

Asiaticoside의 입술 주름 개선 효과

서기석, 이진우, 최수영, 김상태

고신대학교 의과대학 피부과학교실

The Effect of Asiaticoside on the Improvement of Lip

Kee Suck Suh, Jin Woo Lee, Soo Young Choi, Sang Tae Kim

Department of Dermatology, Kosin University College of Medicine Busan, Korea

Abstract

Background : The aging of lip skin is influenced by genetic and environmental factors. The presence of lip wrinkles is known to increase with aging. Many treatment modalities for lip wrinkle reduction have been developed in the field of dermatology and the development of simple and easy treatment modality with less side effects is required.

Asiaticoside, a component isolated from *Centella asiatica*, also has shown improved wound healing effects, even in the infected wounds. It has been reported that wound and ulcer healing are enhanced via promoting fibroblast proliferation and collagen synthesis. The purpose of this study was to evaluate the effect of asiaticoside on the improvement of lip and perioral wrinkle in vitro and in vivo.

Material and Methods : Cultured fibroblast and 54 human volunteers were used for in vitro and in vivo studies respectively. Asiaticoside was administered to the fibroblast culture system and was also applied to the fine and coarse lip wrinkles of the human volunteers twice daily for 8 weeks. Numeric and morphologic changes and procollagen type I c-peptide(PICP) content were measured in fibroblasts with MTT assay method and PICP EIA assay respectively. Also the effect of asiaticoside on lip and peroral fine and coarse wrinkle lesions was examined by using an image analysis system with skin replica and subjective and objective assessment of wrinkle were evaluated.

Results :

1) In vitro study

(1) The number of cultured fibroblast was not increased in the 5, 10 and 20 μ g/ml asiaticoside treated group compared to the control group.

(2) Procollagen type I c-peptide of cultured fibroblast was increased in the 10, 20 μ g/ml asiaticoside treated group compared to the control group($p<0.05$).

2) In vivo study

(1) The change of wrinkle area was measured by using an image analysis system with skin replica. The study showed significant decrease at the wrinkle area in the 0.2% asiaticoside applied group($p<0.01$). Significant differences were identified between the 0.2% asiaticoside applied group and the control group in the study($p<0.01$). The wrinkle area at 4 and 8 weeks after the application showed significant decrease in the 0.2% asiaticoside applied group than in the control group($p<0.05$).

(2) In the subjective visual assessment by the investigator the 0.2% asiaticoside applied group showed improvement of the wrinkles on the lip ($p<0.01$). Significant differences were identified between the 0.2% asiaticoside applied group and the control group in the study($p<0.01$). At 8 weeks after the application, the 0.2% asiaticoside applied group showed significant improvement of wrinkles on the lip($P<0.05$).

(3) In the subjective visual assessment by the subjects themselves at 4 and 8 weeks after the application, the 0.2% asiaticoside applied group showed more self satisfaction than the control group.

Conclusion : In vitro asiaticoside induced collagen synthesis. In vivo the improvement of the wrinkles was identified in the asiaticoside applied group. It is suggested that asiaticoside may treat or reduce wrinkle on the lip.

Key Words : Asiaticoside, Wrinkle

교신저자 : 김 상 태
주소 : 602-702, 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신의대 복음병원 피부과학교실
TEL : 051-990-6145, FAX : 051-990-3041
E-mail : ksderm98@unitel.co.kr

고신대학교 의과대학 연구비 일부 지원 받았음.

서 론

입술 부위는 얼굴에서 구강 점막과 연결되어지는 한 부분으로 직접적으로 외계와 접촉하고 있다. 특

히 입술자체는 바깥으로 돌출되어 있는 모양을 하고 있기 때문에 시선을 끄는 부분이기도 하며 다양한 피부질환이 나타나는 부분이다. 입술 바깥 경계부분의 피부는 모낭이나 땀샘을 가지고 있지는 않으나 청소년기의 반수에서 피지선을 가지게 된다.^{1,3)} 입술의 상피는 얇으며 비각질화된 것이 특징이다. 구강 상피는 수분에 대한 투과성이 일반 상피보다 5배정도 증가된 것으로 나타나며 특유의 붉은색은 모세혈관과 구강 상피의 각질의 감소에 의해 나타나게 된다. 입술은 이러한 해부학적 조직학적 특징을 가지고 있기 때문에 미용적인 관심이 높은 부분 중 하나이다.^{1,2)}

입술과 입술주위 피부 기능의 저하는 결국 주름의 생성이라는 결과를 나타내게 된다.¹⁾ 일반적으로 피부 노화의 대표적인 증상인 주름은 피부의 내인성 노화, 광노화, 얼굴의 표정근의 만성적인 수축 및 이완 그리고 중력에 의해서 발생 되는데 입술은 점막 조직과 상피조직이 혼재되어 있고 침에 의한 습도변화와 주위 환경차이에 따른 온도 차이를 직접적으로 받게 되는 부위로 개개인의 차이가 큰 것도 사실이다.^{1,4-6)} 특히 입술과 입술 주위의 주름은 심미적으로 악영향을 미쳐 미용치료의 요구도가 증가하고 있다. 이러한 미용 치료적 접근으로 각광 받는 방법이 내인성 노화와 광노화에 의해 발생한 진피 내 물질의 변성을 막는 방법이다. 내인성 노화와 광노화의 치료로서 사용되어지는 대표적인 방법으로는 자외선 차단제를 이용한 광방어나 진피 내 물질의 변성을 막는 약품을 도포하는 방법들이라 할 수 있다.⁷⁾ 최근 피부과 영역에서 피부 주름 병변의 예방 및 치료에 대한 요구도가 증가되고 있으며 입술과 입술주위 주름의 예방과 치료에 있어서 보다 효과적이고 간편하며 부작용이 적은 약제의 필요성이 요구되고 있다.

Asiaticoside는 아시아권에서 전통적으로 상처 치유에 효과가 있다고 알려진 *Centella asiatica*의 추출물이다. *Centella asiatica*는 염증 반응을 감소시키고 근섬유 모세포 합성을 증가시키며 제 I 형 콜라겐의 합성을 증가시킴으로써 상처와 궤양 치유 효과가 있는

것으로 알려져 있다. 하지만 생체 도포 시 주름 발생 억제 효과에 대해서는 아직 보고된 바가 없다.^{8,9)}

이 연구는 asiaticoside가 실험실내 인체 섬유모세포의 증식에 미치는 영향과 교원질 합성에 미치는 영향 및 인체 국소 도포 시 주름 생성의 억제 효과를 평가하기 위하여 인체 섬유모세포를 배양하여 인체 섬유모세포의 증식정도와 제 I 형 콜라겐의 분해산물인 제 I 형 전콜라겐 C 펩타이드의 양을 측정하였다. 그리고, 지원자 54명을 대상으로 입술 부위 주름이 발생한 부위에 asiaticoside를 도포하여 획득한 피부 모사판(replica)을 이용해서 컴퓨터영상분석을 시행하였다. 또한 연구자와 피시험자를 통한 객관적인 평가와 주관적인 평가를 통하여 주름 개선 효과를 평가하였다.

