



잇꽃 에탄올 및 열수 추출물의 항노화 기반 항주름효과 비교

하창우¹ · 김성혁² · 장소희³ · 홍성실⁴ · 남궁승⁵ · 최혜숙⁶ · 김윤규⁷ · 임정대⁸ · 손은화^{9,10†}

Comparison of Anti-Wrinkle Effect of Ethanol and Hot Water Extract from Safflower Flower Based on Anti-Aging Potential

Chang Woo Ha¹, Sung Hyeok Kim², So Hee Jang³, Sung Sil Hong⁴, Seung Namkoong⁵, Hye Sook Choi⁶, Youn Kyu Kim⁷, Jung Dae Lim⁸ and Eun Hwa Sohn^{9,10†}

ABSTRACT

Received: 2022 May 16
1st Revised: 2022 June 1
2nd Revised: 2022 June 7
3rd Revised: 2022 June 13
Accepted: 2022 June 13

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



Background: The safflower flower (*Carthamus tinctorius*) contains many bioactive substances and natural pigments. This study aimed to develop a safe and effective functional cosmetic material by comparing the antioxidant and anti-wrinkle effects of *C. tinctorius* flower ethanol extract (CTE) and hot water extract (CTW).

Methods and Results: First, the content of hydroxysafflor yellow A in CTE and CTW was determined. Subsequently, a cell-free system was used to examine the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of CTE and CTW. Furthermore, the effects of CTE and CTW on elastase and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) were determined through enzymatic analysis or real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) in human dermal fibroblast (HDF) cells. The wound closure effect of CTW was also measured using the scratching assay in keratinocyte HaCaT cells. The DPPH scavenging activity of CTE was slightly higher than that of CTW. Regarding wrinkle formation, CTE unexpectedly increased MMP-1 and had no effect on elastase activity except at 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of CTE. In contrast, CTW inhibited both elastase activity and MMP-1 expression. CTW also showed a considerable increase in wound closure rate in the scratching assay.

Conclusions: In conclusion, CTW containing the natural pigment hydroxysafflor yellow A is an effective substance for wrinkle treatment and wound healing for skin aging.

Key Words: *Carthamus tinctorius*, Anti-wrinkle, Elastase, Hot Water Extract, Scratch Assay

서 언

피부는 신체의 외부환경과 내부 장기 사이의 물리적 장벽으로, 외부 자극의 방어, 물질의 흡수 및 체온 조절 등의 생체 주요 기능을 한다. 피부는 상피, 진피, 피하지방층으로 구성되어 있는데, 피부의 가장 최외층인 상피층에는 각질세포가

존재하며 화학적, 물리적 및 생물학적 외부자극에 대한 방어 역할을 하고, 진피층에는 섬유아세포가 있어서 collagen, fibronectin, elastin, glycan과 같은 기질 내 matrix 단백질을 합성 및 분비하여 피부 주름 발생의 주요 인자로 작용한다 (Brenneisen *et al.*, 2002).

노화가 진행되면 피부는 얇고, 평평해지고, 건조해지며 외부

†Corresponding author: (Phone) +82-33-540-3322 (E-mail) ehson@kangwon.ac.kr

¹강원대학교 바이오헬스융합학과 박사과정생 / Ph. D. student, Department of Bio-Health Convergence, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

²강원대학교 바이오헬스융합학과 박사과정생 / Ph. D. student, Department of Bio-Health Convergence, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

³강원대학교 바이오헬스융합학과 석박통합과정생 / Master's and Ph. D. student, Department of Bio-Health Convergence, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

⁴강원대학교 간호학과 교수 / Professor, Department of Nursing, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea.

⁵강원대학교 물리치료학과 교수 / Professor, Department of Physical Therapy, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea.

⁶한국생명과학연구소 연구원 / Researcher, Korea Research Institute of Bio Science Co., Ltd., Yeosu 12668, Korea.

⁷한국생명과학연구소 대표 / CEO, Korea Research Institute Bio Science Co., Ltd., Yeosu 12668, Korea.

⁸강원대학교 바이오헬스융합학과 교수 / Professor, Department of Bio-Health Convergence, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

⁹강원대학교 바이오헬스융합학과 교수 / Professor, Department of Bio-Health Convergence, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

¹⁰유한책임회사 트루비연구소 대표 / CEO, Truebelab Co., Ltd., Samcheok 25913, Korea.

자극 노출에 약해진다. 또한, 주름이 발생하고 피부 부속기와 그 기능이 감소되어 외부 자극에 의한 상처 치유 (wound healing)가 지연되기도 한다 (Yaar and Gilcrest, 2007). 자외선 노출과 같은 자극에서도 자유라디칼의 생성과 matrix metalloproteinase (MMP)의 과발현이 광노화 (photoaging)를 촉진시키고, 주름 형성, 피부구조변화, 상처 치유 지연 등이 노화 유발의 주요 작용 기작으로 인식되고 있다 (Tsukahara *et al.*, 2001).

잇꽃 (*Carthamus tinctorius* L.)은 국화과 (compositae)에 속하는 한해살이 식물로 생약명을 홍화 (紅花)꽃 이라고도 하며, 꽃잎을 말려서 약용으로 사용한다. 이명으로 홍람 (紅藍), 아시꽃, 연지꽃, 잇나물이라고 불리고 영명으로는 safflower라고도 한다. 잇꽃은 채집이 용이하고 중국, 인도, 남유럽, 북아메리카 등 널리 퍼져 있으며 생물학적 활성이 탁월하여 세계 여러 지역에서 식용과 의약으로 사용되고 있는 인기 있는 식물이다 (Lee, 1980).

최근 연구에서도 잇꽃은 심혈관, 뇌혈관질환, 혈액 정체 및 골다공증 등의 다양한 질병 치료에 대한 효능이 검증되고 있고, 항산화, 진통, 항염 및 항당뇨 활성이 보고되고 있어 기능성 소재로서 잇꽃의 개발 가능성은 높게 평가되고 있다 (Kim *et al.*, 2004).

홍화씨 오일 (safflower oil)은 잇꽃 식물의 씨앗을 압착해서 얻은 오일로 홍화씨 오일에는 불포화지방산 linoleic acid 가 80% 이상 함유되어 있고, 그 외 oleic acid 12%, palmitic acid 7% stearic acid 3% 등과 미네랄 성분이 있다. 홍화씨 오일의 linoleic acid는 콜레스테롤 억제 효과가 높아서 동맥경화증, 고지혈증, 고혈압 등 심혈관계 질환 치료에 사용되며, 골다공증, 관절염 등의 치료에 기능성 원료로 사용되기도 한다 (Watkins and Seifert, 2000).

홍화씨의 성분연구로는 홍화씨에서 분리되어진 세로토닌 유도체 (serotonin derivatives)가 분리되어 다양한 생리활성 연구가 진행된 바, N-feruloylserotonin에서 항산화 활성이 측정되었고 (Beak *et al.*, 1999), N-(*p*-coumaroyl)serotonin에서 항산화 및 항염증 효과가 확인되었으며 (Takii *et al.*, 1999), tyrosinase 억제에 의한 미백효과가 보고되었다 (Roh *et al.*, 2004). 또한, 뼈 형성을 촉진함으로써 갱년기 여성의 골다공증을 예방할 수 있음이 세포 및 동물 실험을 통해 제시되었고 (Kim *et al.*, 2002), 그 외에도 혈소판 응집을 억제하여 항응혈 효과가 있다고 보고하였으며 (Yun-Choi *et al.*, 1986), 고혈압, 동맥경화증, 신경통, 혈액순환에도 효과적일 수 있다고 보고되고 있다 (Kim *et al.*, 2000b).

