(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0073954
(43) 공개일자 2020년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/49 (2006.01) *A61Q 17/04* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/498 (2013.01)
A61Q 17/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0014586
(22) 출원일자 2019년02월07일
심사청구일자 2019년02월07일
(30) 우선권주장
1020180162198 2018년12월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
오명숙
서울특별시 강남구 삼성로 151 1동 305호 (대치동, 선경아파트)
노동진
서울특별시 동대문구 이문로6길 39 303호
(74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 9 항

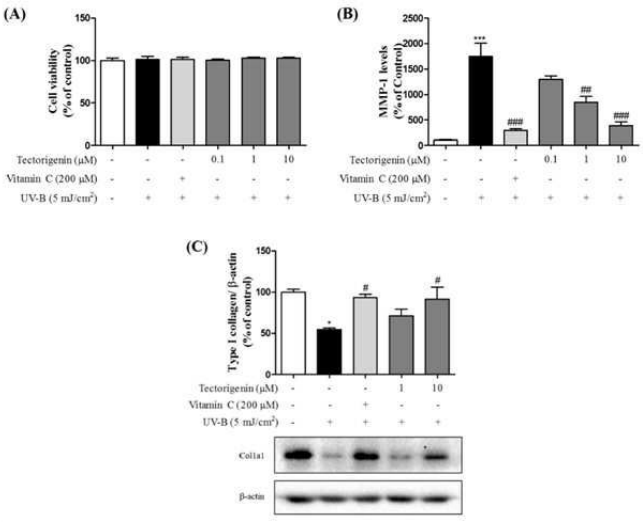
(54) 발명의 명칭 **텍토리게닌을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 텍토리게닌(*Tectorigenin*)을 포함하는 개선용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로는, 텍토리게닌을 포함하는 피부 노화 또는 주름 개선용 화장료 조성물, 피부 개선용 식품 조성물, 의약외품 조성물 및 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 노화 방지 또는 주름 개선 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 텍토리게닌은 UV-B로 인한 활성 산소 증가, 항산화 활동 감소, 콜라겐 분해 및 세포 자살을 억제 또는 보호 효과가 우수하여 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선을 위한 화장품, 의약품 및 의약외품 조성물에 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61Q 19/08 (2013.01)

명 세 서

청구범위

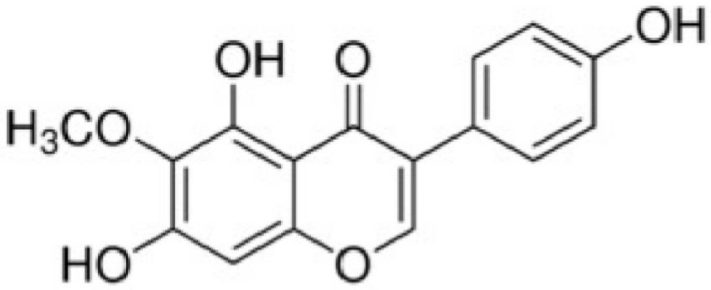
청구항 1

텍토리게닌을 유효 성분으로 포함하는, 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 텍토리게닌은 하기 화학식 1로 표시되는 것인 화장료 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유효성분은 전체 조성물 대비 0.0001 내지 10 중량%를 포함하는 것인, 화장료 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유효성분은 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 것인, 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형을 갖는 것인, 화장료 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 피부 노화는 광노화인 것인, 화장료 조성물.

청구항 7

텍토리게닌을 유효성분으로 포함하는, 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 식품 조성물.

청구항 8

텍토리게닌을 유효성분으로 포함하는, 피부개선용 의약외품 조성물.

