

토인삼 추출물의 항산화 및 항노화 효과

오 정 영[†] · 김 진 화 · 이 근 수 · Yong He Zhang* · 표 형 배

한불화장품(주) 기술연구소, *Department of Pharmacology, Peking University
(2013년 6월 7일 접수, 2013년 7월 2일 수정, 2013년 7월 18일 채택)

Antioxidative and Anti-aging Effects of Extract from *Talinum paniculatum*

Jung Young Oh[†], Jin Hwa Kim, Geun Soo Lee, Yong He Zhang*, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co. Ltd., #62, 547 Beongil, Daesungro, Samsung-Myun, Umsung-Kun, Chungbuk 369-834, Korea

*Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Peking University, 38 Xueyuan Road, Beijing 100083, China

(Received June 7, 2013; Revised July 2, 2013; Accepted July 18, 2013)

요약: 본 연구에서는 예로부터 민간에서 사용되어진 약초인 토인삼 추출물의 피부보호 효과를 측정하기 위해 항산화, 자외선에 의해 유도된 matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) 발현저해효과, 자외선에 대한 세포보호효과, 노화세포를 이용한 senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 활성을 사람 섬유아세포(HDF)를 이용하여 확인하였다. 그 결과, 토인삼 추출물의 free radical과 superoxide radical 소거효과는 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 나타났으며, 토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE) 500 μ g/mL에서 98.45%와 97.01%의 DPPH와 superoxide radical을 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE)의 MMP-1의 발현 저해효과는 섬유아세포에서 UVA조사 실험에서 우수하게 나타났으며, UVB 조사에 의한 세포보호 효과도 우수하게 나타났다. 또한 노화세포를 이용한 SA- β -gal활성은 토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE)을 처리하였을 시 염색된 세포의 수가 감소하여 세포내 senescence를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과들을 종합해 보면, 토인삼의 지상부본인 잎, 줄기 추출물(LSE)은 항노화 및 항산화제로서의 우수한 특성으로 피부손상에 의한 산화적 스트레스에 대응하는 새로운 기능성 소재로서의 가능성을 가지는 것으로 평가된다.

Abstract: Ultraviolet irradiation in the cells and skin produces reactive oxygen species (ROS), which induces the synthesis of matrix metalloproteinases (MMPs) causing skin photoaging. Using the human dermal fibroblast (HDF), we investigated the antioxidative and anti-aging effects of the extracts from *Talinum paniculatum*. *Talinum paniculatum* leaf and stem extracts (LSE) showed free radical scavenging effect by 98.45% at 500 μ g/mL and superoxide radical scavenging effect by 97.01% at 500 μ g/mL in the xanthine/xanthine oxidase system. The photoprotective potential of LSE was tested in HDF exposed to ultraviolet irradiation. It was revealed that LSE had an inhibitory effect on MMP-1 expression in UVA-irradiated HDF without any significant cytotoxicity. The treatment of UVA-irradiated HDF with LSE resulted in dose-dependent decreases in the expression levels of MMP-1 mRNA and protein. Also, UVB-induced cytotoxicity and cell death were effectively suppressed by treatment of LSE. Additionally, the senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity was decreased in the presence of LSE. These results suggest that *Talinum paniculatum* leaf and stem extracts (LSE) may have anti-aging effects and can be used as new functional materials against oxidative stress-mediated skin damages.

Keywords: *Talinum paniculatum*, antioxidation, MMP, anti-aging, ultraviolet

[†] 주 저자 (e-mail: oiy780913@hanbul.co.kr)

1. 서 론

피부노화를 일으키는 원인은 다양하며 이에 대한 이론도 다양하게 제시되고 있으나 그 요인에 따라 크게 두 가지로 구분할 수 있는데, 첫째는 나이가 들에 따라 나타나는 노화 즉, 피부의 구조적 변화와 생리적인 기능이 감소하는 자연노화(내인성노화, intrinsic aging)이며 둘째는 자외선, 주변 환경 등 누적된 외부 자극에 의한 광노화(photoaging)로 구분된다[1-4]. 두 가지 노화 사이에는 주름이 생성되는 기전이 세부적으로는 차이가 있지만 피부에서는 표피 세포의 증식이나 신진대사가 저하되며, 표피-진피 사이의 결합이 약해 조그만 자극에도 손상을 입기 쉽고, 콜라겐 합성 감소와 과다한 콜라겐 분해 효소인 MMPs (Matrix metalloproteinases)의 발현 증가 등의 생리적 변화들이 나타나 피부가 건조해지며 표피, 진피 층의 구조적 변화로 인해 피부가 탄력을 잃고 늘어져 보이며 점차적으로 주름이 깊어진다[5-7].

