

연교를 함유한 처방단 추출물의 항노화 효과

김미진·정택규·윤경섭[†]

(주)사임당화장품 기술연구소

(2015년 2월 23일 접수, 2015년 3월 3일 수정, 2015년 3월 18일 채택)

Anti-aging Effects of Prescription Extracts Containing *Forsythia viridissima* L.

Mi Jin Kim, Taek Kyu Jung, and Kyung-Sup Yoon[†]

Saimdang Cosmetics Co., Ltd. R&D Center, 143, Yangcheongsongdae-gil, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si,
Chungcheongbuk-do 363-886, Korea

(Received February 23, 2015; Revised March 3, 2015; Accepted March 18, 2015)

요약: 항산화 활성, 항염증 효과, 항균작용, 주름개선 및 미백 효과 등이 알려져 있는 연교를 함유하며, 항염증 효과를 갖는 연교승마탕(連翹升麻湯), 가미연교승마탕(加味連翹升麻湯) 및 회춘양격산(回春涼膈散) 각각의 처방단을 추출하여 항노화 관련 효능을 알아보았다. 연교처방단 추출물의 자유라디칼 및 활성산소 소거 활성, 타이로시네이즈 활성 저해효과, 최종당화산물 생성 저해효과를 알아보았으며, 콜라겐 생성 및 자외선에 의해 유도된 MMP-1 생성 저해, α -MSH에 의해 유도된 멜라닌의 생성 저해효과를 확인하였다. 그 결과 항산화 및 항당화 효과를 보였으며, 효소처리 한 연교승마탕 추출물과 가미연교승마탕 75% 에탄올수용액 추출물은 콜라겐 생성 및 MMP-1 생성 저해효과를 나타내었다. 효소처리 한 회춘양격산 추출물들은 멜라닌 생성 저해효과를 나타내었다. 이로써, 연교처방단 추출물을 이용한 항노화 소재로서의 개발 가능성을 확인하였다.

Abstract: *Forsythia fructus* has been shown to have antioxidative, anti-inflammatory, antibacterial, anti-aging and whitening effects. This work was carried out to investigate the anti-aging effects of *Forsythia viridissima*-prescription extracts (Yeongyoseungma-tang, Gamiyeongyoseungma-tang, Hoechunyangkyeok-san) on skin. Skin anti-aging effect of *Forsythia viridissima*-prescription extracts (Yeongyoseungma-tang, Gamiyeongyoseungma-tang, Hoechunyangkyeok-san) was evaluated by using antioxidant assay, anti-glycation activity, inhibitory effect of tyrosinase activity, expression of type I procollagen and UVA-induced matrix metalloproteinase-1 on HS68 cells, and reduction of α -MSH-induced melanin on B16F1 cells. *Forsythia viridissima*-prescription extracts showed anti-oxidative and anti-glycation activity. The pectinex hydrolysed extract from Yeongyoseungma-tang 75% EtOH extract and Gamiyeongyoseungma-tang 75% EtOH extract increased the type I procollagen synthesis, and decreased the UVA-induced MMP-1 expression on HS68 cells. The pectinex hydrolysed extracts of Hoechunyangkyeok-san 75% EtOH extract had the inhibitory effect of melanin synthesis on B16F1 cells. Based on these results, we suggest that *Forsythia viridissima*-prescription extracts may be useful as a potential source of functional anti-aging cosmetics.

Keywords: *Forsythia viridissima*-prescription extracts, type I procollagen, MMP-1, melanin, anti-aging

[†] 주 저자 (e-mail: ksyoonjh@hanmail.net)
call: 043)218-4203

1. 서 론

피부 노화현상은 내인성 노화(intrinsic aging)와 광노화라고도 불리는 외인성 노화(photo-aging) 두 가지로 나눌 수 있다. 내인성 노화는 나이가 들어감에 따라 피부의 표피와 진피 사이의 결합이 약해지고, 피부 각질 형성세포의 분열 능력이 저하되며 지질형성 능력이 떨어지게 된다. 오랜 시간 자외선 노출로 인해 일어나는 외인성 노화는 자외선이 표피를 투과해 진피층까지 깊이 침투함으로써 탄력을 유지시키는 진피 내의 콜라겐과 엘라스틴(탄력섬유)을 손상시켜 나타낸다[1,2]. 자외선 작용으로 인해 피부는 superoxide anion, peroxide 등을 포함하는 라디칼을 과잉 생성한다. 라디칼이 인체에 존재하는 원인은 여러 가지가 있는데, 이 라디칼은 세포를 파괴 또는 피부 진피층의 결합조직을 절단 및 교차결합을 일으키므로 주름형성, 피부암, 세포살상, 류마티스성 관절염, 아토피성 피부염, 여드름 등 여러 문제를 발생시킨다. 라디칼 증가는 진피의 결합조직인 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산 등을 파괴하여 피부의 일정 부위 침하 현상(주름)을 일으키며, 다양한 기질 단백질 분해효소의 발현을 촉진시킨다. 이러한 기질 단백질의 결핍은 노화에 있어서 중요한 인자라고 할 수 있다.

멜라닌은 태양광선 중 유해한 자외선으로부터 생체를 보호하는 중요한 방어 수단으로 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하여, 자외선을 흡수 차단시켜 피부를 보호한다. 그러나 멜라닌이 과도하게 합성되거나 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소침착을 유발하게 된다[3]. 멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌세포의 멜라노솜에서 합성되어 멜라닌세포의 수지상돌기를 통해 피부 각질층으로 이동된다[4].

