

연교추출물의 피부 항노화 효과

김 미 진 · 김 자 영 · 정 택 규 · ¹최 상 원 · † 윤 경 섭
(주)사임당화장품 기술연구소, ¹대구가톨릭대학교 식품영양학과
(접수 : 2006. 7. 11., 게재승인 : 2006. 12. 2.)

Skin Anti-aging Effect of *Forsythia viridissima* L. Extract

Mi Jin Kim, Ja Young Kim, Teak Kyu Jung, Sang-Won Choi¹, and Kyung-Sup Yoon†

R&D Center, Saimdang Cosmetics Co., Ltd., Chungbuk 370-802, Korea

¹Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

(Received : 2006. 7. 11., Accepted : 2006. 12. 2.)

Skin anti-aging effect of *Forsythia viridissima* L. extract was evaluated by using antioxidant assay, expression of type I procollagen, and UVA-induced matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts. Matairesinol-rich *Forsythia viridissima* L. extract was showed the scavenging activity of radicals and reactive oxygen species with the IC₅₀ values of 4.50 µg/ml against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and 542.43 µg/ml against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. The type I procollagen was increased 33.76% by treatment with matairesinol-rich *Forsythia viridissima* L. extract, and UVA-induced MMP-1 was reduced 35.78% in a dose dependent manner. In the human skin irritation test, 2% matairesinol-rich *Forsythia viridissima* L. extract did not show any adverse effect. Also, the clinical study indicated that a cream group treated with 0.2% matairesinol-rich *Forsythia viridissima* L. extract significantly reduced skin wrinkles, as compared with a non-treated cream group (p < 0.05). These results suggest that *Forsythia viridissima* L. extract may be useful as a potential source of functional anti-aging cosmetics.

Key Words : Anti-aging, *Forsythia viridissima* L. extract, type I procollagen, matrix metalloproteinase-1, cosmetics

서 론

나이가 들어감에 따라 생리적·신체적으로 다양한 변화를 겪게 된다. 특히, 갱년기의 여성은 정신적·신체적으로 큰 변화를 초래하며, 이는 주로 여성호르몬인 estrogen의 변화에 기인하는 것으로 알려져 있다. 여성호르몬 estrogen 분비 결핍에 따라 암을 비롯한 심장병, 골다공증 및 노화 등의 발병도 증가할 뿐만 아니라, 섬유아세포에서는 collagen, elastin 등의 생성이 감소되고, 피부가 얇아지면서 피부의 탄력이 감소한다. 즉, estrogen은 진피에 있는 섬유아세포를 자극하여 collagen 합성과 신진대사 및 hyaluronic acid 합성을 촉진시키며, 아울러 collagen의 대사에 관여하는 분해효소 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 발현을 조절하여 collagen의 분해를 억제한다(1-3).

Estrogen의 결핍으로 여성의 내분비 노화증상을 개선하기 위해 가장 많이 연구되고 있는 방법으로 호르몬 대체요법(hormone replacement therapy; HRT)이 있다. 이는 피부 탄력성 증가, 주름살 개선, 심혈관계 질환 및 골다공증 증상 등을 효과적으로 치료 및 예방하는 것으로 알려져 있어 널리 사용되어 왔다(4, 5). 그러나 호르몬 대체요법은 부족한 여성호르몬을 직접 공급하는 것으로, 장기적인 호르몬 투여는 불규칙적인 출혈과 유방암 및 자궁암 등의 부작용을 유발시킬 수 있다(5). 따라서 estrogen을 대신할 수 있는 물질을 찾고자 많은 연구가 이루어졌다. 그 결과, estrogen과 유사한 작용을 하는 물질로써 식물로부터 유래된 phytoestrogen이 발견되었다. Phytoestrogen은 동물사료로써 이를 섭취한 동물이 불임현상을 나타낸다는 관찰로부터 발견하게 된 물질이며, 이들은 특히 콩과식물에 많이 함유되어 있다고 알려져 있다(6). Phytoestrogen 성분은 daidzein, genistein, formononetin, biochanin A 등의 isoflavone 화합물, coumesterol 등의 coumestan 화합물, enterolacton 등의 lignan 화합물 및 enterodiol 등의 phenolic 화합물들이다. 이것들은 식물마다 함유 성분 및 성분들의 함량비가 다르기 때문에 식물 종, 추출부위 및 추출 방법에 따라 추출물의 생리활성 및 효능 정도

† Corresponding Author : R&D Center, Saimdang Cosmetics Co., Ltd., 805-5 Gyesan-ri, Yeongdong-eup, Yeongdong-gun, Chungbuk 370-802, Korea

Tel : +82-43-743-5338, Fax : +82-43-744-4857

E-mail : ksyoonjh@hanmail.net

도 달라질 수 있다.

