(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월30일
(11) 등록번호 10-1507224
(24) 등록일자 2015년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/49 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0060794
(22) 출원일자 2013년05월29일
심사청구일자 2013년05월29일
(65) 공개번호 10-2014-0140242
(43) 공개일자 2014년12월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020060132817 A*
KR1020040107495 A
KR1020080024426 A
KR1020090131766 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
부산대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
(72) 발명자
정해영
부산 동래구 쇠미로81번길 33, 103동 203호 (사직동, 한신아파트)
최영환
경남 밀양시 중앙로 234-17, 304동 1005호 (삼문동, 밀양대우아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

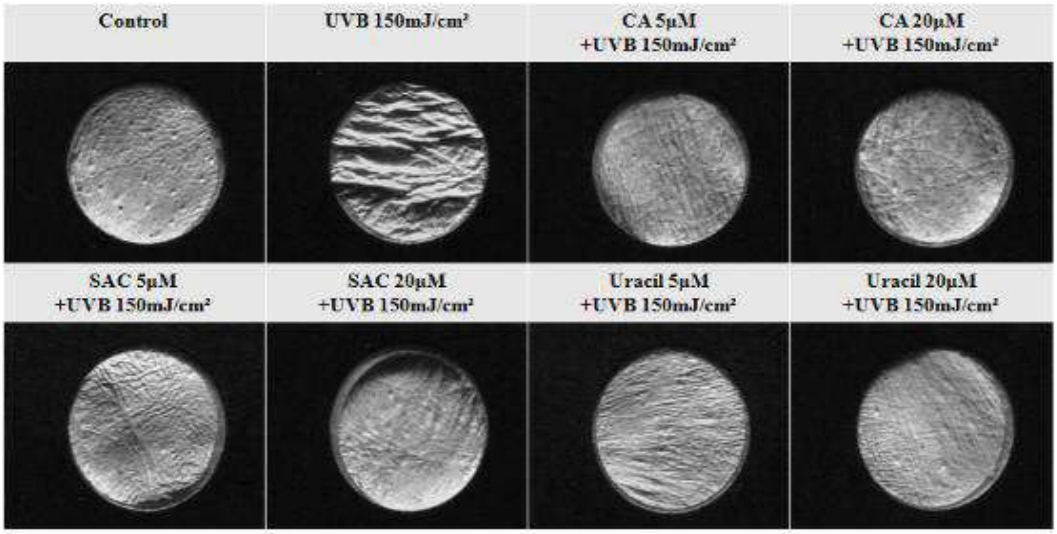
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 **마늘 유래 우라실을 유효성분으로 함유하는 주름 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 마늘 유래 우라실(uracil)을 유효성분으로 함유하는 주름 개선용 조성물에 관한 것으로, 마늘로부터 분리된 카페익산(caffeic acid; CA), s-아릴시스테인(s-allylcysteine; SAC) 및 우라실(uracil)이 NF-κB 신호의 조절을 통해 MMP 효소를 억제하였을 것으로 사료되며, UVB로 유도되는 주름을 효과적으로 개선시킴을 확인하였다. 이로써 마늘로부터 분리된 활성 물질인 CA, SAC 및 우라실(uracil)이 UVB 에 의해 유도된 광노화에 있어서 항피부노화제로 이용될 수 있다는 가능성이 시사되었다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

김소라

부산 사상구 덕상로 8-35, 102동 1707호 (덕포동, 오양힐타운)

정유리

부산 북구 금곡대로 268, 301동 402호 (화명동, 화명대림타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 G01201209010099
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 항노화산업제품화기술개발사업
연구과제명 (RCMS)노화성 근기능 저하 방지를 위한 기능성 식품소재 및 기기 개발
기 여 율 30/100
주관기관 부산대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120310865020010500
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 공동연구사업
연구과제명 마늘로부터 항노화 식품의약개발
기 여 율 40/100
주관기관 부산대학교 산학협력단
연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120009374
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터육성사업(기초의과학분야)
연구과제명 분자염증 노화제어 기전 및 선도물질 연구
기 여 율 25/100
주관기관 부산대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

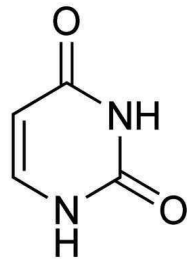
과제고유번호 1345201166
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오·의료기술개발
연구과제명 노화 조직 은행
기 여 율 5/100
주관기관 부산대학교 산학협력단
연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

마늘 추출물로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 우라실(uracil)을 유효성분으로 함유하는 UVB(ultra violet B)에 의해 유도되는 주름 개선용 화장료 조성물.

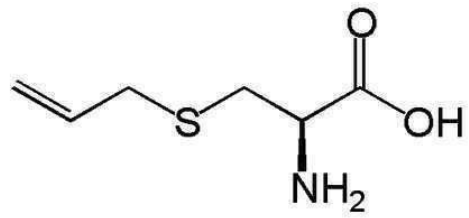
< 화학식 1 >



청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 하기 화학식 2로 표시되는 s-아릴시스테인(s-allylcysteine; SAC)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 UVB(ultra violet B)에 의해 유도되는 주름 개선용 화장료 조성물.

< 화학식 2 >



청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 마늘 추출물은 마늘을 헥산(hexane)으로 추출한 잔여물에 에틸아세테이트(EtOAc)를 첨가하여 추출하고, 그 잔여물에 메탄올을 첨가하여 추출한 메탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 UVB(ultra violet B)에 의해 유도되는 주름 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 우라실은 화장료 조성물 총 중량에 대해 0.01 내지 10 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 UVB(ultra violet B)에 의해 유도되는 주름 개선용 화장료 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 화장수, 유액, 크림, 에센스, 화장연고, 스프레이, 젤, 팩, 선스크린, 메이크업 베이스, 파운데이션, 파우더, 메이크업 제거제 및 세정제로 구성된 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 UVB(ultra violet B)에 의해 유도되는 주름 개선용 화장료 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 마늘 유래 우라실(uracil)을 유효성분으로 함유하는 주름 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피부노화는 피부와 피부 지지층 등의 광범위한 퇴행 과정을 말한다. 피부 노화의 원인은 흡연, 공해, 스트레스 등이 있지만, 그 중에서도 자외선(ultra violet B; UVB) 조사가 가장 큰 요인으로 꼽힌다. 반복적인 UV의 조사에 의해 진행되는 피부 노화를 흔히 광노화라고 하며, 그 가장 큰 특징으로는 콜라겐 섬유와 젤라틴의 감소로 야기되는 주름을 들 수 있다.