청구항 9

텍토리게닌을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 텍토리게닌(*Tectorigenin*)을 포함하는 개선용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로는, 텍토리게닌을 포함하는 피부 노화 또는 주름 개선용 화장료 조성물, 피부 개선용 식품 조성물, 의약외품 조성물 및 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 노화 방지 또는 주름 개선 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 주름, 색소 침착 및 건조 등을 포함하여 피부의 노화라 일컫는다. 피부의 노화는 2가지로 나뉘는데 나이로 인한 노화 및 자외선-A(*UV-A*), 자외선-B(*UV-B*) 및 대기 오염과 같은 외부 요인으로 인한 외부 노화가 있다. UB-A는 긴 파장의 자외선으로(315-400nm), UV-B 보다 피부 깊숙이 침투해 진피에 손상을 주고, 자외선(*UV-B*)의 중간 파장(280-315nm)은 DNA에 직접 영향을 주어 표피를 손상시킨다고 알려져 있다. 이 중 UV-B는 UV-A 보다 에너지량이 높아 피부 항상성을 무너뜨리는 주요 원인으로 꼽힌다. UV-B는 Matrix metalloproteinase-1 (*MMP-1*)의 발현을 촉진하는데 이는 콜라겐 타입 I을 분해하는 주요 콜라겐 분해 요소로써 피부의 장력을 잃게 하고, 주름을 형성하는데 기여한다.

[0004] 또한, 담배 연기 및 오존과 같은 상기 외부 요인은 피부 세포에서 활성 산소를 생성함으로써 피부를 손상시킨다. 활성 산소 발생의 결과 중 하나는 Bcl-2 관련 단백질-x(*Bax*) 수준의 증가로 세포막의 전하-의존 음이온 채널의 활성화, 미토콘드리아 막전위의 감소를 야기한다. 게다가 Bax는 미토콘드리아에서 사이토크롬c의 방출을 유도하고 caspase-3를 활성화시켜 세포를 죽음에 이르게 한다.

[0005] 피부는 산화 손상으로부터 자신을 보호하고 정상적인 생리 상태를 유지하기 위하여 Superoxide dismutase(*SOD*), 카탈라아제(*catalase*) 및 글루타티오네(*GSH*)와 같은 항산화 효소들을 포함하는 방어 메커니즘을 가지고 있다.

[0006] 파이토케미컬은 천연 성분으로써, 건선 및 아토피 피부염과 같은 다양한 질병을 치료하는데 오랫동안 사용되어 왔다. 이러한 식물에서 추출한 화합물은 수확하기 쉬우며, 산화 방지 특성으로 인해 피부의 광노화를 완화시킨다. 예를 들어 녹차에서 발견되는 (-)-epigallocatechin-3-gallate는 UV로부터 피부를 보호한다. 붉은 양파에 많이 함유되어 있는 플라보놀인 Quercetin는 핵인자 k-B를 유도를 억제하여 UV로 인해 유도되는 항염증 사이토카인의 생산으로부터 인간 각질형성세포를 보호한다. 이러한 결과들은 아직 규명되지 않은 다른 플라보노이드들 역시 UV-B로부터 피부 손상을 보호하는 효과를 가지고 있을 것이라 암시한다.

[0007] 텍토리게닌은 범부채(*Belamcanda chinensis* L.)의 성분으로(화학식 1), 항산화 효소 발현을 유도하여 산화 방지 효과는 나타내는 것이라 여겨진다. 예를 들어, 텍토리게닌은 SH-SY5Y 세포에서 SOD, catalase, 또는 GSH peroxidase의 수준을 상향조절하여 1-메틸-4-페닐피리디니움(*1-methyl-4-phenylpyridinium*)에 의해 유도되는 산화 스트레스를 약화시키는 것으로 나타났다. 지금까지 텍토리게닌의 두피 상태 개선, 골 형성 촉진에 대한 발명은 이루어 졌으나 피부 노화 또는 피부 주름 개선에 대한 효과에 대한 발명은 이루어 지지 않았다.

