

한약재복합 추출물의 인간피부섬유아세포 HS68에 대한 항노화 효과

신동철^{1#}, 김귀철², 송시영¹, 김희진², 양재찬⁴, 이용화³, 김보애^{4*}

1 : (주)엔에스텍 부설 중앙연구소, 2 : 전라남도 생물산업진흥재단 나노바이오연구센터
3 : 호서대학교 융합기술연구소, 4 : 목원대학교 테크노과학대학 생의약화장품학부

Antiaging Activity of Mixed Extracts from Korean Medicinal Herbs on HS68 Skin Fibroblast

Dong-Chul Shin^{1#}, Gwui-Cheol Kim², Si-Young Song¹, Hee-Jin Kim²,
Jae-Chan Yang⁴, Yong-Hwa Lee³, Bo-Ae Kim^{4*}

1 : Nstech R&D Center, 270 Beon-Gil 28, Namdongseo-Ro, Namdong-Gu, Incheon
2 : Jeonnam Nano Bio Reserch Center, San 109, Samtae-Ri, Nam-myun, Jangseong-Gun, Jeollanam-Do, 515-893
3 : Hoseo University, Fusion Technology, 165, Sechul-li, Beabang-eup, Asan-city, Chungnam
4 : Mokwon University, College of Sciences & Technology, Division of Biomedical & Cosmetics Doanbuk-ro 88,
Seo-gu, Daejeon 302-729, Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate antiaging and antioxidant effects on cultured human skin fibroblast with 80% ethanol extracts of plants including of stem of *Dendropanax morbifera*, *Corni fructus* and *Lycii Fructus*.

Methods : An ethanol extract of three medicinal plants including stem of *Dendropanax morbifera*, *Corni fructus* and *Lycii Fructus*. Extracts were assessed to determine the mechanism of antioxidant and antiaging activities. Antioxidant activity of extract was evaluated by two different assays as 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and super oxide dismutase (SOD) like activities. These extracts were tested for cell viability on HS68 skin fibroblast by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. We investigated the effects of Ultraviolet-B irradiation on cytotoxicity, type 1 collagen, elastin level and oxidative damage in cultured human skin fibroblast (HS68). Recently, many studies have reported that elastin is also involved in inhibiting or repairing wrinkle formation, although collagen is a major factor in the skin wrinkle formation.

Results : The extracts obtained dose-dependently increased the scavenging activity on DPPH radical scavenging activity and SOD like activity. The extracts of complex herbal medicine showed low cytotoxicity as more than 100% cell viability in 100ppm/ml concentration. HS68 fibroblasts were survived 70% at 120 mJ/cm² UVB irradiation and treated tumor necrosis factor (TNF)-alpha. The levels of aging factors and cytotoxicity were decreased by ethanol extract of complex herbal medicine.

Conclusions : These results suggest that ethanol extracts of complex medicinal plants of including of stem of *Dendropanax morbifera*, *Corni fructus* and *Lycii Fructus* may have value as the potential antioxidant and antiaging medicinal plant.

Key words : *Dendropanax morbifera*, *Corni fructus*, *Lycii Fructus*, ethanol extracts, antioxidant, antiaging

*교신저자 : 김보애, 대전광역시 서구 도안북로 88, 목원대학교 테크노과학대학 생의약화장품학부
· Tel : 042-829-7569 · E-mail : kba@mokwon.ac.kr
#제1저자 : 신동철, 인천광역시 남동구 논현동 429-1 21B 2L (주)엔에스텍
· Tel : 032-812-0806 · E-mail : shin-dc@hanmail.net
· 접수 : 2014년 2월 19일 · 수정 : 2014년 3월 12일 · 채택 : 2014년 3월 19일

