

파슬리추출물의 피부 노화 방지와 자극 완화에 대한 효과

김수남[†]·이소희·최규호·장이섭·이병곤

태평양기술연구원 피부과학연구소

Effects of Parsley Extract on Skin Anti-aging and Anti-irritation

Su-Nam Kim[†], So-Hee Lee, Gyu-Ho Choi, Ih-Seop Jang, and Byeong-Gon Lee

Skin Research Institute, Amore Pacific R&D Center, 314-1, Bora-ri, Giheung-eup, Yongin-si, Gyeonggi-do 449-729, Korea

요약: 파슬리추출물이 피부에 미치는 개선효과를 조사하기 위하여, 배양 인체 섬유아세포에서 total collagen, type I procollagen을 각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin 1 α (IL-1 α)와 tumor necrosis factor α (TNF α)를 무모생쥐(Female albino hairless mice, Skh:hr-1)에서는 진피의 두께와 밀도를 측정하였다. 그 결과, 1 μ g/mL 농도의 파슬리추출물은 total collagen은 23%, type I procollagen은 18% 증가시켰고, 자외선 B에 의한 PGE₂의 생합성은 약 60% 정도 감소시켰다. 10 μ M RA, 100 μ g/mL SLS와 자외선 B 30 mJ/cm²로 조사했을 때, IL-1 α 및 TNF α 의 생합성 역시 1 μ g/mL 파슬리추출물 처리 시 감소되었다. 4일 동안 1% 파슬리추출물로 폐쇄된 무모생쥐의 진피 두께는 대조군에 비해 약 1.5배 정도 두꺼워지고, 밀도도 훨씬 촘촘해졌다. 본 연구의 결과는 파슬리추출물이 피부에서 노화방지 효과 및 자극완화 효과가 있음을 시사하고 있다.

Abstract: In order to investigate the beneficial effects of parsley (*Petroselinum sativum*) extract on skin, we measured the synthesis of total collagen and type I procollagen in cultured normal human fibroblast (NHf), the synthesis of prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin 1 α (IL-1 α) and tumor necrosis factor α (TNF α) in HaCaT cell and we also measured dermal thickness and density in hairless mouse (Female albino hairless mice, Skh:hr-1). As the results, the synthesis of total collagen and type I procollagen were increased 23% and 18% respectively, after 1 μ g/mL parsley extract treatment. The productions of PGE₂ induced by UVB irradiation were decreased 60% after 1 μ g/mL parsley extract treatment. The treatment with 1 μ g/mL parsley extract also decreased the synthesis of IL-1 α and TNF α induced by 10 μ M RA, 100 μ g/mL SLS and 30 mJ/cm² UVB irradiation. After 4 days treatment with 1% parsley extract, the dermal thickness of hairless mouse was increased 1.5 times and the density of dermis was tighter than control. These results indicate that parsley extract have anti-aging and anti-irritation effects on skin.

Keywords: skin, parsley extract, collagen, aging, PGE₂

1. 서 론

미나리과의 2년생 식용 식물인 파슬리(*Petroselinum sativum*)는 유럽남동부와 아프리카 북부 원산이다. 고대 그리스시대부터 이뇨제로 널리 사용되어 왔으며, 피부를 부드럽게 하거나 건강하게 하고, 피부색을 밝게 해주는 효과를 가지고 있어서, 주근깨 제거 및 여드름 완화의 목적을 가진 화장품으로도 이용되어 왔다. 파슬리에는 철이나 칼슘, 마그네슘과 같은 무기물과 비타민 C와 A 등 인체에 유효한 영양성분이 풍부하여 일명 강장채소로서 신체에 균형 잡힌 건강함을 수여하는 역할을 충분히 담당

하고 있다. 식용으로 했을 때 파슬리는 정혈 및 조혈작용, 뇌신경촉진작용, 피부미용 효과, 점막기능 강화, 신장결석, 방광결석 등 신장장애 질환에 대한 효능 및 약효를 가지고 있다[1].