[0008] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 천연에 존재하는 천연자원들로부터 우수한 피부 개선 효과를 나타내는 물질에 관하여 예의 연구노력한 결과, 텍토리게닌이 UV-B로부터 각질형성세포를 보호하여 세포 사멸 억제, GSH 및 catalase와 같은 항산화 효소 조절, 세포 자살 단백질인 Bcl-2, Bax 및 caspase-3의 수준 감소, MMP-1으로 인한 콜라겐 분해를 억제함을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 텍토리게닌을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 하나의 목적은 텍토리게닌을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 텍토리게닌을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 노화 방지 또는 주름 개선 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은 천연에 존재하는 천연자원들로부터 우수한 피부 개선효과를 나타내는 물질을 이용한 다양한 연구 수행 결과, 텍토리게닌이 UV-B로부터 각질형성세포를 보호하여 세포 사멸 억제, GSH 및 catalase와 같은 항산화 효소 조절, 세포 자살 단백질인 Bcl-2, Bax 및 caspase-3의 수준 감소, MMP-1으로 인한 콜라겐 분해를 억제함을 확인하였다.

[0016] 이를 통해 텍토리게닌이 피부 노화 또는 피부 주름 개선을 위한 화장료 조성물로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 상기 피부 노화 또는 피부 주름 개선 효과를 가지는 텍토리게닌을 포함하는 화장료 조성물은 지금까지 전혀 알려지지 않고, 본 발명자에 의해 최초로 개발되었다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다.

[0018] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 텍토리게닌을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에서 사용된 용어, "텍토리게닌"은 범부채(*Belamcanda chinensis* L.)의 성분으로, 범부채는 처음 싹이 나와서부터 질서 있게 퍼지면서 자라는 모양이 부채꼴 같다고 하여 범부채라 불렸다. 고려 때부터 호의선(虎矣扇)이라고 부르던 것이 『동의보감』에 범부채·범부처로 되어 지금에 이르고 있다. 길이 30~50㎝, 너비 2~4㎝로 끝이 뾰족하고 밑부분이 서로 얼싸안는 형태를 보이고, 꽃은 황적색 바탕에 짙은 반점이 있는데 7~8월에 피며, 범부채의 성분인 텍토리게닌은 항염, 항암 효능이 있어 염증이나 종기 치료, 폐암 치료 등에 효과적인 것으로 알려져 있고, 산화스트레스를 억제하는 항산화 물질로도 알려져 있으나, 텍토리게닌의 피부 노화 혹은 피부 주름 개선 효과에 대해서는 본 발명자가 최초로 규명한 것이다. 상기 텍토리게닌은 상업적으로 판매되는 것을 구입할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0022] 상기 항산화는 산화를 억제하는 작용을 의미하는 것으로, 인체에는 산화촉진 물질(*prooxidant*)과 산화억제물질(*antioxidant*)이 균형을 이루고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여 이런 균형상태가 불균형을 이루게 되고 산화촉진 쪽으로 기울게 되면, 산화적 스트레스(*oxidative stress*)가 유발되어 잠재적인 세포 손상 및 병리적인 질환을 일으키게 된다.

[0023] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 텍토리게닌이 항산화 효소인 catalase와 GSH의발현을 유도함을 확인하여 텍토리게닌이 항산화 활성을 가짐을 알 수 있었다(도 3).

[0024] 본 발명에서 사용된 용어, "주름"은 피부가 쇠하여 생긴 잔줄을 의미하는 것으로, 유전자에 의한 원인, 피부 진피에 존재하는 콜라겐의 감소, 외부 환경 등에 의해 유발될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 있어서, 상기 조성물은 MMP-1의 활성을 저해하는 것일 수 있다.

[0026] 상기 MMp-1는 피부 탄력에 관여하는 콜라겐의 분해하는 역할을 갖는 효소를 의미한다.

[0027] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 텍토리게닌이 농도 의존적으로 MMP-1 저해 활성을 나타냄을 확인하여, 텍토리게닌이 주름 개선 활성을 가짐을 알 수 있었다(도 5B).

[0029] 본 발명에서 사용된 용어, "피부 노화"는 피부의 탄력 감소, 윤기 감소, 주름 생성, 재생력 약화 또는 심한 건조 등의 증상이 나타나는 것으로, 시간의 흐름 또는 외부 환경 등에 의해 유발될 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 피부 노화는 광노화인 것일 수 있다.

