

하엽(荷葉) 추출물이 항산화 효능 및 피부노화에 미치는 영향

박찬익^{1#}, 박근혜^{2*}

1 : 대구한의대학교 향산업학과, 2 : (주)대한바이오위드

Antioxidant and Anti-wrinkling Effects of Extracts from *Nelumbo nucifera* leaves

Chan-Ik Park^{1#}, Geun-Hye Park^{2*}

1 : Department of Aroma-Applied Science, Daegu Haany University, Korea,

2 : Daehan Biowid Co., Ltd., Korea,

ABSTRACT

Objective : The purpose of this study was to investigate anti-aging and antioxidant effects of extracts of *Nelumbo nucifera* leaves (NN-L) using ethanol on skin .

Methods : Each part of leaves(NN-L), flowers(NN-F) and stem(NN-S) was extracted with 70% ethanol. We performed radical scavenging assay(DPPH, ABTS+, Superoxide anion radical), elastase inhibition assay, collagenase inhibition assay. NN-L extracts were tested for cell viability(MTT assay), MMP-1 inhibition and MMP-1 protein expression on CCD-986sk cells (human fibroblast line).

Results : 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. We measured its free radical scavenging activity, elastase inhibitory activity and expression of MMP-1 (matrix metalloprotease-1) in human fibroblast cells. Among the parts of *Nelumbo nucifera*, NN-L showed the highest antioxidant activities and in radical scavenging. DPPH, ABTS+ and Superoxide anion radical scavenging activity of NN-L at concentration of 1,000 μ g/mL were 91.43%, 99.31% and 73.7% respectively. In vitro elastase and collagenase inhibition effects of NN-L at concentration of 1,000 μ g/mL was 42.8% and 55.3% respectively. The ethanol extract of NN-L showed cell viability of 95.4% in 50 μ g/mL concentration. In addition, The results from Western blot assay showed that NN-L decreased the expression of MMP-1 protein in a dose-dependent manner (by up to 35.0% at 50 μ M).

Conclusion : The findings suggest that the NN-L great potential as a cosmeceutical ingredient with antioxidant and anti-wrinkling effects.

Key words : *Nelumbo nucifera* leaves(NN-L), DPPH, ABTS+, Elastase, Collagenase, MMP-1, Anti-wrinkling.

I. 서 론

피부의 상태는 한의학적 측면에서 외부요인에 의한 질병뿐 아니라, 인체의 각종 내재 요인에 의해 영향을 받는다. 한의학의 진단 방법인 望診에서 神, 色, 態의 변화는 주요한 요소로 관찰되며, 특히 피부와 관련된 色澤의 변화는 五臟의 氣血, 盛衰를 표현하는 중요한 인자로 인식되어 왔다¹⁾. 피부노화는 나이가 들어감에 호르몬 분비가 감소하고, 면역세포의

기능 활성이 저하되어 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되어 생기는 내인성 노화와 주위환경, 특히 자외선 노출로 인해 발생하는 외인성 노화로 나눌 수 있다. 피부 노화에 영향을 미치는 활성산소 종은 피부세포에 불포화 지방산, 단백질, DNA 등의 물질과 반응하여 피부 결합조직인 콜라겐 결합조직 형성을 파괴하고, 피부세포의 손상, 색소 침착을 증가시켜, 피부 주요 성분들의 직접적인 기능손실을 초래하여 피부 노화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다²⁾. 진피층은 피부의 물

*Corresponding author : Geun-Hye Park, Institute of technology, Daehan biowid Co, Ltd, Gyeong buk, Korea,

