

하엽, 삼백초 및 와송으로 구성된 식물복합추출물의 항노화 화장품 소재로서의 응용성 연구

백민영·김준형·이대우*·황재성**·문은정[†]

(주)참존 참존기술원, *(주)더마랩 R&D센터, **경희대학교 생명과학대학
(2017년 3월 6일 접수, 2017년 4월 12일 수정, 2017년 4월 12일 채택)

Anti-aging Cosmetic Application of Novel Multi-herbal Extract Composed of *Nelumbo nucifera* Leaves, *Saururus chinensis* and *Orostachys japonica*

Minyoung Baik, Jun Hyeong Kim, Dae Woo Lee*, Jae Sung Hwang**, and Eunjung Moon[†]

Charmzone R&D Center, Charmzone Co. Ltd., 318 Yeongdong-daero, Gangnam-gu, Seoul 06177, Korea
*R&D Center, Dermalab Co. Ltd., 231 Munmakgongdan-gil, Munmak-eup, Wonju-si, Gangwon-do 26362, Korea
**Collage of Life Sciences, Kyung Hee University, 1732 Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si,
Gyeonggi-do 17104, Korea

(Received March 6, 2017; Revised April 12, 2017; Accepted April 12, 2017)

요약: 본 연구에서는 효과적이고 안전한 화장품 성분 탐색을 위해 항산화 활성 가이드라인에 따라 다양한 식물 추출물을 대상으로 효능을 확인하였으며 이 중 가장 효능이 좋은 식물을 발굴하고 이를 최적의 비율로 혼합하여 Charmzone Extract (CZE)로 명명하였다. CZE는 하엽(*Nelumbo nucifera* leaves), 삼백초(*Saururus chinensis*) 및 와송(*Orostachys japonica*)으로 구성된 식물복합추출물로, 본 연구에서는 CZE의 항노화 화장품 원료로서의 개발 가능성을 확인해 보고자 하였다. CZE는 자유 라디칼 소거 활성을 가지고 있었으며, 인간 각질 형성세포주인 HaCaT 및 인간 섬유아세포 NHDF에서 활성산소종의 생성을 억제하고 총항산화능을 증가시켰다. 그리고 NHDF에서 제1형 프로콜라겐의 분비를 촉진하였고, B16F10 세포에서 멜라닌의 생성을 감소시켰으며, RAW264.7 세포에서 lipopolysaccharide 자극에 의한 산화질소의 생성을 농도 의존적으로 저해하였다. 또한, CZE는 HaCaT의 이동을 촉진하는 효능을 나타내었다. 결과를 종합하면, CZE는 항산화, 주름개선, 미백, 항염증 및 상처치유의 다효능을 나타내며, 이러한 효능을 통해 피부 기능을 향상시킬 수 있을 것이라고 기대된다. 그러므로 식물복합추출물 CZE는 피부 항노화용 화장품 성분으로 응용 가능하다.

Abstract: In this study, various plant extracts were screened for the effective and safe skin care ingredient according to the antioxidant activity assay guidelines. We selected an optimized combination herbal extract, Charmzone extract (CZE), which composed of *Nelumbo nucifera* leaves, *Saururus chinensis* and *Orostachys japonica*. CZE exerted free radical scavenging activity. It reduced reactive oxygen species formation and increased total antioxidant capacities in human keratinocyte (HaCaT) and normal human dermal fibroblasts (NHDF). CZE also led to procollagen type 1 secretion in NHDF and decreased cellular melanin contents in B16F10. The production of nitric oxide was decreased by CZE in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 in a dose dependent manner. Therefore, it is concluded that CZE can be applied for naturally derived anti-aging functional skin care ingredient for anti-oxidation, wrinkle enhancement, whitening, anti-inflammation and wound healing of skin.

Keywords: *Nelumbo nucifera* leaf, *Saururus chinensis*, *Orostachys japonica*, anti-oxidant, anti-aging

1. 서 론

인간의 피할 수 없는 생리 현상인 노화(aging)는 시간의 흐름에 따라 신체의 구조가 변하고 생리적 기능이 저하되는 것을 뜻한다. 남 등의 연구에 의하면 근래에는 노화에 의한 병리적 질환을 치료하는 것을 넘어 생리적인 기능저하를 지연, 회복시킴으로써 건강하고 젊은 노년을 보내고자 하는 욕구가 커지고 있는데 그 대표적인 관심분야를 바로 피부노화로 보고 있다[1]. 피부는 지속적으로 외부의 환경에 노출되고 있어 가장 빠르게 노화에 따른 변화를 확인할 수 있는 조직으로 노화의 정도를 판단하는 척도가 된다[2]. 피부노화는 나이가 들어감에 따라 자연스럽게 생기는 내인성 노화(intrinsic aging)와 외부 환경에 의해서 생기는 외인성 노화(extrinsic aging)로 나눌 수 있다. 내인성 노화의 경우 피부 표피와 진피 간의 결합이 약해지거나 각질형성세포의 분열과 지질 형성 능력을 저하시키는 등의 특징을 가지며 잔주름, 피부 건조증, 경미한 탄력 감소 등을 나타낸다. 외인성 노화는 대부분 광노화(photoaging)를 의미하며 자외선으로 인한 피부 탄력섬유의 손상을 주요 특징으로 한다[3]. 이에 따라 깊고 굵은 주름이 발생하고 피부 건조, 탄력성 감소, 색소 침착, 염증반응, 면역 저하 등이 나타날 수 있다[4]. 이러한 노화에 의한 피부기능 저하는 직, 간접적으로 피부조직 내에 형성된 활성산소종(reactive oxygen species)과 같은 자유 라디칼(free radical)이 피부에 정상적으로 존재하고 있는 항산화 물질의 작용을 감소시켜 유발되는 산화적 스트레스에 의해 영향을 받는다[5]. 산화적 스트레스는 교원질 분해효소(collagenase)의 일종인 세포외기질 금속함유 단백분해효소(matrix metalloproteinases)의 활성을 증가시켜 피부 내 결합조직 성분인 콜라겐(collagen) 등의 합성을 감소시켜 탄력을 잃게 하며, 탄력섬유, 교원섬유의 사슬을 끊고 비정상적인 결합을 유도하여 결론적으로 피부의 주름을 형성시킨다[6,7]. 또한 멜라닌(melanin) 생성 반응을 촉진하여 기미, 주근깨, 후생성 흑피증, 일광성 흑점 등의 피부 색의 불균일을 가져오며 피부의 염증반응을 유발시키고 DNA 산화와 같은 생체 구성성분들의 손상을 야기하여 피부 세포 및 조직 손상을 주도한다[8]. 그러므로 항산화 효능을 갖는 약재나 화장품을 피부에 적용하는 것은 노화에 의한 주름생성, 과색소 침착, 염증, 피부

조직 손상 등 다양한 현상으로부터 피부를 보호하기 위한 효율적인 방법이 될 수 있다.

