

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0033480 (43) 공개일자 2014년03월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01) A61K 36/185 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)		(71) 출원인 계명대학교 산학협력단 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(21) 출원번호	10-2014-0021401(분할)	(72) 발명자
(22) 출원일자	2014년02월24일	김영철
심사청구일자	2014년02월24일	대구 달서구 호산로 125, 209동 1305호 (파호동, 삼성명가타운)
(62) 원출원	특허 10-2012-0081429	김수은
원출원일자	2012년07월25일	대구 달서구 송현로7길 9, 2109동 1502호 (상인동, 상인화성파크드림2단지)
심사청구일자	2012년07월25일	(뒷면에 계속)
(30) 우선권주장		(74) 대리인
1020110125128	2011년11월28일 대한민국(KR)	양부현

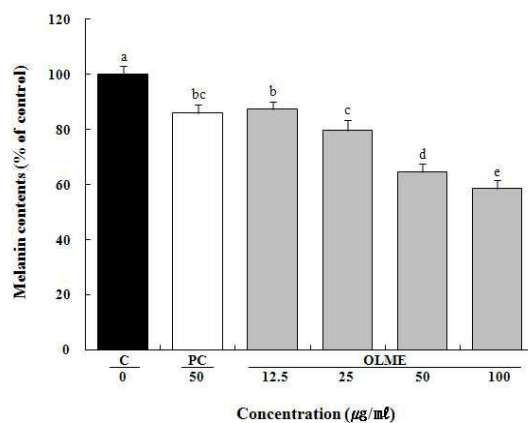
전체 청구항 수 : 총 7 항

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

(57) 요약

본 발명은 애기달맞이꽃(*Oenothera laciniata* Hill) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백, 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선 용도와 같은 피부 상태 개선용 조성물을 제공한다. 본 발명의 애기달맞이꽃 추출물은 Melan-a 세포에서 멜라닌의 합성을 억제하며, 인간 피부 섬유아세포에서 콜라겐을 합성을 촉진하는 활성을 보유한다. 따라서, 본 발명의 애기달맞이꽃 추출물은 피부 미백제, 멜라닌 색소 과다 침착 질환 치료제 또는 피부 노화 및 피부 주름 방지제의 활성성분으로 개발될 수 있다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

박은예

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

신수진

대구 달서구 선원로 122, 104동 907호 (이곡동, 성
서2차서한타운)

특허청구의 범위

청구항 1

애기달맞이꽃 (*Oenothera lacinata* Hill) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물.

청구항 2

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

청구항 3

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

청구항 4

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

청구항 5

애기달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 멜라닌 색소 과다 침착 질환은 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 또는 일광흑색증(solar lentigines)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 애기달맞이꽃 추출물은 조성물 총 중량에 대해 0.0001 - 30 중량%으로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술 분야

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

배경 기술

[0002] 멜라닌 생성과 축적이 증가하면 흑피증(melasma), 염증후흑피증(postinflammatory melanoderma), 일광흑색점

(solar lentigo)등과 같은 후천성 과다색소침착을 포함하는 다양한 피부질환을 유발할 수 있다. 상피 및 피부 과다색소침착은 멜라노사이트의 수가 증가하거나 또는 멜라닌 생성 효소 활성의 증가에 기인할 수 있다 (Ortonne, J. P., and J. J. Nordlund. Mechanisms that cause abnormal skin color. 1998. NewYork: Oxford University Press.pp.489-502). 자외선광, 만성염증 및 피부마찰 뿐만 아니라 비정상적 α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone)의 분비도 상기와 같은 질환을 유도하는 인자가 될 수 있다(Im et al. 2002. *British Journal of Dermatology* 146:165-167). 멜라닌생성은 주로 표피 기저층내의 멜라노사이트 세포의 멜라노솜으로 알려진 라이소솜 유사 구조내에서 발생되고, 멜라닌의 2 가지의 주요 형태인 흑색/갈색 유멜라닌(black/brown eumelanin) 및 황색/적색 페오멜라닌(yellow/red pheomelanin)은 동일한 전구체인 티로신으로부터 공통적인 티로시나아제(tyrosinase)-의존성 경로를 통해 유도된다. 티로시나아제 유전자 패밀리의 3개의 주요 멜라노솜 부속 효소들이 멜라닌 생합성에 관여된다. 티로시나아제는 멜라닌 합성에서 다음의 2가지의 중요한 반응을 촉매하는 핵심 효소이다: 티로신을 DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine)으로 수산화시키는 반응과, DOPA를 도파퀴논(dopaquinone)으로 산화시키는 반응. 도파퀴논은 도파크롬으로 자발적으로 변환된다. TRP-2(Tyrosinase-related protein-2)/DCT(dopachrome tautomerase)은 도파크롬의 DHICA(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)으로의 변환을 촉매한다. TRP-1(Tyrosinase-related protein-1, DHICA oxidase)는 DHICA를 인돌-5,6-퀴논-2-카르복실산으로 산화시키는 반응을 촉매한다. 이들 2개의 밀접하게 관련된 구조, TRP-2/DCT 및 TRP-1은 불안정한 퀴논을 생성하도록 작용하고, 상기 불안정한 퀴논은 추가적인 중합반응을 거쳐 최종적으로 멜라닌을 생성한다(Mallick et al. 2005. *Pigment Cell Research* 18:25-33). 몇몇의 탈색소화제는 티로시나아제 뿐만 아니라 관련된 멜라닌 생성 효소 TRP-1, TRP-2 및/또는 퍼옥시다아제의 전사(transcription)과 활성을 억제함으로써 피부 색소화를 조절한다. 히드로퀴논(hydroquinone), 코직산(kojic acid) 및 알부틴(arbutin)과 같은 공지된 억제제들이 피부의 과다색소침착질환의 치료에 사용되었으나, 최근에 인간의 건강에 안전하지 않다는 것이 밝혀졌다.

[0003] 피부의 노화는 내인성 및 외인성 노화를 포함하며 피부의 구조상의 변화를 가져오는 복잡한 과정이다 (Papanagiotou, V. D. 2009. Skin aging and photoaging. *Dermatology and Venereology Review* 4: 57-65). 광에 의한 노화(photoaging)은 예컨대, 불규칙한 건조, 색소침착, 혈색이 나쁨, 깊은 주름살, 심각한 위축, 모세관확장, 전암성 병변, 이완 및 가죽과 같은 피부의 임상적 징후를 보여준다(Gilchrest, B. A. 1989. Skin aging and photoaging: an overview. *Journal of American Academy of Dermatology* 21: 610-613). 콜라겐은 이의 전구물질인 프로콜라겐으로부터 합성되는데, 이는 TGF- β (transforming growth factor- β)에 의해 조절되면서 피부 섬유아세포에서 합성된다. TGF- β 는 콜라겐 생성과 AP-1(activator protein-1)을 촉진하는 사이토카인이다. AP-1은 MMPs(matrix metalloproteinases)라고 불리는 효소를 상향 조절함으로써 콜라겐 분해를 촉진하는 전사인자이다(Mukherjee, P. K., N. Maity, N. K. Nema, and B. K. Sarkar. 2011. Bioactive compounds from natural resource against skin aging. *Phytomedicine* 19: 64-73). 피부에 흡수된 UV광은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)를 생성하고, 이 활성산소종은 세포벽, 지질막, 미토콘드리아 및 DNA와 같은 세포 구성물에 산화적 손상을 야기하는 것으로 알려져 있다(Kang et al., 2003. *Journal of Investigative Dermatology* 120: 835-841; Lavker, R. M. 1995. Cutaneous aging: chronologic versus photoaging. *Photodamage* 8: 123-135). 비타민 C(아스코르브산)과 비타민 E(알파-토코페롤)을 조합하면 UV광 조사에 의해 발생하는 자유 라디칼 소거능을 상승적으로 향상시킬 수 있다고 보고되어 있다(Swindells, K., and L. E. Rhodes. 2004. *Photoimmunology and Photomedicine* 20: 297-304).

[0004] 달맞이꽃(*Oenothera odorata* Jacquin)은 바늘꽃과(Onagraceae)에 속하는 2년생 초본으로서, 최근에 귀화가 이루어진 잡초 또는 관상용 식용작물이다. 이 식물은 남아메리카 원산이며 우리나라에 야생하는 동속식물로는 큰 달맞이꽃, 겹달맞이꽃, 애기달맞이꽃 등 4종이 알려져 있다(Lee TB. *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmoon Publishing Co., Seoul, Korea, 1999). 달맞이꽃은 아메리카 인디언들이 그 추출액을 피부의 염증 또는 발진에 바르거나 해소 기침약으로 사용하였던 약초로서 한방에서는 대소초(待宵草)라 하여 해열 및 소염제로 사용하였고 민간요법으로는 달인물로 인후염이나 피부염의 환부를 세척하는 것으로 전해지며, 뿌리와 전초를 감기, 해열, 인후염, 신장염, 고혈압 등에 사용한다는 보고가 있다(Varro ET, Lynn RB, James ER. *Pharmacognosy* 9th edition, Lea and Febriger Philadelphia, p. 471 (1988)). 한편 같은 속의 왕달맞이꽃(*Oenothera erythrosepala* Borbas)으로부터는 탄닌계열인 oenothain B 및 C 등의 항종양 및 항바이러스 성분이 보고된 바 있다(Hatano T, et al., *Chem. Pharm. Bull.* 37: 3005-3009, 1989; Okuda T. et al., *Chem. Pharm. Bull.* 32: 3787-3788, 1984). 그러나 애기달맞이꽃(*Oenothera lacinata* Hill)은 최근에 도래한 귀화식물로서 달맞이꽃에 비해 활성성분이나 약리 연구는 거의 보고되어 있는 바가 없다. 한편, 애기달맞이꽃 추출물이 항산화능을 갖는 생리활성물질을 포함하고 있으며 백혈병 세포주에 대한 세포독성활성을 가진다는 것이 보고되어 있고

(이정아 등, Koran J. Food Sci. Technol. Vol. 38. No. 6. pp. 810-815, 2006), 또한, 미생물의 생육을 저해하는 항균활성에 대해서도 보고되어 있다(김지영 등, J Korean Soc Food Sci Nutr, 36(3), 255-261, 2007).

