

Isoquercitrin 함유 연꽃잎 추출물의 피부주름개선 효능 연구

문은정[†] · 전준명 · 이가희 · 백민영 · 이대우*

(주)참존 참존기술원, *(주)더마랩 R&D센터
(2018년 5월 30일 접수, 2018년 6월 20일 수정, 2018년 6월 25일 채택)

Effect of Isoquercitrin-containing *Nelumbo nucifera* Leaves Extract on Skin Wrinkle Improvement

Eunjung Moon[†], Junmyeong Jeon, Gahee Lee, Minyoung Baik, and Dae Woo Lee*

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
(Received May 30, 2018; Revised June 20, 2018; Accepted June 25, 2018)

요약: 본 연구에서는 제1형 프로콜라겐 분비량 측정을 통해 피부 주름개선 효과가 있는 천연물을 검색하던 중, 연꽃잎추출물(*Nelumbo nucifera* leaves extract, NLE)이 가장 우수한 효능을 나타냄을 확인하였다. 고압 액체크로마토그래피로 NLE를 분석한 결과 isoquercitrin이 함유되어 있었으며, isoquercitrin도 normal human dermal fibroblast (NHDF)에서 제1형 프로콜라겐의 분비를 촉진한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 NLE와 isoquercitrin은 자유 라디칼 소거 활성을 가지고 있었으며, 특히 isoquercitrin은 인간 피부유래 세포주인 HaCaT 및 NHDF에서 활성산소종의 생성을 억제하고 총항산화능을 증가시켰다. 최종적으로 본 연구팀은 isoquercitrin의 함유량을 높이기 위해 정제된 NLE를 1.7% 함유한 크림(isoquercitrin 51 ppm 함유)을 제조하여 눈가의 주름개선 효과를 평가하였다. 30 ~ 65세의 한국인 여성 22명을 대상으로 얼굴의 한쪽 면엔 NLE 함유 크림을, 그리고 다른 한쪽 면엔 대조제품을 매일 2회씩, 8주간 연속 사용하도록 하였다. 그 결과 NLE 함유 크림을 사용하였을 때 피부자극이 발견되지 않았으며, 대조제품과 비교하여 통계적 유의성 있게 눈가의 주름을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구결과는 NLE 및 isoquercitrin이 우수한 콜라겐 생성 촉진 및 항산화 효능을 가지며, isoquercitrin 함유 NLE는 안전한 천연 주름개선 화장품 소재로 적용 가능하다는 것을 시사한다.

Abstract: In this study, we conducted research to find anti-wrinkle skin care ingredients from natural sources via the measurement of procollagen type 1 levels in the medium of normal human dermal fibroblast (NHDF) and found that a *Nelumbo nucifera* leaf extract (NLE) was as the best effective ingredient. By the high performance liquid chromatography analysis, we confirmed isoquercitrin was one of the main compounds of NLE. Moreover, it also increased the procollagen type 1 production without cytotoxicity of NHDF. NLE and isoquercitrin exerted free radical scavenging activity. Especially, isoquercitrin exhibited strong intracellular antioxidant capacity in human skin-derived cells, HaCaT and NHDF. Finally, we performed clinical test for the inhibitory effect of NLE on skin wrinkle formation. A randomized study was conducted in 22 healthy female volunteers, aged between 30 and 65 yrs, with moderate to moderately severe facial wrinkles. Volunteer applied a 1.7% NLE cream (isoquercitrin 51 ppm) and a control cream at each facial side (left/right) twice daily for 8 weeks. The 1.7% NLE cream improved skin roughness through reducing the wrinkle of the face significantly without any skin side effect. Our results demonstrate that NLE and isoquercitrin can increase

† 주 저자 (e-mail: skson@lgcare.com)
call: 042)860-8852

the collagen production and exert antioxidant activity. Therefore, we expect that the new non-toxic herbal extract, isoquercitrin-containing NLE will be interesting natural ingredient of cosmetics with anti-wrinkle efficacy.

Keywords: hair treatment, polymers, shampoo, fine coacervate, hair damage

1. 서 론

피부 노화는 인체에서 가장 먼저 보여지는 물리적 노화의 신호 중 하나이며, 대표적인 증상으로는 주름을 들 수 있다. 피부 주름은 피부층 내 콜라겐과 같은 섬유들의 유지 및 생성이 감소됨으로써 발생하는데[1], 산화적 스트레스, 염증성 인자, 자외선, 각종 오염물질 등 다양한 내외부 요인에 의해 가속화된다. 그러므로 피부노화 억제를 타겟으로 하는 화장품의 개발을 위해서 산업연계 피부연구 분야에서는 전통적으로 주름과 관련성이 높은 콜라겐에 집중해왔다. 즉, 1) 콜라겐 생성의 촉진, 2) 활성산소종(reactive oxygen species), 염증성 인자 등과 같이 콜라겐 저해에 영향을 미치는 물질의 제거, 3) 세포외기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase-1)와 같은 콜라겐분해를 촉진하는 효소의 작용 억제 등을 주요 연구테마로 다뤄왔다. 본 연구에서는 피부 주름개선에 효과를 나타내는 천연 항노화 후보물질을 발굴하기 위해 1차적으로 다양한 천연소재의 추출물을 대상으로 제1형 프로콜라겐(procollagen type 1)의 생성 촉진 여부를 측정해보았다. 그 결과 연꽃잎(*Nelumbo nucifera* leaf) 추출물이 가장 높은 콜라겐 생성 촉진 효능을 나타내었다. 연꽃은 중국, 일본 등을 원산지로 하는 수련과(*Nymphaeaceae*)의 여러해살이 수생 식물을 말하는데, 예로부터 모든 부위를 채소로 섭취하거나 전통적으로 지사제, 이뇨제, 해열제, 항균제 및 고지혈증 치료제 등으로 사용되어 왔다[2]. 특히 연꽃잎 추출물은 피부와 관련하여 아토피 피부염 억제[3], 자외선B에 의해 유발되는 주름의 생성 및 피하지방의 손실 감소[4], 항산화와 미백 효능이 보고된 바 있다[5]. 또한 연꽃잎에는 알칼로이드, 류코안토시아닌, 플라보노이드 등 다양한 생리활성 물질이 함유되어 있다고 알려져 있다[2]. 플라보노이드는 폴리페놀계 피토케미컬(polyphenolic phytochemical)의 일종으로 우수한 항산화 및 항염증 활성을 나타내는데[6], 연꽃잎에는 hyperoside, rutin, kaempferol, quercetin, isoquercitrin 등의 플라보노이드 성분이 보고되었다[2]. 이