서론

피부는 장벽기능을 하는 인체의 가장 큰 장기로서 내부 장기를 보호하고 수분과 전해질의 손실을 막는 등의 보호역할을 수행한다. 피부노화는 나이의 증가와 동시에 외부적인 요인인 각종 산화 물질, 대기오염, 중금속, 자외선 (ultraviolet radiation, UV) 등에 항상 노출되어 있어 손상 받기 쉬운 조건에 있다^{1,2)}. 특히 피부노화의 주된 원인은 자외선으로, 태양 광선에 지속적으로 노출된 피부는 항상 자외선에 노출되어 있다고 볼 수 있다. 자외선A와 자외선B의 경우에는 피부의 탄력저하, 주름형성, 홍반과 같은 노화현상과 관련된 증상이 나타나며, 자외선C는 피부암과 같은 병변이 유발한다고 알려져 있다. 피부세포는 자외선에 의해 쉽게 손상되고 있으며, 심하면 일련의 염증반응을 일으켜 피부장벽기능의 소실로 병원성 미생물에 의한 2차 감염에 노출되기도 한다^{3,4)}. 미용적 측면에서는 멜라닌 (melanin) 생성을 촉진시켜 기미, 주근깨와 같은 색소침착을 유발하고, 진피 층의 탄력에 관여하는 콜라겐 (collagen)과 엘라스틴 (elastin)의 결합을 약화시켜 피부 표면에 주름이 형성되므로 자외선으로부터 피부를 보호하고자 하는 노력이 증가하고 있다^{5,6)}. 자외선은 세포내 활성산소종을 발생시켜 산화적 손상을 유발하며, 자외선 B가 DNA에 흡수되어 pyrimidine dimer와 같은 mutagenic lesion을 만들어내어 돌연변이를 유발하며 결국 유전정보의 손실을 야기시킨다⁷⁾. 또한 장기간 노출 시 심각한 피부질환으로 이어져 피부세포 사멸 및 피부암의 발생으로까지 이어진다⁸⁾.

피부노화에 대한 관심이 증가되면서 자외선으로부터 피부를 효과적으로 방어할 수 있는 천연소재 발굴에 대한 다양한 연구가 시도되고 있다⁹⁾. 천연소재의 범위는 내륙식물에서부터 해양 동식물까지 광범위하게 포함된다. 아직까지 천연소재를 기존의 합성 자외선차단 성분으로 완벽하게 대체할 수는 없겠으나 천연에서 유래한 소재는 다양한 항산화 물질을 포함하고 있으므로 자외선차단 화장품에 활용될 시 자외선으로부터 유도될 수 있는 피부 손상을 효과적으로 방지하는데 도움을 줄 수 있다고 사료된다.

황칠나무 (*Dendropanax morbifera*)는 두릅나무과 황칠나무속으로 동아시아, 말레이반도, 중앙 및 남아메리카 등에 약 75종이 분포되어 있으며 우리나라에는 1종이 분포되어 있다. 현재까지 황칠나무에 대하여 연구된 바로는 자연의 금색을 나타내는 공예품에 사용하는 도료의 원료와 황칠나무 잎 추출물 분획에서 항암, 항산화, 간세포 재생, 당뇨치료 효과, 경조직 세포 재생 등과 방향 성분의 신경계에 대한 진정작용과 강장 작용이 있으며, 황칠로부터 얻은 추출물에서 멜라닌을 생성하는 티로시나제 (tyrosinase)의 활성 억제 기능으로 미백효과에 도움을 준다고 알려져 있다¹⁰⁾. 이러한 황칠은 신약개발 및 기능성 소재 등 새로운 치료제로서의 가능성을 높여주고 있다.

산수유 (*Corni fructus*)는 층층나무과에 속하는 산수유나무 (*Cornus officinalis*)의 과육으로, 가을에 성숙한 붉은색 열매의 씨를 제거하고 건조한 과육을 산수유라 하며, 예로부터 우리나라를 비롯하여 중국과 일본 등에서 중요한 한약재로 많이 사용되고 있다¹¹⁾. 산수유에 대한 연구로는 산수유 열매의 렉틴성분, 영양성분, 산수유 종자의 항당뇨 효과, 물 추출물의 히스타민 효과, 부종억제 효과, 납에 의한 조직손상 억제에 미치는 효과, 항균효과, 티로시나아제 저해작용, 항산

화 및 항암효과 등이 보고되고 있으나^{12,13)} 이에 대한 체계적인 연구가 미흡한 실정으로 산업적 활용 연구가 많이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

구기자는 구기자나무 (*Lycium chinense* Miller) 또는 영하구기 (*Lycium barbarum* Linne)의 열매로서 예로부터 민간 치료제로 사용해 왔으며 항산화효과, 항균효과, 면역증진, 항암효과, 모발성장 촉진 등의 다양한 연구가 보고되고 있다¹⁴⁾. 대표적으로 한약재 구기자의 주성분 중 대한약전에서는 구기자의 정량기준을 베타인 (betaine)의 함량으로 설정하고 있다.