연구 대상 및 방법

1. 재 료

가. 연구 대상

1) 실험실내 실험 : 5~9세대 계대배양 된 인체 섬유모세포를 사용하였다.

2) 인체 도포 실험 : 시험부위에 피부질환의 병력이 없고, 만성 소모성질환으로 치료받고 있지 않으며 최근 6개월이내 화학 박피술이나 retinoid 제제의 국소 도포 혹은 전신 투여하지 않은 20세 이상 60세 이하의 건강한 정상 성인 여성 54명을 대상으로 하였다. 평균 연령은 40.9세였다(Table 1).

Table 1. Distribution of subjects based on the age

Age	Subjects
20 ~ 29	5
30 ~ 39	29
40 ~ 49	18
50 ~ 59	2
Total	54

나. 실험 약물

계대배양 된 인체 섬유모세포에는 asiaticoside (Indena S.P.A., Milan, Italy)를 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹인 후 1 mg/dl로 희석하여 사용하였고 인체 도포 실험에서는 0.2%의 asiaticoside를 도포하였다(Table 2).

Table 2. Active ingredient and base of each experimental material

	Component (%)	
	A	B
1. Active ingredient		
Asiaticoside	0.2	—
2. Base		
Solid grease		
Liquid grease		
Moisturizer		
Emulsifier		
Antiseptic	99.8	100
Antioxidant		
Coloring material		
Perfume		
Refined water		
Total	100	100

2. 방법

가. 실험실내 실험

1) 인체 섬유모세포의 배양

신생아의 포경수술시 얻어진 포피를 인산완충액(phosphate buffered saline, pH 7.4)으로 20분간 3회 세척하고 잘게 절단하여 배양접시(100mm petri dish, Nunc Co., Denmark)의 바닥에 진피층이 볼도록 접종한 후 penicillin(100 IU/ml), streptomycin(100 ug/ml) (GibcoBRL, U.S.A.)과 Fungizone®(GibcoBRL, U.S.A.) 및 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, GibcoBRL, U.S.A.)이 포함된 Dulbecco's modified eagles medium (DMEM, GibcoBRL, U.S.A.)을 넣고 섭씨 37도, 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기(Forma Scientific, France)내에서 일차배양을 시행하였다. 약 2~3 주 후 바닥에 붙은 진피층 으로부터 자라나온 섬유모세포가 배양접시의 표면을 약 50~60%정도

덮을 정도가 되면 0.25% trypsin(Gibco BRL, U.S.A.) 처리하여 세포들을 회수한 후 배양을 실시하였으며, 일부는 액체질소 하에 냉동보관하면서 계대배양을 실시하였다. 실험에는 5~9 세대의 섬유모세포를 이용하였다.

2) 인체 섬유모세포의 증식에 미치는 효과

인체 섬유모세포를 96 well 배양판(Falcon Co, Denmark)의 각 well 당 1×10^4 개의 세포를 분주하여 1일간 배양하였다. 시료를 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml의 농도로 10% FBS가 포함된 DMEM에 혼합하여 각각의 well에 넣고 24시간 동안 배양하여 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)법으로 세포증식을 측정하였다.

각 농도마다 동일한 4개의 well에서 실험을 시행하였으며, 3차례의 실험의 결과를 평균하여 판정하였다.

MTT 측정법은 세포의 성장 또는 살아있는 세포를 측정하는 방법 중 하나로 Mossman법을 기준으로 한 MTT assay kit (Cat No. 1465 007, Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하였다.⁷⁾ 96 well 배양판에서 배양실험이 종료된 후에 diphenyltetrazolium bromide, phenazine methosulfate로 구성된 MTT반응액 10 μ l을 첨가하고 4시간 반응시킨 후 buffered formalin 100 μ l를 넣어 섭씨 37도 배양기에 하룻밤 거치한 다음, 1% HCl을 포함한 isopropanol 100 μ l를 첨가하여 formazan 결정체를 용해시켜 ELISA 판독기(EMAX®, Molecular Device, U.S.A.)에서 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) 교원질 합성 증진 효과의 판정

섬유모세포에서 대표적으로 가장 많이 합성이 이루어지는 제 I 형 전콜라겐 C 펩타이드의 양을 PICP (procollagen type I c-peptide) EIA kit(Cat.# MK101, Takara shuzo, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다.⁸⁾ 효소면역측정과정은 one step sandwich method로서 PIP(procollagen I peptide)에 대한 마우스 단클론항체로 96 well 배양판을 coating하고 섭씨 4도에서 하룻밤 거치시킨 후 20 μ l의 세포배양액과

peroxidase로 표지한 항마우스 PIP 단클론항체를 반응시키고 H_2O_2 와 para-phenylenediamine으로 발색시킨 후 100 μ l의 1N 황산을 첨가하여 반응을 종결시킨 후 ELISA 판독기로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. PICP 표준농도로 그래프를 작성하여 정량적인 계측을 하였다. 교원질합성의 증감 정도는 대조 시료에 대한 실험시료의 수치의 비율로서 분석하였으며, 최종적으로 3차례의 실험의 결과를 평균하여 표시하였다.

나. 인체 도포 실험

1) 실험군 분류 및 시험 약물의 도포

상기 선정기준에 적합한 피시험자 54명을 대상으로, 27명씩 시험군과 대조군으로 분류하였으며 흡연자는 없었다. 각 군은 각 시료를 정확히 입술에 하루 2회 도포 하였다. 대조군은 위약을 도포하였으며, 시험군은 asiaticoside가 함유된 시료를 도포하였다. 도포 8주째의 평가 완료 전까지 어떤 군이 시험군이며 대조군인지 연구자 및 피시험자 모두 모르는 상태에서 이중맹검법(double blind test)으로 실시하였다. 피시험자는 시험 약물을 8주간 매일 하루 2회 세면 후 도포하였다. 시험 약물은 세면 후 적어도 30분이 지나 바르게 하였으며 시험 약물 외에 주름 개선 효과가 있다고 알려진 다른 약제나 화장품의 사용을 중단하게 하였다. 피시험자는 일광 노출을 피할 것과 부득이 강한 일광에 노출될 경우 자외선 차단지수(SPF) 15이상의 자외선 차단제를 도포할 것을 권유하였다. 피부자극 증상 또는 증후(홍반, 인설, 가려움증, 따가움, 구진 발생 등)가 발생하는 경우 약 7일 까지 시험 약물 도포를 중단하게 하고 바로 연구자에게 보고하도록 하여 연구자가 피부 상태를 진단하고 적합한 치료를 시행하도록 임상 시험을 계획하였다.

