

곤달비의 주름개선효과

노연주[†] · 김윤신 · 김병관

한양대학교 보건학과
(2009년 4월 3일 접수 ; 2009년 6월 22일 채택)

Anti-wrinkle Effect of *Ligularia stenocephala*

Eon-Joo Roh[†] · Yoon-Shin Kim · Beung-Gwan Kim

Department of Health Sciences, Graduate School, Hanyang University, Seoul, Korea
(Received April 3, 2009 ; Accepted June 22, 2009)

Abstract : In the previous study, we reported the antioxidative activity and inhibition of melanogenesis of *Ligularia stenocephala* extracts. In this study, inhibitory effect on elastase and production type I procollagen were investigated.

The compounds which was investigated were 4-hydroxyacetophenone, vanillin, chlorogenic acid, caffeic acid isolated from *Ligularia stenocephala*.

They were slightly mild on elastase inhibition activity but 4-hydroxyacetophenone, vanillin exhibited good inhibition activity on collagen production. These results suggest that *Ligularia stenocephala* may have potential as an anti-aging ingredient in cosmetics.

Keywords : *Ligularia stenocephala*, elastase, procollagen

1. 서론

피부노화는 복합적인 생물학적 현상으로 크게 두 가지 요인으로 구분할 수 있는데 시간이 지남에 따라 진행되는 자연노화(intrinsic aging, 내인성노화)와 외부환경, 특히 자외선에 의한 광노화(photoaging)로 나눌 수 있다. 피부는 항상 산소와 태양광선에 노출되어 있어 이로부터 유발되는 산화적 스트레스는 피부노화를 촉진한다[1, 2].

주름발생은 노화된 피부의 대표적 증상으로 피부조직의 교원질 중 주 단백질인 콜라겐의 현저한 감소에 의해서라고 할 수 있다. 피부의

진피층에 존재하는 콜라겐은 세포외 기질의 대부분을 차지하며 전체 피부 건조중량의 70~85%를 차지하고 있다.

콜라겐, 엘라스틴, proteoglycan, fibronectin 및 laminin 등 진피의 세포외 기질은 대부분 섬유아세포(fibroblast)에서 만들어지며 세포 밖으로 분비된 후 콜라겐은 3중 나선구조를 형성한다. α -chain에 따라 20종 이상의 콜라겐이 있으나 그 중 사람의 피부에는 I, III, IV, VI 및 VII형 콜라겐이 분포하고 있다[3].

생체 내에서 콜라겐과 같은 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 합성과 분해는 적절하게 조절되나 노화가 진행되면서 그 합성이 감소하며 자외선 조사에 의해 다양한 기질 단백질 분해 효소인 matrix metalloproteinase의 발현이 촉진된다[4]. 피부노화, 특히 주름생

[†]주저자 (e-mail: jennyoon@naver.com)

성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinase(MMPs: collagenas, elastase 등)에 의한 세포 외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다.

피부노화와 같은 미용과 건강에 관한 관심이 생활수준 향상으로 급증하는 가운데 기능성 화장품을 개발하려는 연구가 활발해지는 현 시점에서 신소재개발의 필요성을 가지게 되었다.

본 연구에서는 곤달비에서 분리 보고되어진 단일 화합물 4-hydroxyacetophenone, chlorogenic acid, caffeic acid, vanillin[5]을 시료로 주름개선의 효능을 살펴보고자 하였다.

2. 실험

2.1 실험재료

Normal human fibroblast (Co Seed biopharm Co. Ltd.), N-Succinyl-(Ala)3-p-Nitroani-line, Elastase(from porcine pancreatic, Sigma, USA), FBS (fetal bovine serum, Hyclone, USA), DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Hyclone, USA), Trypsin-EDTA solution (GIBCO, USA), Skim milk (Fluka, USA), Mouse anti-collagen type I antibody (Santacruz, USA), Goat anti-mouse IgG alkaline phosphate conjugate (Santacruz, USA), Alkaline phosphate substrate solution (Sigma, USA), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT, Sigma, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA), 4-hydroxyacetophenone, vanillin, chlorogenic acid, caffeic acid, ascorbic acid, vitamin C, microplate reader (EL800, BIO-TEK Instruments, USA), CO₂ incubator (Sanyo, Japan)

2.2 섬유아세포 증식 효과

MTT 정량은 Mosmann의 방법[6]을 변형하여 실시하였다. 사람 섬유아세포를 1×10⁴cells/well 농도로 96-well plate에 분주하여 15시간 정도 배양한 후, 각 well에 적당한 농도로 시료를 희석한 배지로 교환하고 CO₂배양기에서 24시간 더 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL) 10 μL을 첨가하고 4시간 후 상등액을 제거하고

150 μL의 dimethyl sulfoxide를 첨가한 후 540 nm에서 microplate reader (EL800, BIO-TEK Instruments, USA)로 흡광도를 측정하였다.

