

명세서

발명의 명칭: 항산화용 및 황사에 의한 피부 유해영향 완화용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 항산화용 및 황사에 의한 피부 유해영향 완화용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 고련피 및 연꽃잎을 유효성분으로 함유하는 항산화 효과 및 황사에 의한 피부 유해영향 감소 효과를 갖는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 피부는 외부 환경에 직접적으로 노출되는 신체 부위로서, 우리 몸의 중요한 기관들을 보호하는 보호막 역할을 할 뿐만 아니라 수분 증발을 조절하고 외부 감염으로부터 몸을 보호하는 역할을 한다. 하지만, 아무리 외부로부터의 바이러스 침투까지 막아내는 피부일지라도 과도한 자외선이나 오염물질 등에 노출되면 홍반, 부종, 가려움 등의 피부 자극 및 염증 반응을 유발하게 된다. 이러한 환경유해인자에 의한 피부 트러블은 미관상 문제가 될 뿐만 아니라, 세포의 항산화 보호시스템이 감당하지 못할 만큼 증가된 활성산소종은 DNA, 단백질, 지방, 당에 해를 끼치며 세포의 생존, 성장, 분화에 영향을 주고, 세포사멸을 일으키기도 한다. 장기간 계속된 산화적 스트레스는 피부노화와 암, 염증을 일으키게 된다.(Ismail et al., Angiopoietin-1 reduces H(2)O(2)-induced increases in reactive oxygen species and oxidative damage to skin cells. J Invest Dermatol. 130(5):1307-17, 2010)
- [3] 황사는 중국 및 몽고 등의 내륙에 위치한 사막에서 작은 모래나 황토가 부유하여 상층바람을 타고 멀리 수송되어, 지면 가까이 낙하하는 현상이다. 우리나라에서도 매년 봄철이면 황사가 주기적으로 발생한다. 황사는 유기물과 무기물의 복합체로 발생시기와 장소에 따라 물리적 특성과 구성성분이 매우 다양하며, 생물학적으로 영향을 줄 수 있는 금속 성분도 포함하고 있다. 황사 중 크기가 큰 입자들은 주로 발원지나 주변에 머물며, 국내에 유입되는 것들은 대개 지름 10 μ m 이하의 미세먼지(Particulate matter 10; PM10)이다. 이러한 미세먼지가 흡입 시에 하부기관지 및 폐의 가스-교환부분까지 침착하여 호흡기계에 손상을 일으킬 수 있다고 보고된 바 있다(Yanagisawa et al., Gene expression analysis of murine lungs following pulmonary exposure to asian sand dust particles. Exp Biol Med 232:1109-1118, 2007, Kim et al., Cytotoxicity of yellow sand in lung epithelial cells. J Biosci 28(1):77-81, 2003). 황사의 인체 내 유해성에 대한 연구는 호흡기질환 연구에서 많이 이루어졌는데, 실험용 쥐를 이용한 연구에서 실제 황사발생 시 채취된 황사를 흡입시킨 결과 폐에서 산화스트레스 관련 지표가 상승했다는 동물실험연구가 있다(Naota et al., Pathological Study of Acute Pulmonary Toxicity Induced by Intratracheally Instilled Asian Sand Dust. Toxicol Pathol. 2010 Sep 30.

