(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0062138
(43) 공개일자 2010년06월10일

(51) Int. Cl.
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 17/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0120585
(22) 출원일자 2008년12월01일
심사청구일자 2008년12월01일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
김세권
부산광역시 동래구 사직2동 쌍용예가아파트 125동 1402호
천충길
부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단
류보미
부산광역시 수영구 광안4동 광안협성엠파이어 아파트 101동 2703호
(74) 대리인
이덕록

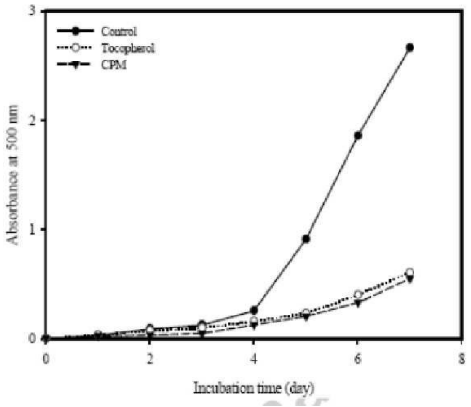
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 피부 항산화 활성 및 항광노화 활성을 갖는 작은구슬산호말추출물

(57) 요 약

본 발명은 피부 항산화 활성 및 항광노화 활성을 갖는 작은구슬산호말 추출물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 작은구슬산호말 추출물은 인체 섬유아세포주(HT-1080)에서 하이드록실 라디칼을 야기시키고, 세포내 ROS 수준 및 MMP-2 및 MMP-9 활성을 저해시키는 DNA 손상에 대해 항산화 효과를 나타내며, 항산화 활성을 나타내어 항-노화 작용에 기여하는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

작은구슬산호말 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 항산화 활성 및 항광s화 활성 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 작은구슬산호말 추출물이 메탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

작은구슬산호말 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 항산화 활성 및 항광노화 활성 건강기능식품.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 작은구슬산호말 추출물이 메탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피부 항광노화 활성을 갖는 작은구슬산호말 추출물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 인체 섬유아세포주(HT-1080)에서 하이드록실 라디칼을 야기시키고, 세포내 ROS 수준 및 MMP-2 및 MMP-9 활성을 저해시키는 DNA 손상에 대해 항산화 효과를 나타내며, 항산화 활성을 나타내어 항-노화 작용에 기여하는 작은구슬산호말 추출물 및 이를 함유하는 피부 항산화 활성 및 항광노화 활성 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 다양한 피부 병리학이 자외선 노출과 관련이 있다. 피부의 자외선 노출은 피부 세포외 매트릭스 조성물을 현저한 변화를 특징으로 하는 위험한 광-손상 효과를 유발시켜 주름, 이완, 거칠음, 반점 착색, 및 표피 두께 증가 및 연결조직 변화를 포함한 조직학적 변화를 가져온다(Kondo, 2000; Rittie and Fisher, 2002). 피부의 연결조직은 콜라겐, 프로테오글리칸 및 글리코프로테인을 포함한 수 십 가지의 생체분자로 이루어져 있다. 더욱이 이들 성분들 사이의 조합 균형이 무너지면 광노화와 같은 피부 섬유아세포에 유해한 영향을 끼치게 된다. 특히, 몇몇 연구들이 MMP에 의해 매개된 합성 및 분해의 저해에 기인한 광노화된 피부에서 콜라겐의 결핍에 대해 기술한 바 있다. 항산화제가 수퍼옥사이드, 하이드록실 라디칼 및 다른 반응성 산소종(ROS) 와 같은 자유라디칼에 대한 만성 질환을 예방하거나 지연시키는데 중요한 역할을 한다고 보고되었다.

[0003] 피부는 자유 라디칼을 포함한 ROS를 무력화시키는 항산화제 방어기작을 포함하고 있지만, 이러한 방어기작은 자외선의 조사량이 과도한 경우 그에 압도되게 되고, 그 결과 단백질, 지질 및 DNA와 같은 세포 성분에 자유 라디칼 손상을 끼치고 되어 세포 기능을 변화시키고, 결과적으로 병리현상을 유발시키게 된다.

[0004] 피부의 손상은 노화, 암 및 다른 많은 질환을 야기시킨다(Kehrer, 1993; Aruoma, 1994). ROS는 신호 변환 경로를 통해 MMP의 유도를 포함한 세포 발현에 영향을 끼친다(Brenneisen et al., 1998; Kang et al., 2003).

[0005] 몇몇의 연구들이 식물 추출물의 수소 원자를 공여함으로써 자유 라디칼을 파괴시키는 환원력에 의한 항산화 활성에 대해 설명하고 있다(Shahidi and Wanasundara, 1992; Sindhu and Emilia, 2005). 또한, 페놀성 특성이 지질 과산화를 저해함으로써 항산화 활성이 기여한다고 예상되고 있다(Rice-Evan et al., 1996).

[0006] 메트릭스 메탈로프로테이나제(Matrix metalloproteinases; MMPs)는 하위군인 *a family of secreted* 또는 세포외 메트릭스(extracellular matrix; ECM)를 소화시킬 수 있는 막 통과 아연-엔도펩티다아제(transmembrane zinc-endopeptidases)로 나뉠 수 있다.

[0007] MMPs의 발현은 조직 재건, 회복 및 바이러스 세포외 자극에 의한 파괴 시에 증가한다. 또한 MMPs는 그들의 기질 특이성 및 도메인 구조에 따라 콜라게나아제, 젤라티나아제, 스트로멜리신, 메트릴리신 및 막형 MMPs(MT-MMPs)로 나뉘어진다(Bode et al., 1999). MMPs 중, MMP-2 및 MMP-9는 세포외 메트릭스를 퇴화시키고, 피부 주름 형성, 피부 두께에 영향을 끼친다(Inomata et al., 2003). MMPs는 자외선에 의해 생성된 ROS에 의해 활성화되어 광노화제로서 작용하는 것으로 여겨진다.

[0008] 작은구슬산호말(*Corallina pilulifera*)은 산호말과에 속하며, 전세계의 해안지역에 광범위하게 분포되어 있으며, 항적조 물질을 생산할 수 있다고 알려져 있다. 또한 대한민국 등록특허 제10-0658950호 "작은구슬산호말 추출물을 포함하는 암질환 예방 및 치료용 조성물"에 HeLa 세포주에 대하여 세포증식억제 효과, 자가 사멸 유도 효과 및 생체 내 (in vivo) 항암 활성을 갖는 작은구슬산호말 추출물 및 이를 포함한 암 질환 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품이 개시되어 있다.

[0009] 본 발명자들은 자외선에 의한 피부 광노화 효과를 저해할 수 있는 물질을 탐색하기 위해 예의 연구를 거듭한 결과, 작은구슬산호말 추출물의 항-광노화 효과를 밝혀내고 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 작은구슬산호물 추출물의 신규한 피부 항산화 활성 및 항광노화 활성 용도를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 작은구슬산호말 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 항산화 활성 및 항광노화 활성 약학 조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0012] 상기와 같은 목적은 작은구슬산호말로부터 추출물을 제조하고, 이 추출물이 인체 섬유아세포주(human fibrosarcoma cell line; HT-1080)에서 하이드록실 라디칼을 야기시키고, 세포내 ROS 수준 및 MMP-2 및 MMP-9 활성을 저해시키는 DNA 손상에 대해 항산화 효과를 나타내며, 항산화 활성을 나타내어 항-노화 작용에 기여함을 밝혀냄으로써 달성되었다.