[0003] 마늘은 항산화 작용, NF-kB 활성화 억제 및 UV에 의한 면역력 저하 방지 등과 같은 여러 가지 효과를 갖는다. 마늘, 과일 및 커피에 들어 있는 카페익산(caffeic acid; CA)은 페놀성 및 아크릴성 작용기를 가진다. 이는 항돌연변이 활성을 가진 항산화제 약물로 잘 알려져 있으며, 광노화에 있어 항염 효과뿐만 아니라 면역 조절 효과도 가진다. 또한, 몇몇 연구에서는 발암작용이 카페익산에 의해 억제된다고 밝혀졌다. *S*-아릴 시스테인(*S*-allyl cysteine; SAC)이 숙성된 마늘 추출물(aged garlic extract; AGE)에 가장 많이 들어있는 화합물이라는 것을 고려하면, SAC의 물리화학적 특성, 독성, 약물동력학, 조직분포 및 대사기작 등에 관심이 높아지고 있다. 우라실은 마늘로부터 분리되었고, 항암 효과를 가지고 세포-생존능을 증가시키는 것으로 잘 알려진 약물이다. CA, SAC 및 우라실은 마늘추출물로부터 분리되었는데, 생물학적 활성을 나타내는 분자기작에 대해서는 많이 밝혀지지 않았다.

[0004] 따라서, 본 발명자들은 CA, SAC 및 우라실(uracil)이 NF-κB 신호의 조절을 통해 MMP 효소를 억제하였을 것으로 사료되며, UVB로 유도되는 주름을 효과적으로 개선시킴을 확인하였다. 이로써 마늘로부터 분리된 활성 물질인 CA, SAC 및 우라실(uracil)이 UVB 에 의해 유도된 광노화에 있어서 항피부노화제로 이용될 수 있다는 가능성이 시사되었다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제10-2010-0009719호는 마늘 추출물을 함유하는 피부 노화방지용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 마늘을 물, C1~C4 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매로 추출하여 얻은 마늘 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화방지용 조성물에 대해 개시하고 있으나, 본 발명의 CA, SAC 및 우라실(uracil)에 대한 언급은 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 마늘 유래 우라실(uracil)을 유효성분으로 함유하는 주름 개선용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

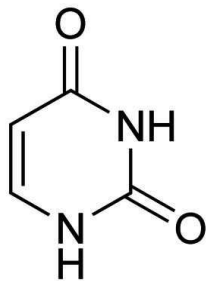
[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 우라실(uracil)을 유효성분으로 함유하는 주름 개선 조성물을 제공한다.

[0008] 상세하게는 하기 화학식 2로 표시되는 s-아릴시스테인(s-allylcysteine; SAC)을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0009] 상세하게는 상기 우라실(uracil)은 마늘 추출물로부터 분리된 것을 특징으로 하고, 보다 상세하게는 상기 마늘 추출물은 마늘을 헥산(hexane)으로 추출한 잔여물에 에틸아세테이트(EtOAc)를 첨가하여 추출하고, 그 잔여물에 메탄올을 첨가하여 추출한 메탄올 추출물인 것을 특징으로 한다.

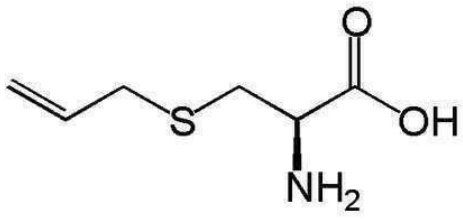
[0010] 상세하게는, 상기 주름은 UVB(ultra violet B)에 의해 유도되는 것을 특징으로 한다.

[0011] < 화학식 1 >



[0012]

[0013] < 화학식 2 >



[0014]

[0015] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 우라실 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예를 들어 항산화제, 안정화제, 용제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다. 또한 상기 화장료 조성물은 그 효과를 증진시키기 위해 피부 흡수 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 또는 스프레이 등으로 제형화될 수 있다. 보다 상세하게는 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 우라실은 화장료 총 중량에 대해 0.01~10 중량%의 양으로 첨가되어 사용될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 마늘 유래 우라실(uracil)을 유효성분으로 함유하는 주름 개선용 조성물에 관한 것으로서, 마늘로부터 분리된 CA, SAC 및 우라실(uracil)이 NF-κB 신호의 조절을 통해 MMP 효소를 억제하였을 것으로 사료되며, UVB로 유도되는 주름을 효과적으로 개선시킴을 확인하였다. 이로써 마늘로부터 분리된 활성 물질인 CA, SAC 및 우라실(uracil)이 UVB 에 의해 유도된 광노화에 있어서 항피부노화제로 이용될 수 있다는 가능성이 시사되었다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 마늘로부터 활성성분을 분리하고 분획화하는 과정을 나타내는 모식도이다.

도 2는 우라실의 주름형성 억제능을 나타낸다.

도 3은 우라실의 콜라겐 섬유의 이상에 대한 보호능을 나타낸다.

도 4는 우라실의 type 1 procollagen 합성능을 나타낸다.

도 5는 우라실의 MMP 효소 발현 억제능을 나타낸다.

도 6은 우라실의 NF-kB 및 AP-1 활성 억제능을 나타낸다.

도 7은 우라실의 COX-2, iNOS 발현 억제능을 나타낸다.

도 8은 우라실의 UVB로 유도된 ROS, $ONOO^-$ 소거능을 나타낸다.