잇꽃의 꽃은 적색을 나타내는 carthamin과 황색을 나타내는 safflower yellow 색소 성분을 포함하고 있으며 (Bujak *et al.*, 2022), 실제 잇꽃은 전통적으로 염료 식물로 사용되었으며, 혈행 증진과 산후질환 개선에 이용되어왔다. 잇꽃의 주성분으로

알려진 hydroxysafflor yellow A는 수용성 화합물 중 하나로 우수한 약리 활성이 보고되면서 심혈관 개선, 신경 보호 (Ren *et al.*, 2022), 간 (Zhang *et al.*, 2011) 및 폐 보호 (Li *et al.*, 2016), 항암, 비만, 당뇨병 등의 대사 조절 (Adamska and Biernacka, 2021) 등 의학적 용도가 높아 다양한 질환 치료에 이용되고 있다 (Ao *et al.*, 2018).

중국에서는 hydroxysafflor yellow A를 80% 정도 함유한 잇꽃 황색 주사액이 중국식품의약품 (China State Food and Drug)의 승인을 받아 협심증과 같은 심장질환 치료에 의약품으로 처방되고 있다 (Adamska and Biernacka, 2021). 또한, hydroxysafflor yellow A 개발에 이어서 잇꽃의 수성 성분에서 hydroxysafflor yellow B와 C가 분리되면서 산화적 손상에 대한 심근세포의 보호와 심혈관계 질환 개선 효능 평가에 관한 연구가 진행되고 있다 (Yue *et al.*, 2014).

잇꽃은 추출 용매에 따라 성분이 다양하게 분포하는 특징을 나타내는 바, 황색 색소 safflower yellow는 수용성 성분으로 물로 추출되지만, 적색 색소 carthamin은 물에 녹지 않는 알칼리액 수용액으로 추출된다. 실제로 전통 혼례 시 신부가 바르는 연지는 추출 용매에 따라 색소가 다르게 추출되는 점을 이용하여 불용성 적색 색소만을 추출하여 만들었다고 보고하기도 하였다 (Kim and Paik, 1997).

Zhao 등 (2009b)은 잇꽃 불용성 분획물이 모노아민 수송체 (monoamine transporters) 활성 조절을 통해 세로토닌 수송체 (serotonin transporter, 5-hydroxytryptamine transporter)에 대한 억제 기능을 하며 신경장애 조절물질로 뇌 허혈성 질환과 우울증 치료에 잠재성이 있다고 보고하였으며, 잇꽃 불용성 분획물에서 N¹,N⁵-(Z)-N¹⁰-(E)-tri-*p*-coumaroylspemidine 성분을 분리하여 새로운 세로토닌 수송체 억제제로의 우울증 치료제 개발 가능성을 제시한 바 있다 (Zhao *et al.*, 2009a).

잇꽃을 대상으로 유기용매를 달리하여 추출한 추출물의 효능연구에 있어, 에탄올이나 메탄올과 같이 극성이 높은 용매로 추출한 경우, 추출물 전체의 폴리페놀 함량과 항산화 효과가 높았다고 보고하였다 (Salem *et al.*, 2011). 또한, 추출 대상이 종자인지 꽃 자체인지에 따라 효능 차이가 나는 것으로 보고되고 있는데, 홍화씨 메탄올 추출물과 열수 추출물의 폴리페놀 함량은 메탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 총폴리페놀 함량이 2.0 배 더 높았으나 (Kim *et al.*, 2000a), 잇꽃의 경우는 열수 추출물이 메탄올 추출물보다 총폴리페놀량이 1.5 배 더 높았다고 보고되고 있다 (Park and Park, 2003). 또한 Kim 등 (2000a)은 잇꽃의 경우 열수 추출물이 메탄올 추출물보다 DPPH 자유라디칼 소거능이 우수했고, 생체막 지질 과산화 억제 효과도 열수 추출물에서 더 높게 나타났다고 보고하였다. 이는 잇꽃 추출물에 함유된 성분이 꽃과 씨 등 부위별로 다양하고, 동일 부위라도 추출 용매에 따라 추출물의 효능과 성분이 크게 다르게 나타날 수 있음을 의미한다.

잇꽃의 꽃과 씨에 대한 다양한 효능에 관한 연구 중, Kim 등 (2004)은 홍화씨 탈지 유박의 70% 에탄올 추출물에서 procollagen 합성증가와 elastase 활성 저해 효과를 통해 주름 개선 효능을 제시한 바 있다. 그러나 hydroxysafflor yellow A와 같은 수용성 유효성분을 많이 함유하고 있으며, 총폴리페놀 함량이 높은 잇꽃에서는 피부의 주름 개선 및 항노화에 대한 연구가 많이 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 잇꽃에는 더 우수한 효능의 수용성 성분이 함유되어 있다는 가설을 가지고, 안전성을 확보한 열수 추출 방법을 이용하여 잇꽃 열수 추출물의 항산화 효과와 주름 개선 효과를 100% 에탄올 추출물과 비교 연구함으로써 잇꽃 추출물을 기능성 원료로 사용할 수 있는 추출 방법을 결정하고자 하였다. 또한, 주름 개선 효과와 함께 피부노화와 관련된 상처치유 효과를 확인하기 위하여 긁힘 손상에 대한 각질세포의 이동과 피부 단합 효과를 연구함으로써 잇꽃 열수 추출물이 화장품 소재로써 천연색소뿐만 아니라 주름 개선과 상처 치유의 촉진제로서 피부 항노화 소재로의 개발 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

잇꽃 (*C. tinctorius*)은 2020년 서울시 경동시장에서 구입한 후 (주)한국생명과학연구소에서 식물형태학적 검증을 거쳐 암소에 보관한 뒤 사용하였다. 잇꽃은 증류수로 세척하여 건조한 뒤 분쇄하여 제조하였다.

잇꽃 에탄올 추출물의 제조는 잇꽃 10 g에 100% 에탄올 200 ml을 가하여, 80°C의 수조에서 6 시간 동안 추출하였다. 잇꽃 열수 추출물의 제조는 잇꽃 10 g에 증류수 200 ml을 가하여, 100°C에서 6 시간 동안 추출하였다.

잇꽃의 에탄올 및 열수 추출물은 여과지 (No. 1, Whatman International Ltd., Leicestershire, England)를 사용하여 침전물을 제거하고 여과된 추출물은 감압농축기 (400 series, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축시킨 후 동결건조기 (FD 5510 SPT, ILSINBioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea)를 이용하여 건조한 다음 -20°C에 냉동 보관하며 시료로 사용하였다. 잇꽃의 에탄올 (CTE) 또는 열수 추출물 (CTW)의 수율은 각각 14.9%, 28.7%로 확인되었다.

