



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Skin-soothing Effects of *Oenothera biennis* Flower Extract

Yeji Im, Kyung-Baeg Roh, Jiyoung You, Suwon Jeon, Eunae Cho, Hong Bae Kim, Deokhoon Park, Eunsun Jung*
Life Science Institute, Biospectrum, Yongin-si, Gyeonggi-do, Korea

*Corresponding author: Eunsun Jung, Life Science Institute, Biospectrum, A-1805, U-TOWER, 767, Sinsu-ro, Suji-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 16827, Korea
Tel.: +82 70 5117 0029
Fax: +82 31 698 3123
Email: bioso@biospectrum.com

Received March 6, 2024
Revised May 28, 2024
Accepted May 31, 2024
Published June 30, 2024



Abstract

Purpose: The current study aimed to assess the use of *Oenothera biennis* flower extract (OBFE) as a cosmetic ingredient exhibiting potential skin-soothing and anti-inflammatory activities. **Methods:** *O. biennis* flowers were extracted with 70% ethanol and used in experiments to confirm skin-soothing efficacy. Several criteria related to skin soothing, such as antioxidant activity, barrier enhancement, moisturization, and sebum secretion control, and anti-inflammatory effects, were evaluated. Antioxidant activity was determined via the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging test. Skin barrier enhancement was assessed by studying the mRNA expression of filaggrin (*FLG*), a key skin barrier component, through quantitative real-time PCR. Moisturizing efficacy was evaluated by analyzing hyaluronic acid (HA) expression through ELISA. Furthermore, the expression levels of the inflammatory agents nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) were investigated in addition to checking the inhibitory effect on sebum production to confirm the anti-inflammatory effects. **Results:** Antioxidant activity was confirmed by DPPH radical scavenging ability, and OBFE demonstrated efficacy equivalent to that of L-ascorbic acid, positive control. Furthermore, OBFE recovered the *Staphylococcus aureus*-induced downregulation of *FLG* expression. Moreover, OBFE significantly improved the production of HA, surpassing the beneficial effect of the positive control, retinoic acid. OBFE also exhibited significant reduction in LPS-induced production of NO and PGE₂ and effectively inhibited palmitic acid-induced sebum production in sebocytes. **Conclusion:** These findings imply that OBFE is a potential cosmetic ingredient that can be used to soothe sensitive skin as it exhibits antioxidant, skin barrier strengthening, moisturizing, anti-inflammatory, and sebum-control effects.

Keywords: *Oenothera biennis*, Skin soothing, Skin barrier, Moisturization, Anti-inflammatory

Introduction

최근 자외선, 미세먼지, 공해, 기후와 같은 다양한 환경적 요인으로 인해 외부 환경과 직접적으로 상호작용하는 피부는 손상에 더욱 취약해지게 된다(Yoon *et al.*, 2013a). 이와 같은 환경에서 민감성 피부는 외부 자극물질이나 내부 원인에 대해 정상 피부보다 더 민감하게 반응하며, 이로 인해 자극에 민감하게 반응하거나 피부염이 쉽게 발생하게 된다. 주로 가려움증, 홍반, 여드름, 통증 등을 겪게 된다. 이러한 증상을 조절하는 것이 민감성 피부를 '진정' 시키고 치료에 있어 주요한 타겟이다. 민감성 피부에서는 장벽기능 손상 같은 원인이 주요하게 작용하며 이는 장벽 강화 등을 통해 개선될 수 있다. 피부의 표피는 각질층, 투명층, 과립층, 유극층, 기저층으로 나뉘는데 피부장벽은 피부의

맨 바깥층에 형성되어 있다. 각질층에서 filaggrin, transglutaminase, keratin, loricrin 등을 포함하는 표피 장벽 단백질과 세포간 단백질과의 교차 결합으로 불침투성 장벽을 형성한다(Candi *et al.*, 2005). 이러한 장벽은 외부 자극으로부터 피부를 보호하고 수분을 유지할 수 있게 해준다. 피부 장벽에 주요인자인 filaggrin은 발현이 감소하면 천연 보습인자(natural moisturizing factor, NMF)의 감소와 각질층의 지질조성 변화가 나타나 피부 각질층의 손상을 일으킨다(Rawlings & Harding, 2004; Sandilands *et al.*, 2009).

또한 공생 미생물 군집(commensal microbiota)은 피부에서 발생하는 필수 생리적 과정에 참여하여 피부장벽 기능을 유지하는데 필수적이다(Belkaid & Segre, 2014). 그러나 다양한 외적, 내적 요인에 지속적으로 노출되면 이러한 균형 체제에 영향을 미쳐 병태생리학적

문제를 일으키고 감염, 알레르기 질환, 자가면역 질환 등의 염증성 피부질환을 유발할 수 있다(Harris-Tryon & Grice, 2022). 피부의 공생 미생물인 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)은 면역조절인자, 세포독소(cytotoxin), 단백질분해효소(proteases), 지질분해효소(lipases) 등 많은 독성 인자(virulence factors)를 생성한다(Oogai *et al.*, 2011). 황색 포도상구균의 단백질분해효소는 장벽 단백질인 filaggrin (FLG)과 desmoglein-1 (DSG-1)을 분해함으로써 피부장벽 붕괴에 영향을 준다(Williams *et al.*, 2017).