예로부터 질병치료와 예방을 목적으로 한약재가 사용되어 왔으며, 제약, 기능성 식품 등의 분야에서는 식물 추출물 및 식물의 2차 대사산물이 광범위하게 사용되어 왔기 때문에 인체에 대한 안전성 및 고효능성이 상당수 이상 검증되었다고 볼 수 있다[9]. 또한 화장품은 약품의 기능이 첨가된 화장품(pharmaceuticals) 혹은 약용화장품(cosmeceuticals)의 개념이 도입되어 세계적으로 폭넓게 이용되고 있는 추세이고, 다양한 천연 소재에 대한 미백, 주름개선, 항산화, 노화억제 등의 효능이 과학적으로 증명되고 있기 때문에 안전성을 기반으로 효능이 검증된 식물 유래 유효 성분의 화장품 적용에 대한 관심은 더욱 커질 것이다.

본 연구에 앞서 우리는 피부노화 개선용 천연 소재를 발굴하기 위해 다양한 식물 추출물을 이용하여 자유 라디칼 소거능 실험을 진행하였으며, 이 중 하엽(荷葉, *Nelumbo nucifera* leaf), 삼백초(三白草, *Saururus chinensis*) 및 와송(瓦松, *Orostachys japonica*)이 가장 높은 항산화 능력을 나타낸다는 것을 확인하였다. 이들 식물을 최적 비율로 조합하여 항산화능을 높였으며, 이 소재를 Charmzone extract (CZE)로 명명하였다. CZE의 주요성분 중 하나인 하엽은 수련과(Nymphaeaceae)의 여러해살이 수생 식물인 연(蓮)의 잎을 말하는데, 연은 예로부터 잎, 뿌리, 씨앗 및 꽃 등의 다양한 부위에서 각각 다른 병증을 치료하는 전통 의약품으로 많이 알려져 있다. 또한 각 부위에 따른 추출물의 항산화, 항염, 항균성, 항 부정맥, 해열, 항허혈, 항당뇨, 저혈당, 설사, 면역조절제 등 다양한 의약학적인 활성이 *in vivo* 및 *in vitro* 실험 결과를 통해 증명되었다[10]. 이러한 생리활성 효능은 연에 포함된 다양한 성분, 즉 알칼로이드 성분인 dauricine, lotusine, nuciferine, 플라보노이드 성분인 kaempferol, leucocyanidin, isoquercitrin, 글리코사이드 성분인 nelumbosides, isorhamnetin glycoside, isorhamnetin rutinoside, 트리테르페노이드 성분인 betulinic acid, 비타민 그리고 미네랄 등 때문으로 알려져 있다[10-12]. 삼백초는 삼백초과(Saururaceae)의 다년생 초본으로 한의학적으로 이수삼습약(利水滲濕藥)에 분류된다. 예로부터 민간 한약재로서 부종, 각기, 대하, 화농, 간염 및 수종을 치료하고 해독과 이뇨에 적용되어 왔다[13]. 또한 항산화능과 생리활성촉진

능 및 항암 효능이 알려져 있다[14]. 삼백초의 주성분으로는 플라보노이드 성분인 quercetin, quercetrin, isoquercitrin을 비롯한 rutin, 수용성 tannin 등이 보고된 바 있으며 이러한 성분은 항산화 작용, 모세혈관 강화, 항균, 항암, 노화방지, 동맥경화 및 심장질환에 대한 약리 효과가 있다고 알려져 있다[15]. 와송은 오래된 기와지붕 위나 깊은 산의 바위 위에 자라는 돌나무과(Crassulaceae)의 여러해살이식물로 예로부터 우리나라에서 민간요법으로 간염, 종기에 대한 면역 작용, 지혈제 및 암 치료제로 사용되어왔다[16,17]. 주 성분으로는 flavonoids, fatty acid esters, triterpenoid, a sterol mixture, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, and gallic acid 등이 알려져 있다[18-20]. 현재 항염 효과[21], 항암 효과[22], 그리고 항산화 효능[23]에 대한 연구보고가 있다.

본 연구에서는 하엽, 삼백초 및 와송으로 구성된 식물복합추출물 CZE의 항산화, 주름 생성 완화, 피부미백 및 상처치유 촉진의 피부기능 개선 효능을 확인하여 천연 항노화 화장품 소재로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 실험 재료

Penicillin, streptomycin, fetal bovine serum (FBS) 및 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 WelGene (Korea)에서 구입하였다. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), transforming growth factor- β (TGF- β), lipopolysaccharide (LPS) 및 sodium nitrite는 Sigma (USA)에서 구입하였다. Total antioxidant capacity assay kit는 Abcam (USA), procollagen type-1 C-peptide EIA kit는 Takara (Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 시료 추출

경북 영천산 하엽과 삼백초 및 전남 담양산 와송은 건조물로 국내 삼흥건재약업사에서 구입하여 사용하였다. 하엽, 삼백초 및 와송을 8 : 1 : 1 (w/w)의 비율로 혼합한 후, 70% 에탄올로 72 h 동안 교반 추출하였

다. 이 과정을 통해 얻은 추출액을 No. 5 (1 μ m paper, Advantec, USA) 여과지로 1차 여과하고, 그 다음 GF/C (1.2 μ m glass fiber, Whatman, UK) 여과지로 감압 여과한 후 여과액을 회전증발농축기를 이용하여 감압 농축 후 식물복합추출물인 CZE를 얻었다. 이들 각각의 식물체는 단독으로도 위와 동일한 방법으로 추출, 농축하였다.

