



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0049010
(43) 공개일자 2020년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/365 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/365 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0131766
(22) 출원일자 2018년10월31일
심사청구일자 2018년10월31일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김기영
경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호(죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)
김재구
경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46, 211동 904호(식사동, 위시티일산자이2단지아파트)
김민호
충청남도 천안시 동남구 서부대로 252, 202동 905호(신방동, 신방동두레현대아파트2단지)
(74) 대리인
위병갑

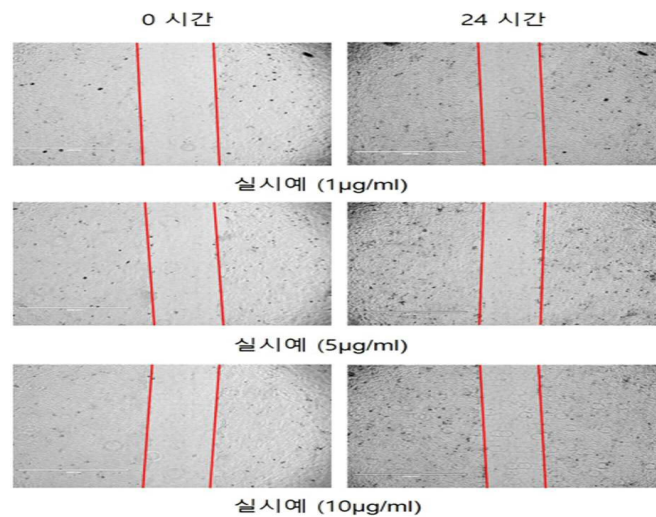
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 겐티스산을 유효성분으로 하는 피부 세포 재생용 조성물

(57) 요약

본 발명은 겐티스산(Gentisic acid)을 유효성분으로 하는 피부 세포 재생용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 겐티스산을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 조성물은 식물에서 유래한 단일 화합물을 유효성분으로 포함하므로 인체에 대한 독성이 낮고, 케라틴 세포의 생장 및 이동에 효과적이어서 상처 치료 또는 선도 물질로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20171792
부처명	한국연구재단(통합)(KNRF)
연구관리전문기관	한국연구재단(학술진흥)
연구사업명	이공분야 기초연구사업/이공학 개인기초연구지원사업
연구과제명	MAPK에 의한 신규 전사조절경로 규명과 조절물질 발굴
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

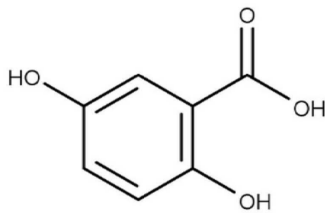
청구항 1

겐티스산(Gentisic acid)을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 겐티스산은 하기 화학식 1로 표시되는 것인 피부 세포 재생용 조성물

[화학식 1]



청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 케라틴 세포(keratinocyte)의 성장 및 이동을 촉진하는 것인 피부 세포 재생용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 케라틴 세포에서 활성화된 단백질 키나제(MAPK)에 의한 p44/42의 인산화를 증가시키는 것인 피부 세포 재생용 조성물.

청구항 5

겐티스산(Gentisic acid)을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 화장품 조성물.

청구항 6

제 5항 있어서, 상기 화장품 조성물은 화장수, 에센스, 로션, 크림, 팩, 젤, 파우더, 파운데이션 또는 세정제의 제형인 것인 피부 세포 재생용 화장품 조성물.

청구항 7

겐티스산(Gentisic acid)을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 천연물에서 추출한 겐티스산(Gentisic acid)을 유효성분을 포함하는 피부 세포 재생용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사람의 최외측에 존재하는 피부는 1차적으로 외부환경에 대한생체 내 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 기초적이며 필수적인 기관이다. 사람의 경우 피부는 바깥쪽부터 표피, 진피, 피하 조직 순으로 구성되어 있으며 이중 표피는 외부 물질의 침입을 막는 역할을 수행한다.