· Tel : +82-53-852-9554 · Fax : +82-53-818-9554 · E-mail : ssdh11@naver.com

#First author : Chan-Ik Park, Dept. of Aroma-Applied Science, Daegu Haany,

· Tel : +82-53-819-1464 · Fax : +82-53-818-9554 · E-mail : gajette@hanmail.net

· Received : 13 June 2016 · Revised : 28 June 2016 · Accepted : 18 July 2016

리 화학적인 성질을 결정하여 모세혈관과 표피에 영양을 공급해주는 중요한 역할을 하므로 피부의 노화와 밀접한 관련이 있다³⁾. 엘라스틴은 진피층의 3-4% 정도를 차지하고 콜라겐은 진피 층의 90% 이상으로 구성되어 있으며 피부의 탄력에 영향을 준다. 콜라겐과 엘라스틴은 섬유아세포의 작용에 의해 합성되며 collagenase와 elastase에 의해 분해된다. 그러므로 피부 노화의 주원인인 콜라겐과 엘라스틴 분해효소인 collagenase와 elastase의 활성을 저해시킴으로써 피부 노화를 억제할 수 있다⁴⁾. 피부 노화가 진행될수록 세포활성이 떨어지며 collagen, elastin, hyaluronic acid 등 구조 단백질을 생성하는 능력이 감소하고, 신호전달체계가 불완전해지면서 피부조직을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 생합성이 증가하게 되면 진피 내 교원 섬유, 탄력 섬유, fibronectin 및 laminin과 같은 기질 단백질 분해를 유도하여 피부탄력을 떨어뜨리고 피부 주름생성을 촉진한다⁵⁾. MMPs는 기질분해 단백질로 기질을 가수분해하는데 중요한 역할을 담당하고 있다. MMP-1은 사람에게서 폭 넓은 활성을 가지고 있으며, type-I, II, III, IV 교원질을 분해하며, 피부탄력을 유지하는 결합조직을 파괴하고 주름과 탄력저하 및 피부 처짐의 원인이 되는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 피부에서 교원 섬유 양을 증가시키기 위해서는 섬유아세포의 교원 섬유 합성능을 증가시키거나 기질 금속 단백질 분해효소인 matrix metallo proteinases (MMPs) 발현을 억제시키는 방법이 있다⁷⁾. 최근 피부 주름 개선 효과가 있는 다양한 천연소재 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 주름 개선으로 쓰이고 있는 물질로는 retinol, retinyl palmitate, adenosine, epigallocatechin gallate 등이 있다⁸⁾. 하엽(荷葉, *Nelumbo nucifera* leaves)은 수련과(Nymphaeaceae)에 속하는 여러해살이 수초 연(蓮, *Loutus*)의 잎으로 아시아 남부, 북호주가 원산지이며 인도와 중국을 중심으로 열대, 온대의 동부아시아에서, 서쪽으로는 카스피해지방, 동쪽으로는 한국, 일본 등에 널리 분포하여 재배되고 있다. 여름에 있을 따서 햇볕이나 그늘에서 말린다. 맛은 쓰고 성질은 평하며, 한의학에서는 서기(暑氣)를 제거하고 습(濕)을 배출시키며 맑은 양기(陽氣)를 승발(升發)시키고 지혈(止血)하는 효능이 있으며 습(濕)에 의한 설사, 현기증, 수기(水氣)에 의한 부종, 피를 토하는 것, 혈변(血便), 산후의 혈훈(血暈)을 치료하는데 사용하여왔다⁹⁾. 하엽에 함유되어 있는 성분으로는 roemerine, N-methylcoclaurine, quercetin, isoquercetin, coclaurine, norcoclaurine, rutin, hyperin, catechin, hyperoside, astragaline, 주석산, 구연산, 사과산, 호박산, 탄닌 등이 있다¹⁰⁻¹³⁾. 약리작용에 대한 연구는 라디칼 소거활성 및 LDL 산화 억제를 보이는 항산화 활성에 관한 연구¹⁴⁻¹⁵⁾, 산화스트레스와 연관된 당뇨 합병증을 예방하는 효과¹⁶⁾, 지방분해활성을 촉진하는 항비만 효과¹⁷⁾ 등이 보고되어 있다. 본 연구는 하엽의 항산화 효과와 피부탄력 및 주름 개선에 관련된 콜라겐 생합성 촉진 및 분해억제효능 확인하기 위해 DPPH, ABTS+, Superoxide anion radical 라디칼 소거능과 자외선 조사한 섬유아세포(CCD-986sk) cell에서 MMP-1 저해활성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 실험에 사용한 연꽃, 연잎, 연줄기는 대구 반야월 연 재배 농장에서 7월에 채취한 것을 건조하여 사용하였다. 시료의 추출은 70% 에탄올을 시료 중량의 10배를 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출 하였고, 얻어진 여액은 여과 (Whatman NO. 5) 및 감압 농축(Rotary vaccum evaporatory)하여 동결건조 후 4℃냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

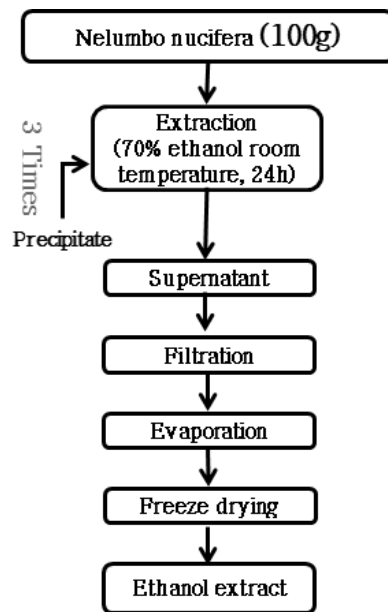


Fig. 1. The procedure for extraction from *Nelumbo nucifera* G.