파슬리의 독특하고 강한 향기는 pinene, apiole이라는 정유성분으로 이 물질의 작용으로 장에서 일어나는 부패를 방지하고, 장내 유해한 박테리아 번식을 방지한다. 주요 성분으로는 flavonoids에 속하는 apiin, luteolin-glycosides, apigenin-glycosides, essential oil인 apiole, myristicin, cumarines인 bergapten, imperatorin과 vitamin C 등이 있다[2,3]. 본 연구에서는 파슬리추출물의 노화 방지 및 자극완화 소재로서의 가능성을 파악하기 위하여, 피부 노화 증상의 하나인 주름 개선 효과와, 피부미세염증의

[†] 주 저자 (e-mail: snkim@amorepacific.com)

개선 효과, 그리고 피부 자극물질에 대한 자극완화 효과를 검토하였으며, 그러한 과정을 통하여 파슬리추출물이 노화 방지 및 자극완화 효능이 있음을 확인하였기에 이에 보고한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 파슬리는 서울특별시 서초구 가락동 농수산물 시장에서 구입하였으며, 그늘에서 말린 뒤, 70% 에탄올로 3시간 동안 열탕추출한 추출물을 감압건조하여 시험물질로 사용하였다. 실험에 사용된 시약으로서 phosphate buffered saline (PBS), sodium lauryl sulfate (SLS), retinoic acid (RA) 등은 Sigma (USA)사 제품을 사용하였으며, trypsin/EDTA, penicillin/streptomycin, Dulbeccos Modification of Eagles medium (DMEM) 등은 Gibco (USA)사 제품을, L-[2,3,4,5-³H]proline은 Amersham pharmacia biotech (UK) 제품을, procollagen type-1 C-peptide EIA kit은 Takara (Japan) 제품을, PGE₂ EIA kit은 Cayman사 제품을, IL-1 α 및 TNF α EIA kit은 Pharmingen사 제품을 사용하였다. 기타 일반시약은 특급시약을 사용하였다. 사용된 기기는 ELISA reader (Dlbiotech, Korea), scintillation counter (Pharmacia, USA) 자외선 B 조사기 등을 사용하였다.

2.2. 동물 실험 및 세포 배양

6주령의 무모생쥐 (Female albino hairless mice, Skh: hr-1)를 Charles River Laboratories (Wilmington, Mass., USA)에서 구입하여 실험에 사용되는 40주령까지 온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 55 \pm 5%로 유지되는 항온항습 사육실에서 사육하였다.

실험에 사용된 섬유아세포는 정상포피의 지방층을 제거하고 잘게 잘라 collagenase로 표피와 진피를 분리한 후 진피조직을 각각 0.25% trypsin 용액에 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 10분간 처리하였다. 이후 vortex를 시행하여 섬유아세포(normal human fibroblast; NHF)를 유리시키고, 유리된 세포를 모아 세척한 후 10% 우태아혈청(FBS)이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다. 70~80% 정도 자라면 1:3의 비율로 분주하여 계대 배양하였고, 3~4차 계대배양한 세포를 실험에 이용하였다.

2.3. Total collagen synthesis assay

섬유아세포를 10% FBS, DMEM 배지를 사용하여, 24 well plate에 1 \times 10⁵ cells/well의 밀도로 분주하고, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양하였다. 24시간 후 섬유아세포를 L-[2,3,4,5-³H]Proline과 시료를 함유한 배지로 같이주

고 24시간 동안 더 배양한 후 배지 중에 생합성되어 분비된 collagen을 trichloroacetic acid (TCA)로 침전시켜 그 양을 scintillation counter를 사용해서 측정하였다.

2.4. Type I procollagen EIA assay

섬유아세포를 48 well plate에 1 \times 10⁴ cells/well의 밀도로 분주하고, 10% FBS, DMEM 배지에서 24시간 배양한 후에 시험물질이 포함된 혈청이 없는 배지에서 24시간 더 배양하였다. 배지 중에 유리된 procollagen의 양은 procollagen type 1 C-peptide EIA kit (MK101, Takara, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 섬유아세포의 총 단백질양으로 보정하였다.