[0003] 표피에 존재하는 각질층(Stratum Corneum)은 죽은 케라틴 세포(keratinocyte) 들이 납작한 육각형 모양을 형성

하며 생성되며, 아래층에서 끊임없는 세포분열로 재생성 및 끊임없는 박리 탈락으로, 항상 일정한 양을 유지하여 외부의 이물질 및 미생물 침입으로부터 피부를 보호한다.

- [0004] 외부의 충격에 의한 타박상·찰과상·창상·열상, 온도 변화에 의한 화상·동상, 물리적·화학적 자극에 의한 습진 또는 부신피질 호르몬의 증가로 인한 튼살에 의해 상처가 발생하는 경우, 피부의 최외 측 각질층 및 표피 세포에 먼저 손상이 가게 되며, 그로 인해 외부의 독성 이물질 및 미생물, 바이러스들의 침투가 매우 손쉬워 진다.
- [0005] 따라서 표피층에 손상이 발생하면 빠른 세포생장에 의한 상처치유 및 복구 과정이 매우 중요하다.
- [0006] 일반적인 상처치유 과정은 상처 발생 후, 첫 번째로 손상된 혈관의 수축으로 인한 지혈되고, 두 번째로 염증성 신호물질 사이토카인 케모카인에 의한 상처부위의 염증반응 및 피사세포 제거되며, 세 번째로 세포와 세포의 기질의 증식으로 인한 회복 및 복구되고, 마지막으로 섬유아세포에 의한 콜라겐합성으로 인한 상처부위 성숙 단계로 진행된다.
- [0007] 특히, 세 번째 단계인 회복 및 복구시 여러 신호전달 물질에 의해 표피와 진피 사이의 기저층(basement membrane)에 접한 케라틴 세포가 활발한 증식을 시작하며, 일정수준의 복구가 이루어지면 케라틴 세포의 세포질의 형태가 바뀌어 표피의 상층으로 이동, 복구가 이루어진다. 결론적으로 케라틴 세포의 증식과 이동은 상처 치유과정에서 상처 부위를 봉합하는 역할을 한다.
- [0008] 또한, 피부의 재생은 상처 형성시 케라틴 세포, 섬유모 세포, 혈관내피 세포, 대식 세포, 혈소판 등 여러 종류의 세포가 상호 작용하며, 성장인자, 사이토카인 및 케모카인 등의 신호전달 물질에 의해 조절된다.
- [0009] 신호전달 물질들은 상처부위의 세포에 도착, 피부세포의 MAPK 신호전달 경로를 활성화 시키게 된다.
- [0010] MAPK(mitogen-activated protein kinases) 신호 전달경로는 ERK1/2, JNK1/2/3, p38, ERK5등 여러 단백질이 관여되어 있으며, 이 중 MAPK/ERK 신호 전달은 세포 증식과 분화, 이동, 노화에 관련이 있는 것으로 연구되어있다. 특히, 인산화된 ERK1/2는 상처치유 직후의 세포에서 많은 양이 존재하는 것으로 밝혀졌다.
- [0011] 이에 본 발명자들은 상처 치료에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 세포 중 최외측에 존재하는 케라틴 세포에 주목하여, 인체 위험성이 적은 천연화합물 중 아스피린을 이용하여 간에서 합성이 이루어지며 식물에서 항산화 물질로 존재하는 인체에 무해한 화합물을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) (0001) 대한민국 등록 특허 KR10-1695549

발명의 내용

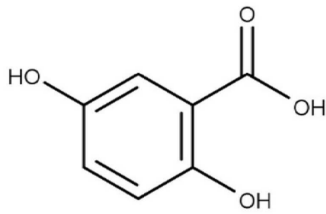
해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 상처 치료에 쓰이는 복합물 대신 인체에 무해한 겐티스산(Gentisic acid)을 이용한 케라틴 세포(keratinocyte)의 성장 및 이동을 증진시키며 이로 인해 상처 치료까지 가능한 겐티스산을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 겐티스산(Gentisic acid)을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 겐티스산은 하기 화학식 1로 표시되 된다.

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 케라틴 세포(keratinocyte)의 성장 및 이동을 촉진할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 케라틴 세포에서 활성화된 단백질 키나제(MAPK)에 의한 p44/42의 인산화를 증가시킬 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 겐티스산을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 화장품 조성물을 제공한다.

