



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0068148
(43) 공개일자 2012년06월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/489 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01) A61Q 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0129621

(22) 출원일자 2010년12월17일

심사청구일자 2010년12월17일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

김영철

대구광역시 달서구 호산로 125, 삼성명가타운
209동 1305호 (파호동)

강철호

대전광역시 서구 갈마로 262, 122동 2103호 (내
동, 맑은아침아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김승진, 양부현

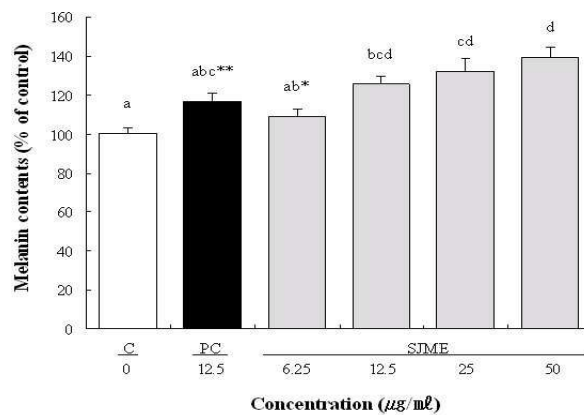
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 회화나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 백반증 또는 백모 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 회화나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 백반증 또는 백모 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 회화나무 추출물은 세포내 멜라닌 색소 합성의 핵심 효소인 티로시나아제의 활성을 증가시킴과 동시에 티로시나아제와 TRP-2의 mRNA 발현을 촉진함으로써, 멜라닌 합성을 증진시킨다. 또한, 본 발명의 회화나무 추출물은 천연소재로서 세포에 대한 독성도 거의 없어, 피부와 모발의 색소저침작증인 백반증 및 백모 치료제로 개발될 가능성이 매우 크다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

박은예

대구광역시 달서구 한들로 70, 파랑새마을 402동
305호 (장기동)

김상남

경상북도 성주군 벽진면 수촌2길 12-8

특허청구의 범위

청구항 1

회화나무(*Sophora japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 백반증 또는 백모의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 회화나무 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 3

제 1 항에 있어서, 상기 회화나무 추출물은 조성물 총 중량에 대해 0.001 - 30 중량%의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 파우더, 젤, 연고, 크림, 로션, 액제 및 에어로졸로 이루어지는 군에서 선택되는 피부외형 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

회화나무(*Sophora japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 백반증 또는 백모 개선용 화장품학적 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 회화나무 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.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 회화나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 백반증 또는 백모 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 백반증(Vitiligo)을 가진 많은 사람에게 있어서 하얀 반점은 삶의 질에 있어서 큰 영향을 미친다(Ongenae et al. 2006). 처음에는 백반증이 작은 장애로 보일지라도, 특히 정도가 심한 색소침착을 가진 사람에게는 미용적으로 인한 이성 교제의 어려움(Papadopoulos et al. 1999)과 심리학적으로 인한 자아 존중감 및 사회 활동에 영향을 줄 수 있다(Kent et al. 1996). 따라서, 미백제와 착색제로 인한 피부 색소침착의 변화는 약리학 뿐만 아니라 약용 화장품에 많은 관심을 불러 일으켰다(Michaela and Vincent 2008).

- [0003] 멜라닌은 진피의 기저층에 분포된 멜라닌세포에 의해 분비된다(Kim and Uyama 2005). 신경능에서 분화된 멜라닌세포에 의해 멜라닌이 생합성 되면 각질형성세포를 통해 표피로 이동한다(Yaar et al. 2006). 멜라닌세포는 멜라닌의 생산을 조절하고 여러 효소를 포함하는 멜라노솜이라고 하는 리소솜과 같은 특수화된 소기관을 가지고 있다(Tiedtke et al. 2004). 멜라닌은 자외선 흡수에 의한 자외선의 해로운 효과로부터 피부를 보호하고 활성산소종을 제거하며 독성 약물과 화학 물질을 소거시키는데 있어서 중요한 역할을 한다(Yaar et al. 2006).
- [0004] 멜라닌 합성은 티로시나아제(tyrosinase), TRP1(tyrosinase-related protein 1), TRP2/DCT(tyrosinase-related protein 2)를 포함하는 단백질의 티로시나아제(tyrosinase) 부류의 참여로 일어난다(Huang et al. 2008). 자외선 조사에 의해 노출된 피부에서 멜라닌합성은 티로시나아제 효소를 통해 시작된다(Parvez et al. 2006). 멜라닌 세포에서 멜라닌의 합성을 촉매 하는데 중요한 효소로 알려진 티로시나아제(Sturm et al. 2000)는 티로신(tyrosine)을 도파(dopa)로, 도파(dopa)를 도파퀴논(dopaquinone)으로 산화시키는 반응에 있어서 중요한 촉매 작용을 한다(Tripath et al. 1992). 도파퀴논(Dopaquinone)은 자연적으로 도파크롬(dopachrome)으로 변화된다. TRP2(DCT)는 도파크롬(dopachrome)을 DHICA로 변환시키는 촉매 작용을 하고, TRP1는 DHICA의 산화로 인돌-5,6-퀴논-2-카르복시산(indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid)로의 촉매 작용을 한다(Kim and Uyama 2005).
- [0005] 백반증은 피부 표피로부터의 멜라닌과 기능적인 멜라닌세포의 손실의 결과로 국한된 탈색소 반점을 특징으로 하는 색소결핍증이다(Helen et al. 2007). 표피에서 멜라닌 세포의 기능부전을 설명하기 위해서 자가면역 기전, 자가-세포독성 기전 또는 각질형성세포 주위에 있는 비정상적인 멜라닌세포가 멜라닌세포 기능 감소를 초래한다고 제시한다는 가설들이 제시되고 있다(Ongenae 2003; Moretti 2002). 백반증의 다른 원인으로는 스트레스, 감염, 유전 인자, 멜라토닌 수용체, 그리고 손상된 멜라닌세포 이주와 증식이 있다(Helen et al. 2007). 멜라닌합성의 강한 자극제인 IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)(David 2001)는 cAMP의 포스포디에스테라제를 억제하여 세포내의 cAMP 함량을 증가시키고(Im et al. 1998), dibutyryl cAMP는 티로시나아제 활성과 mRNA 발현을 증가시킨다(Hoganson et al 1989). MITF는 멜라닌세포 발전과 멜라닌합성의 주요 조절자(Levy et al. 2006)이고, 주 색소침착 효소인 티로시나아제, TRP-1과 TRP-2의 전사를 조절한다(Koo et al. 2008).
- [0006] 현재, 백반증의 치료에 있어서 국부의 코르티코스테로이드, 칼시뉴린 억제제, 비타민 D 파생물, 광선치료(UVA, 단파장 UVB, 광화학치료), 수술, 국부적인 치료와 광선치료의 조합을 포함한 다양한 치료들이 과잉되고 있으며(Maxin et al. 2008), 광화학 치료를 꺼리는 의사와 환자에게 비흑색종 피부암과 흑색종의 발생 정도를 증가시키는 부작용을 가지고 있다(Rajatanavin et al. 2003). 따라서, 새로운 피부 관리 약품의 발전에 있어서 천연 물질을 찾는 데 노력을 하고 있으며, 피부 관리 화장품에 있어 천연 물질 사용은 최근에 더욱 강조되고 있다(Kiken et al. 2002).
- [0007] 한편, 백모(Canities, Hair Graying)는 멜라닌 생합성 세포의 독성적 산화 및 멜라노사이트가 모근 상부의 외부에 위치한 저장소로부터 진피 돌기(dermal papilla)에 근접한 색소 방출 미세환경으로 이동하는 것이 원활하지 않은 것에 기인하는 모발구근(hair bulbar) 멜라노사이트의 티로시나아제 활성이 감소되는 것이 원인이다(Neste and Tobin 2004; Tobin et al. 2001). 또한, 백모(Canities, Hair Graying)는 인간 노화의 전형적인 타입의 하나이고, 모발 색소화의 유지는 멜라노사이트가 지속적으로 존재하고 그 기능을 잃지 않아야 하는 것에 달려있다(Kerscher et al. 2007; Lin and Fisher 2007; Sarin et al. 2007). 멜라노사이트 줄기세포(Melanocyte stem cells, MSCs)이 모낭에서 발견되었다. 상피 멜라노사이트와는 다르게, 매우 고정적이어서, 모낭 멜라노사이트는 각 모발 사이클의 초기에 형성되어 모발 사이클의 끝에 아포토시스에 의해 사멸한다. 이러한 사이클이 45년 이상에 걸쳐 7-15회 반복되면, 모낭은 더 이상 멜라닌 색소를 만들 수 없게 된다. 모발은 일생동안 일정한 사이클링/재색소화 과정을 진행하기 때문에, 인간과 마우스와 같은 동물에서 노화와 더불어 모발의 색이 점차 소실되는 것은 백모가 MSCs의 자기 유지능이 손상된 것에 기인한 것일 수 있다는 가능성을 암시해 준다.
- [0008] 식물 화합물은 유용한 활성이 있다고 알려져 있어서 많은 관심을 가지게 되었고 현대 화장품 제조에 활용되고 있다(Huang et al. 2008). 회화나무의 꽃과 꽃망울은 전통적인 중국 의학 약초로 잘 알려져 있고(Loa et al. 2009), 향종양, 향불임과 향암 활성을 가지고 있다(Ma 2006; Wang 2001). 회화나무 구성성분으로는 플라보놀 삼중글루코사이드, 이소플라보놀, 쿠마론크로몬, 사포닌, 트리터펜 글루코사이드, 인지질, 알카로이드, 아미노산, 다당류, 그리고 지방산을 포함하고 있다(Grupp et al. 2001). 회화나무 추출물은 보통 혈변, 치질 출혈, 자궁 출혈, 그리고 설사와 같은 출혈과 관련된 장애 치료에 사용된다(Zhao 2004).