2. 시약

본 실험에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)과 phosphate buffer saline (PBS)는 Welgene (Daegu, Korea)에서, fetal bovine serum (FBS)과 penicillin/streptomycin은 각각 GenDEPOT (Katy, TX, USA)과 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Hydroxysafflor yellow A의 표준시약은 MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)에서 구매하여 사용하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO), ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH), ursolic acid, elastase, N-succinyl-tri-alanyl-p-nitroanilide (STANA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 언급하지 않은 시약들은 모두 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3. HPLC 분석 조건 및 hydroxysafflor yellow A 함량 분석

잇꽃 추출물에 대한 hydroxysafflor yellow A의 함량 분석은 Waters 600 HPLC (Milford, MA, USA)를 사용하여 수행하였다. 각각의 동결 건조된 잇꽃 에탄올 추출물 (CTE) 및 열수 추출물 (CTW) 시료 10 mg에 메탄올 1 ml을 가하여 녹인 것을 100 μ l를 취하여 증류수 900 μ l로 희석하여 이를 30 분간 초음파 추출하였다. 이후 추출액을 5,000 rpm으로 10 분간 원심분리한 뒤, 상등액을 0.45 μ m syringe filter (Whatman Inc., Maidstone, England)를 이용하여 여과하고, 시료 20 μ l를 HPLC에 주입하여 1.0 ml/min의 유속으로 분석하였다.

이동상으로 A 용매는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 water를, B 용매는 0.1% TFA가 함유된 acetonitrile을 86 : 14 (v/v) 비율로 혼합하여 사용하였다. Column은 Phenomenex사의 Luna C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA)를 사용하였으며, isocratic elution 방법으로 흡광도 393 nm에서 분석하였다.

4. 세포배양

Human dermal fibroblast (HDF)는 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서, human keratinocyte (HaCaT)는 Cell Lines Service (CLS, Eppelheim, Baden-Württemberg, Germany)에서 분양받아 실험에 사용하였다.

HDF 및 HaCaT 세포는 모두 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 첨가한 배지를 사용하였다.

5. 세포 생존율 측정

잇꽃 추출물의 HDF 세포와 HaCaT 세포에 독성이 나타나는 농도를 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석법을 이용하여 확인하였다.

96-well plate에 HDF 및 HaCaT 세포를 1×10^4 cells/well의 세포수로 부착한 후, 잇꽃 추출물 CTE와 CTW를 100,

125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 5 mg/ml 의 MTT를 첨가하고 3 시간에서 4 시간 동안 반응한 후 상등액을 제거하였다.

형성된 formazan을 DMSO 200 μl 에 녹이고 microplate reader VICTOR X3 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군과 비교하여 흡광도의 백분율로 표시하였다.

6. DPPH radical 소거활성 측정

96-well plate에 농도별로 희석한 잇꽃 추출물의 시료 100 μl , 99% ethyl alcohol 100 μl , 0.4 mM DPPH 100 μl 를 넣고 상온 암실에서 30 분 동안 방치시킨 후 microplate reader VICTOR X3 (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 대조군과 실험군의 흡광도 차이를 백분율로 산출하였으며, DPPH radical을 50% 저해하는 농도인 IC₅₀ (half-maximal inhibitory concentration)을 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{DPPH radical 소거활성 (\%)} = (1 - \text{대조군 흡광도/실험군 흡광도}) \times 100$$

7. Elastase 활성 억제 효과

96-well plate에 농도별로 희석한 잇꽃 추출물의 시료 10 μl 넣고, 0.2 M Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)에 녹인 1.5 U/ml 효소액 elastase 88 μl 와 기질인 STANA (N-succinyl-trialanyl-p-nitroanilide, 50 mM)액을 2 μl 첨가하였다. 상온에서 20 분간 반응시킨 뒤, microplate reader VICTOR X3 (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 ursolic acid를 사용하였다.

8. qRT-PCR

잇꽃의 에탄올 추출물인 CTE와 열수 추출물인 CTW의 농도별 처리에 따라 HDF에서 collagen 분해와 연관된 MMP-1의 mRNA 발현 수준을 검정함으로써 주름 개선 효능을 평가하고자 각 추출물 처리에 따른 MMP-1의 mRNA 발현 수준을 real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 이용하여 검정하였다.

세포 독성 검정에서 사용되어진 각 추출물의 농도별 처리가 이루어진 HDF 세포를 대상으로 Trizol™ (Ambion, Austin, TX, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였고 cDNA 합성 키트 (ECDNA100, NanoHelix Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 프리미어 qPCR 키트 (PQL-S500, NanoHelix Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR을 증폭하였다.

Table 1. The primer sequence for qRT-PCR.

Genes	Primer sequence	
MMP-1 ¹⁾	F (5' → 3')	AGT GGC CCA GTG GTT GAA AA
	R (5' → 3')	CCA CAT CAG GCA CTC CAC AT
GAPDH ²⁾	F (5' → 3')	GTG GCA AAG TGG AGA TTG CC
	R (5' → 3')	GAT GAT GAC CCG TTT GGC TCC

¹⁾MMP-1; matrix metalloproteinase-1, ²⁾GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

cDNA 합성 조건은 65°C에서 5 분간 RNA denaturation 시킨 후 42°C에서 1 시간 동안 cDNA를 합성하고 95°C에서 5 분간 reverse transcriptase를 불활성화시켰다. PCR 조건은 95°C에서 30 초간 pre-denaturation을 한 후 95°C에서 5 초, 60°C에서 30 초를 40 cycle로 반응하여 원하는 형광값을 검출하였다. 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다 (Table 1).

9. 굶힘에 대한 상처 닫힘 효과

6-well plate에 HaCaT 세포를 8 × 10⁵ cells/well의 세포수를 부착한 후, 세포의 수가 80%에서 90% 정도 채워졌을 때 FBS 무첨가 (serum free) 배지로 교체하여 12 시간 동안 starvation 시켰다.

각 well에 200 μl 의 pipet tip을 이용하여 스크래치 한 후, 농도별로 희석한 잇꽃 열수 추출물을 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 현미경용 카메라 DigiRetina 16 Camera (TUCSEN, Fuzhou, China)를 이용하여 12 시간, 24 시간 배양 후에 촬영하고, 촬영된 이미지는 image J software 프로그램 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 세포 닫힘 정도를 수치화하였다.

10. 통계분석

본 실험의 결과는 3 회 이상 반복한 값을 평균 ± 표준편차 (means ± SD)로 나타내었다. 각 실험 결과에 대한 통계분석은 SPSS 26.0 program (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 One-way Analysis of Variance (ANOVA)를 실시한 후 Tukey HSD 다중분석법을 사용하거나 t-test를 사용하여 각 처리구간의 유의적 차이를 검증하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 잇꽃 용매별 추출물의 hydroxysafflor yellow A 지표성분 함량 분석

잇꽃 (*C. tinctorius*)은 구성하고 있는 적색소와 황색소 중, 황색소의 75%는 hydroxysafflor yellow A로 알려져 있다 (Lu *et al.*, 1991). Hydroxysafflor yellow A는 safflomin A