따라서 본 연구에서는 한방소재인 황칠나무, 산수유, 구기자를 이용하여 항산화 및 항노화 효능이 있는 기능성 화장품 소재를 위한 *in vitro* 실험을 적용하였으며 긍정적인 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재 및 시약

전라남도 신안군 흑산면에서 자생하는 황칠나무의 줄기, 전라남도 구례군 산동면에서 자생하는 산수유, 전라남도 진도군 의신면에서 자생하는 구기자를 산지에서 구입하여 건조한 후 분쇄기 (HMF-502, 한일전기)로 분쇄한 다음 분말을 14mesh 분체를 통과한 것만을 실험재료로 사용하였다. 실험에 사용한 시약은 일급시약을 사용하였다.

2) 시료 추출

분쇄한 황칠나무, 산수유, 구기자를 상온에서 80% 에탄올을 용매로 하여 상온에서 추출하여 실험에 이용하였다. 획득한 시료를 1차 농축하고 2차로 동결 건조하여 본 연구에 사용하였다. 동결 건조하여 분말화된 시료를 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 0.45 μ l 필터에 필터링 후 다시 농도별로 세포배양액 또는 PBS 완충용액에 희석하여 최종 시료로 사용하였다. 복합소재의 비율은 황칠나무 : 산수유 : 구기자를 2 : 3 : 1의 비율로 정하여 추출하였으며 이는 항산화 실험에서 가장 효능이 우수한 것을 기준으로 비율을 선정한 것이다. 추출물에 대한 추출 조건과 *in vitro* 실험은 최소 3회 이상 반복실험을 수행하였다.

2. 방법

1) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 그 자체가 매우 안정한 Free radical로서 517nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 진한 보라색의 화합물이다. 그러나 Radical 소거활성이 있는 항산화제에 의해 정량적으로 탈색됨으로 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있다. 이 Radical에 의한 소거활성은 지질과산화 억제활성을 비롯한 항산화 활성과 상관관계를 보이므로 항산화제 검색에 널리 이용되고 있다. 추출물의 항산화 활성 측정 (Electron donating abilities, EDA)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하게 되는데, 각 시료용액 2.0 ml에 0.2 mM의

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 0.5 ml를 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm 에서 흡광도를 측정한다.

2) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

추출물의 SOD 효소 활성은 SOD assay Kit-WST를 이용하여 지시대로 측정하였다. 96-well plate에 추출물을 넣고 WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono-sodium salt)과 xanthine oxidase working solution을 첨가한 후 37°C에서 20분간 incubation한 후 microplate reader에서 450 nm 파장을 측정한다.

3) 세포배양

인간 섬유아세포주인 HS68 (human skin fibroblast) 세포 배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 항생제 (penicillin/streptomycin)는 Gibco사 (Grand Island, NY, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하였고, 37°C, 5% CO₂조건의 incubator에서 배양하였다.

4) 세포생존률 측정 (MTT assay)

배지를 제거하고 MTT solution (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide])을 넣고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 MTT solution을 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 자외선 조사

자외선 B 조사로 인한 세포독성 및 산화적 세포사멸에 대한 추출물의 항노화 효과를 확인하기 위해서 UVB를 다음과 같은 조건으로 처리하였다. 이때 HS68 세포를 48-well plate에 4 × 10⁴ cells/well로 분주한 다음 24시간 후에 FBS를 포함하지 않는 배지로 교환하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 washing 하고, 그 후 PBS 200 µl를 well에 분주 후 자외선 조사장치 (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)를 사용하여 UVB를 120 mJ/cm²로 조사하였다. 자외선 B 조사 후에 PBS를 제거하고 배지로 교환한 후 추출물을 처리한 다음 24시간 후에 변화를 측정하였다.