[0009] 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

[0010] 본 발명자들은 백반증(Vitiligo) 및 백모(Canities)와 같은 색소저침착성 질환의 치료 물질을 천연물로부터 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 회화나무로부터 얻은 추출물이 멜라닌 합성의 핵심 효소인 티로시나아제(tyrosinase)의 활성을 증가시킴과 동시에 티로시나아제와 TRP-2의 mRNA 발현을 촉진함으로써, 멜라닌 합성을 증진시킨다는 것을 실험적으로 입증하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 회화나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 백반증 또는 백모의 치료, 예방 또는 개선용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0012] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 회화나무(Sophora japonica) 추출물을 유효성분으로 포함하는 백반증(Vitiligo) 또는 백모(Canities)의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 회화나무(Sophora japonica) 추출물을 유효성분으로 포함하는 백반증 또는 백모 개선용 화장품학적 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 회화나무 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리할 수 있다. 본 발명에서 회화나무 추출물은 회화나무의 잎, 줄기, 과실 등 모든 부분으로부터 얻은 추출물을 의미하며, 추출 부위가 특정의 부분으로 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명의 회화나무 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, n-헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 또는 물이며, 가장 바람직하게는 메탄올이다.

[0017] 본 발명의 다른 바람직한 일 구현예에 의하면, 본 발명에서 상기 회화나무 추출물은 조성물 총 중량에 대해 0.001 - 30중량%의 농도로 포함되어 있다.

[0018] 본 발명의 치료 대상인 "백반증(Vitiligo)"은 피부 표피로부터의 멜라닌과 기능적인 멜라닌세포의 손실의 결과로 국한된 탈색소 반점을 특징으로 하는 색소 결핍증이다. 또한, "백모(Canities, Hair graying)"은 "모발의 회색화 또는 백발화"라고도 하는 증상으로서, 개개 모발의 색소가 점차 약해져, 정상 색소로부터 백색 모발까지 다양한 색조의 털이 혼재하는 증상을 의미한다. 상기 백모는 멜라닌 생합성 세포인 멜라노사이트(melanocyte)의 독성적 산화 손상에 의해 모발구근(hair bulbar) 멜라노사이트에서의 티로시나아제 활성이 감소되는 것이 원인인 것으로 알려져 있다.

[0019] 하기 본 발명 일 실시예에서 입증되는 바와 같이, 회화나무 추출물은 세포내에서 멜라닌 색소 합성에 핵심 효소인 티로시나아제 활성을 크게 증가시킴으로써 멜라닌의 형성을 촉진한다. 따라서, 본 발명의 회화나무 추출물은 백반증과 백모의 치료, 예방 및 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

- [0020] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분으로서 상술한 회화나무 추출물 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.
- [0021] 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.
- [0022] 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. 본 발명의 약제학적 조성물이 펠라닌 색소의 결손으로 인한 백반증의 치료 또는 예방을 위해 적용되는 점을 감안하면, 본 발명 조성물의 투여는 피부에 국소적으로 도포되어 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0023] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [0024] 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 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0025] 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.
- [0026] 본 발명의 조성물은 회화나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 백반증 또는 백모 개선용 화장품학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다.
- [0027] 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.
- [0028] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림, 로션, 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0029] 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.
- [0030] 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.
- [0031] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 예특실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알

코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

- [0033] 본 발명의 화장품학적 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분과 담체 성분 이외에, 화장품학적 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0034] 상술한 바와 같이, 본 발명은 회화나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 백반증 또는 백모의 치료, 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 회화나무 추출물은 세포내 멜라닌 색소 합성의 핵심 효소인 티로시나아제의 활성을 증가시키고 동시에 티로시나아제와 TRP-2의 mRNA 발현을 촉진하여 최종적으로 멜라닌 합성을 증진시킨다. 또한, 본 발명의 회화나무 추출물은 천연소재로서 세포에 대한 독성도 거의 없어, 피부와 모발의 색소저침작증인 백반증과 백모의 치료제로 개발될 가능성이 매우 크다.

[0035]

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 회화나무(*Sophora japonica*) 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 측정의 평균±SD으로 나타내었다. SJME: 회화나무(*Sophora japonica*) 메탄올 추출물, □ : 총 폴리페놀, ■ : 총 플라보노이드.

도 2는 회화나무(*Sophora japonica*) 메탄올 추출물의 전자 공여능을 측정한 결과이다. 측정값은 3회 측정의 평균±SD으로 나타내었다. □ BHT: Dibutylated hydroxytoluene, ■ : SJME: 회화나무 메탄올 추출물(*Sophora japonica* methanol extract).

도 3은 다양한 농도의 회화나무 메탄올 추출물로 처리한 Melan-a 세포의 생존율(cell viability)를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD으로 나타내었다. □ IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine, ■ : SJME: 회화나무 메탄올 추출물(*Sophora japonica* methanol extract).

도 4는 회화나무 메탄올 추출물의 Melan-a 세포내에서 멜라닌 생성능 촉진 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 측정의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, PC(양성대조군): IBMX, SJME: 회화나무 메탄올 추출물. 상이한 위첨자를 갖는 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 유의한 차이($p<0.001$)를 갖는다. ANOVA 및 Duncan's multiple range test에 의한 대조군과의 비교: * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

도 5는 회화나무 메탄올 추출물로 처리한 Melan-a 세포의 형태학적 관찰 결과이다. 패널 A: 비-처리군(non-treated group), 패널 B: SJME (6.25 $\mu\text{g/ml}$), 패널 C: SJME (12.5 $\mu\text{g/ml}$), 패널 D: SJME (25 $\mu\text{g/ml}$), 패널 E: SJME (50 $\mu\text{g/ml}$), 패널 F: IBMX (12.5 $\mu\text{g/ml}$).

도 6은 회화나무 메탄올 추출물의 Melan-a 세포내에서의 세포내 티로시나아제 활성 촉진 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, PC(양성대조군): IBMX, SJME: 회화나무 메탄올 추출물. 상이한 위첨자를 갖는 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 유의한 차이($p<0.001$)를 갖는다.

도 7은 회화나무 메탄올 추출물의 Melan-a 세포내에서의 세포 추출물내의 티로시나아제 활성 촉진 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, PC(양성대조군): IBMX, SJME: 회화나무 메탄올 추출물. 상이한 위첨자를 갖는 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 유의한 차이($p<0.001$)를 갖는다.

도 8은 회화나무 메탄올 추출물의 Melan-a 세포내에서의 티로시나아제 mRNA의 발현상에 미치는 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, PC(양성대조군): IBMX, SJME: 회화나무 메탄올 추출물. 상이한 위첨자를 갖는 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 유의한 차이($p<0.001$)를 갖는다.