[0031] 상기 광노화는 태양광선의 자외선에 반복적이거나 장기간 노출 시 피부의 탄력 및 수분이 감소되고 주름이 형성되는 등 피부손상이 일어나는 현상을 의미한다.

[0032] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 인간 HaCaT 세포에 텍토리게닌을 첨가한 뒤 UV-B를 조사한 경우, UV-B만 조사한 경우와 비교하여 세포 생존율이 증가함을 확인하여, 텍토리게닌이 광노화를 억제하거나 광노화로부터 보호하는 효과를 가짐을 알 수 있었다(도 1B).

[0034] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 본 발명의 조성물을 이용하여 피부 노화 또는 주름의 증상을 억제 또는 저해하거나, 이미 나타난 피부 노화 또는 주름의 증상을 완화시키는 것을 말한다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.

[0038] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0041] 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 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 텍토리게닌을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 방지 또는 주름 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0045] 본 발명에서 사용된 용어 "텍토리게닌", "피부 노화", 및 "주름"은 상기에서 서술한 바와 같다.

[0046] 본 발명에서 사용되는 용어 "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약외품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.

[0047] 본 발명의 상기 의약외품 조성물은 바디 클렌저, 폼, 비누, 마스크, 연고제, 크림, 로션, 에센스 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에 따른 상기 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용 할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0050] 본 발명의 다른 하나의 양태는 텍토리게닌을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 노화 방지 또는 주름 개선 방법을 제공한다.

[0051] 본 발명에서 사용된 용어 "텍토리게닌", "피부 노화", 및 "주름"은 상기에서 서술한 바와 같다.

[0052] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 조성물이 항산화, 미백, 피부 노화 또는 주름 개선에 효과가 있는 특성상, 상기 조성물의 투여 경로는 피부에 도포하여 투여될 수 있다.

[0053] 본 발명의 조성물을 매일 투여 또는 간헐적으로 투여해도 좋고, 1일당 투여 횟수는 1회 또는 2~3회로 나누어 투여하는 것이 가능하다. 또한, 본 발명의 조성물은 항산화, 피부 노화 또는 주름 개선 위하여 단독으로, 또는 다른 약물 치료와 병용하여 사용할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0054] 본 발명에서 용어, "개체"는 주름 또는 피부 노화가 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적으로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0056] 종합하면, 사간 추출물이 UV-B로부터 케라틴 세포의 세포 자살과 콜라겐 저하를 방지함과 세포 내 활성 산소, 항산화 효소, MMP-1, 콜라겐 타입I, 또는 Bcl-2, Bax, caspase-3와 같은 세포 자살 단백질의 수준을 조절함으로써, 피부 노화 또는 피부 주름 개선을 위한 화장료 조성물, 의약품 및 의약외품 조성물로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

발명의 효과

[0058] 본 발명에 따른 텍토리게닌은 UV-B로 인한 활성 산소 증가, 항산화 활동 감소, 콜라겐 분해 및 세포 자살을 억제 또는 보호 효과가 우수하여 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선을 위한 화장품, 의약품 및 의약외품 조성물에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 텍토리게닌의 농도에 따른 UV-B로부터의 세포 보호 효과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 텍토리게닌의 UV-B에 의한 활성 산소 생성 억제 효과를 타나내는그래프이다.

도 3은 텍토리게닌의 UV-B에 의한 항산화 효소 감소의 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 텍토리게닌의 UV-B에 의한 세포 자살-관련 단백질인 caspase-3, Bcl-2/Bax의 조절을 나타내는 그래프이다.

도 5는 텍토리게닌의 UV-B에 의해 유도되는 MMP-1 발현과 콜라겐 분해의 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0063] **실시예 1: 텍토리게닌의 UV-B 손상으로부터 각질형성세포 보호 효과 측정**

[0064] 텍토리게닌의 광노화 억제 또는 보호 효과를 측정하기 위하여, UV-B 조사로 유도되는 세포 자살에 대한 텍토리게닌의 보호 효과를 확인하였다.

