

새로운 주름개선 소재: 3,9-diferuloyl-6-oxopterocarpin (Tensolin-F[®])의 개발과 화장품 응용

이 범 천[†] · 이 정 재 · 박 성 민 · 김 철 배 · 심 관 섭 · 김 진 화 · 이 근 수 · 이 천 일 · 표 형 배

한불화장품(주) 기술연구소

3,9-Diferuloyl-6-oxopterocarpin (Tensolin-F[®]): a Novel Anti-wrinkle Agent for Cosmeceuticals

Bum-Chun Lee[†], Jeong-Jae Lee, Sung-Min Park, Chul-Bae Kim, Gwan-Sub Sim, Jin-Hwa Kim, Geun-Soo Lee, Chun-Il Lee, and Hyeong-Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-834, Korea

요약: 3,9-Dihydro-6-oxopterocarpin과 ferulic acid의 에스테르 반응을 통해 페룰산 유도체인 3,9-diferuloyl-6-oxopterocarpin (Tensolin-F[®])를 합성하여 이를 함유한 주름개선 화장품을 개발하였다. Tensolin-F[®]는 농도 의존적으로 DPPH와 superoxide radical에 대한 소거효과를 나타냈으며, 각각 0.8 mM에서 78%, 0.053 mM에서 92.9%로 DPPH와 superoxide radical을 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. MMP-1 효소 활성 저해 효과도 0.16 mM에서 74%를 저해하였다. HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현 저해 효과는 Tensolin-F[®] 0.8 uM에서 85.5%로 단백질 수준에서 모두 농도 의존적으로 발현 저해 효과가 나타났다. Tensolin-F[®]를 함유한 제품의 피부 주름개선 효과 평가 결과, Tensolin-F[®]를 함유한 화장품을 약 8주 간 도포한 경우 유의한 주름개선 효과가 있음을 확인 할 수 있었다. 본 연구를 통하여 Tensolin-F[®]는 항산화 효과와 MMP-1활성 저해 효과 및 UVA에 의한 MMP-1의 발현을 저해하는 효과가 나타났으며 새로운 주름개선 기능성 화장품으로 이용될 수 있을 것이다.

Abstract: As a novel anti-wrinkle agent, 3,9-diferuloyl-6-oxopterocarpin (Tensolin-F[®]) has been synthesized and its anti-aging effects have been investigated. In the present study, to investigate the relationship between aging and Tensolin-F[®], we examined its effect on scavenging activities of radicals and reactive oxygen species (ROS), *in vitro* inhibition activity of matrix-metalloproteinase (MMP) and expression of UVA-induced MMPs in human dermal fibroblasts (HDF). Tensolin-F[®] was found to show activities of scavenging radicals and ROS with the IC₅₀ values of 0.2 mM and 0.95 mM against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and superoxide radicals, respectively, in the xanthine/xanthine oxidase system. Fluorometric assays for the proteolytic activities of MMP-1 (collagenase) were performed using fluorescent collagen substrates. Tensolin-F[®] inhibited the activities of MMP-1 in a dose-dependent manner and the IC₅₀ values calculated from semi-log plots were 0.025 mM. Also, UVA induced MMP-1 expression was reduced 85% by treatment with Tensolin-F[®] at 0.8 uM, which was reduced dose-dependent manner. The results of clinical study showed that 4.8 mM Tensolin-F[®] treated group reduced wrinkle significantly compared with placebo treated group (P < 0.05). Taken together, these result suggest that Tensolin-F[®] act as an anti-wrinkle agent by taking effects to antioxidation and reducing UVA-induced MMP-1 production.

