

Kaempferol 및 Kaempferol Rhamnosides의 항산화 활성 및 항염 효과에 관한 연구

이근하·조영룡·주철규·주연정·권순상·안수미*·오수진*·노호식**·박청[†]

(주)모아캠 기술연구소, *경희대학교 피부생명공학센터, **(주)아모레퍼시픽 기술연구원
(2011년 9월 8일 접수, 2011년 9월 15일 수정, 2011년 9월 16일 채택)

Study on the Antioxidative Activities and Anti-Inflammatory Effect of Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides

Keun Ha Lee, Young Long Cho, Chul Gue Joo, Yeon Jeong Joo, Sun Sang Kwon,
Soo Mi Ahn*, Su Jin Oh*, Ho Sik Rho**, and Chung Park[†]

R&D Center, Morechem Co., Ltd., 536, Segyo-dong, Pyongtaek-si, Gyeonggi-Do, 450-818, Korea

*Kyung Hee University Skin Biotechnology Center

**R&D Center, Amorepacific Corporation

(Received September 8, 2011; Revised September 15, 2011; Accepted September 16, 2011)

요약: 본 연구에서는 kaempferol 및 그 배당체의 항산화 및 항염증 효능을 평가하기 위해 free radical 소거활성, ROS inhibition assay, TARC 생성 억제 관련 실험을 수행하였다. 또한 kaempferol과 그들의 rhamnosides (α -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin)의 구조에 따른 생리적 활성의 상관관계를 조사하였다. Kaempferol과 α -rhamnoisorobin은 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)에서 각각 62.5, 50.0 μ M이 측정되었으며 afzelin과 kaempferitrin은 농도와 상관없이 free radical 소거활성을 나타내지 않았다. ROS inhibition assay에서는 시료 농도를 10, 50, 100 μ M을 처리한 결과 kaempferol은 대조군(100%)에 비하여 ROS 발현 농도를 각각 97.5, 57.8, 47.8%로 감소하였으며 α -rhamnoisorobin은 93.1, 59.1, 41.4%의 감소를 나타내었다. TARC (thymus and activation regulated chemokine) 생성 억제 실험을 통해 시료의 항염증 효능을 평가한 결과 kaempferol은 10, 50, 100 μ M 농도에서 대조군(100%)에 대비하여 각각 48.8, 5.5, 4.4%로 농도 의존적으로 TARC 생성을 감소시켰으며, α -rhamnoisorobin은 88.1, 19.0, 1.0%로 TARC 생성의 감소 효능을 나타내었다. 결론적으로 kaempferol과 그들의 rhamnoside 중 kaempferol과 α -rhamnoisorobin은 항산화, 항염증에 대한 우수한 효능을 나타내는 것으로 사료되며 더 나아가서는 항노화 및 항염증에 효과가 있는 기능성 화장품에 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, to evaluate the antioxidative activities and anti-inflammatory effects of kaempferol and its rhamnosides, we performed the free radical scavenging assay, ROS inhibition assay and TARC (thymus and activation-regulated chemokine) assay. Also, we studied physiological activity of kaempferol and its rhamnosides (α -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin) by structure-activity relations. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities were determined with kaempferol (62.5 μ M) and α -rhamnoisorobin (50.0 μ M) but afzelin and kaempferitrin did not show free radical scavenging activities. Kaempferol showed a 97.5, 57.8, 47.8% inhibition of ROS (reactive oxygen species) generated at concentrations of 10, 50 and 100 μ M, compared to control (100%). α -rhamnoisorobin showed a 93.1, 59.1 and 41.4% inhibition of ROS at the same concentration. We investigated the inhibitory effects of kaempferol and its rhamnosides on TARC expression. Kaempferol showed a 48.8, 5.5 and 4.4% inhibition of TARC generated at 10, 50 and 100 μ M, compared to control. α -Rhamnoisorobin showed a 88.1, 19.0 and 1.0% inhibition of TARC generated at the same concentration. In conclusion, these results indicate that kaempferol and α -rhamnoisorobin have good antioxidative activities and anti-inflammatory effects that could be applicable to new functional cosmetics for anti-aging and anti-inflammation.