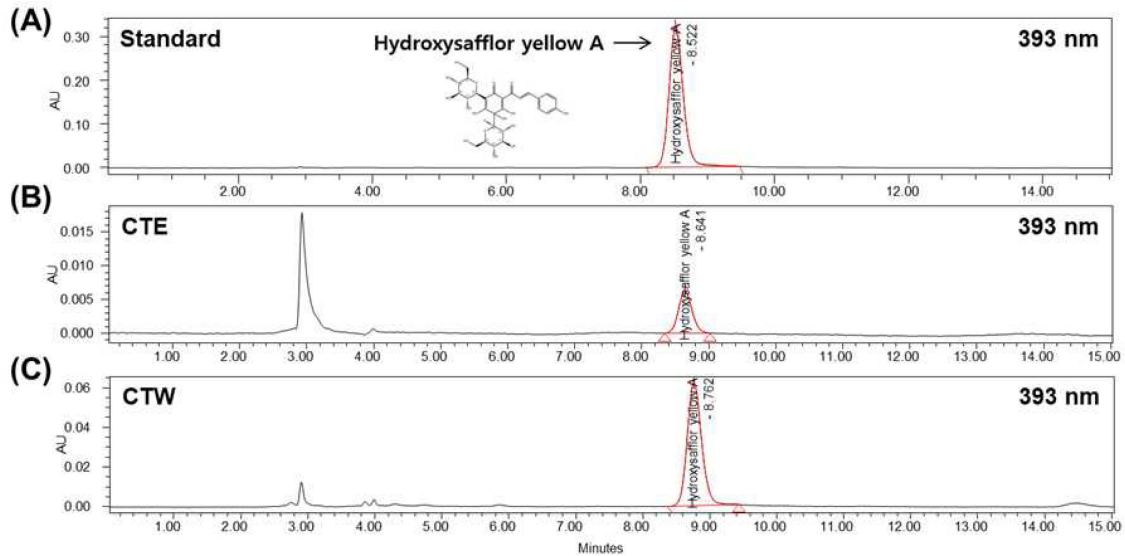


Fig. 1. HPLC chromatograms of hydroxysafflor yellow A. (A); HPLC chromatogram of hydroxysafflor yellow A standard chemical (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (B); HPLC chromatogram of hydroxysafflor yellow A in CTE, (C); HPLC chromatogram of hydroxysafflor yellow A in CTW. CTE; 100% ethanol flower extract of *C. tinctorius*, CTW; hot water flower extract of *C. tinctorius*.

Table 2. Hydroxysafflor yellow A contents in CTE and CTW.

Compound	Contents (mg/g)	
	CTE ¹⁾	CTW ²⁾
Hydroxysafflor yellow A	2.50 \pm 0.21 ^b	19.91 \pm 0.23 ^a

¹⁾CTE; 100% ethanol flower extract of *C. tinctorius*, ²⁾CTW; hot water flower extract of *C. tinctorius*. ^aData are mean \pm SD (n = 3). P values were calculated by t-test (p < 0.01).

라고도 불리며, 잇꽃의 황색 색소 발현 뿐만 아니라, 항산화, 항염증, 항암, 신경보호, 심근 및 뇌보호 효과 등 우수한 생리 활성이 보고되어 있다 (Wang *et al.*, 2021).

에탄올과 열수의 추출용매에 따른 잇꽃 효능연구를 위하여 각 추출물의 hydroxysafflor yellow A 함량을 HPLC 방법으로 분석한 결과 hydroxysafflor yellow A는 약 8.52 분의 retention time을 가진 단일의 peak로 확인되었고 (Fig. 1), 잇꽃의 에탄올 추출물 (CTE)에서 hydroxysafflor yellow A 함량은 2.50 \pm 0.21 mg/g, 열수 추출물 (CTW)의 경우 약 19.91 \pm 0.23 mg/g로 확인되어 CTW의 hydroxysafflor yellow A 함량이 CTE에 비해 약 8 배의 높은 수준으로 함유되어 있음을 확인하였다 (Table 2).

이는 CTW가 물로 추출되는 안전한 잇꽃 추출물로서 hydroxysafflor yellow A 함량이 높은 우수한 효능을 가지는 소재로 개발될 수 있는 가능성을 의미한다.

2. 잇꽃의 용매별 추출물의 세포 독성 평가

HDF 세포는 진피층을 이루고 있는 섬유아세포로 콜라겐

(collagen), 엘라스틴 (elastin) 등 섬유 단백질을 생산하여 세포 외기질 (extracellular matrix, ECM)을 형성하고 피부의 구조적 지지를 유지하여 주름형성에 관여한다 (Brennan *et al.*, 2003).

CTE와 CTW의 효능 평가를 위하여 세포독성이 나타나지 않는 범위를 설정하고자 CTE와 CTW의 처리에 따른 HDF 세포에 대한 독성 평가를 수행하였다. CTW의 경우 실험에 사용한 최고 농도인 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지 세포독성이 확인되지 않아 우수한 안전범위를 나타내었다. 그러나 CTE의 경우 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서부터 유의성 있는 세포독성이 확인되었으며 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 수준에서 39.89%의 세포독성을 나타내었다 (Fig. 2).

인체 피부 섬유아 세포주인 Hs68 세포를 대상으로 하여 핑거루트의 용매별 추출물의 세포독성을 검정한 결과, 에탄올, 메탄올, 클로로포름, 헥산, 에틸아세테이트 추출물 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 높은 독성을 나타냈으나 물 추출물에서는 세포독성이 관찰되지 않았다는 결과와 유사하였다 (Yeon *et al.*, 2019). 또한 MC3T3E1 세포의 골 형성 분화에 대한 잇꽃 및 홍화씨 추출물의 효과에 관한 연구에서도 100 ng/mL 및 200 ng/mL 농도의 홍화씨 추출물 처리군에서 세포 생존율이 최대 40% - 50%까지 현저히 감소한 반면 잇꽃 추출물의 경우 모든 농도에서 MC3T3E1 세포에 대한 독성은 확인되지 않았다고 보고되고 있다 (Yu and shin, 2015).

시료의 농도별 처리가 대상 세포의 생존율을 85% 이하로 감소시키지 않는 경우, 세포독성이 없는 것으로 판단된다는 연구 결과와 (Sandoval-Sicairos *et al.*, 2021), 약용식물에 포함

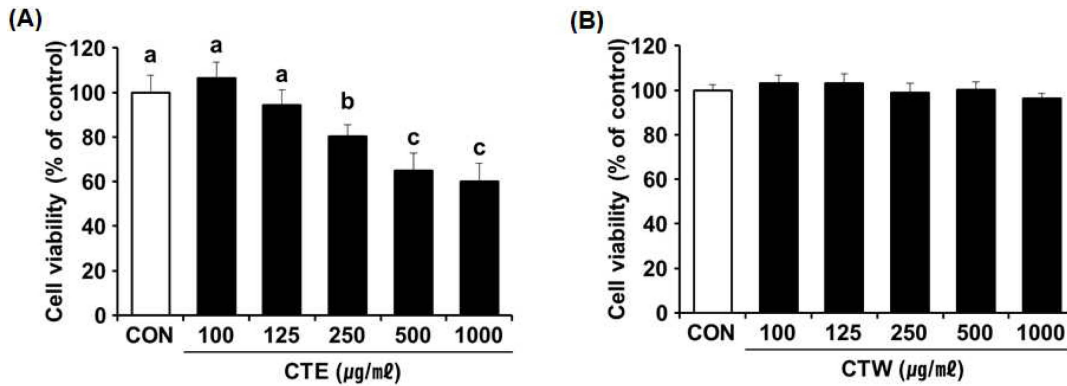


Fig. 2. Cytotoxicity of CTE and CTW on HDF cells by MTT assay. The treatment dose of CTE and CTW ranged from 100 to 1,000 $\mu\text{g/ml}$. Cell cytotoxicity was determined using the MTT assay. The results were expressed as percentages of the untreated control (CON). (A); CTE, (B); CTW. Data are presented as the means \pm SD ($n = 5$). p -values were calculated by One-way ANOVA and Tukey's test. CTE; 100% ethanol flower extract of *C. tinctorius*, CTW; hot water flower extract of *C. tinctorius*, MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

되어진 다양한 생리활성 화합물이 가지는 극성에 의해 추출에 적합한 용매의 선택은 추출의 대상이 되는 식물의 종류와 부위, 특정 화합물에 따라 달라질 수 있다는 점을 고려하여 볼 때 (Truong *et al.*, 2019), 잇꽃을 대상으로 한 추출에 있어 열수 용매의 사용이 에탄올 용매의 사용보다 더 안전한 추출물로서의 제조가 가능함을 확인할 수 있었다.