중 isoquercitrin (quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside)은 다양한 약용, 식용 식물에 존재하는 quercetin 배당체(glycoside)로, 항산화[7], 혈압강하[8], 항바이러스[9], 항염증 및 항알러지[10,11] 등의 효능이 알려져 있다. 피부와 관련해서는 결절성 양진(prurigo nodularis) 증상 완화[12], 멜라닌 생성 억제[13], 상처치유[14] 자외선B에 의해 감소된 제1형 프로콜라겐의 합성 증가 등의 연구결과가 보고되었다[15].

본 연구에서는 연꽃잎 추출물 및 연꽃잎의 생리활성 성분으로 알려져 있는 isoquercitrin의 콜라겐 생성 증가 효능과 항산화 효능을 확인해보고, 피부 임상시험을 통해 isoquercitrin 함유 연꽃잎 추출물의 주름개선 효능을 검증하고자 한다.

2. 재료 및 방법

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) 및 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma (USA)에서 구입하였다. Procollagen type-1 C-peptide EIA kit는 Takara (Japan), total antioxidant capacity assay kit는 Abcam (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 연꽃잎 추출물 시료(NLE) 준비

경상북도 영천산의 건조된 연꽃잎 40.2 g을 70% 에탄올에 넣고 상온에서 72 h 동안 침적 추출하였다. 이후 상기 추출액을 No. 5 (1 μ m, Paper, Advantec, Japan) 여과지로 여과하고 GF/C (1.2 μ m, Glass Fiber, Whatman, UK) 여과지로 여과한 후 감압농축기를 사용하여 농축하였다. 농축액을 동결건조하여 추출물 시료(NLE) 6.9 g을 얻었으며, 수율은 17.3%이었다.

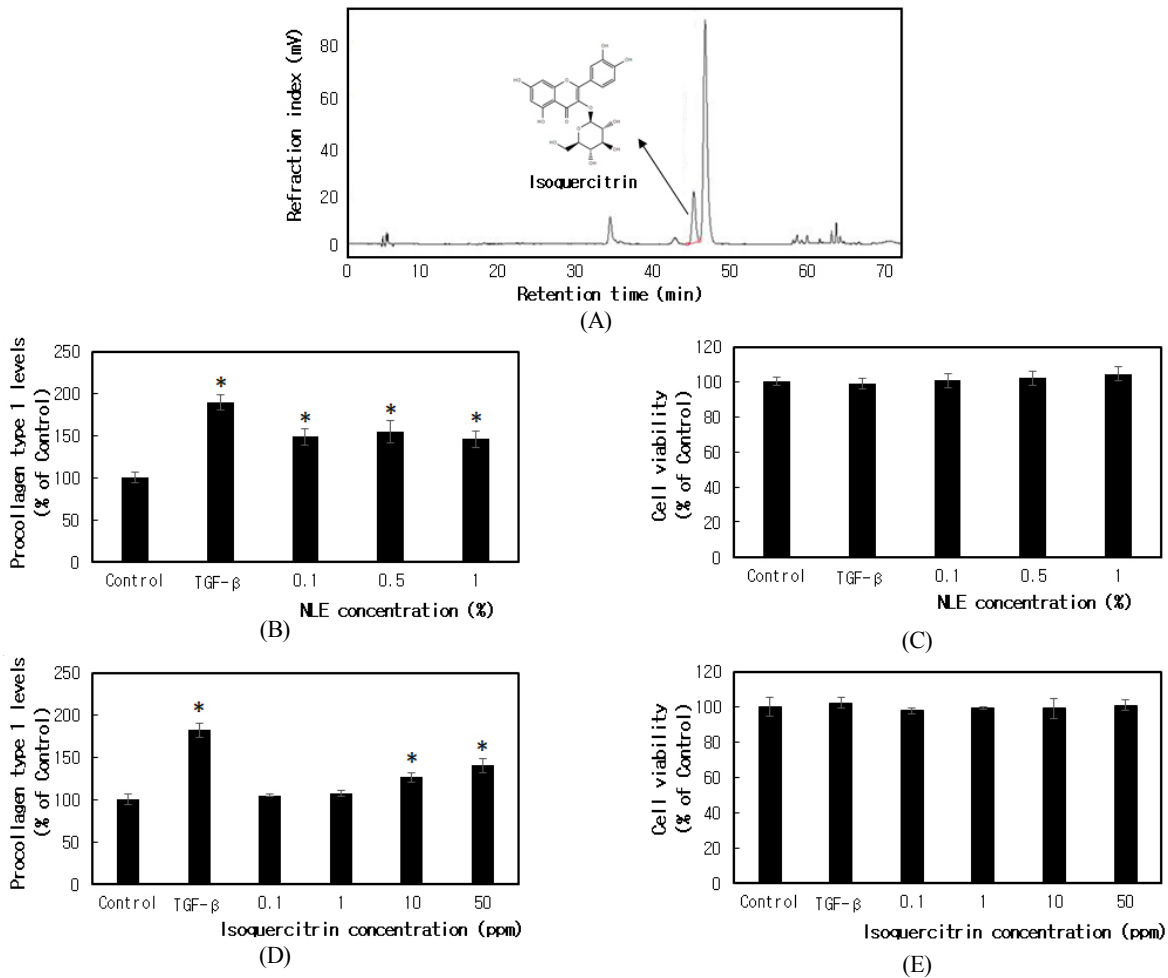


Figure 1. Effect of NLE and isoquercitrin on procollagen type 1 production in NHDF. (A) HPLC chromatogram of NLE, including the isoquercitrin-suspected peak indicated by arrow. Procollagen type 1 levels in the culture medium of NHDF treated with (B) NLE and (D) isoquercitrin. And cell viabilities of NHDF treated with (C) NLE and (E) isoquercitrin. TGF-β (10 ng/ mL) was used as positive control. NLE; *Nelumbo nucifera* leaves extract.