Keywords: 3,9-diferuloyl-6-oxopterocarpin, synthesis, antioxidant, anti-aging cosmetics

1. 서 론

피부의 노화는 시간의 흐름에 따라 생리적 노화(chronological aging) 과정과 외제적 요인에 의한 노화(extrinsic aging) 과정으로 나누어 진다[1]. 피부노화에 영향을 미치

는 외부인자들은 바람, 온도, 습도, 담배연기, 공해, 자외선 등에 의해서 노화가 일어나며 특히 자외선에 의한 노화를 광노화라고 한다. 자외선은 유해한 활성화 산소를 많이 만들어내고, 피부 세포에서 유전자 돌연변이를 유발 할 뿐만 아니라, 신호 전달 체계나, 세포주기, 또는 암 유발 등에 관련된 유전자들의 발현을 변화시킨다. 따라서 ROS로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험은 증가하고

[†] 주 저자 (e-mail: epiboost@hanmail.net)

있다[2-5]. 만성적 일광 손상을 입은 피부에서 볼 수 있는 현상은 진피의 상부쪽 교원질의 비정상적인 elastotic material의 침착(solar elastosis)[6]과 proteoglycan이 증가되고 진피의 주 단백질인 콜라겐이 현저히 감소되는 것이다[7]. 일반적으로 진피층은 대다수의 type I collagen과 약간의 type III collagen, elastin, proteoglycan, fibronectin 등으로 구성되어 있다[8]. 또한 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 부여하며 이로 인해 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층의 90%를 차지하고 있어 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다[9].

Matrix metalloproteinase (MMP)는 세포외기질(Extracellular matrix, ECM)과 기저막(Basement membrane, BM)의 분해에 관여하는 여러 효소의 family로 구조와 기능적 특성에 따라 interstitial collagenase, stromelysin, gelatinase, membrane-type MMP (MT-MMP) 등 네개의 subfamily로 나누어 진다[10]. MMP는 활성중심부에 아연을 가지는 금속단백분해효소로 생체 내에서 잠재성 전효소(zymogen) 형태로 분비된다. 효소활성을 가지기 위해서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단, 활성화되며 활성화된 MMP는 2-macroglobulin이나 Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) 같은 저해제에 의해 활성이 조절되고 피부의 keratinocyte, fibroblast를 포함한 대다수의 많은 세포들이 MMP를 분비한다[11]. Fisher 등은 1회의 UV 조사에도 피부내의 MMP 활성이 증가되며 피부내 콜라겐을 현저하게 붕괴시킴으로써 MMP들이 진피층의 콜라겐 붕괴에 영향을 미치며, 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다[12].

페롤산은 자연계 식물의 종자에 널리 존재하는 천연 항산화 물질로서 항산화, 화학적 자극에 대한 방어, 염증 억제 등이 연구되고 있으며 최근에는 그 유도체화 기술을 이용한 항산화 및 멜라닌 생성 억제 효과가 연구되고 있다[13].

본 연구는 새로운 노화방지 물질로서 페롤산 유도체인 3,9-diferuloyl-6-oxoptero-carpen (Tensolin-F[®])을 합성하여 피부 노화에 대한 다양한 생리활성 기능을 연구하였으며 주름개선 기능성 화장품으로 개발하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1. 실험 재료 및 시약

합성 출발 물질 및 시약들은 상용 시약급을 사용하였으며 반응 용매는 무수 용매를 구입하여 별도의 재처리 없이 사용하였다. 녹는점은 보정되지 않았다. ¹H NMR (300 MHz)과 ¹³C NMR (75 MHz) spectrum은 FT-300 MHz spectrometer (Bruker, USA)를 사용하여 얻었으며

용매는 DMSO-*d*₆를 사용하였다. FT-IR spectra는 FT-IR (JASCO-5300, Japan)을 사용하여 얻었다. LC-MS spectrum은 Waters Alliance 2795 (Waters, USA)를 사용하여 얻었다.