[0005] 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.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 피부 미백이나 피부노화 억제와 같은 피부 상태 개선 효능을 갖는 물질을 천연의 재료로부터 발굴하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 애기달맞이꽃의 추출물이 Melan-a 세포에서 멜라닌의 합성을 저해하여 피부 미백 활성을 가질 뿐만 아니라, 피부 섬유아세포에서 콜라겐의 합성을 촉진하며 동시에 콜라겐의 분해를 억제하는 활성을 가진다는 것을 실험적으로 입증하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 애기달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0008] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 애기달맞이꽃(*Oenothera laciniata* Hill) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 애기달맞이꽃(*Oenothera laciniata* Hill) 추출물을 유효성분으로 포함하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 피부 상태 개선은 피부 미백, 피부 노화 개선, 또는 피부 주름 개선이다.

[0012] 본 발명에서 애기달맞이꽃 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에서 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리할 수 있다. 본 발명에서 애기달맞이꽃 추출물은 애기달맞이꽃의 추출 부위가 제한되지 않으나, 바람직하게는 애기달맞이꽃의 잎, 줄기, 뿌리, 또는 꽃으로부터 얻은 추출물을 의미하며, 보다 바람직하게는 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어지는 전초 또는 잎, 줄기, 뿌리 및 꽃으로 이루어지는 전초로부터 얻은 추출물을 의미한다.

[0013] 본 발명의 애기달맞이꽃 추출물을 추출하기 위한 추출 용매로는 추출공정에서 일반적으로 사용할 수 있는 용매를 사용할 수 있으며, 둘 이상의 서로 다른 용매를 순차적으로 사용하여 추출할 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명의 추출용매는 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 물이며, 가장 바람직하게는 메탄올과 에탄올이다.

[0014] 본 발명의 다른 바람직한 일 구현예에 의하면, 본 발명에서 상기 애기달맞이꽃 추출물은 총 조성물 중량에 대해 0.0001 - 30 중량%의 농도, 보다 바람직하게는 0.001 - 20 중량% 농도로 포함된다.

[0015] 하기 본 명세서의 구체적인 일 실시예에서 입증되는 바와 같이, 애기달맞이꽃 추출물은 세포내에서 멜라닌 합성에 관여하는 티로시나아제(tyrosinase), TRP(tyrosinase related protein)-1 및 TRP-2의 발현을 억제할 뿐만 아니라, 이들 효소 및 단백질 유전자의 전사인자인 MITF-M(microphthalmia-associated transcription factor-M)의 발현도 억제함으로써 멜라닌의 합성을 감소시킨다. 따라서, 본 발명의 애기달맞이꽃 추출물은 피부 미백

활성을 가지므로, 피부 미백용으로 유용하게 사용될 수 있다.

- [0016] 또한, 하기 본 명세서 구체적 실시예에서 증명되는 바와 같이, 애기달맞이꽃 추출물은 피부 섬유아세포에서 콜라겐의 합성을 촉진하고 세포외 콜라겐 분해에 관여하는 MMP(matrix metalloproteinase)-2의 활성을 억제하는 동시에 MMP-1의 발현도 억제함으로써 결과적으로 피부에서 콜라겐의 생성을 촉진한다. 따라서, 본 발명의 애기달맞이꽃 추출물은 피부의 주름을 개선하며 피부 노화를 방지하는 활성을 가지므로, 피부 노화 방지 용도로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 화장품학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다.
- [0018] 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 클린징, 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.
- [0019] 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.
- [0020] 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.
- [0021] 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.
- [0022] 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.
- [0023] 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.
- [0024] 본 발명의 화장품학적 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서 애기달맞이꽃 추출물과 담체 성분 이외에, 화장품학적 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 애기달맞이꽃(*Oenothera laciniata* Hill) 추출물은 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 치료 또는 예방 용도의 약제학적 조성물의 활성성분으로 사용될 수 있다.
- [0026] 상기 용어 "멜라닌 색소의 과다침착"은 피부 또는 손발톱의 특정 부위에서 멜라닌의 과도한 증가에 의해 다른 부위에 비해 검게 또는 어둡게 되는 현상을 의미한다. 상기 멜라닌 색소 과다침착 질환은 예를 들어, 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 또는 일광흑색증(solar lentigines) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 이러한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는

담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [0028] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.0001-100 mg/kg(체중)이다.
- [0029] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약제학적 조성물이 멜라닌 색소 과다 침착으로 인한 질환을 치료 또는 예방을 위해 적용되는 점을 감안하면, 본 발명 조성물은 피부에 국소적으로 도포되어 투여되는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 약제학적 조성물은 피부외용 제형을 갖는다. 피부외용 제형은 특별히 한정되지 않으며 바람직하게는 파우더, 젤, 연고, 크림, 로션, 액제 또는 에어로졸 제형이다.
- [0034] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다.
- [0035] (i) 본 발명은 애기달맞이꽃 추출물의 피부 미백, 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선에 관한 새로운 용도를 제공한다.
- [0036] (ii) 애기달맞이꽃 추출물은 멜라닌을 합성하는 Melan-a 세포에서 멜라닌의 합성에 관여하는 티로시나아제, TRP-1, TRP-2 및 MITF-M의 발현을 억제함으로써 멜라닌 합성을 감소시키는 활성을 보유한다.
- [0037] (iii) 또한 애기달맞이꽃 추출물은 인간 피부 섬유아세포에서 콜라겐을 합성을 촉진하며, 콜라겐 분해에 관련된 MMP-1 및 MMP-2의 발현 또는 활성을 억제한다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명은 애기달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백, 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선과 같은 피부 상태 개선용 조성물을 제공한다. 본 발명의 애기달맞이꽃 추출물은 Melan-a 세포에서 멜라닌의 합성을 억제하며, 인간 피부 섬유아세포에서 콜라겐을 합성을 촉진하는 활성을 보유한다. 따라서, 본 발명의 애기달맞이꽃 추출물은 피부 미백제, 멜라닌 색소 과다 침착 질환 치료제 또는 피부 노화 및 피부 주름 방지제의 활성성분으로 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 애기달맞이꽃(*Oenothera lacinata* Hill) 메탄을 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다.
- 도 2는 애기달맞이꽃 메탄을 추출물의 전자공여능을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. BHT: Dibutylated hydroxytoluene; OLME: 애기달맞이꽃 메탄을 추출물.
- 도 3은 애기달맞이꽃 메탄을 추출물의 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. OLME: 애기달맞이꽃 메탄을 추출물.
- 도 4는 애기달맞이꽃 메탄을 추출물의 SOD(Superoxide dismutase)-유사 활성을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. OLME: 애기달맞이꽃 메탄을 추출물.
- 도 5는 다양한 농도의 알부틴(arbutin)으로 처리한 Melan-a 세포의 성장능을 측정한 결과이다. 측정값은 3회

실험의 평균±SD이다. C: 대조군

도 6은 다양한 농도의 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 처리한 Melan-a 세포의 성장능을 보여준다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. C: 대조군, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물.

도 7은 알부틴으로 처리된 Melan-a 세포의 형태를 관찰한 결과이다(X200). C: 시료 처리하지 않음, E1: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 알부틴으로 처리, E2: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 알부틴으로 처리, E3: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 알부틴으로 처리, E4: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 알부틴으로 처리.

도 8은 애기달맞이꽃 메탄올 추출물로 처리된 Melan-a 세포의 형태를 관찰한 결과이다(X200). C: 시료 처리하지 않음, E1: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 애기달맞이꽃 메탄올 추출물로 처리, E2: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 애기달맞이꽃 메탄올 추출물로 처리, E3: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 애기달맞이꽃 메탄올 추출물로 처리, E4: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 애기달맞이꽃 메탄올 추출물로 처리.

도 9는 Melan-a 세포에서 멜라닌 합성능에 미치는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 억제 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. C: 대조군, PC: 알부틴, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물. 상이한 위첨자의 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다($p<0.05$).

도 10은 Melan-a 세포에서 세포내 티로시나아제 활성에 미치는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 억제 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. C: 대조군, PC: 알부틴, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물. 상이한 위첨자의 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다($p<0.05$).

도 11은 Melan-a 세포에서 세포 추출물내 티로시나아제 활성에 미치는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 억제 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. C: 대조군, PC: 알부틴, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물. 상이한 위첨자의 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다($p<0.05$).

도 12는 Melan-a 세포에서 티로시나아제 mRNA의 발현에 미치는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 억제 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. C: 대조군, PC: 알부틴, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물. 상이한 위첨자의 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다($p<0.05$).

도 13은 Melan-a 세포에서 TRP-1 mRNA의 발현에 미치는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 억제 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. C: 대조군, PC: 알부틴, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물. 상이한 위첨자의 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다($p<0.05$).

도 14는 Melan-a 세포에서 TRP-2 mRNA의 발현에 미치는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 억제 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. C: 대조군, PC: 알부틴, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물. 상이한 위첨자의 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다($p<0.05$).

도 15는 Melan-a 세포에서 MITF-M mRNA의 발현에 미치는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 억제 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. C: 대조군, PC: 알부틴, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물. 상이한 위첨자의 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다($p<0.05$).

도 16은 다양한 농도의 아스코르브산으로 처리한 인간 피부 섬유아세포의 성장능을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. C: 대조군, AA: 아스코르브산.

도 17은 다양한 농도의 애기달맞이꽃 메탄올 추출물로 처리한 인간 피부 섬유아세포의 성장능을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD이다. C: 대조군, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물.

도 18은 아스코르브산(AA)으로 처리한 인간 피부 섬유아세포의 형태를 관찰한 결과이다(X 200). C: 대조군, E1: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AA, E2: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AA, E3: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AA, E4: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AA.

도 19는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물로 처리한 인간 피부 섬유아세포의 형태를 관찰한 결과이다(X 200). C: 대조군, E1: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OLME, E2: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OLME, E3: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OLME, E4: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OLME.

도 20은 배양된 인간 피부 섬유아세포에서 콜라겐 생성에 미치는 아스코르브산의 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD 이다. V: 부형제, PC: TGF-β1 5 ng/ml, AA: 아스코르브산. 상이한 위첨자의 측정값은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다(p<0.05).

도 21은 배양된 인간 피부 섬유아세포에서 콜라겐 생성에 미치는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD 이다. V: 부형제, PC: TGF-β1 5 ng/ml, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물. 상이한 위첨자의 측정값은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다(p<0.05).

도 22는 배양된 인간 피부 섬유아세포에서 MMP-2 활성화에 미치는 아스코르브산의 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD 이다. V: 부형제, C: 대조군, AA: 아스코르브산. 상이한 위첨자의 측정값은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다(p<0.05).

