 5 ng/ml, Hongrosen: 홍로센 과피의 열수 추출물. 상이한 첨자로 표시한 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range test에 의해 유의한 차이를 보인다(p<0.001).

도 4는 배양한 인간피부섬유아세포에서 자두 헐리웃 과피의 열수추출물의 MMP-2 활성에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 측정의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, Hollywood: 헐리웃 과피의 열수 추출물 처리군, 상이한 첨자로 표시한 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range test에 의해 유의한 차이를 보인다(p<0.001).

도 5는 배양한 인간피부섬유아세포에서 자두 홍로센 과피의 열수추출물의 MMP-2 활성에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 측정의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, Hongrosen: 홍로센 과피의 열수 추출물 처리군, 상이한 첨자로 표시한 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range test에 의해 유의한 차이를 보인다(p<0.001).

도 6은 배양한 인간피부섬유아세포에서 자두 헐리웃 과피의 열수추출물의 MMP-1 유전자 발현에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 측정의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, Hollywood: 헐리웃 과피의 열수 추출물 처리군, 상이한 첨자로 표시한 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range test에 의해 유의한 차이를 보인다(p<0.001).

도 7은 배양한 인간피부섬유아세포에서 자두 홍로센 과피의 열수추출물의 MMP-1 유전자 발현에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 측정의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, Hongrosen: 홍로센 과피의 열수 추출물 처리군, 상이한 첨자로 표시한 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range test에 의해 유의한 차이를 보인다(p<0.001).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0039]

[0040] 실시예

[0041] 실험방법 및 재료

[0042] 실시예 1: 시약 및 기기

[0043] DMSO (Dimethyl sulfoxide), MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], 탄닌산 (tannic acid)는 Sigma 사(USA)의 제품을 사용하였으며, DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), FBS (fetal bovine serum), 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin)은 Lonza 사(USA)의 제품을 사용하였으며, 그 외 일반시약들은 특급품을 사용하였다. 시료추출은 초고속 감압 저온 추출기(COSMOS-660, 경서기계 산업, 한국)를 사용하였다. 세포주 관찰은 역상현미경(inverted microscope, CKX41, Olympus, Japan)를 사용하였고, 세포주 배양은 CO2 인큐베이터 (MCO-15AC, Sanyo Electric, Japan)를 사용하였다.

[0044] **실시예 2: 시료 제조**

[0045] 국내 안동에서 유기농 재배한 자두(헐리웃, 홍로센)를 구입하여 과피를 분리한 후 과피 200 g에 증류수 2 l를 첨가하여 초고속 감압 저온 추출한 후 농축하고 동결 건조시켜 시료로 사용하였다.

[0046] **실시예 3: 세포주 및 배양**

[0047] 인체피부섬유아세포는 (주)아모레퍼시픽으로부터 분양 받아 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% P/S (penicillin/streptomycin)가 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에 풀어 37℃, 5% CO2 인큐베이터에서 48시간 동안 안정화시킨 후 실험에 사용하였다.

[0048] **실시예 4: UVA 조사 및 시료 처리**

[0049] 인체피부섬유아세포를 1.5×10^5 세포/ml의 농도로 100 mm 배양디쉬에 약 80%의 밀집도(confluency)에 도달할 때까지 배양한 후 배지를 버리고 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하여 배지내 혈청(serum) 성분을 없앤 후, 6.3 J/cm^2 UVA (Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지에 시료를 농도별로 처리한 후 UVA를 조사한 세포를 24 시간 배양하였다.