6) Type I collagen 발현 측정

TRIzol Reagent를 이용하여 total RNA를 추출하였으며 추출한 RNA로 부터 cDNA를 합성하였으며, 효소들의 유전자 발현을 비교 측정하기 위하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 진행한 후 95°C에서 30초, 53-61°C에서 1분, 72°C에서 1분을 40 cycle 진행한 후 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. 각 PCR 산물들은 ethidium bromide를 포함하고 있는 1.5% agarose gel에서 50 V로 전기영동 한 후 type 1 collagen과 type 1 procollagen 노화관련 유전자 발

현을 확인하였다.

5) MMP-1 저해활성 측정

피부섬유아세포를 2 × 10⁶개/ 2 ml의 세포를 6-well plate에 접종한 뒤 각 well에 추출물 농도별로 첨가하여 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF-α를 10 ng/ml의 농도로 첨가하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며, Gross B. E.의 방법에 따라 Matrix Metalloproteinase-1 Biotrack activity Assay Kit (Amersham Bioscience)을 이용하여 plate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Elastase 저해활성 측정

시료의 elastase 저해활성은 James의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.2)에 기질인 0.5 mM N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pnitroniline (Sigma)를 용해시킨 후 시료와 효소인 elastase (1 unit/ml, Sigma) 용액을 첨가하였고, 이 혼합액을 25°C에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 통계 처리

결과 통계처리는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's test를 이용한 후 P값이 0.05미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포생존율에 미치는 영향

한방복합 에탄올 추출물이 피부섬유아세포 독성에 미치는 영향을 측정한 결과 100ppm에서 세포독성을 나타내지 않았으며, 200ppm이상에서는 세포생존율이 80%대로 감소하였다 (Fig. 1). 또한 항산화제로 광범위하게 사용되고 있는 BHT (butylated hydroxy toluene)와 vitamin C를 대조군으로 이용하여 에탄올 추출물의 효능을 비교하였으며 BHT의 세포독성을 MTT assay로 평가한 결과 0.1ppm에서는 독성을 나타내지 않았으며 0.3ppm부터 50%이하의 세포생존율을 나타내었다. Vitamin C는 0.1ppm에서는 독성을 나타내지 않았으며 5ppm부터 50%이하의 세포생존율을 나타내었다.

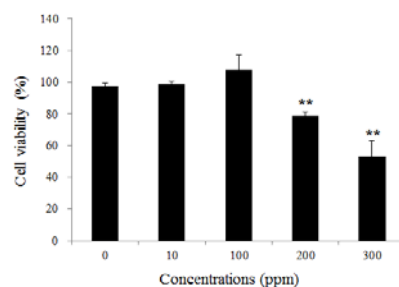


Fig. 1. Cell viability of dependent on concentration from ETOH extracts of Dendropanax moribifera, Corni fructus and Lycii Fructus. Data were presented as them ± S.D. **, P<0.01 compared with negative control.

2. DPPH 라디칼 소거 활성에 미치는 영향

한방복합 에탄올 추출물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼에 대한 시료의 환원력으로 측정하였다. DPPH는 보라색을 띠며 화학적으로 안정화된 자유라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 전자를 받게 되면 흡광도가 감소하며, 환원력이 있는 물질과 만나 전자를 내어주면 DPPH 라디칼이 소멸되어 특유의 보라색이 옅은 노란색으로 변하는 것을 측정한다. 이러한 원리를 바탕으로 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 추출물의 경우 농도 의존적으로 DPPH 라디칼에 대한 시료의 환원력이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

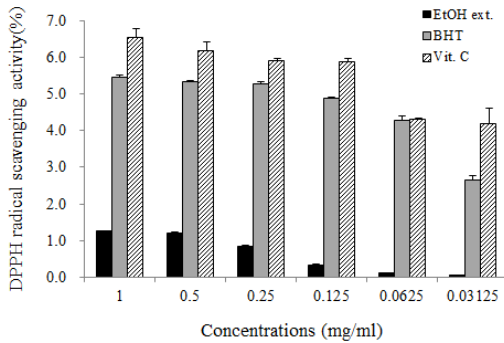


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity(%) of dependent on concentration from EtOH extracts from three medicinal plants including stem of *Dendropanax morbifera*, *Corni fructus* and *Lycii Fructus*, BHT and vitamin C

3. SOD 유사활성 검증

추출물의 SOD 효소 활성은 SOD assay Kit-WST를 이용하여 지시대로 측정하였으며, 그 결과 한방복합 에탄올 추출물 처리군에서 농도 의존적으로 항산화 효능을 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 3).