연교 (連翹, *Forsythiae Fructus*)는 물푸레나무과 (Oleaceae)에 속하는 의성개나리 (*Forsythia viridissima* Lindley)의 열매로 신농본초경에 기재되어 있으며 한방과 민간에서 열매를 종창, 임질, 통경, 이뇨, 치질, 결핵, 음, 해독 등에 널리 사용되고 있다(7). 연교의 종류는 한국연교 (*Forsythia viridissima* Lindley, *Forsythia koreana* Nakai)와 일본연교 (*Forsythia suspensa* Vahl)로 대별된다. *F. koreana*는 *F. viridissima* Lindley var. *koreana* Nakai란 학명으로 사용하기도 하며 한연교라고 불리고 있다. *F. viridissima*는 의성개나리 또는 금중화라고도 하는데, 우리나라 일부와 중국 등지에서 자생하고 있다.

연교에 함유되어 있는 성분에는 lignans (phillygenin, pinosresinol, arctigenin, matairesinol), lignan glucosides (phillyrin, pinosresinol-D-glucose, arctiin, matairesinoside), flavonoid (rutin) 및 3,4-dihydroxyphenethyl alcohol의 caffeoyl glycosides (forsythiaside, acteoside, suspensaside 및 β -hydroxyacteoside) 등이 있다(8).

연교에 포함된 성분 중 lignans는 2,3-dibenzylbutane 구조를 가진 화합물로 많은 식물에 미량 존재한다. 예전에는 고등식물에만 존재하는 것으로 생각되었지만, 사람이나 동물의 체액에도 mammalian lignan의 형태로도 존재하는 것이 밝혀졌다. 이는 plant lignan이 장내미생물에 의해 구조가 전환된 형태로 enterolactone과 enterodiol이 그 대표적인 예이다(9).

지금까지 연교의 생리활성 작용에 대한 연구로는 주로 estrogen과 유사하거나 반대되는 성질을 보이며 *in vitro*에서의 항산화 활성이 우수한 것으로 보고되었으며(10-12), 그 외 항바이러스효과(13), 항염증효과(14), 항균작용(15), 혈압강화작용(16), 후천성면역결핍증 치료(17)에 대한 보고가 있다.

연교는 tyrosinase 활성저해제로서 멜라닌합성을 저해하는 효과 및 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)에 의해 유발되는 멜라닌 대사 경로에 작용하여 멜라닌생성을 제어, 저해하는 효과가 있어 미백화장품 소재로서도 주목을 받고 있다(18-20). 연교추출물을 포함한 생약추출물과 향료를 포함하는 여드름 또는 염증방지용 화장품 조성물이 개시된 바 있으며(21, 22), 암 치료의 의약품(23)과 식품(24)에의 활용이 개시되어 있다.

본 연구에서는 연교 성분들 중에 다양한 생리활성 작용을 하는 lignans인 matairesinol과 arctigenin을 유효성분으로 함유하는 정제된 연교추출물을 제조함과 동시에 그들의 항산화 효과, 섬유아세포 내에서 collagen 합성 및 MMP-1의 합성을 저해하는 효과를 기존의 잘 알려진 성분들과의 비교로 효능을 평가하여 기능성화장품 원료로서의 사용 가능성을 검토하였고, 임상시험(25)을 통해 연교추출물 함유 크림의 피부 주름개선 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 기기

본 실험에 사용한 연교 (개나리 열매)는 경북 의성에서

재배하고 있는 의성개나리 (*Forsythia viridissima* Lindley)를 영천 약재시장에서 직접 구입하여 사용하였다.

세포주는 신생아의 포피조직에서 분리한 normal human fibroblast (CoSeedbiopharm Co., Ltd.)를 DMEM (Jeil Biotech-services Inc.) 배지에 5% fetal bovine serum (FBS, Sigma)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 10~15세대 세포를 실험에 이용하였다. 비고 실험 재료로서 vitamin C (Amresco), butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma), oleanolic acid (Sigma), α -tocopherol (Sigma) 등을 사용하였다. 실험에 사용한 항체는 rabbit anti-human collagen type I polyclonal antibody, goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, rabbit anti-matrix metalloproteinase-1 (anti-MMP-1), 그리고 alkaline phosphatase substrate solution을 Sigma로부터 구입하여 사용하였다.

연교추출물의 제조 및 분석

건조 연교 100 g에 80% 메탄올수용액 (1 L)을 가하여 70~80°C에서 2회 반복 추출한 후, 감압·농축하여 연교 메탄올추출액 (300 g)을 얻었다. 여기에 80% 메탄올수용액을 가하여 가용화한 후 1~2일간 상온에서 방치한 후, 얻어진 상등액은 n-헥산 (300 ml)을 가하여 탈지·탈색하였다. 하층은 농축하여 연교 탈지 메탄올추출물 (18 g)을 얻었다. 이것을 다시 90% 메탄올수용액 (100 ml)에 용해하여 하룻밤 정지시킨 후 여과·농축하여 연교추출물 (51 g)을 얻어, 이 중 5 g을 10% 메탄올수용액 (100 ml)을 가하여 용해시키고 효소 (pectinex + celluclast, Novozyme, Denmark)를 가하여 50~60°C에서 가수분해하였다. 이것을 미리 40% 메탄올수용액으로 평형화시켜 놓은 Diaion HP-20 이온수지 (Mitsubishi Chem. Co., Japan) 칼럼 (2 cm × 30 cm)에 충전시킨 후 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올로 각각 용출한 분획물을 rotary vacuum evaporator로 50°C 이하에서 감압·농축시켜 matairesinol과 arctigenin을 각각 함유하는 정제된 연교추출물 (matairesinol-rich, arctigenin-rich) 각각 0.36 g과 0.32 g을 얻었다.