도 9는 우라실의 MMP 효소 억제 상위 기전을 검토한 결과이다.

도 10은 우라실의 주름 억제능에 대한 기전을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0021] **< 실시예 1 > 마늘 속 활성성분, 카페익산(caffeic acid; CA), s-아릴시스테인(s-allylcysteine; SAC) 및 우라실(uracil)의 주름 제거능 탐색**

[0022] 1. HR1 hairless 마우스

[0023] 웅성 6주령 HR-1 hairless mice는 Hoshino Laboratory Animals (Saitama, Japan)에서 구입하였고, 부산대학교 약학대학 동물사육실에서 사육하였다. 실험동물은 케이지(cage)당 3마리씩, 생수와 사료(Superfeed Co., Wonju, Korea)는 자유식으로 하였다. 실험을 시작하기 전에 실험동물은 최소 1주일 안정화 시켰다. UVB 조사는 격일로 총 4회 처리되었다. 본 연구에 사용된 동물 프로토콜(animal protocol)은 부산대학교 동물실험윤리위원회에서 검토되었고, 승인된 것이다.

[0024] 안정화 기간 후, 생쥐를 무작위로 그룹으로 나뉘었다. 실험 방법은 에탄올(ethanol)과 프로필렌 글리콜(propylene glycol)을 3대7 비율로 혼합하여 용매로 하고, 마늘 활성 물질을 해당한 농도로 각각 가한 다음에 200 μL씩 하루에 한번씩 등에 도포하였다. 이때, 대조군과 UVB군에는 용매를 처리하였다.

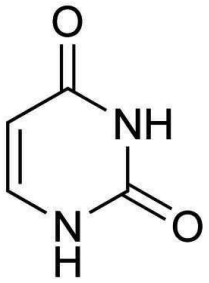
[0025] 2. UVB 광원(light source)

[0026] UVB 광원(light source)는 BEX-800 (UltraLum, Claremont, CA, USA)를 사용하였다.

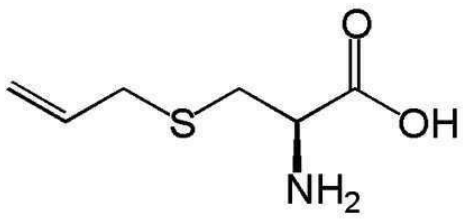
[0027] 3. 마늘의 활성성분 분리

[0028] 건조된 마늘(1309.63g)을 분말이 되도록 갈아서, 상온에서 n-hexane, EtOAc 및 MeOH로 추출하였다(도 1). 우라실(화학식 1)은 MeOH 추출물로부터 분리되었고, SAC(화학식 2) 및 CA(화학식 3)는 EtOAc 추출물로부터 분리되었다. 특히, 우라실은 MeOH 분획물에서 80 x 5.5 cm SiO_2 칼럼을 이용하여 NGLFM22를 얻었으며, 이것을 다시 70 x 3 cm SiO_2 칼럼 및 100 x 3 cm sephadex 칼럼을 이용하여 우라실 22.5mg을 분리하였다. 우라실의 분리는 부산대학교 최영완 교수에 의해 수행되었다.

[0029] < 화학식 1 >

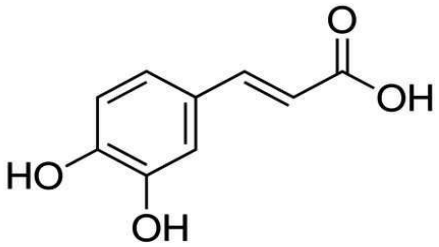
[0030] 

[0031] < 화학식 2 >



[0032]

[0033] < 화학식 3 >



[0034]

[0035] 4. 결과

[0036] HR1 hairless 마우스에 UVB 150 mJ/cm² 을 격일로 조사하고 활성 물질을 피부에 도포하는 방법으로 전처리하였다. 마우스의 오른쪽 등 부위에 동일하게 래플리카 시험법으로 주름의 정도를 측정한 결과, 대조군에 비하여 UVB군에서 굵은 주름이 증가하였고 활성 물질의 전처리에 의해 주름이 효과적으로 억제되었다(도 2).

[0037] **< 실시예 2 > UVB 조사에 의한 콜라겐 섬유의 파괴에 대한 카페익산(caffeic acid; CA), s-아릴시스테인(s-allylcysteine; SAC) 및 우라실(uracil)의 보호능 검토**

[0038] 1. 매슨 트리크롬 염색(Masson's trichrome staining)

[0039] 피부는 4% 파라포름알데히드로 상온에서 밤새도록 고정시켰고, Fontana-Masson staining kit from American Tech Scientific, Inc. (Lodi, CA, U.S.A.)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 멜라닌으로 염색시켰다. 잘려진 피부는 암모니아성 실버 용액으로 60℃에서 60분 동안 염색되었고, 그 후 0.1% 골드 클로라이드(gold chloride)에서 반응시켰으며, 5% 소듐 티오설페이트에서 반응시켰다.

[0040] 2. 결과

[0041] UVB 조사된 HR1 마우스의 피부를 매슨 트리크롬 염색(Masson's trichrome staining) 법을 이용하여 진피층의 콜라겐을 염색한 결과, 푸르게 염색된 부분이 콜라겐 층이며 대조군에 비해서 UVB군에서 콜라겐 섬유가 갈라지며 불균일해짐을 알수 있다. 그러나, 마늘 활성 성분을 전처리 한 군에서는 그 이상 현상이 대조군과 유사하게 회복되었다(도 3).