2.3. HPLC 분석

본 연구에서는 표준품으로 isoquercitrin ($\geq 98.0\%$, Sigma, USA)을 사용하였으며, NLE와 isoquercitrin 모두 메탄올에 용해한 후 여과하여 사용하였다. HPLC (Acme 9000, YL Instruments, Korea) 기기에 C18 Column (Capcell Pak, 4.6×250 mm, Shiseido, Japan)을 장착하여 분석하였는데, 시료의 유속은 0.6 mL/min, 컬럼 온도는 40 °C로 하였으며, peak는 자외부흡광광도계(UV 358 nm)로 검출하였다. Mobile phase는 (A) 2% acetic acid in water 및 (B) 0.5% acetic acid in water : acetonitrile = 50 : 50로 하였으며, (A)의 비율은 0 min에 100%, 15 min에 75%, 50 min에 70%, 60 min에 25%, 65

min에 0%, 65.1 min에 100%으로 하여 75 min까지 100%로 흘러주었다. 3회 이상의 반복측정을 통해 retention time의 재연성을 확인하였으며, 5가지 농도의 표준용액에 대한 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(R^2) 값을 이용하여 직선성을 확인하였다. 분석 결과 isoquercitrin의 retention time은 46.83 min이었으며, NLE에 105.24 ppm의 농도로 함유되어 있었다 (Figure 1A).

2.4. 세포주 및 세포 배양

본 연구에서는 인간 섬유아세포주(normal human dermal fibroblast, NHDF) 및 인간 각질형성세포주

HaCaT이 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 °C 및 5% CO₂가 유지되는 습윤배양기에서 세포를 배양하였다.

2.5. 콜라겐 생성량 및 세포생존률 측정

NLE 및 isoquercitrin의 제1형 프로콜라겐 합성능을 평가하기 위해 NHDF 세포를 48-well plate에 1.4×10^4 cells/well로 가한 후 24 h 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 24 h 동안 세포의 기아 상태를 유지시킨 후 isoquercitrin과 positive control인 TGF- β 를 처리한 후 24 h 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 수거한 뒤 procollagen type 1 c-peptide EIA kit를 사용하여 procollagen 양을 측정하였다.

세포생존률은 MTT assay 방법으로 측정하였다. 세포에 0.5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 100 μ L씩 가하고 37 °C 및 5% CO₂가 유지되는 습윤배양기에서 1 h 동안 배양하였다. Formazan crystal을 용해시키기 위하여 DMSO 200 μ L를 가한 후 540 nm의 흡광도에서 세포의 생존률을 측정하였다.

2.6. 항산화능 측정

DPPH 소거활성 측정을 위해 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL에 농도별 NLE 또는 isoquercitrin을 0.2 mL씩 첨가하여 혼합한 후 약 5 min 동안 방치하고 흡광도분석기 (VERSA max, Molecular Devices, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

피부유래 세포 내 활성산소종의 농도변화를 측정하기 위해 형광 probe인 DCF-DA를 이용하였다. HaCaT과 NHDF을 96-well plate에 각각 3×10^4 및 1×10^4 cells/well로 가한 후 24 h 동안 배양하였고, 이후 시료를 처리하고 24 h 추가 배양하였다. 배지를 제거한 후 인산완충용액(phosphate buffered saline)을 이용하여 2회 세척하고 상온에서 50 μ M의 DCF-DA용액을 처리한 후 DCF-DA가 활성산소종에 의해 생성되는 형광물질인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)의 형광 강도를 형광분석기(SpectraMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였다(excitation 485 nm, emission 530 nm).

피부유래 세포 내 총항산화능은 total antioxidant ca-

capacity assay kit를 사용하여 측정하였다. Isoquercitrin을 처리한 후 24 h 동안 배양한 후 세포 배양 배지를 취한 후 이를 반응시켜 660 nm의 흡광도에서 측정하였다. Isoquercitrin의 이들 세포주에서의 세포독성은 MTT assay를 통해 확인하였다.

2.7. 주름개선 임상 평가

본 임상시험은 피엔케이피부임상연구센터(주)(P&K Skin Research Center)에 의뢰하여 진행하였으며, 생명윤리위원회(Institutional Review Board, IRB)의 승인(P1611-81) 후 임상기관 실험 규정 및 임상시험 실시기준에 따라 실시되었다. 눈가에 주름이 있는 만 30 ~ 65세의 성인 여성으로 피부질환을 포함하는 급, 만성 신체질환 및 시험에 영향을 미칠 수 있는 약물 복용력이 없는 건강한 지원자 22명을 대상으로 총 8주 동안 진행되었다. 시험용 크림을 제작하기 위해 우선 NLE를 정제한 후 isoquercitrin의 함유량을 3,000 ppm으로 높여 화장품 원료로 제조하였으며 크림 제형에 이 원료를 1.7% 적용하여 시험용 크림(isoquercitrin 51 ppm 함유)을 제조하였다. 이 크림을 매일 아침, 저녁 세안 후 얼굴 한쪽 면에 펴 발라 흡수시켜 사용하였으며 다른 쪽 면에는 NLE 원료가 함유되어 있지 않은 크림을 사용하였다. 제품 사용 후 4주 및 8주에 눈가주름 평가를 실시하였으며, 시험대상자가 시험제품을 사용하는 기간 동안 특별한 피부 이상반응에 대한 보고는 없었으며, 피부과 전문의에 의한 이학적 검사상에도 이상 소견은 관찰되지 않았다.