2.3. 세포주 및 세포배양

본 연구에서는 인간 섬유아세포주(normal human dermal fibroblast, NHDF), 인간 멜라닌세포주(normal human epidermal melanocyte, NHEM), 인간 각질형성 세포주 HaCaT, 마우스 대식세포주 RAW264.7, 마우스 흑색세포종 B16F10이 사용되었으며, 이들 세포주는 ATCC (USA)로부터 구매하였다. 세포 배양을 위해 100 unit/mL의 penicillin, 100 μ g/mL의 streptomycin 및 10% FBS가 함유된 DMEM을 사용하였으며, 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂가 유지되는 습윤배양기에서 세포를 배양하였다.

2.4. 항산화능 측정

2.4.1. DPPH 소거활성 측정

95%의 에탄올에 용해시킨 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL에 농도별 CZE 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 후 약 5 min 동안 방치하고 흡광도분석기(Molecular devices, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. CZE의 DPPH 자유 라디칼 소거능은 아래의 식과 같이 계산하였다. A₀는 대조군(control group)의 흡광도이며 A₁은 농도별 CZE의 흡광도를 나타낸다.

$$\text{DPPH 소거능(\%)} = ((A_0 - A_1)/A_0) \times 100$$

2.4.2. 세포 내 활성산소종 생성의 측정

HaCaT과 NHDF를 96-well plate에 각각 3×10^4 및 1×10^4 cells/well로 가한 후 24 h 동안 배양하였고, 이후 CZE를 24 h 동안 농도별로 처리하였다. 배지를 제거한 후 인산완충용액(phosphate buffered saline)을 이용하여 2회 세척하고 상온에서 50 μ M의 DCF-DA용액을 처리한 후 형광분석기(molecular devices)를 이용하여 형광 강도의 변화를 측정하였다(excitation 485 nm, emission 530 nm).

2.4.3. 총산화능 측정

HaCaT과 NHDF를 96-well plate에 각각 3×10^4 및 1×10^4 cells/well로 가한 후 24 h 동안 배양하였고, 이후 CZE를 24 h 동안 농도별로 처리하였다. CZE의 총항산화능을 확인하기 위하여 total antioxidant capacity assay kit를 사용하였으며, 세포 배양 배지를 취한 후 이를 반응시켜 660 nm의 흡광도에서 측정하였다.

2.5. 세포생존율 측정

세포생존율은 MTT assay 방법으로 측정하였다. 24 h 배양된 세포의 배양액을 제거하고 MTT용액의 농도가 0.5 mg/mL가 되도록 배지에 녹여 100 μ L를 가하고 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂가 유지되는 습윤배양기에서 세포를 1 h 배양 후 formazan crystal을 용해시키기 위하여 DMSO 200 μ L를 가한 후 540 nm의 흡광도에서 세포의 생존율을 측정하였다.

2.6. 콜라겐 생성량 측정

NHDF를 48-well plate에 3×10^4 cells/well로 가한 후 24 h 동안 배양하였고, 이후 CZE를 72 h 동안 농도별로 처리하였다. 세포 배양 배지를 취한 후 procollagen type-1 C-peptide EIA kit에 반응시켜 제1형 프로콜라겐 (procollagen type-1)의 생성량을 측정하였다. 본 연구에서 TGF- β 10 ng/mL를 양성대조군으로 사용하였다.

2.7. 멜라닌 생성량 측정

B6F10을 24-well plate에 2×10^4 cells/well 로 가한 후 24 h 동안 배양하였고, 이후 CZE를 72 h 동안 농도 별로 처리하였다. 배지를 제거한 후 인산완충용액을 이용하여 세포를 3회 세척한 후 1 N 수산화나트륨 용액을 각 well당 500 μ L씩 가하여 멜라닌 색소를 용해시켰다. 멜라닌 색소 생성량은 490 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

2.8. 산화질소(nitric oxide, NO) 생성량 측정

RAW264.7 세포를 96-well plate에 5×10^4 cells/well 가 되도록 분주 후 24 h 배양하였다. 그 후 CZE를 전처리하고 30 min 후 100 ng/mL 의 LPS를 투여한 후 24 h 동안 배양하였다. 아질산염(nitrite)는 산화질소의 산화 수용액의 형태로 Griess reaction을 이용하여 배지 내에 있는 양을 측정하였다. 상층액 약 50 μ L를 동량의

Greiss reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid)와 혼합한 후 반응시키고 10 min 후 570 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. Sodium nitrite가 NO₂의 농도를 산출하기 위한 기준 값으로 사용되었다.

2.9. 각질형성세포의 이동 촉진 효능 검증

HaCaT 세포주를 2×10^5 cells/well의 비율로 24-well plate에 가한 후 well에 가득 찰 때까지 배양하였다. 이후 well의 가운데 라인에 200 μ L pipette tip으로 바닥이 보이도록 긁어준 후 인산완충용액을 이용하여 세척하고 CZE를 농도별로 처리하였다. 세포를 긁어낸 부위에서 세포가 이동된 정도를 사진으로 기록한 후 Image J software를 이용하여 세포간 거리를 수치화 시켰다.

2.10. 통계분석

데이터는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, 통계적 유의성은 SPSS 프로그램을 이용하여 ANOVA 방법으로 통계분석을 수행한 후 Dunnett test법을 이용하여 검증하였다(* $p < 0.05$).