피부 세포의 노화(Cellular replicative senescence)는 세포의 크기가 커지고(enlargement), 평평해지며(flattening) 여러 개의 핵을 포함하는 다핵성(multi-nuclei)의 형태적 변화와 생리적 기능들이 저하되고 아포토시스성 세포사멸(apoptosis programmed cell death)에 저항성을 나타내는 특징들을 확인할 수 있다. Hayflick (1961)는 섬유아세포의 시험관 배양을 통해 세포 복제의 횟수(replicative life span)가 유한하다는 것을 확인하였다. 즉 세포 복제 능력인 배가증식(PD: population doubling)이 세포의 종류마다 차이가 있지만 결국 일정한 횟수를 분열한 후 상실된다는 것이다. 이러한 제한된 횟수에 도달하면 더 이상 PD를 할 수 없는 상태를 일컬어 “replicative senescence (세포 복제 senescence 현상)”이라고 하며 “irreversible growth arrest (비가역적 세포 복제 중지)”라 정의되고 있다[8]. 최근 다양한 세포로 구성된 개체를 통해서도 이러한 현상이 확인되었으며 특히 복제 횟수 정도와 senescence의 진행정도가 비례적이라는 것이 확인되었다. 이런 노화(senescence) 상태로 들어간 세포는 노화 연관 효소(senescence associated β -galactosidase: SA- β -gal)라 불리는 중성 베타 갈락토시데이즈의 활성을 통해서 확인할 수 있으며, 이러한 노화관련 베타 갈락토시데이즈 활성이 실제 사람 피부에서도 노화된 피부에서 관찰됨을 확인할

수 있다[9]. 외부자극 중 하나인 UV는 세포 내에서 다양한 signal transduction pathway를 활성화시키고, 다양한 유전자의 발현을 조절한다[10]. UVB는 낮은 강도가 조사되면 DNA의 변이를 유도하여 암세포화를 유도하고, 높은 강도는 세포 내 DNA 손상을 일으켜 세포 사멸을 유도한다[11]. 손상된 DNA는 ataxia-telangiectasia mutata/ATM-and Rad3-related (ATM/ATR) protein을 활성화시키고, 활성화된 ATM/ATR은 전사인자인 p53을 활성화시킨다. 활성화된 p53은 전사인자로 작용하여 p21의 발현을 유도하여 세포 주기를 정지시키고, 세포의 성장을 저해한다[12]. Human dermal fibroblast (HDF)에 UV가 조사되면 이러한 DNA 손상 외에도 HDF의 기능을 저해시키는 광노화 현상이 발생한다. HDF의 광노화는 세포의 성장을 저해할 뿐 아니라 MMP의 발현을 촉진하여 진피층에 존재하는 섬유상 결합조직의 와해를 일으킨다[13]. MMP의 발현은 UV로 인해서 활성화되는 전사인자인 nuclear factor-KappaB (NF- κ B)에 의하여 촉진된다. HDF에 조사된 UV는 reactive oxygen species (ROS)를 증가시켜 NF- κ B를 활성화시키고, 활성화된 NF- κ B는 핵내로 이동하여 MMP의 발현을 촉진하게 된다[14]. 발현된 MMP는 진피층으로 분비되어 collagen의 분해를 촉진하여 진피층의 주름생성과 탄력 감소를 야기시킨다[15].

토인삼(*Talinum paniculatum*)은 Portulacaceae (쇠비름과)로 분류되는 다년초로, 아열대 지방인 미국 남부와 멕시코, 서인도제도, 중앙아메리카, 남아메리카, 중국 등에 서식한다고 알려져 있다. 민간의약에서는 토인삼의 잎을 부종, 피부질환, 상처치료 등에 사용하였으며 뿌리는 고혈압, 관절염 등에 이용하였다. 또한 중국에서는 뿌리를 위염과 폐렴에 이용하였다고 한다. 또한 최근 연구에서는 토인삼 뿌리에서 식물 스테로이드인 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, 3 β -D-glucosyl-sitosterol 등이 존재하는 것으로 알려졌으며 토인삼 뿌리 메탄올 추출물의 염증저해 활성이 보고되기도 하였다[16,17]. 하지만 아직까지 토인삼의 화장품 소재에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 토인삼의 항산화 활성, 자외선에 대한 보호효과 및 피부세포 노화에 대한 연구를 수행하여 화장품 원료로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 시료의 추출

본 실험에서 사용한 토인삼은 중국 북경대학에서 제공받아 사용하였다. 토인삼의 지하 부분인 뿌리와 지상 부분인 잎과 줄기를 각각 분리하여 통풍이 잘되는 곳에서 음건 세절하여 분쇄한 후 70% 에탄올 수용액으로 환류하면서 3시간씩 3회 반복 추출하고 감압 농축, 동결 건조하여 추출물을 얻었다. 토인삼 뿌리추출물을 RTE, 잎 줄기 추출물 LSE라고 명명하였다.