[0042] **< 실시예 3 > 마늘 활성 성분의 type 1 procollagen 생합성능 검토**

[0043] 1. 웨스턴 블랏팅(Western blotting)

[0044] 일정량의 단백질이 포함된 조직 균질 액을 gel-loading buffer(0.125M Tris-HCl, pH6.8,4% SDS,10% 2-mercaptoethanol 및 0.2% bromophenolblue)와 혼합 후 5분간 끓는 물에 반응시켰다. 총 단백질량이 같은 샘플을 10 ~ 15% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 젤 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) 에서 1시간 30분간 100V에서 전기영동하였다. Towbin buffer(25mM Tris-Cl, 192mM glycine, 20% MeOH)를 이용하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인에 옮겼다. 비특이적 단백결합을 차단하기 위해 멤브레인을 blocking buffer [5% non-fat milk 가 함유된 washing buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 0.1% Tween 20)]에 넣어 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, washing buffer로 10분씩 3회 세척하였다. 각각의 1차 항체에 실온에서 5시간 동안 반응시켰다. 그 후 washing buffer로 10분씩 3회 세척 후 horseradish-peroxidase 결합된 anti-mouse antibody (Santa Cruz, 1:10,000), an anti-rabbit antibody (Santa Cruz, 1:10,000), 혹은 an anti-goat antibody (Santa Cruz, 1:10,000) 에 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 항체의 신호를 확인할 수 있는 Westsave^{tm}인 ECL detection reagent를 가하고 생성되는 화학적 발광을 Davinch-chemTM SP (CoreBio, Seoul, Korea) 를 이용하여 신호를 확인하였다. Pre-stained protein markers (Bio-Rad)를 이용하여 분자량을 확인하였다.

[0045] 2. type 1 procollagen 측정

[0046] 배지상 type 1 procollagen의 농도는 ELISA kit (Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit; Takara)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 각 샘플은 3번 반복 시험하였다.

[0047] 3. 결과

[0048] 피부 결합 조직의 가장 많은 부분을 차지하는 type 1 procollagen 단백질의 생합성은 주름 형성에 직접적인 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 웨스턴블랏(Western blot)법을 시행한 결과, UVB 처리에 의해 type 1 procollagen의 단백질량 감소되었으며 마늘 활성 물질의 처리에 의해 효과적으로 증가하였다(도 4).

[0049] **< 실시예 4 > 마늘 활성 성분 카페익산(caffeic acid; CA), s-아릴시스테인(s-allylcysteine; SAC) 및 우라실(uracil)의 MMP 발현 억제, NF-kB 및 AP-1 활성 억제 효과**

[0050] 1. 피부에서 단백질 분리

[0051] 모든 시약과 튜브 그리고 원심분리기는 0~4℃에 맞추어서 진행하였다. 300 mg의 동결된 피부조직은 2 ml의 hypotonic lysis buffer [buffer A: 10 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1mM dithiothreitol(DTT), 0.1mM EDTA, 0.1mM PMSF,1 mM pepstatin, 2 mM leupeptin, 20 mM β-glycerophosphate, 20 mM NaF 및 2 mM Na_3VO_4,10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.4]를 첨가하여 20초간 균질화하였다. 15분 후 10% Nonidet P-40 (NP-40)을 125 μl 추가 후 15 초간 섞었다. 그 후 12,000 g에서 5분간 원심분리 후 상등액을 채취하여 세포질 분획으로 사용하였다. 남은 펠렛(pellet)에 400μl A buffer와 25 μl의 10% NP-40 넣어 세척(washing)하고 12,000 g에서 5분간 원심분리 후 남은 펠렛(pallet)에 50 μl의 buffer C [50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 10% (v/v) glycerol, 1 mM pepstatin, 2 mM leupeptin, 20 mM β-glycerophosphate, 20 mM NaF, 2mM Na_3VO_4 및 50 mM HEPES, pH 7.8]넣고, 30분간 냉소에 반응 후, 12,000 g에 10분간 원심분리하였다. 상등액을 핵 분획으로 사용하였다. 그 후 각각의 샘플은 -80° C에서 보관하였다, 단백질 정량은 bicinchonic acid (BCA) assay 방법을 사용하고 표준물질은 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다.

[0052] 2. 결과

[0053] Type 1 procollagen을 분해시키는 것으로 알려져 있는 MMP 효소의 발현을 웨스턴 블랏(Western blot)법으로 검토해 본 결과, UVB 처리 군에서 현저히 발현량이 증가되었고 마늘 활성 성분의 전처리에 의해 각각 대조군과 유사하게 그 발현이 감소됨을 확인하였다(도 5).

[0054] HR1 hairless mice의 피부조직에서 핵단백을 분리하여 핵에서 MMP 효소의 발현을 조절하는 NF-κB 와 AP-1의 활성을 웨스턴 블랏(Western blot)를 시행하여 확인하였다. 그 결과, 대조군에 비해 UVB 처리 군에서는 전사인자의 활성이 증가되었고, 마늘 활성 물질의 전처리 군에서는 활성화된 전사인자의 단백질량이 효과적으로 감소되었음을 확인하였다(도 6).

[0055] **< 실시예 5 > 마늘 활성 성분 카페익산(caffeic acid; CA), s-아릴시스테인(s-allylcysteine; SAC) 및 우라실(uracil)의 염증 관련 단백질 발현 억제능 검토**

[0056] 마늘 활성 물질을 매일 hairless mouse의 피부에 도포하고, 2시간 후에 150mJ을 격일로 처리 하였다. 채취한 샘플을 균질화(homogenation)하고, cytosol fraction에서 COX-2의 발현 량을 웨스턴 블랏(Western blot)으로 확인하였다. 그 결과, UVB군에서 COX-2, iNOS의 발현이 증가하였고, CA, SAC, 우라실의 처리군 에서는 COX-2, iNOS의 발현이 감소하였다, 이 결과를 통해서 CA, SAC, 우라실이 COX-2 또는 iNOS로 인해 유도되는 염증을 억제할 것이며, COX-2로 인해 유도되는 ROS 역시 감소시킬 것임을 예상할 수 있다(도 7).