- [Epub ahead of print]).
- [4] 임상적으로 황사바람이 직접 피부에 닿으면 알레르기 반응을 일으켜 접촉성 피부염이 발생하기 쉬우며, 또 건조하고 세찬 황사바람은 피부의 수분을 앗아가 피부건조증, 각질, 가려움증, 황사여드름 및 아토피 등을 유발한다고 알려져 있으며, 최근 황사에 의한 피부유해영향에 관하여 각질형성세포에서 전염증인자인 사이토카인 인터루킨 6, 인터루킨 8을 증가시키는 것이 최초로 보고되었다 (Choi et al., Asian dust storm particles induce a broad toxicological transcriptional program in human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett.* 15;200(1-2):92-9. 2010).
- [5] 피부의 최외각층에 존재하는 각질세포(각질형성세포, Keratinocyte)는 섬유아세포, 내피세포 및 진피세포에 주로 있는 면역세포들과 상호작용하여 피부자극반응의 개시, 조정, 조절에 중요한 역할을 한다. 피하의 염증반응과 관련하여 피부자극은 가장 일반적인 유해효과이며 임상적으로 접촉성 피부염의 70%는 피부자극으로 설명될 수 있다. 홍반, 부종, 균열, 수분손실, 표피탈락, 간지럼증 및 통증은 자극성 또는 알러지성 접촉성 피부염의 대표적 증상들이다. 이것은 세포의 항상성에 이상이 오고 염증반응이 일어나 생기는 증상들이다. 황사와 관련에 의한 피부자극의 연구는 전세계적으로 거의 되어 있지 않으나, 황사의 빈도수가 늘어남에 따라 황사에 의한 피부자극을 예방하거나 치료하는 천연외용제를 개발하는 것이 매우 필요한 실정이었다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 새로운 피부자극 완화제로서 고련피 및 연꽃잎 추출물을 함유하여, 황사에 의한 피부유해영향을 감소시키고 항산화 효과를 갖는 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 고련피 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물을 제공한다.
- [9] 본 발명의 일실시에에 있어서, 상기 조성물은 연꽃잎 추출물을 더 함유할 수 있다.
- [10] 본 발명의 일실시에에 있어서, 상기 조성물은 활성산소종 생성을 억제함 또는 항산화 단백질 유전자의 발현을 증가시킴을 특징으로 할 수 있다.
- [11] 또한, 본 발명은 고련피 추출물 및 연꽃잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 황사에 의한 피부 유해영향 완화용 조성물을 제공한다.
- [12] 본 발명의 일실시에에 있어서, 상기 조성물은 GST, NQO1 또는 hBD3의 발현을 증가시킴을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

- [13] 본 발명은 독소를 해독하는 효소인 NQO1, 독소를 배출하는 효소인 GSTT1의 발현을 증가시켜 독소를 해독 및 배출하고, 자연면역인자인 피부항균펩타이드 hBD3의 발현을 증가시켜 피부를 보호하며, GPX1, 카탈라아제(catalase), Trx1, Prdx1의 항산화 단백질의 발현을 증가시켜 활성산소의 생성을 억제함으로써 피부를 보호하고 노화를 억제하는 효과가 있어, 이 조성물을 황사로 인한 트러블 방지, 피부보호 및 노화의 치료 및 예방의 약학 또는 화장품 조성물에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 조성물을 사람정상각질피부세포에 처리한 경우 활성산소의 생성량을 나타낸 그래프이다.
- [15] 도 2 내지 4는 본 발명의 일실시예에 따른 조성물을 사람정상각질피부세포에 처리한 경우 각각 NQO1(도 2), hBD3(도 3), GSTT1(도 4)의 발현량을 확인한 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- [16] 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 조성물을 사람정상각질피부세포에 처리한 경우 GPX1, 카탈라아제(catalase), Trx1, Prdx1의 발현량을 확인한 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[17]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[18]

- [19] 이하에서는, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있도록 하기 위하여, 본 발명의 바람직한 실시예들에 관하여 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다.

[20]

- [21] 본 발명은 고련피 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물을 제공한다.

- [22] 고련피는 멸구슬나무과의 멸구슬나무(*Melia azedarach* L. var. *japonica* Makino의 학명으로 불리기도 함)의 수피 또는 근피를 말하며, 회충, 요충을 제거하고 풍진(風疹)과 개선(疥癬)을 치료한다. 피부습진에도 활용하며 이뇨와 해열작용이 있다. 약리작용으로 촌충구제약 및 회충 등의 장내기생충제거, 트리코모나스질염에 효과가 있음이 보고되었으나, 항산화 효과에 대해서는 보고된 바가 없다. 생김새는 구부러진 반관상 또는 관상으로 바깥면은 회갈색이고 세로로 길게 찢어진 무늬와 가로로 된 피목이 있으며, 코르크층을 벗긴 것은 적갈색이다. 껍은 면은 황백색으로 섬유성이며 질은 단단하나 꺾이기 쉽다. 이 약은 피목이 많은 어린 나무껍질이 좋다. 다른 이름으로 고련근피,련피,련근목피,금령자(金鈴子) 등이 있다.

[23]

- [24] 본 발명의 조성물은 고련피 외에, 연꽃잎 추출물을 더 함유할 수 있다.