2) 시약 및 기기

(1) 항산화 및 주름억제 효과 측정 시약

항산화능 실험에 사용된 시약인 1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), xanthine, xanthine oxidase, nitro blue tetrazolium(NBT), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, potassium persulfate 등은 Sigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 주름억제 효과 측정에 사용된 시약인 porcine pancreas elastase(PPE), N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide, collagenase 및 4-phenyllazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg 등은 Sigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, MMP-1 활성을 측정하기 위하여 MMP-1 kit (Amersham Bioscience, USA), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 그 외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 세포실험에 사용된 세포 주 및 시약

본 실험에서 사용한 섬유아세포는 (CCD-986sk) Korean Cell Line Bank(KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양 시약 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), 0.25% trypsin-EDTA, 0.4% trypan blue stain은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였고, Haemocytometer(Mariefeld, Germany), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT)는 Sigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀의 정량은 Folin-danis¹⁸⁾ 방법을 이용하였다. 시료용액 (20 μ L)을 60배 희석하고 Folin - Ciocalteu's phenol reagent (100 μ L)를 첨가하여 혼합한 후 5분간 실온에서 반응시키고 포화 Na₂CO₃ 용액(300 μ L)을 가하여 1시간 실온에서 방치하고, 760nm에서 흡광도를 측정한 후, 표준물질인 tannic acid로 미리 작성한 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 폴리페놀 함량을 산출하였다.

2) 항산화 효과 측정

(1) DPPH radical 소거능 측정

DPPH 전자공여능 (EDA; electron donating ability)은 Blois의¹⁹⁾ 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액 120 μ L에 0.45 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 60 μ L넣고 교반한 후 15분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

전자공여능(%)=(1-시료첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도)×100

(2) ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical scavenging을 이용한 항산화력 측정은 Fellegrini의²⁰⁾ 방법에 의하여 측정하였다. 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치하여 ABTS를 형성시킨 후 ethanol로 희석하여 사용하였다. 각 시료용액 100 μ L에 희석한 ABTS용액 100 μ L를 가하여 5분 동안 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS radical소거능(%)=(1-시료첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도)×100

(3) Superoxide anion radical 소거능 측정

Superoxide anion radical 소거능은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원방법²¹⁾에 의해 측정하였다. 각 시료용액 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8.0) 40 μ L에 Xanthine (0.4 mM)과 NBT (0.24 mM)을 녹인 기질액 100 μ L를 첨가하고 xanthine oxidase (0.2 U/mL) 100 μ L를 가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 생성된 superoxide anion radical의 양을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Superoxide anion radical 소거능(%)=(1-시료첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도)×100

3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Camichael²²⁾의 방법에 따라 측정하였다. Fibroblast (CCD-986sk) cell를 96 well plate에 5×10^3 cells/ml이 되게 seeding 하고 PBS를 첨가한 다음 자외선을 조사하고 시료를 농도 별로 20 μ L 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양 하였다. 배양 후 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 20 μ L를 첨가하여 3시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 150 μ L를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

4) 주름억제 효과 측정

(1) Elastase 저해능 측정

Elastase 저해능은 Cannell 등²³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5 U/mL) 40 μ L과 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide (1 mg/mL)을 80 μ L 첨가하여 37°C에서 30분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. elastase 저해능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

효소활성 저해(%)=(1-시료첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도)×100

(2) Collagenase 저해능 측정

Collagenase 저해능은 Wünsch 등²⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/mL) 0.15 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL을 넣어 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL을 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. collagenase 저해능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

효소활성 저해(%)=(1-시료첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도)×100

(3) MMP-1 저해활성 측정

96 well plate에 각 well당 1×10^5 cells/well 세포가 되도록 seeding 후 24시간을 안정화 하였다. 이후, 배양된 배지를 제거하고 PBS를 첨가한 다음 자외선을 조사하고 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF- α 를 10 ng/mL의 농도로 첨가하고 시료를 농도 별로 처리한 후 48시간을 배양하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며 Gross 등²⁵⁾의 방법에 따라 MMP-1 biotrack activity assay kit (Amersham

Bioscience, USA)을 이용하여 측정하였다.