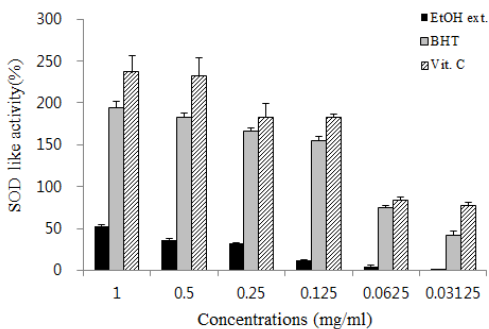


Fig. 3. SOD like activity(%) of dependent on concentration from EtOH from three medicinal plants including stem of *Dendropanax morbifera*, *Corni fructus* and *Lycii Fructus*, BHT and vitamin C

4. UVB 산화적 손상에 대한 항노화 효능

피부 진피층의 콜라겐은 섬유아세포에 의해 생성되며, 엘라스틴, 글리코사미노글리칸, 당단백 등과 함께 세포의 기질의 대부분을 구성하게 된다. 피부 노화의 특성으로는 피부의 탄력성 감소, 주름, 기미 등을 들 수 있으며, 이들은 과도하

게 생성된 활성산소종으로 인하여 콜라겐과 엘라스틴 등의 탄력섬유에 지질과산화이 일어나 비정상적인 교차결합 및 사슬 절단으로 발생하게 된다. 특히, 반복적인 자외선 노출로 피부의 matrix metalloproteinases (MMPs)가 증가하게 되면, 이는 피부의 콜라겐을 분해하여 피부 주름 생성을 촉진하게 된다. 즉, 피부의 주름은 콜라겐의 합성과 분해의 불균형에 기인하며 특히 광노화된 피부의 경우 콜라겐 합성이 감소하고 분해효소의 활성이 증가되어 있는 특성이 나타난다. 본 실험에서 HS68 세포에 자외선 B를 노출시킨 경우 type I collagen 및 type I procollagen의 mRNA 합성이 현저히 감소되었으나, 추출물을 처리 하였을 때 type I collagen 및 type I procollagen의 mRNA 합성이 증가한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 광노화에 의한 collagen의 감소는 깊은 주름과 같이 피부노화징후와 직접적으로 연관이 있고 할 수 있다.

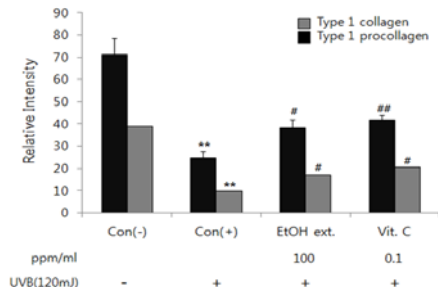
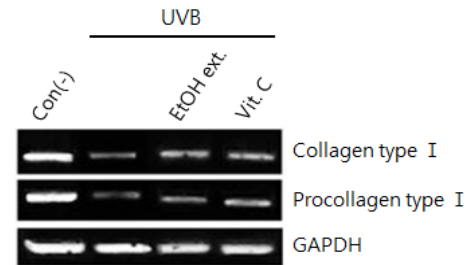


Fig. 4. Effect of EtOH extract from herbals complex on the mRNA level of type I collagen and type I procollagen in HS68 human skin fibroblasts after UVB irradiation. Data were presented as them \pm S.D. **, P<0.01 compared with negative control, ##; P<0.01 compared with positive control, #; P<0.05 compared with positive control.