대조군(control)은 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 다음의 식에 따라 계산하였다. 실험은 각각 3회 실시하여 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.3 Elastase 활성 저해효과 측정

Tris-Cl (0.267 M, pH 8.0)에 elastase 기질인 N-succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide 8.8 mg/mL이 용해된 완충액에 측정시료 용액 100 μL와 완충액 60 μL를 첨가하여 25 °C에서 10분 동안 preincubation한 뒤 여기에 elastase 용액을 20 μL 첨가하여 25 °C 수욕상에서 10분 동안 항온 배양한 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 μL 첨가하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{\text{대조군의흡광도}-\text{시료첨가군의흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.4 세포내 Collagen 생성시험

사람 섬유아세포를 1×10⁵ cells/well 농도로 24-well plate에 분주하여 약 80 % confluency에 도달할 때까지 배양하였다. FBS를 첨가하지 않은 배지에 시료를 농도별로 희석하여 배양한 배지와 교체하고 CO₂배양기에서 24시간 배양하였다.

24시간 배양한 배지를 96-well plate에 분주하여 4°C에서 하룻밤 코팅하였다. PBS (phosphate buffered saline)로 3회 세척하고 블로킹 용액(5 % skim milk)으로 37 °C에서 1시간 동안 블로킹하였다. Mouse anti-collagen type I를 PBS에 희석하여 100 μL 분주하고, 37 °C에서 90분간 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척 후, anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 PBS에 희석하여 100 μL씩 분주하고, 37 °C에서 90분간 반응시켰다. PBS로 세척한 다음, alkaline phosphatase substrate

solution을 100 μ L씩 넣고 실온에서 발색시킨 후, microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 과정을 2회 반복 실시하여 평균값 \pm 표준오차로 나타내었다. Ascorbic acid를 비교물질로 하였다.

$$\text{증식율 (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 사람 섬유아세포 증식 효과 측정

곤달비 추출물에서 분리한 단일 성분의 세포 독성을 평가하기 위해 1, 10, 100, 1000 μ g/ml 농도에서 MTT assay를 실시하였다. 실험 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 4-hydroxyacetophenone은 1000 μ g/ml농도에서 117.15 \pm 14.55%로 양호한 세포 증식효과를 보여 세포 독성이 나타나지 않았고, 같은 농도에서 vanillin은 71.07 \pm 13.05%, chlorogenic acid과 caffeic acid은 70% 이하의 세포 생존률을 보여 1000 μ g/ml농도에서는 독성이 나타나 세포 독성이 없는 100 μ g/ml농도 내에서 실험을 진행하였다.

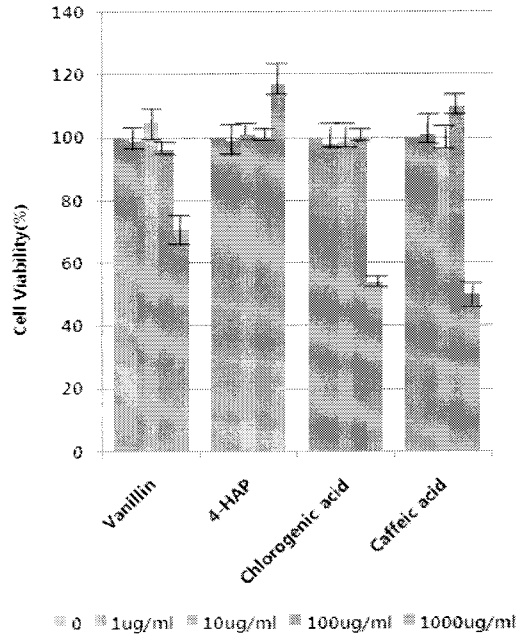


Fig. 1. Relative cell viability of compounds from *Ligularia stenocephala* on human dermal fibroblast by MTT assay. The cells were treated with various concentration of samples for 24 h. The results were expressed as the average of triplicate samples.

Table 1. Relative Cell Viability of compounds from *Ligularia Stenocephala* on Human Dermal Fibroblast by MTT Assay

sample \ ug/ml	0	1	10	100	1000
Vanillin	100	98.99 \pm 10.40	104.92 \pm 17.29	96.33 \pm 5.06	71.07 \pm 13.05
4-hydroxyacetophenone	100	99.03 \pm 13.56	101.04 \pm 9.71	100.78 \pm 9.40	117.15 \pm 14.55
Chlorogenic acid	100	98.23 \pm 12.90	99.63 \pm 15.96	100.41 \pm 3.47	54.74 \pm 5.64
Caffeic acid	100	101.74 \pm 18.58	96.88 \pm 8.19	110.28 \pm 10.90	50.45 \pm 7.50

3.4. Elastase 저해능 측정

피부노화, 특히 주름생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinase (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포 외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부 노화억제 평가에 대단히 중요하다.