2.2. Tensolin-F[®]의 합성

t-Butyldimethylsilyl기로 페놀의 수산기를 보호한 ferulic acid를 Arrieta의 방법[14]을 이용하여 활성화시킨 후, E. M. Bickoff의 방법[15]을 통해 제조된 3,9-dihydroxy-6-oxoptero-carpen(2)을 가하여 상온에서 3시간 동안 반응하였다. 반응 용매를 제거한 다음 혼합물에 증류수를 가해 석출된 고체를 여과하여 1일간 진공 건조한 후, tetrahydrofuran (THF)로 녹여 여기에 tetrabutylammonium fluoride (TBAF)를 가해 t-butyldimethylsilyl기를 제거하여 Tensolin-F[®](1)를 얻었다. Mp 248-250°C, UV-VIS (MeOH): 238.2, 299.6, 337.0 nm, IR(KBr): 3373, 2961, 1724, 1630, 1597, 1514, 1425, 1373, 1267, 1242, 1211, 1124 cm⁻¹, ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.92-7.76 (m, 4H), 7.43 (s, 2H), 7.33-7.20 (m, 3H), 6.98-6.61 (m, 7H), 3.83 (s, 6H) ppm, ¹³C NMR (75 MHz): δ 165.20, 163.38, 162.55, 161.02, 159.10, 158.24, 156.24, 152.20, 150.82, 149.80, 148.48, 146.19, 145.27, 134.06, 129.47, 127.21, 126.71, 125.80, 125.55, 124.60, 122.58, 118.01, 117.66, 117.58, 115.99, 115.56, 114.16, 111.12, 110.45, 107.84, 107.38, 106.12, 102.56, 100.94, 98.45, 56.20, 55.98 ppm, LC/MS m/z 620 (M+H) single component 98% (t_r 1.65 min).

2.3. 세포주

신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblast (HDF)는 Modern Tissue Technology (MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 DMEM/F12 (3:1) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10세대 세포를 실험에 이용하였다. Anti-MMP-1 antibody, anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase, phosphatase substrate는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

2.4. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 효과

항산화 활성은 DPPH (Aldrich, USA)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법[16]을 활용하였다. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동일량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합

한 후 실온에서 10분 동안 반응 후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Superoxide radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거 효과는 NBT (nitroblue tetrazolium) 방법에 의해 측정하였다[17]. 0.05 M Na₂CO₃ buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 Tensolin-F[®]를 가한 후 25°C에서 10분간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/mL xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25분 동안 반응 후 superoxide radical 소거 효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. MMP-1 (Collagenase) 저해 효과 측정

Tensolin-F[®]의 MMP-1 활성 저해 효과를 측정하기 위하여 형광 분석법을 이용하였다. 실험에 사용한 기질은 형광물질이 표지된 DQ collagen, 효소(collagenase)는 Molecular probe사(Eugene, OR, USA)에서 시판중인 제품을 사용하였으며, 반응완충액(0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 50 mM CaCl₂, 2 mM sodium azide, pH 7.6)은 10 배 희석 후 사용하였다. 반응완충액 100 µL에 0.25 mg/mL로 반응완충액에 용해한 DQ collagen 20 µL과 시료 40 µL을 첨가하고 0.5 Unit로 희석한 collagenase 40 µL을 첨가한다. 암소, 실온에서 20분 경과 후 형광 분광광도계(Perkin Elmer, UK)를 이용하여 흡수파장 495 nm, 방출파장 515 nm로 형광값을 측정하며, 대조군으로서 효소액 대신 반응완충액을 효소와 동량 첨가하여 형광값을 측정하였으며 시료 자체의 형광값도 측정하여 효소활성 계산시 보정하였다.

2.7. 세포 생존률 측정

MTT (3-(4,5-dimethylthiazo2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide) 정량은 Mosmann[18]의 방법을 변형하여 실시하였다. HDF를 2×10⁵ cells/mL 농도로 96-well plate의 well에 Tensolin-F[®]를 세포에 투여하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액(5 µL/mL)을 첨가하고 4 시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100 µL acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 570 nm에서 micro plate reader (Model ELX 800, BIO-TEK Instruments, USA)로 흡광도를 측정하였다.

2.8. UVA 조사 및 시료의 처리

HDF를 1.5×10⁵ cells/mL의 농도로 35 mm dish에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한다. UVA 조사 전에 배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거 후 6.3 J/cm² UVA (UVA F15T8,

BLB, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. UVA 조사 후 배양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3:1) 배지에 Tensolin-F[®]를 투여하여 24시간 배양하였다.