- [25] 연꽃은 *Nelumbo nuficera*의 학명으로 불리기도 하며, 노란색 꽃이 피는 다년생 수생 식물로서, 음식 재료로 널리 사용되고 있을 뿐만 아니라 아시아 동부지역 특히 중국에서 다양한 의약재로 사용되고 있다. 구체적으로, 연꽃의 씨앗은 조직 염증, 암 및 나병 치료 그리고 독약 등의 다양한 용도에 응용되고 있다. 또한 연꽃의 배유아는 생체 내(in vivo)에서 급성 염증을 완화시키는 것으로 보고되어 있다. 또한 연꽃잎은 지혈 작용을 가지는 전통 중국 의약품으로 사용되고 있고, 실험동물에서도 과지혈증을 완화시키는 것으로 알려져 있다.
- [26]
- [27] 본 발명에서 사용되는 고련피 또는 연꽃잎 추출물은 추출방법이 특별히 한정되지는 않으며, 물 또는 유기용매로 추출물을 수득할 수 있다. 본 발명에서 사용하는 유기용매는 에탄올, 메탄올, 부탄올, 에테르, 에틸아세테이트 및 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 또는 이들 유기용매와 물과의 혼합용매를 사용할 수도 있다. 본 발명에서는 한국식물추출물은행에서 구입한 것을 사용하였다.
- [28] 상기 방법으로 제조된 고련피 또는 연꽃잎 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 30중량%의 양으로 함유되는 것이 바람직하다. 추출물의 총량이 1중량% 미만이면 효과가 미미하고, 30중량% 초과이면 안정성에 문제가 생길 수 있다.
- [29]
- [30] 본 발명의 고련피 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물 및 고련피 추출물과 연꽃잎 추출물을 동시에 함유하는 조성물은 항산화 효과를 갖는다.
- [31] 후술할 실험에 1 및 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 항산화 효과는 활성산소종 생성을 억제하는 것을 통하여 달성될 수 있다. 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)은 자유 전자를 가진 산소화합물로, 불안정한 상태를 안정시키고자 세포막의 구성성분인 지질단백이나 세포 내 DNA를 공격하여 세포의 파괴 및 자살 등을 일으켜 각종 질환의 발병과 노화를 촉진시키는 원인이 된다. 따라서 활성산소종을 감소시킴으로써 피부 노화를 예방할 수 있다.
- [32] 또한, 후술할 실험에 3 및 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 항산화 효과는 항산화 단백질 유전자의 발현을 증가시킴으로써 달성될 수 있다. 상기 항산화 단백질 유전자는 GPX1, 카탈라아제(catalase), Trx1 및 Prdx1를 포함하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [33] 글루타티온 퍼옥시다아제 1(Glutathione peroxidase 1, GPX1)은 인체 내에서 GPX1 유전자에 의해 코딩되는 효소인 글루타티온 퍼옥시다아제(Glutathione peroxidase, GPX)의 여러 종류 중 하나이다. 글루타티온 퍼옥시다아제는 수소 퍼옥시다아제의 해독(detoxification)에 관여하며 인체내 항산화 효소 중 가장 중요한 효소이다. 본 단백질 서열의 예로서, Hs00829989_Gh를 들 수 있다.
- [34] 카탈라아제(Catalase)는 거의 모든 생물에서 발견되는 공통적인 효소로서 수소 퍼옥시다아제를 물과 산소로 분해하는 것을 촉매시킨다. 본 단백질의 서열의 예로 Hs00156308_m1를 들 수 있다.