3. 잇꽃 추출물의 DPPH radical 소거활성 효과

천연소재 추출물의 대표적인 항산화 활성 측정법으로 알려져 있는 DPPH assay로 CTE와 CTW의 항산화 효과를 비교하였다. CTE와 CTW는 유사한 경향을 나타내 처리 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 증가하였다 (Fig. 3).

잇꽃을 대상으로 하여 추출 용매의 종류별 DPPH radical 소거 활성을 비교한 결과, 잇꽃의 에탄올 추출물인 CTE가 열수 추출물인 CTW보다 다소 높게 나타나는 것을 확인하였다.

극성용매 추출에 관한 연구에서 Kim 등 (2000a)은 잇꽃 물 추출물이 메탄올 추출물보다 총폴리페놀량이 1.5 배 더 높았고, DPPH법의 radical 소거능도 물 추출물이 더 우수하게 나타났다고 보고하였다.

이는 잇꽃 추출물의 DPPH 소거능 활성에는 에탄올, 물, 메탄올 순서로의 추출용매 사용이 더 우수한 효과를 나타낼 수 있음을 보여준다. 하지만 추출은 바이오매스 물질로부터 생리활성 화합물을 얻을 수 있는 주요 공정이며 추출 과정의 목적은 표적 화합물의 양을 최대화하고 이러한 추출물의 가장 높고 종합적인 생물학적 활성을 얻는 것으로 (Chang *et al.*, 2002) 특정된 생물학적 활성을 높일 수 있는 용매의 선택 (Mahdi-Pour *et al.*, 2012) 뿐만 아니라 생성된 추출물의 추출 수율과 적용되는 추출 기술, 추출공정의 편이성 등도 고려하여야 할 것으로 생각된다.

양성대조군으로 사용된 ascorbic acid (AA)와 IC_{50} 값으로

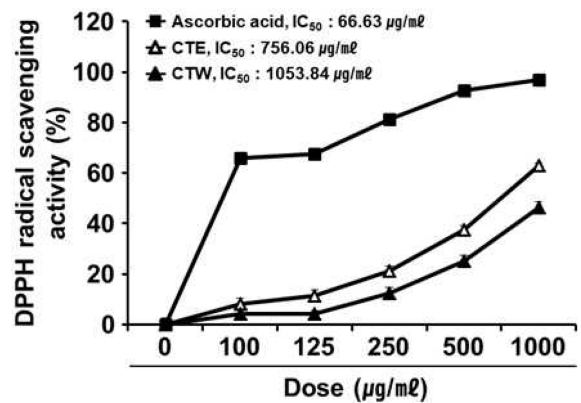


Fig. 3. DPPH radical scavenging activities of the CTE and CTW in various concentrations. Ascorbic acid was used as the positive control. Data are presented as the means \pm SD ($n = 4$). IC_{50} values were determined using the regression equation. CTE; 100% ethanol flower extract of *C. tinctorius*, CTW; hot water flower extract of *C. tinctorius*, DPPH; 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate, IC_{50} ; half-maximal inhibitory concentration.

비교해보면 CTE 756.06 $\mu\text{g/ml}$, CTW 1,053.84 $\mu\text{g/ml}$, AA 66.63 $\mu\text{g/ml}$ 로 확인되었다 (Fig. 3). 양성대조군 AA의 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 96.84%의 DPPH radical 소거 활성 결과를 비교했을 때, CTE 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 62.86%, CTW 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 46.21%로 나타났다. CTW 경우 세포독성이 나타나지 않았던 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 AA 대비 47.7% 정도의 DPPH radical 소거능이 나타났는데, 이는 AA 단일성분의 효과에는 미치지 않지만 CTW가 천연추출물임을 감안할 때 CTW는 우수한 항산화 효과 소재로 판단된다.

4. 잇꽃 추출물의 elastase 활성 억제 효과

주름 생성에 관여하는 진피층의 세포와 세포사이를 이루는

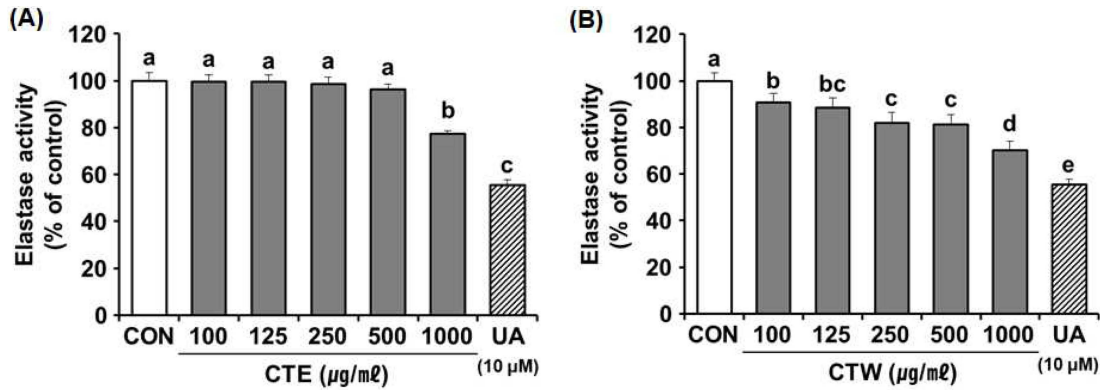


Fig. 4. Elastase activity of CTE and CTW in various concentrations by cell-free assay. Elastase activity was measured using STANA as a substrate and expressed as a percentage of the untreated control (CON). (A); CTE, (B); CTW. Ursolic acid was used as the positive control. Data are presented as the means \pm SD (n = 5). *p*-values were calculated by One-way ANOVA and Tukey's test. CTE; 100% ethanol flower extract of *C. tinctorius*, CTW; hot water flower extract of *C. tinctorius*, UA; ursolic acid, STANA; N-succinyl-tri-alanyl-p-nitroanilide.

extracellular matrix (ECM)은 collagen, elastin 등을 포함한 단백질로 구성되어 있으며 elastase는 elastin을 분해하는 효소로 elastase 활성이 증가되는 것은 ECM내 elastin의 양을 감소시켜 주름 형성을 촉진하는 결과를 나타낸다 (Kim *et al.*, 2016).

본 실험에서는 잇꽃의 에탄올 추출물인 CTE와 열수 추출물인 CTW를 대상으로 elastase 효소 억제 활성을 측정·비교하였다. CTE는 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의적으로 22.59% 억제하였으나, CTW는 실험에 사용한 모든 농도 (100 $\mu\text{g/ml}$ - 1,000 $\mu\text{g/ml}$)에서 농도 의존적으로 elastase 활성을 29.87%까지 억제하였다 (Fig. 4).

Kong 등 (2016)은 잇꽃을 80°C와 25°C로 추출 용매의 온도를 달리하여 추출한 물 추출물을 대상으로 하여 elastase 효소 억제 활성을 비교하여 본 결과, 추출 용매의 온도와 상관없이 동일한 활성을 나타냈다고 보고한 바 있다. 또한 Han 등 (2013)은 잇꽃 70% 에탄올 추출물로 elastase 효소 활성의 억제 효과를 측정한 결과 2 mg/ml의 농도에서 45.90% 억제 효과가 있다고 보고하였다.