피부 건조는 각질 세포의 응집력을 저하시켜 장벽이 무너지게 되는데 보습을 통해 건강한 상태의 각질층을 유지시켜 준다. 보습 인자로 알려진 히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)의 주성분이며 수산화기가 많기 때문에 보습 작용의 역할을 한다. 또한 염증 반응에 관여한다고 알려져 있다. 고분자 HA는 항염증 및 면역 억제 특성을 가지고 있어 피부에 손상이 일어났을 때 활성화된다(Liang *et al.*, 2016). 이는 염증 세포의 활성화를 조절하고 조직 복구를 조절함으로써 손상에 대한 선천적 면역반응을 촉진한다. 민감성 피부를 극복하기 위해 보다 안전하고 진정 효과가 높은 천연물들에 대한 연구가 꾸준히 되고 있다(Ferreira *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2021; Kim & Yoon, 2013). 본 연구에서는 피부 진정 및 보습 효능이 있는 기능성 소재로서의 가능성을 확인하기 위해 달맞이꽃 추출물 효능을 확인하고자 하였다.

달맞이꽃(*Oenothera biennis*)은 바늘꽃과(Onagraceae)에 속하는 두해살이풀로, 현재 멕시코에서 플로리다에 이르는 북미지역의 고유종으로(Steckel *et al.*, 2019), 북아메리카의 동부와 중부, 그리고 아시아 전역에 걸쳐 분포하고 있으며, 다양한 생리활성에 대한 연구가 이루어져 왔다(Timoszuk *et al.*, 2018). 지상부에는 플라보노이드 배당체, 페놀산, 탄닌 등의 화합물이 풍부하게 함유되어 있으며, 씨앗에는 리놀산, 리놀렌산, 올레산, 팔미트산, 스테아르산과 같은 지방유형을 높은 농도로 포함하고 있다. 이러한 화합물들은 달맞이꽃이 지닌 다양한 생물학적 활동과 의약적 특성을 부여하고 있는 것으로 파악되고 있다(Timoszuk *et al.*, 2018). 최근 연구에서는 달맞이꽃의 지상부와 씨앗에서 추출한 화합물이 항산화, 자유 라디칼 소거능, 항당뇨, 및 항암 효능 등 다양한 약리학적 특성을 가지고 있음을 확인하였다(Singh *et al.*, 2017; Wettasinghe *et al.*, 1999; Zaugg *et al.*, 2006). 현재 여러 연구들을 통해서 달맞이꽃의 다양한 생리활성 효능이 알려져 있으나, 달맞이꽃 추출물(*Oenothera biennis* flower extract, OBFE)의 피부 진정에 대한 효능 연구는 미비한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 달맞이꽃의 피부 진정 효능을 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 통한 항산화 효능, FLG 유전자 발현량 확인을 통한 피부장벽 강화 효능을 확인하였으며, HA 합성능평가로 피부 보습 효능과 LPS로 인해 유발된 염증인자를 억제하는 항염 효능 및 피지세포주에서 피지분비 조절 효능을 평가하였다.

Methods

1. 달맞이꽃 추출물의 제조

본 실험에 사용한 달맞이꽃 추출물은 달맞이꽃(지리산처럼영농조합법인, Korea)의 꽃을 20°C–35°C에서 건조시킨 후 크기가 1 mm 이하가 되도록 분쇄하였다. 70% 에탄올을 추출용매로 사용하여 48 h 초음파 추출하였다. 수득한 추출물을 여과지(Advantec, Japan)를 사용하여 감압 필터 후 감압 농축하여 달맞이꽃 추출물(OBFE)을 제조하고 실험에 사용하였다.

2. 세포주 및 세포배양

대식세포주 RAW264,7 (KCLB, Korea)과 각질세포주 HaCaT은 10% FBS (Welgene, Korea)와 1% Penicillin/Streptomycin (Welgene)이 첨가된 DMEM (Welgene)에 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 인간 피지 세포(Celprogen, USA)는 Human Sebocyte Complete Media with Serum (Celprogen)에 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

3. DPPH 라디칼 소거능 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma-Aldrich, USA)는 화학적으로 안정화된 자유 라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 515–520 nm 부근에서 최대 흡광도를 가진다. 보라색의 DPPH가 항산화 활성이 있는 물질과 반응하면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되고 노란색으로 색이 변하는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. OBFE를 메탄올에 1, 10, 50, 100 µg/mL 녹인다. OBFE와 200 µM DPPH를 동량으로 혼합한다. 상온에서 30 min 간 반응시킨다. 96 well plate에 옮겨 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich)를 사용하였다. DPPH 라디칼 제거 활성은 아래의 식을 통해 계산하였다.