- [35] 티오레독신 1(thioredoxin 1, Trx1)은 산화 및 환원적 스트레스로부터 세포를 보호하는 티오레독신 시스템의 세포질성 티오레독신 아이소엔자임이다. 본 단백질의 서열의 예로서, Hs01555212_g1를 들 수 있다.
- [36] 퍼옥시레독신 1(Peroxiredoxin 1, Prdx1)은 인체 내에서 PRDX 1유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. 본 단백질 서열의 예로서, Hs00602020_Mh를 들 수 있다.
- [37]
- [38] 또한, 본 발명은 고련피 추출물 및 연꽃잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 황사에 의한 피부 유해영향 완화용 조성물을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물은 피부의 정상각질세포(Keratinocyte)에 미치는 유해영향을 완화하는 것일 수 있다.
- [39] 후술할 실험에 2 및 도 2 내지 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 고련피 추출물과 연꽃잎 추출물이 동시에 함유될 경우, 연꽃잎 또는 고련피 추출물 각각이 함유된 경우보다 GST, NQO1, hBD3, 각 유전자의 발현이 현저히 증가하는 것을 알 수 있다. GSTT1는 독소를 배출하는 효소이고, NQO1은 독소를 해독하는 효소이며, hBD3는 자연면역인자인 피부항균펩타이드로써, GST, NQO1 또는 hBD3를 포함하는 해독관련효소의 발현이 증가하면 피부 자극을 완화시켜 피부를 보호할 수 있게 된다.
- [40] 글루타티온 에스-트랜스퍼라제(Glutathione S-transferase, GST)는 생체 내에 존재하는 단백질로서 5개 클래스로 나뉜다. 그 중 하나인 글루타티온 에스-트랜스퍼라제 켄타-1(Glutathione S-transferase theta-1, GSTT1)은 GSTT1 유전자에 의해 코딩되는 효소로서 환원된 글루타티온의 다양한 친전자성 및 소수성 화합물에의 컨저게이션을 촉매시킨다. 단백질 서열의 예로서 Hs00184475_m1를 들 수 있다.
- [41] 퀴논옥시도리덕타아제(quinine oxidoreductase 1, NQO1)는 생체 내에 존재하는 단백질로서 퀴논의 두 전자 환원을 촉매시킨다. 이 효소는 퀴논-매개 발암성에 대해 생체를 보호하고 생체 환원 알킬화제를 활성화시킨다. 본 단백질 서열의 예로서, Hs01045994_m1를 들 수 있다.
- [42] 인간 베타 디펜신 3(Human Beta Defensin 3, hBD3)는 항원 제시 세포 (antigen presenting cells) 의 이주 및 활성화를 유도하고 면역 증강제 (immune enhancer) 로서 기능한다. 본 단백질의 서열의 예로서, hs00218678_m1를 들 수 있다.
- [43]
- [44] 본 발명에 따른 조성물은 화장료 조성물, 약학 조성물 또는 건강식품 조성물일 수 있다.
- [45] 상기 화장료 조성물은 그 제형에 특별히 한정되지는 않으며, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징로션, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 미용액, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 바디세정제, 염모제, 헤어토닉, 모발영양화장수, 헤어에센스, 헤어세럼, 스칼프트리트먼트, 헤어트리트먼트,

헤어컨디셔너, 헤어샴푸, 헤어로션, 치약, 구강청정제, 정발제, 양모제, 로션, 연고, 젤, 크림, 패취 또는 분무제 등으로 제형화될 수 있다.

[46] 상기 약학 조성물은 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 약제학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 다양한 경구 투여제 또는 비경구 투여제 형태로 제형화할 수 있다.

[47] 상기 경구 투여제는 예를 들면, 정제, 환제, 경질 및 연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있으며, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분, 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제 등의 약제학적 첨가제를 함유할 수 있다. 상기 정제는 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[48] 또한, 상기 비경구 투여제는 예를 들어, 피부 외용제일 수 있으며, 로션, 연고, 젤, 크림, 패취 또는 분무제 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[49] 상기 건강식품 조성물은 제형이 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 드링크제, 카라멜, 다이어트바 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형의 건강식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

[50] 상기 유효 성분의 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 약물의 1일 투여 용량은 투여하고자 하는 대상의 미만 진행 정도, 발병 시기, 연령, 건강상태, 합병증 등의 다양한 요인에 따라 달라지지만, 성인을 기준으로 할 때 일반적으로는 상기 조성물 1 내지 500mg/kg, 바람직하게는 30 내지 200 mg/kg을 1일 1 내지 2회 분할하여 투여할 수 있으며, 상기 투여량은 어떠한 방법으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

[51]

[52] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 사상과 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있다.

[53]

[54] **[실험예 1]** 사람 각질 세포에서 황사에 의한 활성산소 생성 변화

[55] 사람정상각질피부세포(Human epidermal neonatal keratinocyte cells)는 상용적으로 확보되어 권장하는 방법으로, 론자사(Lonza, Inc. 미국 메릴랜드주 워커스빌(Walkersville) 소재)에서 구입하여 계대배양한 후 CO₂ 배양기(CO₂

incubator)에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 세포를 배양하였다. 세포 배양액은 론자사의 지침서에 따라 배양하였다. 500ml의 KBM-2(Clonetics CC-3103) 배지에 KGM-2 볼렛 키트(Bullet kit: BPE(Bovine pituitary extract) 2ml, hEGF(human epidermal growth factor) 0.5 ml, 인슐린(Insulin) 0.5 ml, 하이드로코티손(Hydrocortisone) 0.5ml, 트랜스페린(Transferrin) 0.5 ml, 에피네프린(Epinephrine) 0.5 ml, 젠타마이신 설페이트+암포페리신-B(Gentamycin Sufate + Amphotericin-B: GA-1000) 0.5 ml을 첨가하여 사용하였다.