연교(連翹, *Forsythia* fruit)는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 의성개나리(*Forsythia viridissima* Lindle)의 열매로 신농본초경에 기재되어 있으며, 한방과 민간에서 종창, 임질, 통경, 이노, 치질, 결핵, 나력, 움, 해독 등에 널리 사용되고 있다[5]. 연교에 함유되어 있는 성분에는 lignan류(phillygenin, pinosresinol, arctigenin, matairesinol), lignan glucoside류(phillyrin, pinosresinol-D-glucose, arctiin, matairesinoside), flavonoid (rutin) 및 3,4-dihydroxyphenethyl alcohol의 caffeoyl glycoside류

(forsythiaside, acteoside, suspensaside 및 hydroxyacteoside) 등이 있다[6]. 연교의 생리활성작용에 대해서는 *in vitro* 시험에서 우수한 항산화 활성[7-9], 항바이러스성[10], 항염증 효과[11], 항균작용[12], 혈압강화작용[13], 주름개선 효과[14], 미백효과[15] 등이 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 연교를 함유하며, 항염증 효과를 갖는 연교승마탕(YSC)[16,17]과 연교를 포함한 처방단을 항노화용 화장품 원료로서의 적용 가능성을 확인하기 위하여 항노화 관련 효능을 알아보았다.

2. 재료 및 실험

2.1. 실험 재료

본 실험에 사용한 생약재는 (주)지유본초(파주시, 경기도)로부터 구입하여 사용하였으며, 연교를 포함한 처방단들의 추출과정 및 분획에 사용된 용매들은 시약급을 사용하였다.

2.2. 연교처방단 추출물 제조 및 분석

2.2.1. 연교처방단 추출물의 제조

연교를 포함한 처방단인 연교승마탕(YSC), 가미연교승마탕(A-YSC), 회춘양각산(HYC) 추출물 각각의 약재 구성은 한의서를 바탕으로 Table 1에 나타내었다[18,19]. 연교처방단 추출물을 제조하기 위하여 Table 1의 약재 비율에 따라 총 50 g을 정량하여 시료 중량 10배의 75% EtOH 수용액을 가하여 60 ~ 90 °C에서 4 h 동안 환류 냉각하면서 추출하였다. 이 추출 과정을 2회 반복한 추출여액을 여과지(Whatman No. 2)로 여과하고 40 °C에서 감압 농축하여 75% EtOH 수용액 추출물을 얻었다(이하 75% EtOH Ext). 이 75% EtOH Ext에 증류수 및 10% EtOH 수용액을 가하여 가용화한 후 동량의 메틸렌클로라이드(CH₂Cl₂), 에틸아세테이트(EtOAc)를 첨가하여 용매분획을 실시하여 분획물을 얻었다(75% EtOH Ext_MC or _EA). 또한 75% EtOH Ext을 10% EtOH 수용액으로 용해한 뒤 당분해 효소인 Pectinex (Novozymes, Denmark)를 처리한 액을 50 ~ 60 °C에서 30 h 반응시킨 뒤 여과하고 40 °C에서 감압 농축하여 효소처리 추출물을 얻었다(75% EtOH Ext_Pec). 효소를 처리한 액을 메틸렌클로라이드와 에틸아세테이트로 각각 분획하여 효소처리 분획

Table 1. The Composition of Prescription Containing *Forsythia viridissima*

Prescription	Herbal name	Amount (%)
YSC	<i>Forsythia viridissima</i> fruit	23.28
	<i>Cimicifuga dahurica</i> root	16.28
	<i>Pueraria lobata</i> root	16.28
	<i>Platycodon grandiflorum</i> root	16.28
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> root	16.28
	<i>Paeonia japonica</i> root	11.6
A-YSC	<i>Forsythia viridissima</i> fruit	23.28
	<i>Cimicifuga dahurica</i> root	8.14
	<i>Pueraria lobata</i> root	16.28
	<i>Platycodon grandiflorum</i> root	16.28
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> root	8.14
	<i>Paeonia japonica</i> root	11.60
HYC	<i>Angelica gigas</i> root	16.28
	<i>Forsythia viridissima</i> fruit	14.70
	<i>Platycodon grandiflorum</i> root	8.53
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> root	8.53
	<i>Paeonia japonica</i> root	8.53
	<i>Angelica gigas</i> root	8.53
	<i>Scutellaria baicalensis</i> root	8.53
	<i>Gardenia jasminoides</i> fruit	8.53
	<i>Coptis chinensis</i> root	8.53
	<i>Mentha arvensis</i> leaf	8.53
	<i>Rehmannia glutinosa</i> root	8.53
	<i>Poncirus trifoliata</i> fruit	8.53

물을 얻었다(75% EtOH Ext_Pec_MC or _EA).

2.2.2. HPLC를 이용한 연교처방단 추출물의 분석

연교처방단 추출물의 분석은 지표성분으로 matairesinol과 arctigenin을 대상으로 HPLC를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석 조건으로 크로마토그래피는 Agilent Technologies사 1200 series HPLC (USA), 칼럼은 Luna C₁₈ (5 μm, 4.6 I.D. × 50 mm), 검출기는 자외부 흡광광도계로 측정파장은 280 nm로 하였다. 유속은 0.8 mL/min이며, 이동상은 용매 A (0.1% acetic acid in acetonitrile), 용매 B (0.1% acetic acid in water)를 기울기 용매로 하여 Table 2의 조건에 따라 실시하였다.