도 9는 회화나무 메탄올 추출물의 Melan-a 세포내에서의 TRP-1 mRNA의 발현상에 미치는 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, PC(양성대조군): IBMX, SJME: 회화나무 메탄올 추출물. 상이한 위첨자를 갖는 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 유의한 차이(p<0.001)를 갖는다.

도 10은 회화나무 메탄올 추출물의 Melan-a 세포내에서의 TRP-2 mRNA의 발현상에 미치는 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, PC(양성대조군): IBMX, SJME: 회화나무 메탄올 추출물. 상이한 위첨자를 갖는 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 유의한 차이(p<0.001)를 갖는다. *p<0.05 ANOVA and Duncan's multiple range tests에 의한 대조군과의 비교.

도 11은 회화나무 메탄올 추출물의 Melan-a 세포내에서의 MITF-M mRNA의 발현상에 미치는 효과를 측정한 결과이다. 측정값은 3회 실험의 평균±SD으로 나타내었다. C: 대조군, PC(양성대조군): IBMX, SJME: 회화나무 메탄올 추출물. 상이한 위첨자를 갖는 측정값들은 ANOVA 및 Duncan's multiple range tests에 의해 유의한 차이(p<0.001)를 갖는다. *p<0.05 ANOVA and Duncan's multiple range tests에 의한 대조군과의 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 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.

[0038] 실시예

[0039] 실험방법 및 재료

[0040] 1 시약 및 기기

[0041] DMSO(Dimethyl sulfoxide), BHT(2,6-di-tert-butylated hydroxytoluene), DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), IBMX(isobuty-methylxanthine), MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), 탄닌산(tannic acid), L-티로신(L-tyrosine), 아스코르브산(ascorbic acid), 디(에틸렌글리콜(di(ethylene glycol))) 시약들은 Sigma 사(USA), 루틴(rutin)은 ACROS 사(USA)의 제품을 사용하였으며, 그 외 일반시약들은 특급품을 사용하였다. 세포주 관찰은 inverted microscope (CKX41, Olympus, Japan)를 사용하였고, 세포주 배양은 CO₂ 인큐베이터(MCO-15AC, SANYO electric, Japan)를 사용하였다.

[0042] 2. 시료

[0043] 한국식물추출물은행에서 분양받은 회화나무 메탄올 추출물(Sophora japonica methanol extract)을 DMSO에 녹여서 사용하였다.

[0044] 3. 항산화능 실험

[0045] 3-1. 총 폴리페놀 함량

[0046] 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin and Denis 1912)에 의해 비색 정량하였다. 적절한 배율로 희석한 시료 1 ml에 folin-시약 1 ml를 가하여 3분간 정치한 후 10% Na₂CO₃ 1 ml를 혼합하고, 1 시간 실온에서 방치하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 탄닌산(tannic acid)를 이용하여 작성하였다.

[0047] 3-2. 총 플라보노이드 함량

[0048] 총 플라보노이드 함량은 Davis 변법(AOAC 1995)을 이용하였다. 적절한 배율로 희석한 시료 용액 1 ml에 디(에틸렌글리콜)[di(ethylene glycol)] 시약 10 ml 및 1N NaOH 1 ml를 가하고 잘 혼합한 다음 37℃ 수욕상에서 1시간 반응시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 루틴(rutin)을 이용하여 작성하였다.

[0049] **3-3. 전자공여능**

[0050] 전자공여능은 Blois의 방법(Blois 1958)으로 측정하였다. 동결 건조시킨 회화나무 메탄을 추출물의 분말을 100, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 DMSO에 녹여 제조하고, 1 ml를 테스트 튜브(test tube)에 취하여, 4×10^{-4} M의 DPPH 용액 4 ml를 가하여 60°C 수욕상에서 10초간 진탕하고, 실온에서 20분 동안 방치한 후에 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물 무 첨가군에는 시료 대신 메탄올 1 ml를 첨가하여 동일하게 실험하고 추출물 첨가군에 대한 흡광도의 감소비율로 전자공여능을 나타내었다. 양성대조군으로 합성 항산화제인 BHT를 동일한 방법으로 실험하였으며, 다음의 식에 의해 전자공여능(%)을 구하였다.

[0051]
$$\text{전자공여능}(\%) = (1 - \text{추출물 첨가군의 흡광도} / \text{추출물 무 첨가군의 흡광도}) \times 100$$

[0052] **4. 인 비트로(In vitro) 세포주 실험**

[0053] **4-1. 세포주 및 배양**

[0054] C57BL/6 마우스에서 유래한 불사멸화된 세포주(immortalized cell line)인 Melan-a 세포를 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% PS(penicillin/streptomycin), 200nM TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)가 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 10% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다.

[0055]

[0056] **4-2. MTT 분석**

[0057] 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 생장율을 측정하는 대표적인 방법이다. Melan-a 세포를 10% FBS, 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37°C, 10% CO₂ 인큐베이터에서 48 시간 동안 안정화시킨 후에 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 96 웰 플레이트에 적정 세포수(0.5×10^4 세포/웰)로 분주하고, 37°C, 10% CO₂ 인큐베이터에서 24 시간 배양한 다음 회화나무 메탄을 추출물을 농도별(25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 희석시켜 200 μl 씩 넣은 후 37°C, 10% CO₂ 인큐베이터에서 48 시간 배양하였다. 플레이트를 1,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 다음, PBS로 1회 세정하고, MTT가 0.5 mg/ml 함유된 배지를 200 μl 씩 넣은 후 37°C, 10% CO₂ 인큐베이터에서 3 시간 배양하였다. 플레이트를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포가 바닥에 가라앉게 한 다음 배지를 버리고, DMSO를 200 μl 씩 넣고 플레이트 진탕기(plate shaker)에서 15분간 세포를 녹여낸 다음 ELISA reader로 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생장률은 다음 식에 의해 산출하였다. 세포생장률(%) = (시료 첨가군의 흡광도/시료 무 첨가군의 흡광도) X 100

[0058] **4-3. 멜라닌 생성능**

[0059] Melan-a 세포를 10% FBS, 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37°C, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72 시간 동안 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 96-웰 플레이트에 적정세포수(2×10^4 세포/웰)로 분주하고 37°C, 10% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양한 다음 회화나무 메탄을 추출물을 농도별(6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 희석시켜 500 μl 씩 넣어 1차 물질 처리를 가하고, 37°C, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72시간 배양한 후 다시 2차 물질 처리와 72 시간 배양한 후 1N NaOH 용액으로 멜라닌을 용해시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, 양성대조군은 IBMX를 사용하였다. 멜라닌 정량은 다음 식에 의해 산출하였다. 멜라닌 양(%) = (시료 첨가군의 흡광도/시료 무 첨가군의 흡광도) X 100

[0060] **4-4. 세포형태 관찰**

[0061] 세포의 형태 변화를 관찰하기 위하여 배양이 끝난 후 새 배지로 교환한 후 도립현미경으로 관찰하였다.

[0062] **4-5. 세포내 티로시나아제(tyrosinase) 활성능 측정**

[0063] Melan-a 세포를 10% FBS와 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72 시간 동안 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 둥근 60φ 세포배양디쉬에 적정세포수 (4 X 10⁵ 세포/웰)로 분주하고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양한 다음 회화나무 메탄올 추출물을 농도별(6.25, 12.5, 25, 50 μg/ml)로 희석시켜 5 ml씩 넣고, 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72 시간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 얼음 위에 얹은 채로 1% 트리톤(triton) X-100 용액을 200 μl씩 넣어 용해한 후 e-튜브에 옮겨 담고 얼음에 박아둔 채로 10분 간격으로 볼텍스(vortex)하면서 1 시간 가량 방치한 다음, 4℃, 14,000rpm 에서 20 분간 원심분리한 상층액을 티로시나아제(tyrosinase) 활성 측정 용액으로 사용하였고, 단백질 분석(protein assay) 용액(Bio Rad, USA)으로 흡광도를 측정, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 단백질 40 μg을 포함한 세포 추출물과 시험 물질을 총 100 μl가 되게 섞은 후, L-DOPA를 100 μl씩 넣고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에 넣고 60분 후에 490 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 양성대조군은 IBMX를 사용하였다.