$\% \text{ Inhibition} = (1 - \text{Absorbance of test material} / \text{Absorbance of control}) \times 100$

4. *S. aureus* 배양액의 제조

Staphylococcus aureus ATCC 12600^r (American Type Culture Collection ATCC, USA)는 Brain heart infusion (BHI; Difco, USA) 배지에 접종 후 37°C, 24 h 동안 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 이후 1% 종배양액을 본 배양 액체 배지에 접종하였고, 37°C, 24 h 배양한 배양액을 5,000×g에서 10 min 동안 원심 분리하여 상등액만을 회수하였고, 이를 0.2 µm syringe filter (Millipore, USA)로 여과하여 *S. aureus* 배양액을 제조하였다

5. FLG mRNA 발현 측정

HaCaT은 6 well plate에 배양한 후 90% confluency가 되면 1% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교체 후 24 h 동안 배양하였다. 1%

Table 1. Primer sequence for PCR

Gene	Primer sequence (5' - 3')	Product size (bp)
FLG	Forward GCTGAAGGAAGCTCTGGAAAAGG	103
	Reverse GTTGTGGTCTATATCCAAGTGATC	
GAPDH	Forward TGCACCACCAACTGCTTAGC	87
	Reverse TGCACCACCAACTGCTTAGC	

FBS가 포함된 DMEM 배지로 다시 교체한 후 OBFE를 1 h 동안 전처리 하였고, 이후 *S. aureus* 배양액을 처리하여 24 h, 48 h 동안 각각 배양하였다. 각각의 시간별로 배양한 세포를 회수하여 TRIzol™ Reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후, AccuPower® CycleScript™ RT PreMix & Master Mix (Bioneer, Korea)를 이용하여 complimentary DNA (cDNA)를 합성하였다. 합성한 cDNA로 AccuPower® 2×GreenStar™ qPCR Master Mix (Bioneer, Korea)를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 수행하여 FLG의 mRNA 발현 정도를 측정하였다. qRT-PCR에 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다(Table 1).

6. HA 합성능 평가

HA 측정용 HaCaT을 96 well plate에 1×10^4 cells/mL가 되도록 희석하여 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하여 사용하였다. OBFE를 10, 50, 100 µg/mL 농도로 24 h 처리하고 세포 배양 상등액을 회수하였다. Hyaluronan DuoSet ELISA (R&D Systems, USA) 제품을 이용하여 450, 570 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다. OD₄₅₀ 값을 OD₅₇₀ 값으로 보정한 후, standard hyaluronan으로 얻은 standard curve를 기준으로 HA 생성량을 계산하였다.

7. Nitric oxide와 Prostaglandin E₂ 생성 억제능 측정

Nitric oxide (NO)생성량 측정은 RAW264.7를 24 well plate에 2×10^5 cells/mL가 되도록 희석하여 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하여 사용하였다. 염증반응을 유도하는 lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich)를 처리하기 1 h 전 OBFE를 10, 50, 100 µg/mL 농도로 전처리하였다. 시료를 1 h 전 처리 후 LPS를 100 ng/mL 농도로 24 h 처리 후에 염증성 매개인자인 NO수치를 확인하기 위해 세포 배양 상등액을 회수하였다. 5% phosphoric acid (DUKSAN, Korea)에 녹인 1% (w/v) sulfanilamide (Sigma-Aldrich)와 중류수에 녹인 0.1% (w/v) N-(1-Naphthyl) ethylenedimine dihydrochloride (Sigma-Aldrich)를 1:1로 혼합하여 Griess reagent를 제조하였다. Griess reagent와 세포배양 상등액을 동량으로 반응시켜 생성된 NO의 양을 540 nm에서 흡광도 값을 측정함으로써 확인하였다. NO 농도는 sodium nitrite (Sigma-Aldrich)를 사용하여 얻은 검량선을 기준으로 정량하였다. 동일한 세포 배양 상

액에서 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 발현량을 확인하기 위해 ELISA로 정량하였다. Prostaglandin E₂ Parameter Assay Kit (R&D Systems, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 피지 생성 억제능 측정

인간 피지 세포(Celprogen, USA)를 Human Sebocyte Complete Media with Serum (Celprogen)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하여 사용하였다. 100 µM palmitic acid (Sigma-Aldrich)으로 피지 생성을 유도하였으며, OBFE는 10, 50, 100 µg/mL 농도로 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 4% 포르말데하이드로 세포 고정 후, Nile red (Sigma-Aldrich) 10 µg/mL를 1:100으로 희석하여 15 min 간 염색을 진행하였다. Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, USA)로 핵을 염색하고 생성된 피지를 형광현미경(EVOS® FL; Thermo Fisher Scientific)으로 확인하였으며 분석은 Image J software (National Institutes of Health, USA)를 이용하였다. 생성된 지질 droplet의 Fluorescence intensity 값을 측정하여 세포수로 나누어 피지 생성량을 구하였다.

9. 통계 처리

실험결과는 3회 반복에 대한 평균±표준편차(mean±standard deviation, M±SD)로 표시하여 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Statview software (Abacus Concepts, USA)를 이용하여 Student's *t*-test를 실시하여 유의성 여부를 판정하였다(**p*<0.05).

Results and Discussion

1. 달맞이꽃 추출물의 항산화 효능

활성산소는 생물체 내에서 생산되는 산소의 화합물로 생체 조직을 공격하고 세포를 손상시키는 산화력이 강한 산소이다. 피부에 자극이 발생하면 피부에서 활성산소의 양이 증가하게 되는데 활성산소는 다양한 피부 질환을 발생시키며 피부세포는 손상을 받게 된다(Ryan & Goldsmith, 1996). 활성산소의 과잉은 염증이 발생하는 순간에 피부의 회복을 방해한다(Wagener *et al.*, 2013). 항산화 작용을 통해 활성산소의 농도를 낮추주면서 1차적으로 자극을 완화시키고 염증 반응 완화에 도움을 줄 수 있다. 피부 진정에 가장 먼저 관여하는 항산화 효능을 확인하기 위하여 OBFE의 DPPH 라디칼 소거능을 측정