[0013] 본 발명은 작은구슬산호말 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 항산화 활성 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 작은구슬산호말 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 항광노화 활성 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 바람직하게는 메탄올 추출물이다.

[0016] 본 발명에 있어서, "유효성분"이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능·효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0017] 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 추출물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 작은구슬산호말 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 항산화 활성 및 항광노화 활성 건강기능식품을 제공한다.

[0020] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명의 피부 항산화 활성 및 항광노화 활성 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백분율로 포함한다.

[0022] 또한, 피부 항산화 활성 및 항광노화 활성을 위한 목적으로 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.

[0023] 피부는 항산화 방어수단을 가지고 있어서, 자유 라디칼 함유 ROS로부터 특정 손상을 입을 수 있고, 이 때 피부의 생분자 성분이 파괴된 후, 재차 보충된다. 그러나 자외선과 같은 환경적 인자의 끊임없는 노출은 피부에 유해한 영향, 예를 들어, 피부 비후화(skin thickening), 주름 형성, 염증 및 발암현상을 유발시킨다. 몇몇 연구들 반응성 산소종(ROS)를 포함한 자유 라디칼의 생성이 주로 UV 조사 및 항산화 시스템의 방어과 관련되어 있다고 보고한 바 있다.

[0024] 수퍼옥사이드 음이온 라디칼(O^{2-}), 하이드록실 라디칼(HO), 및 과산화 수소(H_2O_2)와 같은 반응성 산소종이 in vivo에서 지속적으로 생산된다는 사실이 잘 알려져 있다. 이들 ROS는 매우 불안정하며, 세포 내에서 다른 원자 또는 분자와 반응하여 보다 안정한 상태를 취하려고 시도할 때 반응성이 된다. 따라서 ROS는 지질, 단백질 및 DNA를 포함하여 세포 내의 필수 생분자의 손상 또는 완전한 열화를 야기시킬 수 있다. 예를 들어, DPPH 라디칼은 안정한 유기 자유 라디칼이며, 화합물의 수소 공여 능력으로부터 항산화 활성을 평가하기 위한 시약으로서 유용하다.

[0025] 또한, 과산화수소는 전이금속 이온의 존재하에 다양한 반응성 화학물질을 생산한다. 철 및 과산화수소로부터 생산된 하이드록실 라디칼은 수퍼코일드 형태(supercoiled form)의 DNA를 공격한 후, 단일 가닥 붕괴를 가져온다. 따라서, 착물 철 킬레이트화(complex' iron chelation)를 통한 하이드록실 라디칼 활성의 저해를 연구할 필요가 있다.

[0026] 또한, 항산화제는 자유 라디칼 및 지질 과산화물을 트랩핑하고, 지질 과산화화의 발생을 지연시키고, 추가의 자유 라디칼 생산을 중단시키고, 연결 조직을 열화시킬 수 있는 특정 효소의 손상 효과를 저해할 수 있다. 그러나 특히 축적된 ROS는 in vivo에서 인체 피부의 내재성 노화 및 광노화에 결정적인 역할을 하고, ROS가 다양한 피부의 염증성 질환 및 피부 암을 일으킬 수 있는 것으로 제시되고 있다(Kawaguchi et al., 1996; Cross et al., 1987; Record et al., 1991).

[0027] 항산화 활성은 페놀성 특성 및 환원력으로 나타낼 수 있다. CPM은 높은 페놀 함량을 가지며, 페놀 유래 수소기의 양을 예상할 수 있다. 추출물 중의 페놀성 화합물은 수소-공여제로서 또는 전자-공여제로서의 반응성을 통한 지질 과산화화, 및 금속 이온 킬레이트화 특성을 억제할 수 있다.

[0028] 지질 과산화화는 지질 발생을 야기시키며, 임의 수의 탄소-탄소 이중 결합을 함유한 지질의 산화적 열화로 여겨진다. 이러한 페놀성 특성은 일반적으로 환원력과 관련이 있다. 따라서 수소 원자의 공여에 의한 자유 라디칼 사슬 파괴에 대한 활성으로서 환원력에 의해 항산화 활성을 계산하였다.

[0029] 또한, ROS는 전사 인자 활성제 단백질 1을 인산화시키는 미토겐-활성화 단백질 키나아제를 촉진시킬 수 있고, MMP의 상향조절을 야기시킬 수 있다(Rittie and Fisher, 2002). 이들 MMP는 피부 콜라겐을 열화시키고, 연결 조직 파괴에 기여하며, 최종적으로 콜라겐 결핍을 야기시키고, 주름을 생성시킬 수 있다(Fisher et al., 1996). MMP의 발현은 통상적으로 다양한 세포외 자극, 예를 들어, 생장 인자, 사이토카인, 종양 촉진제 및 UV에 의해 유발된다. 피부 섬유아세포에서 증진된 MMP 발현은, 피부 노화 과정 동안 증진된 MMP 발현이, MMP 기질인 피부 콜라겐을 열화를 여기시켜 피부의 콜라겐 손실을 일으키고, 이어서 세포외 메트릭스(ECM)의 파괴를 야기시키기 때문에 피부 주름 및 탄력성 소실과 밀접하게 관련된다(Fisher et al., 1998; Fisher et al., 2002).

[0030] 특히, MMP-2 및 MMP-9을 포함한 젤라티나아제는 UV-유발 피부 손상의 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. MMP-2 및 MMP-9의 발현은 젊은 피부 보다 광손상 피부에서 보다 높다. 달리 말하면, 동일한 개인에게서 태양-손상 상완(foream) 피부가 내생적으로 노화된 피부 보다 유의적으로 증진된 활성 젤라티나아제(MMP-2 및

MMP-9)의 활성을 나타낸다(Chung et al., 2001; Varani et al., 2000). CPM의 항산화 활성은 총 페놀 함량과 수소 원자의 공여에 의한 이들의 자유 라디칼 소거 활성 사이의 균형에 기여하였다. CPM은 MMP-2 및 MMP-9 활성화에 대한 저해 효과에 의존적인 농도로 항산화 특성을 갖는다(도 7 참조).

[0031] 결론적으로, 본 발명은 CPM이 인체 피부 섬유아세포에서 UV-유발 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 감소시키고, 자유 라디칼 산화를 강력하게 저해할 수 있는 항산화 활성을 갖는다는 사실을 보여주었다. 이러한 결과를 바탕으로, CPM(C. Pilulifera)이 피부 광노화에 있어 보호 효과를 갖는다는 사실을 연구하는 것은 매우 흥미로운 것이며, 이를 제약 산업 및 화장품 산업의 향상에 잠재적으로 사용할 수 있을 것이다.