Keywords: kaempferol, kaempferol rhamnosides, antioxidative activity, anti-inflammatory effect, functional cosmetics

[†] 주 저자 (e-mail: park007chung@hanmail.net)

1. 서 론

기능성 화장품 시장의 비중이 점차 늘어남에 따라, 기능성 소재개발 검색 시간을 최소화하며 보다 빠르고 대량으로 합성하는 과정을 목표로 연구가 진행되고 있다. 분자구조와 활성도의 관계(structure-activity relationship)가 밀접하게 관련이 있음이 이미 알려진 바 있어 이에 초점을 맞추어 개발되는 추세이다. 이러한 구조-활성 관계는 작용기 하나만으로 분자구조를 변형하여 더 우수한 효능을 기대할 수 있는 특성을 갖고 있기 때문이다. 이에 본 연구에서는 플라보노이드계의 일종인 kaempferol과 그 배당체인 α -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin에 대한 항산화 및 항염 효능 연구를 수행하였으며 결과를 바탕으로 kaempferol과 그들의 rhamnoside 구조를 통해 생리활성의 상관관계를 조사하였다. 플라보노이드는 과일, 채소, 허브의 노란색(flavus)을 구성하는 약 4,000여 개의 화합물을 총칭하며 2-phenylbenzopyrone의 구조를 갖는 페놀성 화합물이다[1]. 플라보노이드는 항바이러스 작용, 항산화 작용, 항염작용 외에도 암 발생을 낮추며 다양한 질병의 발생을 예방하는 것으로 알려져 있으며[2,3] 수용성, 지용성 또는 그 중간극성 등 다양한 용해성을 나타내기 때문에 인체에 섭취될 경우 세포의 여러 부분에서 기능을 발휘한다는 것이 임상학적으로 많이 증명되고 있다[4,5]. 또한 플라보노이드의 구조에 따른 생물학적인 활성관계에 관한 연구는 점차적으로 증가 추세에 있으며, 많은 임상학적인 실험을 통한 체내 활성기전의 연구 필요성이 대두되고 있다[6-9]. 과도한 자외선으로 인한 산화적 스트레스, 주름 유발 및 피부성 염증은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 유발시킨다. ROS란 $^1\text{O}_2$, H_2O_2 와 같은 비라디칼종과 $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 와 같은 산소중심의 라디칼들, 그리고 생체 성분과 ROS와의 반응에서 유래된 $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 ROCl 등이 포함된다. 이들은 고에너지 복사선, 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다. 생체 내에서 과잉의 활성산소가 생성되면 돌연변이, 염증, 세포살상, 발암과 피부노화 등이 나타난다[10-15]. 또한 피부내의 콜라겐을 분해시켜 피부 탄력을 감소시키고, 염증성 cytokine의 분비를 초래하게 된다. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 특히 사람 피부 섬유아세포에서 $^1\text{O}_2$ 이 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을

유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 $^1\text{O}_2$ 이 매개할 수 있다고 보고되고 있다[16-20].

본 연구에서는 이들 parameter를 중심으로 항산화, 항염증 연구를 수행하고 kaempferol과 그들의 rhamnoside 구조에 따른 생리활성의 상관관계 분석을 통해 기능성 화장품 소재로의 응용가능성을 연구하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

실험에 사용된 시료는 전라북도 부안군에서 채취한 쌍떡잎식물인 양마(*Hibiscus cannabinus* L.)로부터 kaempferitrin을 분리 정제하여 가수분해를 통한 선택적인 분리 공정을 거쳐, 지표수준의 고순도 kaempferol, α -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin을 얻어 실험에 사용하였다. 세포독성 평가 및 항산화와 항염실험을 위한 흡광도 측정용 TECAN (Infinite M200, Switzerland)사의 제품을 사용하였고 TARC 양을 측정하기 위해 human TARC immunoassay kit (R&D system, DDN00)를 사용하였으며, HPLC는 Agilent (1200series, USA)사의 제품을 사용하였다.

Free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였고, ROS 실험을 위한 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)은 Welgene사에서, 2,7'-dichlorodihydrofluorescein deacetate (DCF-Da)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용한 세포주인 HaCaT cell (human keratinocyte, HaCaT)과 HDF-N cell은 ACTT (USA)에서 구입하였으며 세포배양에 필요한 배지 및 시약은 Welgene (Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 분석에서 사용한 acetic acid와 acetonitrile (ACN)는 chromatographic grade를 사용하였으며 J.T Baker (USA)에서 구입하였다.

2.2. 세포주 및 배양

세포주는 시험 항목에 따라 알맞게 선별하여 사용하였다. 항산화 실험 및 항염증 실험에서 사용한 세포주는 human 각질세포인 HaCaT cell이며, 배양접시 바닥에 접종한 후 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10 % FBS를 함유하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)를 넣고 37 °C를 유지하며 5 % 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양하였다.