2.9. MMP-1 발현저해 측정(ELISA법)

HDF에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24시간 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 blocking buffer로 37°C, 1시간 동안 blocking한 후 monoclonal anti-MMP-1을 assay buffer에 희석하여 150 µL씩 분주하고 37°C, 90분간 반응시켰다. Anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 assay buffer에 희석하여 150 µL씩 분주하고 37°C, 90분간 반응시킨 후 PBS-T로 세척한 다음 diethanolamine buffer에 1 mg/mL pNPP (p-nitrophenyl phosphate)를 포함한 기질용액 150 µL를 넣어 실온에서 30분간 반응시켰다. 3 N NaOH 50 µL를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 micro plate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.10. *in vivo* 주름 평가

Tensolin-F[®]의 주름개선 효과를 측정하기 위하여 각각의 시료를 첨가한 제형을 제조하여 50명 지원자 얼굴의 왼쪽과 오른쪽 눈꼬리의 주름 부위를 매일 2회(아침, 저녁) 반복하여 약 8주일간 사용하였다. 사용 전, 사용 4주 후, 8주 후 시점에서 피부 상태 변화를 조사하기 위해 설문지를 배포하였으며 각 피검자는 각 설문시점에서 현재의 피부 상태를 스스로 평가하고 설문지에 답하도록 하였다. 피부상태 변화를 조사하기 위하여 피부 건조도, 피부 탄력 정도, 피부 주름량, 피부 윤기, 피부 거칠기 이상 등 5개 항목의 질문을 하였고, 3회의 설문지 내용이 동일하였다. 또한, 제품사용에 따른 주름개선 효과를 Skin-Visiometer SV 600 (Courage-Khazaka Electronic, Germany)을 이용하여 분석하였다. 제품 사용 전(D 0), 제품 사용 4주 후(D 28), 제품 사용 8주일 (D 56) 후에 눈꼬리 주위(Crow's feet)의 주름을 실리콘 수지 복사물(레플리카)을 채취하였다. 레플리카의 제작은 항온항습조건(20~22°C, 상대습도 40~60%)에서 제작하였으며, 피험자는 측정 당시 피부에 모든 화장품을 바르지 않도록 하였다. 사용하기 전과 사용 후의 피부 표면상태와 주름의 변화를 피부영상 분석 장치인 Skin visiometer SV 600과 Visioscan (Courage-Khazaka Electronic, Germany)을 이용하여 측정하였다. Visiometer의 software를 이용하여 분석하였으며 분석 결과는 circle line을 이용하여 R1~R5의 값을 계산하여 분석하여 정리하였다. R1~R5의 값이 작아질수록 피부주름이 개선되어 주름의 깊이가 낮아짐을 의미하며

단위는 임의의 단위(Arbitrary unit)를 나타낸다.

- R1 : Skin Roughness, 최고 주름의 포인트와 최저 주름의 포인트와의 거리
- R2 : Maximum Roughness, 주름을 자동적으로 5개로 분할하여 각각 R1을 구한 후 분할된 주름 중에서 가장 높은 R1 값
- R3 : Average Roughness, 5개로 분할하여 얻은 R1 값의 평균
- R4 : Smoothness Depth
- R5 : 산술적인 평균 거칠기

2.11. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Tensolin-F[®]의 합성

3,9-Dihydroxy-6-oxoptero-carpene(2)과 t-butyl-dimethylsilyl기로 보호된 ferulic acid 간의 에스테르 반응을 위해 Arrieta의 방법을 이용하여 온화한 조건 하에서 ferulic acid를 활성화시키는 것이 매우 효율적인 것으로 나타났다. 그런 후 tetrabutylammonium fluoride (TBAF)로 매우 용이하게 t-butyl-dimethylsilyl기를 제거하여 Tensolin-F[®](1)를 얻을 수 있었다(Figure 1).

3.2. Free-radical 소거 효과(DPPH method)

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측 할 수 있다. 유해산소라 불려지는 활성산소는 세포 생체막의 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발[19]하는 것으로 알려져 있으며 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되어 있다[20,21]. Tensolin-F[®]의 항산화 효과를 DPPH를 이용하여 측정하였으며 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 BHT를 이용하여 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 BHT는 2.27 mM에서 70%의 DPPH radical을 소거하였으며, Tensolin-F[®]는 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈다(Figure 2). Tensolin-F[®]을 0.2, 0.4, 0.8 mM의 농도로 처리한 경우 각 DPPH radical 소거능은 50%, 65%, 78%로 나타났으며, IC₅₀은 0.2 mM의 소거능

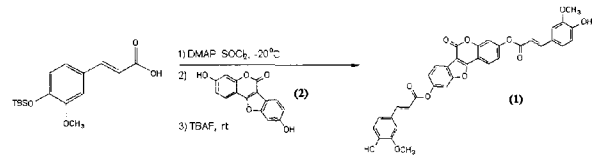


Figure 1. Synthetic procedure of Tensolin-F[®].