효 과

[0032] 상기한 바와 같이 본 발명에 따른 작은구슬산호말 추출물은 인체 섬유아세포주(HT-1080)에서 하이드록실 라디칼을 야기시키고, 세포내 ROS 수준 및 MMP-2 및 MMP-9 활성을 저해시키는 DNA 손상에 대해 항산화 효과를 나타내며, 항산화 활성을 나타내어 항-노화 작용에 기여하는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0033] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] **실시예**

[0035] 작은구슬산호말(*C. Pilulifera*)을 대한민국 부산 오륙도 해변에서 2007년 7월 수집하였다. 인간 섬유육종세포주(Human fibrosarcoma; HT-1080), 인간 백혈병 세포주(human leukemic; U-937), 인간 태아 폐 섬유아세포주(human fetal lung fibroblast; MRC-5) 및 인간 피부 섬유아세포주(human dermal fibroblast; HDF)는 ATCC(American Type of culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 입수하였다. 덜벡코 개질 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM)는 깁코 BRL 라이프 사이언스 테크놀로지드사(Gibco BRL, Life Technologied; USA)에서 입수하였다. MTT [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 시약, 플루로글루시놀, 5,5-디메틸-1-피롤린-N-옥사이드(DMPO), 및 폴린 시약(Folin-Ciocalteu)은 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 2 '' ,7 '' -디클로로플루오레신 디아세테이트(DCFH-DA) 및 모노브로모비메인은 몰리큘라 프로브스(Molecular probes; Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 모든 다른 시약들은 시약 등급의 화학물질을 사용하였다.

[0036] 모든 데이터를 평균 ± S.D로 나타내었다. 평균값은 새로이 제조한 시약을 이용하여 별도의 날에 수행한 3회 이상의 독립적인 실험에서 얻은 데이트를 기준으로 계산하였다. 스튜던츠 t-테스트를 이용하여 통계적 분석을 수행하였다. $P<0.05$일 때 통계적 유의성을 얻었다.

[0037] **실시예 1 : 작은구슬산호말 추출물의 제조**

[0038] 신선한 작은구슬산호말을 물로 3회 세척하여 염분을 제거하였다. 열수 추출을 위해, 자기 교반기에 의해 1 시간 동안, 건조된 EC 분말 (50 g)을 500 ML의 열수와 혼합하였다. 이어서, 수득된 추출물을 왓츠만 NO 41 페이퍼 상으로 여과하였다. 얻어진 여과물을 냉각하고, -50℃에서 동결건조하였다. 에탄올 및 메탄올 추출을 위하여 탈지된 보리 분말 50 g을 계량하여 500 mL 병에 넣었다. 각각 95%(v/v) 메탄올 및 95%(v/v) 에탄올을 각 병에 가하였다. 실온(25℃)에서 10 일 동안 추출한 후, 상청액 및 침전물을 진공여과로 분리하였다. 잔사를 제1 추출로서 재추출하고, 수득된 추출 용액을 37℃에서 결합하고, 진공 증발기로 건조상태까지 농축하였다. MeOH 추출물 (16 g, 32 %)), EtOH 추출물 (12.6 g. 25.2 %) 및 H_2O 추출물(9.1 g, 18.2 %) 중, MeOH 추출물이 EtOH 추출물과 H_2O 추출물에 비해 최고도의 총 페놀성 성분을 함유하였다. 따라서 MeOH 추출을 추가의 연구를 위하여 선택하였다. 작은구슬산호말 MeOH 추출물(CPM)을 디메틸 술폭사이드(DMSO)에 용해시키고, 4℃에서 보관하였다(DMSO의 총 최종 농도는 0.1 %였음)

[0039] **실시예 2 : 총 항산화도 측정**

[0040] CPM의 항산화도를 티오시아네이트 방법(Mitsuda et al., 1996)에 따라 측정하였다. 10 mg의 CPM를 10 mL의 DMSO/물(10 %)에 용해시키고, 물 1 mL 중의 CPM 1 mg을 인산 포타슘 완충액 중의 리놀fp산(2.5 mL, 0.04 M, pH 7.0)에 가하였다. 리놀레산 에멀젼 50 mL는 175 μg Tween-20, 155 μL 리놀레산 및 0.04 M 인산 포타슘 완충액(0.04 M, pH 7.0)으로 구성되었다. 혼합 용액을 유리 플라스크에서 37℃로 배양하였다. 배양 동안 몇 번의 간격으로 $FeCl_2$와 티오시아제이트와 반응시킨 후, 500 nm에서의 흡수능을 읽어 과산화수소가를 측정하였다. 추출물을 가하지 않은 용액을 블랭크 시료로서 사용하였다. 모든 데이터는 3회 분석의 평균값으로 나타내었다. % 조건에서 지질 과산화 저해도는 다음과 같다:

[0041] $$\text{저해도}(\%) = 100 - [(A1/A0) \times 100],$$

[0042] 상기 식에서, A0는 대조 반응의 흡수능이고, A1은 시료 존재하의 흡수능이다.

[0043] **실시예 3 : ESR에 의한 자유 라디칼 소거능 측정**

[0044] 상기에 언급한 과정에 따라 상이한 라디칼들을 생성시키고, JES-FA 전자 스핀 공명(ESR) 분광계(JEOL Lts., Tokyo, Japan)를 이용하여 스핀 부가물을 기록하였다.

[0045] **실시예 3-1 : DPPH 라디칼 소거 활성**

[0046] 난조 등(Nanjo et al.; 1996)의 방법을 이용하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 추출물 용액(또는 대조구로서 에탄올 자체) 30 μL를 에탄올 용액 중의 DPPH (60 μM) 30 μL에 가하였다. 10 초 동안 격렬하게 혼합한 후, 용액을 100 μL 석영 모세관으로 옮기소, DPPH 라디칼에 대한 소거 활성을 JES-FA ESR 분광계(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 정확히 2 분 후, ESR 분광계 상에서 스핀 부가물을 측정하였다. 실험 조건을 다음과 같다: 자기장, 336.5 ± 5 mT; 전력, 5 mW; 변조 주파수, 9.41 GHz; 진폭, 1×1000; 스윕 시간, 30 sec. 하기 방정식에 따라 DPPH 라디칼 소거능을 계산하였다:

[0047] $$\text{라드칼 소거능} = \frac{H0}{H0 - H} \times 100\ \%$$

[0048]

[0049]

[0050] 상기 식에서, H 및 H0는 각각 시료를 사용한 및 사용하지 않은 라디칼 신호의 상대 피크 높이이다.

[0051] **실시예 3-2 : 하이드록실 라디칼 소거 활성**

[0052] 철-촉매화 펜톤 하버-베이스 반응(Fenton Haber-Weiss reaction)에 의해 하이드록실 라디칼을 생성시키고, 생성된 하이드록실 라디칼을 니트론 스핀 트랩 DMPO(nitrone spin trap DMPO; Rosen and Rauckman, 1984)와 빠르게 반응시켰다. 생성된 DMPO-OH 부가물은 ESR 분광계로 검출할 수 있었다. 추출물 용액(20 μL)을 인산염 완충 용액(pH 7.4) 중의 DMPO (0.3 M, 20 μL), $FeSO_4$ (10 mM, 20 μL) 및 H_2O_2 (10 mM, 20 μL)와 혼합한 후, 100 μL 석영 모세관 튜브로 옮겼다. 2.5 분 후, ESR 분광계를 이용하여 ESR 스펙트럼을 기록하였다. 사용된 실험 조건은 다음과 같다: 자기장, 336.5 ± 5mT; 전력, 1 mW; 변조 주파수, 9.41 GHz; 진폭, 1 × 200; 스윕 시간, 4 min. 하이드록실 라디칼 소거능을 하기 방정식으로 예산하였다.