(4) Western blot을 통한 단백질 발현 측정

세포 (CCD-986sk)를 6 well에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 각 well에 시료를 48시간 동안 처리한 뒤 PBS로 2번 세척해주었다. Lysis buffer를 이용하여 CCD-986sk 세포를 용해시키고, 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하여 10%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5%skim milk in TBST)에서 incubation시켰다. MMP-1 각각의 1차 항체를 1:1000으로 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 washing하고 mouse anti-rabbit IgG HRP의 각각의 2차 항체를 1:1,000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 붙이고, 3회 washing한 뒤 LAS 4,000 imageanalyzer (Fugifilm life science, Japan) 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

5) 통계처리

모든 실험 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 통계처리는 Students's t-test로 검정하였고, 정상 세포군과 비교하여 $p < 0.05$ 이하의 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

III. 결 과

가. 총 폴리페놀 함량

Folin-Ciocalteu을 이용한 Folin-Denis법으로 연의 꽃 (NN-F), 잎(NN-L), 줄기(NN-S) 에탄올 추출물의 페놀성 화합물 함량을 tannic acid 으로 환산하여 비교측정 한 결과, NN-L(213.5 ± 1.12)에서 NN-F(182.7 ± 1.68)와 NN-S (49.6 ± 0.69) 보다 많은 폴리페놀 함량을 확인 하였다.

Table 1. The contents of total polyphenol of *Nelumbo nucifera* G. extracts.

| Samples | Total polyphenol (mg/g) |
|---------|-------------------------|
| NN-F | 182.7 ± 1.68 |
| NN-L | 213.5 ± 1.12 |
| NN-S | 49.6 ± 0.69 |

Each value presents the mean ± SD of triplicate determinations.
 NN-F : *Nelumbo nucifera* G. flower extracted with 70% ethanol
 NN-L : *Nelumbo nucifera* G. leaf extracted with 70% ethanol
 NN-S : *Nelumbo nucifera* G. stem extracted with 70% ethanol

2. 항산화 효과

1) DPPH radical 소거능

전자공여능 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

(DPPH)는 안정한 자유 라디칼로서 비공유전자로 인해 517 nm 부근에서 최대 흡수치를 나타내며 전자 또는 수소를 받으면 517 nm 부근에서 흡광도가 감소하며 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성을 기대할 수 있으며 알코올 등의 유기용매에 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 연의 꽃, 잎, 줄기 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능을 비교 측정한 결과(Fig 2), 1000ug/mL에서 NN-L(91.43%), NN-F (82.0%), NN-S(72.7%)으로 NN-L에서 가장 우수한 DPPH radical 소거능을 확인하였으며, 농도 의존적이고 대조군인 Vit. C (93.16%) 보다 우수한 결과를 확인 하였다.

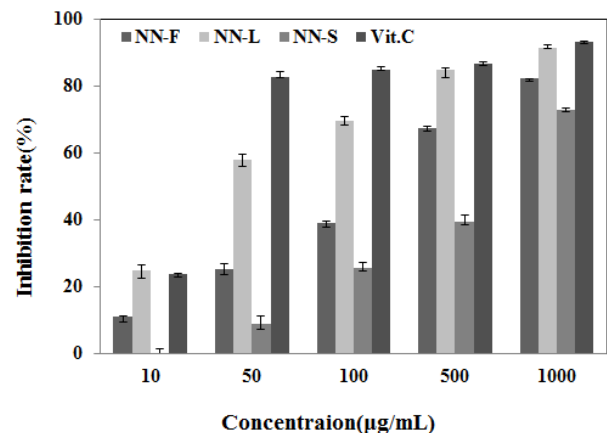


Fig. 2. The Electron donating ability of *Nelumbo nucifera* G. extracts. NN-F : *Nelumbo nucifera* G. flower extracted with 70% ethanol
 NN-L : *Nelumbo nucifera* G. leaf extracted with 70% ethanol
 NN-S : *Nelumbo nucifera* G. stem extracted with 70% ethanol
 Vit. C : L-ascorbic acid.
 Results are means ± S.D. of triplicate date.

2) ABTS radical 소거능 측정

DPPH radical의 소거활성과 같이 일반적으로 많이 사용되는 ABTS+ radical cation소거능은 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)와 potassium persulfate와의 반응으로 ABTS+ radical이 생성되면 특유의 색인 청록색을 띠게 되는데, 시료를 첨가함에 따라 연한녹색으로 decolorization 되는 것을 측정하는 방법이며, hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정 할 수 있다. 연의 꽃, 잎, 줄기 에탄올 추출물의 ABTS+ radical 소거능을 비교 측정한 결과(Fig 3), 100 µg/mL에서 NN-L(97.1%), NN-F(96.2%), NN-S(91.6%)으로 NN-L에서 가장 우수한 radical 소거능을 확인하였으며 대조군인 Vit. C (99.7%)와 유사한 결과를 확인 하였다.