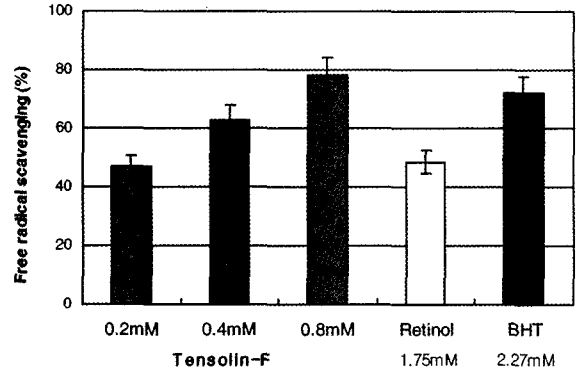


Figure 2. Free radical scavenging activity of Tensolin-F[®] by DPPH method.

을 보여 우수한 free radical 소거 효과를 나타내었다.

3.3. Superoxide radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide 음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타난다[22]. Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion의 생성저해 결과는 Figure 3에 나타내었다. 양성 대조군으로 3-t-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)를 이용하여 Tensolin-F[®]의 superoxide radical 소거효과를 비교하였다. 그 결과 Tensolin-F[®]은 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타내 0.013, 0.027, 0.053 mM의 농도로 처리한 경우 superoxide radical 소거능은 23.8, 77.9, 92.9%로 나타났으며, IC₅₀은 0.02 mM의 소거능을 보여 우수한 superoxide radical 소거 효과를 나타내었다. 양성대조군인 BHA는 0.2 mM에서 약 70%의 superoxide radical을 소거하였다.

3.4. MMP-1 (Collagenase) 활성 저해 효과

콜라겐은 결합조직의 탄력을 나타내며 진피를 구성하는 단백질의 70%를 차지한다. 이러한 콜라겐을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 콜라겐 type I을 분해하는 MMP-1 (Matrix metalloproteinase I, collagenase)으로 이러한 MMP-1의 효소활성을 저해하는 활성을 가진 물질은 콜라겐을 보호하여 피부조직의 기계적 특성을 유지시켜 탄력과 피부가 늘어지는 것을 방지할 수 있다고 알려져 있다[23]. 따라서

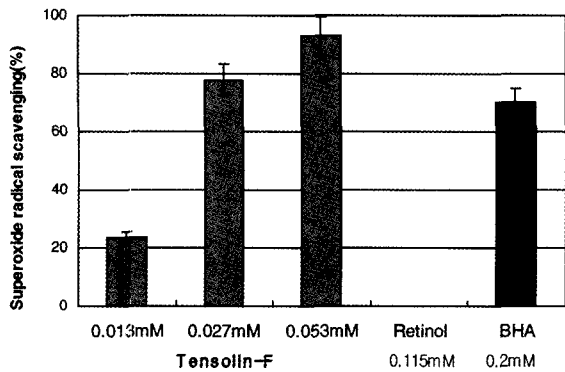


Figure 3. Superoxide radical scavenging activity of Tensolin-F[®] by NBT method.

MMP 저해 효과가 있는 소재는 주름을 개선하고 탄력 있는 피부를 위한 화장품 개발에 유용하게 사용될 수 있다는 생각으로 Tensolin-F[®]의 MMP-1의 효소활성에 대한 저해 효과를 확인하였다. 양성 대조군인 1,10-phenanthroline의 경우 0.2 mM의 농도에서 효소활성의 83% 이상을 저해하는 것으로 나타났으며 Tensolin-F[®]의 MMP-1의 저해 효과는 0.006, 0.032, 0.16 mM의 농도에서 효소활성의 36, 60, 74%를 저해하는 것으로 나타났으며, 이는 Tensolin-F[®]가 MMP-1 효소 활성 부위에 대하여 직접적인 저해 활성이 우수한 것을 확인하였다(Figure 4).