[0053] $$\text{라드칼 소거능} = \frac{H0}{H0 - H} \times 100\ \%$$

[0054]

[0055]

[0056] 상기 식에서, H 및 H0는 각각 시료를 사용한 및 사용하지 않은 라디칼 신호의 상대 피크 높이이다.

[0057] **실시예 4 : 세포 배양 및 생존력 측정**

[0058] CPM의 세포독성 효과를 측정하기 위하여, HT-1080, U-937 및 MRC-5 세포주를 96-웰 플레이트에서 상이한 농도의 CPM으로 5 × 103 cells/well의 밀도에서 배양하였다. 24 시간 동안 배양한 후, 1 mg/mL MTT [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 100 μL를 가하고, 추가로 4 시간 동안 배양하였다. MTT를 제거하고, DMSO (150 μL)를 가하였다. 이어서 포르마잔 결정을 DMSO 중에 가용화시키고, UV 마이크로플레이트 리더기(Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 54 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. MTT가 포르마잔 염으로 전환된 양에 의해 상대 세포 생존력을 측정하였다. 세포 생존력을 대조구와 비교하여 %로서 정량화하였다. 데이터를 3 회 이상의 독립적인 실험의 평균으로 나타내었다. $P < 0.05$을 유의적인 것으로 고려하였다.

[0059] **실시예 5 : DCFH-DA에 의한 세포 반응성 산소종(ROS) 측정**

[0060] 기질로서 산화 민감성 염료 2' 7' -디클로로플루오레신 디아세테이트(2' 7' dichlorofluorescin diacetate; DCFH-DA)을 이용하여 종래의 방법에 따라 반응성 산소종의 세포내 형성을 분석하였다(Okimotoa et al., 2000). 형과 마이크로타이터 96-웰 플레이트에서 배양한 HT-1080 세포에 HBSS 중의 20 μM DCFH-DA를 적재하고, 암 중에서 20 분 동안 배양하였다. 비형광 DCFH-DA 염료는 세포 내로 자유롭게 투과할 수 있고, 세포내 에스타라아제에 의해 2' 7' -디클로로플루오레신(DCF)으로 수화되고, 세포 내에서 트랩될 수 있다. 이어서, 세포를 상이한 농도의 시험 화합물로 처리하고, 1 시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 후, HBSS에 용해된 H_2O_2 300 μM를 세포에 가하였다. 다양한 ROS의 존재하에 DCFH의 산화에 기인한 2' 7' -디클로로플루오레신(DCF)의 형성을 GENions형광 마이크로플레이트 리더기(Tecan Austria GmbH, Austria)을 이용하여 485 nm의 여기 파장(Ex) 및 535 nm의 방출 파장(Em)에서 매 30분 후 판독하였다. 다양한 처리군에서의 용량- 및 시간-의존적 효과를 플롯팅하고, 대조군 및 블랭크 군의 형광 강도와 비교하였다.

[0061] **실시예 6 : 유전체 DNA 분리 및 하이드록실-라디칼 유발 DNA 손상에 대한 추출물의 보호 효과**

[0062] 유전체 고분자량 DNA를 약간 변형시킨 표준 페놀/프로에티나아제 K 공정을 이용하여 U-937 세포로부터 추출하였다(Sambrook and Russell, 2001). 간략하게, 10 cm 디쉬에서 배양한 세포를 PBS로 2회 세척하고, 5 mM EDTA를 함유한 PBS 1 mL에 스크랩하였다. 세포를 원심분리한 후, RNase (0.5 mg/mL), 아세트산 소듐(0.2 M), 프로테이나아제 K (10 mg/mL) 및 SDS (10 %)에 용해시켰다. 혼합물을 37℃에서 30 분, 55℃에서 1 시간 배양하였다. 배양 후, 페놀:클로로포름:이소아밀알코올(25:24:1) 을 1:1의 비율로 가하고, 혼합물을 4℃에서 5 분 동안 12,000 × g로 원심분리하였다. 상청액을 100% 빙냉 에탄올과 1:1.5 비율로 혼합하고, -20℃에서 15 분 동아 정치시켰다. 12,000 × g로 5 분 동안 원심분리한 후, 펠릿을 TE 완충액에 용해시키고, DNA의 순도를 260/280 nm에서 분광광도법으로 측정하였다. 또한, 분리된 DNA의 품질을 1 % 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 0.04 M 트리스-아세테이트-0.001 M EDTA 중에서 평가하였다. 하이드록실 라디칼에 의해 유발된 DNA 손상에 대한 CPM의 보호 효과를 연구하기 위하여, 반응을, 50 mM 인산염 완충액(pH 7.4) 3 μL, 2 mM FeSO4 3 μL 및 다양한 농도(5, 10 and 50 μg/μL)의 추출물 2 μL 중의 DNA 0.5 μL을 함유한 총부피 12μL에서 에펜도르프 튜브(eppendorf tube)에서 수행하였다. 이어서 30 % H2O2 4 μL를 가하고, 혼합물을 37℃에서 30 분 동안 배양하였다. 혼합물을 0.8 % 아가로스 겔 전기영동시키고, DNA 대역을 에티디움 브로마이드로 염색하였다.

[0063] **실시예 7 : 자외선 조사 및 세포 생존력 분석**

[0064] 인간 피부 섬유아세포(1.5×10^5 cell/mL)를 35 mm 플레이트에 파종하고, 밤새도록 배양하였다. 자외선 조사 전, 세포가 80% 컨플루언트(confluent)되었을 때, 이들을 PBS 완충액으로 2회 세척하였다. UV 조사(0-400 nm)를 위해 여과된 시뮬레이터 UVP(simulator UVP; Upland, CL-1000, USA)를 튜브와 목적물의 거리 35mm에서 사용하였다. UVA 조사량을 10 초 동안 100 J/cm^2로 설정하였다. 블랭크 세포를 자외선에 노출시키지 않고 동일하게 처리하였다. 자외선 조사 후, 37℃에서 4 시간 동안 다양한 농도의 CPM을 함유한 신선한 무혈청 배지를 세포에 가하였다. 상대 세포 생존력을 포르마잔 염으로 전환된 MTT의 양에 의해 측정하였다. 세포 생존력을 대조군과 비교하여 %로 정량화시켰다. 데이터를 3회 이상의 독립적 실험의 평균으로 나타냈고, $P<0.05$를 유의적인 것으로 교려하였다.

[0065] **실시예 8 : 형광 젤라틴에 의한 MMP 활성 분석**

[0066] 효소 활성 분성을, 50 mmol/L Tris-HCl 완충액, pH 7.5, 0.15 mol/L NaCl, 10 mmol/L $CaCl_2$, 0.05% Brij 35 및 50 μmol/L $ZnSO_4$을 지시된(Netzel-Arnett et al., 1991) %로 함유한 0.02% NaN_3 (TNC 완충액)에서 수행하였다.

다양한 농도의 CPM에 대해 합성 형광 기질(일반적인 MMP 기질) 소화능을 시험하였다. 각 농도의 CPM을 1umol/L 기질로 37℃에서 7 시간 동안 배양하고, 3% 아세트산을 가하여 반응을 종료시켰다. GENios형광 마이클로플레이트 리더기(fluorescence microplate reader; Tecan Austria GmbH, Austria)을 이용하여 495 nm (여기) 및 520 nm (방출)에서 형광 강도를 측정하였다.