2.3. 항산화효과

2.3.1. 자유라디칼 소거효과 측정

자유라디칼 소거 활성시험은 안정한 자유라디칼

DPPH를 사용하는 방법으로[20] 메탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액에 시료를 각각의 농도로 메탄올에 녹여 혼합하고, 실온에서 10 min 동안 반응시킨 후 microplate reader (Synergy, BioTek, USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 메탄올을 넣었으며, DPPH 용액 대신 메탄올을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 하기의 식에 따라 계산하였으며, 그 결과는 자유라디칼을 50% 소거할 수 있는 농도(IC₅₀)로 나타내었다.

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

2.3.2. 활성산소 소거효과 측정

활성산소(superoxide anion) 소거 활성평가는 Noro 등의 방법[21]을 활용하여 xanthine/xanthine oxidase 효

Table 2. Gradient Elution Condition for HPLC Analysis

Time (min)	0.1% Acetic acid in acetonitrile	0.1% Acetic acid in DW
0	0	100
5	10	90
15	20	80
30	30	70
35	40	60
45	60	40
60	100	0
65	0	100

소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 nitroblue tetrazolium (NBT)의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃, 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, bovine serum albumin (BSA), 0.75 mM NBT 및 시료를 넣고 잘 혼합하여 25 °C에서 10 min 동안 정치하였다. Xanthine oxidase를 넣고 25 °C에서 20 min 동안 반응시킨 후에 6 mM CuCl₂를 넣어 반응을 정지시키고 microplate reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 정제수를 넣으며, xanthine oxidase 대신에 정제수를 넣어 색 보정값을 얻었다. 소거율은 DPPH radical 소거율에 사용된 식에 따라 계산하였으며, 그 결과는 활성산소를 50% 소거할 수 있는 농도(IC₅₀)로 나타내었다.

2.4. Tyrosinase 활성 저해효과 측정

Tyrosinase에 대한 활성은 각 농도별 시료 0.9 mL, 0.1 M 인산완충액(pH 6.8) 1.0 mL, 1.5 mM L-tyrosine 용액 1.0 mL을 넣은 후, 37 °C에서 10 min 간 반응시킨 뒤 mushroom tyrosinase (1,500 units/mL) 0.1 mL를 첨가하여 37 °C에서 10 min 간 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 저해율은 DPPH radical 소거율에 사용된 식에 따라 계산하였으며, 그 결과는 활성을 50% 저해하는 농도(IC₅₀)로 나타내었다.

2.5. 최종당화산물 생성 저해효과

Glycation 반응이 진행되면 산화, 축합 등의 일련의 복합적인 과정을 거쳐 여러 화합물이 혼재되어 있는 최종당화산물(advanced glycation end products, AGEs)

이 만들어진다. AGEs 화합물 중 일부는 형광을 띄게 되어 glycation 반응의 정도를 가늠할 수 있는 척도로 이용되고 있다[22]. Vinson과 Howard의 방법[23]을 변형하여 실시하였다. 0.2 mL BSA (10 mg/mL), 0.4 mL glucose (225 mg/mL), 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 용해된 10 mg/mL 알부민(Bovine serum albumin, Sigma), 225 mg/mL glucose와 0.1 mL 시료를 혼합하여 60 °C에서 24 h 동안 당화 반응을 시켰다. AGEs inhibitor로 알려진 aminoguanidine-HCl을 양성대조군으로 사용하였으며, 반응 후 microplate reader를 이용하여 형광도를 측정하였다(Ex: 360 nm, Em: 460 nm).

2.6. 세포배양

세포주로 normal human fibroblast인 HS68 cells과 마우스 흑색종 세포주인 B16 melanoma cells은 ATCC에서 분양받아 사용하였다. 세포 배양에 사용된 배지 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone Lab, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Life Tech Inc., USA), 1% antibiotic antimycotic (100 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin, Life Tech Inc., USA)을 혼합한 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.7. 세포 생존력 시험

본 실험에서 HS68 cells과 B16F1 cells에 대한 시료의 처리농도를 결정하기 위하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma] assay를 Mosmann의 방법[24]을 변형하여 실시하였다.

HS68 cells와 B16F1 cells을 각각 1 × 10⁴ cells/well,

Table 3. The Contents of Major Lignans of *Forsythia viridissima*-prescription Extracts

Prescription	Extraction	Yield (%)	Content (%)		
			Matairesinol	Arctigenin	
YSC	_75% EtOH	Ext	25.28	0.159	0.387
		_MC	2.35	3.480	5.017
		_EA	2.93	3.382	4.550
		_Pec	24.55	0.593	0.814
		_Pec_MC	1.32	16.875	15.405
		_Pec_EA	2.00	10.730	9.865
A-YSC	_75% EtOH	Ext	33.43	0.169	0.366
		_MC	2.29	3.403	5.438
		_EA	3.20	3.706	4.576
		_Pec	30.90	0.391	0.780
		_Pec_MC	1.12	16.395	15.175
		_Pec_EA	2.10	10.495	9.765
HYC	_75% EtOH	Ext	31.96	0.138	0.359
		_MC	2.04	1.673	2.991
		_EA	2.28	1.819	2.880
		_Pec	30.55	0.507	0.828
		_Pec_MC	1.38	9.981	9.021
		_Pec_EA	1.82	6.868	6.125

5 × 10³ cells/well이 되도록 96-well plate 분주하여 5% CO₂, 37 °C 조건하에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 시료를 농도별로 배지에 희석하여 교체한 후, 24 h, 72 h 동안 각각 배양하였다. 배양 후 MTT assay를 통해 세포의 생존율을 알아보았다.

2.8. 콜라겐 합성효과

HS68 cells을 1 × 10⁵ cells/well이 되도록 24-well plate 분주하여 5% CO₂, 37 °C 조건하에서 24 h 동안 배양하였다. 농도별로 시료가 희석된 serum-free 배지로 교체하고 24 h 동안 배양하였다. 배양액을 모아 Procollagen type I C-Peptide EIA kit (Takara, Japan)를 이용하여 콜라겐 전구체 C-말단의 양을 측정하였으며, 총 단백질량으로 보정하였다.