2.2. DPPH에 의한 자유라디칼 소거 효과

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical법은 피부 노화의 원인으로 알려져 있는 free radical에 대하여 식물 추출물의 항산화 효능을 간단히 확인하기 위한 경우나 항산화 화장품 원료들의 활성을 비교하기 위한 실험방법이다. 따라서 DPPH를 이용하여 토인삼 추출물의 free radical 소거활성을 측정하였다[18]. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동일량의 토인삼 추출물을 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10분 동안 반응시킨다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. Superoxide radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거 효과는 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법에 의해 측정하였다[19]. 0.05 M Na₂CO₃ buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 토인삼 추출물을 가한 후 25 °C에서 10 min 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/mL xanthine oxidase를 가하고 25 °C에서 25 min 동안 반응 후 superoxide radical 소거 효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 세포 배양

신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblast (HDF)는 Modern Tissue Technology (MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 DMEM/F12 (3:1) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건하에 배양하고 trypsinization으로 3 ~ 4일 간격으로 계대 배양한 뒤 6 ~ 15계대(PD6~15) 세포를 이용하여 실험을

수행하였으며, 50계대(PD50) 이상의 노화 세포를 이용하여 노화 지표인 SA-β-gal염색을 수행하였다.

2.5. 세포 생존률 측정

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 정량은 Mosmann[20]의 방법을 변형하여 실시하였다. HDF를 2 × 10⁴ cells/well 농도로 96-well plate의 well에 토인삼 추출물을 투여하여 CO₂ 배양기에서 24, 48 h 배양하였다. 각 well의 배지들을 제거하고 MTT solution (5 mg/mL in PBS)을 첨가하였다. 37 °C에서 2 h 반응시킨 후 MTT solution을 제거하고 각 well에 100 μL의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 15 - 20 min plate shaker로 흔들여 준 후 570 nm에서 microplate reader (Model ELX 800, BIO-TEK Instruments Inc, USA)로 흡광도를 측정하였다.

2.6. 자외선(UVA, UVB) 조사 및 시료의 처리

자외선에 의한 광노화 및 산화적 세포사멸에 대한 토인삼 추출물의 항노화 효능을 확인하기 위해서 UVA 및 UVB를 아래와 같은 조건으로 처리하였다. HDF를 1.5 × 10⁵ cells/mL의 농도로 48 well에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한다. 자외선 조사 전에 배양배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지 내 serum을 제거한 후 PBS 상태에서 6.3 J/cm² UVA (UVA F15T8BLB, Sankyo Denki, Japan) 및 100 mJ/cm² UVB (UVB G15T8E, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. 자외선 조사 후 배양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3:1) 배지에 토인삼 추출물을 투여하여 24 h 배양하였다.

2.7. MMP-1 발현 저해 측정(ELISA법)

HDF에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24 h 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4 °C에서 overnight 하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 3% BSA (bovine serum albumin)/PBS로 37 °C, 2 h 동안 blocking한 후 monoclonal anti-MMP-1 (mouse)을 1:1000으로 blocking solution (3% BSA)에 희석하여 150 μL씩 분주하고 37 °C, 2 h 반응시켰다. Anti- mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 1:1000으로 blocking solution에 희석하여 150 μL씩 분주하고 37 °C, 90 min 반응시킨 후

PBS-T로 세척한 다음 diethanolamine buffer에 1 mg/mL pNPP (p-nitrophenyl phosphate)를 포함한 기질용액 150 μ L를 넣어 실온에서 30 min 반응시켰다. 3 N NaOH 50 μ L를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 microplate reader을 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, Maryland, Germany)을 이용하였다. cDNA합성은 1 μ g의 total RNA를 oligo (dT)15 primer, dNTP (0.5 uM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany)로 37 °C에서 60 min, 93 °C에서 5 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase Chain Reaction (PCR)은 cDNA로부터 MMP-1, GAPDH를 증폭하기 위하여 1 μ L cDNA, 0.5 μ M의 5'과 3'primer, 10 \times buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200 μ M dNTP, 25 mM MgCl₂, 2.5 unit Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)를 섞고 distilled water로 전체를 25 μ L로 맞추어 다음 PCR을 실시하였다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 MMP-1과 GAPDH 유전자의 발현을 확인하였다.

2.9. β -galactosidase 염색을 이용한 노화 지표의 확인

세포 노화는 세포 노화 측정의 바이오마커로 사용되는 β -galactosidase를 이용하여 염색하는 방법인 SA- β -gal assay[9]를 통해 측정하였고, 이를 위해 senescence detection kit (sigma, USA)를 사용하였다. 55계대의 노화된 HDF를 60 mm culture dish에 접종하여 24 h 동안 배양하여 안정화 시킨 후 토인삼 추출물을 처리한 후 다시 24 h 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 제거하고 1 mL PBS로 1회 세척 후 0.5 mL fixing solution을 첨가하여 상온에서 15 min 방치하여 고정화하였다. 고정된 세포는 다시 1 mL PBS로 2번 세척한 후 staining solution mix (staining solution 470 μ L, staining supplement 5 μ L, 20 mg/mL X-gal dimethylformamide 25 μ L)를 0.5 mL씩 첨가하고 37 °C에서 24 h 동안 염색을 하였다. 염색된 세포는 1 mL PBS로 세척 후 1 mL 70% glycerol을 넣고 광학현미경(Olympus, Japan)을 통하여 염색된 세포 수를 측정하였다. 염색된 세포의

측정은 각 plate당 동일한 5곳의 위치에서 사진을 촬영한 후, 전체 세포의 수와 염색된 세포의 수를 계수하여 시행하였다.