[0064] **4-6. 세포 추출된 티로시나아제 활성능**

[0065] Melan-a 세포를 10% FBS와 1% P/S, 200 nM 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 X 10⁵ 세포/웰)로 분주하고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에서 72시간 배양한 다음 PBS로 세척 후 1% 트리톤(triton) X-100을 200 μl 넣어 용해한 다음, e-튜브에 옮겨 담고 얼음에 박아둔 채로 10분 간격으로 볼텍스(vortex)하면서 1 시간 가량 방치한 후, 4℃, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리한 상층액을 취하고, 수득한 상층액을 50 μl, 0.1M 포스페이트 완충액(phosphate buffer)(pH 6.8) 49 μl, 회화나무 메탄올 추출물을 농도별(6.25, 12.5, 25, 50μg/ml)로 1μl를 섞은 후 1시간 동안 방치하였다. 여기에 L-DOPA를 100 μl씩 넣고 37℃, 10% CO₂ 인큐베이터에 넣고 490 nm에서 60분 후에 흡광도의 변화를 측정하였고, 양성대조군은 IBMX를 사용하였다.

[0066] **4-7. RT-PCR**

[0067] 총 RNA는 제조사에서 제공된 지시에 따라 Trizol-Reagent (Invitrogen, Caylsbad, CA)를 이용해 분리하였다. 총 RNA 5μg을 40 μl 용량에서 M-MLV RT 5X 배지의 8 μl, 10 mM dNTPs의 3 μl, 10,000 U RNase 억제자 0.45 μl, 50,000 U M-MLV 역전사효소(Promega, Madison, USA) 0.3 μl 및 50 pmol/μl 올리고 dT (Bioneer, Chungbuk, Korea) 1.5μl를 이용해 역전사 하였다. Single stranded cDNA는 5 X green Go Taq flexi buffer 4 μl, 10 mM dNTPs 0.4μl, 500 U Taq polymerase 0.1 μl, 25 mM MgCl₂(Promega, Madison, USA) 1.2μl와 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, MITF-M, β-액틴의 특이 센스 및 안티센스 프라이머 각각 20 pmol/L 0.4μl를 사용하여 PCR로 증폭하였다. PCR에 사용한 프라이머 서열과 기대 크기는 아래 표 1에 나타내었다. 프라이머는 내부표준물질로 β-액틴(51℃, 30 사이클), 실험물질로 티로시나아제(56℃, 28 사이클), TRP-1(56℃, 28 사이클), TRP-2(64℃, 28 사이클), MITF-M(54℃, 30 사이클)을 사용하였다. PCR 산물을 1.2% 아가로스 겔에 전기영동시킨 후 분석하였다.

표 1

Items	Primers	Expected size(bp) ¹⁾
Tyrosinase ²⁾	F3) (5' → 3') CAT TTT TGA TTT GAG TGT CT R4) (5' → 3') TGT GGTAGT CGT CTT TGT CC	1192
TRP-1 ⁵⁾	F (5' → 3') GCT GCAGGA GCC TTC TTT CTC R (5' → 3') AAG ACGCTG CAC TGC TGG TCT	268
TRP-2 ⁶⁾	F (5' → 3') GGA TGACCG TGA GCA ATG GCC R (5' → 3') CGG TTGTGA CCA ATG GGT GCC	1044
MITF-M ⁷⁾	TAC AGA AAG TAG AGG GAG GAG F (5' → 3') GAC TAA G R (5' → 3') CAC AGT TGG AGT TAA GAG TGA GCA TAG CC	326
β-Actin ⁸⁾	F (5' → 3') ACCGTG AAA AGA TGA CCC AG R (5' → 3') TACGGA TGT CAA CGT CAC AC	528

¹⁾bp: basepair

²⁾Tyrosinase: monophenol monooxygenase

³⁾F: forward

⁴⁾R: reverse

⁵⁾TRP-1: tyrosinase-related protein-1

⁶⁾TRP-2: tyrosinase-related protein-2

⁷⁾MITF-M: microphthalmia-associated transcription factor-M

⁸⁾β-Actin: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

[0068]

[0069]

5. 통계학적 분석

[0070]

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 $\alpha=0.001$, $\alpha=0.01$, $\alpha=0.05$ 에서 실시하였다.

[0071]

실험결과

[0072]

1. 인 비트로(In vitro) 항산화능 실험

[0073]

1-1. 총 폴리페놀 함량

[0074]

회화나무 추출물의 총 폴리페놀 함량은 38.9mg/g이었다(도 1 참조).

[0075]

1-2. 총 플라보노이드 함량

[0076]

회화나무 추출물의 총 플라보노이드 함량은 65.2mg/g이었다(도 1 참조).

[0077]

1-3. 전자공여능

[0078]

양성대조군인 BHT와 회화나무 추출물 모두 농도에 따른 정적인(+) 양-반응 관계를 나타냈으며, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 85.0%, 14.6% 이었다(도 2 참조).

[0079]

2. 인 비트로(In vitro) 세포주 실험

[0080]

2-1. MTT 분석

- [0081] 회화나무 추출물은 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 모두 89% 이상의 성장율을 보여 Melan-a 세포에 대해 독성이 미미한 것으로 나타났으며, 최대허용농도(maximum permissible level, MPL)는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상으로 확인되었고, IBMX는 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것으로 확인되었다(도 3 참조).
- [0082] **2-2. 멜라닌 생성능**
- [0083] 대조군과 비교할 때 양성 대조군인 IBMX는 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 멜라닌 양이 16.7%($p<0.01$) 많았고, 회화나무 추출물은 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 9.4%($p<0.05$), 25.5%($p<0.001$), 32.5%($p<0.001$), 39.6%($p<0.001$) 높게 나타나 멜라닌 생성능이 우수한 것으로 확인되었다(도 4 참조).
- [0084] **2-3. 세포의 형태 관찰**
- [0085] 시료를 농도별로 처리한 Melan-a 세포의 형태학적 관찰에서 회화나무 메탄올 추출물 처리군은 농도 의존적으로 수지상 돌기의 발달과 멜라닌 침착정도가 증가하였고, 대조군과 양성대조군인 IBMX에 비해 수지상 돌기의 발달과 멜라닌 침착정도가 높았다(도 5 참조).
- [0086] **2-4. 세포내 티로시나아제 활성능**
- [0087] 대조군에 비해 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 회화나무 추출물 처리군에서 각각 13.6%($p<0.001$), 21.9%($p<0.001$), 35.5%($p<0.001$), 36.3%($p<0.001$) 높았고, 양성대조군인 IBMX는 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 22.2%($p<0.001$) 높았다(도 6 참조).
- [0088] **2-5. 세포 추출된 티로시나아제 활성능**
- [0089] 대조군에 비해 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 회화나무 추출물 처리군에서 각각 1.6%, 17.9%($p<0.001$), 20.1%($p<0.001$), 31.3%($p<0.001$) 높았고, 양성대조군인 IBMX는 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 21.2%($p<0.001$) 높았다(도 7 참조).
- [0090] **2-6. 티로시나아제 mRNA 발현에 대한 SJME의 영향**
- [0091] 대조군에 비해 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 회화나무 추출물 처리군에서 각각 14%($p<0.001$), 16%($p<0.001$), 22%($p<0.001$), 20%($p<0.001$) 높았고, 양성대조군인 IBMX는 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.31($p<0.001$) 높았다(도 8 참조).
- [0092] **2-7. TRP-1 mRNA 발현에 대한 SJME의 영향**
- [0093] 대조군에 비해 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 회화나무 추출물 처리군에서 각각 6%, 7%, 5%, 6% 높았고, 양성대조군인 IBMX는 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 2% 높았지만 유의하지는 않았다(도 9 참조).
- [0094] **2-8. TRP-2 mRNA 발현에 대한 SJME의 영향**
- [0095] 대조군에 비해 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 회화나무 추출물 처리군에서 각각 3%($p<0.05$), 14%($p<0.05$), 6%($p<0.05$), 7%($p<0.05$) 높았고, 양성대조군인 IBMX는 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 9%($p<0.05$) 높았다(도 10 참조).
- [0096] **2-9. MITF-M mRNA 발현에 대한 SJME의 영향**
- [0097] 대조군에 비해 회화나무 추출물 처리군은 모두 낮았고, 양성대조군인 IBMX는 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 74% ($p<0.001$) 높았다(도 11 참조).