[0050] **실시예 5: MTT 분석**

[0051] 배양중인 인체피부섬유아세포에 홍로센, 헐리웃 과피 열수추출물을 농도별로 처리한 다음 MTT 시약을 첨가한 후 3시간 배양하고, DMSO를 처리한 다음 ELISA reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생장률은 다음 식에 의해 산출하였다. 세포생장률(%) = (시료 첨가구의 흡광도/시료 무첨가구의 흡광도) X 100

[0052] **실시예 6: 타입-I 프로콜라겐(Type-I procollagen) 합성능**

[0053] 인체피부섬유아세포에 동결 건조시킨 분말로 된 헐리웃, 홍로센 과피 열수추출물 시료를 DMEM 배지에 농도별로 희석하여 처리한 후 상청액(supernatants)을 취해 EIA kit(Takara, Japan)를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 타입-I 프로콜라겐 단백질 생성량을 산출하였다. 양성대조군으로 TGF- β_1 (5 ng/ml)을 사용하였다.

[0054]

[0055] **실시예 7: MMP-2 활성**

[0056] 세포 배양액을 수거하여 같은 단백질량을 로딩(loading)할 수 있도록 조절해서 시료(sample)와 같은 부피의 샘플버퍼(sample buffer)(2X)를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 10% 지모그람 젤(zymogram gel, Invitrogen, USA)에서 로딩하였다. 전기영동으로 단백질을 분리하고, 노벡스 지모그람 복원 버퍼(Novex zymogram renaturing buffer, 1X)로서 30분간 반응시켰다. 이후 노벡스 지모그람 전개 버퍼(Novex zymogram developing buffer, 1X)로 바꾸어서 약 1 시간 상온에서 반응시킨 후 새로운 전개 버퍼(developing buffer)로 교체하여 37℃에서 24시간 반응시켰다. Simply blue safe stain (Invitrogen, USA)으로 염색 후 멸균증류수로 세척하여 흰색 밴드인 MMP-2의 활성정도를 밴드로서 확인하고 이미지 분석기(image analyzer)로 정량하였다.

[0057] 실시예 8: MMP-1 유전자 발현

[0058] 8.1. 총 RNA 분리

[0059] 배양한 인체피부섬유아세포에 1 ml Trizol-시약 (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA에 200 μ l 클로로포름을 넣고 잘 섞은 후 원심분리하는 과정을 2번 반복하여 상층액을 분리하였다. 500 μ l 이소프로필 알코올을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% 에탄올로 세척하고 자연 건조시켰다. DEPC-물에서 RNA를 녹인 후 -70℃에 저장하였다.

[0060] 8.2. cDNA 제조

[0061] 대조군 및 시험군에서 각각 분리한 총 RNA 5 μ g을 40 μ l 용량에서 M-MLV RT 5X 버퍼 8 μ l, 10 mM dNTPs 3 μ l, 10,000U RNase 억제제 0.45 μ l, 50,000U M-MLV 역전사효소 (Promega, USA) 0.3 μ l 및 50 pmol/ μ l oligo dT (Bioneer, Korea) 1.5 μ l를 이용해 역전사 하였다.

[0062] 8.3. RT-PCR과 전기영동

[0063] 단일쇄 cDNA는 5X green Go Taq flexi 버퍼 4 μ l, 10 mM dNTPs 0.4 μ l, 500U Taq 폴리머라아제 0.1 μ l, 25 mM MgCl₂ (Promega, Madison, USA) 1.2 μ l와 MMP-1, β -액틴에 대한 특이 센스 및 안티센스 프라이머를 각각 20 pmol/L 0.4 μ l 사용하여 PCR로 증폭하였다. PCR에 사용한 프라이머의 뉴클레오타이드 서열과 PCR 증폭산물의 예측 크기는 표 1과 같다. 내부표준물질로 β -액틴 (50℃, 28 사이클), 실험물질로 MMP-1(50℃, 28 사이클)을 사용하였다. PCR 산물을 1.2% 아가로스 겔에 전기영동 시킨 후 분석하였다.