[0021] 아울러, 본 발명은 겐티스산을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 의약품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 겐티스산(Gentisic acid)을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 조성물은 인체에 대한 독성이 낮고, 케라틴 세포의 성장 및 이동에 효과적이어서 상처 치료 또는 선도 물질로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 겐티스산(Gentisic acid)의 농도별(1, 5, 10 μ g/ml) 상처 회복 활성화도(wound healing activity)를 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 2는 겐티스산(Gentisic acid)의 농도별(1, 5, 10 μ g/ml) 상처 회복 활성화도(wound healing activity)를 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 3는 겐티스산(Gentisic acid)의 농도별(1, 10, 50, 100 μ g/ml) 세포 독성을 평가한 결과이다.

도 4는 겐티스산(Gentisic acid)의 농도별(0, 1, 5, 10 μ g/ml) 세포 영향 메커니즘을 확인하기 위하여 신호 전달 단백질의 변화를 확인한 웨스턴 블롯 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

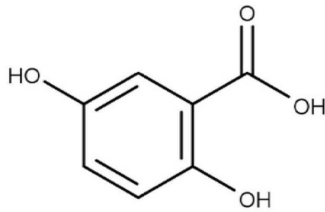
[0024] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0026] 본 발명의 연구자들은 상처치유 과정의 세번째 단계인 회복 및 복구 단계의 촉진에 중점을 두어 케라틴 세포의 세포 성장 및 이동을 촉진, 상처치유 복구 메커니즘을 증대할 수 있는 화합물에 대해 연구하였으며, 겐티스산이 세포독성은 없으면서 케라틴 세포의 성장 및 이동을 증진시키며 이로 인해 상처 치료까지 가능한 물질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0027] 따라서 본 발명은 겐티스산(Gentisic acid)을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명에서 겐티스산은 하기 화학식 1로 나타낼 수 있다.

화학식 1



[0029]

[0030]

상기 “화합물”은 겐티스산으로 명명될 수 있으며, 혹은 2,5-dihydroxybenzoate, 2,5-dihydroxybenzoic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, monosodium salt, lithium 2,5-dihydroxybenzoate으로 명명될 수 있다.

[0031]

상기 겐티스산은 하이드로퀴논(Hydroquinone)을 카르복시화하여 생산할 수 있다.

[0032]

상기 겐티스산은 엘브스 과황산염 산화(Elbs persulfate oxidation)를 통해 살리실산(Salicylic acid)에서 합성할 수 있다.

[0033]

상기 겐티스산(Gentisic acid)은 *Alchornea cordifolia*의 추출물에서 분리될 수 있다. 상기 *Alchornea cordifolia*은 아프리카 전역 열대지방에 분포하고 있으며, 전통적 아프리카 의학에 약재로 쓰이고 있다.

[0034]

상기 *Alchornea cordifolia*은 60℃ 이상의 고온의 물을 용매로 하여 추출될 수 있으며, 피리딘, 메탄올 그리고 에탄올을 용매로 하여 추출될 수 있다. 알코올 추출물은 유기용매 및 물로 분배 추출될 수 있다.

[0035]

또한, 상기 *Alchornea cordifolia* 추출물에 함유된 겐티스산의 당해 기술 분야에 널리 알려진 크로마토그래피법에 의해 분리될 수 있다. 예컨대, 상기 비극성유기 용매가 제거된 후, 컬럼크로마토그래프 용비이온성수지에 흡착될 수 있다. 상기 컬럼 크로마토그래피는 당해 기술 분야에 널리 알려진 통상적인 방법으로 수행될 수 있다.

[0036]

본 발명에 있어서, “피부세포”는 피부(표피, 진피, 피하지방층)를 이루는 세포를 말하며, 특별히 제한되는 것은 아니다. 상기 피부세포의 예로서는 표피에 존재하는 케라틴 세포(keratinocyte), 멜라닌 세포(melanocyte)와 진피에 존재하는 것이다.