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 효능

피부조직 내에 형성된 자유 라디칼은 산화적 스트레스를 유발하여 피부노화의 주요원인으로 작용한다[5]. 본 연구팀은 이전 연구에서 항노화용 화장품에 적용 가능한 천연소재를 발굴하기 위해 다양한 식물 추출물을 대상으로 DPPH 자유 라디칼 소거활성 측정실험을 실시하였다. 그 결과 하엽, 삼백초 및 와송이 가장 소거능이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 하엽은 0.05-1%의 농도에서 DPPH 라디칼을 9.4-38.0%, 삼백초는 8.1-29.1%, 와송은 5.7-28.5% 감소시켰다(Figure 1A). 이후 이들을 다양한 비율로 혼합한 후 효능을 추가 확인하였다. 그 결과 가장 높은 활성을 나타내는 최적의 혼합비율 조건인 하엽 : 삼백초 : 와송 = 8 : 1 : 1을 발굴하였으며, 이것의 추출물을 CZE로 명명하였다. Figure 1A의 결과에서 알 수 있듯이 CZE는 0.05-1%의 농도에서 DPPH 라디칼을 19.3-42.8% 감소시켰다. 이는 하엽, 삼백초 또는 와송 단독 추출물과 비교하여 상승작용(synergic effect)을 나타낸 것으로, 각각의 추출

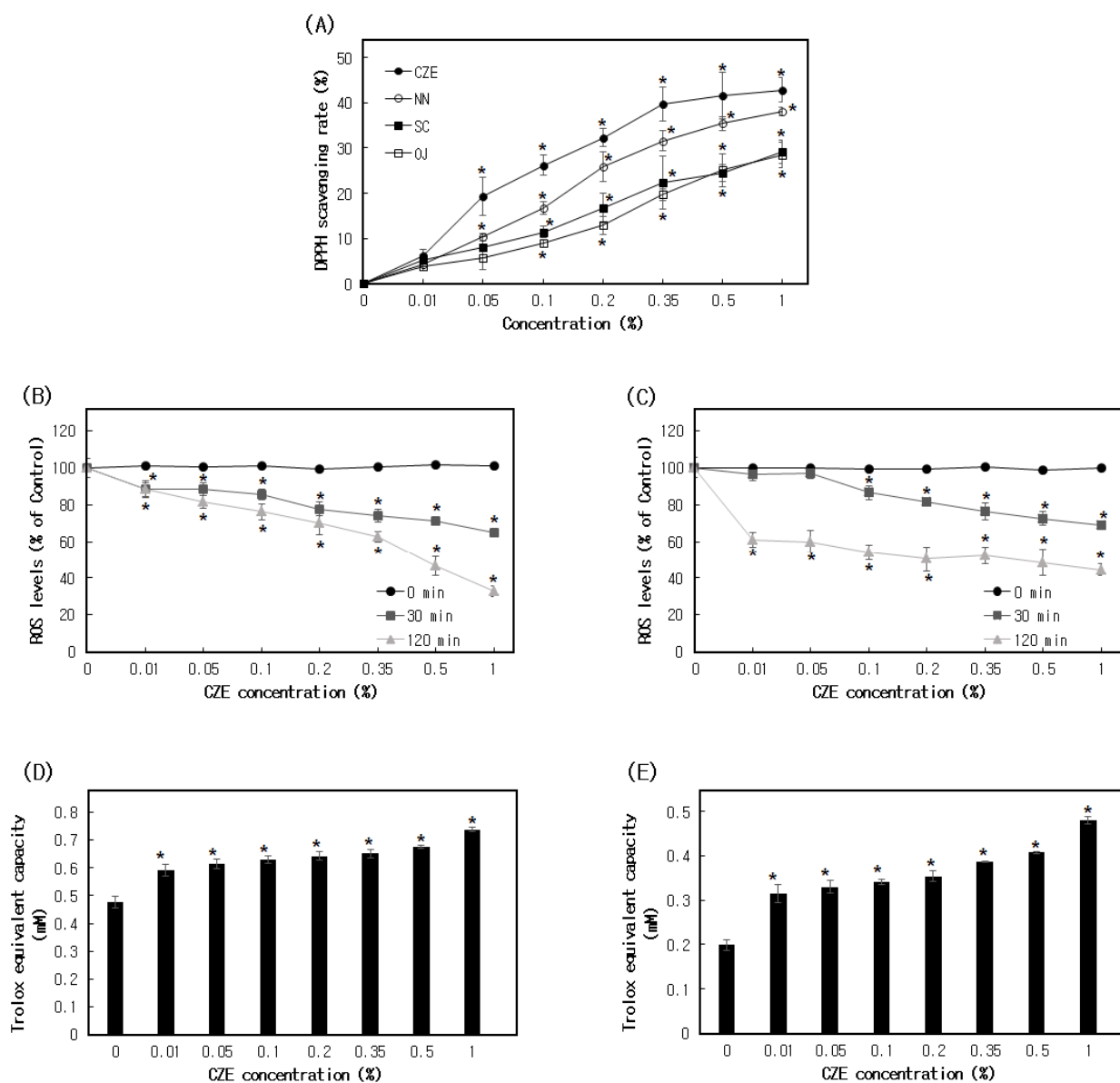


Figure 1. Antioxidant activities of CZE. (A) Free radical scavenging activities of CZE, SC, OJ and NN were determined by DPPH assay. Reactive oxygen species inhibition activities were determined by DCF-DA assay in (B) HaCaT and (C) NHDF. And total antioxidant capacities were measured by TAC assay in (D) HaCaT and (E) NHDF. Charmzone extract, CZE; *Nelumbo nucifera* leaves extract, NN; *Saururus chinensis* extract, SC; and *Orostachys japonica* extract, OJ.

물에 존재하는 다양한 성분들이 상호작용을 일으켜 이러한 결과를 나타낸 것으로 생각된다.