2.10. 자료분석 및 통계처리

결과는 각 실험그룹별 평균 표준편차(S.D)로 표기하였고 실험데이터는 대조군과 샘플처리 그룹 간 Student's *t*-test법을 이용하여 처리하였다. 통계적 유의성은 *p* value가 0.05 미만인 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH radical 소거 효과

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기 반응의 억제정도를 예측할 수 있다. 유해산소라 불려지는 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있으며 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되어 있다[21,22]. 토인삼 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 효과가 알려진 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)을 이용하여 토인삼추출물과 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 BHA는 100 μ g/mL에서 90.34%의 DPPH radical을 소거하였으며, 토인삼의 지하 부분인 뿌리 추출물(RTE)은 100 μ g/mL의 농도에서 72.05%의 free radical 소거 효과가 나타났으며, 지상 부분인 잎, 줄기 추출물(LSE)은 100 μ g/mL의 농도에서 92.05%의 양성대조군보다 우수한 free radical 소거 효과를 확인할 수 있었다(Table 1).

3.2. Superoxide radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide 음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타난다[23]. Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion의 생성저해의 결과는 Table 1에 나타내었다. 양성 대조군으로 BHA를 이용하여 토인삼 추출물의 superoxide radical

Table 1. Antioxidative Activities of *T. paniculatum* Extract

Used parts	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH radical scavenging (%)	Superoxide radical scavenging (%)
<i>T. paniculatum</i> root extracts (RTE)	500	89.45 \pm 3.24	91.01 \pm 4.36
	100	72.05 \pm 4.58	83.11 \pm 4.92
	10	34.45 \pm 5.25	79.01 \pm 5.36
<i>T. paniculatum</i> leaf and stem extracts (LSE)	500	98.45 \pm 5.14	97.01 \pm 2.23
	100	92.05 \pm 2.68	93.11 \pm 7.13
	10	84.45 \pm 3.23	90.01 \pm 6.66
BHA ¹⁾	100	90.34 \pm 5.69	83.62 \pm 8.13

¹⁾ BHA (3-t-butyl-4-hydroxyanisole)

Values are means of triplicate determinations \pm standard deviation

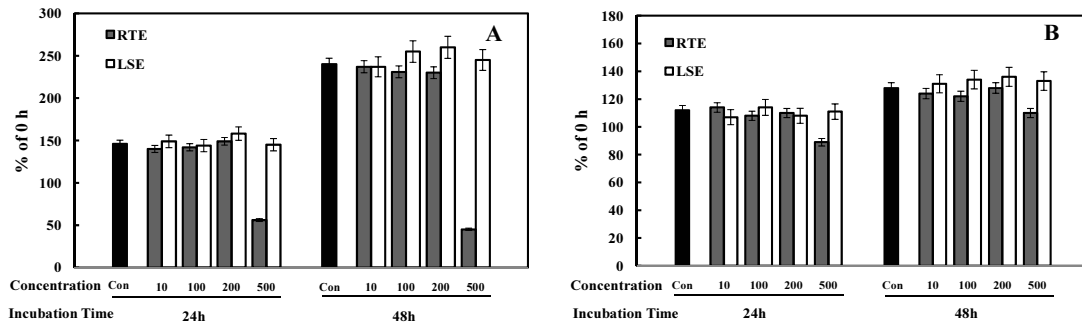


Figure 1. Relative cell viability of *T. paniculatum* extract on human dermal fibroblast by MTT assay. The cells were treated with various concentration of *T. paniculatum* extract for 24, 48 h. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. RTE: *Talinum paniculatum* root extracts, LSE : *Talinum paniculatum* leaf and stem extracts.

소거 효과를 비교하였다. 토인삼 지상 부분인 잎, 줄기 추출물(LSE)을 10, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 경우 각 superoxide radical 소거능은 90.01%, 93.11%, 97.01%로 우수한 superoxide radical 소거 효과를 나타내었다. 또한 지하 부분인 뿌리 추출물(RTE)도 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 결과 83.11%의 양성대조군과 유사한 효과를 확인할 수 있었다.