2.9. MMP-1 생성 억제효과

HS68 cells을 1 × 10⁵ cells/well이 되도록 24-well plate 분주하여 5% CO₂, 37 °C 조건하에서 24 h 동안 배양하였다. Phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척하여 배지의 serum 성분을 제거한 후 PBS를 넣어 15 J/cm² UVA (ELC-500, Lightning Enterprises, USA)를 조사하였다. UVA를 조사 후 시료가 농도별로 희석된 serum-free 배지로 교체하고 48 h 배양하였다. 배지 중에 유리된 MMP-1의 양은 MMP-1, Human, Biotrak ELISA System (GE Healthcare, UK)을 이용하여 측정하였으며, 총 단백질량으로 보정하였다.

2.10. 멜라닌 생성 억제효과

멜라닌 생성량 측정은 Oka 등의 방법[25]을 변형하여 사용하였다. B16F1 cells을 5 × 10⁴ cells/well이 되도록

Table 4. Antioxidative Effect of *Forsythia viridissima*-prescription Extracts

Prescription	Extraction	IC ₅₀ ^{a)} (μg/mL)		
		DPPH Scavenging	Superoxide Scavenging	
YSC	_75% EtOH	Ext	89.4 ± 2.7	759.2 ± 3.4
		_MC	49.2 ± 2.7	480.6 ± 9.4
		_EA	23.1 ± 6.0	357.6 ± 26.2
		_Pec	98.7 ± 2.7	387.7 ± 3.2
		_Pec_MC	50.1 ± 1.0	437.0 ± 10.2
		_Pec_EA	27.5 ± 1.4	295.9 ± 0.3
A-YSC	_75% EtOH	Ext	89.3 ± 4.2	781.3 ± 3.9
		_MC	56.3 ± 0.7	483.9 ± 15.1
		_EA	20.6 ± 0.9	332.2 ± 3.3
		_Pec	96.6 ± 2.1	405.9 ± 5.2
		_Pec_MC	53.2 ± 0.7	433.5 ± 2.5
		_Pec_EA	18.2 ± 1.1	306.4 ± 2.8
HYC	_75% EtOH	Ext	108.3 ± 5.8	636.4 ± 7.8
		_MC	51.7 ± 1.7	388.3 ± 3.7
		_EA	21.9 ± 1.0	263.1 ± 7.0
		_Pec	109.0 ± 0.9	575.6 ± 3.2
		_Pec_MC	21.4 ± 1.3	381.0 ± 3.3
		_Pec_EA	11.4 ± 0.2	242.6 ± 2.6
	BHT		134.2 ± 0.1	1.0 ± 0.9 mg/mL

IC₅₀^{a)} : Concentration of the sample required for 50% the radical to be scavenged

록 6-well plate 분주하여 5% CO₂, 37 °C 조건하에서 24 h 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 시료를 농도별로 배지에 희석하여 교체한 후, 최종 농도가 200 nM이 되도록 α-MSH를 첨가하여 3일간 추가 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후, 10% DMSO가 함유된 1 N NaOH를 첨가하여 50 °C 항온조에서 세포 내 멜라닌을 용해시켰다. Microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 총 단백질량으로 보정하였다.

2.11. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였으며, 통계분석은 SPSS® Package Program (IBM, USA)을 사

용하여 분석하였다. 모든 실험 결과는 3번 이상의 독립적인 실험 결과이며 각 군간의 통계적인 유의성은 일원분산분석(one-way ANOVA)로 검증하였고 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 연교처방단 추출물 중의 lignans 함량 분석

연교처방단으로부터 추출, 분리한 추출물 중의 lignans를 분석한 결과, matairesinol과 arctigenin을 확인할 수 있었으며, Table 3에 나타난 바와 같이 일반추출물 및 분획층에 비해 효소처리한 추출물의 분획층에서 matairesinol은 약 3 ~ 5배, arctigenin은 약 2 ~ 3배

Table 5. Inhibitory Effects of *Forsythia viridissima*-prescription Extracts on Tyrosinase

Prescription	Extraction	IC ₅₀ ^{b)} (μg/mL) or rate of inhibition (% , at 1 mg/mL)	
YSC	_75% EtOH	Ext	14.9 ± 0.0%
		_MC	481.6 ± 5.8
		_EA	679.2 ± 4.9
		_Pec	737.9 ± 5.0
		_Pec_MC	410.7 ± 1.9
		_Pec_EA	606.4 ± 2.3
A-YSC	_75% EtOH	Ext	13.3 ± 0.0%
		_MC	484.1 ± 1.2
		_EA	538.4 ± 16.8
		_Pec	760.3 ± 16.8
		_Pec_MC	485.4 ± 4.2
		_Pec_EA	576.8 ± 2.0
HYC	_75% EtOH	Ext	8.0 ± 2.4%
		_MC	19.3 ± 1.8%
		_EA	17.6 ± 0.7%
		_Pec	11.2 ± 1.1%
		_Pec_MC	56.3 ± 0.8%
		_Pec_EA	28.0 ± 2.1%

IC₅₀^{b)} : Concentration of the sample required for 50% the activity to be inhibited

정도 함량이 증가하였다. 또한 연교 함량이 많은 YSC 과 A-YSC가 HYS에 비해 높은 lignans를 함유하였다.