[0067] **실시예 9 : 젤라틴 자이모그래피**

[0068] CPM의 존재 또는 부재 하에서 종래의 방법(Hrabec et al., 2002)에 의거한 자이모그래피로 MMP-2와 MMP-9의 활성을 측정하였다. 세포를 다양한 농도의 CPM에 1시간 동안 노출시킨 후, 각각 HDF 및 HT-1080 세포를 10 ng/mL 및 100 ng/mL PMA로 처리하고, 3일 동안 무-FBS 배지에서 배양을 계속하였다.

[0069] 가열 없이 50 μg의 총 단백질 (또는 활성 MMP-2를 갖는 다양한 농도의 CPM 반응 생성물)을 함유한 조절된 배지를 시료 완충액(125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 3% SDS, 40% 글리세롤, 0.02% 브로모페놀 블루) 중에 재현탁시키고, 1.5 mg/mL 젤라틴 함유 10% 폴리아크릴아마이드 겔 상의 비환원성 조건하에서 전기영동시켰다. 전기영동 후, 겔을 2.5% Triton X-100 함유 50 mM Tris-HCl (pH7.5)로 2회 세척하고, 10 mM CaCl2, 50 mM Tris-HCl, 및 150 mM NaCl을 함유한 전개용 완충액에서 37℃로 밤새 배양하였다. 겔을 30 % 메탄올 및 10% 아세트산 중에서 0.2% 쿠마씨 블루(Coomassie Blue) R-250로 염색하고, 쿠마씨 블루 염료 없이 동일한 용액 중에서 탈색시켰다. 젤라틴융해성 밴드(Gelatinolytic bands)를 청색 배경에 대해 청정 대역으로서 관찰하고, 밴드의 강도를 이미지 마스터 소프트웨어(Image Master Software; Amersham Pharmacia Biotech; Sweden)를 이용하여 측정하였다.

[0070] **실시예 10 : 총 페놀성 성분 측정**

[0071] 종래의 방법(Slinkard and Singleton, 1977)에 따라서 폴린 시약(Folin-Ciocalteu' reagent; FCR)을 이용하여 동결건조된 추출물 주의 총 페놀성 성분을 측정하였다. 추출물 용액(0.5 mL)을 2.5 mL FCR (diluted 1:10, v/v)과 혼합한 후, 2 mL Na_2CO_3 (7.5%, v/v) 용액과 혼합하였다. 이어서, 30℃로 90분 동안 배양한 후 765 nm에서 흡수능을 측정하였다. 갈산 등가(mg 갈산/g 건조 추출물)로서 결과를 나타내었다.

[0072] **실시예 11 : 환원력 활성**

[0073] 제조된 작은구슬산호말 추출물의 환원력을 종래의 방법(Oyaizu; 1986)에 따라 측정하였다. 간략하게, 다양한 농도의 추출물(페놀 함량 계산) 및 1 mL 증류수 중의 표준 화합물을 2.5 mL의 인산염 완충액 (0.2 M, pH 6.6) 및 2.5 mL의 포타슘 페리시아나이드 용액(1%, w/v)과 혼합하였다. 혼합물을 수조에서 50℃로 20 분 동안 배양하였다. 이어서, 2.5mL의 TCA 용액(10%, w/v)을 가하고, 혼합물을 3000 g로 10 분 동안 원심분리하였다. 상층의 분취액 2.5 mL를 증류수 2.5 mL와 염화 제1철 용액(0.1%, w/v) 0.5 mL와 결합시키고, 700 nm에서 흡수능을 측정하였다. 반응 혼합물의 증가된 흡수능은 보다 큰 환원력에 상응하는 것이다.

[0074] 상기 실시예 1 내지 11를 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

[0075] **1. 총 항산화 활성**

[0076] FTC법(ferric thiocyanate method)에 의해CPM의 총 항산화 활성을 측정하였다. FTC법을 이용하여 지질 산화 초기 단계 동안 퍼옥사이드 수준을 측정하였다. 퍼옥사이드는 리놀레산 산화 동안 형성되며, Fe^{2+}와 반응하여 Fe^{3+}를 생성시킨다. Fe^{3+} 이온은 SCN^-와 착물을 형성하고, 이 착물은 500nm에서 최대 흡수능을 갖는다. 리놀레

산의 과산화를 방지하는 CPM의 효과를 도 1에 나타내었다. 배양 기간(7 일) 후, 리놀레산을 이용할 수 없기 때문에 퍼옥사이드의 형성이 중단되었다. 또한 중간 생성물이 안정한 최종 생성물로 전환되어 Fe2+의 산화가 중단되었다. 따라서 보다 낮은 흡수능은 보다 높은 수준의 항산화 활성을 지시한다. 7일 후, CPM (79.45%)은 1.3 mg/mL 농도에서 양성 대조군으로서 α-토코페롤(77.34%) 보다 높은 활성을 나타내었다.

[0077] **2. 자유 라디칼 소거 활성**

[0078] ESR 스핀-탭핑 기술(spin-trapping technique)을 이용하여 CPM의 직접 자유 라디칼 소거 활성을 조사하였다. DPPH는 자유 라디칼 생성을 평가하는데 널리 이용되고 있다(Ozcelik et al., 2003). DPPH 분석에 있어서, 항산화제가 안정한 DPPH 라디칼을 황색 착색된 디페닐피크릴-하이드라진으로 환원시킬 수 있다. 이러한 방법은 비라디칼 형태의 DPPH-H의 형성에 기인하여 알콜성 DPPH 용액이 수소 공여 항산화제의 존재하에서 환원되는 것을 바탕으로 한 것이다. 하이드록실 라디칼을 펜톤 반응으로 생성시키고, ESR 분광계로 시각화하였다. ESR 신호는 ·OH에 대한 DMPO와 경쟁하는 ·OH 소거제의 존재에 의해 저해되었다. CPM의 DPPH 및 하이드록실 라디칼 소거 활성을 평가한 결과, 두 가지 라디칼 모두가 각각 ESR 스펙트럼에 대한 상이한 농도(5-200 μg/mL)에서 용량 의존적으로 소거되었다(도 2 a 및 b 참조).

[0079] **3. DCFH-DA에 의한 반응성 산소종(ROS) 측정**

[0080] HT-1080, U-937 및 MRC-5 세포주에 대한 CPM의 세포독성 효과를 평가한 결과, CPM이 저농도에서 비세포독성 효과를 나타내었다(도 3 참조). 따라서 본 발명에서는 CPM 추출물의 세포 라디칼에 대한 직접 소거 효과를 연구하였다. 이를 위하여, HT-1080 세포를 상기에서 기재한 형광 프로브 DCFH-DA로 표지하였다. 형광 프로브는 세포에서의 산화 활성을 모니터링하기 위해 널리 사용되고 있다. 표지 동안, 세포내로 자유롭게 투과하는 비-형광 DCFH-DA 염료가 세포내 에스테라아제에 의해 DCFH로 가수분해되고, 세포 내에서 포집된다(Veerman et al., 2004). 도 4에 나타낸 바와 같이, ROS 매개 DCFH의 산화에 따라 DCF에 의해 방출된 형광은 200 분까지 시간 경과에 따라 증가하였다. CPM 전처리로 DCF 형광도가 용량- 및 시간-의존적으로 감소하였다. CPM은 30분 후 5 μg/mL 농도에서 현저한 라디칼 소거 효과를 나타내었다. 보다 명확하게, CPM은 배양 시간 전체에 걸쳐 100 μg/mL 농도에서 유의적으로 라디칼을 소거할 수 있었다.