[0037]

본 발명에 있어서, “재생”은 손상된 부위의 기능이 되살아나는 것을 말한다. 일 예로, 상기 재생은 세포의 직접적인 공급으로 훼손된 기관의 조직이 정상적인 기능을 하게 하는 세포 치료 방법과 세포의 생리활성물질의 공급으로 기능회복을 돕는 방법을 포함한다. 따라서, 본 발명은 치료적인 목적뿐만 아니라 노화 방지, 주름 개선 등의 다양한 목적으로 이용될 수 있으며, 이 경우 화장품 조성물, 의약품 조성물 등은 각각 본 발명의 실시예에 따른 피부세포 재생용 조성물을 유효성분으로 포함하며, 그 제형은 특별히 한정되지 않는다.

[0038]

또한, 본 발명의 겐티스산(Gentisic acid)을 유효성분으로 포함하는 조성물은 케라틴 세포의 성장 및 이동을 촉진하며, 케라틴 세포에서 활성화된 단백질 키나제(MAPK)에 의한 p44/42의 인산화를 증가시킬 수 있다.

[0040]

또한, 본 발명의 겐티스산을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 화장품 조성물을 제공한다.

[0041]

본 발명에 따른 화장품 조성물은 상기한 겐티스산 또는 허용가능한 염 외에도 필요에 따라 본 발명의 효과를 저하시키지 않는 범위 내에서 피부 외용제에 일반적으로 사용하는 각종 성분, 예를 들면 수용성 성분, 분말성분, 유분, 계면활성제, 보습제, 점도조절제, 방부제, 산화방지제, 향료, 색소 등을 배합하여 구성될 수 있다.

[0042]

본 발명에 따른 화장품 조성물은 이에 제한되는 것은 아니나, 화장수, 에센스, 로션, 크림, 팩, 젤, 파우더, 파운데이션 또는 세정제의 제형일 수 있다. 구체적으로 상기 화장품 조성물의 제형은 임의로 선택할 수 있으며, 유효성분인 겐티스산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 함께, 물, 생리식염수, 글리세롤, 유분, 계면활성제, 보습제, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제 및 향료 등과 같은 기공지된 화장료용 부형제가 혼합되어 로션제(lotiones), 액제(液劑), 유제, 에멀션제, 현탁제(懸濁劑), 정제(錠劑) 및 캡슐제(capsules) 형태를 이루는 화장품 조성물이 형성된다. 상기 화장품 조성물을 사용하여 유연 화장수, 밀크로션, 영양크림, 맛사지 크림, 에센스, 클렌싱 폼, 클렌싱 워터, 팩 또는 바디오일 등의 기초 화장품 및 파운데이션, 립스틱, 마스크라 또는 메

이크업 베이스 등의 색조 화장료를 제조할 수 있으며, 또한 세안제 및 목욕제를 제조할 수 있다.

[0043] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 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. 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 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, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 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 디메틸에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 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. 본 발명에 따른 화장료 조성물은 사용되는 양태를 고려할 때 헤어토닉, 헤어컨디셔너, 헤어에센스, 헤어로션, 헤어영양로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어트리트먼트, 헤어크림, 헤어영양크림, 헤어모이스처크림, 헤어맛사지크림, 헤어왁스, 헤어 에어로졸, 헤어팩, 헤어영양팩, 헤어비누, 헤어클렌징폼, 머릿기름, 모발건조제, 모발보존처리제, 모발염색제, 모발용 웨이브제, 모발탈색제, 헤어젤, 헤어글레이즈, 헤어드레싱어, 헤어래커, 헤어모이스처라이저, 헤어무스 또는 헤어스프레이의 제형으로 제조되는 것이 바람직하다.