- [56] 사람 각질세포를 배양한 무처리군(대조군)을 준비하였다. 실험군의 경우 사람 각질세포 배양액에, 고련피 추출물 처리 실험군의 경우 10ppm의 고련피 추출물(한국식물추출물은행에서 구입)을 첨가하였고, 연꽃잎 추출물 처리 실험군도 10ppm의 연꽃잎 추출물(한국식물추출물은행에서 구입)을 첨가하였다. 고련피 및 연꽃잎 추출물 동시 처리 실험군의 경우 각각 5ppm의 고련피 및 연꽃잎 추출물 동량을 첨가하여 30분 전처리 후 황사시료 25 μ g/ml을 첨가하여 24시간 세포와 함께 배양하였다. 황사시료는 황사기간에 경기도 용인에 위치한 태평양기술연구원 옥상에서 포집하였다. 황사를 25 μ g/ml 씩 처리하고 24시간 후, 10ml의 인산염 완충액(Phosphate Buffered Saline, PBS)으로 세포를 두 번 세척하고, 2ml의 인산염 완충액에 외부로 생성되는 1mM luminol과 20Units/ml horse-radish peroxidase(HRP)를 넣어 chemiluminescence를 Glomax 20/20 Luminometer를 사용하여 1분 후 측정하였으며, 그 결과를 도 1에 도시하였다.
- [57] 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 사람정상각질피부세포에서 황사에 의해 증가된 활성산소의 생성을 고련피 추출물 및 연꽃잎 추출물이 억제하며, 특히 고련피 추출물 및 연꽃잎 추출물이 동시에 함유되었을 때 상승효과로 인하여 더욱 현저하게 억제 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[58]

- [59] [실험예 2] 고련피 또는 연꽃잎 추출물 처리시 독소해독 및 배출인자, 자연면역인자인 피부항균펩타이드의 유전자 발현 증가 확인

- [60] 사람정상각질피부세포(Human epidermal neonatal keratinocyte cells)는 상용적으로 확보되어 권장하는 방법으로, 론자사에서 구입하여 계대배양한 후 CO₂ 배양기(CO₂ incubator)에서, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 세포를 배양하였다. 세포 배양액은 론자사의 지침서에 따라 배양하였다. 500ml의 KBM-2(Clonetics CC-3103) 배지에 KGM-2 볼렛 키트(Bullet kit: BPE(Bovine pituitary extract) 2ml, hEGF(human epidermal growth factor) 0.5 ml, 인슐린(Insulin) 0.5 ml, 하이드로코티손(Hydrocortisone) 0.5ml, 트랜스페린(Transferrin) 0.5 ml, 에피네프린(Epinephrine) 0.5 ml, 젠타마이신 설페이트+암포페리신-B(Gentamycin Sufate + Amphotericin-B: GA-1000) 0.5 ml을 첨가하여 사용하였다.

- [61] 사람 각질세포를 배양한 무처리군(대조군)을 준비하였다. 실험군의 경우 사람 각질세포 배양액에, 고련피 추출물 처리 실험군의 경우 10ppm의 고련피 추출물(한국식물추출물은행에서 구입)을 첨가하였고, 연꽃잎 추출물 처리