3.2. 항산화 효과

3.1.1. 자유라디칼 소거효과

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 라디칼로 자유라디칼의 안정된 모델이다. 따라서 반응 중 DPPH의 감소는 자유라디칼의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다. 연교처방단 관련 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 자유라디칼 소거효과를 측정하였다. 측정 결과, 연교처방단 추출물에서의 자유라디칼 소거 활성은 유사한 정도를 나타내었다. 특히 일반 및 효소처리 추출물에 비해 각각의 분획층에서

소거 활성효과가 약 2 ~ 3배 양호하였으며, 이는 항산화 효과가 알려져 있는 BHT보다 양호한 소거활성을 나타내었다. 연교처방단 추출물 중 HYC_75% EtOH Ext_Pec_EA의 IC₅₀ 값이 11.3 ± 0.2 μg/mL으로 가장 양호한 효과를 나타내었다(Table 4).

3.1.2. 활성산소 소거효과

활성산소 소거활성 평가는 xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 NBT의 산화도를 흡광도 변화로 측정하였다. 연교처방단 추출물의 활성산소 소거활성 평가 결과, 일반추출물을 제외한 추출물에서 유사한 효과가 나타났으며, 이는 자유라디칼 소거 활성에서와 마찬가지로 항산화 효과가 알려져 있는 BHT보다 양호한 소거 활성을 보였다. YSC와 A-YSC에 비해 HYC에서

Table 6. Inhibitory Effects for AGEs Formation of *Forsythia viridissima*-prescription Extracts

Prescription	Extraction	IC ₅₀ ^o ($\mu\text{g}/\text{mL}$) or rate of inhibition (% , at 1 mg/mL)	
YSC	_75% EtOH	Ext	102.0 \pm 3.8
		_MC	576.2 \pm 6.0
		_EA	705.7 \pm 9.4
		_Pec	47.1 \pm 2.2%
		_Pec_MC	45.7 \pm 1.5%
		_Pec_EA	50.9 \pm 2.1%
A-YSC	_75% EtOH	Ext	391.2 \pm 4.7
		_MC	730.2 \pm 5.7
		_EA	710.7 \pm 8.0
		_Pec	52.6 \pm 8.0%
		_Pec_MC	42.2 \pm 1.5%
		_Pec_EA	52.9 \pm 0.6%
HYC	_75% EtOH	Ext	94.3 \pm 0.9
		_MC	295.9 \pm 9.0
		_EA	51.9 \pm 4.0%
		_Pec	43.4 \pm 1.4%
		_Pec_MC	49.0 \pm 0.9%
		_Pec_EA	52.4 \pm 6.1%
Aminoguanidine-HCl		390.3 \pm 4.8	

IC₅₀^o : Concentration of the sample required for 50% the AGEs formation to be inhibited

양호한 효과를 보였으며, HYC_75% EtOH Ext_Pec_EA의 IC₅₀ 값이 242.6 \pm 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 자유라디칼 소거활성 결과에서와 동일하게 가장 우수한 효과를 나타내었다(Table 4).

3.2. 연교처방단 추출물의 tyrosinase 활성 저해효과

Tyrosinase는 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 효소로, 기질인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 산화되어 생성되는 멜라닌의 흡광도를 측정함으로써 시료의 tyrosinase 활성 저해효과를 검토하는 방법으로 미백효과 연구에 사용되고 있다. 연교처방단 추출물의 tyrosinase 활성 저해효과 평가 결과, YSC와 A-YSC에서 일반추출물을 제외한 추출물에서 유사한 효과가 나타났으며, 특히 MC 분획층에서 다소 양호하였다. YSC 및

A-YSC의 일반추출물과 HYC의 추출물에서는 tyrosinase 활성 저해효과가 거의 나타나지 않았다(Table 5).

3.3. 연교처방단 추출물의 최종당화산물 생성 저해효과

단백질의 당화산물은 펩타이드 간의 가교결합 형성 또는 생리적 기능을 저해하는 것으로 알려져 있다 [26]. 연교처방단 추출물의 최종당화산물 생성 저해효과 측정 결과, 일반추출물에서 저해효과가 우수하였으며, 특히 HYC의 일반추출물은 양성대조군으로 알려진 aminoguanidine-HCl과 비교하여 약 4배의 최종당화산물 생성 저해효과를 나타냈다(Table 6).