도 23은 배양된 인간 피부 섬유아세포에서 MMP-2 활성화에 미치는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD 이다. V: 부형제, C: 대조군, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물. 상이한 위첨자의 측정값은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다(p<0.05).

도 24는 배양된 인간 피부 섬유아세포에서 MMP-1 mRNA 발현에 미치는 아스코르브산의 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD 이다. V: 부형제, C: 대조군, AA: 아스코르브산. 상이한 위첨자의 측정값은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다(p<0.05).

도 25는 배양된 인간 피부 섬유아세포에서 MMP-1 mRNA 발현에 미치는 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 영향을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD 이다. V: 부형제, C: 대조군, OLME: 애기달맞이꽃 메탄올 추출물. 상이한 위첨자의 측정값은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 통계적으로 유의성을 갖는다(p<0.05).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

실시예

실험재료 및 실험방법

1. 시약 및 기기

DMSO (Dimethyl sulfoxide), BHT (2,6-di-tert-butylate hydroxytoluene), L-DOPA(3,4-dihydroxy-L-phenyl-alanine), DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), ABTS (2,2'-Azino-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonolialid), 알부틴(Arbutin), 탄닌산(tannic acid), L-티로신(L-tyrosine), 아스코르브산(ascorbic acid), Folin-ciocalteu's phenol reagent, MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide], MITF(microphthalmia-associated transcription factor-M), TRP-1 및 TRP-2는 Amersham Company (Bucks, UK)으로부터 구입하였다. DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), FBS (fetal bovine serum) 및 페니실린/스트렙토마이신은 Lonza Company (Cascade, USA)으로부터 구입하였다. TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 및 역상현미경 (CKX41, Olympus, Japan)을 세포성장 관측에 사용하였다. CO2 인큐베이터(MCO-15AC, SANYO electric, Japan)는 세포 배양에 사용하였다.

2. 시료

한국식물추출물은행에서 분양 받은 애기달맞이꽃 메탄올 추출물(*Oenothera lacinata* Hill methanol extract)을 DMSO에 녹여서 사용하였으며, 상기 애기달맞이꽃의 메탄올 추출물은 애기달맞이꽃의 잎, 줄기 및 뿌리를 포함하는 전초로부터 추출하여 얻는 추출물이다.

[0047] **3. 항산화능 실험**

[0048] **(1) 총 폴리페놀 함량**

[0049] 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin and Denis 1912)에 의해 비색 정량하였다. 적절한 배율로 희석한 시료 1ml에 folin-reagent 1ml를 가하여 3분간 정치한 후 10% Na₂CO₃ 1ml를 혼합하고 1시간 실온에서 방치하여 760nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량 곡선은 탄닌산(tannic acid)를 이용하여 작성하였다.

[0050] **(2) 총 플라보노이드 함량**

[0051] 총 플라보노이드 함량은 Davis 변법(AOAC 1995)을 이용하였다. 적절한 배율로 희석한 시료 용액 1ml에 디에틸렌글리콜 시약(diethylene glycol reagent) 10ml 및 1N NaOH 1ml를 가하고 잘 혼합한 다음 37℃ 수욕상에서 1시간 반응시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 루틴(rutin)을 이용하여 작성하였다.

[0052] **(3) 전자공여능**

[0053] 전자공여능은 Blois의 방법(Blois 1958)으로 측정하였다. 시료용액을 100, 500, 1,000µg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 제조하고 1ml를 테스트 튜브에 취하여 4×10⁻⁴ M의 DPPH 용액 4ml를 가하여 60℃ 수욕상에서 10초간 진탕하고 실온에서 20분 동안 방치한 후에 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물 무 첨가구에는 시료 대신 메탄올 1ml를 첨가하여 동일하게 실험하고 추출물 첨가구에 대한 흡광도의 감소비율로 전자공여능을 나타내었다. 양성 대조군으로 합성 항산화제인 BHT를 동일한 방법으로 실험하였으며, 다음 식으로 전자공여능(%)을 구하였다.

[0054] 전자공여능(%) = [1 - (추출물 첨가구의 흡광도 / 추출물 무 첨가구(대조구)의 흡광도)] × 100

[0055] **(4) ABTS 라디칼 소거능**

[0056] ABTS 라디칼을 사용한 항산화능 측정은 ABTS+ 양이온 탈색 분석방법에 따라 행하였다(Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. 1999. Free Radical Biology & Medicine 26: 1231-1237). 7 mM의 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.4 mM의 potassium peroxodisulfate를 혼합한 후 상온의 암실에서 12시간 동안 두어 ABTS+를 제조한 후, 이를 734 nm에서의 흡광도 0.7(±0.02)이 되도록 에탄올을 사용하여 희석하였다. 시료를 96-웰 플레이트에서 100 µg/ml의 농도로 제조하고, 상기 희석한 100 µg/ml ABTS를 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 상온의 암실에서 7 분간 두고, 734 nm에서의 흡광도를 측정하여 억제 백분율을 측정하였다.

[0057] **(5) SOD (Superoxide dismutase) 유사 활성**

[0058] SOD-유사 활성은 Marklund-Marklund 방법(Marklund A. and Marklund G. 1974)에 따라 측정하였다. 0.2 ml의 상이한 농도의 추출물과 2.6 ml의 tris-HCl 완충액 (50 mM tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 용액을 25℃에서 10분간 반응시켰다. 이어서, 0.1 ml의 1 M HCl을 가하고, 반응을 중지시켰다. 용액에서 산화된 피로갈롤의 양을 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 측정하였다.

[0059] SOD 유사 활성(%) = [1 - (시료첨가구의 흡광도 / 대조구의 흡광도)] × 100

[0060] **4. 미백활성에 대한 실험**

[0061] **(1) 세포주 및 배양**

[0062] C57BL/6 마우스에서 유래한 불멸화 세포주인 Melan-a 세포는 Dr. Bennett(Cancer Research Center, London, England)으로부터 분양 받아 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% PS(penicillin/streptomycin), 200nM TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)가 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37℃, 10% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다.

[0063] (2) MTT 분석

[0064] MTT 분석법은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 시약이 세포내로 흡수된 후 미토콘드리아의 석시네이트 디하이드로게나아제(succinate dehydrogenase)에 의해 포르마잔(formazan)을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하는 것으로써 세포의 성장율을 측정하는 대표적인 방법이다. Melan-a 세포를 10% FBS, 1% P/S, 200nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 동안 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 96-웰 플레이트에 적정세포수(0.5×10^4 세포/웰)로 분주하고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양한 다음 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 농도별(25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)로 희석시켜 200 μl 씩 넣은 후 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 배양하였다. 플레이트를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 PBS로 1회 세정하고 MTT가 0.5mg/ml 함유된 배지를 200 μl 씩 넣은 후 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 3시간 배양하였다. 플레이트를 1,000rpm에서 10분간 원심분리하여 세포가 바닥에 가라앉게 한 다음 배지를 버리고 DMSO를 200 μl 씩 넣고 플레이트 셰이커에서 15분간 세포를 녹여낸 다음 ELISA 리더 (reader)로 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 성장률은 다음 식에 의해 산출하였다.

[0065] 세포성장률(%) = (시료 첨가구의 흡광도/시료 무첨가구의 흡광도) X 100

[0066] (3) Melan-a 세포의 형태학적 관찰

[0067] 애기달맞이꽃 추출물을 10, 50, 100, 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 Melan-a 세포에 처리한 후 Melan-a 세포의 형태를 관찰하고, 세포를 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72 시간동안 배양하였다. 배지를 교환하고 세포를 역상 현미경 하에서 관찰하였다.

[0068] (4) 멜라닌 함량 측정

[0069] Melan-a 세포를 10% FBS, 1% P/S, 200nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72시간 동안 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 96-웰 플레이트에 적정세포수(2×10^4 세포/웰)로 분주하고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양한 다음 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 농도별(12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 희석시켜 500 μl 씩 넣어 1차 물질 처치를 가하고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72 시간 배양한 후 다시 2차 물질 처치와 72시간 배양한 후 1N NaOH 용액으로 멜라닌을 용해시켜 490nm에서 흡광도를 측정하였고, 양성대조군은 알부틴을 사용하였다. 멜라닌 정량은 다음 식에 의해 산출하였다.

[0070] 멜라닌 양(%) = (시료 첨가구의 흡광도/시료 무첨가구의 흡광도) X 100

[0071] (5) 세포내 티로시나아제 활성 측정

[0072] Melan-a 세포를 10% FBS와 1% P/S, 200nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72 시간 동안 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 둥근 60 ϕ 세포배양 디쉬에 적정 세포수(4×10^5 세포/웰)로 분주하고, 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양한 다음 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 농도별(12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 희석시켜 5ml씩 넣고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72시간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 얼음 위에 얹은 채로 1% 트리톤 X-100 용액을 200 μl 씩 넣어 용해한 후 에펜도르프-튜브에 옮겨 담고 얼음에 박아둔 채로 10분 간격으로 볼텍스(vortex)하면서 1시간 가량 방치한 다음, 4℃, 14,000rpm에서 20분간 원심분리한 상층액을 티로시나아제 활성 측정 용액으로 사용하였고, 단백질 분석(protein assay) 용액(Bio Rad, USA)으로 흡광도를 측정, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 단백질 40 μg 을 포함한 세포 추출물과 시험 물질을 총 100 μl 가 되게 섞은 후 L-DOPA를 100 μl 씩 넣고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에 넣고 60분 후에 490nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 양성대조군은 알부틴을 사용하였다.

[0073] (6) 세포-추출물내에서 티로시나아제 활성 측정

[0074] Melan-a 세포를 10% FBS와 1% P/S, 200nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72시간 동안 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 둥근 60φ 세포배양디쉬에 적정세포수 (4X10⁵ 세포/웰)로 분주하고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72시간 배양한 다음 PBS로 세척 후 1% 트리톤 X-100을 200μl 넣어 용해하였다. 이어서, 에펜도르프-튜브에 옮겨 담고 얼음에 놓아 둔채로 10분 간격으로 볼텍스하면서 1시간 가량 방치한 후, 4℃, 14,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 50μl, 0.1M phosphate buffer(pH 6.8) 49μl, 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 농도별(12.5, 25, 50, 100μg/ml)로 1μl를 섞은 후 1시간 동안 방치하였다. 여기에 L-DOPA를 100μl씩 넣고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에 넣고 490nm에서 60분 후에 흡광도의 변화를 측정하였고, 양성대조군은 알부틴을 사용하였다.