본 연구 결과에서도 1 mg/ml의 농도 수준에서 잇꽃의 에탄올 추출물인 CTE가 elastase 효소 활성을 22.59%의 수준으로 억제하는 효과를 나타내어 Han 등 (2013)의 결과와 유사한 경향을 나타내었으나, CTE 1 mg/ml의 농도는 앞서 제시한 결과와 같이 HDF 진피세포에 39.89% 독성을 나타냈던 농도로 안전성이 크게 확보되지 못하는 수준으로 확인된다.

반면 잇꽃의 열수 추출물인 CTW는 1 mg/ml의 농도 수준에서 elastase 활성을 29.87%까지 억제하여 CTE보다 상대적으로 다소 활성은 낮았으나 독성을 나타내지 않아 안전하게 사용할 수 있는 것으로 나타나, 주름개선 효과를 나타내는 소재의 선택에 있어 잇꽃 열수 추출물을 사용하는 것이 안전성과 효능성이 확보될 수 있음을 확인하였다.

5. 잇꽃 추출물의 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 발현 억제 효과

MMP-1은 collagen을 분해하는 collagenase 효소로서, ECM 내에서 활성이 증가된 MMP-1은 콜라겐 섬유를 분해하여 콜라겐 양을 감소시키고, 주름을 형성하며, 피부 처짐과 거친 피부 표면으로 피부노화를 유발하게 한다 (Won *et al.*, 2021).

추출에 사용된 용매에 따라 잇꽃의 주름 개선 효능을 확인하기 위하여 잇꽃의 에탄올 추출물인 CTE와 열수 추출물인 CTW의 처리에 따른 collagenase인 MMP-1의 mRNA 발현 억제 정도를 측정·비교하였다. 측정 결과, 잇꽃의 에탄올 추출물인 CTE는 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 오히려 MMP-1 발현을 증가시켰고, 고농도의 처리 농도인 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 대조군 대비 1.68 배까지 MMP-1의 mRNA 발현이 증가되는 결과를 나타내었다 (Fig. 5A). 잇꽃의 에탄올 추출물인 CTE는 MMP-1을 증가시킴으로써 콜라겐 유지와 주름 개선에 전혀 긍정적인 효과를 나타내지 못하는 것으로 확인된 반면, 잇꽃의 열수 추출물인 CTW는 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 MMP-1 발현을 유의성 있게 억제시키는 결과를 나타내었다 (Fig. 5B).

앞서 나타난 elastase 억제 활성과 함께, MMP-1 mRNA 발현 억제 효과를 검증한 결과, 잇꽃의 열수 추출물인 CTW는 안전 농도에서 MMP-1 발현과 elastase 활성을 동시에 억제하여 ECM 내의 elastin과 collagen의 분해를 억제하여 진피 내에서 ECM의 수준을 유지시켜 줄 수 있는 효과적인 주름 개선 소재라고 생각되어진다.

6. 잇꽃 열수 추출물의 굼힘에 대한 상처 닫힘 효과

노화가 진행됨에 따라 피부 기능은 자연 노화에 의한 내적 요인과 광노화 같은 외적 요인에 의해 악화되는데, 노화된 피부는 정상적인 상처치유 효과를 나타내지 못하고 치유되지 않

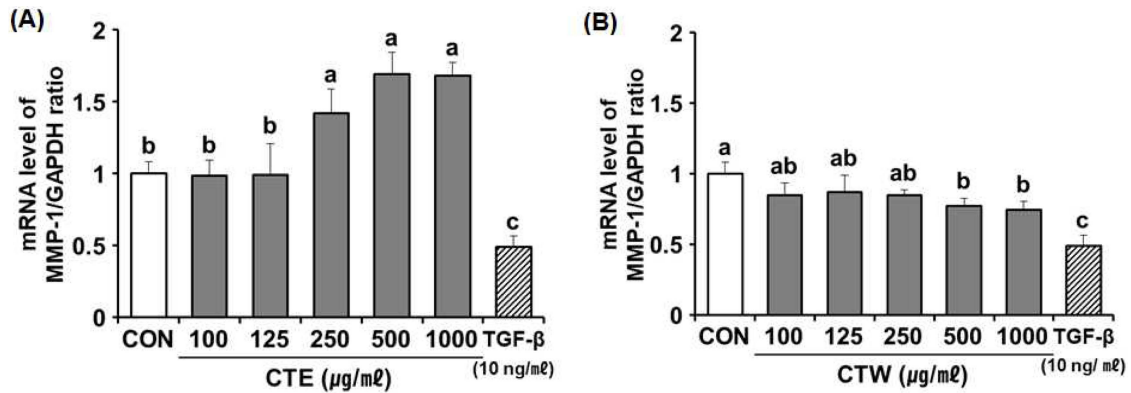


Fig. 5. Effects of CTE and CTW on the mRNA expressions of MMP-1 in HDF cells by qRT-PCR. HDF were treated with different doses of CTE and CTW for 24 h. The mRNA expression levels of the MMP-1 gene were determined using qRT-PCR and normalized to mRNA levels of GAPDH. Results are expressed as an index of the untreated control (CON). (A); CTE, (B); CTW. TGF-β was used as the positive control. Data are presented as the means ± SD (n = 5). *p*-values were calculated by One-way ANOVA and Tukey's test. CTE; 100% ethanol flower extract of *C. tinctorius*, CTW; hot water flower extract of *C. tinctorius*, MMP-1; matrix metalloprotease-1, GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TGF-β; transforming growth factor-β.