[0065] 구체적으로 세포는 HaCaT 인간 피부 각질형성세포를 준비하여 10% 열 비활성화 된 FBS 및 1% P/S가 포함된 DMEM 배양액에 접종하고, 95% 대기 및 5% CO_2와 37℃ 조건에서 배양하였으며, 텍토리게닌은 Chemfaces(후베이, 중국)에서 구입하였다.

[0066] 또한, 세포 생존력은 MTT 분석을 통해 측정하였다. 상기 인간 HaCaT 세포는 96-웰 플레이트에$1.0x10^4$ cells/well 농도로 접종하여 24시간 동안 배양하고, PBS로 세포를 워싱한 뒤, 5 Sankyo Denki 태양등으로 7.5cm 거리에서 $25mJ/cm^2$ UV-B를 조사하였다. 그 다음, 상기 세포를 DMEM으로 희석된 텍토리게닌(0.1, 1, 10μM)으로 옮겨 24시간 동안 배양하고, 1μg/mL MTT에 옮겼다. 4시간 뒤, 상등액을 100μL DMSO로 교체하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 비타민C 200μM을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0067] 실험 결과, 0.1~10μM 농도의 텍토리게닌은 HaCaT 세포에 독성을 보이지 않았으며(도 1A), UV-B 조사가 상기 인간 HaCaT 세포에 손상을 주지만, 텍토리게닌을 투여하고 UV-B를 조사하면 세포 사멸이 줄어든 것을 확인하였다(도 1B).

[0068] 따라서, 텍토리게닌이 UV-B가 조사된 인간 HaCaT 세포의 세포 생존율을 증가시키므로, 텍토리게닌이 광노화 억제 또는 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0070] **실시예 2: 텍토리게닌의 UV-B로 인한 세포 내 활성 산소 생성 억제 측정**

[0071] 텍토리게닌의 활성 산소 생성 억제 효과를 확인하기 위하여, UV-B를 조사하여 세포 내 활성 산소 생성에 대한 텍토리게닌의 억제 효과를 측정하였다.

[0072] 구체적으로, 상기 인간 HaCaT 세포를 검은 96-웰 플레이트에 $1.0x10^4$ cells/well 농도로 접종 또는 $2.0x10^4$ cells/well 농도로 24-웰 플레이트 내 커버슬립 위에 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 그 뒤, 배양액을 혈청이 없는 DMEM으로 교체하고, 24시간 후 PBS로 3번 세척하고 $25mJ/cm^2$ UV-B를 조사하였다. 다시 상기 세포를 3번 세척 후, 텍토리게닌(0.1, 1, 10μM)과 비타민C(200μM)와 30분간 반응시켰다. 상등액을 제거 후 20μM DCF-DA와 30분간 반응 후, PBS로 세척하고 형광 마이크로플레이트 해독기(SpectraMax Gemini EM, Molecular Device; Sunnyvale, USA)로 485nm 여기, 535nm 방출에서 형광을 측정하였다.

[0073] 실험 결과, UV-B 조사는 활성 산소를 상당히 증가하였으나, 텍토리게닌을투여하고 UV-B를 조사하자 활성 산소 증가가 약화되었음을 확인하였다(도 2).

[0074] 따라서, 텍토리게닌은 UV-B가 조사된 인간 HaCat 세포 내 활성 산소 증가를 억제하므로, 텍토리게닌이 광노화

억제 또는 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0076] **실시예 3: UV-B 손상을 억제하는 항산화 효소의 생성의 촉진과 UV-B로 인한 세포 자살-관련 단백질의 과발현을 억제하는 텍토리게닌**

[0077] 텍토리게닌의 세포 자살-관련 단백질의 억제 능력을 측정하기 위하여 UV-B를 조사하여 세포 자살-관련 단백질들의 과발현을 유도하고 텍토리게닌의 과발현 억제 정도를 확인하였다.