[0075] (7) 역전사-중합효소연쇄반응 분석

[0076] 제조자에 의해 제공된 지시서에 따라 Trizol-Reagent (Invitrogen, CA)을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 총 RNA의 5 μg을, 8 μl의 M-MLV RT (Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), 5X 버퍼, 3 μl의 10 mM dNTPs, 0.45 μl의 10,000 U RNase 억제제, 0.3 μl의 50,000 U M-MLV 역전사 효소(Promega, USA), 및 1.5μl의 50 pM/μl oligo dT (Bioneer, Korea)를 포함한 총 40 μl 부피의 반응액을 사용하여 역전사하였다. 단일가닥 cDNA는 4 μl의 5 X green Go Taq flexi 버퍼, 0.4 μl의 10 mM dNTPs, 0.1μl의 500 U Taq 중합효소, 1.2 μl의 25 mM MgCl₂ (Promega, USA), 및 20 pM/μl 농도의 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, MITF-M 또는 β-액틴의 특이적 센스 및 안티-센스 프라이머 0.4 μl를 사용한 PCR에 의해 증폭하였다. PCR에서 사용된 프라이머는 다음과 같았다: 티로시나아제 : 정방향 : 5'-CAT TTT TGA TTT GAG TGT CT-3'(서열번호 1), 역방향 : 5'-TGT GGT AGT CGT CTT TGT CC-3'(서열번호 2); TRP-1 : 정방향 : 5'-GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC-3'(서열번호 3), 역방향 : 5'-AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT-3'(서열번호 4); TRP-2 : 정방향 : 5'-GGA TGA CCG TGA GCA ATG GCC-3'(서열번호 5), 역방향 : 5'-CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC-3'(서열번호 6); MITF-M : 정방향 : 5'-TAC AGA AAG TAG AGG GAG GAG GAC TAA G-3'(서열번호 7), 역방향 : 5'-CAC AGT TGG AGT TAA GAG TGA GCA TAG CC-3'(서열번호 8); β-액틴 : 정방향 : 5'-ACC GTG AAA AGA TGA CCC AG-3'(서열번호 9), 역방향 : 5'-TAC GGA TGT CAA CGT CAC AC-3'(서열번호 10). 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, MITF-M 및 β-액틴에 대한 PCR 산물의 예상 크기는 각각 1192, 268, 1044, 326 및 528 bp이다.

[0077] PCR의 반응조건은 다음과 같았다: 티로시나아제 및 TRP-1 : 94℃에서 60초간 변성, 56℃에서 60초간 어닐링, 및 72℃에서 60초간 연장의 한 사이클을 28 사이클; TRP-2 : 94℃에서 60초간 변성, 64℃에서 60초간 어닐링, 및 72℃에서 60초간 연장의 한 사이클을 28 사이클; MITF-M : 94℃에서 30초간 변성, 54℃에서 30초간 어닐링, 및 72℃에서 30초간 연장의 한 사이클을 30 사이클; β-액틴 : 94℃에서 30초간 변성, 51℃에서 30초간 어닐링, 및 72℃에서 60초간 연장의 한 사이클을 30 사이클. PCR 산물은 1.2% 아가로스 겔상에서 분석하였다. β-액틴은 티로시나아제, TRP-1, TRP-2 및 MITF-M의 상대 발현량을 평가하기 위한 내부대조군으로 사용하였다.

[0078] 5. 항노화 활성에 대한 실험

[0079] (1) 세포주 및 배양

[0080] 인간 피부 섬유아세포(아모레 퍼시픽)를 계대배양하였다. 세포는 10% FBS (Lonza, USA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S) (Lonza, USA)이 첨가된 DMEM (Lonza, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0081] (2) UVA 조사 및 시료 처리

[0082] 인간 피부 섬유아세포는 200 nm에서 80%의 세포밀집(confluency)를 형성하기전 까지 배양 디쉬내에서 배양하였다. 배지를 제거한 후에, 세포들을 PBS로 세정하였다. 시료를 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지내의 세포(1.5 X

10^5 세포/ml)에 처리하고, 6.3 J/cm^2 UVA (Sankyo Denki, Japan)으로 조사하고, 24 시간 동안 배양하였다.

[0083] (3) MTT 분석

[0084] 인간 피부 섬유아세포들을 96-웰 플레이트(0.5×10^4 세포/웰)에 분주하고, 37°C 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. $200 \mu\text{l}$ 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 phenol red 무첨가 DMEM 배지로 다양한 농도 (10, 50, 100, 및 $200 \mu\text{g/ml}$)로 희석하여 각 웰에 첨가하고, 37°C 5% CO_2 인큐베이터에서 48시간 동안 추가 배양하였다. 여기에 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 의 MTT가 포함된 배지를 첨가하고, 37°C 5% CO_2 인큐베이터에서 3시간 동안 추가 배양하였다. 플레이트를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포가 바닥에 가라앉게 한 다음 배지를 버리고 DMSO를 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣고 플레이트 셰이커에서 15분간 세포를 녹여내었다. 이어서, ELISA 리더(reader)를 사용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생장률은 다음 식에 의해 산출하였다.

[0085] 세포 생존능(%) = (시료 첨가구의 흡광도 / 시료무첨가구의 흡광도) $\times$ 100

[0086] (4) 인간 피부 섬유아세포의 형태 관찰

[0087] 인간 피부 섬유아세포의 형태를 관찰하기 위해, 먼저 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 10, 50, 100, 및 $200 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 인간 피부 섬유아세포에 처리하고, 37°C 5% CO_2 인큐베이터에서 72시간 동안 배양하였다. 이어서, 배지를 교환하고 역상 현미경하에서 세포를 관찰하였다.

[0088] (5) Type-I 프로콜라겐 합성능

[0089] 인간 피부 섬유아세포에 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 6.25, 12.5, 25, $50 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후, 상등액을 분리하고, EIA 키트에 의해 분석하였다(Takara, Japan). 450 nm에서 흡광도를 측정하고, type-I 프로콜라겐 단백질 수율을 산출하였다(Son et al., 2007. Biological and Pharmaceutical Bulletin 30: 1395-1399). TGF- β 1 (5 ng/ml)을 양성 대조군(positive control)으로 사용하였다. 인간 피부 섬유아세포는 10% FBS 및 1% P/S를 포함하는 DMEM 배지에서 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하여 안정화시킨 후에 실험에 사용하였다. 이 세포는 적합한 세포수(0.7×10^5 세포/웰)가 되도록 $500 \mu\text{l}$ 씩 12-웰 플레이트에 분주하고, 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세정한 후 1% P/S를 포함하고 phenol red 무첨가 DMEM 배지(1 ml)에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. PBS 및 1% P/S으로 1회 세정한 후에, 6.25, 12.5, 25, $50 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석된 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 각 1.5 ml 씩 phenol red 무첨가 0.1% DMSO 첨가 DMEM 배지에 첨가하고, 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 48시간 배양하였다. 플레이트를 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하여 프로콜라겐(procollagen) 단백질 정량 분석에 사용하였다. $100 \mu\text{l}$ 의 항체-컨쥬 게이트 용액과 4배 희석한 $20 \mu\text{l}$ 의 시료를 96-웰 EIA 키트에 첨가하고, 키트를 포일(foil)로 감싸 37°C 에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. PBS으로 4회 세정한 후에, 각 $100 \mu\text{l}$ 기질용액을 첨가하여 포일에 감싼 키트를 상온에서 15분간 두었다. $100 \mu\text{l}$ 의 정지 용액($1\text{N H}_2\text{SO}_4$)을 가하고 키트를 포일에 감싸, 450 nm 파장에서 흡광도를 ELISA 리더기로 3회 측정하였다. Lowry (Lowry 1951) 방법에 따라 프로콜라겐 단백질 수율로부터 단백질 함량을 조정하기 위해, 표준 물질로서 BSA (bovine serum albumin)을 사용하여 단백질 함량을 정량하였다. $80 \mu\text{l}$ 세포 용해 버퍼 (CellLytic™ B Cell Lysis Reagent, Sigma, USA)를 플레이트에 첨가하고, 배지를 제거한 후에, -20°C 냉동고에서 동결과 용해를 3회 반복하고, 시료를 1:10 비율로 희석하여 단백질의 함량을 정량하였다. 측정 곡선은 단계 별로 희석한 표준용액을 사용하여 제작하였다.

[0091] (6) MMP-2 활성

[0092] 동일량의 단백질을 로딩하기 위해, 세포 배양액을 회수한 후, 시료의 동일한 부피의 샘플 버퍼(2X)와 혼합하고, 10% 지모그렘 젤(Invitrogen, USA)상으로 로딩하였다. 단백질을 전기영동에 의해 분리하고, Novex zymogram renaturing 버퍼(1X)와 30 분간 반응시켰다. 버퍼를 Novex zymogram developing 버퍼(1X)로 교환한 후 1시간

동안 상온에서 반응시키고, 새로운 developing 버퍼으로 교환한 후 24 시간 동안 37℃에서 반응시켰다. Simply blue safe stain (Invitrogen, USA)으로 염색한 후에, 멸균 증류수로 세정하고 MMP-2 활성으로서 흰색 밴드를 확인하고, 이미지 분석기를 사용하여 정량하였다.

[0093] (7) 역전사-중합효소 연쇄반응 분석

[0094] 제조자의 지시에 따라 1 ml Trizol-Reagent (Invitrogen, CA)으로 배양한 인간 피부 섬유아세포를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 5 µg의 총 RNA를 8 µl의 M-MLV RT (Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), 5X 버퍼, 3 µl의 10 mM dNTPs, 0.45 µl의 10,000 U RNase 억제제, 0.3 µl의 50,000 U M-MLV 역전사효소 (Promega, USA), 및 1.5 µl의 50 pM/µl 올리고 dT (Bioneer, Korea)을 포함하는 40 µl의 반응액을 사용하여 역전사하였다. 단일가닥 cDNA는 4 µl의 5 X green Go Taq flexi 버퍼, 0.4 µl의 10 mM dNTPs, 0.1 µl의 500 U Taq 중합효소, 1.2 µl의 25 mM MgCl₂ (Promega, USA), 및 20 pM/µl 농도의 MMP-1 또는 β-액틴의 특이적 센스 및 안티-센스 프라이머 0.4 µl를 사용한 PCR 반응에 의해 증폭하였다. PCR 반응에 사용한 프라이머의 염기서열은 다음과 같다 : MMP-1 : 정방향 : 5'-AAA GGG AAT AAG TAC TGG GC-3' (서열번호 11), 역방향 : 5'-AAT TCC AGG AAA GTC ATG TG-3' (서열번호 12); β-액틴 : 정방향 : 5'-ATG CAG AAG GAG ATC ACT GC-3' (서열번호 13), 역방향 : 5'-CTG CGC AAG TTA GGT TTT GT-3' (서열번호 14). MMP-1 및 β-액틴에 대한 PCR 산물의 예상 크기는 각각 237bp 및 248bp이다. MMP-1 및 β-액틴에 대해 사용한 PCR 조건은 94℃에서 60초간의 변성, 50℃에서 60초간의 어닐링, 및 72℃에서 60초간의 연장으로 이루어지는 하나의 사이클을 28 사이클 행하였다. PCR 산물을 1.2% 아가로스겔상에서 분석하였다. β-액틴은 MMP-1의 상대 발현량을 평가하기 위한 내부 대조군으로 사용하였다.