2.5. 자외선에 의한 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂) 생합성

독일암연구소(DKFZ)의 Norbert E. Fusenig박사로부터 분양받은 사람유래 각질형성세포주인 HaCaT 세포를 96-well plate에 2 \times 10⁴ cells/well의 밀도로 분주하고, 500 μ M의 aspirin을 가한 뒤 2시간 CO₂ 배양기에서 배양하여 COX-1을 불활성화 시켰다. PBS (pH 7.4)로 2회 세척한 다음, 새로운 PBS를 가하고 20 mJ/cm² 용량의 UVB를 조사하였다. 검색시료가 포함된 0.1% FBS 함유 phenol red-free DMEM을 가하여 24시간 배양한 후에 배지 중으로 분비된 PGE₂의 양을 Cayman사의 PGE₂ EIA kit을 이용하여 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 측정하였다.

2.6. 여러 자극물질에 의한 proinflammatory cytokines의 생합성

HaCaT 세포를 96-well plate에 2 \times 10⁴ cells/well의 밀도로 분주하고, 파슬리추출물이 포함된 DMEM 배지로 교체하여 1시간 전처리 후, 자극원이 될 수 있는 SLS, 주름개선효과가 있지만 상대적으로 자극이 강한 RA와 UVB 30 mJ/cm²를 각각 처리 또는 조사하여 2시간 배양한 후에 배지 중으로 분비된 IL-1 α 또는 TNF α 의 양을 Pharmingen사의 IL-1 α 또는 TNF α EIA kit을 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다.

2.7. Histochemistry

단기시험인 4day patch assay를 시행하였다. 40주령의 자성, 무모생쥐(Skh: hr-1, Female albino, hairless mouse)의 등에 적절한 기제로 용해시킨 시료를 2일간 폐쇄 첩포(occlusive patch)하고, 하루 휴식 후에 한번 더 폐쇄 첩포 처치를 하였다. 피부를 생검하여 Verhoeff Van Gieson법으로 collagen에 대한 특수염색을 실시하였다.

2.8. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± SEM으로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Collagen 생합성 촉진 효과

Total collagen 생합성에 미치는 파슬리추출물의 작용을 알아보기 위해 transforming growth factorβ (TGFβ)를 양성대조군으로 하여 섬유아세포에서 시험한 결과 1 μg/mL의 농도로 처리했을 때, 대조군의 생합성량에 비하여 약 23% 증가하였고, 이는 양성대조군의 20%에 비하여 비슷하거나 3% 더 생합성촉진 효과가 있음을 보여 주었다(Figure 1).

또한 type I procollagen 생합성에 미치는 파슬리추출물의 영향을 조사하기 위하여 섬유아세포에 1 μg/mL로 파슬리추출물을 처리한 후 24시간 후에 배양상층액에서의 type I procollagen의 발현을 ELISA 방법으로 조사하였다. 그 결과, 파슬리추출물의 농도가 1 μg/mL일 경우 type I procollagen 생합성이 약 18% 증가하였다(Figure 2).

*in vivo*에서의 collagen 합성 촉진 효과를 조사하기 위해 1% 파슬리추출물을 무모생쥐의 등 부위에 4일간 폐쇄 첩포한 후 피부를 생검하여 Verhoeff Van Gieson 염색하여 표피와 진피의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 표피에서는 어떠한 변화도 관찰할 수 없었으며, 진피에서는 대조군에 비해 collagen 섬유 등의 밀도가 훨씬 더 촘촘해지고 1.5배 정도 더 두터워진 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3).

즉, 본 연구 결과 파슬리추출물은 배양한 섬유아세포에서 total collagen과 type I procollagen 생합성을 증가시키는 효과가 있음을 증명하였고, 또한 노화된 무모생쥐의 피부에 단기폐쇄첩포함에 따라 진피조직이 치밀해짐을 증명하였다. 동시에 본보에 결과로 제시하지는 않았지만 파슬리추출물은 자외선 조사 후 증가되는 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 발현 역시 억제하였다. 그러므로, 파슬리추출물은 자외선에 의한 일련의 조직파괴 반응을 억제하고, 조직 재생을 촉진시켜 자외선의 유해한 생물학적 작용을 예방할 수 있는 후보물질임을 알 수 있었다.