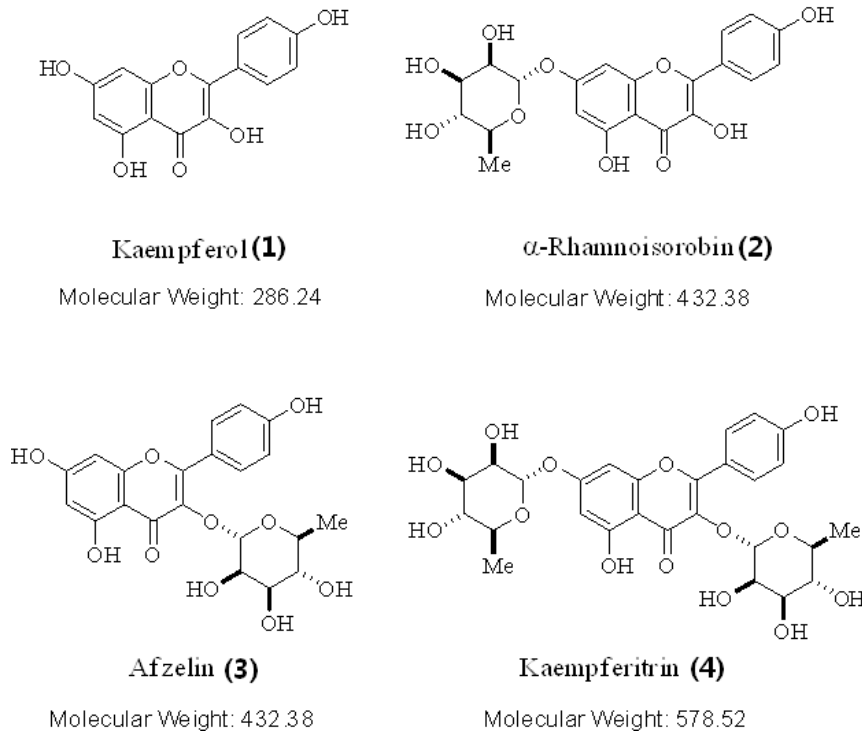


Figure 1. Structure and molecular weight of kaempferol and its rhamnosides (α -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin).

2.3. 검액의 조제

본 연구에서 사용되는 검액은 kaempferol (1), α -rhamnoisorobin (2), afzelin (3), kaempferitrin (4)이며 이들의 구조식 및 분자량은 Figure 1에서 보는 바와 같다. 각 시료는 DMSO에 용해시켰으며 실험 시 농도는 WST-1 assay를 통하여 예비실험을 진행한 후 세포독성을 나타내지 않는 농도를 선택하였다. 실험 물질은 시험 항목에 맞는 세포주에 따라 세포 배양 배지에 희석하여 사용하였으며, 예비시험 후, 효력을 나타내는 농도를 찾아 3개를 선정, 항산화 및 항염증 효능을 확인하였다. 각 실험의 양성 대조군 역시 세포주에 따른 세포 배양 배지로 희석하여 처리하였다.

2.4. 세포독성평가

검액의 독성을 확인하기 위해, HaCaT cell과 HDF-N cell에서의 세포독성을 측정하였다. HaCaT cell은 96 well plate에 well 당 5×10^4 cell의 농도로, HDF-N cell은 96 well plate에 well 당 6×10^3 cell의 농도로 분주한 다음 세포 배양조건에서 24 h 배양하였다. 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤, 12 h의 기아상태를 유지시킨 후 검액 및 새로운 배지(media supplement 제외)를 넣고, 24

Table 1. HPLC Conditions for Separation of Kaempferol and Its Kaempferol Rhamnosides

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 250 × 4.6 mm I.D., 5 μ m
Detector	DAD 340 nm
Flow rate	0.5 mL/min
Column oven Temp.	25 $^{\circ}$ C
Mobile phase	2 % acetic acid in H ₂ O : 100 % acetonitrile (92 : 8 ~ 10 : 90, Gradient)

h 동안 배양하였다. 또 검액 및 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 세포의 생존율을 측정하기 위해 WST-1 반응액을 supplement가 제외된 배지에 1 : 10로 희석하고 이를 각 well당 100 μ L씩 처리하여 1 h 동안 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. HPLC 분석