2) 피부 주름 모사판(replica) 획득

시험 약물 도포 전, 도포 후 4주, 8주에 입술 부위에서 피부 주름 모사판(replica)을 얻었다. 피부 주름 모사판(replica)의 획득 위치 및 모양은 아래 그림과 같다(Fig. 2). 모사판을 얻기 전에 적어도 20분 전에

는 세면을 하게 하였고 휴식 후 누운 상태에서 모사판을 얻었다.

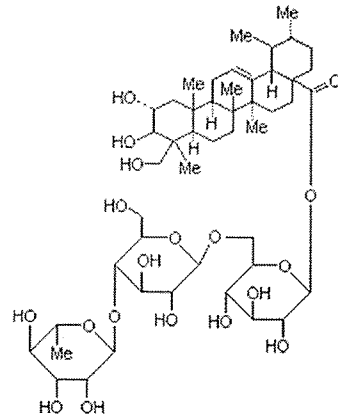


Fig. 1 Structural formula of asiaticoside.

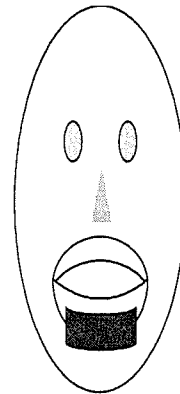


Fig. 2 Application of replica.

시험 약물을 바른 후 적어도 12시간이 지나 피부 주름 모사판(replica)을 얻었고 피부 주름 모사판(replica)을 얻는 당일에는 모든 화장품을 바르지 않게 하였다. 사용된 모사판(replica)의 재료는 실리콘 폴리머인 Provil®(Heraeus Kulzer Inc., South Bend, USA)으로 Provil®의 베이스(base) 및 경화제(catalyst)를 1:1 비율로 혼합 후 사용하였고 약 10 분이 지난 후 모사판(replica)을 피부에서 제거하였다.⁹⁾ 모사판(replica)을 얻었을 때마다 모사판에 기포(bubble)가 있는지 확인하였으며 기포가 있는 경우는 이미지 분석에 적합하지 않으므로 다시 피부 주름 모사판(replica)을 얻었다. 실리콘 재료는 매번 동일한 위치

에 도포하기 위해 아랫입술(lower lip)은 입술 양쪽 끝 1/5을 제외한 중간 3/5부위에 도포하여 모사판(replica)을 얻었다. 피부 주름 모사판(replica)의 획득에서 연구자의 개인 차이에 의한 바이어스(interobserver bias)를 제거하기 위하여 동일 연구자에 의하여 모사판(replica)을 얻었다.

3) 연구자에 의한 주름 개선 효과의 육안 판정

어느 시험약물이 위약(placebo)이고 asiaticoside가 들어있는지 모르는 상태에서 연구자가 시험약물 도포 전, 도포 후 4주, 8주에 주름 개선 효과를 비교하였다.

이 연구에서는 임의의 기준에 따라 주름을 굵은 주름(coarse wrinkle), 잔주름(fine wrinkle), 얇은 주름(linear wrinkle)으로 각각 정의하였으며, 이들 주름의 개수에 따라 각각 등급(score)을 표시하였다. 굵은 주름(coarse wrinkle)은 육안으로 쉽게 확인할 수 있는 깊은 주름, 잔주름(fine wrinkle)은 근접하지 않아도 육안으로 구분되는 주름, 얇은 주름(linear wrinkle)은 근접(약 30cm)하여야 식별이 가능한 주름으로 정의하였다(Table 3). 판단이 어려운 경우에는 중간 평점도 가능하게 하였으며 평점 grade는 총 5단계로 정하였다.

Table 3. Descriptive scale used in the assessment of cutaneous wrinkling

Score	Coarse wrinkle*	Fine wrinkle [†]	Linear wrinkle [‡]
1			1-2
2		1-2	
3		>3	
4	1-2	3-5	
5	>3		

* : Coarse wrinkle : deep line, furrow

[†] : Fine wrinkle : shallow line

[‡] : Linear wrinkle : superficial shallow line

4) 피시험자의 육안적 자가 주름 개선 효과 판정
시험약물 도포 4주, 8주경과 시점마다 주름 개선 효과에 대해 아래의 항목으로 설문 조사를 시행하였다.

- 실제로 주름이 사라짐. (Markedly improved)
- 많이 호전되었으며 육안적으로 확인할 수 있

음.(Moderate improved)

- 약간 호전되었으며 육안적으로 나아진 듯함. (Slightly visually improved)
- 약간 호전된 듯하나 육안적으로 구분할 수 없음.(Slightly improved)
- 변화 없음.(Not improved)
- 더 나빠짐.(Worse)

5) 피부 주름 모사판(replica)의 컴퓨터 영상 분석 (computerized image analysis)

54명의 피시험자에서 피부 주름 모사판(replica)을 컴퓨터 영상 분석(computerized image analysis)을 시행하였다. 모사판(replica)은 시험 시료 도포 전, 도포 후 4주, 8주에 얻어진 것으로 광원(Halla Optical Eng., 대한민국)과 모사판의 거리는 약 20cm 정도로 하였고 광원의 조사 각도는 26도로 하여 피부 주름의 음영을 만들었으며 이 이미지를 CCD 카메라(삼성항공, 대한민국)를 이용하여 획득하였다(Fig. 3). 이미지 획득은 PC에 설치되어 있는 이미지 분석 프로그램인 Image Pro Plus[®](Media Cybernetics, Silver Spring, USA)를 이용하여 CCD 카메라에서 주름 영상을 얻었다. 얻어진 이미지는 시험 약물의 어느 제품이 위약 이고 asiaticoside가 들어간 제품인지 모르는 상태에서 이미지 분석 프로그램인 Image Pro Plus[®]를 이용하여 피부 주름 그림자의 넓이를 측정하였으며 이 그림자의 넓이를 이용하여 평균 주름의 변화를 계산하였다. 이때 그림자의 넓이의 단위는 a.u.(Arbitrary unit)로 프로그램 상에서 동일 sample의 전후를 상대비교 하기위하여 임의로 부여하였다.