장기간 태양광선에 노출된 피부에서는 엉덩이와 같이 태양광선에 노출되지 않는 비노출 피부에 비하여 주름생합성, 탄력감소 등의 피부노화 증상이 심하게 나타난다. 대표적인 피부노화 증상인 주름의 발생기전에 대하여는 비교적 많은 연구가 진행되었으며, 광노화된 피부에서의 collagen 결핍상태가 주름의 원인이라는 가설이 제시된

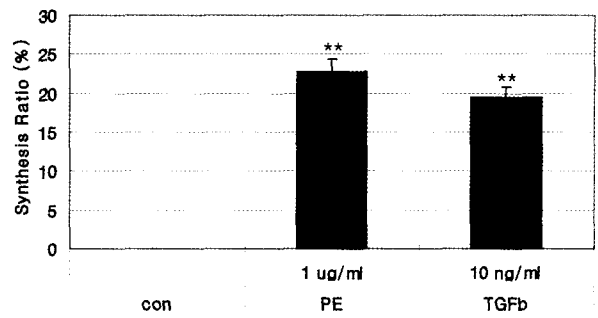


Figure 1. The effect of parsley extract (PE) on the production of total collagen. PE induced the expression of total collagen in cultured human fibroblasts. Data represent the mean ± SEM of 4 independent experiments.

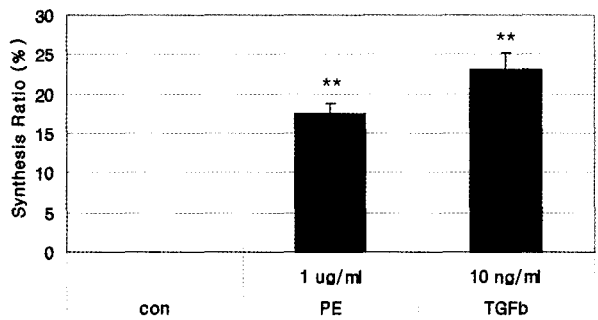


Figure 2. The effect of parsley extract (PE) on the production of type I procollagen. PE induced the expression of type I procollagen in cultured human fibroblasts. Data represent the mean ± SEM of 4 independent experiments.

바 있다. 배양한 피부세포 및 인체 피부에 자외선을 조사할 경우 각종 MMPs의 발현이 증가되며, 증가된 MMPs가 피부를 구성하고 있는 collagen을 분해하게 된다. 오랜 세월 자외선에 노출된 피부에서는 MMPs에 의해 collagen이 분해되어 collagen의 양이 점점 감소하여, 결국에는 collagen이 결핍되어 피부주름을 형성하게 된다는 가설이 가장 인정받고 있다[4-8]. 따라서 피부의 주름을 예방하거나 완화하기 위하여는 노화된 피부의 결핍된 collagen 양을 증가시키는 것이 한가지 방법일 수 있다. 피부에서 collagen 양을 증가시키는 방법으로는 섬유아세포에서의 collagen 합성을 증가시키는 것도 한 방법이 될 수 있을 것이다.

3.2. 자외선에 의한 PGE2 생합성 억제 효과

UVB의 조사에 의하여 피부세포에서 생합성되는 PGE2의 양이 파슬리추출물의 처리에 의해 감소하였다. Ha-CaT cell에서 파슬리추출물을 0.1, 1 μg/mL 처리 시, PGE2의 생합성이 약 52, 60% 정도 감소되었다(Figure 4).

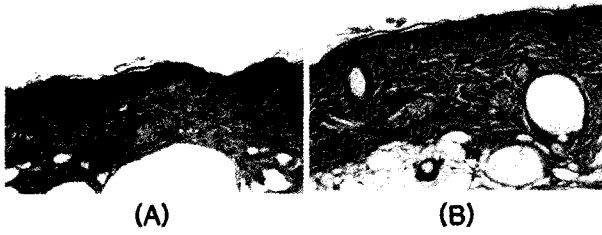


Figure 3. The effect of parsley extract (PE) on the epidermal thickness and dermis in aged hairless mouse skin *in vivo*. PE increased the thickness and density of dermis in aged hairless mouse skin *in vivo*. Skin was treated topically for 3 months with 1% PE. X100. (A) Control, (B) 1% PE treated.