Kaempferol과 그들의 rhamnoside의 chromatography

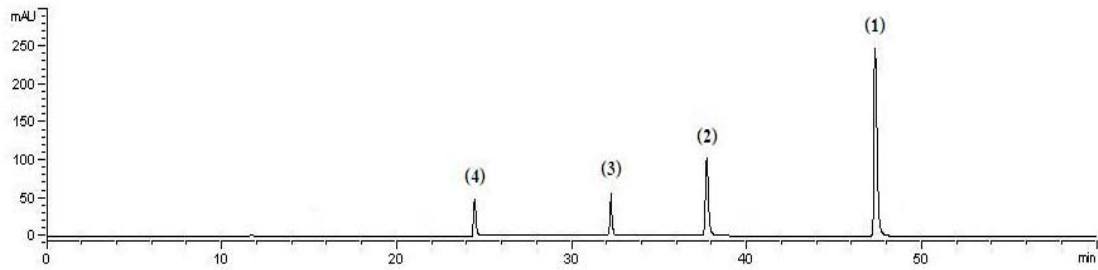


Figure 2. HPLC chromatogram of kaempferol and its rhamnosides. 1: kaempferol, 2: α -rhamnoisorobin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin.

적인 특성을 연구하기 위해 HPLC (high performance liquid chromatography)를 이용하여 C₁₈ 컬럼(Zorbax XDB - C₁₈ 4.6 × 250 mm, Agilent, USA)과 diode array detector (DAD, Agilent Technologies, USA) 340 nm 파장에서 분석하였으며, 2 % acetic acid 수용액과 acetonitrile (ACN) 용매를 사용한 기울기 용리법으로 분리하였고, 이때 HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었으며 구조에 따른 HPLC chromatogram은 Figure 2에 나타내었다.

2.6. 항산화 효과 측정

2.6.1. DPPH assay

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 각 시료에 대한 free radical 소거활성은 DPPH를 이용하여 시료의 항산화 활성을 측정하였다. 특히 DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 520 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. 이 물질은 여러 가지 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다.

이에 따라 DPPH 용액과 농도별로 용매에 용해시킨 시료를 혼합하여 30 min 동안 반응시키고 30 min 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도인 FSC₅₀ 값(free radical scavenging activity)을 통해 항산화 활성을 분석하였다.

2.6.2. ROS inhibition assay

세포 내의 활성산소 수준을 측정하기 위해 DCF-da (dichlorofluorescein diacetate) 염색 방법을 사용하였다. DCF-da는 비극성 분자로 세포 내로 들어가면서 DCFH로 분해되고, 세포 내의 활성산소에 의해 녹색형광을 나

타내는 DCF로 변화한다. 따라서 세포 내의 활성산소의 농도가 높을수록 높은 흡광도를 나타낸다. 이러한 방법으로 피부에서의 항산화능을 측정하기 위해 세포 내 활성산소종의 억제능을 측정하였다. HaCaT cell을 96 black well plate에 5 × 10⁴ cells/well로 분주하고 약 24 h 배양한 후, 시료를 처리하여 37 °C, 5 % CO₂의 조건에서 3 h 동안 배양한다. 배양 후, 배지를 제거한 다음, HBSS로 희석된 50 μM의 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 첨가하고, 1 h 배양하였다. HBSS로 2회 세척한 다음 UVB를 25 ~ 30 mJ/cm²의 조사량으로 조사 또는 비조사하고, 2 h 배양한 뒤에 fluorescence microplate reader를 사용하여 excitation 파장 485 nm, emission 파장 535 nm에서 fluorescence intensity를 측정하였다. 또한 FITC 필터를 이용한 형광사진을 통해 세포를 이미지로 관찰하였다.

2.7. 항염증 효과 측정

2.7.1. TARC (Thymus and Activation-Regulated Chemokine) Assay

TARC는 chemokine receptor CCR4 (peripheral blood mononuclear cell과 human T-cell에서 발현)에 작용한다. Macrophage-derived chemokine과 TARC는 CCR4에 대해 경쟁적 관계이다. TARC는 또한 CCR8에 결합하기도 한다. CCR4와 CCR8 발현은 일시적으로 활성화된 T cell에 의해 up-regulate 된다. TARC는 TH2 세포의 trafficking을 위한 specific chemokine이다. 아토피 피부염의 경우 TARC의 증가가 일어나므로 세포에 각각의 시료 처리 후 TARC의 양을 측정하여 아토피의 완화를 간접적으로 측정할 수 있다.

본 실험에서는 HaCaT cell을 이용하여 TARC의 생성을 측정함으로써 검역의 항염증 개선 정도를 실험하고자

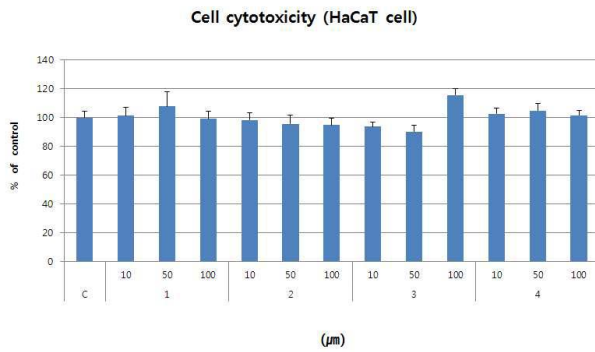


Figure 3. Cell cytotoxicity of kaempferol and its rhamnosides on HaCaT cell. 1: kaempferol, 2: α -rhamnoisorobin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin.