연교추출물 중의 lignans 함량 분석

Matairesinol과 arctigenin을 각각 함유하는 정제된 연교추출물 50 mg에 메탄올 50 ml을 넣고 초음파로 분산시킨 다음 메탄올을 넣어 정확히 100 ml로 한 후 0.45 μ m 여과막을 이용, 여과하여 20 μ l를 고속액체크로마토그래피 (HPLC) 분석을 행하였다.

HPLC 분석 조건으로 Dionex사 Summit HPLC를, 칼럼은 YMC-Pack Pro C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm × 250 mm), 검출기는 자외부흡광광도계로 측정파장은 280 nm로 하였다. 유속은 1.0 ml/min이며, 이동상은 용매 A (0.03% H₃PO₄를 함유한 20% 메탄올용액)와 용매 B (80% 메탄올용액) 기울기용리로 하여 Table 1의 조건에 따라 실시하였다.

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거효과

항산화 활성은 DPPH (Sigma)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하는 방법을 활용하였다(26). 0.2 mM DPPH 메탄올용액에 시료를 각각의 농도로 메탄올에 희석

하여 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후 UV-VIS Spectrophotometer (Shimadzu)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조구는 시료액 대신 메탄올을 넣으며, DPPH 용액 대신 메탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH radical 소거율은 다음의 식 (1)에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율 (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100 \quad (1)$$

Table 1. Conditions of HPLC analysis

Time (min)	Solvent A ¹⁾	Solvent B ²⁾
4	100	0
8	80	20
12	80	20
16	60	40
25	60	40
35	40	60
40	40	60
45	20	80
50	20	80
55	0	100
60	0	100

1) Solvent A : 0.03% H₃PO₄ in 20% methanol

2) Solvent B : 80% methanol

Superoxide radical 소거효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) 방법에 의해 측정하였다(27). 50 mM Na₂CO₃ buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, bovine serum albumin (BSA), 0.75 mM NBT와 시료를 가한 후 25°C에서 10분간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/ml xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 20분 동안 반응 후 superoxide radical 소거효과를 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조구는 시료 대신 정제수를 넣으며, xanthine oxidase 대신에 정제수를 넣어 색 보정값을 얻었다. Superoxide radical 소거율은 DPPH radical 소거율에 사용된 식 (1)에 따라 계산하였다.

섬유아세포 증식효과

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma] 정량은 Mosmann(28)의 방법을 변형하여 실시하였다.

사람 섬유아세포를 1 x 10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 분주하여 15시간 정도 배양한 후, 각 well에 적당한 농도로 연교추출물을 처리하여 CO₂ 배양기에서 24시간 더 배양하였다. MTT 용액 (5 mg/ml) 10μl를 첨가하고 4시간 후 상등액을 제거하고 150 μl dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)를 첨가한 후 540 nm에서 microplate reader (EL800, BIO-TEK Instruments, USA)로 흡광도를 측정하였다.

대조구는 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 다음의 식 (2)에 따라 계산하였다.

$$\text{세포증식율 (\%)} = \frac{\text{시료첨가구의 흡광도} - \text{대조구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100 \quad (2)$$

Collagen 합성을 증가효과

사람 섬유아세포를 1 x 10⁵ cells/well 농도로 24-well plate에 분주하여 약 80% confluency에 도달할 때까지 배양하였다. FBS를 첨가하지 않은 배지에 시료를 농도별로 희석하여 배양한 배지와 교체하고 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다.

24시간 배양한 배지를 96-well plate에 분주하여 4°C에서 하룻밤 코팅하였다. PBS-T (0.05% Tween 20 / phosphate buffered saline)로 3회 세척하고 블로킹 용액(5% skim milk, Fluka)으로 37°C에서 1시간 동안 블로킹하였다. rabbit anti-collagen type I를 PBS-T에 희석하여 100 μl분주하고, 37°C에서 90분간 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척 후, anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate를 PBS-T에 희석하여 100 μl씩 분주하고, 37°C에서 90분간 반응시켰다. PBS-T로 세척한 다음, alkaline phosphatase substrate solution을 100 μl씩 넣고 실온에서 발색시킨 후, microplate reader (EL800, BIO-TEK Instruments, Inc.)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MMP-1 발현저해효과

사람 섬유아세포를 1 x 10⁴ cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하여 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양하였다. UV 조사 전에 원배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거하고 자외선조사기 (ELC-500, Lightning Enterprises, USA)를 이용하여 세포에 영향을 주지 않는 범위에서 자외선 (UVA)을 조사하였다. UVA 조사 후 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지에 시료를 희석한 후 첨가하여 48시간 더 배양하였다.