3.3. 세포독성

토인삼 추출물의 세포독성 측정과 더불어 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. 실험에 사용될 섬유아세포와 50계대(PD50) 이상의 노화섬유아세포에 대한 토인삼 추출물의 세포 독성을 측정된 결과, 토인삼의 지상 부분인 잎, 줄기 추출물(LSE)은 500 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도로 처리 시 24, 48 h

후 섬유아세포의 생존에 영향이 없는 것으로 확인되었으며, 뿌리 추출물(RTE)은 200 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 섬유아세포의 생존에 영향이 없는 것으로 나타났다(Figure 1A). 또한 50계대(PD50) 이상의 노화섬유아세포는 24, 48 h 경과에도 세포의 성장이 확연히 느려짐을 알 수 있었으며, 토인삼 뿌리 추출물을 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리 시 세포독성은 노화되지 않은 세포에 비해서 영향이 적은 것으로 나타났다(Figure 1B).

3.4. UVA에 의해 유도된 MMP-1 발현 저해 효과

피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성화도가 증가하고 전사인자인 activator protein-1 (AP-1)의 활성화도가 증가되는 신호전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다

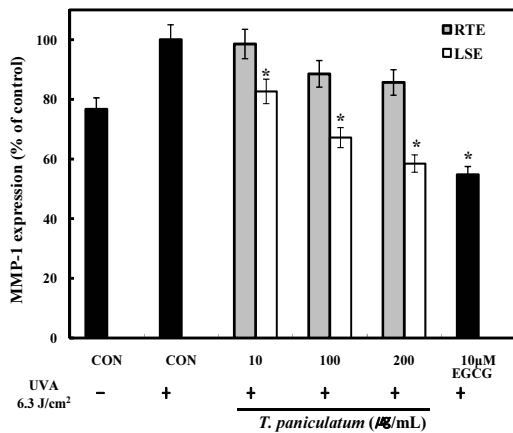


Figure 2. The effect of *T. paniculatum* extract on the production of MMP-1 by the UVA-irradiated human dermal fibroblast. The cells were treated with various concentration of the extract for 24 h. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. **p* < 0.05 compared with UVA (UVA: 6.3 J/cm²). RTE: *Talinum paniculatum* root extracts, LSE : *Talinum paniculatum* leaf and stem extracts.

고 알려져 있다[24]. 이러한 UVA에 의해 발현이 증가 되는 MMP-1에 토인삼 추출물이 미치는 영향을 알아 보고자 섬유아세포에 6.3 J/cm² UVA를 조사하고 토인삼 추출물을 첨가하여 24 h 배양한 후 MMP-1 발현저해 효과를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)을 통해 알아보았다. 그 결과 토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE)을 10, 100, 200 µg/mL의 농도로 처리한 경우 MMP-1 발현저해 효과는 17.35%, 32.8%, 41.52%로 나타났으며 뿌리 추출물(RTE)에서는 상대적으로 낮은 MMP-1 발현 저해 효과가 나타남을 확인할 수 있었다(Figure 2). 따라서 항산화 효과와 MMP-1 발현 저해 효과를 토대로 이하 실험에서는 잎, 줄기 추출물(LSE)을 이용해서 항노화 평가를 수행하였다.

3.5. RT-PCR를 이용한 MMP-1 mRNA 발현 저해 효과

토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE)이 섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과 자외선에 의해 증가된 MMP-1 mRNA 발현이 토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE)을 처리 시에는 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3). Scharffetter 등[25]은 배양된 섬유아세포에 5 - 60 J/cm²의 UVA를 1회 조사하여 MMP-1 유전자 발현이 증폭됨을 관찰하였으며 Wlaschek 등[26]

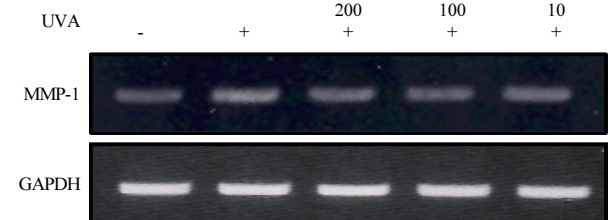
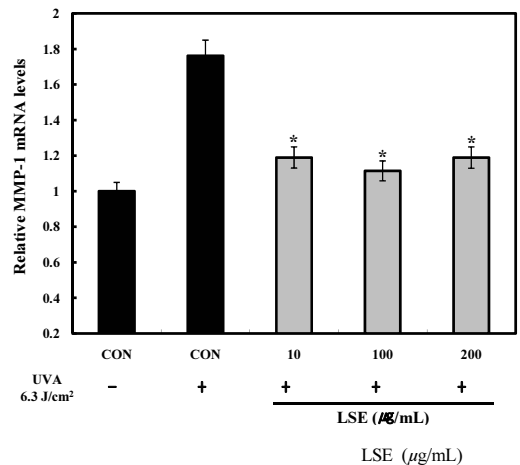


Figure 3. The effect of *T. paniculatum* leaf and stem extracts (LSE) on MMP-1 mRNA expression in human dermal fibroblast irradiated with UVA. Fibroblast cultures were treated with various concentration of LSE 24 h and compared with culture alone (control). Total RNA extracted from human dermal fibroblast was analyzed by RT-PCR. Significantly different from the control (**p* < 0.05).