5. MMP-1 저해활성 효능

한방 복합 추출물을 이용하여 세포 독성에 미치지 않는 100ppm으로 세포에 전처리하였으며, 비교군으로서 Vitamin C도 세포독성을 나타내지 않는 0.1ppm으로 전처리하였다. 그 결과 MMP-1활성도를 높이기 위해 처리되었던 TNF- α 를 단독으로 처리한 군은 MMP-1 수준이 현저히 증가한 것을 관찰할 수 있었으며, 반면 추출물을 처리한 군에서는 MMP-1 수준이 TNF- α 단독 처리군 보다 유의하게 감소되었으며, 이는 추출물이 collagen분해에 영향을 미치는 MMP-1의 활성을 억제함으로써 피부노화 억제에 도움을 줄 수 있음을 의미한다 (Fig. 5).

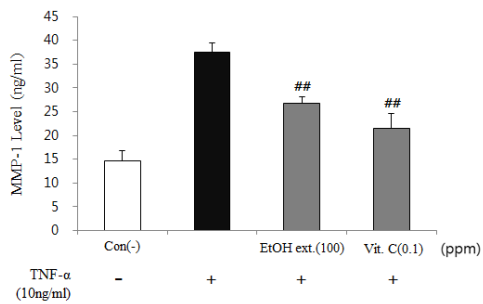


Fig. 5. MMP-1 activities of extracts in human dermal fibroblast from EtOH extracts of *Dendropanax moribifera*, *Corni fructus* and *Lycii Fructus*. ##; P<0.01 compared with positive control.

6. Elastase 저해활성 효능

본 연구에서는 황칠나무, 산수유, 구기자 복합 에탄올 추출물의 주름예방효능에 대해 분석하기 위해 elastase 저해 활성을 조사하였다. 그 결과 에탄올 추출물 100ppm/ml에서 35.2±5.7의 저해 활성을 나타냈으며 vitamin C보다는 낮은 활성을 나타내었으나 농도가 1000배 차이 나므로 에탄올 추출물이 농도에 비례하여 우수한 효능을 나타냄을 알 수 있었다 (Table 1).

Table 1. Elastase Inhibitory Effects from EtOH Extracts of three medicinal plants including stem of *Dendropanax moribifera*, *Corni fructus* and *Lycii Fructus*.

Elastase inhibitory(%)	Concentration (ppm/ml)	
	EtOH ext. (100)	Vitamin C (0.1)
	35.2±5.7	75.5±2.4

고찰

Reactive oxygen species (ROS)는 세포 내의 DNA와 RNA를 손상시키고, 사이토카인, 단백질 합성, 효소, 대사활성에 작용하여 산화적 스트레스를 가함으로써 유전정보의 변화 및 질병을 유발하게 하는 중요한 인자이다¹⁵⁾. 외부적 요인으로써 광노화 유발인자와 자유라디칼, 호르몬의 변화, 영양상태의 불균형, 수면부족, 스트레스, 생활환경 등은 자연노화 인자로서 노화와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. ROS는 끊임없이 생성되지만 건강한 사람의 경우 ROS와 항산화물질이 체내에서 균형을 이루어 건강을 유지하게 된다. 항산화 물질은 ROS의 손상으로부터 인체를 보호하는데 vitamin, carotenoids, bilirubin, albumin과 같은 radical scavenging antioxidants와 항산화 효소들이 대표적이다¹⁶⁾. 즉 인체 내부는 항산화 방어 시스템을 갖추고 있어 유해한 각종 산화적 스트레스로부터 대응하여 항상성 (homeostasis)을 끊임없이 유지하려고 한다¹⁷⁾. 항산화 방어 시스템은 효소에 의한 방어기전과 비효소성 항산화 방어기전의 두 가지 형태로 구분된다^{18,19)}. 특히, 효소에 의한 방어기전은 catalase (CAT)와 superoxide dismutase (SOD) 등을 대표적으로 들 수 있다. 이에 본 연구에서는 추출물의 항산화 효능을 검증하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능과 SOD유사 활성을 관찰하였으며, 추출물의 농도에 비례하여 높은 항산화 효능을 나타

내었다. 산화에 의한 피부손상은 다양한 노화 징후 즉 잔주름, 굵은 주름, 색소침착, 피부건조증 등의 증상과 밀접한 관련이 있어 항노화에 있어서 산화에 적극적으로 억제하는 것이 중요하다.