- [0098] 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.
- [0099] **참고문헌**
- [0100] Amae, S., N. Fuse, K. Yasumoto, S. Sato, I. Yajima, H. Yamamoto, T. Uono, Y. K. Durlu, M. Tamai, K. Takahashi, and S. Shibahara. 1998. Identification of a novel isoform of microphthalmia-associated transcription factor that is enriched in retinal pigment epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247: 710-715.
- [0101] A.O.A.C. 1995. Association of official analytical Chemists Official methods of analysis(12th). Washington D.C.: A.O.A.C.
- [0102] Beecher, G. R. 2003. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutritional Biochemistry* 133: 3248-3254.
- [0103] Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- [0104] Boude, A. M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68: 2722-2735.
- [0105] Chung, S. W., Y. M. Ha, Y. J. Kim, S. Song, H. Lee, H. Suh, and H. Y. Chung. 2009. Inhibitory effects of 6-(3-hydroxyphenyl)-2-naphthol on tyrosinase activity and melanin synthesis. *Archives of Pharmacal Research* 2: 289-294.
- [0106] David, A. B. 2001. Skin pigmentation enhancers. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology* 63: 148-161.
- [0107] Di, C. G., M. Mascolo, A. A. Izzo, and F. Capasso. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science* 65: 337-353.
- [0108] Eklund, P. C., O. K. Langvik, J. P. Warna, T. O. Salmi, S. M. Willfor, and R. E. Sjöholm. 2005. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Organic and Biomolecular Chemistry* 21: 3336-3347.
- [0109] Fan, L., Y. Dongsheng, X. Zhou, Hu. D. N, and Q. Jia. 2007. Expression of melanin-related genes in cultured adult human retinal pigment epithelium and uveal melanoma cells. *Molecular Vision* 13: 2066-2072.
- [0110] Folin, O., and W. Denis. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biochemistry and Chemistry* 12: 239-249.
- [0111] Fuse, N., K. Yasumoto, K. Takeda, S. Amae, M. Yoshizawa, T. Uono, K. Takahashi, M. Tamai, Y. Tomita, M. Tachibana, and S. Shibahara. 1999. Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus. *Journal of Biochemistry* 126: 1043-1051.
- [0112] Grupp, C., H. John, U. Hemprich, A. Singer, U. Munzel, and G. A. Muller. 2001. Identification of nucleated cells in urine using lectin staining. *American Journal of Kidney Diseases* 37: 84-93.
- [0113] Hwang, S. H., S. Y. Choi, J. H. Lee, S. N. Kim, J. K. In, S. K. Ha, E. J. Lee, T. Y. Kim, S. Y. Kim, S. Choi, and S. H. Kim. 2010. Identification of a potent and noncytotoxic inhibitor of melanin production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18: 5602-5609.
- [0114] Helen, K. E., G. G. Nikos, J. G. David, and P. W. Anthony. 2007. Autoantibody responses to melanocytes

in the depigmenting skin disease vitiligo. *Autoimmunity Reviews* 6: 138-142.

- [0115] Hershey, C. L., and D. E. Fisher. 2005. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of MITF-J/Mitf-J isoform. *Gene* 347: 73-82.
- [0116] Hoganson, G. E., F. Ledwith-Rigby, R. L. Davidson, B. B. Fuller, C. D. Smith, R. Radi, W. H. Koppenol, and J. S. Beckman. 1994. On the Regulation of tyrosinase mRNA levels in mouse melanoma cell pH-dependent yield of hydroxyl radical products from peroxyl radicals by melanocyte-stimulating hormone and cyclic AMP, nitrite. *Free Radical Biology & Medicine* 16: 331-338.
- [0117] Huang, Y. H., T. H. Lee, K. J. Chan, F. L. Hsu, Y. C. Wu, and M. H. Lee. 2008. Anemonin is a natural bioactive compound that can regulate tyrosinase-related proteins and mRNA in human melanocytes. *Journal of Dermatological Science* 49: 115-123.
- [0118] Huber, W. E., E. R. Price, H. R. Widlund, J. Du, I. J. Davis, M. Wegner, and D. E. Fisher. 2003. A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates a-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *Journal of Biological Chemistry* 278: 45224-45230.
- [0119] Jin, J., Z. Li, and F. Zhang. 2006. Scavenging function of mulberryvinegar extractives for 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).
- [0120] *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry* 34: 135-137.
- [0121] Kent, G., and M. S. Al' Abadie. 1996. Psychologic effects of vitiligo: a critical incident analysis. *Journal of American Academy of Dermatology* 35: 895-898.
- [0122] Kiken, D. A., and D. E. Cohen. 2002. Contact dermatitis to botanical extracts. *American Journal of Contact Dermatitis* 13: 148-152.
- [0123] Kim, H. J., S. H. Seo, B. G. Lee, and Y. S. Lee. 2005. Identification of tyrosinase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis*. *Planta Medica* 71: 785-787.
- [0124] Kim, Y. J., and H. Uyama. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Molecular and Cellular Biology* 62: 1707-1023.
- [0125] Koo, J. H., H. T. Kim, H. Y. Yoon, K. B. Kwon, I. W. Choi, S. H. Jung, H. U. Kim, B. H. Park, and J. W. Park. 2008. Effect of xanthohumol on melanogenesis in B16 melanoma cells. *Experimental and Molecular Medicine* 3: 313-319.
- [0126] Kratchanova, M., P. Denev, M. Ciz, A. Lojek, and A. Mihailov. 2010. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochimica Polonica* 2: 229-234.
- [0127] Lee, M. H., Y. P. Lin, F. L. Hsu, G. R. Zhan, and K. Y. Yen. 2006. Bioactive constituents of *Spatholobus suberectus* in regulating tyrosinase-related proteins and mRNA in HEMn cells. *Phytochemistry* 67: 1262-1270.
- [0128] Levy, C., M. Khaled, and D. E. Fisher. 2006. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine* 12: 406-414.
- [0129] Loa, Y. H., R. D. Lin, Y. P. Lin, Y. L. Liue, and M. H. Lee. 2009. Active constituents from *Sophora japonica* exhibiting cellular tyrosinase inhibition in human epidermal melanocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 124: 625-629.
- [0130] Lucille, P., J. M. Routaboul, V. Cheynier, L. Lepiniec, and I. Debeaujon. 2006. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *TRENDS in Plant Science* Vol. 12, No. 1.
- [0131] Ma, L., and F. C. Lou. 2006. The anticancer activity in vitro of constituents from fruits of *Sophora japonica*. *Chinese Journal Of Natural Medicines* 4: 151-153.

- [0132] Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, and L. Jimenez. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-747.
- [0133] Mallick, S., S. K. Singh, C. Sarkar, B. Saha, and R. Bhadra. 2005. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins in vitro. *Pigment Cell Research* 18: 25-33.
- [0134] Maxine, E., B. A. Whitton, M. Darren. Ashcroft and Urba` Gonzalez. 2008. Therapeutic interventions for vitiligo. *Journal of the American Academy of Dermatology* 59: 713-717.
- [0135] Michaela, B., and J. H. Vincent. 2008. Modifying skin pigmentation-approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 22: 189-199.
- [0136] Momtaz, S., N. Lall, and A. Basson. 2008. Inhibitory activities of mushroom tyrosine and DOPA oxidation by plant extracts. *South African Journal of Botany* 74: 577-582.
- [0137] Moretti, S., A. Spallanzani, L. Amato, G. Hautmann, I. Gallerani, M. Fabiani, and P. Fabbri. 2002. New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. *Pigment Cell Research* 15: 87-92.
- [0138] Marmol, V., and F. Beermann. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Letters* 381: 165-168.
- [0139] Naughton, G. K., M. Eisinger, and J. C. Bystry. 1983. Antibodies to normal human melanocytes in vitiligo. *Journal of Experimental Medicine* 158: 246-251.
- [0140] Nordlund, J. J., and A. B. Lerner. 1982. Vitiligo: it is important. *Archives of Dermatology* 118: 5-8.
- [0141] Oboki, K., E. Morii, T. R. Kataoka, T. Jippo, and Y. Kitamura. 2002. Isoforms of mitranscription factor preferentially expressed in cultured mast cells of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 1250-1254.
- [0142] Ogg, G. S., P. R. Dunbar, P. Romero, J. L. Chen, and V. Cerundolo. 1998. High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *Journal of Experimental Medicine* 188: 1203-1208.
- [0143] Ongenae, K., L. Beelaert, N. V. Geel, and J. M. Naeyaert. 2006. Psychosocial effects of vitiligo. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 20: 1-8.
- [0144] Ongenae, K., N. Van Geel, J. M. .Naeyaert. 2003. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Research* 16: 90-100.
- [0145] Ozcelik, O., J. H. Lee, and D. B. Min. 2003. Effects of light, oxygen and pH on the Absorbance 330 of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science* 68: 487-490.
- [0146] Papadopoulos, L., R. Bor, and C. Legg. 1999. Coping with the disfiguring effects of vitiligo: a preliminary investigation into the effects of cognitive-behavioral therapy. *British Journal of Medical Psychology* 72: 385-396.
- [0147] Paker, L., and A. S. H. Ong. 1998. Biological oxidants and antioxidants: molecular mechanisms and health effects. Champain: AOCS Press.
- [0148] Parvez, S., M. Kang., H. Chung, C. Cho, M. Hong, M. Shin, and H. Bae. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research* 20: 921-934.
- [0149] Pawelek, J., A. Korner, and A. Bergstrom. 1980. New regulation of melanin biosynthesis and autodestruction of melanoma cells. *Nature* 286: 617-619.
- [0150] Rajatanavin, N., T. Somsak, T. Wisuttida, and L. Laor. 2003. Narrowband ultraviolet B radiation therapy for recalcitrant vitiligo in Asians. *Journal of American Academy of Dermatology* 3: 473-476.
- [0151] SCnchez-Moreno, C., J. A. Larrauri, and F. Saura-Calixto. 1998. A procedure to measure the

antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of Science of Food and Agriculture* 76: 270-276.

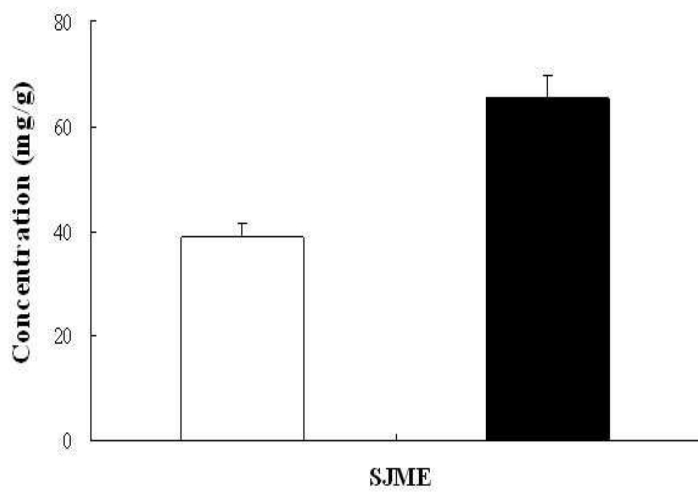
- [0152] Scalbert, A., and G. Williamson. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130: 2073-2085.
- [0153] Schallreuter, K. U., J. M. Wood, and J. Berger. 1991. Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology* 97: 1081-1085.
- [0154] Shibahara, S., K. Yasumoto, S. Amae, N. Fuse, T. Uono, and K. Takahashi. 1999. Implications of isoform multiplicity of microphthalmia-associated transcription factor in the pathogenesis of auditory-pigmentary syndromes. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 4: 101-104.
- [0155] Stefano, P., and S. Crispian. 2009. Oral health and disease: a review. *Journal of dentistry* 37: 413-423.
- [0156] Sturm, R. A., R. D. Teasdale, and N. F. Box. 2001. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* 277: 49-62.
- [0157] Takeda, K., K. Yasumoto, N. Kawaguchi, T. Uono, K. Watanabe, H. Saito, K. Takahashi, M. Noda, and S. Shibahara. 2002. Mitf-D, a newly identified isoform, expressed in the retinal pigment epithelium and monocyte-lineage cells affected by Mitf mutations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1574: 15-23.
- [0158] Tiedtke, J., J. Morel, and O. Marks. 2004. Depigmentation factor Bioflavonoids- A safe and effective skin lightening based on encapsulated citrus bioflavonoids. *Natural Ingredients* 2004: 12-17.
- [0159] Tripathi, R. K., V. J. Hearing, K. Urabe, P. Aroca, and R. A. Spritz. 1992. Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry* 267: 23707-23712.
- [0160] Uono, T., K. Yasumoto, K. Takeda, S. Amae, K. Watanabe, H. Saito, N. Fuse, M. Tachibana, K. Takahashi, M. Tamai, and S. Shibahara. 2000. Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters. *Biochimica et Biophysica Acta* 491: 205-219.
- [0161] Vachtenheim, J., and J. Borovansky. 2004. Microphthalmia transcription factor: a specific marker for malignant melanoma. *Prague Medical Report* 105: 318-324.
- [0162] Vaknin, H., A. B. Akiva, R. Ovadia, A. N. Levi, I. Forer, D. Weiss, and M. O. Shamir. 2005. Active anthocyanin degradation in *Brunfelsia calycina* (yesterday-today-tomorrow) flowers. *Planta* 222: 19-26.
- [0163] Wang, J. H., Y. L. Wang, and F. C. Lou. J. 2001. Acacia trees the chemical constituents of the seeds. *Journal of China Pharmaceutical University* 32: 471.
- [0164] Wang, K. H., R. D. Lin, F. L. Hsu, Y. H. Huang, H. C. Chang, C. Y. Huang, and M. H. Lee. 2006. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 353-359.
- [0165] Wakamatsu, K., R. Kavanagh, A. L. Kadekaro, S. Terzieva, R. A. Sturm, S. Leachman, Z. A. Malek, and S. Ito. 2006. Diversity of pigmentation in cultured human melanocytes is due to differences in the type as well as quantity of melanin. *Pigment Cell Research* 19: 154-162.
- [0166] Weilbaecher, K. N., G. Motyckova, W. E. Huber, C. M. Takemoto, T. J. Hemesath, Y. Xu, C. L. Hershey, N. R. Dowland, A. G. Wells, and D. E. Fisher. 2001. Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf mi/mi mice. *Molecular Cell* 8: 749-758.
- [0167] Westerhof, W., and M. d'Ischia. 2007. Vitiligo puzzle: the pieces fall in place. *Pigment Cell Research* 20: 345-359.
- [0168] Yaar, M., C. Wu, H. Y. Park, L. Panova, G. Schutz, and B. A. Gilchrest. 2006. Bone morphogenetic protein-4, a novel modulator of melanogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 281: 25307-25314.
- [0169] Yasumoto, K., K. Yokoyama, K. Takahashi, Y. Tomita, and S. Shibahara. 1997. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human

tyrosinase family genes. Journal of Biological Chemistry. 272: 503-509.

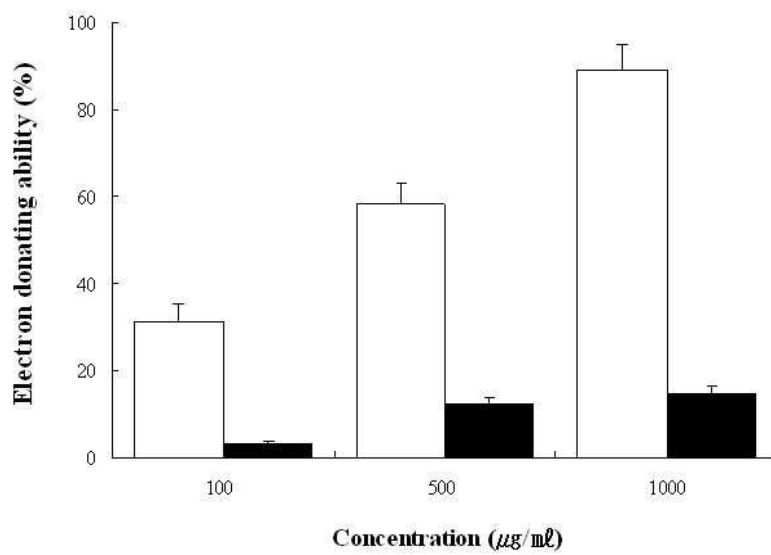
[0170] Zhao, Z. Z. 2004. An Illustrated Chinese Materia Medica in Hong Kong. School of Chinese Medicine. Hong Kong: Hong Kong Baptist University.