실험군도 10ppm의 연꽃잎 추출물(한국식물추출물은행에서 구입)을 첨가하였다. 고련피 및 연꽃잎 추출물 동시 처리 실험군의 경우 각각 5ppm의 고련피 및 연꽃잎 추출물을 동량으로 첨가하여 30분 전처리 후 황사시료 25 μ g/ml을 첨가하여 24시간 세포와 함께 배양하였다. 고련피 또는 연꽃잎 추출물, 황사 처리 24시간 후, 10ml의 인산염 완충액으로 세포를 두 번 세척하고, 트라이졸(인비트로젠사)을 이용하여 세포 내의 전체 RNA(total RNA)를 분리하였다. 분리된 RNA를 키아젠사의 RNA 키트를 사용하여, 한번 더 정제한 후, 에질런트사의 바이오어널라이저 2100 모델 기기를 이용하여, RNA의 질(quality)을 확인하였다. 인비트로젠사의 역전사키트(Superscript Reverse Transcriptase (RT) II kit)를 이용하여 상기 분리된 RNA로부터 cDNA를 합성하였고, 이를 실시간역전사중합효소연쇄반응(real time-reverse transcription polymerase chain reaction, Q-RT-PCR)으로 정량적으로 분석하였다. GSTT1(Hs00184475_m1), NQO1(Hs01045994_m1), hBD3(hs00218678_m1)의 발현 패턴 변화는 어플라이드 바이오시스템사의 택맨 유전자발현시스템(TaqMan®geneexpressionassaykit)을 이용하여 평가하였으며, 그 결과를 도 2 내지 4에 도시하였다.

- [62] 도 2 내지 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 고련피 및 연꽃잎 추출물이 사람정상각질피부세포에서, 독성물질을 해독하는 NQO1[도 2], 자연면역인자인 피부항균펩타이드 hBD3[도 3] 및 독소를 배출하는 효소인 GSTT1[도 4]의 유전자 발현양을 증가시킴을 확인하였다. 이러한 효과는 고련피 및 연꽃잎 추출물을 혼합 처리시 더욱 현저하게 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [63] 따라서, 고련피 또는 연꽃잎 추출물의 혼합 처리시 독소해독, 배출 및 자연면역인자의 발현 또한 상승효과로 인하여 증가시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [64]
- [65] **[실험예 3]** 고련피와 연꽃잎 추출물 처리시 항산화 단백질 유전자 발현 증가 확인
- [66] 사람정상각질피부세포(Human epidermal neonatal keratinocyte cells)는 상용적으로 확보되어 권장하는 방법으로, 론자사에서 구입하여 계대배양한 후 CO₂ 배양기(CO₂ incubator)에서, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 세포를 배양하였다. 세포 배양액은 론자사의 지침서에 따라 배양하였다. 500ml의 KBM-2(Clonetics CC-3103) 배지에 KGM-2 볼렛 키트(Bullet kit: BPE(Bovine pituitary extract) 2ml, hEGF(human epidermal growth factor) 0.5 ml, 인슐린(Insulin) 0.5 ml, 하이드로코티손(Hydrocortisone) 0.5ml, 트랜스페린(Transferrin) 0.5 ml, 에피네프린(Epinephrine) 0.5 ml, 젠타마이신 설페이트+암포페리신-B(Gentamycin Sufate + Amphotericin-B: GA-1000) 0.5 ml을 첨가하여 사용하였다.
- [67] 사람 각질세포를 배양한 무처리군(대조군)을 준비하였다. 실험군의 경우 사람 각질세포 배양액에, 고련피 추출물 처리 실험군의 경우 10ppm의 고련피

추출물(한국식물추출물은행에서 구입)을 첨가하였고, 연꽃잎 추출물 처리 실험군도 10ppm의 연꽃잎 추출물(한국식물추출물은행에서 구입)을 첨가하였다. 고련피 및 연꽃잎 추출물 동시 처리 실험군의 경우 각각 5ppm의 고련피 및 연꽃잎 추출물을 동량으로 첨가하여 24시간 세포와 함께 배양하였다. 물질 처리 24시간 후, 10ml의 인산염 완충액으로 세포를 두 번 세척하고, 트라이졸(인비트로젠사)을 이용하여 세포 내의 전체 RNA(total RNA)를 분리하였다. 분리된 RNA를 키아젠사의 RNA 키트를 사용하여, 한번 더 정제한 후, 에질런트사의 바이오어널라이저 2100 모델 기기를 이용하여, RNA의 질(quality)을 확인하였다. 인비트로젠사의 역전사키트(Superscript Reverse Transcriptase (RT) II kit)를 이용하여 상기 분리된 RNA로부터 cDNA를 합성하였고, 이를 실시간역전사중합효소연쇄반응(real time-reverse transcription polymerase chain reaction, Q-RT-PCR)으로 정량적으로 분석하였다. GPX1(Hs00829989_gH), catalase(Hs00156308_m1), Trx1(Hs01555212_g1), PRDX1(Hs00602020_mH)의 발현 패턴 변화는 어플라이드 바이오시스템사의 택맨 유전자발현시스템(TaqMan@geneexpressionassaykit)을 이용하여 평가하였다.