[0095] 6. 통계 분석

[0096] SPSS(version 17.0) 통계프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 이용하여 동질성을 분석하였고, 각 군 간의 비교는 Duncan's multiple range test로 사후 분석을 실시하였다. 통계학적인 유의성 검증은 α = 0.05에서 실시하였다. P<0.05를 통계학적으로 유의성이 있다고 간주하였다.

[0097] 실험결과

[0098] 1. 항산화능 측정 결과

[0099] (1) 총 폴리페놀 함량

[0100] 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 66.3mg/g이었다(도 1 참조).

[0101] (2) 총 플라보노이드 함량

[0102] 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 19.0mg/g이었다(도 1 참조).

[0103] (3) 전자공여능

[0104] 애기달맞이꽃 메탄올 추출물과 양성대조군인 BHT 모두 농도에 따른 정적인 (+) 양-반응 관계를 나타냈으며, 500 및 1,000 µg/ml에서 애기달맞이꽃 메탄올 추출물은 94.5, 94.3%, BHT는 83.6, 94.7%이었다(도 2 참조).

[0105] (4) ABTS 라디칼 소거능

[0106] 양성대조군인 아스코르브산의 ABTS 라디칼 소거능은 500 및 1,000 µg/ml의 농도에서 각각 100.2% 및 103.7%으로 나타났다. 반면에, 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 500 및 1,000 µg/ml의 농도에서 각각 95.6% 및 97.9% 이었다. 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거능이 아스코르브산 보다 약간 높았다(도 3).

[0107] (5) SOD (Superoxide dismutase)-유사 활성

[0108] 양성대조군으로 사용한 아스코르브산의 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서의 SOD-유사 활성은 각각 86.4% 및 96.5% 이었다. 반면에, 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 SOD-유사 활성은 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 63.6% 및 64.4% 이었다. 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 SOD-유사 활성은 아스코르브산 보다 약간 낮았다(도 4).

[0109] 2. 미백활성에 대한 실험 결과

[0110] (1) MTT 분석 결과

[0111] 알부틴은 25 내지 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포 생존능 감소 활성을 보이지 않았고 98% 이상의 생존능을 보였다. Melan-a 세포에 알부틴 적용에 대한 최대허용수준(Maximum permissible level, MPL)은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이였다(도 5 참조). 애기달맞이꽃 메탄올 추출물은 25 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포 생존능을 감소시키지 않고 89% 이상의 생존능을 나타내었으나, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 세포 생존능이 53%으로 감소하였다. Melan-a 세포에 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 적용시의 최대허용수준(MPL)은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다(도 6 참조).

[0112] (2) Melan-a 세포의 형태학적 관찰

[0113] 알부틴을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 Melan-a 세포에 처리한 결과 대조군과 비교하여 수상돌기 및 멜라닌 침착의 감소는 관찰되지 않았다(도 7 참조). 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 Melan-a 세포에 처리한 결과 대조군과 비교하여 수상돌기 및 멜라닌 침착이 감소되었다(도 8 참조).

[0114] (3) 멜라닌 합성에 대한 저해능

[0115] 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 각각 12.7, 20.4, 35.5, 41.6% 유의하게($p<0.05$) 멜라닌 함량이 낮았다. 양성 대조군인 알부틴을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 처리한 경우 대조군과 비교하여 멜라닌 함량이 14.2% 유의하게($p<0.05$) 낮았다. 애기달맞이꽃 메탄올 추출물은 알부틴과 비교할 때 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의하게($p<0.05$) 멜라닌 함량이 낮았다(도 9 참조).

[0116] (4) 세포내 티로시나아제 활성에 대한 저해능

[0117] 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 애기달맞이꽃 메탄올 추출물은 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 티로시나아제 활성이 농도 의존적 방식으로 각각 3.8%, 11.9%($p<0.05$), 22.6%($p<0.05$), 54.4%($p<0.05$) 낮았다. 양성 대조군인 알부틴을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 티로시나아제 활성이 12.6% 유의하게($p<0.05$) 낮게 나타났다. 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 알부틴과 비교할 때 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 티로시나아제 활성이 유의하게($p<0.05$) 낮게 나타났다(도 10 참조).

[0118] (5) 세포추출물내의 티로시나아제 활성에 대한 저해능

[0119] 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 애기달맞이꽃 메탄올 추출물은 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 티로시나아제 활성이 농도 의존적 방식으로 각각 9.3%, 17.2%, 26.0%, 및 35.9% 낮게 나타났다. 양성 대조군인 알부틴을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 티로시나아제 활성이 대조군과 비교하여 47.4% 낮게 나타났다. 알부틴과 비교할 때 애기달맞이꽃 메탄올 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리에서 티로시나아제 활성이 유의하게($p<0.05$) 높게 나타났다(도 11 참조).

[0120] (6) 티로시나아제 mRNA 발현에 미치는 영향

[0121] 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 애기달맞이꽃 메탄올 추출물은 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처

리한 경우 티로시나아제 mRNA 발현을 유의성 있게($p<0.05$) 농도 의존적 방식으로 각각 27.5%, 53.8%, 및 57.1% 감소시켰다. 양성 대조군인 알부틴을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 대조군과 비교하여 티로시나아제 mRNA 발현이 유의성 있게($p<0.05$) 24.2% 낮게 나타났다. 알부틴과 비교할 때 애기달맞이꽃 메탄을 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리에서 티로시나아제 mRNA 발현이 유의성 있게($p<0.05$) 낮게 나타났다(도 12 참조).

[0122] (7) TRP-1 mRNA 발현에 미치는 영향

[0123] 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 애기달맞이꽃 메탄을 추출물은 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 TRP-1 mRNA 발현을 농도 의존적 방식으로 유의성 있게($p<0.05$) 각각 18.4%, 29.6%, 및 67.3% 감소시켰다. 양성 대조군인 알부틴을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 대조군과 비교하여 TRP-1 mRNA 발현이 유의성 있게($p<0.05$) 42.9% 감소하였다. 알부틴과 비교할 때 애기달맞이꽃 메탄을 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리에서 TRP-1 mRNA 발현이 유의성 있게($p<0.05$) 낮게 나타났다(도 13 참조).

[0124] (8) TRP-2 mRNA 발현에 미치는 영향

[0125] 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 애기달맞이꽃 메탄을 추출물은 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 TRP-2 mRNA 발현을 농도 의존적 방식으로 유의성 있게($p<0.05$) 각각 97.0%, 98.0% 및 99.0% 감소시켰다. 양성 대조군인 알부틴을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우에도 대조군과 비교하여 TRP-2 mRNA 발현이 유의성 있게($p<0.05$) 48.5% 감소하였다. 알부틴과 비교할 때 애기달맞이꽃 메탄을 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리에서 TRP-2 mRNA 발현이 유의성 있게($p<0.05$) 낮게 나타났다(도 14 참조).

[0126] (9) MITF-M mRNA 발현에 미치는 영향

[0127] 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 애기달맞이꽃 메탄을 추출물을 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 MITF-M mRNA 발현이 14.5% 증가하였다. 반면에, 애기달맞이꽃 메탄을 추출물을 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 MITF-M mRNA 발현이 유의성 있게($p<0.05$) 각각 62.5% 및 77.0% 감소하였다. 양성 대조군인 알부틴을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우에 대조군과 비교하여 MITF-M mRNA 발현이 6% 감소하였다. 알부틴과 비교할 때 애기달맞이꽃 메탄을 추출물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하면 MITF-M mRNA 발현이 유의성 있게($p<0.05$) 낮게 나타났다(도 15 참조).

[0128] 3. 항-노화 활성에 대한 실험 결과

[0129] (1) MTT 분석

[0130] 아스코르브산은 최대 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 98%의 세포 생존율을 보여 세포의 생존능을 감소시키지 않았으나, 세포 생존능은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 65%로 감소하였다. 인간 피부 섬유아세포에 아스코르브산 처리의 최대허용수준(Maximum permissible level, MPL)은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이였다. 애기달맞이꽃 메탄을 추출물은 최대 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 세포 생존능을 감소시키지 않고 120% 이상의 생존능을 나타내었으며, 인간 피부 섬유아세포에 대한 애기달맞이꽃 메탄을 추출물의 적용시의 최대허용수준(MPL)은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이였다(도 17 참조).

[0131] (2) 인간 피부 섬유아세포에 대한 형태 관찰

[0132] 아스코르브산을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 인간 피부 섬유아세포에 처리한 경우 세포가 사멸됨이 관찰되었다(도 18). 애기달맞이꽃 메탄을 추출물을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 처리한 경우에도 세포는 사멸되지 않았다(도 19).

[0133] (3) Type-I 프로콜라겐 합성능

[0134] 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 아스코르브산을 6.25, 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 유의성 있게($p<0.05$) 콜라겐의 합성이 농도 의존적 방식으로 각각 49.0, 86.7, 110.3 및 119.7% 증가하였다(도 20). 대조군과 비교할 때, 애기달맞이꽃 메탄을 추출물을 6.25, 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한

경우, 역시 유의성 있게($p<0.05$) 농도 의존적 방식으로 콜라겐의 합성을 각각 38.7, 74.3, 111.4 및 113.0% 증가시켰다. 양성대조군인 TGF- β 1을 5 ng/ml의 농도로 처리한 경우에도 대조군과 비교하여 유의성 있게($p<0.05$) 콜라겐의 합성을 176.2% 증가시켰다(도 21 참조). 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 Type-I 프로콜라겐 합성능은 아스코르브산과 유사한 수준이었다.