[0081] **4. 하이드록실-라디칼-유발 DNA 손상에 대한 추출물의 보호 효과**

[0082] in vitro 자유-라디칼-유발 DNA(U-937 세포 유래) 손상에 대한 보호 효과를 평가하는 방법을 이용하여 CPM의 항산화 효과를 평가하였다. DNA 염기의 산화는 내생적 원인 및 생체이물(xenobiotics)의 반응으로부터 생성된 ROS에 유해 발생된다. 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동 방법에 의해 하이드록실 라디칼-유발 DNA 손상에 대한 CPM의 보호 효과를 연구하였다(도 5 참조). DNA (U-937 세포) 블랭크(선 1)과 비교하여, 본 발명의 DNA는, 2 mM Fe2+ 및 30 % H2O2로 처리하였을 때 펜톤 반응으로부터 생성된 하이드록실 라이칼에 기인한 형태로 완전하게 전환되었다(선 2). 상기 결과에 따라, 5-50 μg/mL 농도 범위의 CPM으로 처리된 DNA는 하이드록실 라디칼-유발 DNA 손상을 용량 의존적으로 보호하였고(선 3-5), 이는 항산화 효과를 지시한다.

[0083] **5. UVA 조사 및 세포 생존력 분석**

[0084] 도 6에 4 시간 동안 UV 조사 후 세포 생존력을 나타내었다. 블랭크 군(102.5%) 및 처리군(지시된 CPM 100 μg/mL, 99.5%)에 대한 약간의 세포독성 효과가 관찰된 반면, CPM 미처리 세포(대조군)은 세포독성 효과를 나타냈다(12.3%). 이는 MTT 분석에 의한 UV-조사 HDF 세포주에 대한 CPM의 보호효과를 제시한다. UV 조사에 의한 손상이 용량-의존적 방식으로 유의적으로 감소하였다.

[0085] **6. CPM에 의한 HT-1080 세포에서 MMP-2 및 MMP-9 발현 완화**

[0086] 섬유아세포는 주로 MMP-2 및 MMP-9를 생산함으로써 조직 리모델링 및 상처 치료 과정에서 주요한 역할을 하며, UV-유발 피부 노화 및 연결 조직의 병인에 관여한다. 다양한 종류의 섬유아세포 중, 인체 섬유육종(HT-1080)

세포가 MMP 연구에 통상적으로 이용된다. 따라서 본 발명에서는 MMP에 대한 CPM의 효과를 연구하기 위하여 동일한 세포주를 이용하였다. MMP의 저해는 이들의 유전자 발현 내지 효소 활성의 상이한 수준에서 일어날 수 있다. MMP-2 및 MMP-9은 일련의 MMP 군에 속하며, 이들은 기질로서 젤라틴을 이용하며, 젤라틴 자이모그래피를 이용하여 이들의 활성을 스크리닝하였다. 이를 위하여, HT-1080 세포를 상이한 농도의 CPM으로 전처리하고, 강력한 종양 촉진제인 포르볼 12-마이리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA)로 MMP 발현을 촉진시켰다. 도 7에 나타낸 바와 같이, PMA 처리가 블랭크 군($P < 0.01$)과 비교하여 MMP-2 및 MMP-9 활성을 유의적으로 증진시켰다. 반대로, 비교적 매우 낮은 MMP-2의 발현이 관찰되었다. 그러나 CPM 처리는 용량-의존적으로 MMP-2 및 MMP-9 발현을 명확히 저해하였다. 더욱이, 최고 농도(100 μg/mL)에서 MMP-2 및 MMP-9 발현 수준은 비촉진된 세포에서와 유사하였다. 따라서 본 발명에서 관찰된 MMP-9과 비교하여 낮은 수준의 MMP-2 발현 이유를 예상할 수 있다.

[0087] **7. 총 페놀성 화합물 및 환원력**

[0088] CPM은 갈산 당량체(gallic acid equivalent; GAE, GAE의 mg/g)로 표현되는 총 페놀성 물질을 32.56 mg/g 함유하는 것으로 밝혀졌다. 폴린 시약(Folin-Ciocalteu phenol reagent)을 이용하여 추출물 내에 존재하는 페놀성 화합물의 양에 대한 초기 어림값을 얻었다. 총 페놀이 항산화 활성을 나타낼 수 있기 때문에, 추출물 중 수득한 총 페놀의 양은 추출물이 높은 항산화 활성을 갖는다는 점을 지시하였다. 또한, 이들 페놀성 화합물의 높은 함량이, 수소-공여 또는 전자 공여제로서 이들의 반응성을 통해 높은 자유 라디칼 소거 활성, 및 금속 이온 킬레이트화 특성을 설명할 수 있다. 도 8에 α-토코페롤 및 비타민 C와 비교한 CPM의 환원력을 나타내었다. CPM의 환원력이 용량의존적으로 유의적임이 밝혀졌다. CPM 및 표준 화합물의 환원력은 비타민 C > CPM > α-토코페롤의 순서였다. 화합물의 환원력은 강력한 항산화 활성의 유의적인 지시자로서 작용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0089] 도 1은 FTC(ferric thiocyanate)법으로 측정한 리놀레산 에멀젼 중에서 CPM과 α-토코페놀의 항산화 활성을 나타낸 그래프이다.

[0090] 도 2는 다양한 농도의 CPM(5, 50, 100 및 200 μg/mL) 존재하의 자유 라디칼 소거 활성을 나타낸 그래프로서, (a) DPPH 라디칼을 DPPH에 의해 생성된 것이며, (b) DMPO에 트랩핑된 하이드록실 라디칼은 펜톤 반응에 의해 생성된 것이다.

[0091] 도 3은 MTT 분석을 이용한 HT-1080, U-937 및 MRC-5 세포주에 대한 CPM의 상대 세포 생존력을 나타낸 그래프이다.

[0092] 도 4는 5 μg/mL (a), 10 μg/mL (b), 50 μg/mL (c) 및 100 μg/mL (d)에서 CPM의 세포 라디칼 소거 활성을 나타낸 그래프이다.

[0093] 도 5는 CPM의 존재하에 펜톤 반응으로 생성된 OH에 의한 U-937 세포주의 DNA 붕괴의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸 도이다.

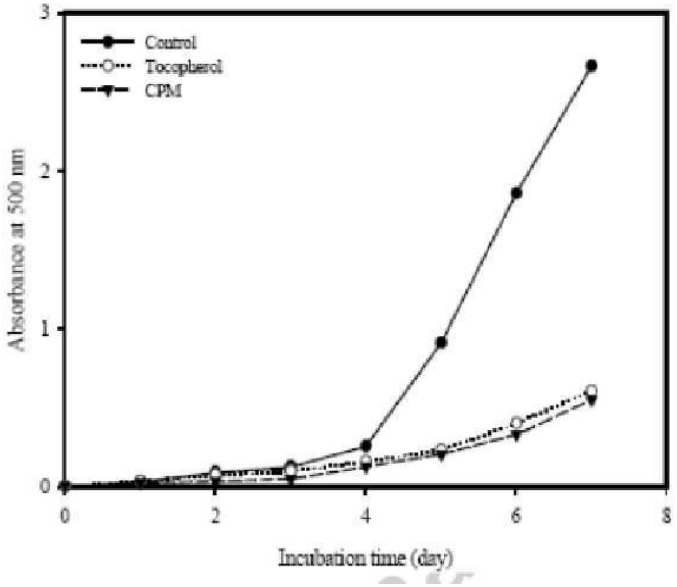
[0094] 도 6은 MTT 분석에 의한 UV-조사 HDF 세포주에 대한 CPM(10, 100 및 200 μg/mL)의 보호 효과를 나타낸 그래프이다.