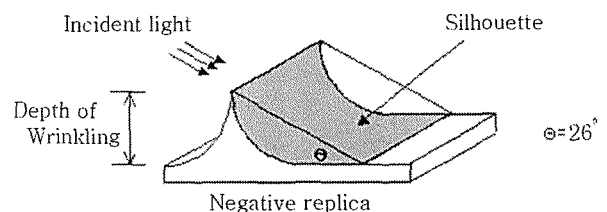


Fig. 3 Measurement of wrinkle silhouette on the negative skin replica.

Asiaticoside의 입술 주름 개선 효과

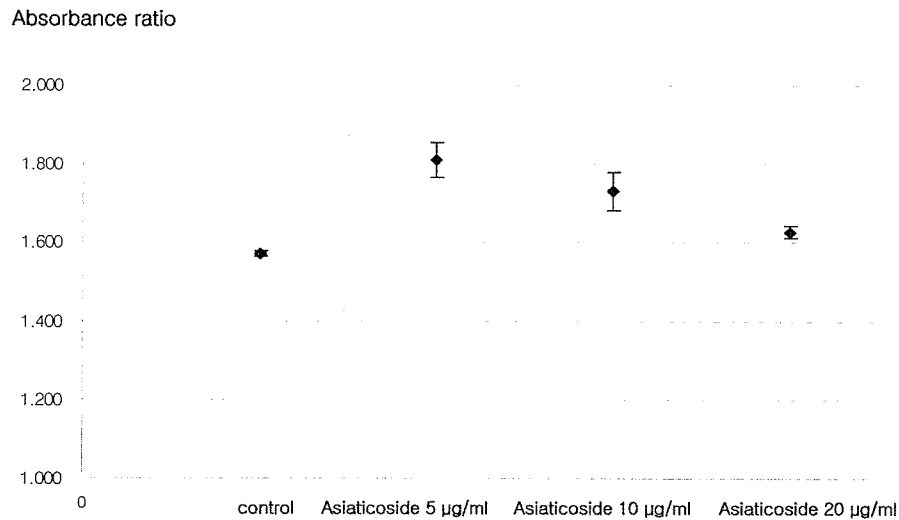


Fig. 4 Absorbance ratio of MTT assay for proliferation of the cultured fibroblast treated with asiaticoside.

6) 부작용의 임상적인 평가

시험약물 도포 4주 및 8주 시점에서 피시험자 각각의 도포 부위에 피부 부작용을 평가하였다. 시험약물 도포 중간에라도 국소적인 자극 증세 혹은 증상이 있는 경우는 즉시 연구자에게 알리도록 하였다. 피시험자도 4주마다 방문 시 설문 조사를 통해 부작용 빈도 및 정도를 평가하였다.

7) 통계학적 분석

모든 실험 결과는 SPSS/10.0 program을 자료의 특성에 따라 독립표본 t-검정(t-test), 분산분석(ANOVA), 반복측정분석 (Repeated measures ANOVA)으로 분석하였다. 이 때 유의 수준은 0.05로 하였다.

결 과

1. 실험실내 실험

가. 인체 섬유모세포의 증식의 변화

약물 투여 1일 후 배양된 인체섬유모세포의 증식에 미치는 효과를 MTT assay로 측정한 결과 대조군과 asiaticoside 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml의 농도에서 흡광도의 변화는 1.569에서 1.808까지 다양하게 관찰되었으나, 대조군과 실험군 사이에서 통계학적

차이는 보이지 않았으며 대조군과 실험군간의 형태학적 차이는 관찰할 수 없었다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Absorbance ratio of MTT assay for proliferation of the cultured fibroblast treated with asiaticoside

	Absorbance (mean ± SD*)
Control	1.569 ± 0.008
Asiaticoside 5 µg/ml	1.808 ± 0.045
Asiaticoside 10 µg/ml	1.729 ± 0.048
Asiaticoside 20 µg/ml	1.626 ± 0.016

* : Standard Deviation

나. 교원질 합성 증가 정도

Asiaticoside의 처리로 인체섬유모세포에서 측정된 PICP (procollagen type I c-peptide)의 합성은 asiaticoside 5 µg/ml에서는 대조군에 비하여 유의있는 차이를 보이지 않았지만 asiaticoside 10 µg/ml, 20 µg/ml에서 대조군과 비교해서 유의한 합성 증가를 보였다($p < 0.05$)(Table 5, Fig. 5).

2. 인체 도포 실험

54명의 피시험자가 본 임상시험에 참여하였으며 8주간의 임상 시험에 모두 중도 탈락 이 연구 종료 시점까지 참여하였다.

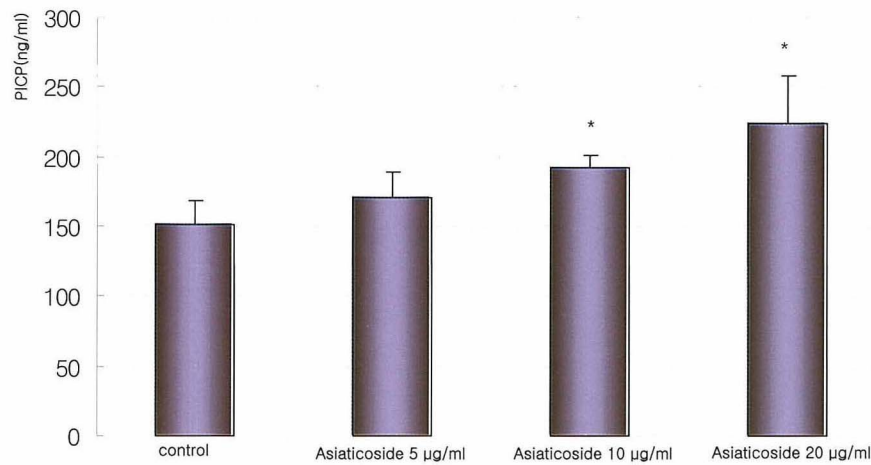


Fig. 5. Effect of asiaticoside on the production of procollagen type I c-peptide in the cultured fibroblast.

Table 5 PICP synthesis (EIA assay) from the cultured human skin fibroblast treated by asiaticoside(* : $p < 0.05$)

	PICP (ng/ml)
Control	151 ± 18
Asiaticoside 5 µg/ml	170 ± 20
Asiaticoside 10 µg/ml	189 ± 8*
Asiaticoside 20 µg/ml	223 ± 21*

가. 피부 모사판의 컴퓨터 영상 분석에 의한 평가 시험약물 도포에 따른 주름의 변화를 피부주름 모사판을 사용하여 측정 한 결과, 0.2% asiaticoside를 도포한 실험군은 실험 기간이 경과함에 따라 주름의 면적이 유의하게 감소하였으며($p < 0.01$), 대조군과 실험군 사이에는 실험이 진행되면서 통계적으로 유의한 값의 차이를 보였다($p < 0.01$). 대조군은 도포 전에 비해 8주경과 후 까지 통계적으로 유의한 주름 감소 효과를 보이지 않았고 실험군은 4주경과 후부터 통계적으로 유의하게 주름의 면적이 감소하였다($p < 0.05$)(Table 6, Fig. 6,7,8).