기기적 평가를 위하여 시험대상자는 실내온도 20 ~ 25 °C, 습도 40 ~ 60%의 항온항습 조건의 대기실에서 30 min 동안 안정을 취하여 피부표면 온도와 습도를 측정공간의 환경에 적응하게 하였으며, 안정을 취하는 동안에는 수분 섭취를 제한하였다. 객관적 측정을 위하여 연구자 1인이 측정하였으며, 매 측정 시 동일한 부위를 측정하였다. 모사판을 이용한 눈가주름 측정은 시험대상자 우측 눈가 부위를 기준으로 눈꼬리에서 2 cm 떨어진 지점을 측정하였다. 제품 사용 전후에 동일한 부위에 대하여 제작한 피부 모사판을 Visiometer SV600 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Germany)을 이용하여 주름 관련 파라미터인 R1, R2, 및 R3를 분석하였다. 이들 파라미터는 피부의 거친 정도(roughness)를 나타내는 매개 변수인 주름의 깊이를 분석하여 도

출한 것으로, R1은 주름 프로파일 중 가장 높은 꼭대기 값과 가장 낮은 계곡의 값의 차이를 구한 것이며(skin roughness), R2는 주름 프로파일을 5개로 균등하게 분할한 구역에 대하여 구한 5개의 R1 중 가장 큰 값을 의미한다(maximum roughness). R3는 주름 프로파일을 X축을 따라 5개의 균등한 분절을 나누는 다음 각 분절 내에서 최대값과 최소값의 차이를 측정하여 산술 평균한 값이다(average roughness). 또한 시험대상자의 주름 생성 부위를 디지털카메라로 촬영하였으며, 방문 시 마다 동일한 품질의 사진을 얻기 위하여 촬영 조건을 고정하였다.

2.8. 통계분석

모든 데이터는 3회 반복 실험, 측정하여 얻은 결과로 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, 통계적 유의성은 SPSS 프로그램을 이용하여 ANOVA 방법으로 통계분석 수행을 통해 확인하였다. *In vitro* 실험 결과는 Dunnet test법을 이용하여 사후 검정하였으며, 임상시험 결과는 Bonferroni 방법으로 사후 검정하였다(* $p < 0.05$).

3. 결과 및 고찰

3.1. NLE 및 isoquercitrin의 콜라겐 생성 촉진 효능

콜라겐은 피부, 혈관, 근육 등 모든 결합 조직의 주된 단백질로 세포와 세포 사이를 채워주고 구조를 견고하게 유지하는데 중요한 역할을 한다[16]. 피부에서 콜라겐은 진피층의 섬유아세포에서 생성되는데, 특히 제1형 프로콜라겐은 피부 조직의 80 ~ 85%를 차지하며 피부와 근육의 탄력에 주요한 영향을 준다고 알려져 있다[17]. 하지만 노년기 피부의 섬유아세포에는 제1형 프로콜라겐의 mRNA 발현량이 감소하게 된다[18]. 즉, 나이가 들면서 진피층 내의 콜라겐의 양이 줄어들게 되는데, 이는 결과적으로 피부조직이 느슨해지고 주름이 생성되는 등 피부 노화의 주요 요인이 된다[19,20]. 본 연구팀은 피부 주름개선에 효과를 나타내는 천연 항노화 후보물질을 발굴하기 위해 NHDF 세포주에 다양한 식물추출물을 처리하여 제1형 프로콜라겐 생성능을 평가하는 1차 스크리닝을 실시하였다. 그 결과 NLE가 가장 높은 콜라겐 생성 촉진 효능을 나타

내었으므로 본 연구에서는 NLE를 이용하여 이후 실험을 진행하였다. Figure 1B 및 1C의 결과와 같이 NLE는 세포독성 없이 0.1, 0.5 및 1%의 농도에서 제1형 프로콜라겐을 대조군 대비 각각 $148.5 \pm 10.0\%$, $154.7 \pm 12.6\%$ 및 $146.0 \pm 9.8\%$ 증가시켰다. 이는 NLE가 콜라겐 생성을 촉진하여 피부 주름을 억제할 수 있는 안전한 천연물질로서 화장품에 적용가능하다는 것을 시사한다.

플라보노이드는 주름억제와 관련된 효능, 즉 콜라겐 생성 촉진[21], 항산화, 항염증 등의 효능을 나타내기 때문에[6], 본 연구에서는 NLE의 플라보노이드 성분에 관심을 가지게 되었다. 연꽃잎에는 대표적으로 quercetin, isoquercitrin, rutin 등의 플라보노이드 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[2]. Isoquercitrin과 rutin은 quercetin의 배당체(glycosides)로서 isoquercitrin은 quercetin의 3-O-glucoside, rutin은 3-O-rutinoside이다. 기존 연구에 따르면 rutin 보다는 이의 탈당화(deglycosylation) 형태인 quercetin, isoquercitrin의 활성이 더 높은 것으로 알려져 있다[22,23]. Quercetin과 rutin의 콜라겐 생성 증가 효능은 이미 알려져 있으므로[21,24], 본 연구에서는 NLE에 함유되어 있는 성분 중 주름개선 관련 효능을 나타낼 가능성이 있는 후보 성분으로서 isoquercitrin에 주목하게 되었다. Figure 1A의 HPLC chromatogram을 통해 확인할 수 있는 바와 같이 isoquercitrin은 NLE의 주요 성분 중 하나였다. 그러나 NLE에 가장 다량 함유된 것으로 생각되는 성분은 isoquercitrin peak의 오른쪽에 나타나는 peak의 성분으로, 본 연구에서는 이 peak에 해당하는 성분에 대해 분석, 효능 연구를 진행하지는 않았으나 NLE의 주요 성분으로서 추후 이 성분에 대한 추가 연구도 필요하다 사료된다.