[0095] 도 7은 CPM 처리 HT-1080 세포에서 MMP-2 및 MMP-9 활성의 젤라틴 자이그래피 측정 결과를 나타낸 도이다.

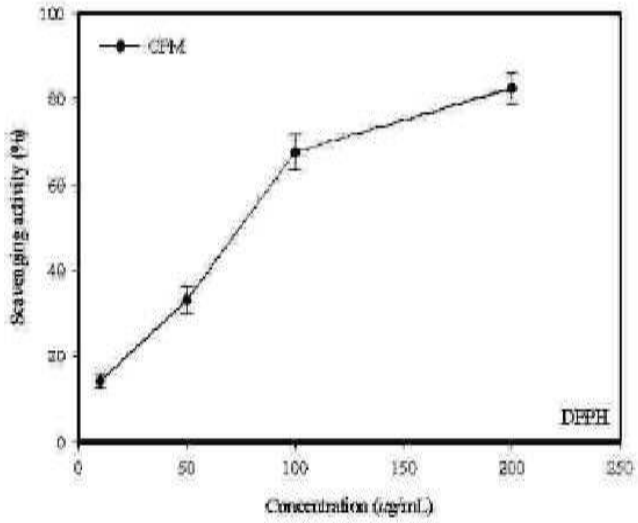
[0096] 도 8은 CPM 추출물(계산된 폴리페놀), α-토코페롤 및 비타민 C(50-200 μg/mL)의 환원력을 나타낸 그래프이다.

도면

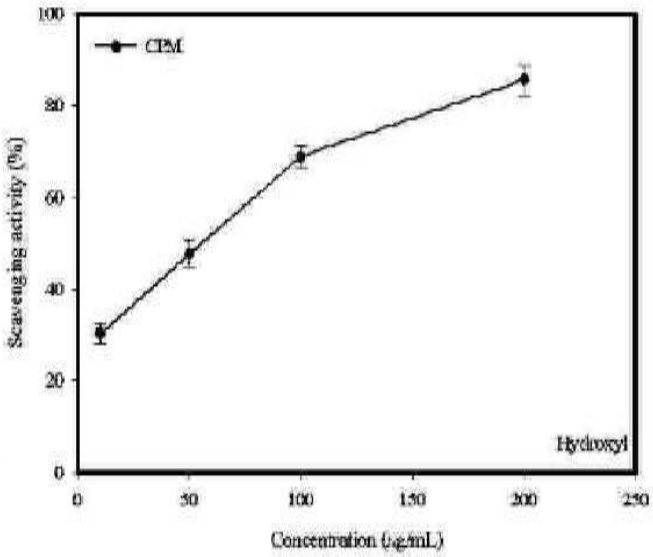
도면1


Control
Tocopherol
CPM
Absorbance at 500 nm
Incubation time (day)
0
1
2
3
0
2
4
6
8

도면2

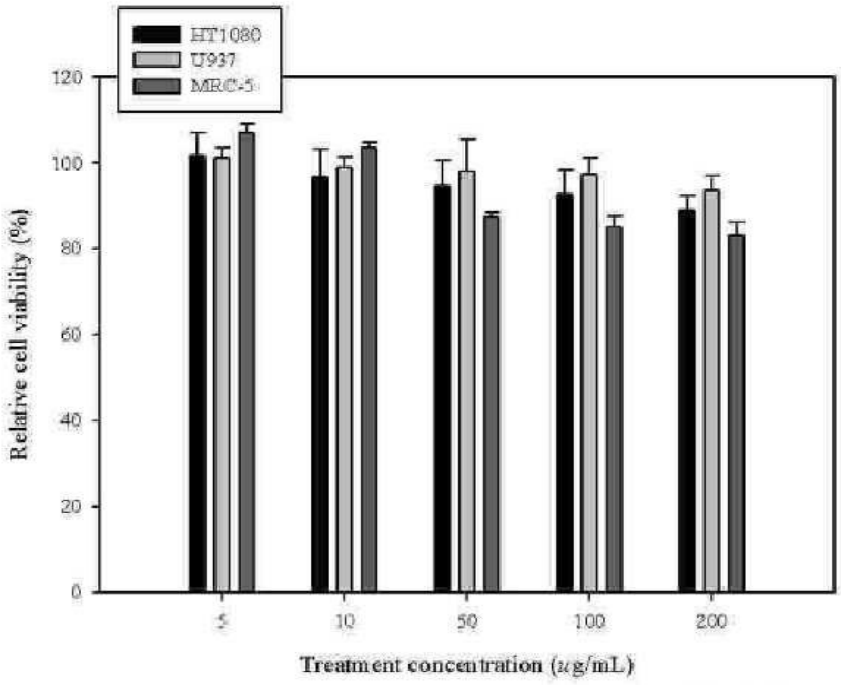

CPM
Scavenging activity (%)
DPPH
Concentration (μg/mL)

(a)