[0078] 구체적으로는, 텍토리게닌의 UV-B로 인한 세포 자살-관련 단백질의 발현을 웨스턴블랏팅을 통해 측정하였다. 인간 HaCaT 세포를 60mm 배양접시에 $1.2x10^6$ cells/well 농도로 접종하고 24시간 배양하였다. 상기 세포를 PBS로 3번 세척하고, 25mJ/cm^2 UV-B를 조사한 후, 텍토리게닌(1, 10μM)과 비타민C(200μM)를 상기 세포와 2시간 동안 반응시켰다. 그 후, 상기 세포를 원심분리를 통해 회수하여 버퍼에 용해시킨 뒤, 다시 원심분리 후 상등액을 취하였다. 단백질 농도는 키트(BioRad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 Bradford 어세이를 통해 측정하였다. 각 단백질 시료 30μg씩 SDS-아크릴라마이드 겔에 넣고 전기를 흘려주어 멤브레인을 통과하게 하였다. PBS로 희석한 β-액틴(1:3000), Bcl-2(1:500), Bax(1:500), caspase-3(1:500), catalase(1:500) 및 Colla1(1:1000)을 5% 탈지유, Tween 20 및 tris buffered saline에 담지하여 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 또한, 항-래빗 HRP-결합(1:2000) 및 항-마우스 HRP-결합(1:2000)은 2차 항체로써 1시간 동안 반응시키고, 멤브레인을 ECL 검출 키트를 사용하여 반응시켰다. 밴드 이미지는 LAS-4000 mini system (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 사용하여 촬영하였고, 촬영한 이미지는 Image J (Bethesda, MD, USA)를 통해 정량화 했으며 β-액틴의 밴드 강도와 비교하였다.

[0079] 또한, GSH 수준을 측정하기 위해, 상기 인간 HaCaT 세포를 60mm 배양 접시에 $1.2x10^6$ cells/well 농도로 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 그 다음, PBS로 세척하고 25mJ/cm^2 UV-B를 조사하였다. 다시 PBS로 세척 후, 상기 세포를 텍토리게닌(1, 10μM) 및 비타민C(200μM)와 2시간 반응시키고 상등액을 회수하여 글루타티오네 정량화 키트를 이용하여 GSH 함량을 측정하였다.

[0081] 실험 결과, UV-B 조사는 catalase, GSH 수준을 감소시킴을 확인하였다. 반면, 텍토리게닌 처리 후 UV-B를 조사하면 catalase, GSH 수준 감소가 약화됨을 확인하였다(도 3).

[0082] 또한, UV-B 조사는 caspase-3의 발현을 증가시켰다. 반면, 텍토리게닌 처리 후 UV-B를 조사하면 caspase-3의 발현 증가가 약화됨을 확인하였다(도 4A).

[0083] 또한, UV-B 조사는 Bcl-2/Bax 비율을 감소시켰다. 반면, 텍토리게닌 처리 후 UV-B를 조사하면 상기 감소가 약화됨을 확인하였다(도 4B).

[0084] 따라서, 텍토리게닌이 UV-B가 조사된 인간 HaCaT 세포에서 상기 세포 자살-관련 단백질들의 과발현을 약화시켰으므로, 텍토리게닌이 UV-B로 인한 세포 자살의 억제 또는 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0086] **실시예 4: 텍토리게닌의 UV-B로 인한 콜라겐 분해 억제 효과 측정**

[0087] 텍토리게닌의 콜라겐 분해 억제 또는 보호 효과를 측정하기 위하여, UV-B 조사 후 MMP-1과 콜라겐 타입I을 측정하였다.

[0088] 구체적으로는, 인간 HaCaT 세포를 24-웰 플레이트에 $2.0x10^4$ cells/well 농도로 접종하고 배양하였다. 그 다음, 세포에 PBS로 세척하고 5mJ/cm^2 UV-B를 조사하였다. 세척 후 세포를 텍토리게닌(1, 10μM) 및 비타민C(200μM)와 24시간 반응시키고 상등액을 회수하여 MMP-1 ELISA 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 MMP-1 수준을 측정하였다.