3.5. UVA에 의한 MMP-1 발현 저해 효과

피부의 광노화에 있어 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 AP-1의 활성도가 증가되는 신호전달 경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다[24]. 이러한 UVA에 의하여 발현이 증가되는 MMP-1에 Tensolin-F[®]가 미치는 영향을 알아보기 위하여 HDF에 6.3 J/cm² UVA를 조사하고 Tensolin-F[®]를 첨가하여 24시간 배양한 후 MMP-1 발현저해 효과를 ELISA을 통해 알아 보았다. 그 결과 Tensolin-F[®]는 농도 의존적으로 MMP-1 발현 저해 효과를 나타내었다. Tensolin-F[®]를 0.2, 0.4, 0.8 uM의 농도로 처리한 경우 MMP-1 발현 저해 효과는 5.6%, 49.5% 85.5%로 나타났다(Figure 5). Retinoic acid의 경우 UV에 의한 collagenase 발현 증가를 저하시켜 콜라겐의 분해를 막아주어 상대적으로 생합성을 증가시켜 준다고 알려져 있다[25]. 이는 UV에 의한 c-Jun 단백질의 발현증가를 억제하여 MMP-1 발현저해 효과가 보고된[26] retinoic acid의 3.5 uM에서 43.8% 발현 저해 효과와 비교하여 보아도 우수한 결과를 나타내었다.(data not shown)

결론적으로 Tensolin-F[®]는 HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1을 단백질 수준에서 발현을 저해

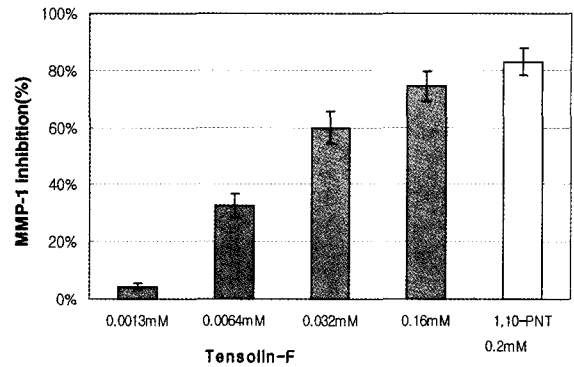


Figure 4. MMP-1 (collagenase) inhibition activity of Tensolin-F[®].

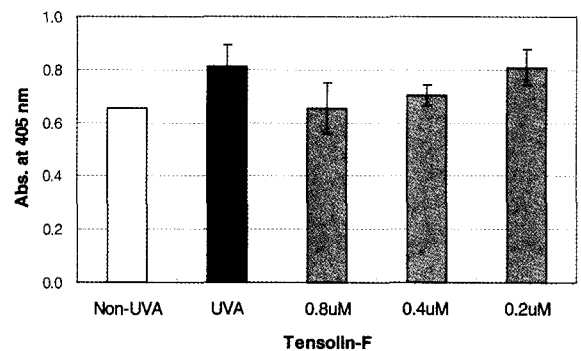


Figure 5. The effect of Tensolin-F[®] on the production of MMP-1 by the UV irradiated human dermal fibroblast.

하는 효과가 확인되었다. 이는 HDF에서 UVA로부터 ROS가 생성되며, ROS로 인해 MMP 발현[24-28]이 촉진되는 것을 Tensolin-F[®]가 ROS 소거작용을 통하여 MMP 발현을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

3.6. in vivo 주름개선 효과

Tensolin-F[®]를 함유한 제품에서의 주름개선 효과를 측정하기 위하여 피검자를 이용한 제품을 사용 전과 사용 4주, 8주 후의 피부결 개선 및 주름개선 효과를 피검자 설문 평가와 주름 측정기를 이용하여 평가하였다. skin visiometer를 이용한 replica 분석법을 사용 하였으며, 영상분석에 의한 통계분석 결과 각각의 매개변수(ΔR1~ΔR5) 평균값이 도포전에 비해 실험제품에서 유의적인 주름 감소 효과를 나타내었다(Figure 6).