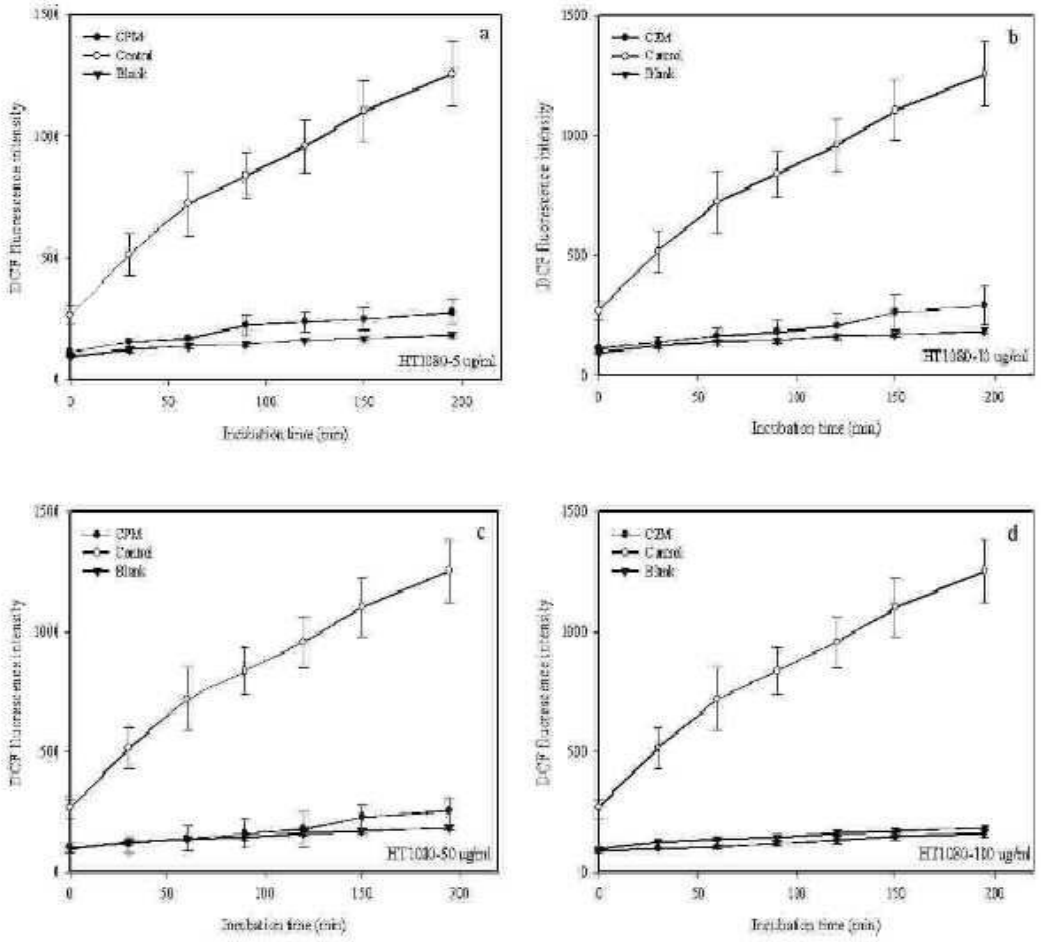

CPM
Scavenging activity (%)
Hydroxyl
Concentration (μg/mL)

(b)

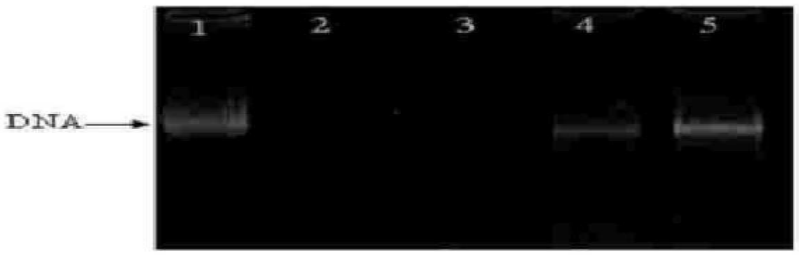
도면3


HT1080
U937
MRC-5
Relative cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
5
10
50
100
200
Treatment concentration (㎍/mL)

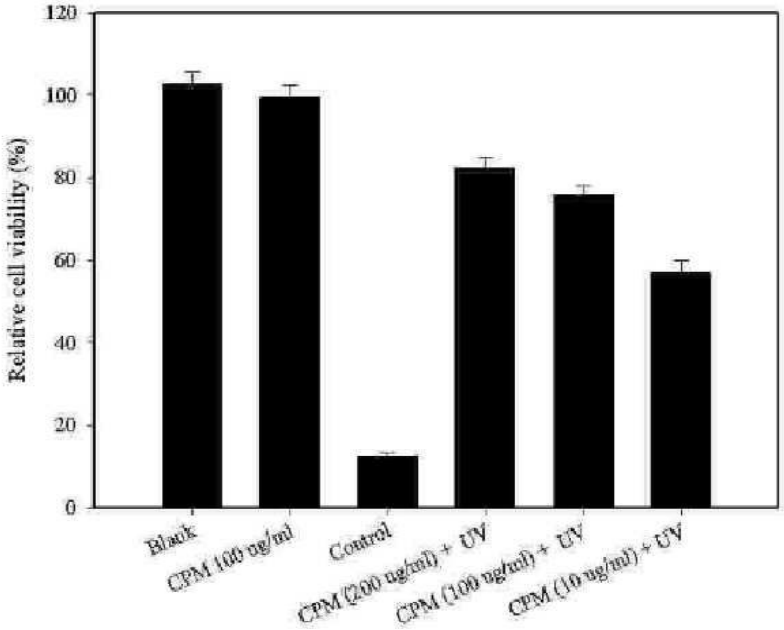
도면4


a
b
c
d
CPM
Control
Blank
DCF fluorescence intensity
Incubation time (min)
HT1080-5 ug/ml
HT1080-10 ug/ml
HT1080-50 ug/ml
HT1080-100 ug/ml

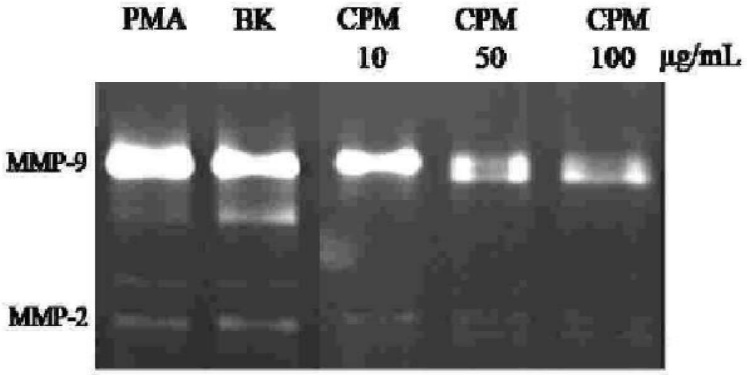
도면5


1
2
3
4
5
DNA

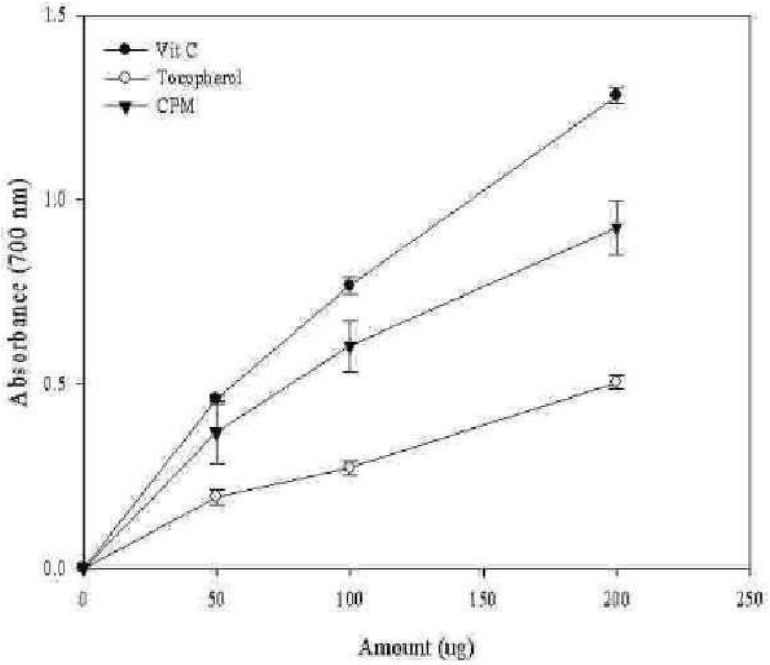
도면6


120
100
80
60
40
20
0
Relative cell viability (%)
Black
CPM 100 ng/ml
Control
CPM (200 ng/ml) + UV
CPM (100 ng/ml) + UV
CPM (10 ng/ml) + UV

도면7


PMA
BK
CPM 10
CPM 50
CPM 100
μg/mL
MMP-9
MMP-2

도면8


1.5
1.0
0.5
0.0
Absorbance (700 nm)
Vit C
Tocopherol
CPM
0
50
100
150
200
250
Amount (ug)