배양한 배지를 96-well plate에 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 코팅하였다. PBS-T로 3회 세척하고 블로킹 용액으로 37°C에서 1시간 동안 블로킹하였다. Rabbit anti-MMP-1을 PBS-T에 희석하여 100 μl씩 분주하고 37°C에서 90분간 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척 후, anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate를 PBS-T에 희석하여 100 μl씩 분주하고 37°C에서 90분간 반응시켰다. PBS-T로 세척한 다음, alkaline phosphatase substrate solution을 100 μl씩 넣어 실온에서 발색시킨 후, microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

피부안전성 시험

연교추출물에 대한 피부 안전성, 즉 피부반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생 여부를 알아보기 위하여 한국식품의약품안전청 기준 피부안전성 검사법에 따라 인체첨포시험을 실시하였다.

피험자로 20세 이상 50세 이하의 건강한 성인 남, 여 30명을 선정하였고, 첨포시험은 대상자 상박 내측에 첨포를 부착하였으며, 48시간이 지난 후 첨포를 제거하였다. 약 60분간 안정을 취하도록 한 후 첫 판독을 시행하였고, 첨

포 부착 후 96시간이 경과한 후 2차 판독을 시행하였다. 판정기준은 Table 2에 나타내었다.

침포 부착 후 48시간과 96시간에 판독한 결과의 피부반응도를 다음의 식 (3)에 따라 계산하였다.

$$\text{피부반응도}(\%) = \frac{\sum(\text{가중치}) \times (\text{반응인원수})}{\text{최대가중치} \times \text{전체인원수}} \times 100 \quad (3)$$

상기 계산식에 의해 계산되는 피부반응도를 미리 정한 다음의 Table 3의 판정기준에 준하여 각 시료의 피부반응도를 판정하였다.

Table 2. Evaluation criteria for marking of human patch test

Response	Grade	Interpretation criteria
-	0	No response
±	0.5	Doubtful reaction
+	1	Weak (non-vesicular) reaction
++	2	Strong (oedematous or vesicular) reaction
+++	3	Strong, infiltrated erythema and accompanying vesiculae or superficial

Table 3. Evaluation criteria of skin reactions

Average reaction	Evaluation criteria
0.0 ~ 0.9	No irritation
1.0 ~ 2.9	Weak irritation
3.0 ~ 4.9	Medium irritation
> 5.0	Strong irritation

연교추출물 함유 크림의 피부 주름개선 효과

본 실험은 병력조사 및 피부상태 진단을 통해 시험목적에 적합한 30~50대 피험자 24명을 선정하고, 선정된 피험자들을 무작위 (randomization) 방식으로 시험품 (matairesinol-rich 0.2% 함유 크림)과 대조품 (함유하지 않은 크림) 각각을 좌우로 할당하여 12주간 정하여진 부위 (양쪽 눈가)에 사용하게 하였다. 제품 사용 4주, 8주, 12주 후 시점에서 대조군과 시험군 눈꼬리 부근 주름의 육안 평가와 facial stage DM-3을 이용한 사진 촬영 및 Skin Visiometer SV600 (Courage-Khazaka Electronic, Germany)을 이용한 R-value 측정, 설문에 의한 피험자의 주관적 평가 방법을 실시하여 제품의 주름개선 상태를 평가하였고, 피험자의 설문 작성과 시험자의 관찰, 질의응답을 통해 주관적 피부 자극감과 객관적 피부자극을 평가하였다. R-value의 값이 작아질수록 피부주름이 개선되어 주름의 깊이가 낮아짐을 의미하며 단위는 임의의 단위 (arbitrary unit)를 나타낸다. 육안평가 자료 및 기기평가 자료는 SPSS 11.5의 반복측정 분산분석법 (Repeated Measures ANOVA)을 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

- R1 : Skin Roughness, 최고 주름의 포인트와 최저 주름 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

평균값

R4 : Arithmetic Average Roughness, R5에 대한 평균값

R5 : Smoothness Depth, 기준 profile 위로 최고 주름선까지 선을 그어 중앙값으로 분리했을 때 윗부분의 크기

결과 및 고찰

연교추출물 중의 lignans 함량 분석

연교로부터 추출·분리한 lignans를 각각 함유한 추출물들을 분석한 결과, matairesinol과 arctigenin을 15.49%, 15.74%를 각각 함유한 추출물을 얻었다. 각각의 추출물들이 함유한 lignans의 HPLC 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다.