활성산소종은 생체 내에서 효소 반응, 미토콘드리아에서의 전자 전달계, 신호전달, 유전자 발현 등의 대사 과정 중 발생하는 반응성이 높은 자유 라디칼이다. 대사 과정 중 발생한 활성산소종은 생체 내 glutathione

등에 의해 소거됨으로써 균형을 이루어 주변 세포, 조직 등에 영향을 미치지 않는다. 하지만 자외선, 유해 화학물질과 같은 외부 환경 요인, 생체 내 스트레스 등에 의해 활성산소종이 과다 생성되고 균형이 파괴되면 주변 세포, 조직에 영향을 미친다. 활성산소종은 직접적으로 피부세포의 DNA와 RNA손상을 일으키며,

activator protein (AP)-1, nuclear factor (NF)- κ B와 같은 전사인자의 활성화를 일으켜 항산화 효소, 콜라겐 분해·합성 효소, 멜라닌 생성 효소 및 염증성 사이토카인의 생성에 영향을 미쳐 피부 노화를 유발시킨다고 알려져 있다[24-26]. 본 연구에서는 CZE가 인간 피부유래 세포주에서 활성산소종의 생성에 관여하는지 알아보기 위해 HaCaT 및 NHDF에 CZE를 농도별로 24 h 동안 처리하고 DCF-DA를 첨가한 후 활성산소종에 의해 생성된 형광물질 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)를 측정하는 실험을 진행하였다. 그 결과 HaCaT에 CZE를 0.01-1%의 농도로 처리하였을 때 농도의존적으로 DCFH의 생성이 감소되었다(Figure 1B). NHDF에서는 DCF-DA를 첨가하고 30 min 후에 DCFH를 측정하였을 때 CZE 0.1% 이상의 농도에서 통계적으로 유의하게 DCFH의 생성이 감소하는 것을 확인할 수 있었으나, 120 min 후 측정하였을 때는 CZE 0.01% 이상의 농도에서 통계적인 유의성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Figure 1C). MTT assay 방법을 통해 각 세포에 CZE를 동일 농도로 24 h 동안 처리한 후 세포생존율을 확인해본 결과 CZE는 세포생존율에는 영향을 미치지 않았다(data not shown). 즉, CZE에 의한 세포 내 활성산소종 감소는 세포사멸 또는 증식에 의해 영향을 받아 발생할 결과는 아니라고 할 수 있다. 또한 본 연구팀은 HaCaT 및 NHDF에서 총항산화능이 CZE에 의해 증가됨을 확인할 수 있었다(Figure 1D and E). 위의 결과를 종합하여 볼 때, CZE는 인간 각질형성세포주 HaCaT 및 인간 섬유아세포주 NHDF에서 활성산소종의 생성을 억제하고 총항산화능을 증가시키는 것을 알 수 있다. 이러한 결과를 통해 CZE는 다양한 항산화 효능을 통해 주름개선, 피부색소 침착, 피부염증 완화 등 피부노화를 개선하는데 도움을 줄 수 있을 것이라 생각한다.

3.2. 콜라겐 생성 촉진 효능

콜라겐은 다양한 결합 조직의 세포 외 공간에서 발견되는 구조 단백질로 체내 전체 단백질 중 25-35%를 구성하는 중요한 단백질이다. 주로 힘줄, 인대, 피부와 같은 섬유조직에서 발견되며 전체 콜라겐 중 1형(type 1)이 전체 콜라겐의 약 90%를 차지하는 것으로 알려져 있다[27]. 콜라겐은 피부 형성 및 자외선 등 다양한 요인에 의한 피부 손상 부위를 회복하는데 중요한 역할

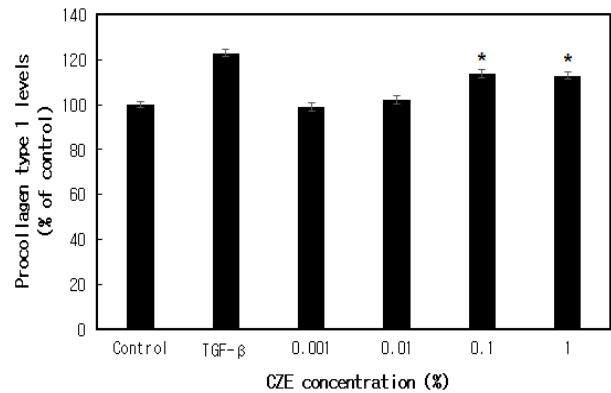


Figure 2. Effect of CZE on procollagen type 1 production in NHDF. In this study, TGF- β (10 ng/mL) was used as positive control.

을 한다[28]. 그러나 나이가 들수록[29], 체내 산화적 스트레스가 과도할수록 피부 진피층 내에서의 콜라겐 합성이 감소하는 것으로 알려져 있다[6,7]. 앞의 결과에서 CZE의 인간 피부유래 세포주에서의 항산화 효능을 확인하였으므로, CZE이 콜라겐 생성에 미치는 영향을 확인해보고자 하였다. Figure 2의 결과와 같이 CZE를 NHDF에 0.1% 및 1%의 농도로 처리하였을 때 대조군 대비 제1형 프로콜라겐이 113.7% 및 113.2% 증가되었다. 이러한 결과는 CZE의 NHDF 세포주에서의 활성산소종 생성 억제 및 총항산화능 증가 효과와 관련이 있을 것으로 생각되며, CZE가 피부에 적용되었을 때 진피층에 존재하는 섬유아세포의 콜라겐의 생성을 증가시켜 주름 개선 및 피부손상 회복에 기여할 수 있을 것이라 사료된다.