3.4. 연교처방단 추출물의 세포독성

연교처방단 추출물의 항노화 효능 평가를 위하여

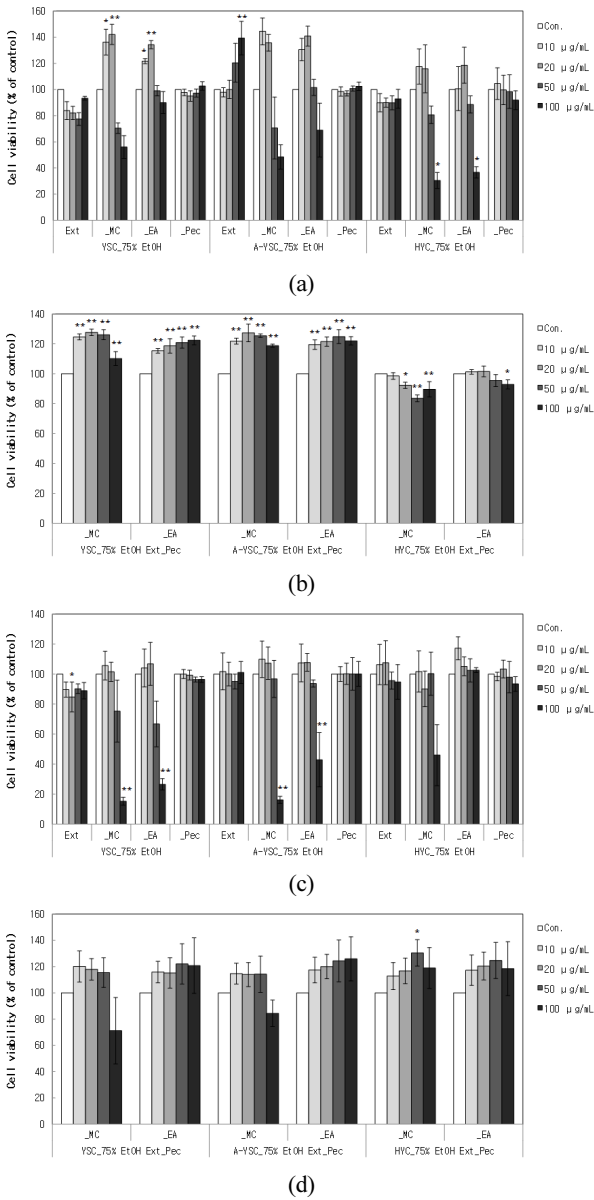


Figure 1. Cell viability of *Forsythia viridissima*-prescription extracts in HS68 cells (a),(b); and B16F1 cells (c),(d). The cells were treated with various concentration of samples for 24 h (a),(b) and for 72 h (c), (d). The results were expressed as the mean ± S.D. from the three independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.005 indicate a significant difference from the control.

각 효능 평가에 사용되는 세포주에 대한 세포독성 평가를 수행하여 이에 대한 결과를 Figure 1에 나타내었다. 사람 섬유아세포주인 HS68 cells에서는 분획층의 50, 100 μg/mL에서 세포독성이 나타났으며, 효소처리한

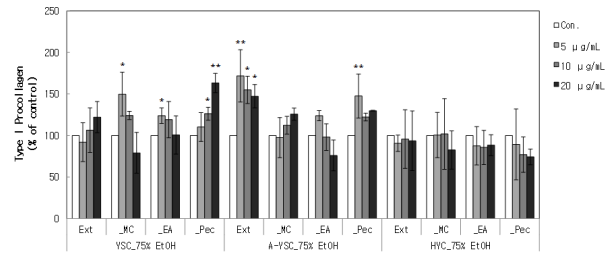


Figure 2. The effect of *Forsythia viridissima*-prescription extracts on the production type I procollagen. The results were expressed as the mean ± S.D. from the three independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.005 indicate a significant difference from the control.

추출물군에서는 100 μg/mL 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다. 마우스유래의 B16F1 cells의 경우에도 HS68 cells과 유사한 결과를 보였다. 세포 생존에 영향을 주지 않는 농도를 고려하여, HS68 cells은 20 μg/mL 농도 이하에서 주름개선 효과를 평가하였으며, B16F1 cells의 경우는 일반추출물 및 분획층은 20 μg/mL, 효소처리한 분획층(YSC과 A-YSC의 75% EtOH Ext_Pec_MC는 50 μg/mL 이하)은 100 μg/mL 이하의 농도에서 미백효과를 평가하였다.

3.5. 연교처방단 추출물의 콜라겐 합성효과

Type I procollagen의 합성효과를 알아보기 위하여 HS68 cells에 연교처방단 추출물을 처리하여 24 h 후 배양액을 취하여 ELISA를 수행하였다. 연교처방단 추출물 중 YSC_75% EtOH Ext_Pec에서 농도의존적으로 유의성 있는 콜라겐 합성효과를 볼 수 있었으며, 특히 20 μg/mL 농도에서 163.2 ± 11.5%로 콜라겐 합성효과가 우수하였다. A-YSC의 일반추출물에서도 양호한 콜라겐 합성효과가 나타났으나 농도가 증가함에 따라 그 정도가 감소하였으며, HVC 추출물에서는 콜라겐 합성효과가 나타나지 않았다(Figure 2). 연교처방단의 효소처리 추출물에서는 콜라겐 합성효과가 나타나지 않았다(data 미첨부).

3.6. 연교처방단 추출물의 MMP-1 생성 저해효과

MMPs는 UVA에 의해 발현이 촉진되며, 피부의 광손상과 관련되어 있다[27-28]. 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 연교처방단 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 연교처방단 추출물을 첨가하여 48 h 배양한 후 MMP-1 생성 저해 효과를 ELISA를 통

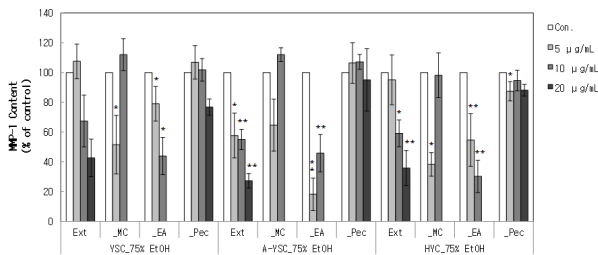


Figure 3. Inhibitory effect of *Forsythia viridissima*-prescription extracts the expression of MMP-1 in the UVA irradiated HS68 cells. The results were expressed as the mean \pm S.D. from the three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ indicate a significant difference from the control.

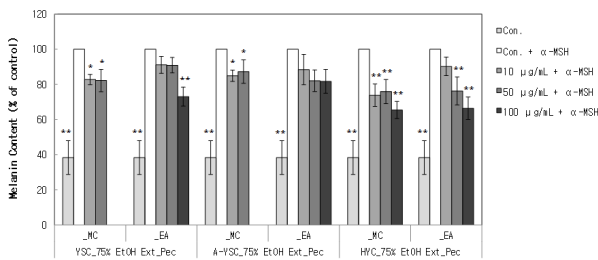


Figure 4. Inhibitory effect of *Forsythia viridissima*-prescription extracts on melanin content of B16F1 cells. After the treatment of samples and α -MSH for 72 h, melanin contents were measured at 490 nm. The results were expressed as the mean \pm S.D. from the three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ indicate a significant difference from the control.