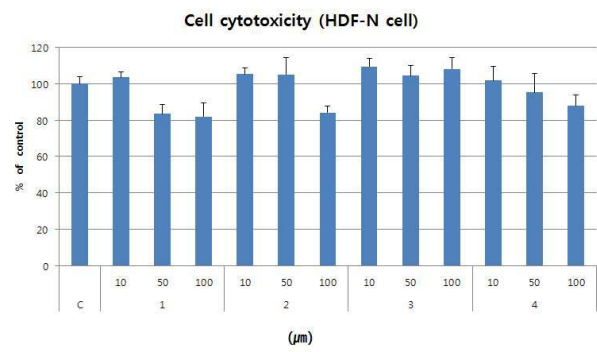


Figure 4. Cell cytotoxicity of kaempferol and its rhamnosides on HDF-N cell. 1: kaempferol, 2: α -rhamnoisorobin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin.

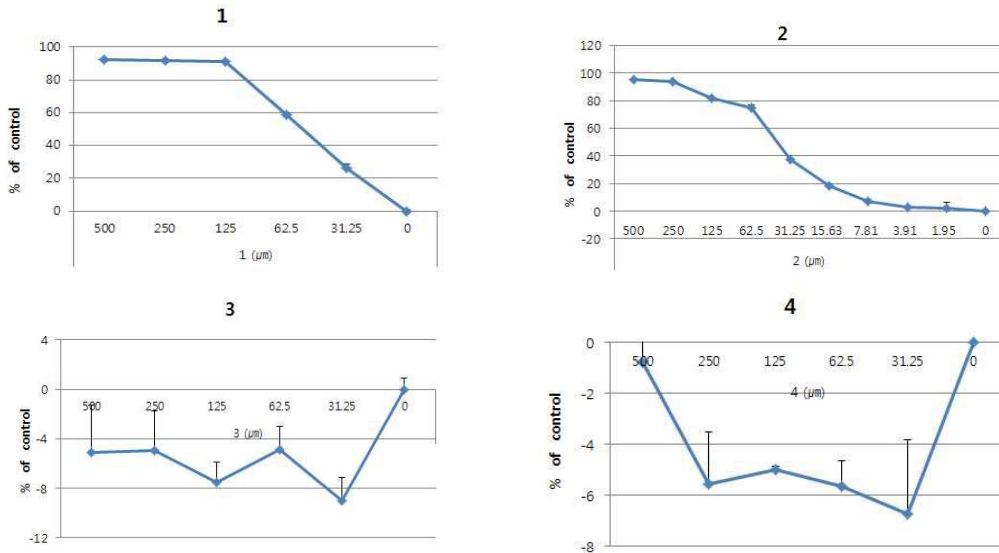


Figure 5. Free radical scavenging activity of kaempferol and its rhamnosides. 1: kaempferol, 2: α -rhamnoisorobin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin.

하였다. 각질세포인 HaCaT cell을 48 well plate에 7×10^4 cells/well로 분주한 다음 세포배양 조건에서 24 h 동안 배양하였다. 24 h 이후 배지를 버리고 DPBS로 세척한 다음, FBS가 함유되지 않는 DMEM 배지로 교체하여 기아상태를 12 h 동안 유지시켰다. 12 h 후, 배지를 제거하고 10 ng/mL의 INF- γ 와 10 ng/mL의 TNF- α 및 검액을 적당한 농도로 배지에 희석한 후 처리하여 세포 배양 조건에서 72 h 배양하였다. 양성대조군은 dexamethasone을 사용하였으며, 농도는 100 μ g/mL로 처리하였다. 72 h 후 배양액을 취하여 human TARC immunoassay kit를 사용하여 TARC 양을 측정하였다. 측

정된 TARC 양은 총 단백질 양으로 보정하였다.