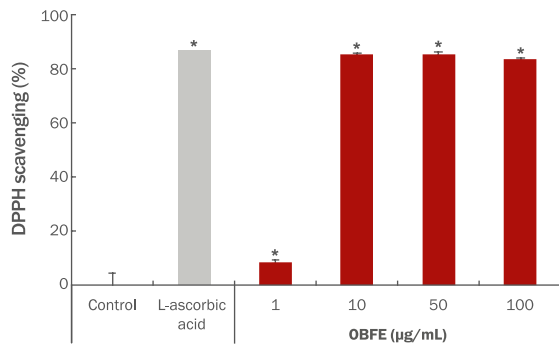


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of OBFE. L-ascorbic acid was used as the positive control. Values are denoted as M±SD of three measurements. **p*<0.05 vs. control.

하였다(Figure 1). 실험결과, OBFE 10 µg/mL 처리 조건에서 85.3 ± 0.47% DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, 모든 처리 조건에서 유의한 차이가 있음을 확인하였다(*p*<0.05). 강력한 항산화 효과를 가지고 있다고 알려진 양성 대조군 L-ascorbic acid (86.6 ± 0.21%)만큼 높은 DPPH 라디칼 소거능을 가지므로 우수한 항산화 효과를 가지는 것으로 판단할 수 있다. 이러한 결과는 OBFE가 활성산소를 낮추어 외부자극으로 인해 발생하는 활성 산소의 양을 낮추어 피부 진정에 도움을 줄 것으로 사료된다.

2. 달맞이꽃 추출물의 피부장벽 강화 효능

황색 포도상구균의 독성인자인 단백질분해효소는 장벽 단백질인 FLG과 DSG-1을 분해함으로써 피부장벽 붕괴와 연계된다고 보고되고 있다(Williams *et al.*, 2017). 표피 장벽의 핵심적인 구조단백질인 FLG의 결핍은 각질세포의 구조를 변경하고 경피적 감각을 촉진하여 피부염증을 유발하게 된다(Oyoshi *et al.*, 2009). 피부의 공생 미생물이자 많은 독성인자를 생성하는 황색포도상구균이 분비하는 독성인자가 피부장벽의 구조단백질인 FLG의 발현에 직접적인 영향을 미치는지를 확인하였고, 이 과정에서 OBFE의 효능에 대해서 확인하였다. 각질형성세포의 분화 과정에서 OBFE를 처리하였고, 황색포도상구균 배양액(*S. aureus*-cultured media, SCM)의 처리 유무에 따라 FLG의 mRNA 발현을 각각 비교하였다. 황색포도상구균의 독성인자를 단독으로 처리한 각질형성세포는 FLG의 mRNA 발현이 유의하게 억제되었고(*p*<0.01), OBFE를 함께 처리한 조건에서는 FLG의 발현 억제가 유의하게 회복되는 결과를 나타내었다(*p*<0.05)(Figure 2). 그리고 OBFE를 단독으로 처리한 조건에서는 무처리군과 비교하여 FLG의 발현이 촉진되는 결과를 나타내었으며(Figure 2), 유의한 차이가 있음을 확인하였다(*p*<0.05). 이러한 결과는 OBFE가 FLG의 발현을 효과적으로 향상시키는 능력을 가지고 있음을 시사하므로, 피부 공생미생물 군집의 불균형에 의한 피부장벽 붕괴로 인해 발생하는 피부 건조 및 염증성 피부질환을 개선하는 소재로 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

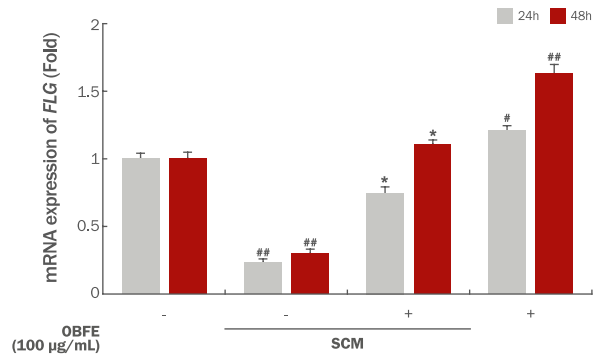


Figure 2. Effect of OBFE on FLG mRNA expression suppressed by *S. aureus*-cultured media.

HaCaT cells were harvested, and FLG mRNA expression was analyzed through quantitative real-time PCR. Values are denoted as M±SD of three measurements. #*p*<0.05 vs. SCM-untreated control.; ##*p*<0.01 vs. SCM-untreated control.; **p*<0.05 vs. SCM-treated control.

3. 피부 각질 형성세포에서 달맞이꽃 추출물의 보습 효능

건조한 피부는 염증이 발생하기 쉬우므로 보습을 통해 피부를 보호하고 피부 상태를 개선할 수 있다. 보습 인자로 알려진 HA는 친수성 물질로 피부에서 보습 작용을 하고(Al-Khateeb & Prpic, 2019), 전염증성 사이토카인의 양을 감소시킨다고 알려져 있다(Neuman *et al.*, 2011). 이러한 HA가 HaCaT 각질 형성세포에서 OBFE를 24 h 동안 처리하여 조절되는 지 확인하였다(Figure 3). 양성대조군은 HA를 증가시키는 것으로 알려진 retinoic acid를 사용하였다(Choi *et al.*, 2022). OBFE를 처리하였을 때 HA 생성량을 측정된 결과 50, 100 µg/mL 농도에서 세포독성이 나타났으며 10 µg/mL 농도에서 무처리군에 대비하여 HA의 생성량이 83.8 ± 4.1% 증가하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 있음을 확인하였다(*p*<0.05). 양성대조군인 retinoic acid를 처리했을 때(25.3 ± 2.8%) 보다 높은 HA 생성량을 나타내어 OBFE가 우수한 보습 효능을 가지는 것으로 사료된다.