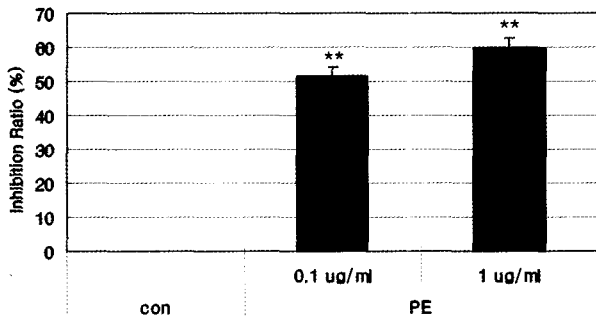
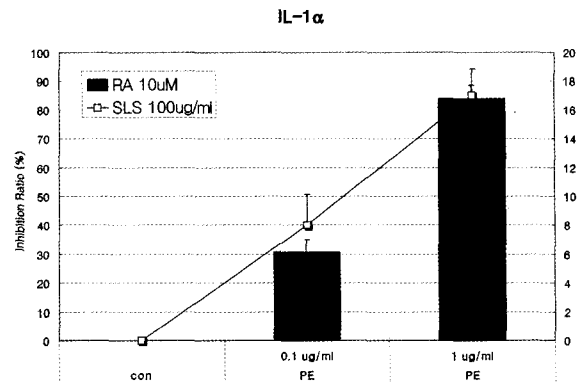


Figure 4. The effect of parsley extract (PE) on the production of PGE₂. PE decreased the UVB-induced production of PGE₂ in cultured HaCaT cell. Data represent the mean ± SEM of 4 independent experiments.

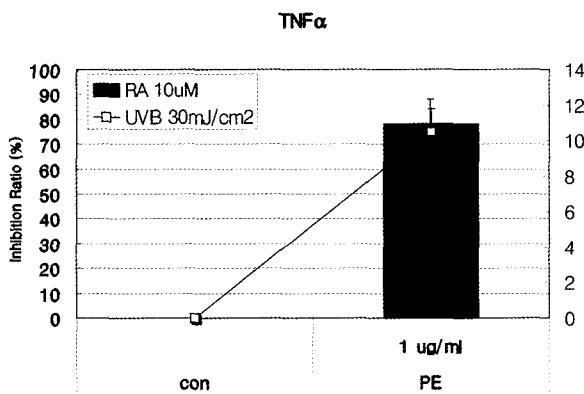
그러므로, 파슬리추출물은 자외선에 의한 염증반응과 이후 일어나는 자극과 동통의 발생을 억제하여 자외선의 유해한 생물학적 작용을 예방할 수 있는 후보물질로 예측된다.

3.3. 자극물질에 의한 proinflammatory cytokines의 생합성 억제 효과

피부가 자극을 받으면 동통, 홍반, 염증 등의 부작용이 일어나고, 이는 proinflammatory cytokine들인 TNF α , IL-1 α , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), IL-8 등에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 자극원이 될 수 있는 SLS, 주름개선 효과가 있지만 자극이 상대적으로 강한 RA, UVB에 의해 발생하는 proinflammatory cytokine들 중 IL-1 α 와 TNF α 가 파슬리추출물에 의해 어느 정도 감소하는지 알아보았다. 그 결과, 파슬리추출물은 0.1, 1 μ g/mL 농도에서 RA와 SLS에 의한 IL-1 α 의 방출을 약 8~84%까지 감소시켰고, RA와 UVB에 의한 TNF α 의 방출은 11~78% 감소시켜



(a)



(b)

Figure 5. The effect of parsley extract (PE) on the production of proinflammatory cytokines to several irritants. PE decreased the production of IL-1 α and TNF α by RA, SLS and UVB in cultured HaCaT cell. Data represent the mean ± SEM of 4 independent experiments. (A) release of IL-1 α , (B) release of TNF α .