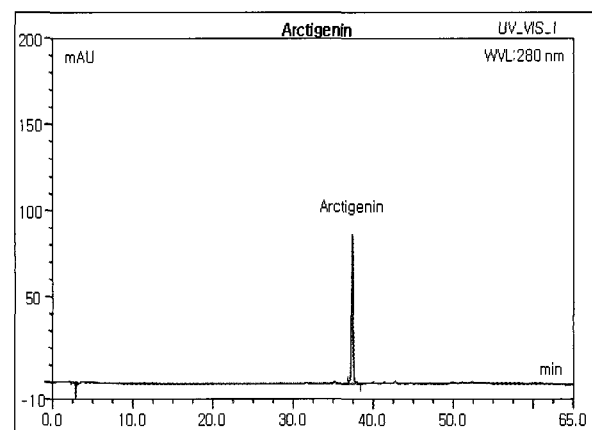
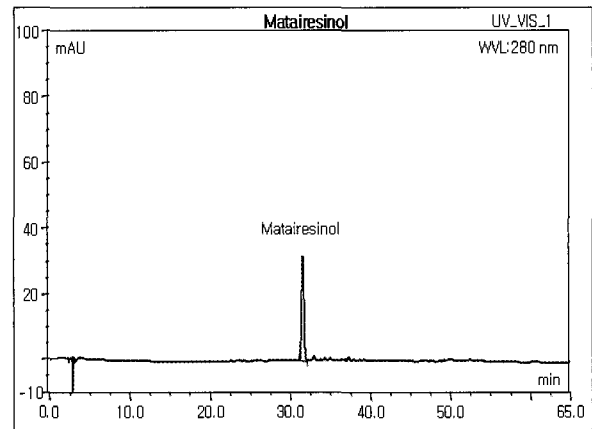


Figure 1. HPLC chromatograms of (a) matairesinol-rich and (b) arctigenin-rich in *Forsythia viridissima* L. extract.

DPPH radical 소거효과

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 radical로 free radical의 안정된 모델이다. 따라서 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다.

연교추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이

용하여 항산화 효과를 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 효과가 알려진 BHT, vitamin C, dl- α -tocopherol (1000 IU/g, Sigma)을 이용하여 lignans를 각각 함유한 연교추출물의 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 free radical을 50% 소거할 수 있는 농도(IC₅₀)가 arctigenin-rich 5.747 μ g/ml, matairesinol-rich 4.497 μ g/ml, BHT 134.150 μ g/ml, vitamin C 2.992 μ g/ml 그리고 dl- α -tocopherol 18.297 μ g/ml로 lignans를 각각 함유한 연교추출물들은 BHT보다 약 20배 이상의 free radical 소거효과를 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Antioxidative effect of *Forsythia viridissima* L. extract

Materials	*IC ₅₀	
	DPPH scavenging activity (μ g/ml)	SOD-like activity (mg/ml)
Arctigenin-rich	5.747	1.634
Matairesinol-rich	4.497	0.542
BHT	134.150	1.0
DL- α -tocopherol	18.297	0.222

*IC₅₀ : Concentration of the sample required for 50% the radical to be scavenged

Superoxide radical 소거효과

Superoxide radical 소거활성 평가는 xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 NBT의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다.

양성 대조군으로 BHT와 dl- α -tocopherol (1000 IU/g, Sigma)을 이용하였다. 그 결과 superoxide를 50% 소거할 수 있는 농도 (IC₅₀)는 arctigenin-rich 1.634 mg/ml, matairesinol-rich 0.542 mg/ml, BHT 1.0 mg/ml, 그리고 dl- α -tocopherol 0.222 mg/ml로 측정되었다(Table 4). matairesinol을 함유한 연교추출물은 dl- α -tocopherol과는 유사한 정도의 효과를 보였으며, BHT보다 약 2배의 효과를 나타내어 DPPH radical 소거활성과 같이 종합해 볼 때, lignans를 각각 함유한 연교추출물은 지질 radical과 반응하는 primary 항산화제로서 매우 효과적임을 알 수 있었다.

섬유아세포 증식효과

시험 시료들의 섬유아세포에 미치는 영향 및 세포독성과 더불어 시험에 사용될 농도 범위결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. Phytoestrogen의 일종인 lignans를 각각 함유하는 연교추출물의 농도 500 μ g/ml 미만에서는 농도의존적으로 섬유아세포의 증식효과를 보였으며, 500 μ g/ml의 농도에서는 급격하게 생존력 저하를 보였다(Fig. 2).

Collagen 합성을 증가효과

Type I collagen의 합성을 증가효과를 알아보기 위하여 섬유아세포에 lignans를 각각 함유하는 연교추출물을 처리하여 24시간 후에 배양액을 취하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하였다. Arctigenin 및 Matairesinol을 각각 함유한 연교추출물 그리고 양성 대조군으로 vitamin C를 100 μ g/ml을 처리하였을 때 각각 10.5, 26.4, 15.7%의 합성을 증가를 보였다(Fig. 3). 즉, arctigenin

을 함유한 연교추출물은 vitamin C와 유사한 정도로 type I collagen의 합성을 증가효과를 보였으며, matairesinol을 함유한 연교추출물은 약 1.7배의 합성을 증가효과를 보였다.