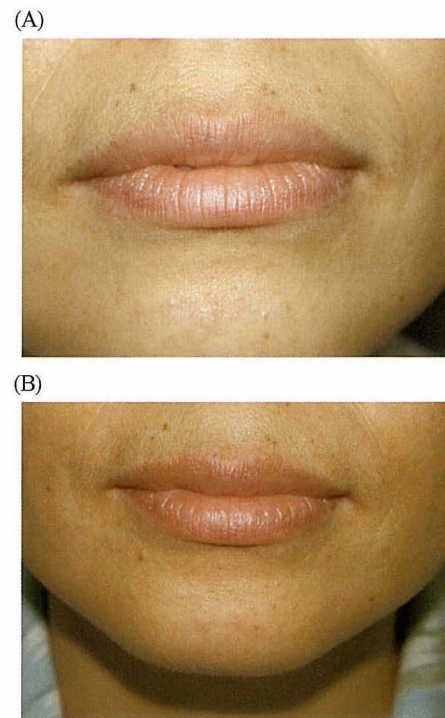


Fig. 6 Fine wrinkle lesions before (A) and at 8 weeks after (B) topical application with 0.2% asiaticoside twice daily.

Table 6. Change of wrinkle silhouette(a.u.) before and at 4 and 8 weeks after topical application of 0.2% asiaticoside(* : $p < 0.05$)

Drug	Initial	4 Wks	8 Wks
A Placebo	64.69±27.03	59.54±27.36	60.98±27.57
B 0.2% Asiaticoside	70.87±34.45	45.23±23.46*	45.60±27.83*

Asiaticoside의 입술 주름 개선 효과

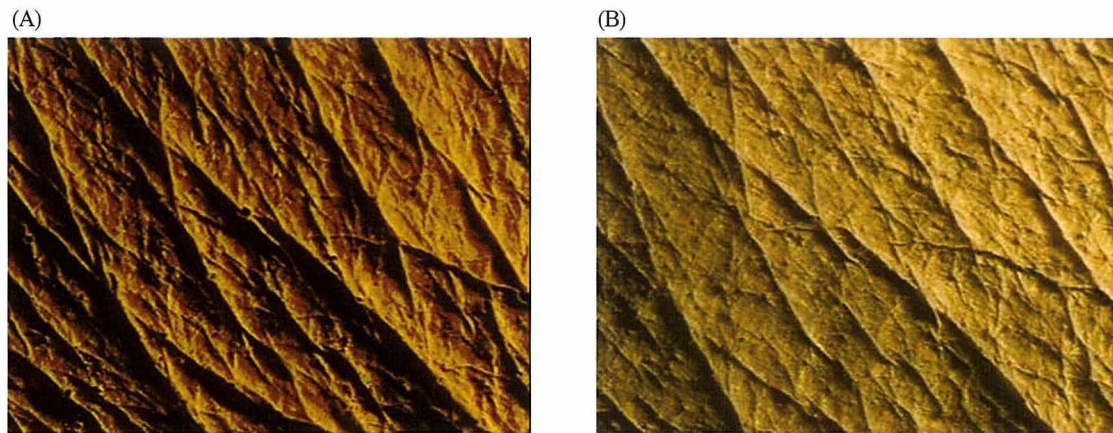


Fig. 7 Skin replica under stereomicroscope before (A) and at 8 weeks after (B) topical application with 0.2% asiaticoside twice daily.

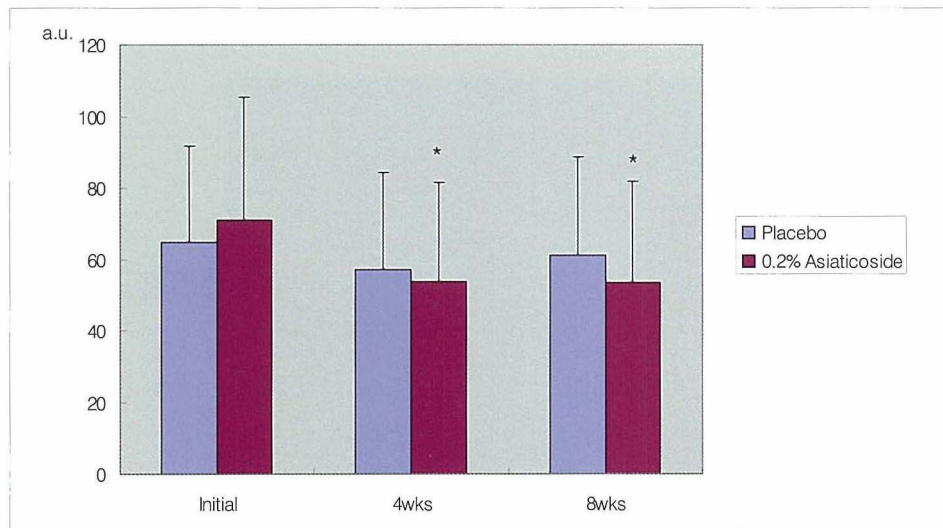


Fig. 8 Change of wrinkle silhouette(a.u.) before and at 4 and 8 weeks after topical application of 0.2% asiaticoside(* : $p < 0.05$).

나. 연구자의 육안적 평가

연구자에 의한 주름 개선 효과의 육안 판정에서 0.2% asiaticoside를 도포한 실험군은 실험 기간이 경과함에 따라 주름이 개선되었으며($p < 0.01$), 대조군과 실험군 사이에는 실험이 진행되면서 통계적으로 유의한 값의 차이를 보였다($p < 0.01$). 대조군은 8주경과 후 까지 통계적으로 유의한 주름 감소 효과를 보이지 않았으나, 실험군은 8주경과 후 통계적으로 유의하게 주름 개선 효과가 있었다($p < 0.05$)(Table 7, Fig. 9).

다. 피시험자 자신의 육안적 평가

피시험자의 주름개선 자가 평가에서 4주경과 후 육

안적으로는 구분이 되는 약간의 호전을 보인다고 응답한 피시험자는 대조군에서는 없었으나 실험군에서는 27명 중 8명(30%)이었으며 8주경과 후에는 시료 A(대조군)가 27명 중 1명(4%), 시료 B(실험군)는 27명 중 12명(44%)이었으며 육안적으로 많이 호전되었다고 응답한 사람 또한 실험군에서 27명 중 8명(39%)이었다(Table 8.).