곤달비에서 분리한 단일 성분을 가지고 elastase 저해능을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 1000ug/ml의 농도에서 4-hydroxyacetophenone은 8.72±0.61, caffeic acid는 9.63±0.90, chlorogenic acid는 14.74±1.23, vanillin은 25.23±2.77 %로 elastase 저해능은 높지 않았다.

Table 2. Elastase Inhibitory Activities of Compounds from *Ligularia Stenocephala*

samples	ug/ml	ug/ml	
		500	1000
4-HAP		4.99	8.72
		±0.40	±0.61
Chlorogenic acid		8.23	14.74
		±0.57	±1.23
Caffeic acid		5.12	9.63
		±0.50	±0.90
Vanillin		13.56	25.23
		±1.68	±2.77

3.5. 세포내 Type I Collagen 생성시험

주름 개선 효과 평가를 위하여 사람 섬유아 세포를 이용하여 collagen 합성효과 실험을 실시하였다. 섬유아세포에 곤달비 추출물에서 분리한 단일 성분과 vitamin C를 처리하여 24h 후에 배양액을 취하여 enzymelinked immunosorbent assay(ELISA)를 수행하였다. 실험 결과는 Table 3, Fig. 2에서 보는 바와 같이 chlorogenic acid, caffeic acid는 10ug/ml 농도까지 collagen 합성을 증가시켰지만 100ug/ml 농도에서 collagen 생합성능이 감소되는 반면 vanillin은 100ug/ml 농도에서 139.18%의 collagen 증가 효과를 보였고, 4-hydroxyacetophenone은 100ug/ml 농도에서

131.73%의 collagen 증가 효과를 보여 양성대조군인 ascorbic acid가 100ug/ml 농도에서 123.29%의 콜라겐 증가 효과를 보이는 것보다 collagen 합성능이 우수했다.

Table 3. The effect of compounds from *Ligularia stenocephala* extract on the production type I procollagen

samples	ug/ml	ug/ml			
		0	1	10	100
Vanillin		100	131.97	102.70	139.18
			±7.59	±10.60	±1.05
4-hydroxyacetophenone		100	113.15	122.93	131.73
			±15.96	±6.92	±7.89
Chlorogenic acid		100	109.44	126.09	80.14
			±3.13	±6.84	±0.30
Caffeic acid		100	116.76	101.38	47.41
			±2.75	±7.38	±1.68
Ascorbic acid		100	110.84	120.48	123.29
			±13.60	±4.09	±1.60

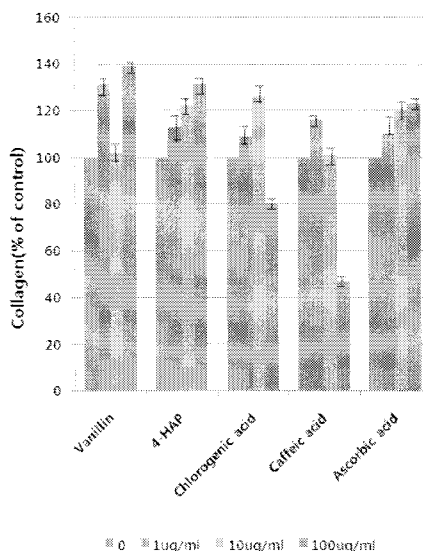


Fig. 2. The effect of compounds from *Ligularia stenocephala* extract on the production type I procollagen

4. 결론

본 연구에서는 곤달비에서 분리 보고되어진 단일 화합물 4-hydroxyacetophenone, chlorogenic acid, caffeic acid, vanillin을 시료로 주름개선의 효능을 살펴보았다.

Elastase 저해능은 미약하지만, Type I collagen의 합성을 증가효과는 단일화합물중 4-hydroxyacetophenone, vanillin은 양성대조군인 ascorbic acid보다 collagen 합성능이 월등히 우수한 것으로 보아 주름개선 화장품소재로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. A. Oikarinen, The aging of skin: chronoaging versus photoaging, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 7, 3, 1990.
2. A. M. Klingman and R. M. Laver, Cutaneous aging: the differences between intrinsic aging and photoaging, *J. Cutan Aging Cosmet. Dermatol.*, 1, 5, 1988.
3. I. Y. Song, Effects of electrical stimulation on collagen synthesis and type I collagen mRNA and TGF- β 1 mRNA expression in the skin, doctor's thesis, KEIMYUNG University, 2004.
4. W. Meinhard, T. B. Iliana, N. Lale, M. Wenjian, A. S. Lars, R. W. Ziba, S. Jutta, and S. K. Karin, Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 63, 41, 2001.
5. Cho, Jong Un; Kim, Chang Jin; Lee, Hyang Beom; Lim, Chi Hwan. Extract of *Ligularia stenocephala* with weed-killing activity. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, S. Korea. Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo, 2004.
6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J Immun Methods* 65:55, 1983.