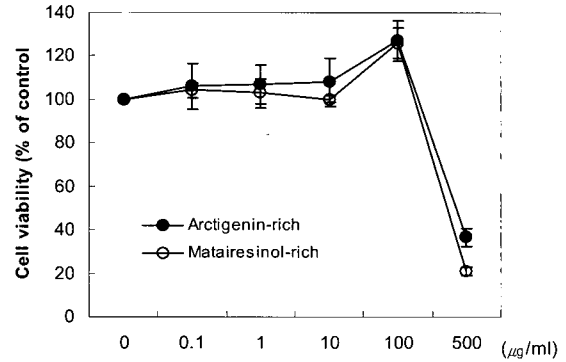


Figure 2. Relative cell viability of *Forsythia viridissima* L. extracts on human dermal fibroblasts by MTT assay. The cells were treated with various concentration of samples for 24 h. The results were expressed as the average of triplicate samples.

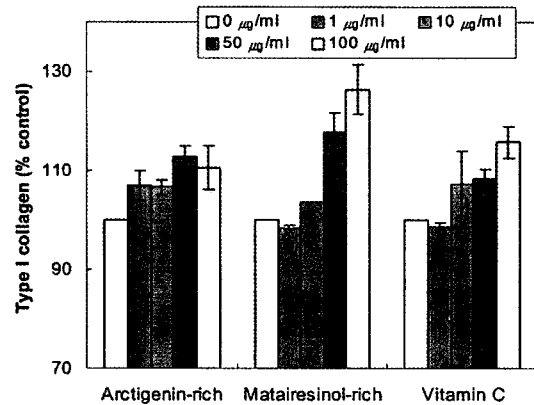


Figure 3. The effect of *Forsythia viridissima* L. extracts on the production type I procollagen by ELISA method.

UVA에 의한 MMP-1 발현저해효과

MMPs는 UVA에 의해 발현이 촉진되며, 피부의 광손상과 관련되어 있다(29, 30). 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 lignans를 각각 함유한 연교추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 사람 섬유아세포에 UVA를 조사하고 연교추출물을 첨가하여 48시간 배양한 후 MMP-1 발현저해 효과를 ELISA를 통해 알아보았다. 그 결과 matairesinol을 함유한 연교추출물은 oleanolic acid 처리구와 유사하게 MMP-1 발현저해 효과를 보였다(Fig. 4). Matairesinol 함유 연교추출물과 oleanolic acid를 0.1, 1, 10 μ g/ml의 농도로 처리한 경우, MMP-1 발현저해 효과는 각각 17.4, 12.4, 32.7%와 22.6, 34.4, 30.62%로 나타났다. 반면에 arctigenin을 함유한 연교추출물은 10% 이내로 MMP-1 발현저해에 큰 효과를 나타내지는 못했다. 그러나 항산화 효과, 섬유아세포 증식효과 및 collagen 합성효과를 고려해 보면 arctigenin을 함유한 연교추출물 또한 주름개선의 소재로서 유용하다고 사료되어진다.

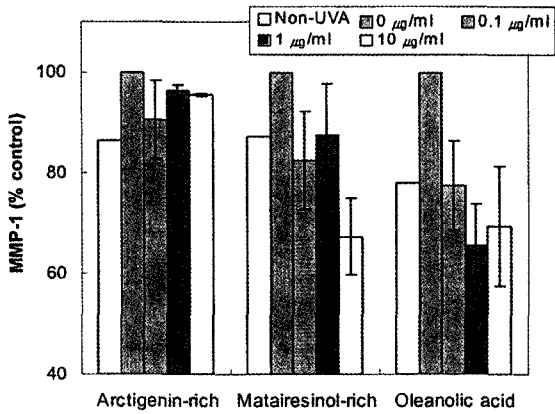


Figure 4. Inhibitory effect of *Forsythia viridissima* L. extracts the expression of MMP-1 in the UVA irradiated human dermal fibroblasts.

피부안전성 시험

피험자 30명에 대하여 실시한 첩포시험의 검사 결과에 근거하여 계산된 피부 반응도를 Table 5에 나타내었다. 시험결과 matairesinol을 함유한 연교추출물 2%에 대한 피부 반응도는 0.28로 Table 3의 피부반응도 판정기준에 의하여 대조군과 마찬가지로 무자극으로 판정되었다.