라. 부작용

연구 기간 중 자극 증상이나 그 외 부작용을 보인 피시험자는 실험군이나 대조군 모두에서 없었다.

Table 7. Score of evaluation of wrinkle before and at 4 and 8 weeks after topical application of 0.2% asiaticoside(* : p<0.05)

Drug		Initial	4 Wks	8 Wks
A	Placebo	2.91±0.73	2.67±0.69	2.70±0.71
B	0.2% asiaticoside	2.85±0.88	2.52±0.89	2.20±0.83*

Table 8. Evaluation of wrinkles on subjects' lip at 4 and 8 weeks after topical application of 0.2% asiaticoside

	After 4 wks		After 8 wks	
	Placebo(A)	Drug(B)	Placebo(A)	Drug(B)
Markedly improved	0	0	0	0
Moderately improved	0	0	0	8
Slightly visually improved	0	8	1	12
Slightly improved	9	13	11	5
Not improved	18	6	15	2
Worse	0	0	0	0

(n=54)

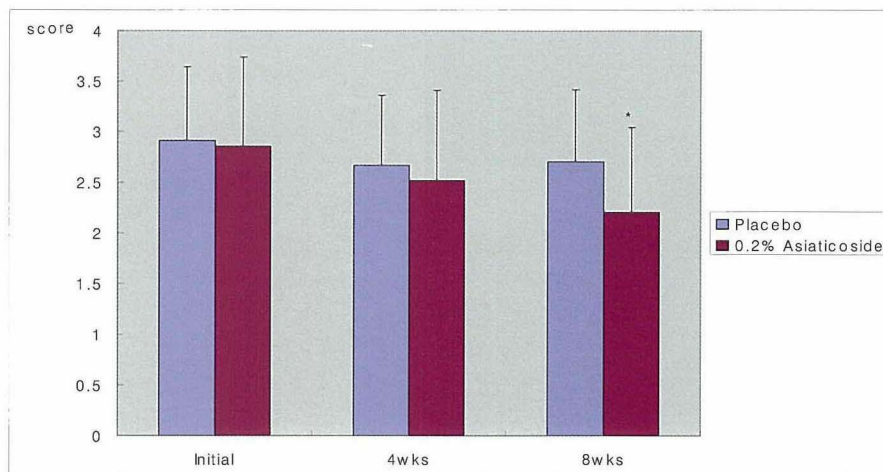


Fig. 9 Score of evaluation of wrinkle before and at 4 and 8 weeks after topical application of 0.2% asiaticoside(* : p<0.05).

고찰

입술은 중요한 해부 생리적 기능을 가지고 있다. 입술은 골격계와는 분리되어 독립적으로 치아를 감싸고 있고 구강과 붙어 있어 여러 가지 음식물과 치약, 립스틱 같은 외부 물질에 노출되어 있으며 직접적으로 습도와 온도변화를 받는 부분이다. 그러므로 입술의 노화에는 다양한 요인이 영향을 끼친다고 할 수 있다.¹⁻³⁾ 일반적으로 피부의 노화란 고령화로 인한 피부 기능의 저하라고 말 할 수 있으며 20대 초반에 기능의 최고조를 이르며 그 후 시간의 흐름에 따라 피부 두께, 피부 색조, 피부탄력의 변화, 혈관의 확장

및 주름 등의 증상이 피부 기능의 저하로 인해 나타나게 되나 입술의 경우는 특히 외부 환경의 요인의 영향이 크므로 입술과 입술주위의 피부 노화는 개개인에 따라 서로 상이하게 나타나게 된다.^{4,6)}

입술에 영향을 미치는 외부 요인으로는 공기, 수분, 약제, 화장품, 음식, 구강 청결제, 자외선 같은 것들이 있고 내부요인으로 호르몬, 유전 등이 있다.¹⁾ 입술의 노화현상은 이러한 외부와 내부 요인의 영향으로 주름이 발생하게 되는데 조직학적으로 표피 두께의 감소와 진피경계부가 편평해지고 진피에서는 섬유아세포에서의 교원질 합성저하가 나타나게 되며 교원질 분해효소인 collagenase의 발현이 증가하여

교원질의 감소가 발생하게 된다. 또한 유두진피에 위치한 탄력섬유가 기저막대를 향하여 수직으로 배열되는 양상이 소실되고 미세한 탄력섬유가 수축되어 말단부가 표피 직하부에 도달하지 못하는 현상이 관찰되며 망상진피에서는 탄력섬유는 두꺼워지며 수가 증가하고 불규칙하게 배열된다.^{1,5,10-17)}

입술부위의 주름을 개선하기 위해서는 수술적인 방법을 이용하거나 보톡스나 교원질 직접 주입 등 직접적인 시술을 하기도 하지만 비침습적인 방법으로 입술의 수분을 유지시키는 물질을 도포하거나 광손상을 막기 위하여 자외선 차단제를 바르는 방법들이 이용되고 있다.^{1,7,16,18)} 하지만 직접적인 시술은 시술 자체의 위험성 과 많은 비용 부담이 있어 주름 개선에 보다 효과적이고 광안정성을 가지며 보다 효율적으로 약물을 피부에 전달할 수 있는 새로운 약제에 대한 연구가 필요하다.

이러한 노화현상으로 인한 주름의 생성을 막기 위하여 교원질 합성을 증가시키는 방법이 주목받고 있다. 세포외 기질의 대부분을 차지하는 교원질은 대부분 섬유아세포에서 생성되고 피부조직의 70~80%를 차지한다.^{4,19)} 사람의 피부에는 I, III, IV, VII 및 XVII 형의 교원질이 관찰되며 이 중 진피층에 제 I형 교원질이 80~85%로 가장 많이 존재한다.^{4,10,11,15)} 이러한 교원질은 섬유아세포의 각종 교원질 유전자 발현 조절에 의해 생성된다. 여러 α -chain 유전자의 발현에 의해서 α -chain 다단백질 즉, 전교원질(procollagen) 분자가 형성되고, 생성된 전교원질은 섬유아세포 밖으로 배출되어 교원질 metalloproteinase에 의해 섬유소가 되며, 섬유소의 cross-linking에 의하여 완전한 교원질이 된다.^{1,19)}