주름 측정 parameter ΔR1, ΔR2, ΔR3, ΔR4, ΔR5 측정 결과를 보면, Tensolin-F[®]를 함유한 제품을 도포한 부위는 무함유 제품을 도포한 부위에 비해 사용 4주 후부터 ΔR1, ΔR2 측정값이 통계적으로 유의한 수준의(p < 0.05) 차이를 가지는 것으로 나타났으나 ΔR3, ΔR4 및 ΔR5는 유의적인 차이가 없었다. 하지만 제품 도포 8주일

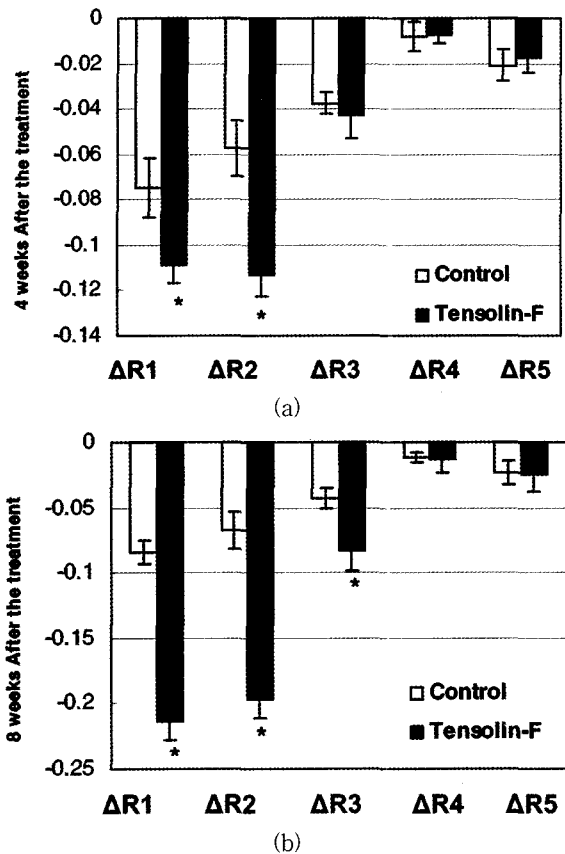


Figure 6. Comparison of the volunteer's eye area before and after the treatment of the o/w emulsion containing Tensolin-F[®]. (*, P < 0.05) (a) The wrinkle index(ΔR1~ΔR5) of the volunteer's eye area 4 weeks after the treatment. (b) The wrinkle index(ΔR1~ΔR5) of the volunteer's eye area 8 weeks after the treatment.

경과 후에는 각 parameter를 측정된 결과, ΔR1, ΔR2 및 ΔR3가 대조부위에 비해 통계적으로 유의한 수준의(p < 0.05) 차이를 가지는 것으로 나타났다. Tensolin-F[®]를 함유한 제품을 약 8주 간 도포했을 경우, 깊은 주름과 총 주름수의 감소 효과를 관찰할 수 있었으며, 95% 신뢰구간에서 통계적으로도 유의한 주름개선 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 새로운 주름개선 소재로서 페롤산 유도체인 3,9-diferuloyl-6-oxoptero-carpen (Tensolin-F[®])를 합성하여 다양한 생리활성 효과를 확인하고, 이를 함유한 주름 개선 화장품을 개발하였다. Tensolin-F[®]는 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 DPPH와 super-

oxide radical에 대한 소거 효과를 나타냈으며, 각각 0.8 mM에서 78%, 0.053 mM에서 92.9%로 DPPH와 super-oxide radical을 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. MMP-1 효소 활성 저해 효과도 0.16 mM에서 74%를 저해하는 것으로 나타나 비교적 우수한 효과를 나타내었다. HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현저해 효과는 Tensolin-F[®] 0.8 uM에서 85.5%로 단백질 수준에서 모두 농도 의존적으로 우수한 발현 저해 효과가 나타났다. Tensolin-F[®]를 함유한 제품의 피부 주름 개선 효과를 평가하기 위하여, 눈가 주름 부위의 제품도포 후 피부 주름의 변화와 피부거침 개선 효과를 평가하였다. Tensolin-F[®]를 함유한 제품을 약 8주 간 도포했을 경우, 깊은 주름과 총 주름수의 감소효과를 관찰할 수 있었으며, 95% 신뢰구간에서 통계적으로도 유의한 주름개선효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