[0044] 이러한 화장료 조성물의 겐티스산 또는 허용가능한 염이 피부에 흡수 및 고정되는 것을 촉진하도록, 화장료용 부형제 중에서 글리세린 1~7 중량%가 포함되어 겐티스산 또는 허용가능한 염 함유 화장료 조성물이 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 아울러 본 발명의 겐티스산을 유효성분으로 포함하는 피부 세포 재생용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0047] 상기 본 발명의 의약외품 조성물은 바디 클렌저, 소독 청결제, 세정제, 주방용 세정제, 청소용 세정제, 치약, 가글제, 물티슈, 세제, 비누, 핸드워시, 헤어세정제, 헤어 유연제, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제 및 필터 충전제로 이루어진 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] <실시예 1> 상처 회복 실험(*In vitro* scratch assay)

[0050] 상기 겐티스산(SIGMA-ALDRICH G5129)을 케라틴 세포(keratinocyte, 한국세포주은행)의 성장 및 이동에 대한 효과를 확인하기 위해 인체 유래 세포에 상처를 가한 후 성장 및 치유 비율을 측정하였다.

[0051] 겐티스산의 성장 및 이동 촉진을 확인하기 위해 겐티스산을 농도(1, 5, 10 μ g/ml)에 따라 HaCaT cell line에 처리하고 *In vitro* scratch assay를 수행하였다.

[0052] 구체적으로, HaCaT cell line을 6-well cell culture plates(SPL)의 각 well에 cell을 90% 이상 배양 후 media를 제거해준다. White tip(Sorensson)을 이용하여 각 well에 상하, 좌우로 상처를 낸 다음, PBS를 이용해 well을 씻어준 뒤 serum-free media를 각 well에 2ml 투입하고 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해된 각 물질을 표시된 농도로 추가해주었다. Microscopy(Thermo fisher scientific, USA)를 이용해 각 well의 상처 난 부분을 촬영하고 24시간 배양 뒤 다시 같은 부위에 대하여 촬영하였으며, 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다. 하기

표 1에 MEAN은 세포가 성장한 평균 비율이며, S.D는 표준편차이다.

[0053] 그 결과, 대조군(control)로 쓰인 dimethyl sulfoxide(DMSO)과 양성대조군(positive control)로 쓰인 알란토인(Allantoin)와 비교하였을 때 겐티스산이 더 높은 세포 성장 및 이동을 하였다. 이미 효능이 있다고 알려진 알란토인과 비교하여도 겐티스산이 상대적으로 좋은 활성으로 세포 성장 및 이동을 증진시켰다. 겐티스산에 의한 케라틴 세포 성장 및 이동의 증진됨을 확인하였다(도 1 및 표 1).

표 1

Wound Healing Ratio						
Concentration	Control		Allantoin		Gentisic acid	
	Mean	S.D	Mean	S.D	Mean	S.D
1 μ g/ml	7.20%	4.27%	11.17%	2.38%	16.81%	5.07%
5 μ g/ml	9.13%	1.94%	10.07%	2.26%	15.01%	3.80%
10 μ g/ml	10.38%	0.19%	10.08%	2.42%	17.98%	6.67%

[0054]

[0056] <실시예 2> 세포 독성 평가(Cytotoxicity assay)

[0057] 겐티스산의 세포에 대한 독성을 확인하기 위하여 인체 유래 세포(HaCaT)에 대한 성장을 저해하는지 측정하였다.

[0058] 구체적으로, 겐티스산에 의한 세포 독성을 확인하기 위해 겐티스산을 농도(1, 10, 50, 100 μ g/ml)에 따라 HaCaT cell line에 각각 처리하고 MTT assay를 수행하였다. 세포 독성실험은 HaCaT cell line을 사용하여 수행하였다. 각 10⁴ cells/0.1ml의 세포를 96-well tissue culture plates(SPL)의 각 well에 넣은 후 DMSO에 용해된 각 물질을 표시된 농도로 culture plates에 추가하였다. 대조군 DMSO는 최대 농도가 0.2%를 초과하지 않도록 각 plates에 투입하였다. 48시간 경과 후 100 μ l 5mg/ml MTT(sigma Cat. M2128)를 투입한 후, 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C 반응시킨다. 배지를 제거 후 0.1ml의 DMSO를 투입하고 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader(BioTek Instruments, Korea)를 이용하여 540nm 흡광도에서 활성을 측정하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

[0059] 그 결과, 겐티스산 농도(1, 10, 50, 100 μ g/ml)에 따라 세포의 양이 대조군에 비하여 감소하지 않았다. 즉 세포에 독성은 없으며 오히려 성장을 증진시킴을 확인하였다(도 3).