해 알아보았다. 그 결과, YSC의 EA 분획층, A-YSC의 일반추출물, HYC의 일반추출물과 EA 분획층에서 농도의존적으로 유의성 있게 MMP-1이 감소하였다. 또한, YSC의 효소처리군의 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 유의성은 나타나지 않았으나 MMP-1의 감소효과가 나타났다. 앞선 콜라겐 합성효과 측정 결과와 함께 볼 때, YSC의 효소처리군과 A-YSC의 일반추출물은 주름개선의 소재로서 유용하다고 사료된다.

3.7 멜라닌 생성 억제효과

연교처방단 추출물의 mushroom tyrosinase를 이용한 tyrosinase 활성 저해효과를 평가한 결과에서는 YSC와 A-YSC에서 유사한 저해 활성을 관찰하였으나, HYC에서는 tyrosinase 활성 저해효과가 나타나지 않았다 (Table 5). 연교처방단 추출물이 멜라닌 합성에 미치는

영향을 확인하기 위해 B16F1 cells에 연교처방단의 일반추출물 및 분획층을 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하고 72 h이 지난 후 멜라닌 생성량을 측정하였다. 그 결과, HYC의 효소처리군에서만 멜라닌 생성량이 유의적인 감소를 보였다(data 미첨부). 효소처리에 의한 멜라닌 생성량의 감소를 알아보기 위하여 연교처방단을 효소처리 후 분획하여 평가하였다. 그 결과 연교처방단의 효소처리 분획층에서 유의적인 멜라닌 생성 감소효과를 볼 수 있었으며, 특히 HYC의 효소처리 EA와 MC 분획층에서는(75% EtOH Ext_Pec_EA, _MC) 멜라닌이 농도의존적으로 감소하였다(Figure 4).

4. 결 론

노화란 나이가 들면서 신체의 구조와 기능이 점진적으로 저하되고 질병과 사망에 대한 감수성이 급격히 증가하면서 쇠약해지는 과정이다. 이러한 변화는 생명체 내외의 요인으로부터 초래되는 스트레스를 견뎌낼 수 있는 능력을 상실하게 되고, 따라서 세포 내의 항상성을 잃게 된다. 최근의 노화 가설들 중 프리라디칼 가설과 산화적 손상가설로 이러한 산화적 스트레스에 의한 노화현상이 알려져 있다[29-31]. 이에 항산화 활성[7-9], 항염증 효과[11], 주름개선[14] 및 미백 효과[15]에 대한 생리활성이 알려진 바 있는 연교를 포함하며, 항염증 효과를 갖는 연교승마탕(YSC) [16,17]과 연교를 포함한 처방단을 이용한 항노화용 화장품 원료로의 적용 가능성을 확인하기 위하여 항노화 관련 효능을 알아보았다. 연교처방단 추출물의 리그난류의 함량은 일반추출물 및 분획층과 비교하여 볼 때 효소처리한 분획층에서 월등히 증가하였다. 앞선 연구에 따르면, matairesinol과 arctigenin을 함유한 연교추출물의 농도 의존적 주름개선 효과와 우방자 추출물로부터 분리, 동정한 matairesinol과 arctigenin의 procollagen 합성 및 MMP-1 생성 저해에 관한 보고가 있으며, 연교 추출물로부터 분리한 arctigenin의 멜라닌 생성 억제 효과가 알려진 바 있다[14,15,32]. 본 실험 결과에 따르면, 연교처방단 추출물의 주름개선 효과는 리그난 함량에 비례하여 그 효과가 나타나지 않았다. 그러나, 회춘양격산 추출물은 리그난 함량 변화에 따라 tyrosinase 활성 저해 및 멜라닌 생성 저해 효과가 나타남을 확인하였다. 연교처방단 추출물의 주

름개선 효과는 균약으로 작용한 연교 추출물 이외의 추출물에 함유된 성분들의 결과라고 예측할 수 있으며, 향후 활성을 나타내는 다른 지표물질에 대한 분석이 필요할 것으로 보인다. 연교처방단 추출물의 주름개선 효과 측정에서 YSC 일반추출물 효소처리군과 A-YSC 일반추출물 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 콜라겐 합성량이 각각 약 163, 147% 증가하였으며, MMP-1 생성은 약 23, 73% 감소하였다. 연교처방단 일반추출물에서는 최종당화산물 억제효과가 양호하였으며, HYC 일반추출물은 양성대조군으로 알려진 aminoguanidine-HCl과 비교하여 약 4배의 저해효과를 나타내었다. 멜라닌 생성 저해효과 결과에서는 HYC 효소처리한 분획층에서 농도의존적으로 멜라닌 합성이 감소함을 볼 수가 있었으며, 더불어 tyrosinase 활성 저해효과 및 자유라디칼 소거 활성 또한 증가하였다.

이상의 결과로 볼 때, 연교처방단 추출물의 항산화, 주름개선 및 미백 효과를 확인하였다. 특히 YSC 일반추출물 효소처리군(YSC_75% EtOH Ext_Pec)과 A-YSC 일반추출물(A-YSC_75% EtOH Ext)는 주름개선 효과가 우수하였으며, YSC 효소처리 EA 분획층(YSC_75% EtOH Ext_Pec_EA)과 HYC 효소처리 분획층(HYC_75% EtOH Ext_Pec_EA or_MC)은 미백효과가 우수하여 연교처방단 추출물의 항노화 소재로서의 이용 가치가 기대된다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부 산하 (재)충청지역사업평가원의 산업협력권사업에 의해 수행되었습니다.