도 UVA를 조사 시 MMP-1 유전자 발현이 증폭되는 것을 관찰한 바 있다. UVA 조사로 인해 MMP-1 유전자의 발현이 증가되는 기전은 아직 확실치 않으나 MMP-1 유전자가 발현되는 과정 중 신호전달(signal transduction) 과정과 전사(transcription) 과정 모두에 UVA의 자극이 관여할 것으로 생각되고 있다. 즉 UVA 조사에 의해 섬유아세포에서 MMP-1의 유전자 발현을 자극하는 전사 인자(transcriptional factor)로 알려져 있는 AP-1의 활성도도 증가됨이 보고된 바 있다 [27]. Barthelman 등[28]과 Fisher 등[29]은 각각 EGCG와 all-trans-retinoic acid가 자외선에 의한 AP-1의 활성도 증가를 방지함으로써 MMP-1 유전자 발현이 감소함을 보고하였다. 결론적으로 토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE)은 섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1을 단백질 및 mRNA 수준에서 발현을 저해하는 효과가 확인되었으며, 이는 기존 보고된 EGCG와 유사한 우수한 효과를 나타내었다[14]. 따라서 섬유

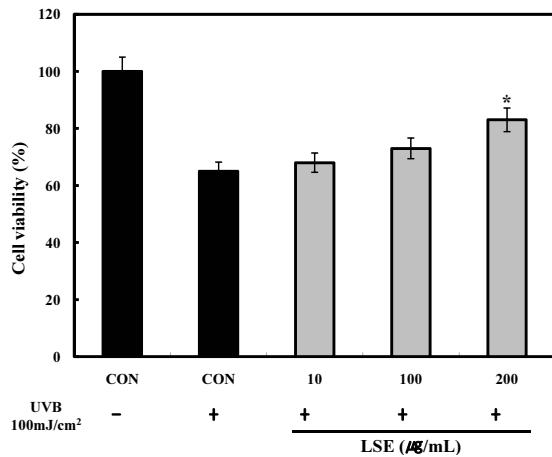


Figure 4. Cell protective effect of *T. paniculatum* leaf and stem extracts (LSE) on the UVB-induced cytotoxicity. HDF cells were exposed to UVB (100 mJ/cm²) and treated with various concentrations (10, 100, 200 µg/mL) of LSE for additional 24 h. Viable cells were determined by MTT assay. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. **p* < 0.05 compared with UVB (UVB: 100 mJ/cm²).

유아세포에서 토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE)은 UVA로부터 생성된 ROS를 소거하거나 신호전달 과정에 관여하여 MMP 발현을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

3.6. UVB로 인한 세포 손상으로부터의 보호효과

자외선 B는 피부세포의 면역억제, 염증촉진, 유전자 손상을 통한 피부암 유발을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 특히 이러한 신호전달과정의 시작은 산화적 스트레스가 중요한 역할을 한다. 자외선 B로 손상이 유도된 섬유아세포의 세포독성 완화 실험을 실시하였다[30]. UVB를 100 mJ로 조사 후 시료를 농도별로 처리하여 자외선 조사 후 시료를 처리하지 않은 대조군과 세포생존율을 비교하였다. UVB를 조사한 경우 세포생존율이 45% 정도 감소하였으며, 토인삼 잎, 줄기추출물(LSE)을 함께 처리한 그룹에서 세포생존율이 증가됨을 확인할 수 있었다(Figure 4). 이는 토인삼 잎, 줄기(LSE)추출물이 섬유아세포에서 UVB 조사로 인한 세포독성 및 사멸을 감소시키는 효과가 있다는 것을 나타낸다.

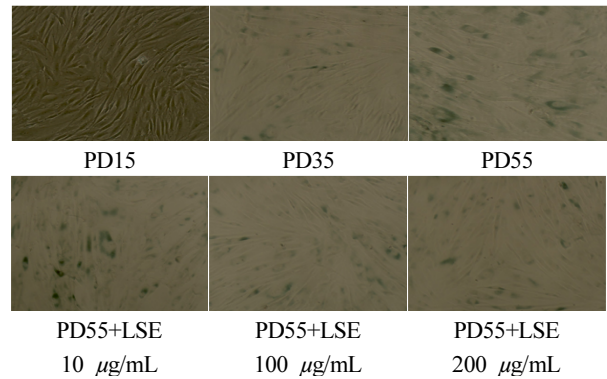
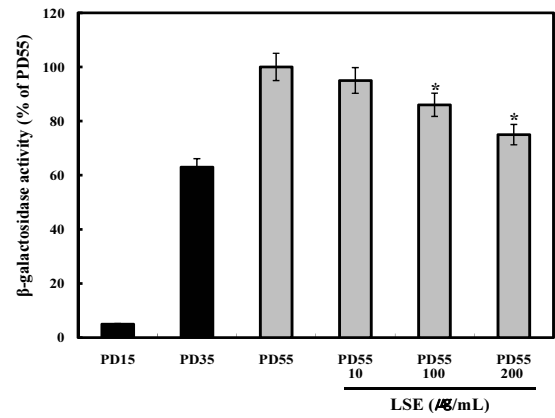