본 연구를 통하여 Tensolin-F[®]는 항산화 효과와 MMP-1 활성 저해 효과 및 UVA에 의한 MMP-1의 발현을 효과적으로 저해하여 새로운 주름개선 기능성 화장품으로 이용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. S. Claude, K. Manabu, M. Laura, and P. Lester, Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line, *Free radical Biol & Med.*, **26**, 174 (1999).
2. A. Naqui, B. Chance, and E. Cadenas, Reactive oxygen intermediate in biochemistry, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 137 (1986).
3. E. Cadenas, Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 79 (1989).
4. K. J. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radicals, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
5. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **23**, 75 (1997).
6. M. Yaar and B. A. Gilchrist, Aging versus photo-aging: postulated mechanisms and effectors, *J. Investing. Dermatol. Symp. Proc.*, **3**, 47 (1998).
7. J. J. Li, Z. Dong, M. I. Dawson, and N. H. Colburn, Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element, *Cancer Research*, **56**, 483 (1996).
8. C. Bailly, S. Dreze, D. Asselineau, B. Nusgens, C. M. Lapiere, and M. Darmon, Retinoic acid inhibits

- the production of collagenase by human epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 47 (1990).
9. C. Huang, W. Y. Ma, M. I. Dawson, M. Rincon, R. A. Flavell, and Z. Dong, Blocking activator protein-1 activity, but not activation retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **94**, 5826 (1997).
 10. G. J. Fisher, S. W. Kang, and J. J. Voorhees, Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by Ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo, *J. Clin. Invest.*, **101**, 1432 (1998).
 11. G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid, *Photochem. Photobiol.*, **69**, 154 (1999).
 12. K. S. Lee, S. J. Kim, Y. W. Ryoo, and B. C. Kim, All-trans-retinoic acid down-regulates elastin promoter activity elevated by ultraviolet B irradiation in cultured skin fibroblasts, *J. Dermatol. Sci.*, **17**, 182 (1998).
 13. F. Yoko, K. Mari, and I. Masamitsu, Depigmentation effect of α -tocopheryl ferulate on normal human melanocytes, *Pigment Cell Res.*, **13**, 170 (2000).
 14. A. Arrieta, T. Garcia, and C. Palomo, *Syn. Comm.*, **12**, 1139 (1982).
 15. O. H. Emerson and E. M. Bickoff, *JACS*, **80**, 4381 (1958).
 16. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 17. K. Furuno, T. Akasako, and N. Sugihara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 19 (2002).
 18. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
 19. A. Kitahara, U. Matsumoto, H. Ueda, and R. Ueoka, A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of γ -irradiated methyl linolate, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2208 (1992).
 20. T. Hatano, Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-Tannins and related polyphenols, *Natural Medicines*, **49**, 357 (1995).
 21. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Active oxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162 (1995).
 22. P. Kuppusamy and J. L. Zweier, Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 9880 (1989).
 23. J. H. Chun, S. W., Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Decreased extracellular-signal regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 177 (2000).
 24. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, P. McPhillips, Z. Q. Wang, X. Li, Y. Wan, S. W. Kang, and J. J. Voorhees, Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo, *J. Clin. Invest.*, **101**, 1432 (1998).
 25. J. Y. Seo, G. E. Rhie, and J. H. Chung, The effect of ultraviolet irradiation on the expression of type I procollagen and MMP-1 in human dermal fibroblast and human skin in vivo, *Kor. J. Invest. Dermatol.*, **8**, 116 (2001).
 26. J. Y. Seo, H. R. Choi, G. E. Rhie, C. S. Youn, W. W. Choi, J. A. Kim, J. H. Chung, K. H. Kim, K. H. Cho, and H. C. Eun, The effect of retionic acid and vitamin C on the expression of the procollagen α 1(I), tropoelastin, and MMP-1 in human dermal fibroblast, *Kor. J. Invest. Dermatol.*, **8**, 23 (2001).
 27. S. K. Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblast, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
 28. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and S. K. Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of interstitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).