Reference

1. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, and J. J. Voorhees, Molecular mechanism of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid, *Photochem. Photobiol.*, **69**(2), 154 (1999).
2. J. S. Shim, Y. Y. Kwon, and J. K. Hwang, The effects of panduratin a isolated from kaempferia pandurata on the expression of matrix metalloproteinase-1 and type-1 procollagen in human skin fibroblasts, *Planta Med.*, **74**(3), 239 (2008).
3. H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Michell, Melanin: a two edged swords, *Pigment Cell Res.*, **10**, 158 (1997).
4. M. Seiberg, L. Babiarz, and C. B. Lin, IL-41 the PAR-2 pathway is differentially expressed in skin of color, *Pigment Cell Res.*, **16**, 591 (2003).
5. T. J. Kim, Korean resources plants, *Seoul National University Pub.*, Seoul, 262 (1991).
6. E. B. Lee and H. J. Keum, Pharmacological studies on *Forsythia fructus*, *Kor. J. Pharmacogen.*, **19**, 262 (1998).
7. Y. S. Rim, Y. M. Park, M. S. Park, K. Y. Kim, M. J. Kim, and Y. H. Choi, Screening of antioxidant and antimicrobial activity in native plants, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **8**, 342 (2000).
8. D. K. Lim, U. Choi, and D. H. Shin, Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **8**, 342 (2000).
9. G. R. Schinella, H. A. Tournier, J. M. Prieto, D. Moduiovich, and J. L. Rios, Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts, *Life Sci.*, **70**, 1023 (2002).
10. W. Mazur, T. Fotsis, K. Wahala, S. Ojala, A. Salakka, and H. Adlercreutz, Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol and lignans in food samples, *Anal. Biochem.*, **233**, 169 (1996).
11. Y. Ozaki, J. Rui, and Y. T. Tang, Antiinflammatory effect of *Forsythia suspensa* V (AHL) and its active principle, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 365 (2000).
12. Z. X. Li, X. H. Wang, J. H. Zhao, J. F. Yang, and X. Wang, Investigation on antibacterial activity of *Forsythia suspense* Vahl *in vitro* with Mueller-Hinton agar, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi (China Journal of Chinese Materia Medica)*, **25**, 742 (2000).
13. E. B. Lee and H. J. Keum, Pharmacological studies on *Forsythia fructus*, *Kor. J. Pharmacogen.*, **19**, 262 (1988).
14. M. J. Kim, J. Y. Kim, T. K. Jung, S. W. Choi, and

- K.-S. Yoon, Skin anti-aging effect of *Forsythia viridissima* L. extract, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**(6), 444 (2006).
15. J. N. Lee, J. H. Park, S. W. Kim, Y. K. Yoo, G. T. Lee, and K. K. Lee, A study on the whitening effect of the oriental medicinal herb *Forsythia suspensa* fruit as a cosmetic ingredient, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **33**(2), 79 (2007).
 16. M. J. Kim, K. R. Im, and K.-S. Yoon, Anti-inflammatory effects of YeongyoSeungma-tang, *J. Ethnopharmacol.*, **126**(3), 377 (2009).
 17. M. J. Kim, K. R. Im, and K.-S. Yoon, Anti-inflammatory effects of prescription extracts containing *Forsythia viridissima* L., *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**(4), 277 (2009).
 18. G. B. Jang, 1320, KyungAc's Complete Book, (in Chinese) (1637).
 19. D. Y. Hwang, Bangyakhappyeon, Yeogang Publish, Seoul (2007).
 20. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 21. T. Noro, O. Yasushi, M. Toshio, U. Akira, and S. Fukushima, Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984 (1983).
 22. J. Baynes and V. Monnier, Progress in Clinical and Biological Research: The maillard reaction in aging, diabetes, and nutrition, ed. Alan R. Liss, **304**, 277, Elsevier Inc., New York, USA. (1989).
 23. J. Vinson and T. B. Howard, Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients, *J. Nutr. Biochem.*, **7**, 659 (1996).
 24. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
 25. M. Oka, M. Ichihashi, and A. K. Chakraborty, Enhanced expression of protein kinase C subspecies in melanogenic compartments in B16 melanoma cells by UVB or MSH, *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 377 (1996).
 26. A. R. Hipkiss, C. Brownson, and M. J. Carrier, Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups, *Mech. Aging Devel.*, **122**, 1431 (2001).
 27. J. H. Chun, S. W. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Decreased extracellular signal regulated kinase and increased stress activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 177 (2000).
 28. J. Y. Seo, G. E. Hrie, and J. H. Chung, 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 (2001).
 29. D. Harman, Free radical theory of aging: nutritional implications, *AGE.*, **1**, 143 (1978).
 30. B. P. Yu, Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction, *Free Radic. Biol. Med.*, **21**, 651 (1996).
 31. B. Y. Sung and H. Y. Chung, Significances of molecular inflammation and energy metabolism during aging, *J. Cancer Prev.*, **10**, 6 (2005).
 32. J.-Y. Hwang, T.-S. Park, D.-H Kim, E.-Y. Hwang, J.-N. Lee, J. Y. Lee, G.-T. Lee, K. K. Lee, and J.-H. Son, Anti-wrinkle compounds isolated from the seeds of *Arctium lappa* L., *J. Life Sci.*, **22**, 1092 (2012).