피부의 진피층에 다량 존재하는 collagen은 피부 건조증량의 90% 이상을 차지하는 주요 구성 단백질이다. 즉 피부의 collagen의 분해는 결합 조직의 탄력을 저하시켜 주름 생성되는 직접적인 영향을 미치게 된다. Collagen의 분해와 관련된 분자기작으로 전사인자인 AP-1(activating protein-1)에 의해 유도되는 MMPs (matrix metalloproteinases)에 의해 세포외기질과 type I procollagen의 분해가 일어나 주름 생성과 같은 노화현상이 나타난다^{20,21)}. MMP family 중 MMP-1은 collagen을 분해하는 protease로서 피부노화와 직접적으로 관련되는데, MMP-1의 활성을 억제하여 collagen의 분해를 감소시키면, 피부 조직의 탄력이 유지되어 주름 생성을 예방할 수 있으므로 MMP-1 활성을 저해하는 천연소재에 대한 연구가 증가되고 있는 추세이다. 본 연구에서는 항노화 소재로서 황칠나무, 산수유, 구기자 복합 소재를 에탄올 추출하여 MMP-1활성 저해활성을 평가한 결과 TNF-α를 단독으로 처리한 군보다 MMP-1의 활성이 약25% 감소된 것을 확인하였으며, 이는 항노화 관련 화장품이나 건강기능성 식품에 적용되기에 적절하다고 사료된다.

Elastin은 피부 세포외기질을 구성하는 성분중의 하나로 진피 내 피부탄력을 유지한다. 이에 반해 Elastase는 기질 단백질인 elastin의 분해와 관련되며, collagen 분해에도 비특이적으로 작용하여 피부조직파괴의 직접적인 원인이 되어 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발한다. 그러므로 elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 하며 urosolic acid 등이 elastase 저해제로 알려져 있다²²⁾. 본 연구에서 복합 소재 에탄올 추출물은 elastase 저해 활성을 나타내었으며, 이는 피부의 주름을 개선하는 항노화 기능성소재로서의 가능성을 나타낸다.

복합 생물소재 3종 (황칠나무, 산수유, 구기자)을 이용한 에탄올 추출물의 항산화 및 세포독성, 항노화 (Type I Collagen), MMP-1 저해활성, Elastase 저해활성 등에 대한 효력시험을 수행한 결과 전체적으로 농도 의존적으로 활성이 나타남을 알 수 있었으며, 이는 대조군인 Vitamin C보다 활성은 높지 않으나 농도 비례 평가하였을 시 우수한 것으로 나타난다. 추후 본 결과를 적극적인 활용을 위하여 식품의약품안전청의 “기능성화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인”에 따라 수행되었으므로 화장품 원료로서의 사용 가치가 높다고 사료된다.

결론

본 연구는 황칠나무, 산수유, 구기자 복합 에탄올 추출물의 항산화 및 항노화 효능을 조사하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 추출물은 피부섬유아세포에서 높은 안전성을 나타내었으며, 농도 의존적으로 DPPH radical scavenging activity와 SOD-like activity가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

2. HS68 세포에 자외선 B를 노출시킨 경우 type I collagen 및 type I procollagen의 mRNA 합성이 현저히 감소되었으나, 추출물을 처리 하였을 때 type I collagen 및 type I procollagen의 mRNA 합성이 증가한 것을 관찰할 수 있었다.
3. 추출물을 처리한 군에서는 MMP-1 수준이 TNF- α 단독 처리군 보다 감소되었으며, elastase 저해활성 측정에서도 농도에 비례하여 우수한 효능을 나타냄을 알 수 있었다.