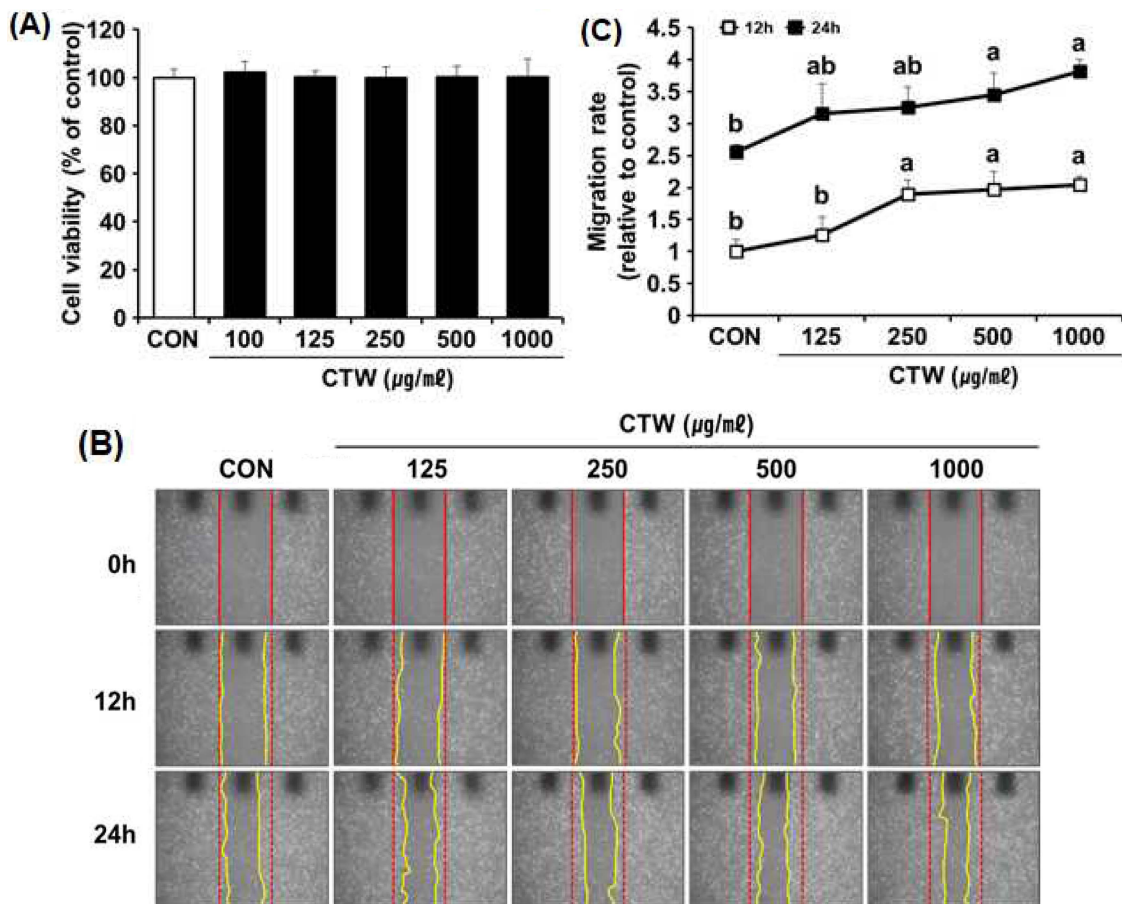


Fig. 6. Effects of CTW on the cytotoxicity, and migration of HaCaT cells. (A); Effects on cell cytotoxicity of CTW ranged from 100 to 1,000 µg/ml, (B); image of cell migration of CTW ranged from 125 to 1,000 µg/ml, (C); the cell migration rates of the 12 h untreated control (CON) were set at 1.0, and the data were expressed as a relative index of CON. Data are presented as the means ± SD (n = 5). *p*-values were calculated by One-way ANOVA and Tukey's test. CTW; hot water flower extract of *C. tinctorius*.

는 상처는 외부 자극에 대하여 더 쉽게 노출되어 취약해짐으로써 새로운 피부질환을 야기하기도 한다 (Sgonc and Gruber, 2013).

잇꽃의 에탄올 추출물인 CTE와 열수 추출물인 CTW의 주름 개선 효과의 비교 연구에서 CTW에서 나타난 elastase 활성 억제 효과와 (Fig. 4B) MMP-1 발현 억제 효과를 통하여 (Fig. 5B) 잇꽃 열수 추출물인 CTW가 피부노화와 관련된 주름 개선에 효과적임을 확인하였다. CTW가 주름 개선 효과 뿐만 아니라 주름 발생과 관련된 노화에도 효과가 있는지 확인하기 위하여 표피 각질형성세포인 HaCaT의 세포독성 평가로 실험에 사용할 농도 범위를 정하고 물리적 긁힘 상처에 대한 세포 단합 효과를 측정한 결과, 잇꽃 열수 추출물인 CTW는 HDF 세포의 경우와 같이 HaCaT 세포에서도 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 모두 세포독성이 확인되지 않아 각질 형성 세포에 있어서도 안전성을 나타내었다 (Fig. 6A).

Park 등 (2018)은 발효시킨 고본 뿌리 추출물을 처리하는 경우, UVB 노출의 광노화 자극에서 긁힘 상처 단합이 크게 지연됨을 확인한 바 있으며 Zhao 등 (2017)은 상처치유 단계 중 열린 상처 (긁힘)에 대한 세포 이동 및 증식은 상처 조직의 재생피화에 의해 피부장벽의 완전성 (integrity)을 유지하는 상처치유에 필수적인 과정이며 중요한 단계라고 하였다.

긁힘에 대한 세포 이동과 증식률로 상처 단합 정도를 측정하기 위해 HaCaT 세포에 scrach를 내어 긁힘으로 열린 상처를 만들고 잇꽃 열수 추출물인 CTW를 처리하고 12 시간 및 24 시간에 걸쳐 상처에 대한 세포 이동률을 측정할 결과, CTW는 12 시간 경과 후, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비해 각각 1.90 배, 1.97 배, 2.04 배의 유의적인 상처 단합 효과를 나타내었고, 24 시간 경과 후에는 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 수준에서 대조군에 비하여 1.35 배, 1.49 배의 유의적인 상처 단합 속도의 증가가 나타났다 (Fig. 6B and 6C).

이상의 결과를 통하여, 잇꽃 열수 추출물인 CTW는 피부 구성의 각질형성세포 및 진피 섬유아세포에서 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이하까지 세포독성이 전혀 나타나지 않아 안전성이 우수한 소재임을 확인하였으며, DPPH radical 소거율이 다소 잇꽃의 에탄올 추출물인 CTE 보다 적게 나타나지만 안전한 농도범위에서 항산화 효과를 나타내고, CTE와는 달리 MMP-1 mRNA 발현 억제와 elastase 효소 억제 활성이 우수하여 항주름개선 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다. 또한, 잇꽃 열수 추출물인 CTW는 긁힘 상처에 대한 세포 이동률을 증가시켜 상처 단합 효과를 12 시간 내 빠르게 나타냄으로써 피부의 항노화 효과가 있음을 확인하였다.

잇꽃의 열수 추출물은 주름 개선과 피부 단합에 의한 항노화 효과를 나타낼 수 있을 뿐만 아니라 천연염료로도 사용하고 있었기 때문에 주름 개선의 기능성 기초 화장품 소

재로서 뿐만 아니라 색소화장품에도 활용할 수 있는 우수한 기능성을 가진 화장품 소재로 활용될 수 있음을 시사한다고 하였다.

감사의 글

본 연구는 2020년 중소벤처기업부의 기술개발사업(과제번호: S2889420)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Adamska I and Biernacka P. (2021). Bioactive substances in safflower flowers and their applicability in medicine and health-promoting foods. *International Journal of Food Science*. 2021: 6657639. <https://www.hindawi.com/journals/ijfs/2021/6657639/> (cited by 2022 April 18).
- Ao H, Feng W and Peng C. (2018). Hydroxysafflor yellow A: A promising therapeutic agent for a broad spectrum of diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018: 8259280. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/8259280/> (cited by 2022 April 18).
- Baek NI, Bang MH, Song JC, Lee SY and Park NK. (1999). N-feruloylserotonin, antioxidative component from the seed of *Carthamus tinctorius* L. *Applied Biological Chemistry*. 42:366-368.
- Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang SW, Fisher GJ, Varani J and Voorhees JJ. (2003). Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochemistry and Photobiology*. 78:43-48.
- Brenneisen P, Sies H and Scharffetter-Kochanek K. (2002). Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: From induction via signaling to initial events. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 973:31-43.
- Bujak T, Zagórska-Dziok M, Ziemska A, Nizioł-Lukaszewska Z, Lal K, Wasilewski T and Hordyjewicz-Baran Z. (2022). Flower extracts as multifunctional dyes in the cosmetics industry. *Molecules*. 27:922. <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/3/922> (cited by 2022 April 18).
- Chang CC, Yang MH, Wen HM and Chern JC. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10:178-182.
- Han MR, KIM NW and Lee YS. (2013). Anti-wrinkle and antioxidative effects of ethanolic extracts of inula flos, chrysanthemi flos and carthami flos. *Journal of Investigative Cosmetology*. 9:29-37.
- Kim HJ, Bae YC, Park RW, Choi SW, Cho SH, Choi YS and Lee WJ. (2002). Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats. *Calcified Tissue International*. 71:88-94.
- Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY and Cho YS. (2000a). Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower(*Carthamus*