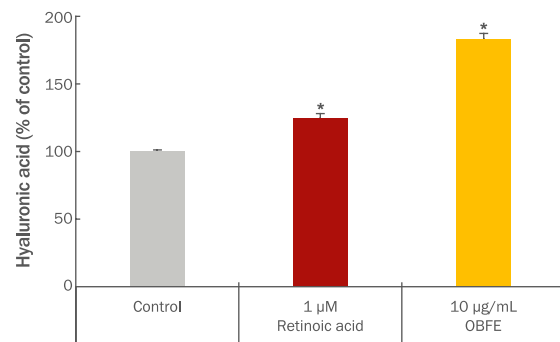


Figure 3. Production of HA by OBFE in HaCaT cells.

HA was assessed in the HaCaT supernatant through ELISA. Retinoic acid was used as the positive control. Values represent % HA (M±SD) of three replicates. **p*<0.05 vs. control.

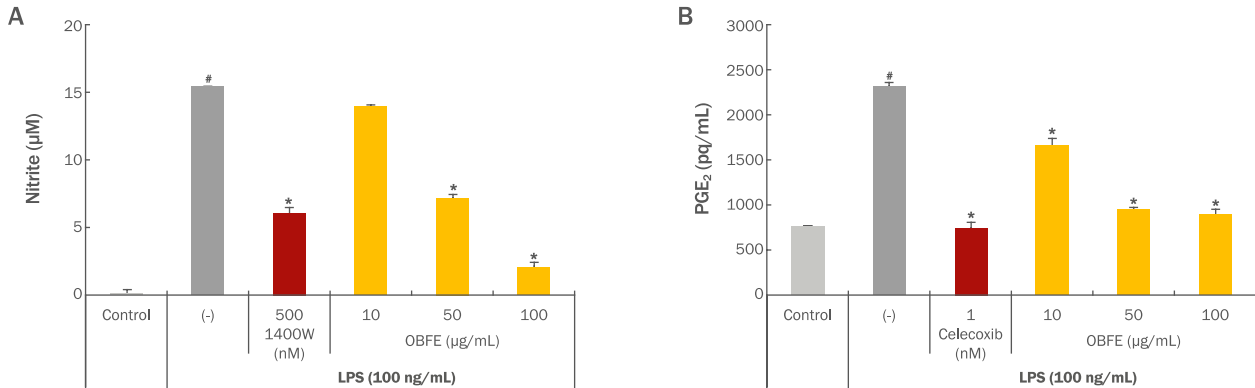


Figure 4. Inhibition of NO (A) and PGE₂ (B) production by OBFE in RAW264.7 cells.

(A) LPS was used as a stimulant to enhance NO production. 1400W was used as the positive control. (B) LPS was employed as a stimulant to enhance PGE₂ production. Celecoxib was utilized as the positive control. Values are denoted as M±SD of three measurements. #*p*<0.05 vs. LPS-untreated control; **p*<0.05 vs. LPS-treated control.

4. LPS로 자극된 대식세포에서 달맞이꽃 추출물의 염증 반응 억제 효능

민감한 피부는 외부 자극에 취약하고 여드름이나 통증 등 염증 반응이 쉽게 일어난다. 염증 반응을 완화시킬 수 있는 효능을 보기 위해 염증 매개체의 생성을 촉진하여 염증을 악화시키는 NO (Lee *et al.*, 2014)와 혈관 확장, 부종 및 발열 같은 다양한 생리적인 체내 변화에 관여하는 PGE₂ (Yun *et al.*, 2008) 억제능을 확인하였다. RAW264.7 대식세포에 OBFE (10, 50, 100 µg/mL)를 1 h 동안 전처리 한 후 LPS (100 ng/mL)로 24 h 동안 자극하여 NO와 PGE₂의 생성량을 확인하였다. NO 생성량을 측정된 결과(Figure 4A), OBFE를 100 µg/mL 처리한 조건에서 86.9±1.64%의 NO 생성 억제능을 나타내었다. 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 경향을 나타내었으며, 50 µg/mL 처리한 조건부터 유의적으로(*p*<0.05) NO 생성 억제 효능을 나타내었다. OBFE는 양성대조군으로 사용한 inducible nitric oxide (iNOS) inhibitor인 1400W 500 nM (60.8±2.46%)과 비교하여 높은 NO 생성 억제능을 보였다. OBFE의 PGE₂ 생성 억제능을 확인한 결과(Figure 4B), 100 µg/mL 처리 조건에서 61±2.33%의 PGE₂ 생성 억제능을 나타내었다. 농도 의존적으로 PGE₂ 생성량을 억제하는 경향을 보였으며, 모든 처리 조건에서 유의한 차이가 있음을 확인하였다(*p*<0.05). Cyclooxygenase-2 (COX-2) 표적 저해제로 쓰이는 양성대조군 celecoxib 1nM (67.4±2.17%)과 비교하여 비슷한 효능을 보였다. OBFE는 NO, PGE₂ 생성량을 억제하여 우수한 항염 효능을 나타내었으며, 이로 인해 자극에 의한 염증반응을 완화시켜 피부 진정에 도움을 줄 것으로 기대된다.