표 1

명칭	프라이머	예측 크기(bp) ¹⁾
MMP-1 ²⁾	F ³⁾ (5' → 3') : AAA GGG AAT AAG TAC TGG GC (서열번호 1)	237
	R ⁴⁾ (5' → 3') : AAT TCC AGG AAA GTC ATG TG (서열번호 2)	
β -액틴	F (5' → 3') : ATG CAG AAG GAG ATC ACT GC (서열번호 3)	248
	R (5' → 3') : CTG CGC AAG TTA GGT TTT GT (서열번호 4)	

[0065] ¹⁾bp: basepair, ²⁾MMP-1: matrix metalloproteinase-1, ³⁾F: forward, ⁴⁾R: reverse

[0066] 실시예 9: 통계 분석

[0067] 자료의 분석은 SPSS(version 20.0) 통계프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)으로 동질성을 확인하였고, 각 군 간의 비교는 Duncan's multiple range test로 사후 분석을 실시하였다. 통계적인 유의성 검증은 $\alpha=0.001$, $\alpha=0.01$, $\alpha=0.05$ 에서 실시하였다.

[0068] 실험결과

[0069] 실시예 1 : MTT 분석

[0070] MTT 분석법은 MTT 시약이 세포내로 흡수된 후 미토콘드리아의 석시네이트 디히드로게나아제(succinate dehydronase)에 의해 포르마잔(formazan)을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하는 것으로써 세포의 생장율을 측정하는 대표적인 방법이다(Mosmann, 1983). 자두(헐리웃, 홍로센) 과피 열수추출물은 측정농도 모두에서 세포생장률이 80% 이상으로 나타나 인체피부섬유아세포에 대한 최대허용농도는 200 μ g/ml 이상인 것으로 확인되었고(도 1), 홍로센 과피 열수추출물이 헐리웃 과피 열수추출물에 비해 세포독성이 상대적으로 낮았다.

[0071] 실시예 2 : 타입-I 프로콜라겐 합성능

[0072] 교원섬유는 피부에 결합력과 탄력성을 갖게 하며 섬유아세포의 작용에 의해 프로콜라겐(procollagen)이라는 전구물질 형태로 합성되어 만들어진다. 합성된 프로콜라겐은 효소반응을 거쳐 피부 세포의 세포 외 공간으로 분비되어 삼중나선 구조의 마이크로피브릴(microfibril)을 형성하고 마이크로피브릴은 프로테오글리칸(proteoglycan)과 결합하여 피브릴(fibril)을 형성하게 되며 피브릴이 모여 교원섬유가 된다. 섬유아세포에 의해 세포외 기질로 분비된 프로콜라겐은 세포 표면에 존재하는 프로콜라겐 펩티다아제(procollagen peptidase)에 의해 C-펩티드가 분해되고 활성 콜라겐을 형성한다(Bateman *et al.*, 1996). 인체피부섬유아세포를 이용한 타입-I 프로콜라겐 합성능 실험 결과, 용매대조군에 비해 양성대조군인 TGF- β 1은 5 ng/ml에서 150% 유의하게($p<0.001$) 증가하였다. 헐리웃 과피 열수추출물 처리군은 12.5, 25, 50, 100 μ g/ml에서 각각 26.3($p<0.05$), 43.8($p<0.01$), 52.0($p<0.001$), 52.0($p<0.001$) 증가하였고(도 2), 홍로센 과피 열수추출물 처리군은 각각 53.6, 54.2, 54.7, 56.9% 유의하게($p<0.001$) 증가하여(도 3), 홍로센 과피 열수추출물이 헐리웃 과피 열수추출물에 비해 우수한 효능을 보였다. 치자와 삼백초 열수추출물을 10 μ g/ml 처리 시 타입-I 프로콜라겐 합성능이 각각 14.4%, 12.2% 증가하였고(강성례 등, 2011), 주박을 500 μ g/ml 처리 시 42.5% 증가하였다는(유정민 등, 2010) 연구보고와 비교할 때 헐리웃과 홍로센 과피 열수추출물의 콜라겐 합성능은 매우 우수한 것으로 평가된다.