Figure 5. Effects of *T. paniculatum* leaf and stem extracts (LSE) on β-galactosidase activity of the older (PD55) HDF cells measured using the SA-β-gal assay. (A) Cells from young (PD15), intermediate (PD35) and aged passage (PD55) were analyzed with β-galactosidase enzyme activity. (B) The morphologic change of cells with SA-β-gal **p*(200X). < 0.05 compared with control (PD55).

3.7. Senescence associated β-galactosidase 활성 평가

X-gal은 lactose의 유사체로서 β-galactosidase에 의해서 galactose와 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole로 분해된다. X-gal로부터 분해된 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole은 dimer를 형성하여 파란색을 띠게 된다. β-galactosidase는 senescence가 발생한 세포에서 특히 발현이 높기 때문에 노화된 세포에 X-gal을 처리하면 세포가 파란색으로 염색이 되므로 X-gal은 세포 노화 정도를 확인하는 바이오마커로 사용되고 있다[9]. 계대에 따라 HDF 세포가 나타내는 노화의 정도를 SA-β-gal 활성으로 검토하였다. SA-β-gal 활성은 35세대 (PD35) HDF세포부터 점차 증가를 보이기 시작했고

노화가 나타난 55계대(PD55)에서는 젊은 세포에 비해 현저한 증가를 보였다(Figure 5). 토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE)을 노화 세포인 55계대(PD55)에 처리하여 SA- β -gal 활성을 검토했던 결과, 잎, 줄기 추출물(LSE)을 처리한 cells과 처리하지 않은 cells의 SA- β -gal 활성도를 비교해보면 잎, 줄기 추출물(LSE)을 처리한 군에서 SA- β -gal 활성이 감소된다는 것을 알 수 있다(Figure 5). 이는 토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE)의 항산화 물질의 활성을 통하여 세포의 산화스트레스에 대한 저항성을 증가시키고 활성 산소를 감소시켜 세포 손상을 방어하여 궁극적으로 세포의 노화를 억제하는 것으로 이해된다.

4. 결 론

본 연구에서는 토인삼 추출물의 항산화 효과 및 human dermal fibroblast에서 자외선에 의해 발현이 증가되는 MMP에 미치는 영향을 알아보았으며, 토인삼의 지상 부분인 잎과 줄기 추출물을 이용하여 자외선에 대한 세포보호 효과 및 노화 세포를 이용한 SA- β -gal 활성을 관찰하였다. 토인삼 뿌리 추출물(RTE)과 잎, 줄기 추출물(LSE)의 DPPH와 superoxide radical 소거 효과는 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 소거효과를 나타냈으며, 그중 지상부분인 잎, 줄기 추출물(LSE)에서 더 우수한 항산화 효과를 확인할 수 있었다. 또한 사람 섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현 저해 효과는 지하 부분인 뿌리 추출물(RTE)과 지상 부분인 잎, 줄기 추출물(LSE) 200 μ g/mL농도에서 각각 14.35%, 41.53%의 MMP-1의 단백질 발현 저해 효과가 나타났으며 지상 부분인 잎, 줄기 추출물(LSE)에서는 mRNA 수준에서도 MMP-1의 발현 저해 효과를 확인할 수 있었다. 자외선에 대한 세포보호 효과는 UVB 조사한 경우 세포생존율이 65% 정도로 감소하였으며, 토인삼 지상 부분인 잎, 줄기 추출물(LSE)을 함께 처리한 그룹에서 세포생존율이 증가됨을 확인할 수 있었다. 노화 세포를 이용한 β -galactosidase 활성검토에서는 토인삼 잎, 줄기 추출물(LSE)을 처리했을 때 세포의 β -galactosidase 활성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과들을 종합해보면 토인삼의 지상 부분인 잎, 줄기 추출물(LSE)은 우수한 항산화 효과와 함께 피부 주름에 연관된 자

외선 및 노화에 대한 기능성 소재로서 화장품에 응용될 수 있을 것이라 기대된다.