Table 5. Skin irritation index of *Forsythia viridissima* L. extract

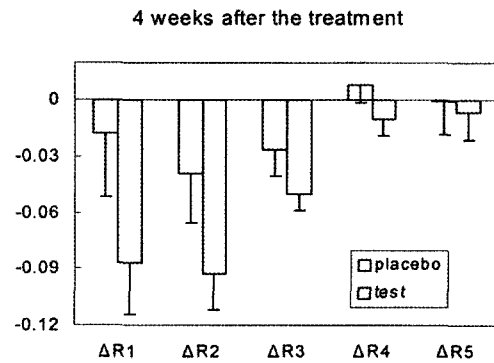
Material	48 hr		96 h		Response(%)		
	+	++	+	++	48 hr	96 hr	Average
Matairesinol-rich (2% in 1,3-Butylene Glycol)	-	-	1	-	0.00	0.56	0.28

연교추출물 함유 크림의 피부 주름개선 효과

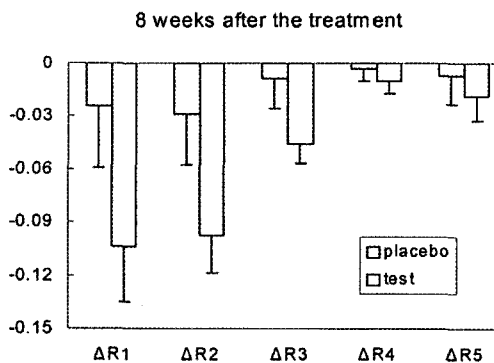
Matairesinol이 함유된 연교추출물을 포함한 제품에서의 주름개선 효과를 측정하기 위하여 제품 사용전과 사용 4주, 8주, 12주 후 시점에서 Skin Visiometer SV600을 이용하여 피부 주름을 측정하였다. 각 시점 별 측정된 R-value 분석을 통해 피부 주름개선 정도를 평가하였다.

주름 측정 parameter ΔR1~ΔR5 측정 결과를 보면, ΔR1은 제품 사용 12주 후 시점에서 시험군이 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, ΔR2와 ΔR3은 제품 사용 4주 후, 8주 후 및 12주 후 시점에서 시험군이 대조군에 비해 피부 거칠기가 유의하게 감소하였다. 시점별 피부 주름개선 효과 분석 결과 ΔR1과 ΔR2는 시험 군에서 제품 사용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점에서 유의하게 나타났으며, ΔR3의 경우 두 군 모두 제품 사용 4주 후와 12주 후 시점에서 유의하게 감소하였다. 그러나 ΔR4와 ΔR5는 유의적인 차이가 없었다(Fig. 5).

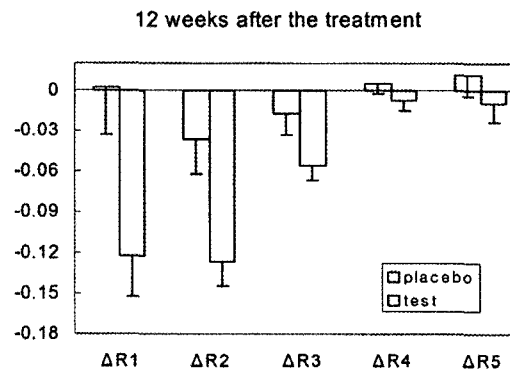
Arctigenin, matairesinol과 같은 lignans를 각각 함유한 연교추출물은 기존 알려진 항산화제보다 유사하거나 우수한 항산화효과를 보였다. 또한, type I collagen 합성을 증가와 UVA에 의해 발현이 유도되는 MMP-1의 발현저해에서 우수한 효과를 나타내었으며, 이를 토대로 한 *in vivo* 시험에서는 인체에 자극이 없으며 주름개선 효과를 보였다. 따라서 lignans를 함유한 연교추출물은 항노화를 위한 새로운 천연소재로 기대된다.



(a)



(b)



(c)

Figure 5. Comparison of the volunteer's eye area before and after the treatment of the formula containing matairesinol-rich. (a) The wrinkle index (ΔR1~ΔR5) of the volunteer's eye area 4 weeks, (b) 8 weeks, (c) 12 weeks after the treatment.

요 약

본 연구에서는 새로운 주름개선 소재로서 phytoestrogen의 일종인 lignans를 각각 함유하는 연교추출물을 추출·분리하여 노화와 관련된 생리활성 효과를 확인하였다. Arctigenin과 matairesinol을 각각 함유하는 연교추출물은 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 DPPH와

superoxide radical에 대한 소거효과를 나타내었다. DPPH radical 소거효과에서 arctigenin-rich와 matairesinol-rich는 각각 IC₅₀ 값이 5.747 µg/ml, 4.450 µg/ml를 나타내었으며, superoxide radical 소거효과에서는 각각 1.634 mg/ml, 542.428 mg/ml로 양성 대조군으로 사용한 BHT보다 우수한 항산화 효과를 보였다.