5. 피지세포에서 달맞이꽃 추출물의 피지 생성 억제 효능

여드름은 피부에 생기는 염증성 반응 중 하나이다. 과도한 피지 생성은 염증 반응을 촉진하고 여드름 발생에 기여한다(Bergler-Czop & Brzezinska, 2013). 따라서 과도하게 분비되는 피지를 줄이면 피부염을 개선하고 완화하는 것에 도움을 줄 수 있다. Palmitic acid

는 대표적인 포화지방산으로 피지세포에서 지질 생성을 높이고, 염증 반응을 일으킨다고 알려져 있다(Choi *et al.*, 2019). 그러므로, 본 연구에서는 sebocyte에서 피지생성을 촉진하기 위한 자극원으로 palmitic acid를 사용하였다. Sebocyte에 palmitic acid (100 µM)와

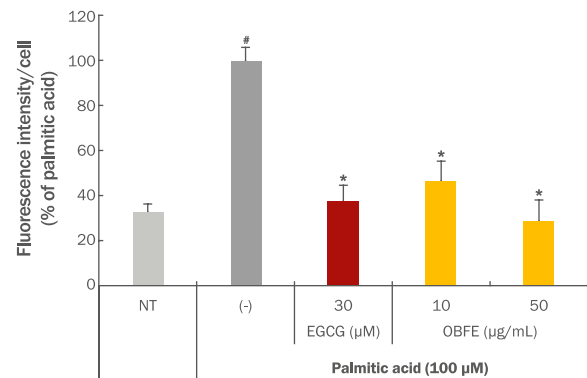
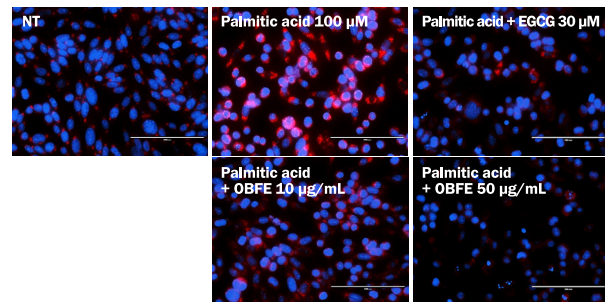


Figure 5. Inhibition of sebum production by OBFE in sebocytes.

Palmitic acid was used to boost sebum production. EGCG was employed as the positive control. The fluorescence intensity value of the developed lipid droplet was measured and divided by the number of cells to determine the amount of sebum production. Values are denoted as M±SD of three measurements. NT, no treatment. #*p*<0.05 vs. palmitic acid-untreated control; **p*<0.05 vs. palmitic acid-treated control.

OBFE (10, 50, 100 µg/mL)를 48 h 동안 처리하여 피지 생성 정도를 확인하였다(Figure 5). 양성대조군은 sebocyte에서 피지생성을 억제한다고 알려진 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)를 사용하였다(Yoon *et al.*, 2013). 피지 생성량을 측정한 결과, 100 µg/mL 농도에서 세포독성이 나타났으며 OBFE 10, 50 µg/mL 처리 조건에서 피지 생성 억제능은 각각 $53.8 \pm 8.77\%$, $71.3 \pm 9.06\%$ 를 나타내었다(Figure 5). 농도 의존적으로 피지 생성을 억제하는 경향을 보였으며, 모든 처리 조건에서 유의한 차이가 있음을 확인하였다($p < 0.05$). OBFE는 양성 대조군인 30 µM EGCG ($62.4 \pm 6.68\%$)와 유사하게 피지 생성 억제능을 보였다. OBFE는 palmitic acid에 의해 증가된 피지 생성량을 감소시키므로 피지에 의해 생기는 염증을 완화하여 염증성 피부를 진정시키는 소재로 활용될 것으로 기대된다.

Conclusion

본 연구에는 OBFE를 활용하여 다양한 환경적 요인으로 인해 민감해진 피부를 진정시킬 수 있는 화장품 소재로서의 가능성을 제안하고자, 항산화, 피부장벽강화, 보습, 항염, 및 피지분비 조절 효능을 확인하였다. 항산화 효능 평가 결과 OBFE는 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, 피부 장벽과 보습 관련 인자인 *FLG* 발현과 HA 생성이 높아지는 결과를 통해 OBFE가 항산화, 피부장벽강화, 보습에 효과가 있음을 확인하였다. 또한, 항염 효능 평가에서 염증매개인자인 NO, PGE₂를 양성 대조군과 유사하게 감소시켰으며, 염증에 관여하는 피지 생성량도 감소시켜 항염 효능이 뛰어난 것을 확인하였다.

본 연구결과들을 종합해 볼 때, OBFE는 항산화, 피부장벽강화, 보습 및 항염 효능을 통해 다양한 요인들로 발생되는 피부자극을 진정 시킴으로써, 민감한 피부에 효과적으로 적용할 수 있는 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다. 본 연구는 *in vitro* 효능만을 확인한 연구 결과로 추가적인 임상 유효성 평가를 통해 피부진정에 직접적인 효과가 있는지에 대한 연구를 진행할 계획이다. 이를 통해 OBFE를 다양한 자극으로 인해 손상된 피부를 진정시켜 줄 수 있는 화장품 소재로서 활용될 수 있기를 기대한다.