Reference

1. A. Oikarinen, The aging of skin: chronoaging versus photoaging, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **7**, 3 (1990).
2. B. A. Gilchrist, Skin aging and photoaging: an overview, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**, 610 (1989).
3. J. Uitto, M. J. Fazio, and D. R. Olsen, Molecular mechanism of cutaneous aging, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**, 614 (1989).
4. A. M. Klingman and R. M. Laver, Cutaneous aging: the differences between intrinsic aging and photoaging, *J. Cutan. Aging. Cosmet. Dermatol.*, **1**, 5 (1988).
5. S. K. Karin, B. Peter, W. Jutta, H. Gernot, M. Weijan, K. Lale, M. Christian, and W. Meinhard, Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms, *Experimen. Gerontol.*, **35**, 307 (2000).
6. J. Y. Seo, H. R. Choi, G. E. Rhie, C. S. Youn, W. W. Choi, J. A. Kim, J. H. Chung, K. H. Kim, K. H. Cho, and H. C. Eun, The effect of retinoic acid and vitamin C on the expression of the procollagen α 1(I), tropoelastin, and MMP-1 in human dermal fibroblast, *Kor. J. Invest. Dermatol.*, **8**, 23 (2001).
7. C. Bailly, S. Dreze, D. Asselineau, B. Nusgens, C. M. Lapiere, and M. Darmon, Retinoic acid inhibits the production of collagenase by human epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 47 (1990).
8. L. Hayflick and P. S. Moorhead, The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **25**, 585 (1961).
9. G. P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, M. Peacocke, and J. Campisi, A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 9362 (1995).
10. D. B. Yarosh, S. Boumakis, A. B. Brown, M. T.

- Canning, J. W. Galvin, D. M. Both, E. Kraus, A. O'Connor, and D. A. Brown, Measurement of UVB-induced DNA damage and its consequences in models of immunosuppression, *Methods*, **28**, 55 (2002).
11. D. Kulms and T. Schwarz, Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis, *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, **16**(5), 195 (2000).
 12. V. A. Smits and R. H. Medema, Checking out the G(2)/M transition, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1519**, 1 (2001).
 13. J. Kim, C. W. Lee, E. K. Kim, S. J. Lee, N. H. Park, H. S. Kim, H. K. Kim, K. Char, Y. P. Jang, and J. W. Kim, Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UVB-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts, *J. Ethnopharmacol.*, **137**, 427 (2011).
 14. J. Y. Bae, J. S. Choi, Y. J. Choi, S. Y. Shin, S. W. Kang, S. J. Han, and Y. H. Kang, (-)Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase, *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 1298 (2008).
 15. G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. W. Kang, and J. J. Voorhees, Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature*, **379**, 335 (1996).
 16. M. Komatsu, I. Yokoe, Y. Shirataki, and T. Tomimori, Studies on the constituents of *Talinum paniculatum* Gaertner. I, *J. Pharm. Soc. Jap.*, **102**, 499 (1982).
 17. H. Shimoda, N. Nishida, K. Ninomiya, H. Matsuda, and M. Yoshikawa, Javaberine A, New TNF- α and nitric oxide production inhibitor, from the Roots of *Talinum paniculatum*, *Heterocycles*, **55**, 2043 (2001).
 18. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 19. K. Furuno, T. Akasako, and N. Sugihara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 19 (2002).
 20. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
 21. A. Kitahara, U. Matsumoto, H. Ueda, and R. Ueoka, A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of γ -irradiated methyl linolate, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2208 (1992).
 22. T. Hatano, Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-Tannins and related polyphenols, *Natural Medicines*, **49**, 357 (1995).
 23. P. Kuppusamy and J. L. Zweier, Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 9880 (1989).
 24. J. H. Chun, S. W. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Decreased extracellular signal regulated kinase and increased stress activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 177 (2000).
 25. K. Scharffetter, M. Wlaschek, and A. Hogg, UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts *in vitro* and *in vivo*, *Arch. Dermatol. Res.*, **283**, 506 (1991).
 26. M. Wlaschek, K. Bolsen, G. Herrmann, A. Schwarz, F. Wilmroth, P. C. Heinrich, G. Goerz, and K. Scharffetter, UVA induced autocrine stimulation of fibroblast derived collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage?, *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 164 (1993).
 27. H. C. Kim, J. S. Yang, Y. S. Chae, K. S. Suh, and S. T. Kim, The effect of all-trans-retinoic acid and ursolic acid on the ultraviolet a radiation induced AP-1 (Fos/Jun) activity in cultured human dermal fibroblasts, *Kor. J. Invest. Dermatol.*, **35**, 1136 (1997).
 28. M. Barthelme, W. B. Bair, K. K. Stickland, W. Chen, B. N. Timmermann, S. Valcic, Z. Dong, and G. T. Bowden, (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity, *Carcinogenesis*, **19**, 2201 (1998).
 29. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, P. McPhillips, Z. Q. Wang, X. Li, Y. Wan, S. W.

Kang, and J. J. Voorhees, Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*, *J. Clin. Invest.*, **101**, 1432 (1998).

30. Y. W. Ryoo, S. I. Suh, K. C. Mun, B. C. Kim, and K. S. Lee, The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts, *J. Dermatol. Science*, **27**, 162 (2001).