Type I collagen 합성효과도 arctigenin 및 matairesinol을 각각 함유한 연교추출물 그리고 양성 대조군 vitamin C를 100 µg/ml을 처리하였을 때 각각 10.5, 26.4, 15.7%의 합성율을 보임으로써 vitamin C와 유사하거나 우수한 효과를 나타내었다. 또한, UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현저해 효과는 matairesinol을 함유한 연교추출물의 경우 oleanolic acid와 유사한 저해 효과를 보였다.

Matairesinol을 함유한 연교추출물을 함유한 크림의 피부 주름개선 효과를 평가하기 위하여, 눈가 주름 부위의 제품 도포 후 피부 주름의 변화와 피부거침 개선 효과를 평가하였다. 연교추출물을 함유한 크림을 약 12주간 도포하였을 경우, 깊은 주름과 총 주름수의 감소효과를 관찰할 수 있었으며, 연교추출물 2%를 적용한 인체 안전성시험에서 무자극으로 판명되었다.

본 연구를 통하여 lignans를 각각 함유하는 연교추출물은 항산화 효과와 생체 단백질의 30%를 구성하는 collagen의 합성효과 및 UVA에 의한 MMP-1의 발현저해 효과를 보였다. 인체에 무자극성으로 제품에 적용시 관찰되는 피부 주름개선 효과는 lignans를 각각 함유한 연교추출물을 새로운 주름개선을 위한 천연소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 2005년도 중소기업기술혁신개발사업 (과제번호 S1004958)의 지원에 의한 결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Matthews, K., A. E. Meilahn, and L. H. Kuller (1989), Menopause and risk factors for coronary heart disease, *The New England J. of Med.* **321**, 641-646.
2. Thornton, M. J. (2002), The biological actions of estrogen on skin, *Exp. Dermatol.* **11**, 487.
3. Shah, M. G. and H. I. Maibach (2001), Estrogen and skin, *Am. J. Clin. Dermatol.* **2**, 143.
4. Beauregard, S. and B. A. Gilchrest (1987), A survey of skin problems and skin care regimens in the elderly, *Archives. of Dermatol.* **123**, 1638-1643.
5. Brincat, M. P. (2000), Hormone replacement therapy and the skin, *Maturitas* **29**, 107.
6. Franke A. A., L. J. Custer, C. M. Cerna, and K. Narala (1995), Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**, 18-26.
7. Kim, T. J. (1991), Korean resources plants, p262, *Seoul National University Pub.* Seoul.
8. Lee, E. B. and H. J. Keum (1998), Pharmacological studies on *Forsythia Fructus*, *Kor. J. Pharmacogen* **19**, 262-269.
9. Thompson, L. U. (1998), Experimental studies on lignans and cancer, *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* **12**, 691-705.
10. Rim, Y. S., Y. M. Park, M. S. Park, K. Y. Kim, M. J. Kim, and Y. H. Choi (2000), Screening of antioxidant and antimicrobial activity in native plants, *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **8**, 342-350.
11. Lim, D. K., U. Choi, and D. H. Shin (2000), Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants, *Korean J. Food Sci. Technol.* **8**, 342-350.
12. Schinella, G. R., H. A. Tournier, J. M. Prieto, D. Modujovich, and J. L. Rios (2002), Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts, *Life Sci.* **70**, 1023-1033.
13. Mazur, W., T. Fotsis, K. Wahala, S. Ojala, A. Salakka, and H. Adlercreutz (1996), Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food samples, *Anal. Biochem.* **233**, 169-180.
14. Ozaki, Y., J. Rui, and Y. T. Tang (2000), Antiinflammatory effect of *Forsythia suspensa* V (AHL) and its active principle, *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 365-367.
15. Li, Z. X., X. H. Wang, J. H. Zhao, J. F. Yang, and X. Wang (2000), Investigation on antibacterial activity of *Forsythia suspense* Vahl in vitro with Mueller-Hinton agar, *Zhongguo Zhong. Yao. Za. Zhi.* **25**, 742-745.
16. Lee, E. B. and H. J. Keum (1988), Pharmacological studies on *Forsythia Fructus*, *Kor. J. Pharmacogen.* **19**, 262-269.
17. Vlietinck, A. J., T. De Bruyne, S. Apers, and L. A. Pieters (1998), Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection, *Planta. Med.* **64**, 97-109.
18. KP 2002-0080660.
19. KP 2002-0046614.
20. JP 1999-255639.
21. KP 2005-004354.
22. JP 1989-031717.
23. WO 03/047608
24. WO 02/080702
25. *In vivo*, anti-wrinkles efficacy test, Dermapro Co. Ltd. (2006).
26. Blois, M. S. (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* **181**, 1199-1200.
27. Noro, T., O. Yasushi, M. Toshio, U. Akira, and S. Fukushima (1983), Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 3984-3987.
28. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods* **65**, 55-63.
29. Chun, J. H., S. W. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees (2000), Decreased extracellular signal regulated kinase and increased stress activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.* **115**, 177-182.
30. Seo, J. Y., G. E. Hrie, and J. H. Chung (2001), 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**, 116-122.