- [68] 사람정상각질피부세포에서 활성산소를 제거하는 항산화 효소인 GPX1, catalase, Trx1, Prdx1의 상대적 발현량이 고련피 추출물의 경우 각각 약 2.5, 2.0, 1.9, 1.9였고, 연꽃잎 추출물의 경우 각각 약 1.9, 1.7, 1.6, 1.7이었다. 고련피와 연꽃잎 추출물을 함께 처리하는 경우는 도 5에 도시한 바와 같이, GPX1, catalase, Trx1, Prdx1 각각 약 3.0, 2.43, 2.48, 2.4로, 가장 발현량이 높은 것을 알 수 있었다.
- [69] 따라서, 이를 통해 항산화 효소의 발현이 고련피 추출물 단독 처리시 증가할 뿐 아니라, 고련피 및 연꽃잎 추출물 동시 처리시에는 더욱 증가하여 유효한 효과를 가짐을 알 수 있었다.
- [70]
- [71] 본 발명의 고련피 및 연꽃잎 추출물을 함유하는 조성물의 제형예를 하기에서 설명하지만, 본 발명의 조성물이 이 예로만 한정되는 것은 아니다.
- [72]
- [73] [제형예 1] 로션형 제형
- [74] 고련피 및 연꽃잎 추출물 3.00
- [75] L-아스코르빈산-2-인산마그네슘염 1.00
- [76] 수용성 콜라겐 (1% 수용액) 1.00
- [77] 시트르산나트륨 0.10
- [78] 시트르산 0.05
- [79] 감초 엑기스 0.20
- [80] 1,3-부틸렌글리콜 3.00
- [81] 정제수 잔량
- [82] (단위: 중량%)

- [83]
- [84] **[제형예 2] 크림형 제제**
- [85] 고련피 및 연꽃잎 추출물 1.00
- [86] 폴리에틸렌글리콜모노스테아레이트 2.00
- [87] 자기유화형 모노스테아르산글리세린 5.00
- [88] 세틸알코올 4.00
- [89] 스쿠알렌 6.00
- [90] 트리2-에틸헥산글리세릴 6.00
- [91] 스핑고당지질 1.00
- [92] 1,3-부틸렌글리콜 7.00
- [93] 정제수 잔량
- [94] (단위: 중량%)
- [95]
- [96] **[제형예 3] 팩형 제제**
- [97] 고련피 및 연꽃잎 추출물 5.00
- [98] 폴리비닐알코올 13.00
- [99] L-아스코르빈산-2-인산마그네슘염 1.00
- [100] 라우로일히드록시프롤린 1.00
- [101] 수용성 콜라겐 (1% 수용액) 2.00
- [102] 1,3-부틸렌글리콜 3.00
- [103] 에탄올 5.00
- [104] 정제수 잔량
- [105] (단위: 중량%)
- [106]
- [107] **[제형예 4] 미용액형 제제**
- [108] 고련피 및 연꽃잎 추출물 2.00
- [109] 히드록시에틸렌셀룰로오스 (2% 수용액) 12.00
- [110] 크산탄검 (2% 수용액) 2.00
- [111] 1,3-부틸렌글리콜 6.00
- [112] 진한 글리세린 4.00
- [113] 히알루론산나트륨 (1% 수용액) 5.00
- [114] 정제수 잔량
- [115] (단위: 중량%)

청구범위

- [청구항 1] 고련피 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 조성물은 연꽃잎 추출물을 더 함유하는 것인 조성물.
- [청구항 3] 제 1항 또는 제 2항에 있어서,
상기 조성물은 활성산소종 생성을 억제함을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 1항 또는 제 2항에 있어서,
상기 조성물은 항산화 단백질 유전자의 발현을 증가시킴을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 항산화 단백질 유전자는 GPX1, 카탈라아제(catalase), Trx1 및 Prdx1를 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 6] 고련피 추출물 및 연꽃잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 황사에 의한 피부 유해영향 완화용 조성물.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서,
상기 조성물은 GST, NQO1 또는 hBD3의 발현을 증가시킴을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 제 1항, 제 2항 및 제 6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조성물은 피부의 정상각질세포(Keratinocyte)에 미치는 유해영향을 완화하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 9] 제 1항, 제 2항 및 제 6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 추출물의 총량은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 30 중량%인 것인 조성물.