[0089] 또한, 상기 인간 HaCaT 세포를 60mm 배양접시에 $1.2x10^6$ cells/well 농도로 접종하고 24시간 배양하고, PBS로 3번 세척 후, 5mJ/cm^2 UV-B를 조사하였다. 그 다음, 텍토리게닌(1, 10μM)과 비타민C(200μM)를 상기 세포와 24시간 동안 반응시켜 웨스턴블랏팅을 통해 콜라겐 타입I을 측정하였다. 본 실험에서 사용된 웨스턴블랏팅의 방법

은 상기에 서술한 바와 같다.

[0090] 실험 결과, 우선, 어떠한 그룹에서도 5mJ/cm^2 UV-B로 인한 세포 사멸은 나타나지 않았다(도 5A). 반면, UV-B 조사는 MMP-1 수준을 증가시켰지만, 텍토리게닌을 처리한 후 UV-B를 조사할 경우, MMP-1의 증가가 약화되었다(도 5B).

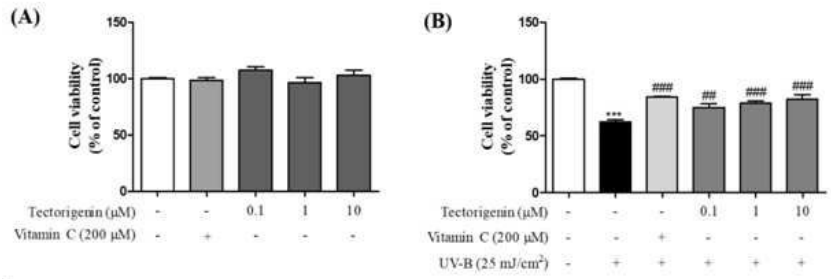
[0091] 또한, UV-B 조사는 콜라겐 타입I의 수준을 감소시켰으나, 텍토리게닌을 처리 후, UV-B를 조사할 경우, 콜라겐 타입I의 수준 감소가 약화되었다(도 5C).

[0092] 따라서, 텍토리게닌이 MMP-1의 과발현을 억제하여 콜라겐 타입I이 분해되는 것을 억제 또는 보호 하는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

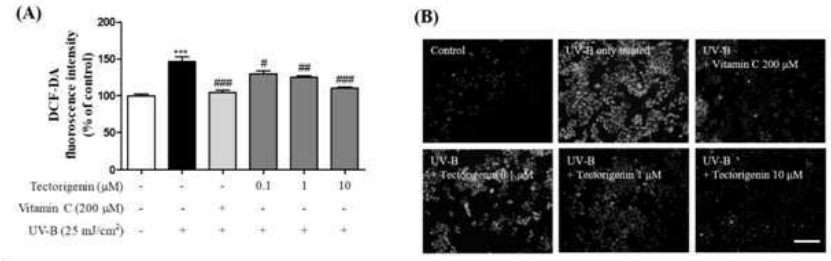
[0093] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