Asiaticoside는 아시아권에서 전통적으로 상처 치유 목적으로 사용된 *Centella asiatica* 라는 식물에서 유래되었다. Maquart 등이 *Centella asiatica*의 추출물이 상처와 궤양 치료에 효과가 있다는 것을 발견하였고 그 후 추출물에서 유효 성분인 asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid 를 추출하였다.²⁰⁾ 그 중 madecassic acid는 상처 치료 연고로 시판 중에 있는 것이다. Asiaticoside는 주로 상처나 궤양 치료에 사용되었으며 최근 섬유모세포에서 증식 및 교원질 합성의 증가를 유도할 수 있을 가능성이 발견되었으나 이를 주름 개선의 목적으로 사용된 예는 아직 없다.^{8,9,21-23)}

이 실험에서 asiaticoside는 섬유모세포의 증식에

미치는 영향이 통계적으로 의의가 없었으나 고농도에서 asiaticoside의 세포 독성 또한 관찰되지 않았다. 하지만 섬유모세포가 가장 많이 생성하는 제 I형 전교원질의 분해 산물인 제 I형 전교원질 c-peptide의 경우 asiaticoside 5 μ g/ml에서는 통계학적 유의성이 없었으나 asiaticoside 10 μ g/ml부터 현저히 증가하여 asiaticoside는 섬유모세포의 증식에 관여하기 보다는 교원질의 합성 자체를 유도 할 수 있는 것으로 나타났다.

이 연구에서 입술 주름의 변화를 측정하기 위하여 주관적인 방법으로 연구자가 직접 관찰하여 채점하는 방법과 객관적인 방법으로 피부 모사판을 이용한 컴퓨터 계측방법을 사용하였다.²⁴⁾ 피부 주름의 변화에 대하여 정량적인 방법으로 측정하기 위하여 사용된 컴퓨터 숫자화 영상 분석법(computerized digital image analysis system)은 기존의 표면 계측기(profilometer, surfometer)와는 달리 변이계수가 적으며 3차원적인 피부 주름의 부피를 구하는 것을 2차원 하에서 간단하게 피부주름의 정량적인 측정을 할 수 있게 도움을 주었다.^{24,25)} 피부 주름이 표면의 주름(surface furrows)과 고평부(plateaux)를 이루는 것을 이용하여 피부 모사판의 불규칙한 표면에 투사광선을 일정각도로 조사해서 그림자를 만들고 이 음영의 넓이를 컴퓨터를 이용하여 계수화한 후 분석하는 방법을 사용하였다. 음영의 면적을 가장 크게 하기위한 광원의 각도는 26도로 고정하여 관찰하였다.²⁶⁾ 영상분석기로 얻어진 음영을 숫자화 된 영상으로 전환시켜 영상처리과정을 거친 다음 영상분석을 시행하였으며 이를 통해 피부표면의 미세한 변화에 대한 정량적인 연구를 가능하게 하였다.^{24,26)}

피부 모사판(replica)은 이 연구에서 입술표면의 모형을 만드는데 사용하였다. 피부 모사판을 이용하여 입술에 발생한 주름표면 모형을 매우 예리하게 만들 수 있었으며 컴퓨터 숫자화 영상 분석법에서 3차원적인 영상을 2차원적인 영상으로 정량적인 측정을 할 수 있게 도움을 주었다.^{27,28)} 피부 모사판으로 필요한 조건은 표면의 형태를 정확히 재현해야 하며, 인체피부 온도에서 쉽고 빠르게 경화되어야 하고, 불순물이 포함되지 않고 유해한 성분이 없으며 피부에서 쉽게 제거되어야 되는 조건을 갖추어야 한다.^{24,25,28)} 이 연구에서 사용한 것은 보철물의 압인 제작 시 사용되는 실리콘폴리머인 Provil®(Heraeus

Kulzer Inc., South Bend, USA)로 치과용으로 널리 쓰이며 상기 요건에 적합하다 생각되어 입술부위 주름의 구조 측정을 위한 재료로 사용되었다.

이번 연구에서는 각 군에서 score를 이용한 육안적 관찰과 컴퓨터 영상분석법을 이용하여 일정한 각도의 투사광선에 의한 그림자의 넓이를 측정한 값을 비교 관찰한 결과 대조군은 시작시점과 8주 후의 시점을 비교할 때 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 asiaticoside의 경우 도포 4주 후부터 유의한 차이가 나타나며 도포 8주 후에는 4주에 비하여 더욱 호전됨이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 연구자에 의한 주름개선 효과와 피시험자의 주름개선 효과 평가 정도와 일치하며 지속적인 asiaticoside 도포 시 8주부터 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다.

이 연구에서 부작용을 나타낸 예는 없었으며 asiaticoside는 대부분의 사람들에게 피부 부작용 없이 안전하게 도포할 수 있는 물질이라고 생각한다.

이상의 결과로 asiaticoside는 실험실내 실험에서 인체 섬유모세포 증식 작용은 관찰되지 않으나 교원질 합성 증가 작용이 있으며 노화로 발생한 입술 부위 주름에 대해서 asiaticoside 도포 시 4주부터 대조군에 비해 현저한 주름 병변 억제 효과를 가짐을 알 수 있었다.

최근 주름에 대한 관심이 증가되고 있는 가운데 주름 자체를 억제하는 물질을 새로 찾아내는 연구가 진행되고 있으며 asiaticoside와 더불어 기존에 주름 억제에 효과가 있다고 알려진 물질들에 대한 병합요법을 시행하는 것이 더욱 효과적일 것으로 생각되며 이에 대한 연구도 흥미로울 것으로 생각된다.

결 론

배양된 인체 섬유모세포에 asiaticoside를 투여하여 섬유모세포의 증가정도와 교원질 생성의 증가 정도를 비교 관찰하였으며 성인 피시험자 54명을 대상으로 asiaticoside의 도포로 인한 주름 개선 효과를 관찰하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험실내 실험

가. 약물 투여 1일 후 배양된 인체섬유모세포의 증식에 미치는 효과를 MTT assay로 측정한 결과 대

조군과 asiaticoside 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml의 농도에서 흡광도의 변화는 1.569에서 1.808까지 다양하게 관찰되었으나, 대조군과 실험군 사이에서 통계학적 차이는 보이지 않았으며 대조군과 실험군간의 형태학적 차이는 관찰할 수 없었다.

나. Asiaticoside의 처리로 인체섬유모세포에서 측정된 PICP (procollagen type I c-peptide)의 합성은 asiaticoside 5 μ g/ml에서는 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았지만 asiaticoside 10 μ g/ml, 20 μ g/ml에서 대조군과 비교해서 유의한 합성 증가를 보였다.