Author's contribution

YI performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. KBR performed filaggrin PCR experiments. JY performed sebocytes experiments. SJ performed HA, DPPH assay experiments. EC and HBK developed the process for extract manufacturing. DP and EJ oversaw the project, and contributed to all aspects of analysis and experimental design. YI wrote the manuscript with assistance from KBR.

Author details

Yeji Im (Research Scientist)/Kyung-Baeg Roh (Senior Research Scientist)/Jiyoung You (Junior Research Scientist)/Suwon Jeon (Research Scientist)/Eunae Cho (Director)/Hong Bae Kim (Director)/Deokhoon Park (CEO)/Eunsun Jung (Director), Life Science Institute, Biospectrum, A-1805, U-TOWER, 767, Sinsu-ro, Suji-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 16827, Korea.

References

- Al-Khateeb R, Prpic J. Hyaluronic acid: The reason for its variety of physiological and biochemical functional properties. *Applied Clinical Research, Clinical Trials and Regulatory Affairs*, 6: 112-159, 2019.
- Belkaid Y, Segre JA. Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science*, 346: 954-959, 2014.
- Bergler-Czop B, Brzezińska-Wcislo L. Dermatological problems of the puberty. *Advances in Dermatology and Allergology*, 30: 178-187, 2013.
- Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 328-340, 2005.
- Choi CW, Kim Y, Kim JE, Seo EY, Zouboulis CC, Kang JS, Youn SW, Chung JH. Enhancement of lipid content and inflammatory cytokine secretion in SZ95 sebocytes by palmitic acid suggests a potential link between free fatty acids and acne aggravation. *Experimental Dermatology*, 28: 207-210, 2019.
- Choi H, Lee Y, Park W, Kin BJ, Lee CS. Retinoic acid induces hyaluronic acid production through the klotho-mediated EGFR signaling pathway in human epidermal keratinocytes. *Archives*, 74: 91-96, 2022.
- Ferreira MS, Resende DISP, Sousa Lobo JM, Sousa E, Almeida IF. Marine ingredients for sensitive skin: market overview. *Marine Drugs*, 19: 164, 2021.
- Han JW, Nam BM, Kim SY, Park Y, Lee BS, Hwang JY. Skin soothing effect of three herbs from the Namwon-Mt.Jiri regions. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 19: 595-607, 2021.
- Harris-Tryon TA, Grice EA. Microbiota and maintenance of skin barrier function. *Science*, 376: 940-945, 2022.

- Kim HN, Yoon Y. Skin soothing effects of the compositions containing extracts of fermented bird's nest and *Centella asiatica*. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 11: 721-728, 2013.
- Lee HJ, Sim BY, Bak JW, Kim DH. Effect of Gami-sopungsan on inflammation and DNCB-induced dermatitis in NC/Nga in mice. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, 28: 146-153, 2014.
- Liang J, Jiang D, Noble P.W. Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97: 186-203, 2016.
- Neuman MG, Nanau RM, Oruña L, Coto G. *In vitro* anti-inflammatory effects of hyaluronic acid in ethanol-induced damage in skin cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 14: 425-437, 2011.
- Oogai Y, Matsuo M, Hashimoto M, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H. Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 8097-8105, 2011.
- Oyoshi MK, Murphy GF, Geha RS. Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124: 485-493, 2009.
- Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy*, 17: 43-48, 2004.
- Ryan AS, Goldsmith LA. Nutrition and the skin. *Clinics in Dermatology*, 14: 389-406, 1996.
- Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WHI. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of Cell Science*, 122: 1285-1294, 2009.
- Singh S, Dubey V, Singh D.K, Fatima K, Ahmad A, Luqman S. Antiproliferative and antimicrobial efficacy of the compounds isolated from the roots of *Oenothera biennis* L. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69: 1230-1243, 2017.
- Steckel LE, Sosnoskie LM, Steckel SJ. Common evening-primrose (*Oenothera biennis* L.). *Weed Technology*, 33: 757-760, 2019.
- Timoszuk M, Bielawska K, Skrzydlewska E. Evening primrose (*Oenothera biennis*) biological activity dependent on chemical composition. *Antioxidants*, 7: 108, 2018.
- Wagener FA, Carels CE, Lundvig DM. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 9126-9167, 2013.
- Wettasinghe M, Shahidi F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1801-1812, 1999.
- Williams MR, Nakatsuji T, Sanford JA, Vrbanac AF, Gallo RL. *Staphylococcus aureus* induces increased serine protease activity in keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 137: 377-384, 2017.
- Yoon JY, Kwon HH, Min SU, Thiboutot DH, Suh DH, Frechet M, Suh DH. Epigallocatechin-3-gallate improves acne in humans by modulating intracellular molecular targets and inhibiting *P. acnes*. *Journal of Investigative Dermatology*, 133: 429-440, 2013b.
- Yoon Y, Bae S, An S, Choe YB, Ahn KJ, An IS. Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 11: 417-426, 2013a.
- Yun KJ, Kim JY, Kim JB, Lee KW, Jeong SY, Park HJ, Jung HJ, Cho YW, Yun KJ, Lee KT. Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 2647 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *International Immunopharmacology*, 8: 431-441, 2008.
- Zaugg J, Potterat O, Plescher A, Honermeier B, Hamburger M. Quantitative analysis of anti-inflammatory and radical scavenging triterpenoid esters in evening primrose seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 6623-6628, 2006.