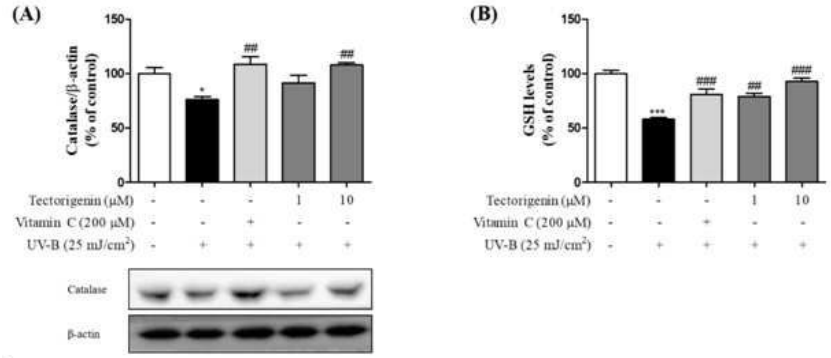
도면1



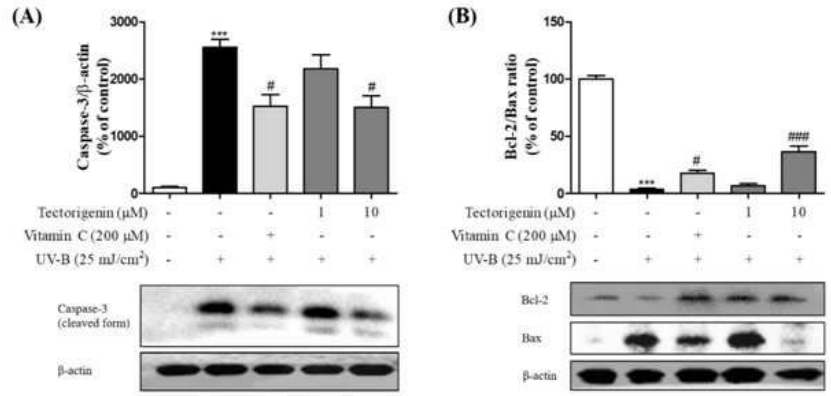
도면2



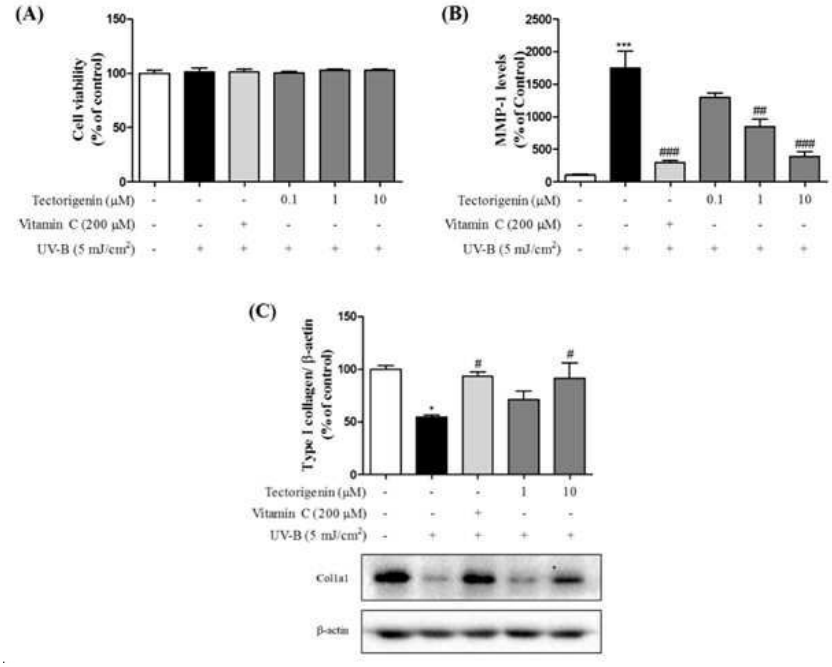
도면3


(A)
Catalase/β-actin (% of control)
Tectorigenin (μM)
Vitamin C (200 μM)
UV-B (25 mJ/cm²)
Catalase
β-actin
(B)
GSH levels (% of control)
Tectorigenin (μM)
Vitamin C (200 μM)
UV-B (25 mJ/cm²)

도면4


(A)
Caspase-3/β-actin (% of control)
Tectorigenin (μM)
Vitamin C (200 μM)
UV-B (25 mJ/cm²)
Caspase-3 (cleaved form)
β-actin
(B)
Bcl-2/Bax ratio (% of control)
Tectorigenin (μM)
Vitamin C (200 μM)
UV-B (25 mJ/cm²)
Bcl-2
Bax
β-actin

도면5


(A)
Cell viability (% of control)
Tectorigenin (μM)
Vitamin C (200 μM)
UV-B (5 mJ/cm²)
(B)
MMP-1 levels (% of Control)
Tectorigenin (μM)
Vitamin C (200 μM)
UV-B (5 mJ/cm²)
(C)
Type I collagen/ β-actin (% of control)
Tectorigenin (μM)
Vitamin C (200 μM)
UV-B (5 mJ/cm²)
Col1a1
β-actin