2.8. 통계

모든 자료는 mean \pm SD로 나타내었고, 통계처리는 student's *t*-test를 사용하였으며 $p < 0.005$ 의 유의확률과 양측검정을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성 평가

시료 4종에 대한 *in vitro* 세포독성은 HaCaT cell과

Table 2. Free Radical Scavenging Activities of Kaempferol and Its Rhamnosides

Compounds	Scavenging activity (FSC ₅₀ , μ M)
Kaempferol	62.5
α -Rhamnoisorobin	50.0
Afzelin	-
Kaempferitrin	-
Vitamin C	500

HDF-N cell에서 수행하였으며, 세포의 미토콘드리아 활성에 의존하여, 세포의 생존을 결정할 수 있는 WST-1 반응액에 의해 측정되었다. 세포 생존율은 시료를 제외한 배양배지만 처리한 값(control)에 대한 백분율로 나타내었다. 그 결과, HaCaT cell에 대한 시료 독성은 4종 시료 모두 100 μ M 농도까지 90.0 % 이상의 생존율을 보였다(Figure 3). 또한, HDF-N cell에 대한 세포독성은 4종 시료 모두 100 μ M 농도까지 80.0 % 이상의 생존율을 보여 세포독성을 나타내지 않았다(Figure 4). 그러므로 추후 실험에 사용할 시료의 최고 농도는 4종 시료 모두 100 μ M 농도로 선택하였다.

3.2. 항산화 효과

3.2.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

항산화 효능을 평가하기 위해 DPPH 용액을 이용하여 DPPH assay를 수행하였다. 시료와 DPPH 용액을 반응시킨 후 free radical 소거 활성을 FSC₅₀ 값으로 구하였다. Figure 5 및 Table 2에서 보는 바와 같이 시료 4종 모두 500 μ M부터 free radical 억제율을 측정된 결과, kaempferol (1)의 FSC₅₀ 값은 62.5 μ M이며, α -rhamnoisorobin (2)의 FSC₅₀ 값은 50 μ M으로 측정되었다. 양성 대조군으로 사용한 비타민 C의 항산화능 FSC₅₀ 값은 500 μ M로 측정되었다. 그러나 afzelin (3)과 kaempferitrin (4)는 농도와 상관없이 free radical 억제율에 대한 효능을 보이지 않았다.

3.2.2. ROS Inhibition Assay

시료 4종이 UV에 의한 HaCaT cell의 산화적 손상을 보호하는 효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ROS inhibition assay를 실시하였다. 그 결과 Figure 6에서 보는 바와 같이 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비하여,

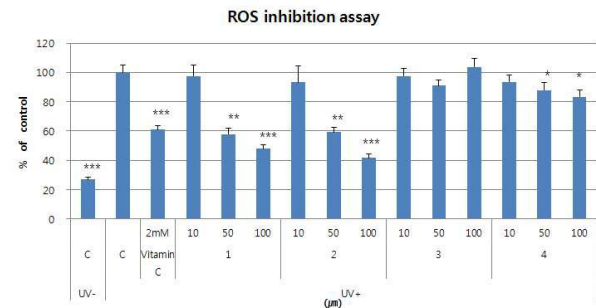


Figure 6. Inhibitory effects of kaempferol and its rhamnosides on ROS generated in HaCaT cell at 2 h after irradiated with 30 mJ/cm² UVB. 1: kaempferol, 2: α -rhamnoisorobin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin (*p < 0.01, **p < 0.001, ***p < 0.0001).

UVB를 처리한 실험군에서 유의성 있는 형광 강도의 증가를 보였다. 이로써 UVB의 처리가 HaCaT 세포의 산화적 손상을 효과적으로 유도하였음을 알 수 있었다. 또한, 4종의 물질을 처리하였을 때, 4종 중 kaempferol (1)과 α -rhamnoisorobin (2)에서 UVB에 의해 증가된 ROS 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. Kaempferol (1)을 10, 50, 100 μ M를 처리한 결과 대조군(100 %)과 대비하여 각각 97.5, 57.8, 47.8 %로 감소하였다. α -Rhamnoisorobin (2)을 10, 50, 100 μ M를 처리한 결과 대조군과 대비하여 93.1, 59.1, 41.4 %로 감소하였다. 또한 kaempferitrin (4)을 10, 50, 100 μ M를 처리한 결과 대조군과 대비하여 93.5, 87.7, 83.2 %로 감소하였다. 더불어, 형광현미경으로 촬영한 이미지에서도 UVB 처리 시 증가되는 ROS 생성량에 따른 형광 강도가 kaempferol (1)과 α -rhamnoisorobin (2)을 처리 시 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 7). 양성대조군으로 사용한 비타민 C 역시 ROS 생성이 유의적으로 저해됨을 알 수 있었다.