2. 인체 피부 주름 실험

가. 시험약물 도포에 따른 주름의 변화를 피부주름 모사판을 사용하여 측정한 결과 0.2% asiaticoside를 도포한 실험군은 실험 기간이 경과함에 따라 주름의 면적에 유의하게 감소하였으며($p<0.01$), 대조군과 실험군 사이에는 실험이 진행되면서 통계적으로 유의한 값의 차이를 보였다($p<0.01$). 대조군은 도포 전에 비해 8주경과 후까지 통계적으로 유의한 주름 감소효과를 보이지 않았다. 실험군은 4주 및 8주경과 후에는 통계적으로 유의하게 주름의 면적이 감소하였다($p<0.05$).

나. 연구자에 의한 주름 개선 효과의 육안 판정에서 0.2% asiaticoside를 도포한 실험군은 실험기간이 경과함에 따라 주름이 개선되었으며($p<0.01$), 대조군과 실험군 사이에는 실험이 진행되면서 통계적으로 유의한 값의 차이를 보였다($p<0.01$). 대조군은 8주경과 후까지 통계적으로 유의한 주름 감소 효과를 보이지 않았으나, 실험군은 8주경과 후 통계적으로 유의하게 주름 개선 효과가 있었다 ($p<0.05$).

다. 피시험자의 주름개선 자가 평가에서 4주경과 후 육안적으로는 구분이 되는 약간의 호전을 보인다고 응답한 피시험자는 대조군에서는 없었으나 실험군에서는 27명 중 8명(30%)이었으며 8주경과 후에는 시료 A(대조군)가 27명 중 1명(4%), 시료 B(실험군)는 27명 중 12명(44%)이었으며 육안적으로 많이 호전되었다고 응답한 사람 또한 실험군에서 27명 중 8명(39%)이었다.

라. 실험도중 시료에 대한 부작용은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 asiaticoside는 시험관내 실험에서 섬유모세포의 증식에는 유의한 효과가 없었지만 교원질 합성 증가를 유도하며 임상적으로 주름 개선 작용이 있는 것으로 나타났다.

참고 문헌

1. Leveque JL, Goubanova E : Influence of age on the lips and perioral skin. *Dermatolog y* 208 : 307-313, 2004
2. Kobayashi H, Tagami H : Functional properties of the surface of the vermillion border of the lips are distinct from those of the facial skin. *Br J Dermatol* 150 : 563-567, 2004
3. Lanfranchi HE, Rey BM : Comparative morphometric analysis of vermillion border epit helium and lip epidermis. *Acta Anat* 101 : 187-191, 1978
4. Uitto J, Pulkkinen L, Chu M : Collagen. In : Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff KW, Au sten KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds. *Fitzpetrick's Dermatology in general medicine*, 6th ed. New York, McGraw-Hill Book 165-179, 2003
5. 한광호, 조광현, 노동영, 은희철, 윤재일 : 노화에 따른 피부 구조의 변화. *대한피부과학회지* 36 : 971-980, 1998
6. 조광현, 이미경, 조성진, 김규한, 박경찬, 은희철, 정진호 : 광노화에 따른 피부의 조직학적 변화. *대한피부과학회지* 41 : 754-760, 2003
7. 김상태 : 광보호. *대한의학협회지* 36 : 765-773, 1993
8. Shukla A, Rasik AM, Dhawan BN : Asiaticoside-induced elevation of antioxidant levels in healing wounds. *Phytother Res* 13 : 50-54, 1999
9. Widgerow AD, Chait LA, Stals R, Stals PJ : New innovations in scar manageme nt. *Aesthetic Plast Surg* 24 : 227-234, 2000
10. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ : Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379 : 335-339, 1996
11. Fenske NA, Lober CW : Strucural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol* 15 : 571-585, 1986
12. Gilchrest BA, Blog FB, Szabo G : Effect of aging and chronic sun exposure on mela nocytes in human skin. *J invest Dermatol* 74 : 141-143, 1979
13. Sunderkotter C, Kalden H, Luger TA : Aging and the skin immune system. *Arch Dermatol* 133 : 256-262, 1979
14. Montagna W, Carlisle K : Structural changes in aging human skin. *J invest Dermatol* 73 : 47-53, 1979
15. Braverman IM, Fonferko E : Studies in cutaneous aging : The elastic fiber network. *J Invest Dermatol* 78 : 434-443, 1975
16. 윤상웅, 서구일, 유종엽, 박경찬, 은희철 : 보툴리눔독소(보톡스[®])로 치료한 얼굴 주름 임상적 고찰. *대한피부과학회지* 40 : 386-392, 2002
17. Tasuji T, Hamada T : Age-related changes in human dermal elastic fibers. *Br J Dermatol* 105 : 57-63, 1982
18. 이호성, 강남규, 김태홍 : 자외선 차단제의 광화학적 안정성이 생체 광방어에 미치는 영향. *대한피부과학회지* 41 : 881-893, 2003
19. Uitto J, Olsen DR, Fazio MJ : Extracellular matrix of the skin; 50 years progress *J Invest Dermatol* 92 : 61-77, 1989
20. Maquart F, Bellon G, Gillery P, Wegrowski Y, Borel JP : Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. *Connect Tissue Res* 24 : 107-120, 1990
21. Hong SS, Kim JH, Li H, Shim CK : Advanced formulation and pharmacological activity of hydrogel of the titrated extract of *C. asiatica*. *Arch Pharm Res* 28 : 502-508, 2005
22. Lu L, Ying K, Wei S, Liu Y, Lin H, Mao Y : Dermal fibroblast-associated gene induction by asiaticoside shown in vitro by DNA microarray analysis. *Br J Dermatol* 151 : 571-578, 2004
23. Cheng CL, Guo JS, Luk J, Koo MW : The healing effects of *Centella* extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats. *Life Sci* 74 : 2237-2249, 2004
24. 최현철, 오칠환 : 영상분석법을 이용한 노화에 따른 피부 주름의 변화에 대한 연구. *대한피부과학회지* 35 : 292-302, 1997
25. Awajan A, Rondot D, Mignot J : Quick method of measuring the furrows distribution on skin surface replicas. *Med Biol Eng Comput* 27 : 379-389, 1989
26. Barton SP, Marks R : Image analysis as a tool for measuring biological phenomena of the skin. *Int J Cosmet Sci* 10 : 137-144, 1988
27. Gromley DE : Computer models and images of the cutaneous surface. *Dermatol Clin* 4 : 641-649, 1986
28. Kawai K, Nakagawa M, Kawai J, Kawai K : Evaluation of skin irritancy of sodium lauryl sulphate : A comparative study between the replica method and visual evaluation. *Contact Dermatitis* 27 : 174-181, 1992