국문초록

달맞이꽃 추출물의 피부 진정에 관한 연구

임예지, 노경백, 유지영, 전수원, 조은애, 김홍배, 박덕훈, 정은선*
바이오스펙트럼 생명과학연구소, 경기도 용인시, 한국

목적: 본 연구는 달맞이꽃 추출물(*Oenothera biennis* flower extract, OBFE)의 피부 진정 및 항염 효능을 가진 화장품 원료로서의 가능성을 확인하기 위해 수행되었다. **방법:** 달맞이꽃의 꽃을 70% 에탄올로 추출하였다. 피부 진정에 영향을 줄 수 있는 항산화, 장벽강화, 보습, 피지분비 조절 및 항염 효능을 평가하였다. 항산화 효능을 보기 위하여 DPPH 활성 소거능을 측정하였다. 피부 장벽 관련 인자인 filaggrin (*FLG*)을 실시간중합효소 연쇄반응을 이용하여 mRNA의 발현량을 관찰하여 피부장벽 강화 효능을 확인하였다. 보습 효능은 hyaluronic acid (HA) 발현량을 ELISA로 확인하였다. 또한 염증성 매개인자인 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 발현량을 확인하고, 피지 생성 억제능을 확인하여 항염 관련 효능을 확인하였다. **결과:** 항산화 효능은 DPPH 활성 소거능으로 확인했으며 OBFE는 양성 대조군인 L-ascorbic acid 만큼 높은 효능을 보였다. 피부 장벽 관련 인자인 *FLG* 발현은 *S. aureus*에 의해 감소되었지만 OBFE가 회복시키는 결과를 보였다. 보습관련 인자인 HA의 생성량은 OBFE가 양성 대조군인 retinoic acid 보다 증가시켜 우수한 효능을 보였다. 염증 효능 관련하여 염증성 매개인자인 NO와 PGE₂의 생성 억제 효능 실험에서 양성대조군과 비슷한 억제 효능을 나타내었고, 피지생성도 억제하는 것을 확인하였다. **결론:** 이러한 결과는 OBFE가 항산화, 피부장벽 강화, 보습, 항염 및 피지조절 효과를 나타내어 민감한 피부를 진정시키는 화장품 소재로서 가능성을 가지고 있음을 시사한다.

핵심어: 달맞이꽃, 피부 진정, 피부장벽, 보습, 항염

참고문헌

- 김하나, 윤영민. 바다제비집과 병풀 복합발효추출물의 피부진정 효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 11: 721-728, 2013.
- 이해진, 심부용, 박지원, 김동희. 加味消風散이 염증 및 아토피피부염 동물병태에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*, 28: 146-153, 2014.
- 윤영민, 배승희, 안성관, 최용범, 안규중, 안인숙. 자외선(Ultraviolet)이 피부 및 피부세포 내 신호전달체계에 미치는 영향. *아시아뷰티화장품학술지*, 11: 417-426, 2013a.
- 한지원, 남보미, 김세울, 박유나, 이범석, 황지영. 남원·지리산권 허브 3 종의 피부 진정 효능에 관한 연구. *아시아뷰티화장품학술지*, 19: 595-607, 2021.

中文摘要

月见草提取物的舒缓肌肤研究

任禮智, 盧京伯, 劉指寧, 全水源, 趙恩愛, 金弘倍, 朴德勛, 鄭恩先*

百欧思特生命科学研究院, 京畿道龙仁市, 韩国

目的: 本研究旨在评估月见草花提取物(OBFE)作为化妆品成分的用途, 该成分具有潜在的皮肤舒缓和抗炎活性。

方法: 通过70%乙醇处理获得*O. biennis*花提取物, 并用于实验以确认皮肤舒缓功效。评估了与皮肤舒缓相关的几个标准, 例如抗氧化活性、屏障增强、保湿、皮脂分泌控制以及抗炎作用。抗氧化活性通过1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除试验来测定。通过定量实时PCR确认皮肤屏障关键成分丝聚蛋白(FLG)的mRNA表达来评估皮肤屏障增强效果。通过ELISA分析透明质酸(HA)的表达来评估保湿效果。此外, 除了检查对皮脂产生的抑制作用之外, 还研究了炎症因子一氧化氮(NO)和前列腺素E₂(PGE₂)的表达水平, 以确认抗炎作用。**结果:** 通过DPPH自由基清除能力证实了抗氧化活性, OBFE的功效与阳性对照L-抗坏血酸相当。此外, OBFE恢复了金黄色葡萄球菌诱导的FLG表达下调。此外, OBFE显着提高了HA的产量, 超过了阳性对照视黄酸的有益效果。OBFE还显着减少LPS诱导的NO和PGE₂的产生, 并有效抑制皮脂细胞中棕榈酸诱导的皮脂产生。**结论:** 这些发现表明OBFE是一种潜在的化妆品成分, 可用于舒缓敏感皮肤, 因为它具有抗氧化、增强皮肤屏障、保湿、抗炎和控制皮脂的作用。

关键词: 月见草, 舒缓肌肤, 保护皮肤屏障, 保湿, 抗炎