3.3. 멜라닌 생성 억제 효능

멜라닌은 자외선으로부터 피부세포의 손상을 억제하는 역할을 하지만 과량 생성되면 기미, 주근깨 등 미용적 측면에서 다양한 문제를 야기한다. 본 연구에서는 식물복합추출물 CZE의 다양한 피부기능 개선 효능을 알아보기 위해 멜라닌 색소 측정 실험을 실시하였다. B16F10 세포주에 CZE를 다양한 농도로 처리하고 멜라닌의 생성량을 측정된 결과 0.5% 및 1%의 농도에서 세포생존율의 변화 없이 대조군 대비 멜라닌을 14.1% 및 23.6% 감소시킴을 확인할 수 있었다(Figure 3). 위의 결과를 종합해볼 때, CZE를 천연 화장품 소재로 개발하고 이후 항노화용 화장품에 적용하였을 때

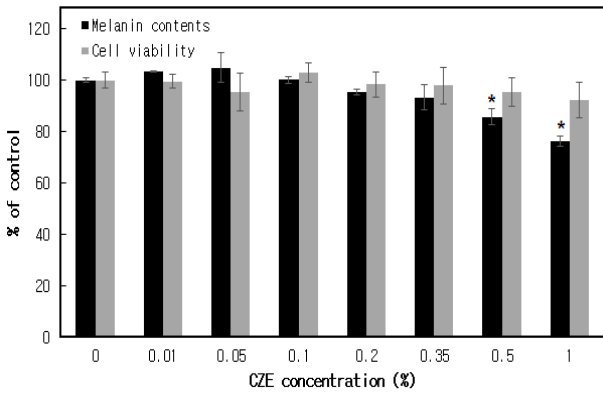


Figure 3. Anti-melanogenic effect of CZE in B16F10. Cell viability was assessed by MTT assay.

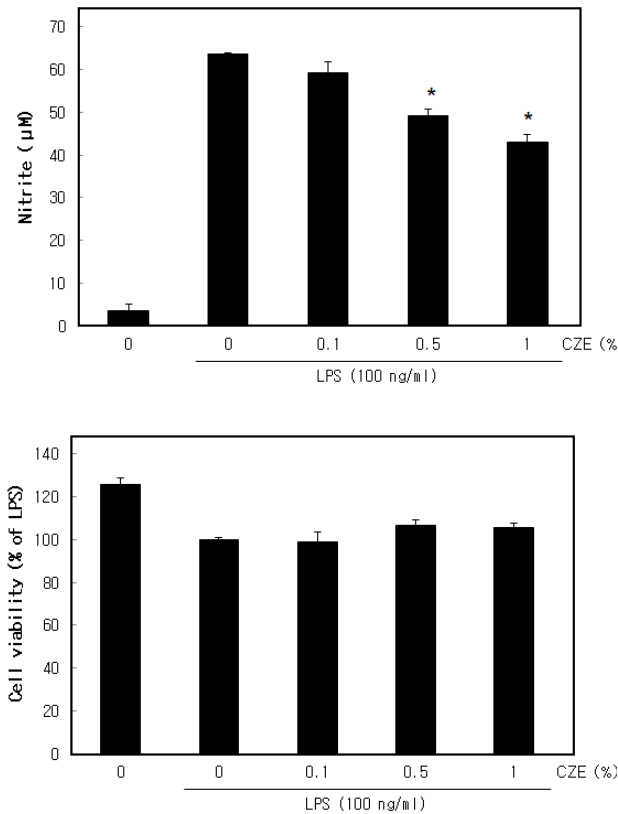


Figure 4. Inhibitory effect of CZE on NO production in LPS-stimulated RAW264.7. Cell viability was assessed by MTT assay.

피부세포의 멜라닌 생성 억제 효능을 통한 안색 개선 효과를 기대할 수 있다.

3.4. 산화질소 생성 억제 효능

산화질소는 생리적, 병리적 과정에서 중요한 세포 신호전달 물질이다[30]. 낮은 수준의 산화질소의 생성은 생체 내 방어 기작에 중요한 역할을 담당하는 반면 생성 증가가 지속되면 신체 조직에 직접적인 손상 및 다양한 질병을 야기한다[31]. 또한 산화질소는 피부의 기능 및 질병에도 깊게 관여하는데, 특히 산화질소가 아토피성 피부염과 여드름 같은 염증성 피부질환의 병리 현상에 주요하게 관여한다는 것이 보고된 바 있다[32,33]. 본 연구에서 CZE를 LPS에 의해 활성화된 대식세포주 RAW264.7에 처리하였을 때 LPS에 의해 유도된 산화질소의 생성을 세포생존율의 변화 없이 억제한다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4). 이는 CZE가 피부노화 및 각종 질환의 원인이 되는 과도한 염증 반응을 억제하여 피부세포의 손상을 감소시킬 수 있음을 시사한다.

3.5. 상처치유 효능

세포의 이주(migration)는 피부 상처 치유에 중요한 과정이다. 피부에 상처가 발생하면 상처 부위의 회복 및 방어를 위하여 다양한 세포들의 세포 이동이 일어난다. 피부의 상처 치유 과정에서 피부 재생을 위하여 각질형성세포, 섬유아세포 등이 이동하고 이들은 콜라겐 등의 세포 외 기질을 합성하여 피부 복원에 중요한 역할을 수행한다[34]. 본 연구에서는 식물복합추출물 CZE가 피부 표피 유래 세포의 이동을 통한 상처치유 효능을 나타내는지 확인하기 위해 CZE를 농도별로 HaCaT에 처리한 후 HaCaT의 이동을 통한 세포 간 거리 감소율을 시간별로 확인하는 실험을 진행하였다. Figure 5의 결과와 같이 CZE를 0.1%의 농도로 처리하였을 때 대조군과 비교하여 처리 후 6 h 만에 HaCaT 세포 간 거리가 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(76.2%). 특히 1%의 농도로 처리하였을 때 처리 후 2 h 만에 HaCaT 세포 간 거리가 69.2%로 감소하였으며, 4 h 및 6 h 후에는 54%, 41%로 세포 간 거리가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 위의 결과를 종합하여 볼 때, CZE는 각질형성세포의 이동을 촉진하여 피부 상처 치유 및 복원에 긍정적인 도움을 줄 수 있을 것이라 사료된다.