Isoquercitrin을 NHDF 세포주에 농도별로 처리한 후 제1형 프로콜라겐의 생성량을 측정된 결과, 10 및 50 ppm을 처리하였을 때 대조군 대비 $126.5 \pm 5.8\%$ 및 $140.4 \pm 8.2\%$ 증가시켰다. 콜라겐 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있어 본 연구에서 양성대조군으로 사용된 TGF- β 10 ng/mL[25]보다는 낮은 증가율을 나타내었으나, 세포독성 없이 통계적 유의성 있게 콜라겐의 생성을 증가시켰다(Figure 1D and 1E). 위의 결과를 종합하여 볼 때, NLE와 NLE의 주요 플라보노이드 성분 중 하나인 isoquercitrin이 인간 섬유아세포주 NHDF에서 제1형 프로콜라겐의 생성을 촉진한다는 것을 알 수

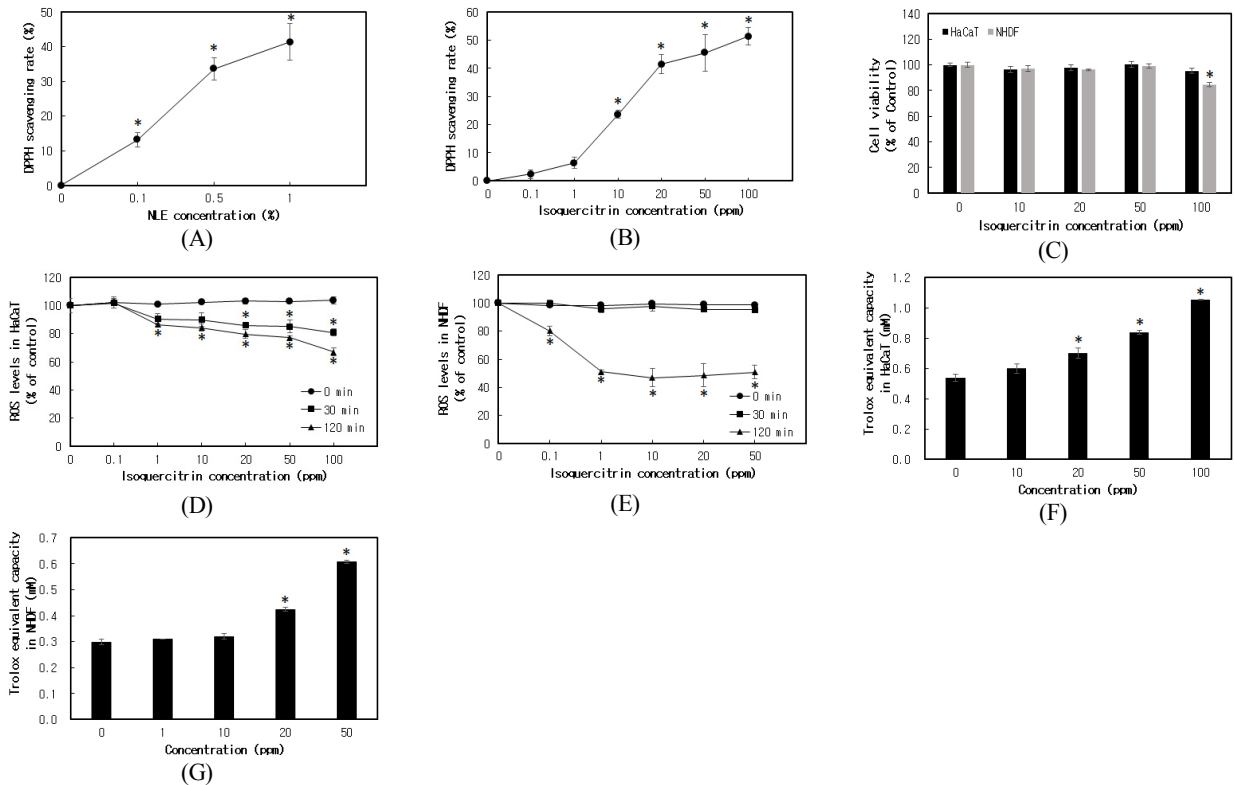


Figure 2. Antioxidant activities of NLE and isoquercitrin. Free radical scavenging activities of (A) NLE and (B) isoquercitrin determined by DPPH assay. (C) Cell viabilities of isoquercitrin-treated HaCaT and NHDF. Reactive oxygen species inhibition activities of isoquercitrin determined by DCF-DA assay in (D) HaCaT and (E) NHDF. And total antioxidant capacities of isoquercitrin measured by TAC assay in (F) HaCaT and (G) NHDF.

있다. 그러나 Figure 1B의 결과에서는 NLE을 0.1% ~ 1% 농도를 처리하였을 때 제1형 프로콜라겐의 생성이 증가되었는데, Figure 1D의 결과에서는 isoquercitrin 10 및 50 ppm의 농도에서는 제1형 프로콜라겐의 생성을 촉진하였으나 NLE의 0.1% ~ 1%에 함유되었을 것으로 생각되는 0.1 및 1 ppm의 농도에서는 촉진하지 않았다. 이러한 결과는 NLE의 콜라겐 생성 증가 효능이 isoquercitrin 단독에 의한 것이라기보다는 NLE에 존재하는 isoquercitrin을 포함한 다양한 성분 및 그에 의한 효능 메커니즘의 활성화에 의한 것으로 생각해볼 수 있다.