[0057] **< 실시예 6 > UVB 조사에 의해 생성되는 산화 스트레스에 대한 카페익산(caffeic acid; CA), s-아릴시스테인(s-allylcysteine; SAC) 및 우라실(uracil)의 ROS, $ONOO^-$ 제거능**

[0058] 1. ROS 측정

[0059] ROS는 형광분석법(fluorometric assay)을 사용하여 확인하였다. 형광을 띠지 않는 dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA)는 esterases 와 ROS 존재하에 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescin (DCF)로 산화된다. Phosphate buffer(50mM) pH 7.4를 이용하여 실험에 필요한 용액을 제조하였다. 신장의 분획물에, DCF-DA 25μM를 넣고 최종 용적이 250μl가 되도록 만든 후 형광값의 변화를 30분간 5분 간격으로 Fluorescence plate reader, TECAN (Tecan Instruments,Salzburg, Austria)을 이용하여 측정하였다. Excitation 485nm, emission 535 nm 파장에서 측정하였다.

[0060] 2. Peroxynitrite 측정법

[0061] Peroxynitrite($ONOO^-$)는 DHR123의 산화반응에 의해서 측정하였다. 즉, 10 μl의 조직 균질 액과 rhodamine 용액 [50 mM sodium phosphate buffer, 90mM sodium chloride, 5mM diethylene triaminepenta-acetate(DTPA),및 DHR 123]을 섞은 뒤, 형광의 변화를 30분간 5분 간격으로 fluorescence plate reader를 이용하여 측정하였다. Excitation 485nm, emission 530nm파장에서 확인하였다.

[0062] 3. 결과

[0063] 마늘 활성 물질을 매일 hairless mouse의 피부에 도포하고, 2시간 후에 150mJ을 격일로 처리하였다. 채취한 샘플을 균질화(homogenation)하고, 세포질 분획(cytosol fraction)에서 각각 DCFDA assay와 DHR123 을 이용해 ROS, $ONOO^-$ 생성량을 측정하였다. 그 결과, 대조군에 비해 UVB를 처리한 군에서 ROS, $ONOO^-$가 증가했고, 마늘 활성 성분인 CA, SAC와 우라실을 처리함에 따라 ROS 및 $ONOO^-$가 농도 의존적으로 현저히 억제되었다(도 8).

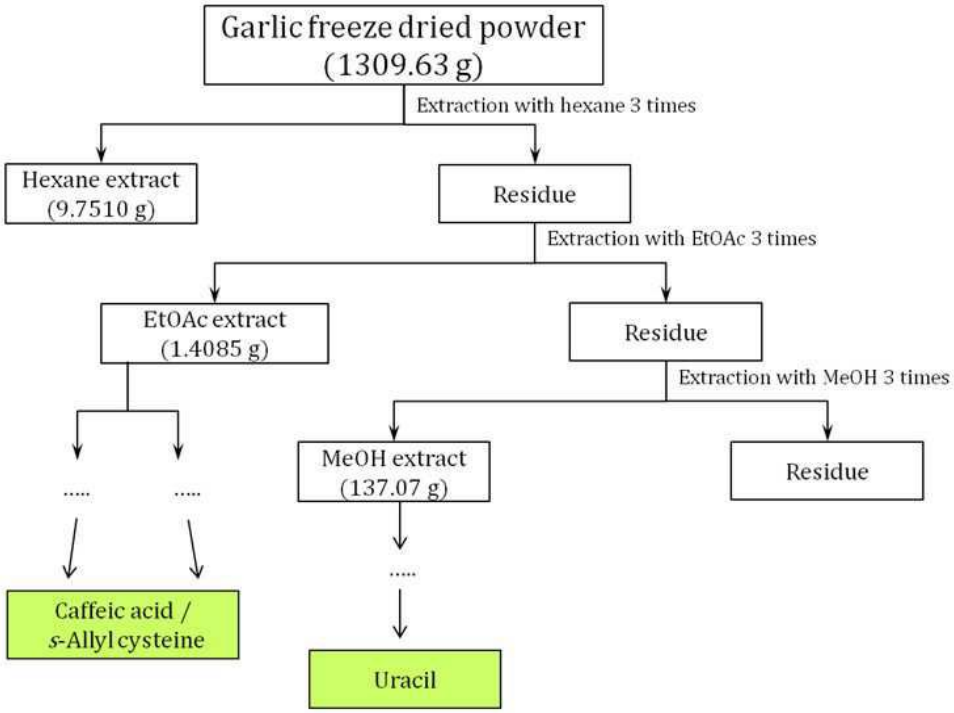
[0064] **< 실시예 7 > 마늘 활성 성분 카페익산(caffeic acid; CA), s-아릴시스테인(s-allylcysteine; SAC) 및 우라실(uracil)의 주름 억제 기전 검토**

[0065] 마늘 활성 물질의 MMP 효소 억제를 통한 주름 형성 억제에 대한 생화학적 기전을 규명하기 위하여 NF-κB, AP-1

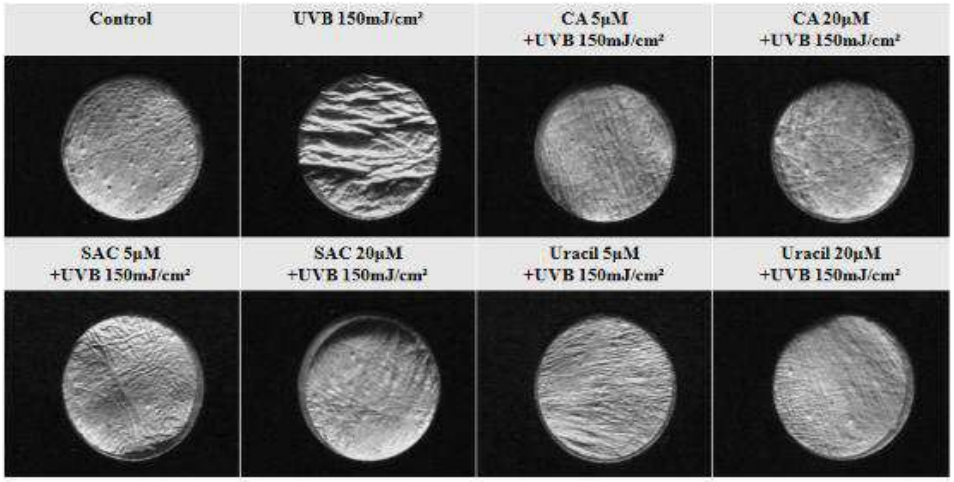
의 상위 신호를 웨스턴 블랏(Western blot)법으로 검토하였다. 채취한 샘플을 균질화(homogenation) 하고, 세포질 분획(cytosol fraction)에서 상위 인자들의 발현량을 웨스턴 블랏(Western blot)으로 확인하였다. 그 결과, UVB군에서 p-NIK, p-Akt의 발현이 증가하였고, 그로 인해 활성화되는 것으로 알려진 p-IKKαβ의 발현 역시 증가되었다. 반면 CA, SAC, 우라실의 처리에 의해 위의 증가된 발현량이 감소하였다. 뿐만 아니라, ERK 역시 UVB에 의해 활성화되었고 마늘 활성 물질에 의해 효과적으로 억제되었다. 특히, 우라실은 NIK, ERK, p-38의 활성을 가장 효과적으로 감소시킴을 확인하였다(도 9). 우라실의 주름 억제능에 대한 기전은 도 10에 나타냈다.