따라서 황칠나무, 산수유, 구기자 복합 에탄올 추출물은 대조군에 비하여 낮은 세포독성을 나타내며 농도 의존적으로 항산화와 항노화 효능을 나타내므로 피부개선에 도움을 주는 기능성화장품에 활용할 수 있는 좋은 소재라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 전라남도 생물산업진흥재단 3G-Bio연계 친환경 생물소재 고도화 사업 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2001 ; 117 : 1218-24.
2. Lee WJ. Structure and function. *J Skin Barrier Research*. 2006 ; 8 : 10-7.
3. Lea T, Michael S, Claudia P, Michael F, Viktor M, Markus S, Wolfgang T and Jorg R. Cutaneous Photosynthesis of Vitamin D: An Evolutionary Highly-conserved Endocrine System that Protects against Environmental Hazards Including UV-radiation and Microbial Infections. *Anticancer Research*. 2006 ; 26 : 2743-8.
4. Arnold HL, Odom RB, James WD. *Andrew's Disease of the skin : Clinical Dermatology*. 8th rev. ed. Philadelphia : WB Saunders. 1990 : 28-9.
5. Shimoda N, Mutou Y, Shimura N, Tsukimoto M, Awaya A, Kojima S. Effect of heterocyclic pyrimidine compounds on UVB-induced cell damage in human keratinocytes and on melanogenesis in mouse B16 cells. *Biol Pharm Bull*. 2010 ; 33 : 862-8.
6. Gilchrest BA. Skin aging and photoaging : an overview. *J Am Acad Dermatol*. 1989 ; 21 : 610-3.
7. Lee MH, Cho YH. Viability of Cultured Human Keratinocyte and Melanocyte after UVB Exposure. *Korea J dermatol*. 1997 ; 35(2) : 258-65.
8. Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006 ; 150 : 25-38.
9. Chang MS, Ko EB, Lee HJ, Kim JS, Kim JS, Jee SW, Kim HY, Yeom MH, Kim DH, Kim HK, Park SK. The Effects of *Nelumbo nucifera* on Ultraviolet-B Irradiated human Keratinocytes. *Korea J Herbology*. 2011 ; 26(2) : 45-9.
10. Mo JH, Oh SJ. Tyrosinase Inhibitory Activity and Melanin Production Inhibitory Activity of the Methanol Extract and Fractions from *Dendropanax morbifera* Lev. *Korea J Society for Aesthetics and Cosmetology*. 2013 ; 11(2) : 275-80.
11. Tian G, Zhang T, Yang F, Ito Y. Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatography A*. 2000 ; 886 : 309-12.
12. Yang L, Wang Z, Huang L. Isolation and structural characterization of a polysaccharide FCAP1 from the fruit of *Cornus officinalis*. *Carbohydr Res*. 2010 ; 345(13) : 1909-13.
13. Liu X, Han ZP, Wang YL, Gao Y, Zhang ZQ. Analysis of the interactions of multicomponents in *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. with human serum albumin using on-line dialysis coupled with HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011 ; 879(9-10) : 559-604.
14. Lee YG, Kim JK. The study of the oriental medicine extract on the hair growth effect. *Korea J Herbology*. 2004 ; 19(2) : 83-90.
15. Hur SK, Kim SS, Heo YH, Ahn SM, Lee BG, Lee SK. Effect of the grapevine shoot extract on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in raw 264.7 macrophages. *J Applied Pharmacology*. 2001 ; 9 : 188-93.
16. Roberforid M, Calderon PB. Free radicals and oxidation phenomena in biological system. New York : Marcel Dekker, Inc. 1995 : 193-236.
17. Bickers DR1, Athar M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. *J Invest Dermatol*. 2006 ; 126(12) : 2565-75.
18. Sen CK. Oxidative and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol*. 1995 ; 79(3) : 675-86.
19. Tsan MF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Int J Mol Med*. 2001 ; 7(1) : 13-9.
20. Kang TH, Park HM, Kim YB, Kim H, Kim N, Do JH, Kang C, Cho Y, Kim SY. Effects of red ginseng extract on UVB irradiation-induced skin aging in hairless mice. *J Ethnopharmacol*. 2009 ; 123(3) : 446-51.

21. Kim MJ, Kim JY, Jung TK, Choi SW, Yoon KS. Skin anti-aging effect of *Forsythia viridissima* L. extract. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2006 ; 21(6) : 444-50.
22. Hwang JG, Yun JK, Han KH, Do EJ, Lee JS, Lee EJ, Kim JB, Kim MR. Anti-oxidation and Anti-aging Effect of Mixed Extract from Korean Medicinal Herbs. *Korea J Herbology.* 2011 ; 26(1) : 111-17.