서 자극원에 의한 자극을 상당히 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

즉 파슬리추출물은 자외선에 의한 PGE₂의 생합성을 억제하고, 여러 자극원에 의한 proinflammatory cytokine인 IL-1 α 와 TNF α 의 생합성을 억제하여, 강한 항염증 효과 및 자극완화효과를 보여주어, 염증으로 인해 발생할 수 있는 피부자극이나 동통, 노화의 촉진 등을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

본 실험 이후에는 사람을 대상으로 파슬리추출물의 주름 완화 효과에 대한 체계적인 임상연구가 필요할 것으로 생각되며, 또한 파슬리추출물 중 procollagen의 생합성을 증가시키며, PGE₂ 및 proinflammatory cytokine의 생합성을 억제하는 주성분과 그것의 분자생물학적 기전을 밝혀야 할 것이다.

4. 결 론

피부노화에 대한 파슬리추출물의 효능을 규명하기 위해, *in vitro*에서 total collagen 생합성, type I procollagen 생합성, 자외선 조사에 의한 PGE₂ 생합성에 미치는 영향, 여러 자극물질에 의한 proinflammatory cytokines의 생합성에 미치는 영향을 보고, 무모생쥐 피부에 대한 파슬리추출물의 피부 개선 효과를 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- (1) 파슬리추출물은 배양 인체 섬유아세포에서 total collagen 생합성을 증가시켰다.
- (2) 파슬리추출물은 배양 인체 섬유아세포에서 type I procollagen 생합성을 증가시켰다.
- (3) 파슬리추출물은 노화된 무모생쥐에서 노화로 얇아진 진피의 두께를 증가시키며, 진피의 밀도 또한 증가시켰다.
- (4) 파슬리추출물은 HaCaT cell에서 UVB에 의한 PGE₂ 생합성을 감소시켰다.
- (5) 파슬리추출물은 HaCaT cell에서 SLS, RA, UVB에 의한 proinflammatory cytokine인 IL-1 α , TNF α 의 생합성을 감소시켰다.

참 고 문 헌

1. S. I. Kreydiyyeh and J. Usta, Diuretic effect and mechanism of action of parsley, *J. Ethnopharmacol.*, **79**, 353 (2002).
2. M. Yoshikawa, T. Uemura, H. Shimoda, A. Kishi, Y. Kawahara, and H. Matsuda, Medicinal foodstuffs. XVIII. Phytoestrogens from the aerial part of *Petroselinum crispum* Mill. (Parsley) and structures of 6''-acetylapiin and a new monoterpene glycoside, petroside, *Chem. Pharm. Bull., (Tokyo)* **48**, 1039 (2000).
3. 김영희, 김근수, 홍종기, 파슬리 잎과 씨의 휘발성 성분, *한국농화학회지*, **33**, 62 (1990).
4. G. J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees, Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, *Arch Dermatol.*, **138**, 1462 (2002).
5. S. E. Fligiel, J. Varani, S. C. Datta, S. Kang, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Collagen degradation in aged/photodamaged skin *in vivo* and after exposure to matrix metalloproteinase-1 *in vitro*, *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 842 (2003).
6. M. Brennan, H. Bhatti, K. C. Nerusu, N. Bhagavathula, S. Kang, G. J. Fisher, J. Varani, and J. J. Voorhees, Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin, *Photochem. Photobiol.*, **78**, 43 (2003).
7. A. P. Pentland, S. D. Shapiro, and H. G. Welgus, Agonist-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and metalloproteinases by human macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E₂ synthesis, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 52 (1995).
8. A. Mauviel, C. Halcin, P. Vasiloudes, W. C. Parks, M. Kurkinen, and J. Uitto, Uncoordinate regulation of collagenase, stromelysin, and tissue inhibitor of metalloproteinases genes by prostaglandin E₂: selective enhancement of collagenase gene expression in human dermal fibroblasts in culture, *J. Cell. Biochem.*, **54**, 465 (1994).