3.2. NLE 및 isoquercitrin의 항산화 효능

산화적 스트레스를 유발하는 활성산소종(reactive oxygen species) 등의 자유라디칼(free radicals)은 단백질 변성, 지질 과산화 그리고 DNA의 산화를 야기하는데 이러한 현상들이 만성적인 질환인 암, 염증, 노화 등과 연관이 있다고 여겨지며[26], 피부에서도 자유라

디칼은 노화의 주요 원인 중 하나이다[27]. 특히 활성 산소종은 섬유아세포에서 콜라겐의 합성을 감소시키며[28], 산화적 스트레스를 받은 각질형성세포는 콜라겐을 분해하는 세포외기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinases)를 증가시켜 콜라겐을 분해하는 것으로 알려져 있다[29]. 그러므로 항산화제에 대한 관심은 질병 분야뿐만 아니라 화장품 분야에서도 계속 증가하고 있는 추세이다. 연꽃잎 추출물은 우수한 항산화 효능을 나타내는 것으로 알려져 있는데[5], 본 연구에서도 DPPH assay를 통해 NLE의 자유라디칼 소거능을 확인할 수 있었다(Figure 2A). 제1형 프로콜라겐 생성 촉진 효능을 나타내었던 0.1 ~ 1%의 농도에서 NLE는 DPPH 라디칼을 13.3 ~ 41.4% 감소시켰다. 이러한 NLE의 항산화 효능은 NLE가 인체 피부유래 섬유아세포에서 콜라겐의 생성을 증가시키는 데에 긍정적인 영향을 줄 것으로 생각된다.

연꽃잎에서 유래한 플라보노이드 성분 및 isoquercitrin

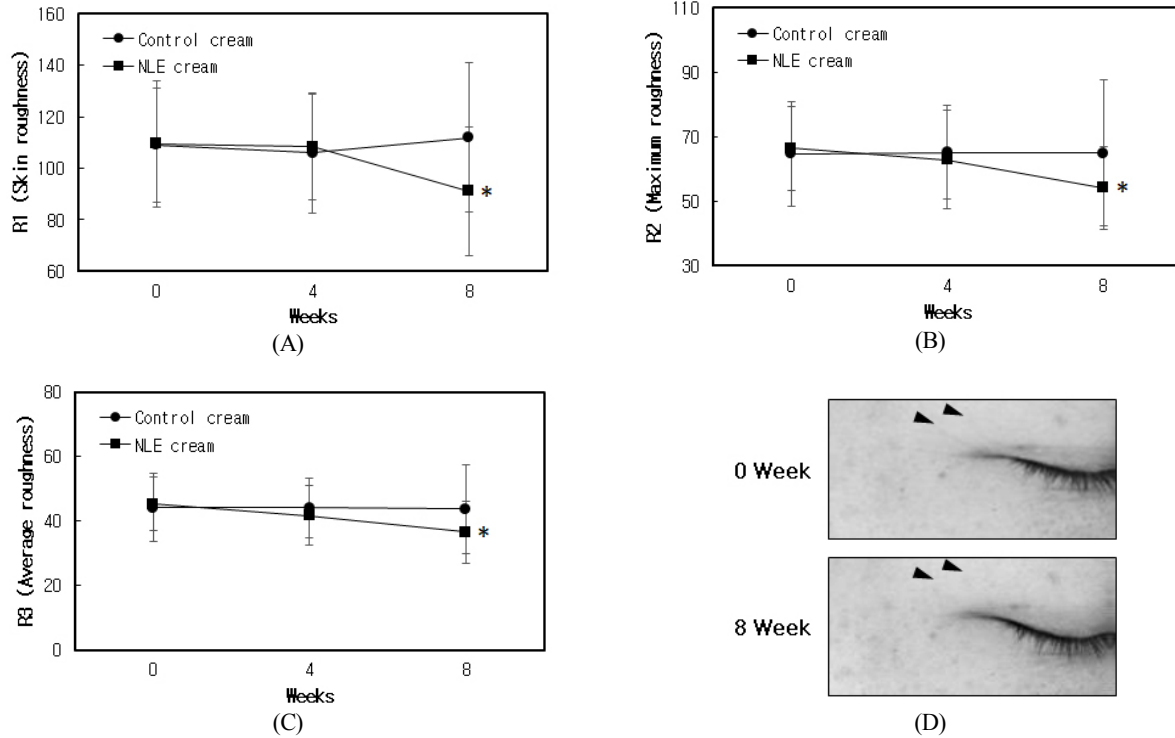


Figure 3. Effect of 1.7% NLE cream on eye wrinkle improvement. (A) R1 (skin roughness), (B) R2 (maximum roughness), and (C) R3 (average roughness) values analyzed by skin replicas obtained at 0, 4 and 8 weeks after topical application of 1.7% NLE cream (containing isoquercitrin 51 ppm). And (D) representative pictures of eye wrinkles at 0 and 8 weeks after topical application.

의 항산화 효능에 대해서도 이미 보고가 된 바 있으나 [7,30], 피부에서의 효능은 아직 구체적으로 밝혀진 바가 없다. 본 연구에서는 앞서 확인한 isoquercitrin의 콜라겐 증가 효능이 이 성분의 피부에서의 항산화 작용과 연관이 있을 것으로 생각하고 다양한 실험을 통해 isoquercitrin의 항산화 효능을 평가하였다. Figure 2B에 따르면, isoquercitrin 10 ~ 100 ppm은 대조군 대비 DPPH 라디칼을 23.6% ~ 51.3% 감소시켰다. 이는 isoquercitrin이 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 가지고 있음을 의미한다. 이어서 isoquercitrin의 인간 피부유래 세포주에서의 항산화 효능을 확인해보기 위해 인간 각질형성세포 HaCaT 및 인간 섬유아세포 NHDF를 사용하여 실험을 진행하였다. 그에 앞서 MTT assay를 통해 isoquercitrin이 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였고, 그 결과 HaCaT에서는 isoquercitrin 100 ppm, NHDF에서는 50 ppm까지는 통계적으로 유의미한 세포독성이 나타나지 않았으므로 이후 실험은 이 농도 범위까지 진행하였다(Figure 2C). Figure 2D 및 2E에 따르면,