도면

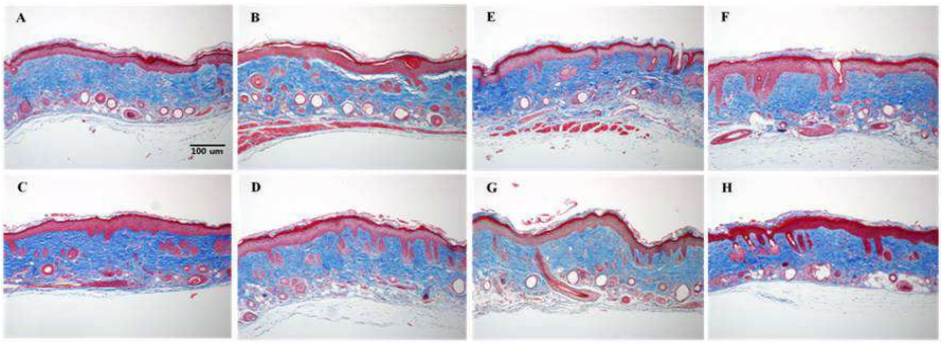
도면1

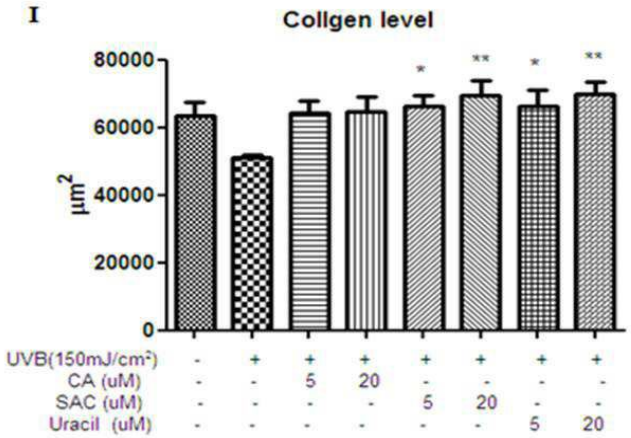


도면2

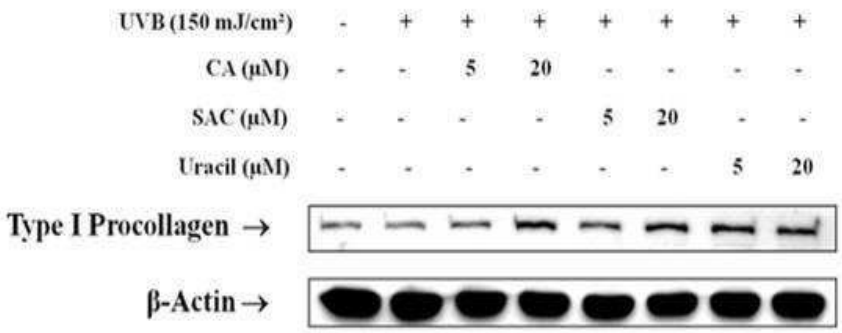


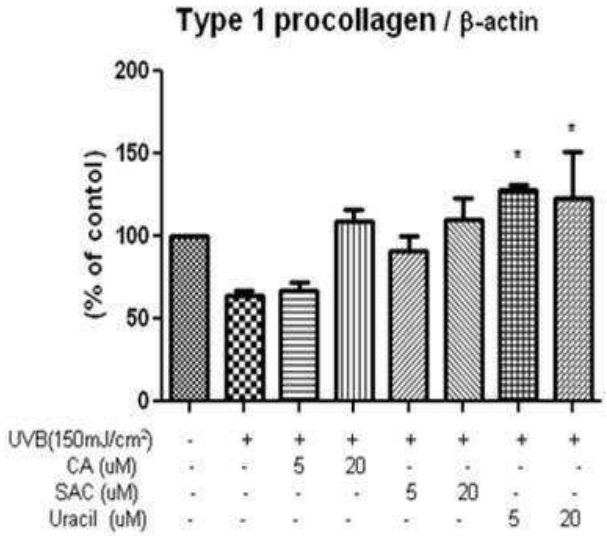
도면3


A
B
E
F
100 um
C
D
G
H

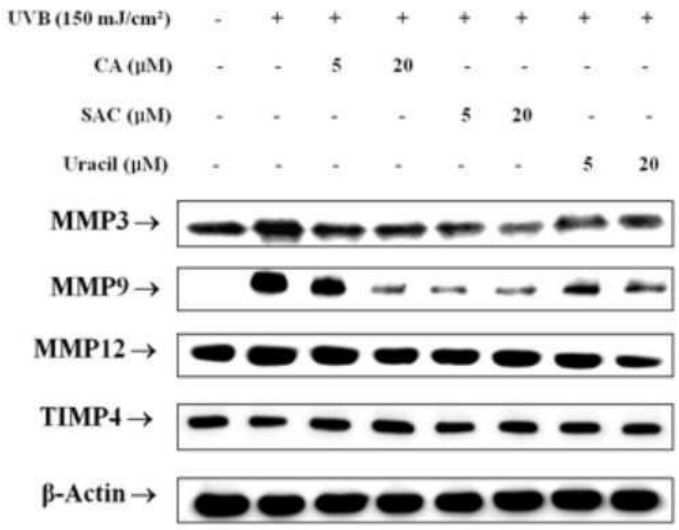

I
Collgen level
80000
60000
40000
20000
0
μm2
*
**
*
**
UVB(150mJ/cm²) - + + + + + + +
CA (uM) - - 5 20 - - - -
SAC (uM) - - - - 5 20 - -
Uracil (uM) - - - - - - 5 20