[0061] <실시예 3> 관련 신호 전달 단백질 변화 분석

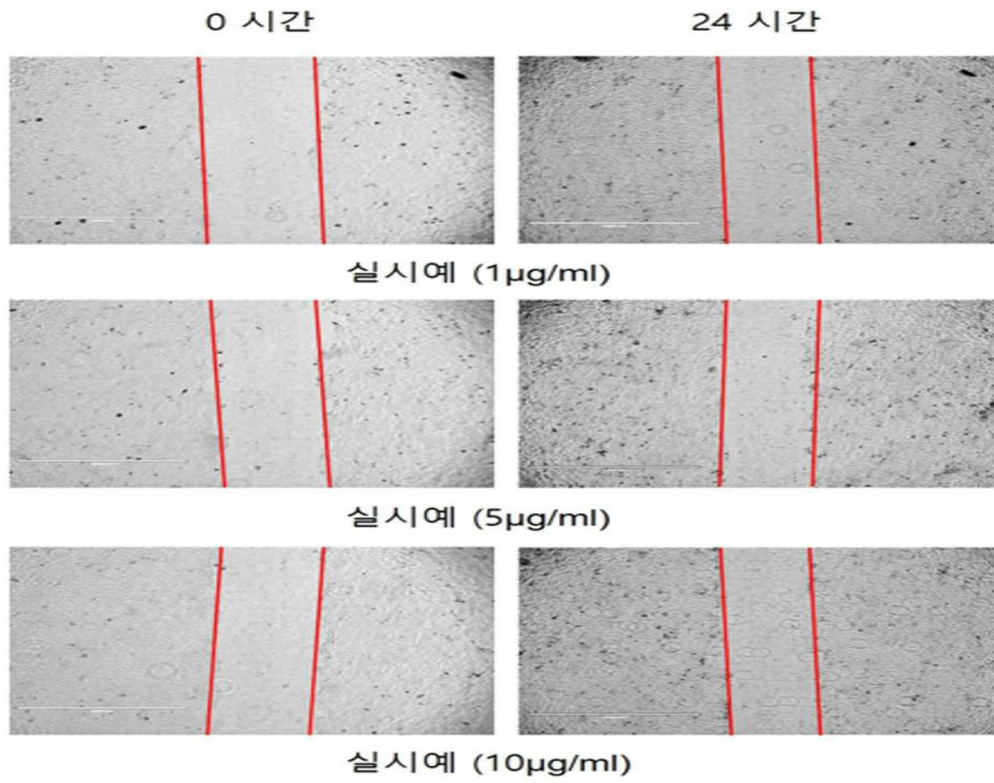
[0062] 겐티스산의 케라틴 세포(keratinocyte)의 성장 및 이동 촉진에 대한 메커니즘을 확인하기 위해 세포 성장 및 이동에 관여하는 단백질에 대해 웨스턴 블랏을 진행하였다.

[0063] 구체적으로, 겐티스산의 농도(0, 1, 5, 10 μ g/ml) 차이에 대한 세포 성장 및 이동과 관련된 단백질의 변화를 확인하기 위해 웨스턴 블랏을 사용하였다. 겐티스산은 10mg/ml의 농도로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후 사용하였다. HaCaT cell line을 90 Φ cell culture dish(SPL)에서 배양하였다. 각 Plate에 8 X 10⁵ Cells 만큼 subculture 후 serum-freemedia를 10ml 넣어주고 24시간 배양한다. 합물을 각 Plate 당 0, 1, 5, 10 μ g/ml 농도로 주입해주고 24시간 동안 배양해준다. Cell scraper(SPL)를 이용하여 세포를 plate에서 분리한 뒤 세포를 tube에 모아준다. RIPA buffer(25mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2mM EDTA)를 이용해 세포를 켠 후에 단백질을 모아 정량 한 뒤 일정한 양을 아크릴아마이드 겔(acrylamide gel)에 적재한다. ECL은 Bio-Rad 제품을 이용하였으며 항체는 santa cruz biotechnology와 cell signaling technology 제품을 사용하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