isoquercitrin은 HaCaT 및 NHDF에서 활성산소종에 의해 생성되는 DCFH의 생성을 감소시켰다. HaCaT에 isoquercitrin을 처리하고 30 min 후에 DCFH를 측정하였을 때, 20 ~ 100 ppm의 농도에서 DCFH의 생성을 14.1% ~ 19.0%, 120 min 후에는 1 ~ 100 ppm의 농도에서 13.5% ~ 32.9% 감소시킴을 확인할 수 있었다(Figure 2D). NHDF에서는 30 min 후에 DCFH를 측정하였을 때 대조군과 비교하여 유의미한 차이를 확인할 수 없었으나, 120 min 후에 측정하였을 때는 0.1 ~ 50 ppm 농도에서 DCFH를 19.8% ~ 53.2% 감소시켰다(Figure 2E). 위의 결과로부터 isoquercitrin은 HaCaT 및 NHDF에서 활성산소종의 생성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 isoquercitrin은 HaCaT에서 빠른 활성산소종 억제 효능을 나타내며 NHDF에서는 적은 농도로도 우수한 효능을 나타낼 수 있었다. 또한 본 연구팀은 HaCaT 및 NHDF에서 총항산화능이 isoquercitrin에 의해 증가됨을 확인할 수 있었다(Figure 2F and 2G). HaCaT에 isoquercitrin을 20, 50 및 100 ppm의

농도로 처리하였을 때 대조군 대비 총항산화능을 각각 $130.1 \pm 6.3\%$, $156.0 \pm 2.7\%$ 및 $195.4 \pm 0.6\%$ 증가시켰으며(Figure 2F), HNHF에 20 및 50 ppm의 농도로 처리하였을 때는 각각 $141.9 \pm 2.7\%$ 및 $203.3 \pm 1.6\%$ 증가시켰다(Figure 2G). 위의 결과를 종합하여 볼 때, NLE의 주요 플라보노이드 성분인 isoquercitrin은 인간 각질형성세포주 및 인간 섬유아세포주에서 활성산소종의 생성을 억제하고 총항산화능을 증가시키며, isoquercitrin의 이러한 항산화 효능은 isoquercitrin 처리에 의한 섬유아세포주에서의 제1형 프로콜라겐 증가에도 영향을 미칠 것으로 생각한다.

3.3. 주름개선 효과

본 연구팀은 앞서 진행했던 실험 결과를 바탕으로 isoquercitrin을 함유한 NLE가 실제적으로 사람의 피부 주름 개선에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 가정하였다. 이를 확인하기 위해 정제하여 isoquercitrin의 함유량을 높은 NLE 원료를 1.7% 첨가한 크림(최종적으로 크림에 isoquercitrin 51 ppm 함유)을 제조하여 임상시험에 시험제품으로 사용하였다. 시험제품 사용 전과 사용 후 4 및 8주에 피부모사판을 제작하였으며 이를 분석하여 주름 파라미터인 R1, R2 및 R3의 값을 도출하였다. 결과적으로 시험제품의 사용 전과 비교하여 4주 후에는 각 파라미터의 변화가 관찰되지 않았으나, 8주 후에는 R1, R2 및 R3의 값이 모두 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 사용 전과 비교하여 사용 후 8주에 R1은 14.5%, R2는 17.6% 및 R3는 18.9% 감소하여 대조군과도 통계적으로 유의적인 차이를 나타내었다(Figure 3A, 3B and 3C). 사진 상으로도 시험제품 사용 후 8주에 눈가 주름의 개선이 관찰되었다(Figure 3D). 이는 isoquercitrin을 함유한 NLE가 피부 주름 개선에 우수한 효능을 나타낸다는 것을 의미하며, 이러한 결과는 NLE 및 isoquercitrin의 제1형 프로콜라겐 생성 촉진 효능과 우수한 항산화 효능에 의해 영향을 받았을 것으로 생각할 수 있다.

4. 결 론

주름개선은 남녀노소 모두의 관심사이며 소비자들은 화장품과 피부관리를 통하여 이를 개선하려 노력하고 있다. 화장품 산업은 이미지 마케팅이 큰 부분을 차

지하고 있고 최근 화학 물질의 사용을 꺼려하는 소비자가 늘고 있는 추세이기 때문에 주름개선 화장품 소재로서의 천연 유래 활성 물질 개발이 활발하게 이뤄지고 있다. 본 연구에서는 피부 주름개선에 효과를 나타내는 천연소재로서 NLE와 isoquercitrin을 발굴하였다. 연꽃잎 추출물 또는 isoquercitrin이 자외선 B에 의해 유발되는 주름 또는 콜라겐 감소에 긍정적인 영향을 미친다는 연구내용이 발표된 바 있으나[4,15], 본 연구에서는 자외선 등의 자극이 없는 상태에서 NLE 및 isoquercitrin이 인간 피부유래 섬유아세포에서 콜라겐 생성을 증가시킨다는 것을 확인하였다. 연꽃잎 추출물과 isoquercitrin의 항산화 효능도 이미 알려져 있지만[5,7], 본 연구에서는 NLE 및 isoquercitrin의 우수한 항산화 효능이 이들 각각의 콜라겐 생성 촉진 효능에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였고, 특히 isoquercitrin의 인체 피부유래 세포주에서의 항산화 효능을 최초로 확인하였다. 이러한 결과들이 기존 연구와 다른 점이라고 할 수 있으며, 결과적으로 임상시험을 통해 isoquercitrin 함유 NLE 원료의 인체 주름개선 효능소재로서의 가능성을 확인하였다는 점에서 본 연구의 의의가 있다. 그러므로 주름개선에 효과가 있는 isoquercitrin 함유 NLE는 소비자의 피부 고민을 해결해 줄 수 있는 안전한 천연 항노화 화장품 성분으로서 개발 가치가 충분히 있다고 사료된다.