- tinctorius* L.). Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 29:1127-1132.
- Kim JB and Paik YS.** (1997). Stability of carthamin from *Carthamus tinctorius* in aqueous solution: pH and temperature effects. Archives of Pharmacal Research. 20:643-646.
- Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT and Yoon KS.** (2004). Anti-wrinkle effect of safflower(*Carthamus tinctorius* L.) seed extract(II). Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea. 30:449-456.
- Kim TG, Kim SH, Kang SY, Jung KK, Park YB, Choi MS, Lee HS and Han HM.** (2000b). Anti-atherogenic effects of curcumin in hypercholesterolemic rabbits. Yakhak Hoeji. 44:71-79.
- Kim YM, Jung HJ, Choi JS and Nam TJ.** (2016). Anti-wrinkle effects of a tuna heart H₂O fraction on Hs27 human fibroblasts. International Journal of Molecular Medicine. 37:92-98.
- Kong MR, Seo SJ, Han MR and Lee YS.** (2016). Anti-oxidation and anti-aging activity of three compositae species at different extraction temperatures. Journal of Investigative Cosmetology. 12:29-37.
- Lee TB.** (1980). Illustrated flora of Korea. Hyangmunsa. Seoul, Korea. p.990.
- Li L, Dong P, Hou C, Cao F, Sun S, He F, Song Y, Li S, Bai Y and Zhu D.** (2016). Hydroxysafflor yellow A(HSYA) attenuates hypoxic pulmonary arterial remodelling and reverses right ventricular hypertrophy in rats. Journal of Ethnopharmacology. 186:224-233.
- Lu ZW, Liu F, Hu J, Bian D and Li FG.** (1991). Suppressive effects of safflower yellow on immune functions. Acta Pharmacologica Sinica. 12:537-542.
- Mahdi-Pour B, Jothy SL, Latha LY, Chen Y and Sasidharan S.** (2012). Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2:960-965.
- Park GS and Park EJ.** (2003). Comparison of the chemical compositions of Korean and Chinese safflower flower(*Carthamus tinctorius* L.). Korean Journal of Food and Cookery Science. 19:603-608.
- Park YA, Lee SR, Lee JW, Koo HJ, Jang SA, Yun SW, Kim HJ, Woo JS, Park MR, Kang SC, Kim YK and Sohn EH.** (2018). Suppressive effect of fermented angelica tenuissima root extract against photoaging: Possible involvement of hemeoxygenase-1. Journal of Microbiology and Biotechnology. 28:1391-1400.
- Ren M, Zhang M, Zhang X, Wang C, Zheng Y and Hu Y.** (2022). Hydroxysafflor yellow A inhibits A β 1-42-induced neuroinflammation by modulating the phenotypic transformation of microglia via TREM2/TLR4/NF- κ B pathway in BV-2 cells. Neurochemical Research. 47:748-761.
- Roh JS, Han JY, Kim JH and Hwang JK.** (2004). Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower(*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 27:1976-1978.
- Salem N, Msaada K, Hamdaoui G, Limam F and Marzouk B.** (2011). Variation in phenolic composition and antioxidant activity during flower development of safflower(*Carthamus tinctorius* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59:4455-4463.
- Sandoval-Sicairos ES, Milán-Noris AK, Luna-Vital DA, Milán-Carrillo, J and Montoya-Rodríguez A.** (2021). Anti-inflammatory and antioxidant effects of peptides released from germinated amaranth during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry. 343:128394. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814620322561> (cited by 2022 April 18).
- Sgonc R and Gruber J.** (2013). Age-related aspects of cutaneous wound healing: A mini-review. Gerontology. 59:159-164.
- Takii T, Hayashi M, Hiroma H, Chiba T, Kawashima S, Zhang HL, Nagatsu A, Sakakibara J and Onozaki K.** (1999). Serotonin derivative, N-(p-coumaroyl) serotonin, isolated from safflower(*Carthamus tinctorius* L.) oil cake augments the proliferation of normal human and mouse fibroblasts in synergy with basic fibroblast growth factor(bFGF) or epidermal growth factor(EGF). Journal of Biochemistry. 125:910-915.
- Truong DH, Nguyen DH, Ta NTA, Bui AV, Do TH and Nguyen HC.** (2019). Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and *in vitro* anti-inflammatory activities of *severinia buxifolia*. Journal of Food Quality. 2019:8178294. <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2019/8178294/> (cited by 2022 April 18).
- Tsukahara K, Takema Y, Moriwaki S, Tsuji N, Suzuki Y, Fujimura T and Imokawa G.** (2001). Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation. Journal of Investigative Dermatology. 117:671-677.
- Wang R, Ren C, Dong S, Chen C, Xian B, Wu Q, Wang J, Pei J and Chen J.** (2021). Integrated metabolomics and transcriptome analysis of flavonoid biosynthesis in safflower(*Carthamus tinctorius* L.) with different colors. Frontiers in Plant Science. 12:712038. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.712038/full> (cited by 2022 April 18).
- Watkins BA and Seifert MF.** (2000). Conjugated linoleic acid and bone biology. Journal of the American College of Nutrition. 19:478-486.
- Won HR, Lee PJ, Oh S and Kim YM.** (2021). Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of TNF- α -induced MMP-1 via MAPK/ERK signaling pathways in human dermal fibroblasts. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 44:18-24.
- Yaar M and Gilchrist BA.** (2007). Photoaging: Mechanism, prevention and therapy. British Journal of Dermatology. 157: 874-887.
- Yeon D, Lee H, Song JH, Yang JW, Kim YH, Jeong HS and Lee JS.** (2019). Protective effect of fingerroot ethanol extract and its water fraction against UVB-induced skin photoaging in human skin fibroblasts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 48:24-31.
- Yu SR and Shin SM.** (2015). Effect of safflower and safflower seed extract on osteogenic differentiation of MC3T3E1 cells. Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 36:518-526.
- Yue S, Tang Y, Xu C, Li S, Zhu Y and Duan JA.** (2014). Two new quinochalcone C-glycosides from the florets of *Carthamus tinctorius*. International Journal of Molecular Sciences. 15:16760-16771.
- Yun-Choi HS, Kim JH and Lee JR.** (1986). Screening of potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources(II).

Korean Journal of Pharmacognosy. 17:19-22.

Zhang Y, Guo J, Dong H, Zhao X, Zhou L, Li X, Liu J and Niu Y. (2011). Hydroxysafflor yellow A protects against chronic carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *European Journal of Pharmacology*. 660:438-444.

Zhao G, Gai Y, Chu WJ, Qin GW and Guo LH. (2009a). A novel compound $N^1, N^5-(Z)-N^{10}-(E)$ -tri-p-coumaroylspermidine isolated from *Carthamus tinctorius* L. and acting by serotonin transporter inhibition. *European Neuropsychopharmacology*. 19:

749-758.

Zhao G, Zheng XW, Gai Y, Chu WJ, Qin GW and Guo LH. (2009b). Safflower extracts functionally regulate monoamine transporters. *Journal of Ethnopharmacology*. 124:116-124.

Zhao P, Sui B, Liu N, Lv Y, Zheng C, Lu Y, Huang W, Zhou C, Chen J and Pang D. (2017). Anti-aging pharmacology in cutaneous wound healing: Effects of metformin, resveratrol, and rapamycin by local application. *Aging Cell*. 16:1083-1093.