도면4

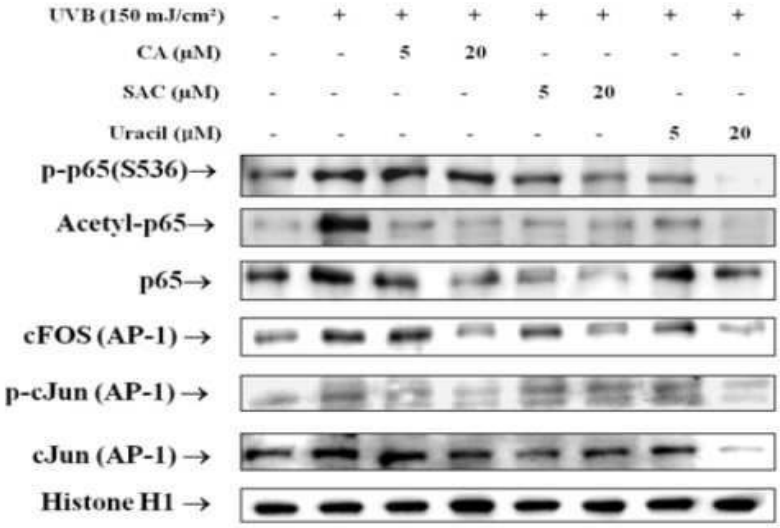

UVB (150 mJ/cm²) - + + + + + + +
CA (μM) - - 5 20 - - - -
SAC (μM) - - - - 5 20 - -
Uracil (μM) - - - - - - 5 20
Type I Procollagen →
β-Actin →


Type 1 procollagen / β-actin
(% of contol)
200
150
100
50
0
*
*
UVB(150mJ/cm²) - + + + + + + +
CA (uM) - - 5 20 - - - -
SAC (uM) - - - - 5 20 - -
Uracil (uM) - - - - - - 5 20

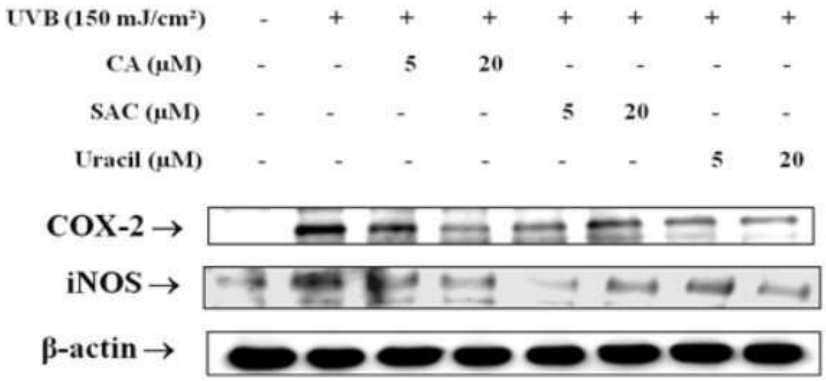
도면5


UVB (150 mJ/cm²) - + + + + + + +
CA (μM) - - 5 20 - - - -
SAC (μM) - - - - 5 20 - -
Uracil (μM) - - - - - - 5 20
MMP3 →
MMP9 →
MMP12 →
TIMP4 →
β-Actin →

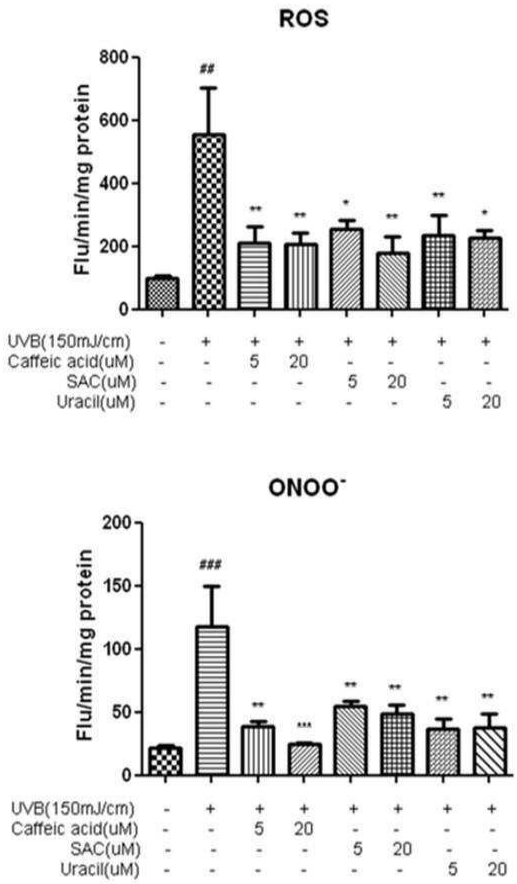
도면6


UVB (150 mJ/cm²) - + + + + + + +
CA (μM) - - 5 20 - - - -
SAC (μM) - - - - 5 20 - -
Uracil (μM) - - - - - - 5 20
p-p65(S536)→
Acetyl-p65→
p65→
cFOS (AP-1) →
p-cJun (AP-1) →
cJun (AP-1) →
Histone H1 →