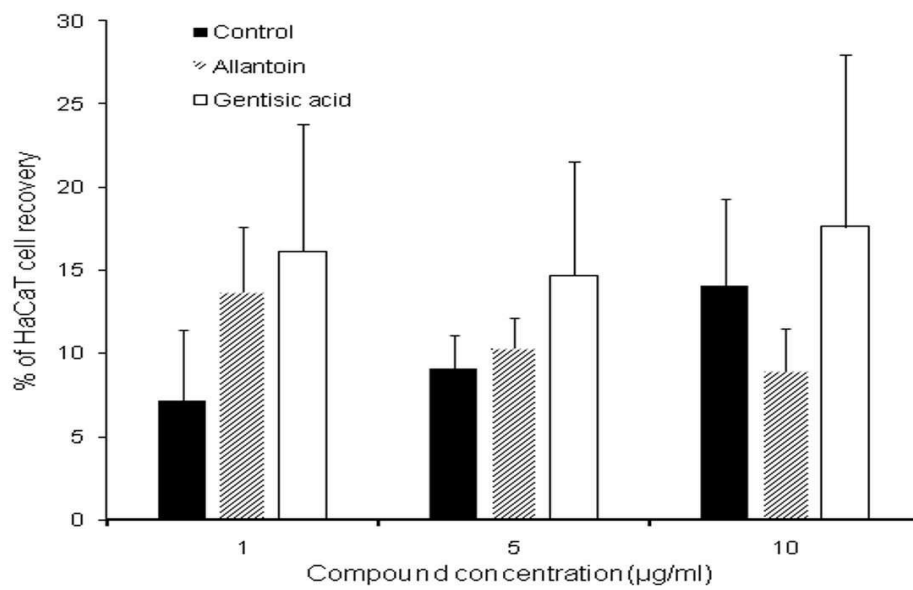
[0064] 그 결과, 겐티스산은 p38과 JNK 그리고 이들의 인산화(phosphorylation)에 대해서는 화합물의 농도에 상관없이 단백질의 양의 변화가 보이지 않았다. 하지만 p44/42(ERK1/2)의 경우 변화가 없었으나 이의 인산화 형태는(phosphorylation form) 겐티스산의 농도가 증가함에 따라 양이 증가하였다. 이를 통해 다양한 세포 성장과 이동에 관여하는 단백질 중 p44/42가 겐티스산의 농도에 따라 활성에 차이가 생기는 것을 확인하였다(도 4).

도면

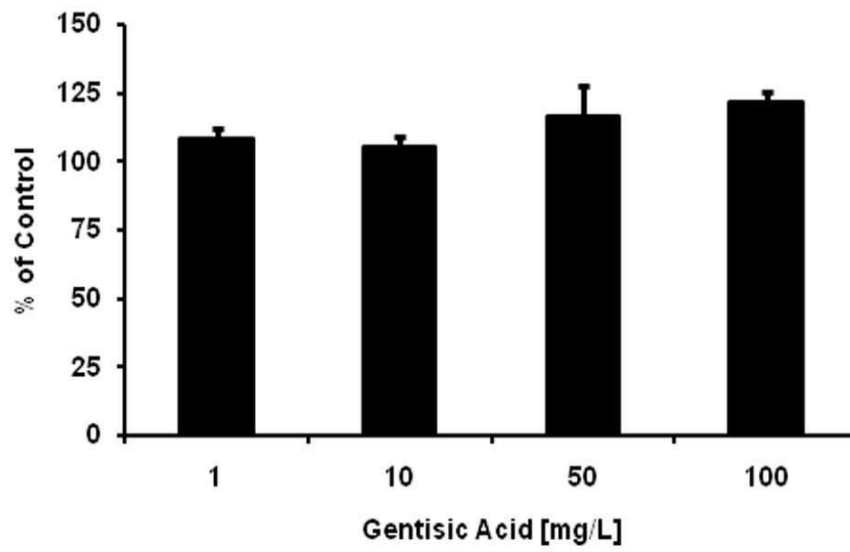
도면1



도면2



도면3



도면4