[0073] 실시예 3 : MMP-2 활성

[0074] MMP-2는 기저막(basement membrane)의 주요 구성 성분인 타입 IV 콜라겐 (type IV collagen)의 트리플-나선형(triple-helical) 부분을 절단하므로 발생 과정에서 상처 치유 뿐만 아니라 암 전이 및 비정상적인 혈관 생성에 의한 관절염 등의 질병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Collier *et al.*, 1988). MMP-2의 활성을 확인한 결과, 대조군에 비해 12.5, 25, 50, 100 μ g/ml에서 헐리웃 과피 열수추출물 처리군은 각각 29.0, 32.9, 36.1, 38.0% 유의하게($p<0.001$) 활성을 저해시켰고(도 4), 홍로센 과피 열수추출물 처리군은 각각 28.5, 30.1, 31.5, 34.3% 유의하게($p<0.001$) 활성을 저해시켜(도 5), 헐리웃 과피 열수추출물과 홍로센 과피 열수추출물은 효능이 비슷하게 나타났다. 피부주름개선에 효능이 우수한 것으로 알려진 녹차, 백차, 홍차 열수추출물이 25 μ g/ml에서 각각 27.2($p<0.01$), 17.6($p<0.05$), 41.5($p<0.001$) 활성을 저해시켰다는 연구 보고(김상남, 2011)와 비교할 때, 헐리웃 과피 열수추출물과 홍로센 과피 열수추출물은 효능이 우수한 것으로 평가된다.

[0075] 실시예 4 : MMP-1 유전자 발현

[0076] 피부의 광노화에 있어 MMP-1의 발현은 자외선, 미토겐 성장인자(mitogenic growth factor), 친염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine) 등에 의해 촉진되는 것으로 알려져 있으며, 이들은 세포내 신호전달 경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래시킨다(Fligiel *et al.*, 1998; Kondo, 2000). MMP-1의 유전자 발현을 확인한 결과, 대조군에 비해 12.5, 25, 50, 100 μ g/ml에서 헐리웃 과피 열수추출물 처리군은 각각 46.7, 46.8, 52.2, 62.6% 유의하게($p<0.001$) 낮았고(도 6), 홍로센 과피 열수추출물 처리군은 각각 50.2, 51.1, 61.0, 61.7% 유의하게($p<0.001$) 낮아(도 7), 헐리웃 과피 열수추출물과 홍로센 과피 열수추출물은 MMP-1 발현 억제 효능이 비슷하였다. 피부주름개선에 효능이 우수한 것으로 알려진 녹차, 백차, 홍차 열수추출물이 25 μ g/ml에서 각각 77.6($p<0.001$), 33.1($p<0.001$), 81.4($p<0.001$) 활성을 저해시켰다는 연구보고(김상남, 2011)를 고려해볼 때, 헐리웃 과피 열수추출물과 홍로센 과피 열수추출물은 MMP-1 유전자 발현 억제 효능이 우수한 것으로 평가된다.

[0077] 결론

[0078] 자두품종인 헐리웃과 홍로센 과피 열수추출물의 인체피부섬유아세포를 이용한 콜라겐 합성능 및 분해능을 평가한 인 비트로(*in vitro*) 시험에서 다음과 같은 결과를 얻었다. MTT 분석에 의한 인체피부섬유아세포의 성장률은 헐리웃, 홍로센 과피 열수추출물은 측정농도 10, 50, 100, 200 μ g/ml 모두에서 세포성장률이 80% 이상으로 나타나 인체피부섬유아세포에 대한 최대허용농도는 200 μ g/ml 이상인 것으로 확인되었다. 타입-I 프로콜라겐(Type-I procollagen) 합성능은 용매대조군에 비해 양성대조군인 TGF- β 1은 5 ng/ml에서 150% 유의하게