Reference

1. H. Masaki, Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects, *J. Dermatol. Sci.*, **58**(2), 85 (2010).
2. P. K. Mukherjee, D. Mukherjee, A. K. Maji, S. Rai, and M. Heinrich, The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) - phytochemical and therapeutic profile, *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**(4), 407 (2009).
3. R. Karki, M. A. Jung, K. J. Kim, and D. W. Kim, Inhibitory effect of *Nelumbo nucifera* (Gaertn.) on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **153568**, (2012).
4. K. M. Park, Y. J. Yoo, S. Ryu, and S. H. Lee, *Nelumbo Nucifera* leaf protects against UVB-induced wrinkle formation and loss of subcutaneous fat

- through suppression of MCP3, IL-6 and IL-8 expression, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **161**, 211 (2016).
5. D. H. Yoo, D. H. Joo, S. Y. Lee, and J. Y. Lee, Antioxidant effect of *Nelumbo nucifera* G. Leaf extract and inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expression in a B16F10 melanoma cell line, *J. Life Sci.*, **25**(10), 1115 (2015).
 6. E. Middleton Jr, C. Kandaswami, and T. C. Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.*, **52**(4), 673 (2000).
 7. C. G. Silva, R. J. Raulino, D. M. Cerqueira, S. C. Mannarino, M. D. Pereira, A. D. Panek, J. F. Silva, F. S. Menezes, and E. C. Eleutherio, *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata*, *Phytomedicine.*, **16**(8), 761 (2009).
 8. A. Gasparotto Junior, F. M. Gasparotto, E. L. Lourenço, S. Crestani, M. E. Stefanello, M. J. Salvador, J. E. da Silva-Santos, M. C. Marques, and C. A. Kassuya, Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme, *J. Ethnopharmacol.*, **134**(2), 363 (2011).
 9. Y. Kim, S. Narayanan, and K. O. Chang, Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin, *Antiviral Res.*, **88**(2), 227 (2010).
 10. A. P. Rogerio, A. Kanashiro, C. Fontanari, E. V. da Silva, Y. M. Lucisano-Valim, E. G. Soares, and L. H. Faccioli, Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma, *Inflamm. Res.*, **56**(10), 402 (2007).
 11. L. Li, X. H. Zhang, G. R. Liu, C. Liu, and Y. M. Dong, Isoquercitrin suppresses the expression of histamine and pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP kinases and NF- κ B in human KU812 cells, *Chin. J. Nat. Med.*, **6**, 407 (2016).
 12. C. M. Pennesi, J. Neely, A. G. Marks Jr, and S. A. Basak, Use of isoquercetin in the treatment of *Prurigo nodularis*, *J. Drugs Dermatol.*, **16**(11), 1156 (2017).
 13. K. Ohguchi, C. Nakajima, M. Oyama, M. Iinuma, T. Itoh, Y. Akao, Y. Nozawa, and M. Ito, Inhibitory effects of flavonoid glycosides isolated from the peel of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* 'Fuyu') on melanin biosynthesis, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**(1), 122 (2010).
 14. N. Bhatia, G. Kaur, V. Soni, J. Kataria, and R. K. Dhawan, Evaluation of the wound healing potential of isoquercetin-based cream on scald burn injury in rats, *Burns Trauma*, **4**, 7 (2016).
 15. Eui Kyun Park, So Ra Ahn, Dong-Hee Kim, Eun-Woo Lee, Hyun Ju Kwon, Byung Woo Kim, and Tae Hoon Kim, Effects of unripe apple polyphenols on the expression of matrix metalloproteinase-1 and type-1 procollagen in ultraviolet irradiated human skin fibroblasts, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **4**(57), 449 (2014).
 16. T. Ihanamäki, L. J. Pelliniemi, and E. Vuorio, Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye, *Prog. Retin. Eye Res.*, **23**(4), 403 (2004).
 17. G. A. Di Lullo, S. M. Sweeney, J. Korkko, 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).
 18. J. J. Furth, The steady-state levels of type I collagen mRNA are reduced in senescent fibroblasts, *J. Gerontol.*, **46**(3), B122 (1991).
 19. 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).
 20. P. U. Giacomoni and G. Rein, Factors of skin ageing share common mechanisms, *Biogerontology*, **2**(4), 219 (2001).
 21. T. Stipcevic, J. Piljac, and D. Vanden Berghe, Effect of different flavonoids on collagen synthesis in human fibroblasts, *Plant Foods Hum. Nutr.*, **61**(1), 29 (2006).
 22. Y. Q. Li, F. C. Zhou, F. Gao, J. S. Bian, and F.

- Shan, Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase, *J. Agric. Food Chem.*, **57**(24), 11463 (2009).
23. J. M. Cruz-Zúñiga, H. Soto-Valdez, E. Peralta, A. M. Mendoza-Wilson, M. R. Robles-Burgueño, R. Auras, and N. Gámez-Meza, Development of an antioxidant biomaterial by promoting the deglycosylation of rutin to isoquercetin and quercetin, *Food Chem.*, **204**, 420 (2016).
24. S. J. Kim, M. H. Lim, I. K. Chun, and Y. H. Won, Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblast, *Skin Pharmacol.*, **10**(4), 200 (1997).
25. F. Verrecchia and A. Mauviel, TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression, *Cell Signal.*, **16**(8), 873 (2004).
26. N. Khansari, Y. Shakiba, and M. Mahmoudi, Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer, *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, **3**(1), 73 (2009).
27. D. Harman, Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **11**(3), 298 (1956).
28. H. Tanaka, T. Okada, H. Konishi, and T. Tsuji, The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts, *Arch. Dermatol. Res.*, **285**(6), 352 (1993).
29. S. Chae, M. J. Piao, K. A. Kang, R. Zhang, K. C. Kim, U. J. Youg, K. W. Nam, J. H. Lee, and J. W. Hyun, Inhibition of matrix metalloproteinase-1 induced by oxidative stress in human keratinocytes by mangiferin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(12), 2321 (2011).
30. M. Z. Zhu, W. Wu, L. L. Jiao, P. F. Yang, and M. Q. Guo, Analysis of flavonoids in Lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves and their antioxidant activity using macroporous resin chromatography coupled with LC-MS/MS and antioxidant biochemical assays, *Molecules*, **20**(6), 10553 (2015).