3.3. 항염증 효능 평가

3.3.1. TARC (Thymus and Activation-Regulated Chemokine) 생성 억제능 시험

본 실험은 시료의 항염증 효능을 평가하기 위해 식품의약품안전청에서 발간한 아토피피부염 효력시험 가이드라인(1-019-2010-0000)을 참조하였다. 가이드라인 중 *in vitro* parameter 중의 하나인 TARC를 immunoassay ELISA로 측정함으로써 시료의 항염증 효능을 평가하였다. 그 결과 Figure 8에서 보는 바와 같이 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비하여, IFN- γ 및 TNF- α 를 처

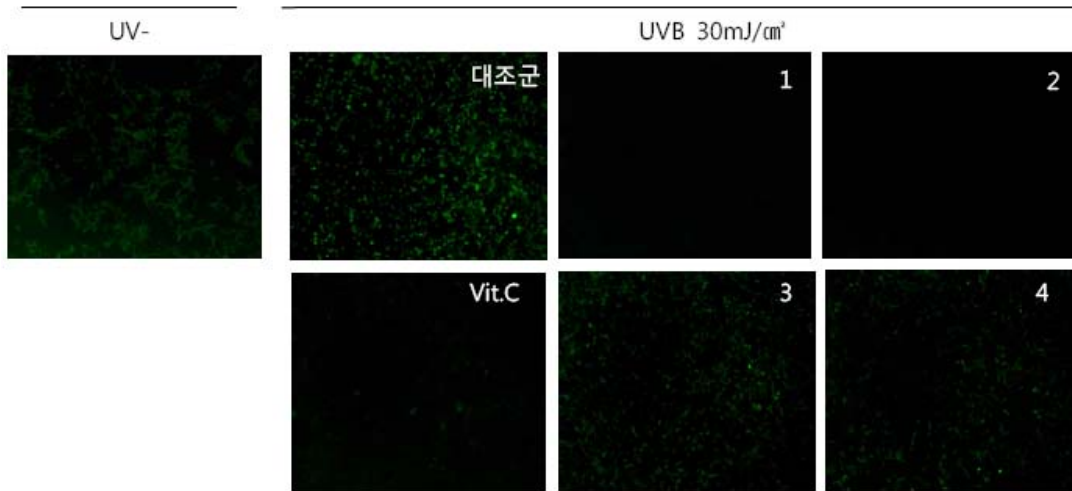


Figure 7. Fluorescence image of HaCaT cell irradiated with 30 mJ/cm² UVB (by fluorescence microscope). 1: kaempferol, 2: α-rhamnoisorobin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin.

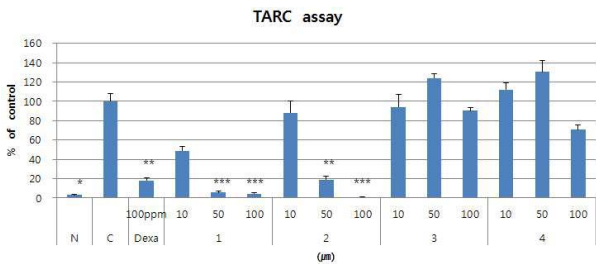


Figure 8. Inhibitory effects of kaempferol and its rhamnosides on TARC generated in HaCaT cell at 72 h after IFN-γ and TNF-α treatment. 1: kaempferol, 2: α-rhamnoisorobin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin (*p < 0.001, **p < 0.0001, ***p < 0.00005).

리한 실험군에서 유의성 있는 TARC 생성의 증가를 보였다. 이로써 IFN-γ 및 TNF-α의 처리가 HaCaT 세포의 염증을 효과적으로 유도하였음을 알 수 있었다. 또한, 시료 4종 모두 10, 50, 100 μM를 처리한 후 상등액으로 TARC를 측정된 결과, kaempferol (1)의 경우 대조군(100%)에 대비하여 각각 48.8, 5.5, 4.4%로 농도 의존적으로 감소한 경향을 보였다. 또한 α-rhamnoisorobin (2)의 경우 역시 대조군에 대비하여 각각 88.1, 19.0, 1.0%로 TARC 생성이 농도 의존적으로 감소한 경향을 확인하였다. 그러나 afzelin (3)과 kaempferitrin (4)의 경우는 농도와 상관없이 TARC 생성 감소 효능을 보이지 않았다.