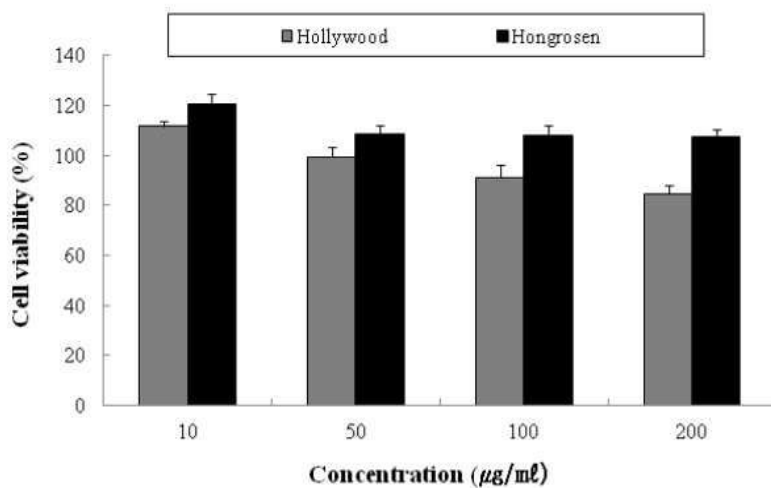
($p < 0.001$) 증가하였고, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 헐리웃 과피 열수추출물 처리군은 각각 26.3($p < 0.05$), 43.8($p < 0.01$), 52.0($p < 0.001$), 52.0%($p < 0.001$) 증가하였고, 홍로센 과피 열수추출물 처리군은 각각 53.6, 54.2, 54.7, 56.9% 유의하게($p < 0.001$) 증가하였다. MMP-2 활성은 대조군에 비해 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 헐리웃 과피 열수추출물 처리군은 각각 29.6, 32.9, 36.1, 38.0% 유의하게($p < 0.001$) 감소하였고, 홍로센 과피 열수추출물 처리군은 각각 28.5, 30.1, 31.5, 34.3% 유의하게($p < 0.001$) 감소하였다. MMP-1 유전자 발현은 대조군에 비해 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 헐리웃 과피 열수추출물 처리군은 각각 46.7, 46.8, 52.2, 62.6% 유의하게($p < 0.001$) 낮았고, 홍로센 과피 열수추출물 처리군은 각각 50.2, 51.1, 61.0, 61.7% 유의하게($p < 0.001$) 낮았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 자두 헐리웃과 홍로센 과피 열수추출물은 인체피부섬유아세포에 독성이 미미하며 콜라겐 합성을 촉진시키고, 콜라겐 분해효소의 활성 및 유전자 발현을 효과적으로 저해시키는 것으로 확인됨으로써 주름개선 또는 주름억제 기능성 화장품 소재로의 활용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

[0079]

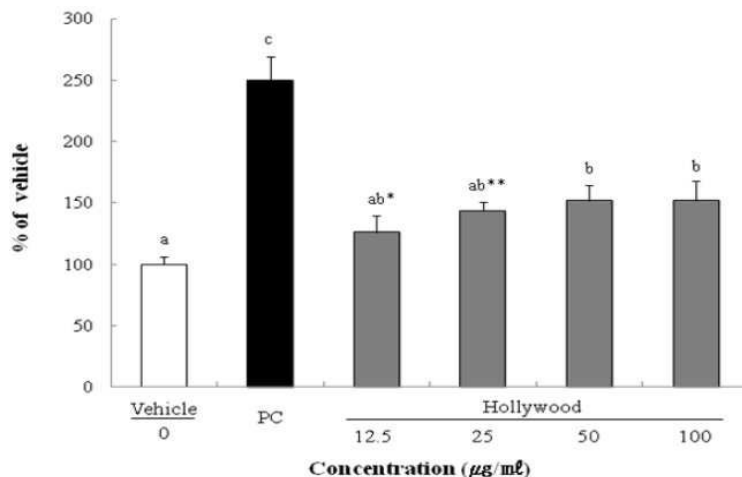
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