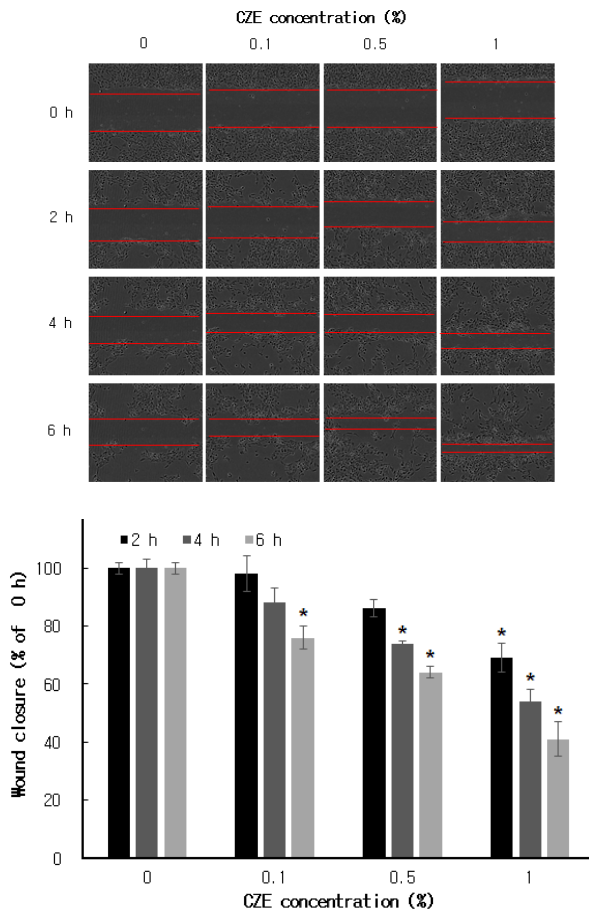


Figure 5. Wound healing effect of CZE. Keratinocyte migration by treatment of CZE was determined by scratch test in HaCaT.

4. 결 론

예로부터 미백, 주름개선 등 피부 미용에 대한 관심과 욕구는 남녀노소를 불문하고 이어져 왔으며, 많은 사람들이 피부 관리, 화장품 사용 등을 통해 그러한 욕구를 해소하여 왔다. 하지만 최근엔 생활환경 속에서 각종 오염물질 및 스트레스에 수시로 노출됨으로써 피부질환, 피부기능 저하 및 급격한 노화를 경험하는 사람들이 증가하게 되었다. 그래서 이제는 화장품에도 고효능 및 다효능을 요구하는 경향이 많아지고 있으며, 피부에 안전한 소재에 대한 관심이 증가하고 있다.

본 연구에서는 피부에 효과적이고 안전한 천연 화

장품 성분을 개발하기 위하여 항산화 효능을 기반으로 다양한 천연물을 탐색하였고, 그중에서 하엽, 삼백초 및 와송으로 구성된 식물복합추출물 CZE를 발굴하게 되었다. 본 연구결과에 따르면 CZE는 다양한 항산화 효능을 나타내었으며, 섬유아세포에서 콜라겐 생성을 증가시켰다. 또한 멜라닌 및 염증성 산화질소의 생성을 억제하였으며, 각질형성세포의 이동성을 증가시키는 효능을 나타내었다. 이는 CZE가 피부세포의 산화적 스트레스를 감소시켜 피부노화의 근본적인 원인을 억제할 수 있으며, 피부 주름 개선과 미백 효능을 통한 안색 개선에 도움을 줄 수 있음을 의미한다. 아울러 피부에 불필요하게 일어나는 염증 반응을 억제하여 피부질환을 감소시킬 수 있을 뿐 아니라 피부 손상 회복 및 치유에 도움을 줄 수 있는 천연 화장품 소재임을 시사한다. 즉, 식물복합추출물인 CZE는 피부 기능을 개선하는데 중요한 역할을 할 수 있는 다효능 항노화 천연화장품 성분으로써 상당한 개발 가치가 있다고 생각한다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술연구개발사업 지원에 의해 수행되었습니다(과제고유번호: HI14C0779).

Reference

1. H. J. Nam and Y. B. Kim, Aging and skin aging, *J. Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **17**(1), 16 (2004).
2. J. M. Han, S. W. Ko, and H. J. Yoon, The study on the korean and western medical literatures for aging and skin aging, *J. Kor. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **27**(1), 45 (2014).
3. K. H. Cho, M. K. Lee, S. J. Jo, K. H. Kim, K. C. Park, H. C. Eun, and J. H. Chung, Histologic changes in the skin with photoaging, *Kor. J. Dermatol.*, **41**(6), 754 (2003).
4. T. Quan, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J. J. Voorhees, and G. J. Fisher, Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*,