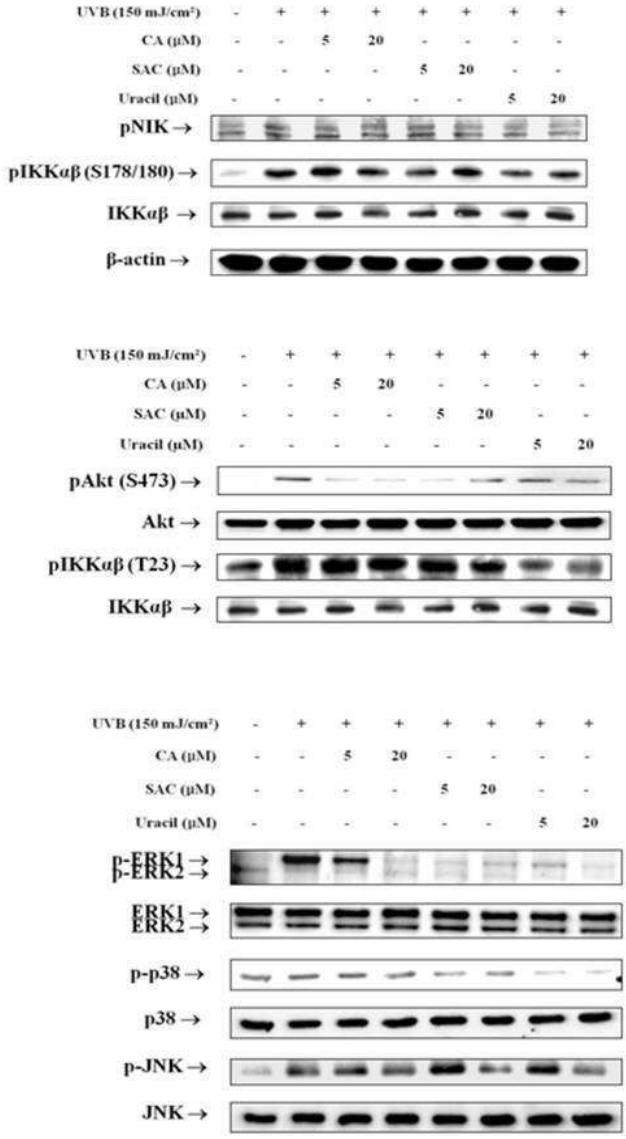
도면7


UVB (150 mJ/cm²) - + + + + + + +
CA (μM) - - 5 20 - - - -
SAC (μM) - - - - 5 20 - -
Uracil (μM) - - - - - - 5 20
COX-2 →
iNOS →
β-actin →

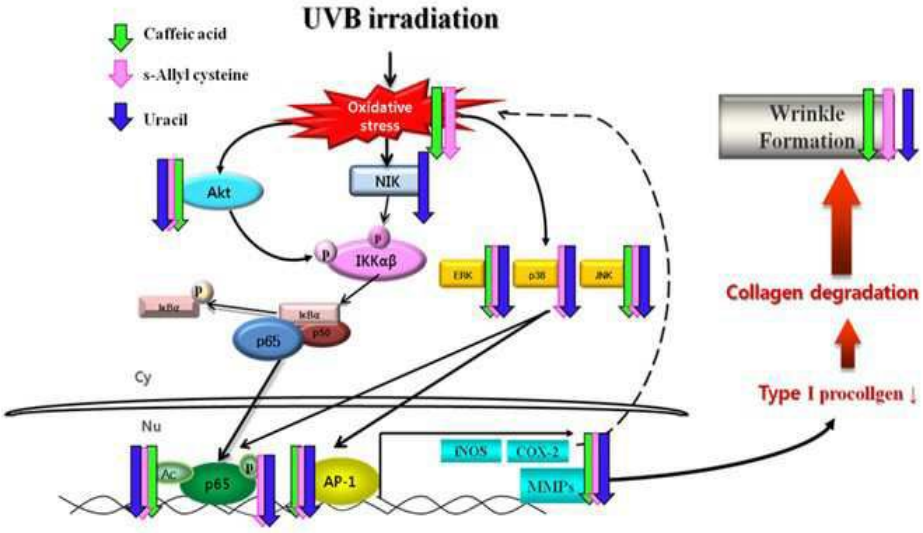
도면8


ROS
Flu/min/mg protein
800
600
400
200
0
##
**
**
*
**
**
*
UVB(150mJ/cm) - + + + + + + +
Caffeic acid(uM) - - 5 20 - - - -
SAC(uM) - - - - 5 20 - -
Uracil(uM) - - - - - - 5 20
ONOO-
Flu/min/mg protein
200
150
100
50
0
###
**
***
**
**
**
**
UVB(150mJ/cm) - + + + + + + +
Caffeic acid(uM) - - 5 20 - - - -
SAC(uM) - - - - 5 20 - -
Uracil(uM) - - - - - - 5 20

도면9


UVB (150 mJ/cm²) - + + + + + + +
CA (μM) - - 5 20 - - - -
SAC (μM) - - - - 5 20 - -
Uracil (μM) - - - - - - 5 20
pNIK →
pIKKαβ (S178/180) →
IKKαβ →
β-actin →
UVB (150 mJ/cm²) - + + + + + + +
CA (μM) - - 5 20 - - - -
SAC (μM) - - - - 5 20 - -
Uracil (μM) - - - - - - 5 20
pAkt (S473) →
Akt →
pIKKαβ (T23) →
IKKαβ →
UVB (150 mJ/cm²) - + + + + + + +
CA (μM) - - 5 20 - - - -
SAC (μM) - - - - 5 20 - -
Uracil (μM) - - - - - - 5 20
p-ERK1 →
p-ERK2 →
ERK1 →
ERK2 →
p-p38 →
p38 →
p-JNK →
JNK →

도면10


UVB irradiation
Caffeic acid
s-Allyl cysteine
Uracil
Oxidative stress
NIK
Akt
IKKαβ
ERK
p38
JNK
p65
p50
Cy
Nu
AP-1
iNOS
COX-2
MMPs
Wrinkle Formation
Collagen degradation
Type I procollgen ↓