[0135] (4) MMP-2 활성화에 미치는 영향

[0136] 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 아스코르브산을 6.25, 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 경우 유의성 있게($p<0.05$) MMP-2 활성이 각각 20.0, 20.3, 21.0 및 40.3% 감소하였다(도 22 참조). 대조군과 비교할 때, 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 6.25, 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 경우, 역시 유의성 있게($p<0.05$) 농도 의존적 방식으로 MMP-2 활성이 각각 27.6, 37.1, 76.3 및 93.9% 감소되었다(도 23 참조). 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 MMP-2 활성화는 아스코르브산 보다 낮은 값을 나타내었다.

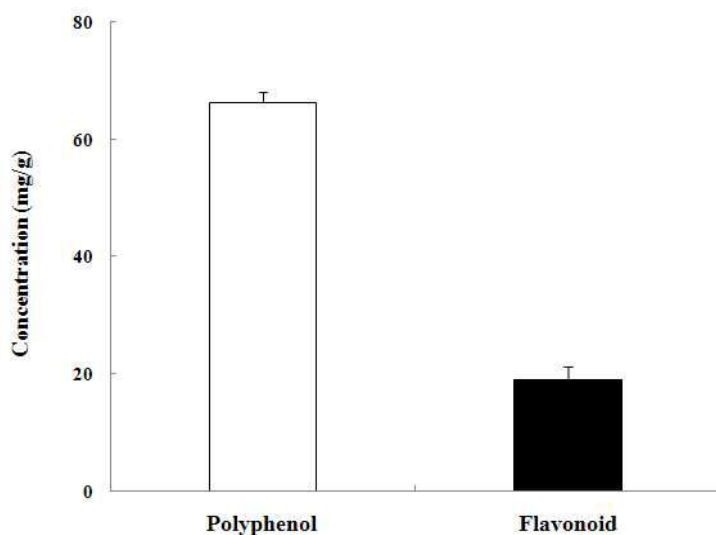
[0137] (5) MMP-1 mRNA 발현에 미치는 영향

[0138] 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 아스코르브산을 6.25, 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 경우 유의성 있게($p<0.05$) MMP-1 mRNA 발현이 각각 20.5, 21.3, 30.7 및 39.4% 감소하였다(도 24 참조). 대조군과 비교할 때, 애기달맞이꽃 메탄올 추출물을 6.25, 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 경우, 역시 유의성 있게($p<0.05$) MMP-1 mRNA 발현이 각각 67.7, 71.7, 75.6 및 84.3% 감소되었다(도 25 참조). 애기달맞이꽃 메탄올 추출물의 MMP-1 mRNA 발현은 아스코르브산 보다 낮은 값을 나타내었다.

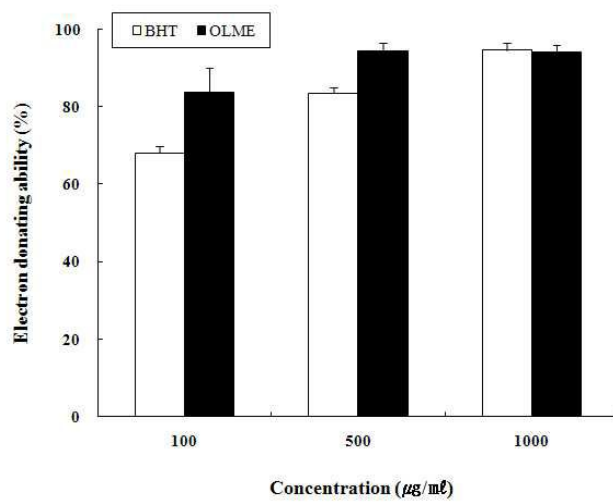
[0139] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