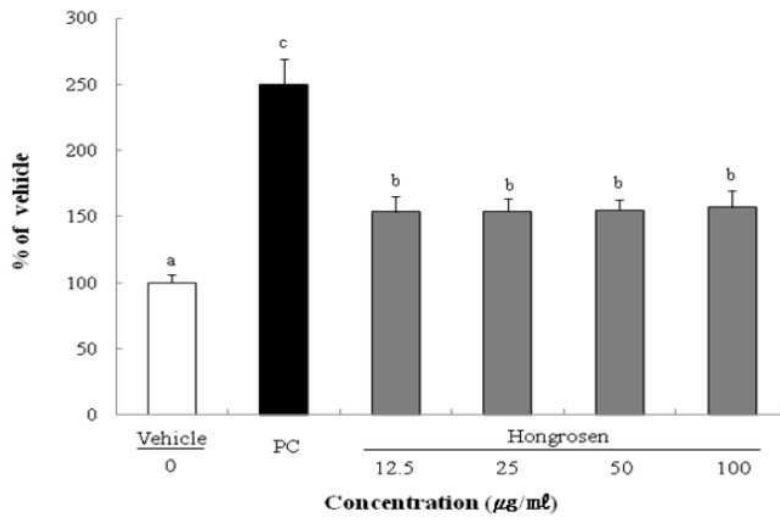
도면1



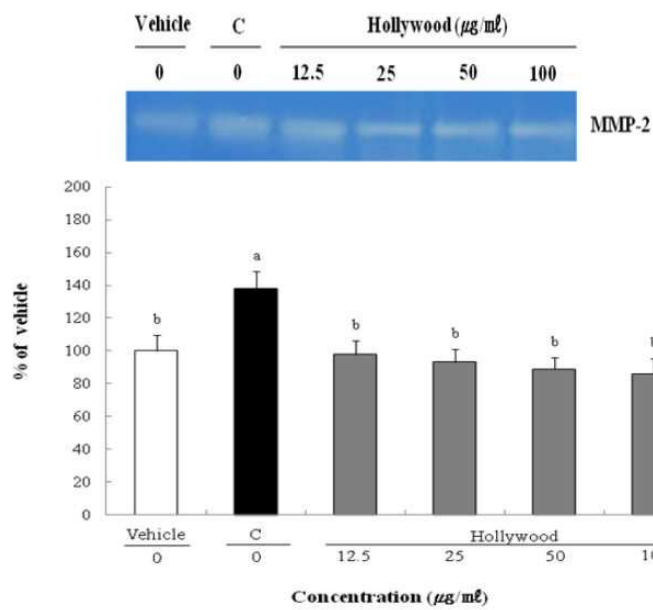
도면2



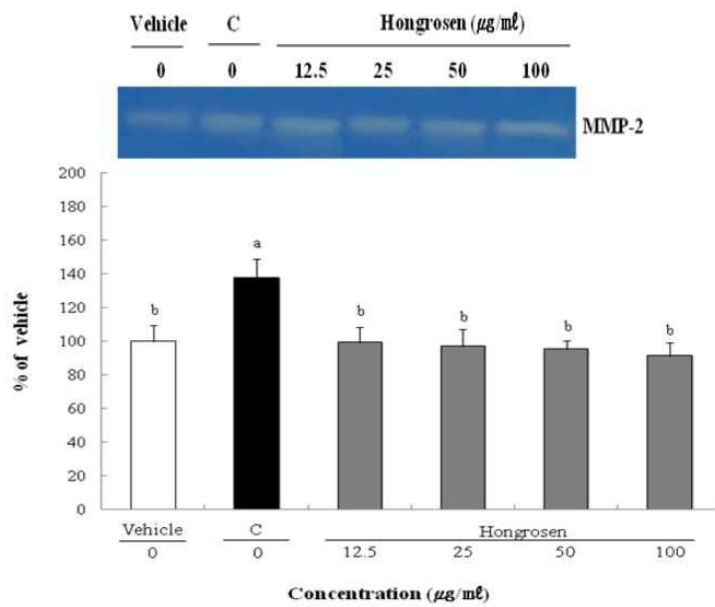
도면3



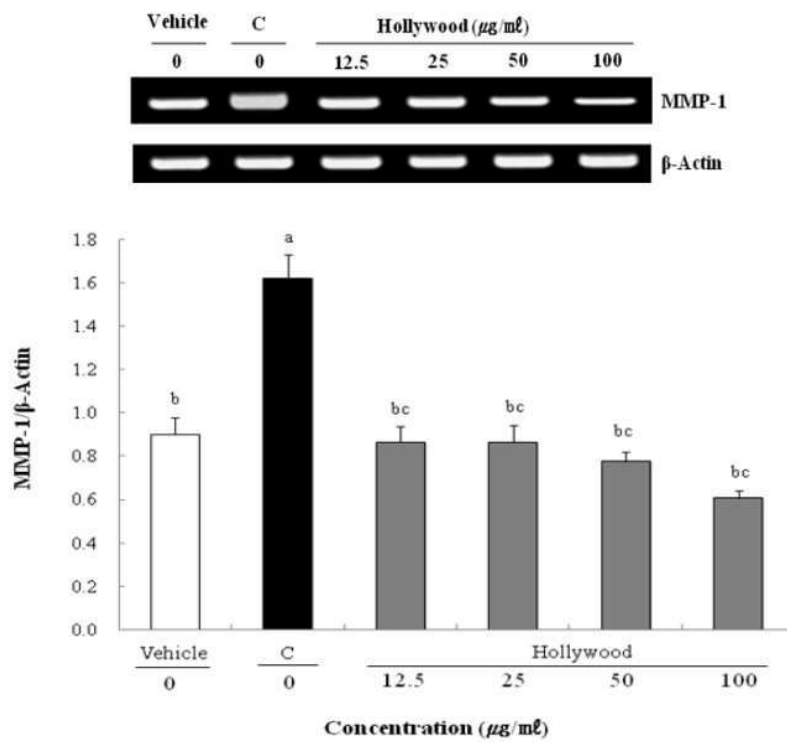
도면4



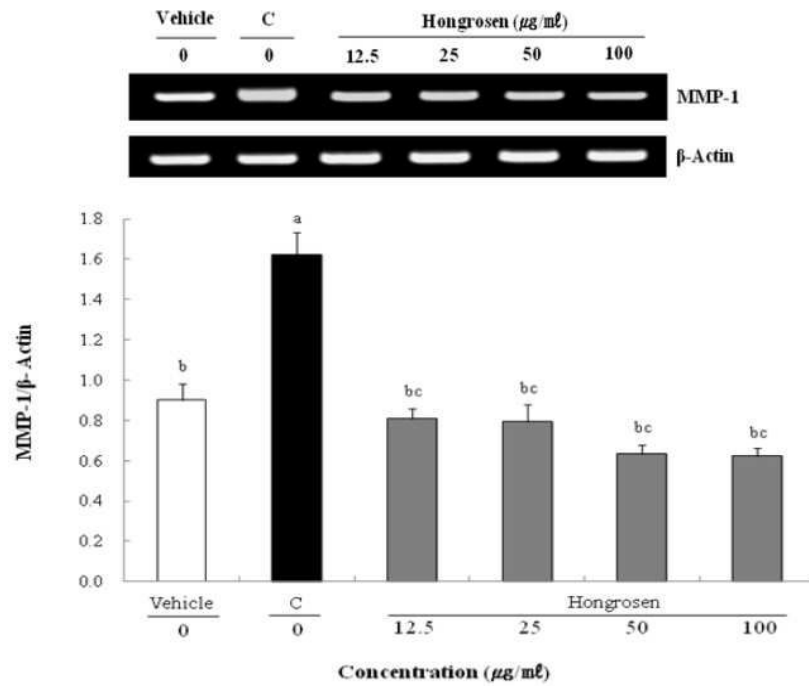
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Chungbuk National University Industry Academic Cooperation
- <120> Composition for Improving Skin Condition Comprising Extract from Plum As Active Ingredient
- <130> PN130182
- <160> 4
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PCR primer
- <400> 1
- aaaggaata agtactgggc
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><
- 223> PCR primer

<400>	2	
aattccagga aagtcatgtg		20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	3	
atgcagaagg agatcactgc		20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	4	
ctgcgcaagt taggttttgt		20