도면

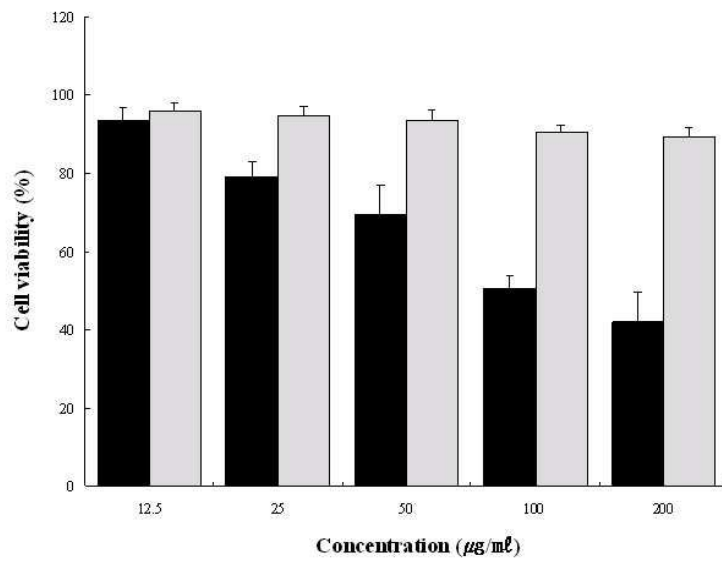
도면1



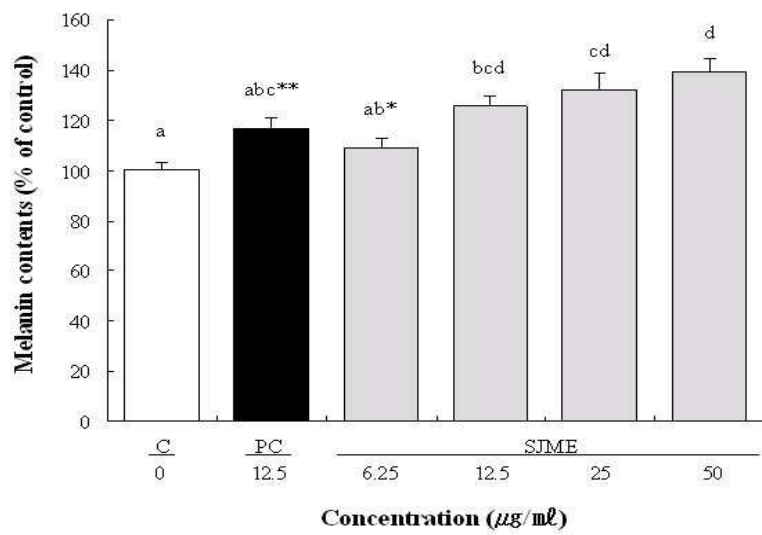
도면2



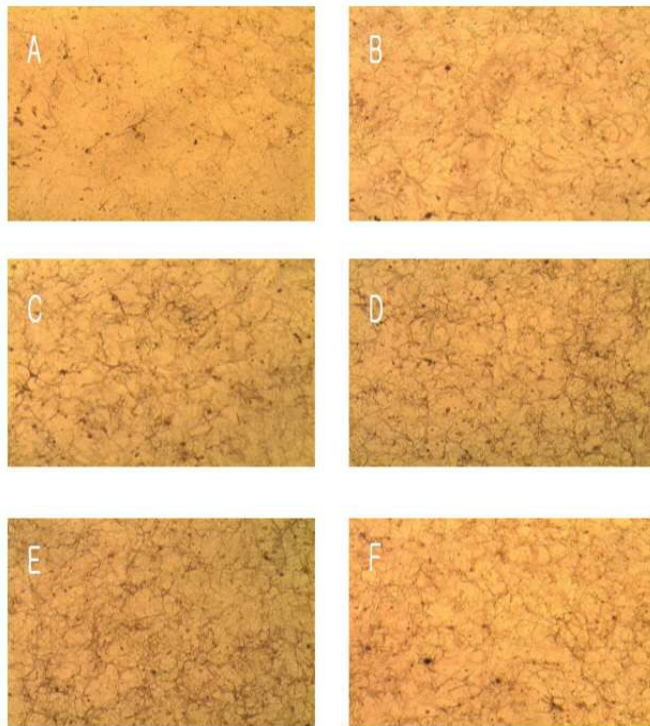
도면3



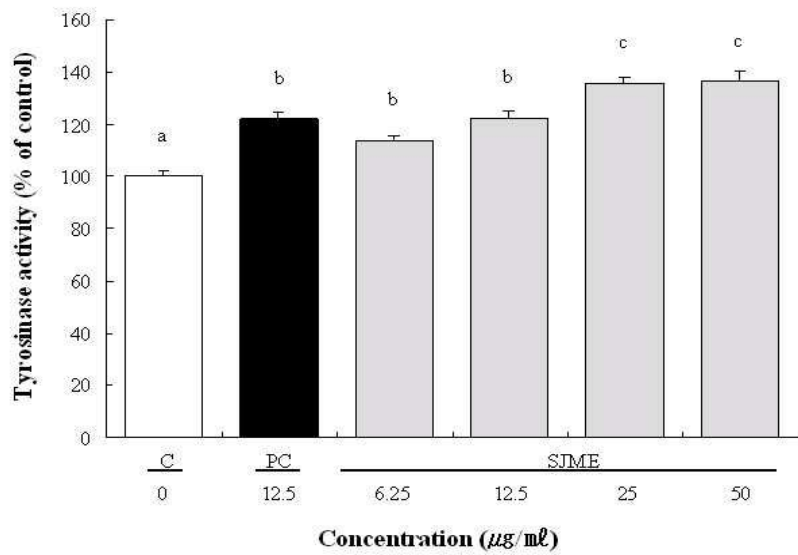
도면4



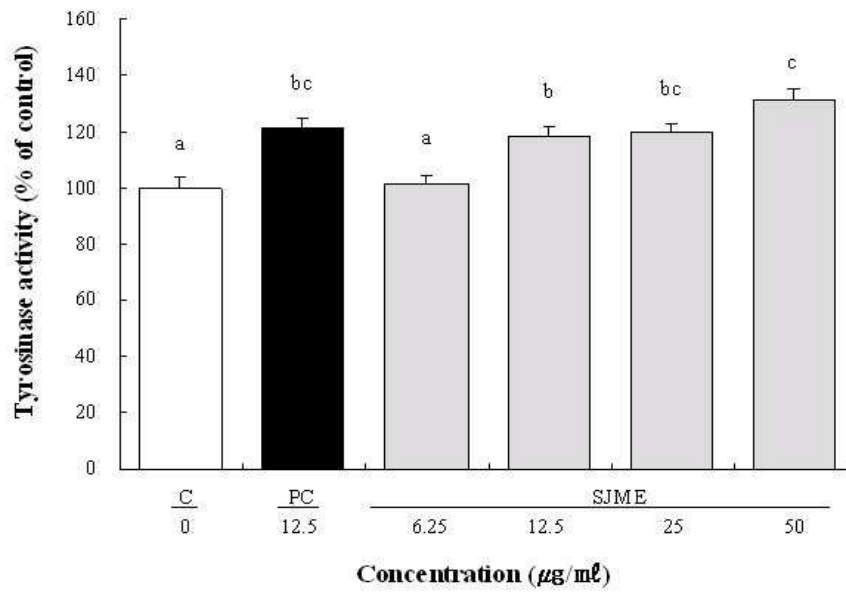
도면5



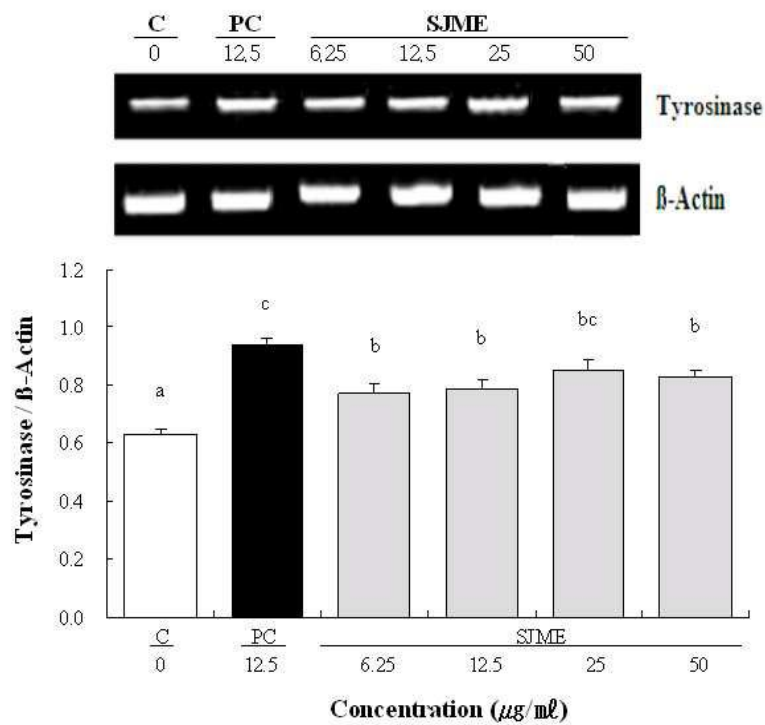
도면6



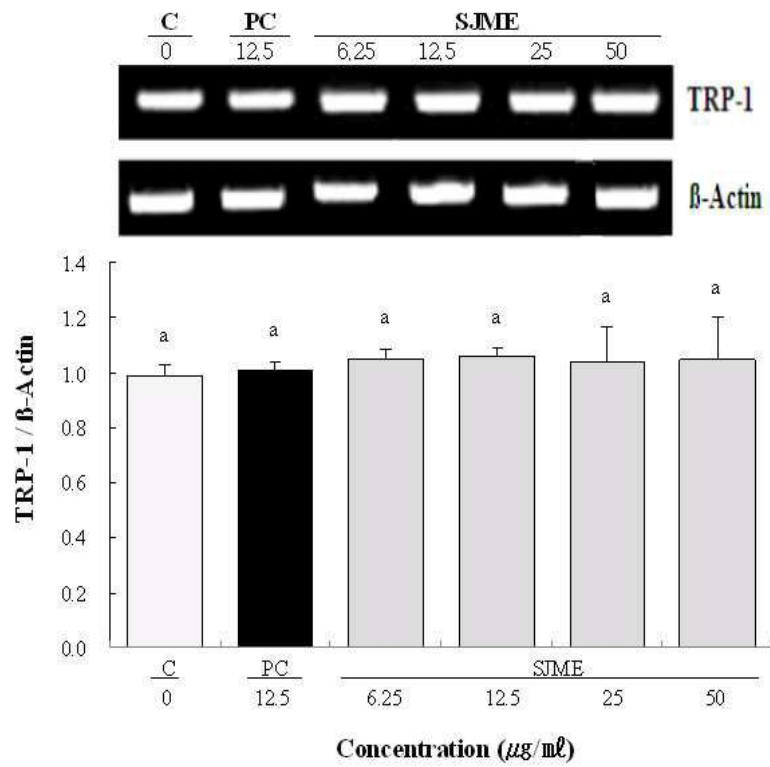
도면7



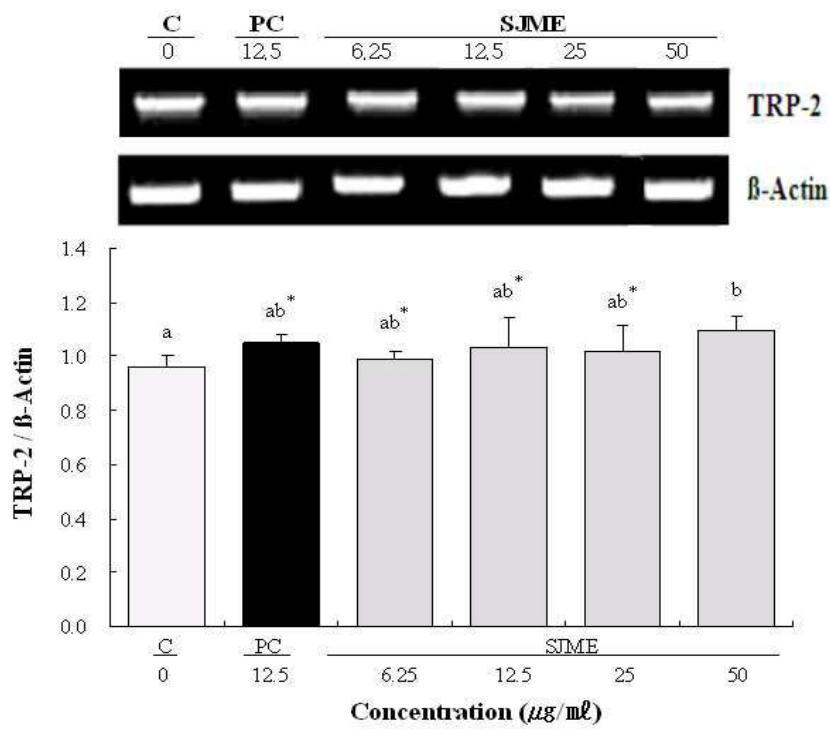
도면8



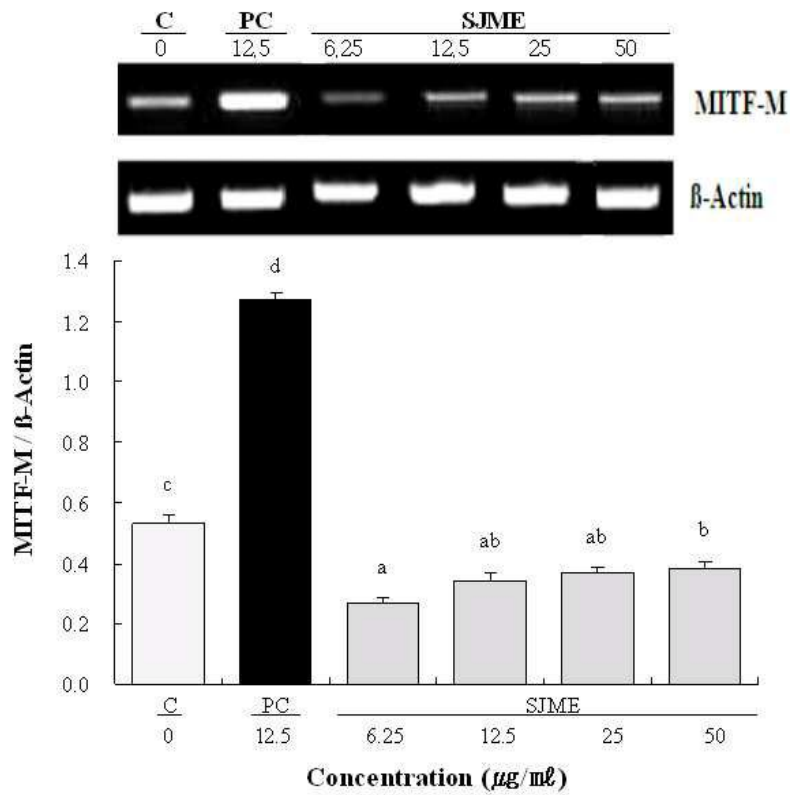
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Keimyung University Industry Academic Cooperation Foundation
- <120> Composition for Improving Vitiligo or Canities Comprising Extract From *Sophora japonica* As Active Ingredient
- <160> 10
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PCR forward primer for Tyrosinase
- <400> 1
- catttttgat ttgagtgtct 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220><223> PCR reverse primer for Tyrosinase

<400> 2
tgtggtagtc gtctttgtcc 20

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR forward primer for TRP-1
<400> 3
gctgcaggag ccttctttct c 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR reverse primer for TRP-1
<400> 4
aagacgtgc actgctggtc t 21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR forward primer for TRP-2
<400> 5
ggatgaccgt gagcaatggc c 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR reverse primer for TRP-2
<400> 6
cggttgtgac caatgggtgc c 21

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR forward primer for MITF-M

<400>	7	
tacagaaagt agagggagga ggactaag		28
<210>	8	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR reverse primer for MITF-M	
<400>	8	
cacagttgga gttaagagtg agcatagcc		29
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR forward primer for beta-Actin	
<400>	9	
accgtgaaaa gatgaccag		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR reverse primer for beta-Actin	
<400>	10	
tacggatgtc aacgtcacac		20