- 14(1), 20 (2009).
5. D. Darr and I. Fridovich, Free radicals in cutaneous biology, *J. Investig. Dermatol.*, **102**(5), 671 (1994).
 6. 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**(11), 1462 (2002).
 7. M. J. Ryu and S. Y. Lee, Antioxidant effects of *Plantago asiatica* and protective effect on human HaCaT keratinocyte, *J. Kor. Soc. Beauty Cult. Arts*, **11**(3), 15 (2010).
 8. J. K. Hong, A study on skin aging caused by free-radical and on efficacy of antioxidant vitamins, *Kor. J. Aesth. Soc.*, **7**(2), 51 (2009).
 9. N. Lynch and D. Berry, Differences in perceived risks and benefits of herbal, over-the-counter conventional, and prescribed conventional, medicines, and the implications of this for the safe and effective use of herbal products, *Complement. Ther. Med.*, **15**(2), 84 (2007).
 10. E. J. Cho, T. Yokozawa, D. Y. Rhyu, S. C. Kim, N. Shibahara, and J. C. Park, Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine*, **10**(6-7), 544 (2003).
 11. M. Pulok, M. Debajyoti, M. Amal, and H. Michael, The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) - Phytochemical and therapeutic profile, *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**(4), 407 (2009).
 12. Y. Kashiwada, A. Aoshima, Y. Ikeshiro, Y. P. Chen, H. Furukawa, M. Itoigawa, T. Fujioka, K. Mihashi, L. M. Cosentino, S. L. Morris Natschke, and K. H. Lee, Anti-HIV benzyloisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera* and structure-activity correlations with related alkaloids, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**(2), 443 (2005).
 13. S. R. Kang, E. Y. Park, M. S. Park, J. Park, and Y. C. Park, Antioxidative and collagen synthetic abilities of *Gardeniae fructus* and *Saururus chinensis* water extracts, *J. Investig. Cosmetol.*, **7**(2), 165 (2011).
 14. C. S. Kang, M. J. LEE, C. B. Park, and I. S. Bang, Study on the antioxidative and physiological activities of *Saururus chinensis* extract, *J. Life Sci.*, **22**(6), 807 (2012).
 15. J. Y. Hwang, J. Zhang, M. J. Kang, S. K. Lee, H. A. Kim, and J. I. Kim, Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Saururus chinensis* baill in streptozotocin-induced diabetic rats, *Nutrit. Res. Pract.*, **1**(2), 100 (2007).
 16. H. J. Kim, J. Y. Lee, S. M. Kim, D. A. Park, C. B. Jin, S. P. Hong, and Y. S. Lee, A new epicatechin gallate and calpain inhibitory activity from *Orostachys japonicas*, *Fitoterapia*, **80**(1), 73 (2009).
 17. D. Y. Shin, W. S. Lee, J. H. Jung, S. H. Hong, C. Park, H. J. Kim, G. Y. Kim, H. J. Hwang, G. S. Kim, J. M. Jung, C. H. Ryu, S. C. Shin, S. C. Hong, and Y. H. Choi, Flavonoids from *Orostachys japonicus* A. Berger Inhibit the Invasion of LnCaP Prostate Carcinoma Cells by Inactivating Akt and Modulating Tight Junctions, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**(9), 18407 (2013).
 18. H. J. Park, H. S. Young, K. Y. Park, S. H. Rhee, H. Y. Chung, and J. S. Choi, Flavonoids from the whole plants of *Orostachys japonicas*, *Arch. Pharm. Res.*, **14**(2), 167 (1991).
 19. Y. S. Yoon, K. S. Kim, S. G. Hong, B. J. Kang, M. Y. Lee, and D. W. Cho, Protective effects of *Orostachys japonicas* A. Berger (Crassulaceae) on H₂O₂-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line, *J. Ethnopharmacol.* **69**, 73 (2000).
 20. N. Y. Yoon, B. S. Min, H. K. Lee, J. C. Park, and J. S. Choi, A potent anti - complementary acylated sterol glucoside from *Orostachys japonicas*, *Arch. Pharm. Res.*, **28**(8), 892 (2005).
 21. H. S. Lee, D. Bilehale, G. S. Lee, D. S. Ryu, H. K. Kim, D. H. Suk, and D. S. Lee, Anti-inflammatory effect of the hexane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW264.7 cells by suppression of NF- κ B and PI3K-Akt signaling, *Journal of functional food*, **5**, 1217 (2013).
 22. C. H. Kim, J. H. Park, J. K. Lim, K. J. Lee, G. Y. Chung, and H. J. Jeong, The activity of antioxidants

- and suppression of cancer cell proliferation in extracts of *Orostachys japonicas* A. Berger, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **11**(1), 31 (2003).
23. J. H. Lee, S. J. Lee, S. M. Park, H. K. Kim, W. Y. Jeong, J. Y. Choi, N. J. Sung, W. S. Lee, C. S. Lim, G. S. Kim, and S. C. Shin, Characterisation of flavonoids in *Orostachys japonicus* A. Berger using HPLC-MS/MS: Contribution to the overall antioxidant effect, *Food Chemistry*, **124**(4) 1627 (2011).
 24. M. J. Kim, S. W. Woo, M. S. Kim, J. E. Park, and J. K. Hwang, Anti-photoaging effect of aaptamine in UVB irradiated human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **16**(12), 1139 (2014).
 25. M. S. Kim, Y. G. Park, H. J. Lee, S. J. Lim, and C. W. Nho, Youngiasides A and C isolated from *Youngia denticulatum* inhibit UVB-induced MMP expression and promote type I procollagen production via repression of MAPK/ AP-1/NF- κ B and activation of AMPK/Nrf2 in HaCaT cells and human dermal fibroblasts, *J. Agric. Food Chem.*, **63**(22), 5428 (2015).
 26. J. L. Song and Y. Gao, Protective effects of *Lindera coreana* on UVB-induced oxidative stress in human HaCaT keratinocytes, *Iran. J. Pharmaceut. Res.*, **13**(4), 1369 (2014).
 27. G. A. Di Lullo, S. M. Sweeney, J. Körkkö, L. Ala-Kokko, and J. D. San Antonio, Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen, *J. Biol. Chem.*, **277**(6), 4223 (2002).
 28. W. Cheng, R. Yan-hua, N. Fang-gang, and Z. Guo-an, The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury, *Afr. J. Biotechnol.*, **10**(13), 2524 (2011).
 29. Y. H. Rong, G. A. Zhang, and C. Wang, Quantification of type-I and type-III collagen content of normal skin among groups of different ages, *Chin. J. Burns*, **24**(1), 51 (2008).
 30. Y. C. Hou, A. Janczuk, and P. G. Wang, Current trends in the development of nitric oxide donors, *Curr. Pharmaceut. Design*, **5**(6), 417 (1999).
 31. T. Osanai, N. Fujiwara, M. Saitoh, S. Sasaki, H. Tomita, M. Nakamura, H. Osawa, and H. Yamabe, Relationship between salt intake, nitric oxide and asymmetric dimethylarginine and its relevance to patients with end-stage renal disease, *Blood Purify*, **20**(5), 466 (2002).
 32. N. Akdeniz, A. Aktaş, T. Erdem, M. Akyüz, and Ş. Özdemir, Nitric oxide levels in atopic dermatitis, *Pain Clin.*, **16**(4), 401 (2013).
 33. S. H. Eom, E. H. Lee, K. B. H. Park, J. Y. Kwon, P. H. Kim, W. K. Jung, and Y. M. Kim, Eckol from *Eisenia bicyclis* inhibits inflammation through the AKT/NF-kB signaling in *Propionibacterium acnes*-induced human keratinocyte HaCaT Cells, *J. Food Biochem.*, <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.12312> (2016).
 34. Q. T. Smith, Clinical and Biological Springer US Aspects, 31, Collagen metabolism in wound healing (1975).