한편, 양성 대조군으로 사용한 dexamethasone을 100 μg/mL를 처리하였을 경우는 대조군과 대비하여 TARC 생성이 17.8%로 감소하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 시료 4종(kaempferol, α-rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin)을 대상으로 항산화, 항염증과 같은 피부 효능 평가를 수행하였으며 그 결과를 바탕으로 kaempferol과 그들의 rhamnoside의 구조에 따른 생리활성의 상관관계를 조사하였다. 4종의 시료는 최고 농도 100 μM까지 HaCaT cell과 HDF-N cell에서 80% 이상의 세포 생존률을 보여 세포 독성은 없는 것으로 판단되었다. 한편, 항산화 효능 평가를 진행한 결과 kaempferol과 α-Rhamnoisorobin은 DPPH assay 및 ROS inhibition assay에서 free radical과 산소활성종을 억제함으로써 항산화 효능을 나타내는 것으로 판단되었다.

항염증 효능평가는 TARC 농도를 측정함으로써 효능을 평가하였다. TARC 농도를 immunoassay로 측정된 결과 kaempferol과 α-rhamnoisorobin은 농도 의존적으로 감소시킴으로써 항염증 효능을 보였다.

위의 실험결과들을 종합해 보면, 시료 4종 중 kaempferol과 α-rhamnoisorobin은 항산화, 항염증에 대한 우수한 효능을 나타내며 이는 4개 시료 물질의 구조식과 대비하여 비교하여 볼 때, 본 실험에서 효능을 나타내었던 kaempferol과 α-rhamnoisorobin은 구조식에서 3번 위치에서 hydroxyl 작용기를 갖고 있었으나, 비교적 우수한 효능을 보이지 않았던 다른 2종의 시료 afzelin과 kaempferitrin은 3번 위치에서 hydroxyl 작용기를 갖고 있지 않음을 통해 3'-hydroxyl기는 항산화 및 항염증과 관련된 활성을 나타내는데 중요한 작용을 하는 것으로

사료된다. 이상의 결과들을 통해 kaempferol과 α -rhamnoisorobin는 항산화, 항염증에 대한 우수한 효능이 있는 기능성 화장품원료로서의 응용가능성이 있으며 이러한 구조-활성 관계는 작용기 하나만으로 분자구조를 변형하여 더 우수한 효능을 기대할 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 시행한 "2010년도 중소기업기술혁신개발사업(과제번호 : S1075444)"의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. B. Havsteen, Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *B. Pharm.*, **32**, 1141 (1983).
2. H. Tapiero, K. D. Tew, G. Ba, G. Nguyen, and Mathe, Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?, *Biom. Pharmacol.*, **56**, 200 (2002).
3. B. E. Leibovitz and J. A. Mueller, Bioflavonoids and polyphenols: medical applications, *J. Optimal Nutr.*, **35**, 217 (1993).
4. Rothwell, J. A. Day, A. J. Morgan, and M. R, Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids, *J. Agric. Foodchem.*, **53**, 4355 (2005).
5. D. ross, S. Mendiratta, Z. C. Qu, C. E. Cobb, and J. M. May, Ascorbate 6-palmitate protects human erythrocytes from oxidative damage, *FreeRadic. Biol. Med.*, **26**, 81 (1998).
6. Z. Zuo, L. Zhang, L. Zhou, Q. Chang, and M. Chow, Intestinal absorption of hawthorn flavonoids - *in vitro*, *in situ* and *in vivo* correlations, *Life Sci.*, **79**, 2455 (2006).
7. A. O. Karen, J. D. Andrea, W. N. Paul, S. S. William, M. O. Nora, and W. Gary, Flavonoid glucuronides are substrates for human liver β -glucuronidase, *FEBS Lett.*, **503**, 103 (2001).
8. N. N. Leyre, C. Julian, L. L. Maria, M. Constantino, B. G. Obdulio, V. Vicente, and R. Jose, Thromboxane A^2 receptor antagonism by flavonoids: structure-activity relationships, *J. Agric. Food. Chem.*, **57**, 1589 (2009).
9. D. K. Vessela, Phenolic antioxidants-radical-scavenging and chain-breaking activity: a comparative study, *Eur. J. Lipid Sci.*, **111**, 1072 (2009).
10. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Ann. J. Pathol.*, **107**, 397 (1982).
11. K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
12. C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems, W. A. Pryor, **2**, 85, Academic press, New York (1976).
13. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
14. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
15. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalin, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
16. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy, *Adv. Pharmacol.*, **38**, 639 (1997).
17. R. M. Tyrrell and M. Pidoux, Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblast by UVA and near visible radiations, *Photochem. Photobiol.*, **49**, 407 (1989).
18. G. F. Vile and R. M. Tyrrell, UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen, *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 721 (1995).
19. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS. Lett.*, **331**, 304 (1993).
20. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A in induced synthesis of interstitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).