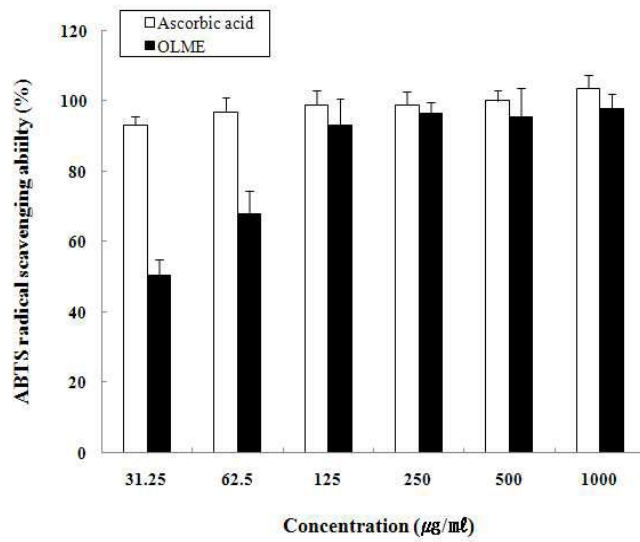
도면1



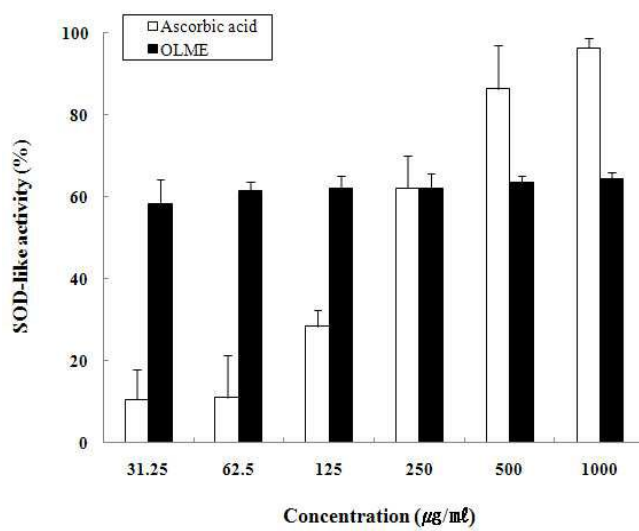
도면2



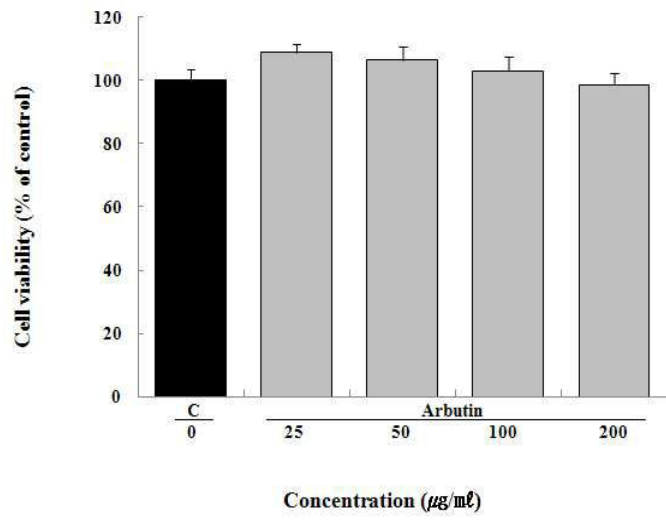
도면3



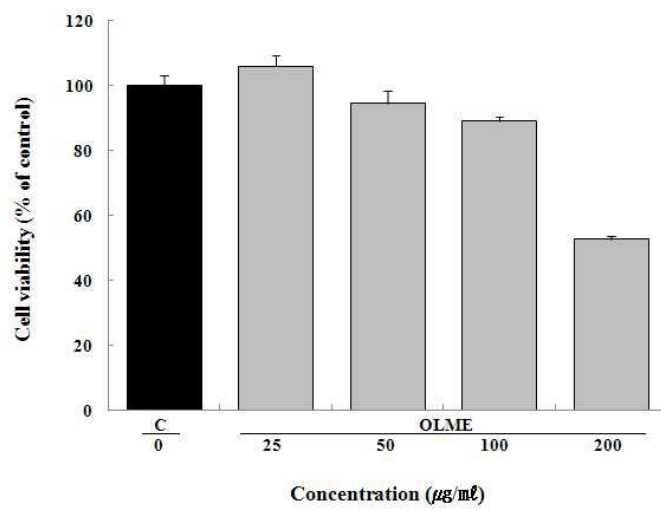
도면4



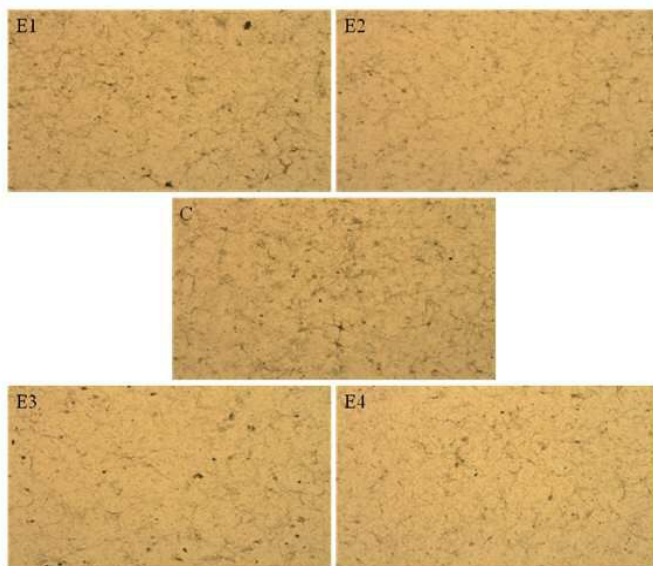
도면5



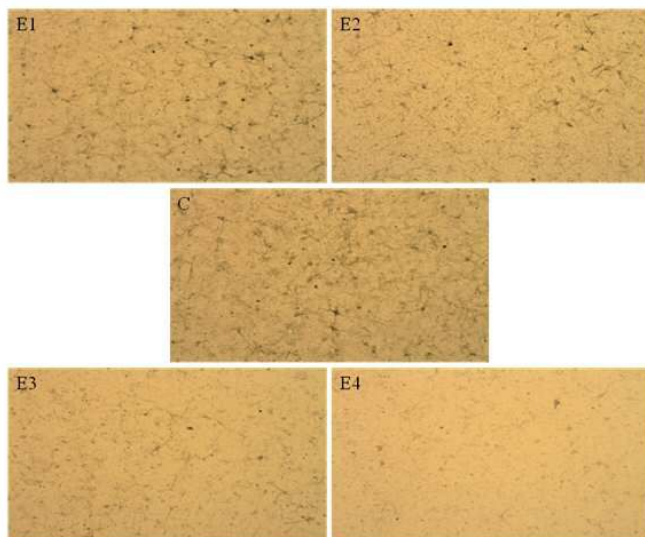
도면6



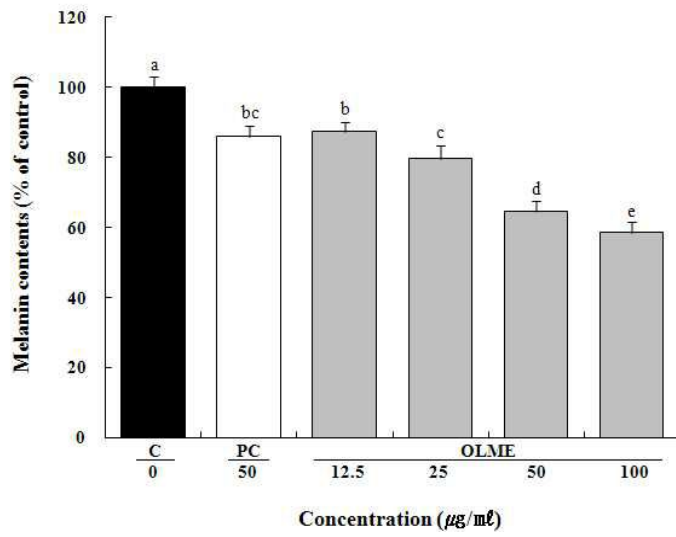
도면7



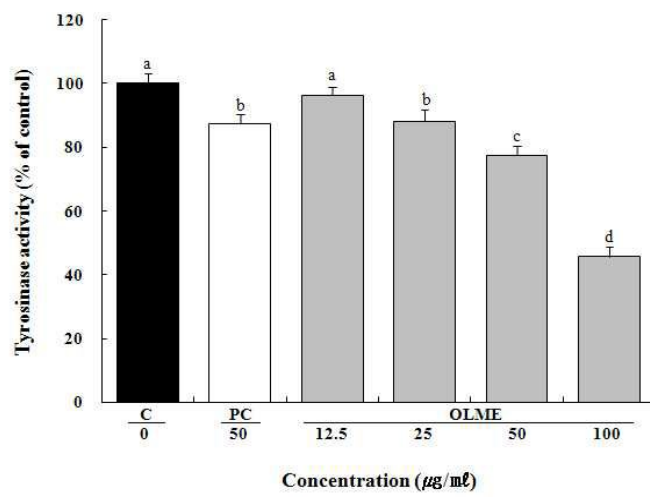
도면8



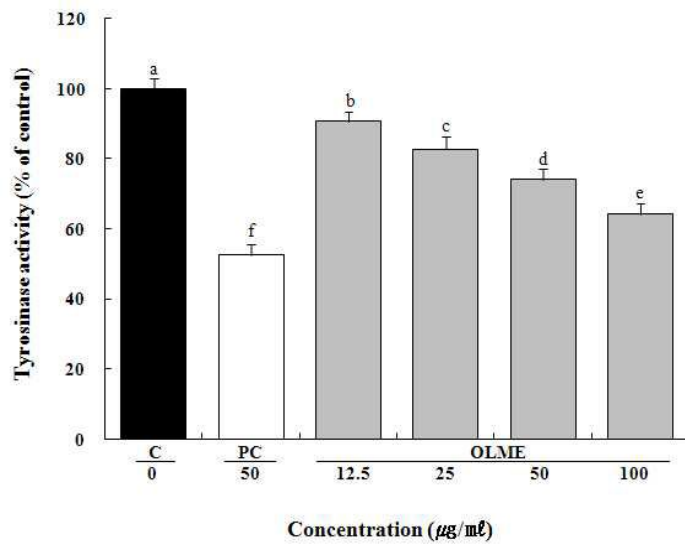
도면9



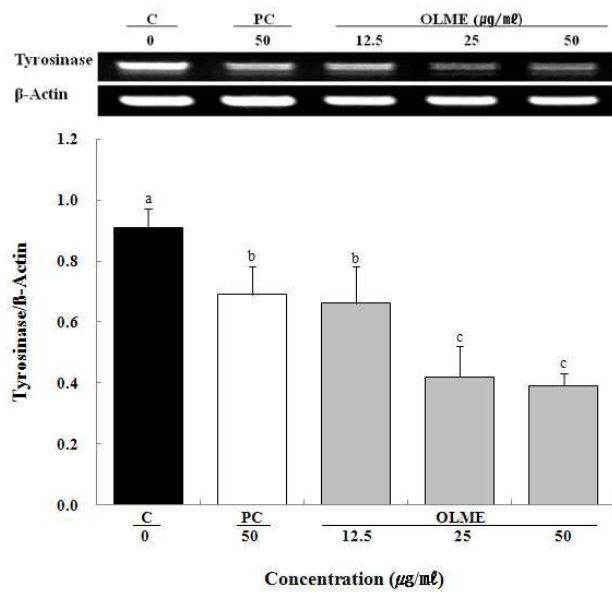
도면10



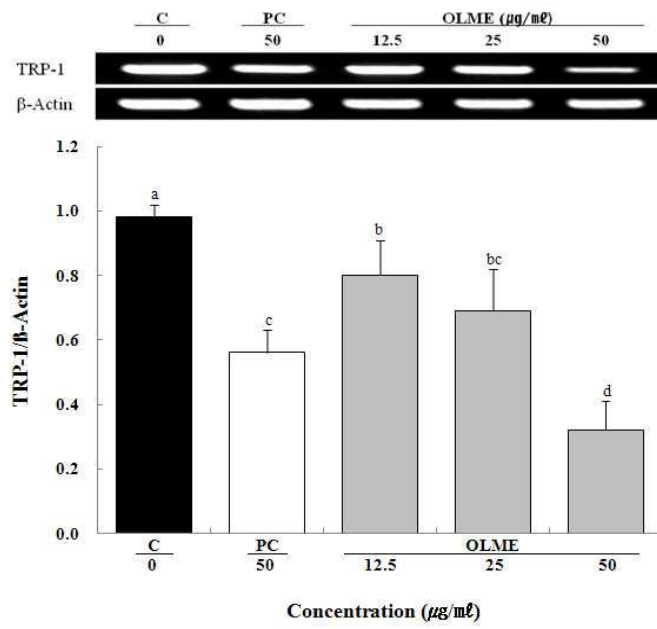
도면11



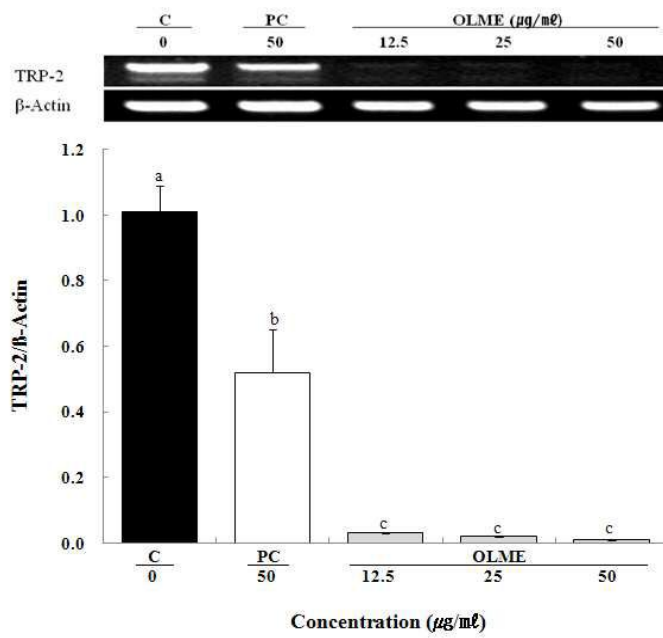
도면12



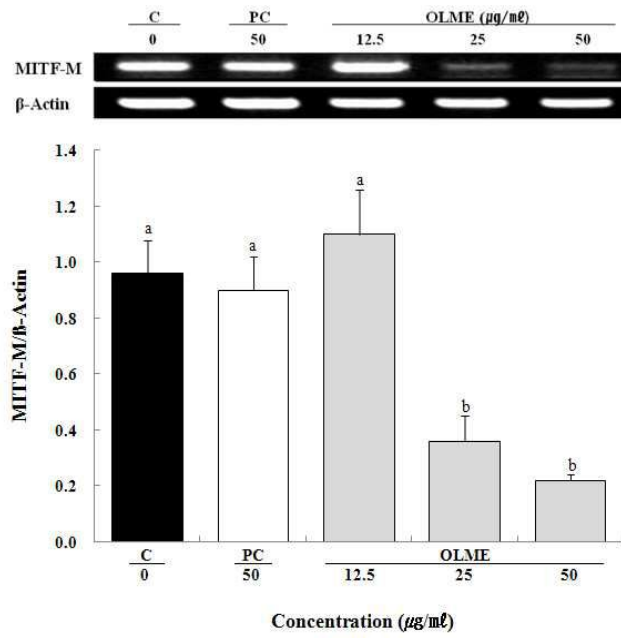
도면13



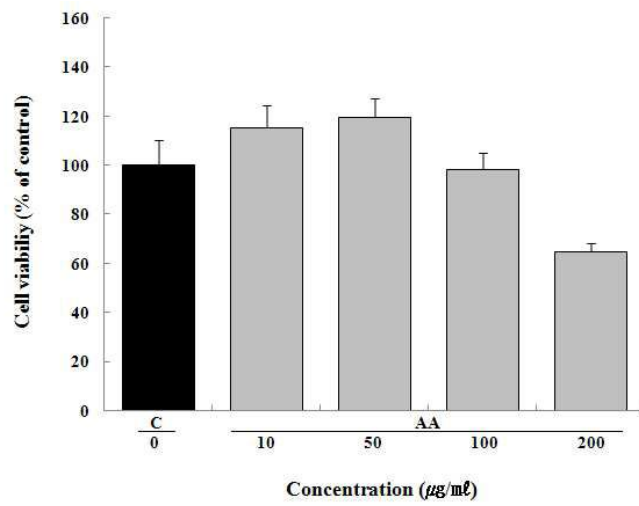
도면14



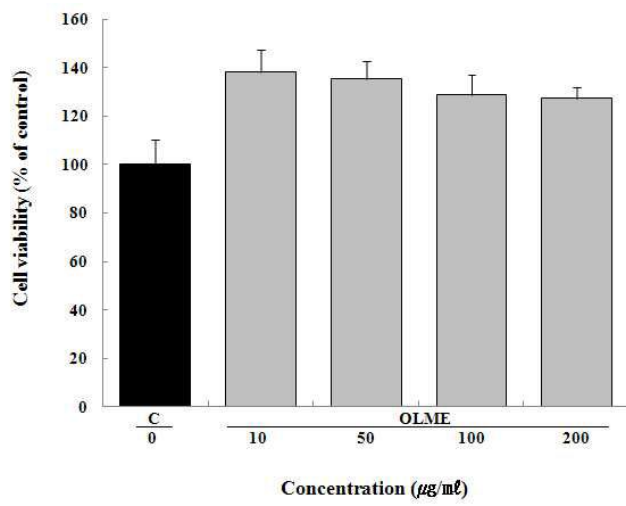
도면15



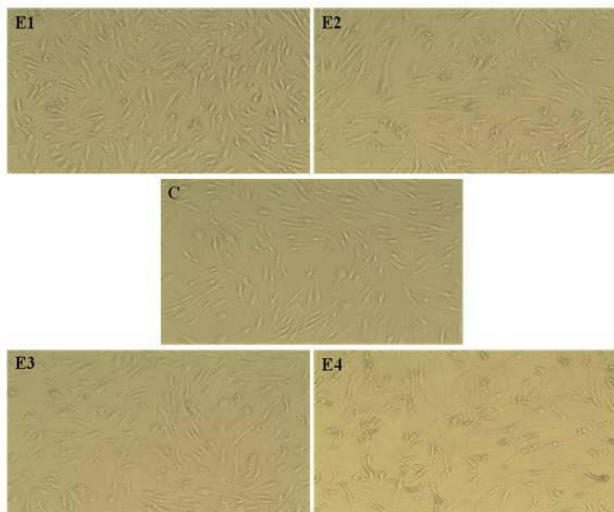
도면16



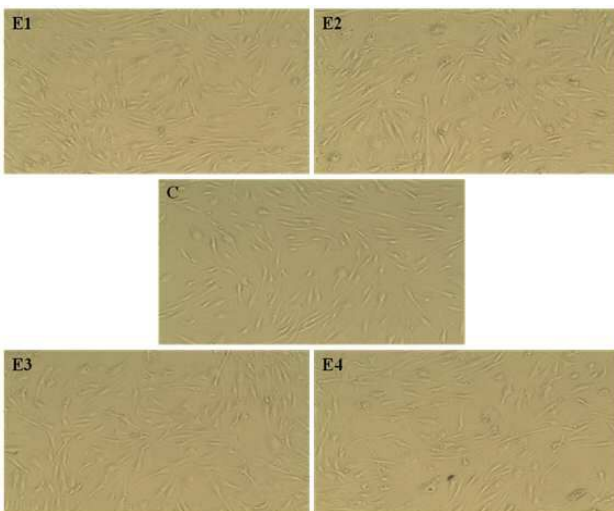
도면17



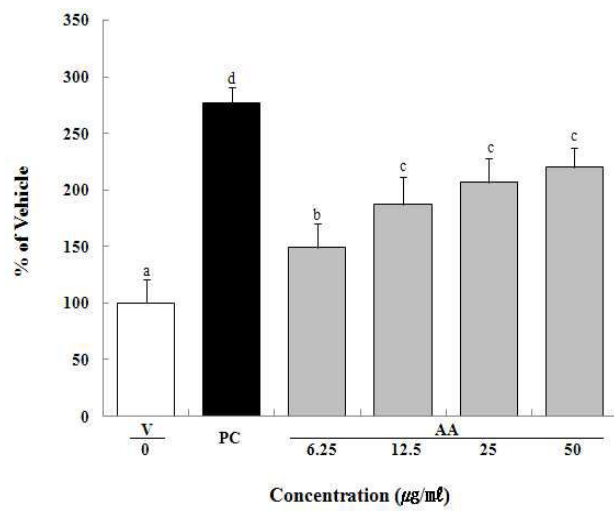
도면18



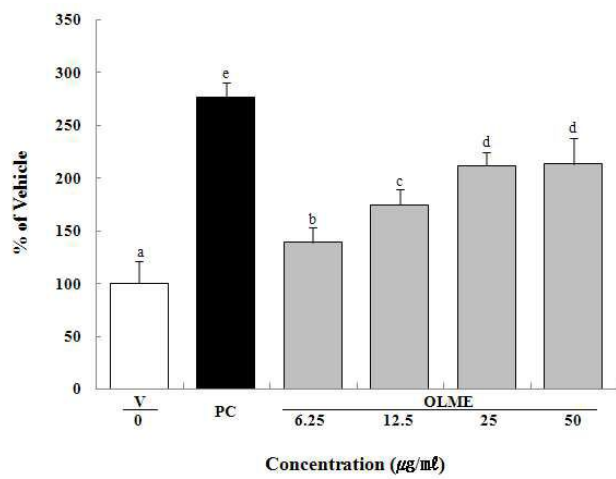
도면19



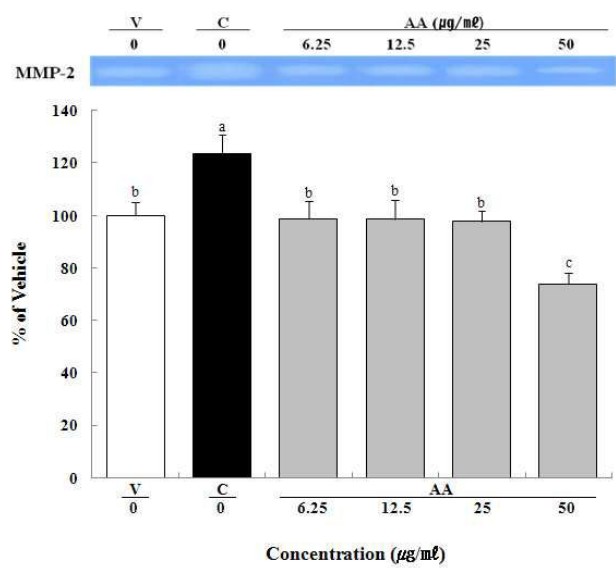
도면20



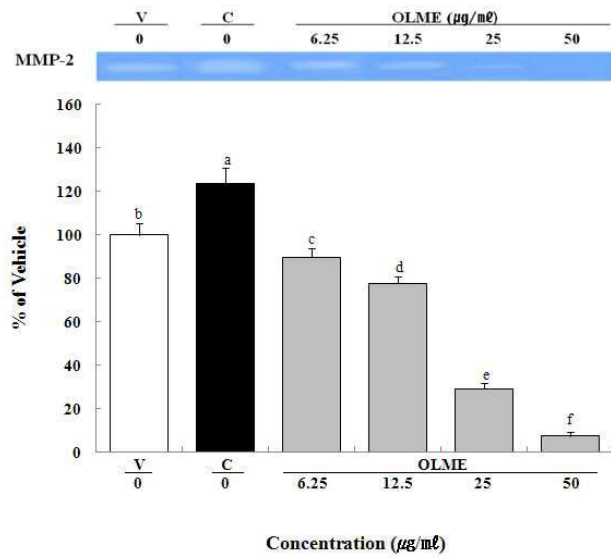
도면21



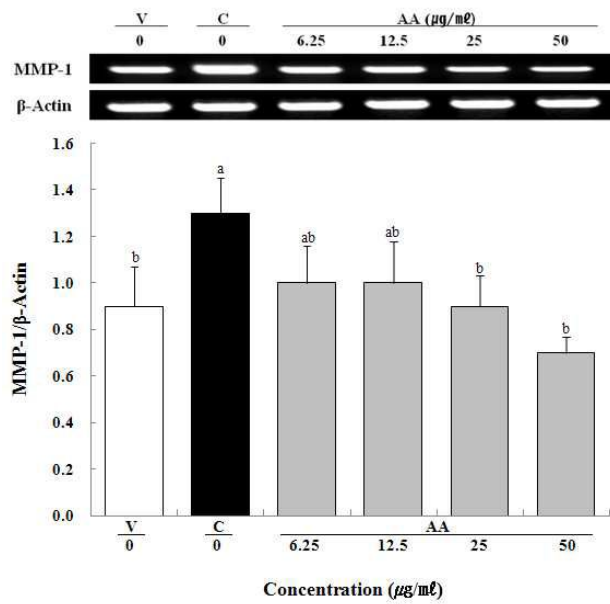
도면22



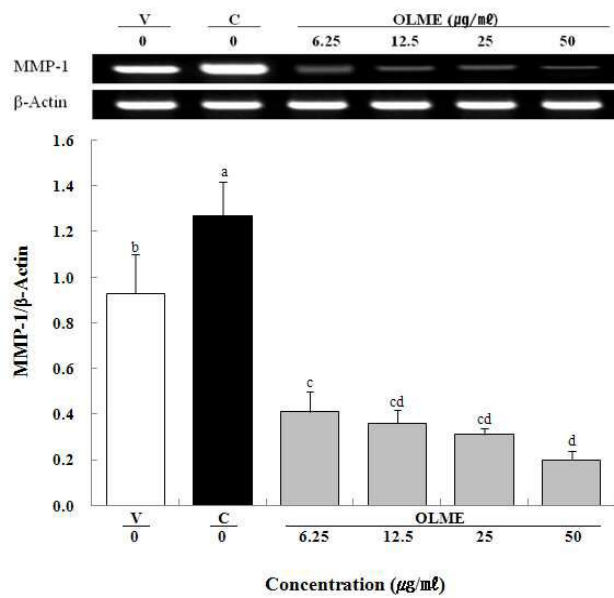
도면23



도면24



도면25



서열 목록

<110> Keimyung University Industry Academic Cooperation Foundation

<120> Skin Condition Improving Composition Comprising Extract From
Oenothera laciniata Hill As Active Ingredient

<160> 14

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 1

catttttgat ttgagtgtct 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> PCR primer

<400> 2

tgtggtagtc gtctttgtcc 20

<210> 3

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 3
 gctgcaggag ccttctttct c 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 4
 aagacgctgc actgctggtc t 21
 <210> 5
 <211>
 > 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 5
 ggatgaccgt gagcaatggc c 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 6
 cggttgtgac caatgggtgc c 21
 <210> 7
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 7

tacagaaagt agagggagga ggactaag

28

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 8

cacagttgga gttaagagtg agcatagcc

29

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 9

accgtgaaaa gatgaccag

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 10

tacggatgtc aacgtcacac

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 11

aaaggaata agtactgggc

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	PCR primer	
<400>	12	
aattccagga aagtcattgtg		20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	13	
atgcagaagg agatcactgc		20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	14	
ctgcgcaagt taggttttgt		20