3) Superoxide anion radical 소거능 측정

NBT(Superoxide anion radical) 소거 능 측정은 Xanthine oxidase가 xanthine을 기질로 하여 uric acid를 생성하는 과정에 생성되는 superoxide anion radical을 NN-L 에탄올추

출물과 반응시켜 nitro blue tetrazolium로 superoxide anion radical 소거 능을 확인하는 방법이다. 연의 꽃, 잎, 줄기 에 탄을 추출물의 superoxide anion radical 소거능을 비교 측정 한 결과(Fig 4), 1000 μ g/mL에서 NN-L(73.7%), NN-F (68.1%), NN-S(35.6%)으로 NN-L에서 가장 우수한 radical 소거능을 확인하였으며 대조군인 Vit. C (81.2%)와 유사한 결과를 확인 하였다.

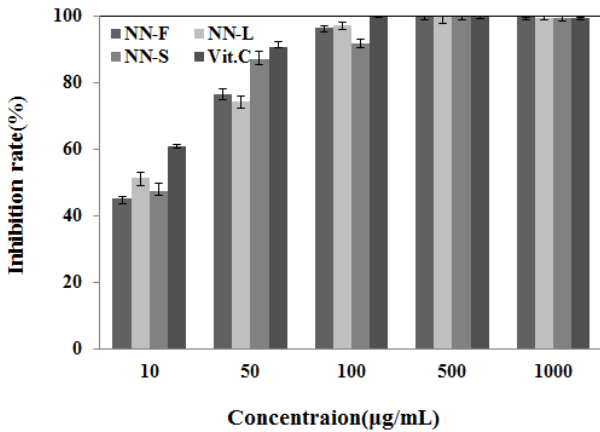


Fig. 3. ABTS⁺ radical cation scavenging activity of *Nelumbo nucifera* G. extracts.

NN-F : *Nelumbo nucifera* G. flower extracted with 70% ethanol
 NN-L : *Nelumbo nucifera* G. leaf extracted with 70% ethanol
 NN-S : *Nelumbo nucifera* G. stem extracted with 70% ethanol
 Vit. C : L-ascorbic acid.
 Results are means \pm S.D. of triplicate date.

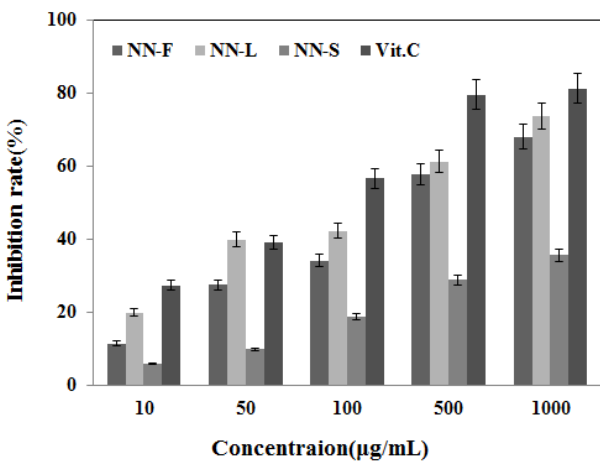


Fig. 4. The superoxide anion radical scavenging activity of *Nelumbo nucifera* G. extracts.

NN-F : *Nelumbo nucifera* G. flower extracted with 70% ethanol
 NN-L : *Nelumbo nucifera* G. leaf extracted with 70% ethanol
 NN-S : *Nelumbo nucifera* G. stem extracted with 70% ethanol
 Vit. C : L-ascorbic acid.
 Results are means \pm S.D. of triplicate date.

3) MTT assay에 의한 Fibroblast cell (CCD-986sk)의 생존율 확인

CCD-986sk 세포에서 NN-L 에탄올추출물이 세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 이용한 세포 생존율을 측정하였다. CCD-986sk 세포에 NN-L 에탄올추

출물 1, 5, 10, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 48시간 처리한 결과 5, 10, 50, 100 μ g/mL 농도구간에서 100%에 가까운 세포 생존율을 확인 하였다. 실험결과(Fig 5)에 따라 50 μ g/mL이하 농도에서 MMP-1 저해활성 측정과 단백질 발현 실험을 하였다.

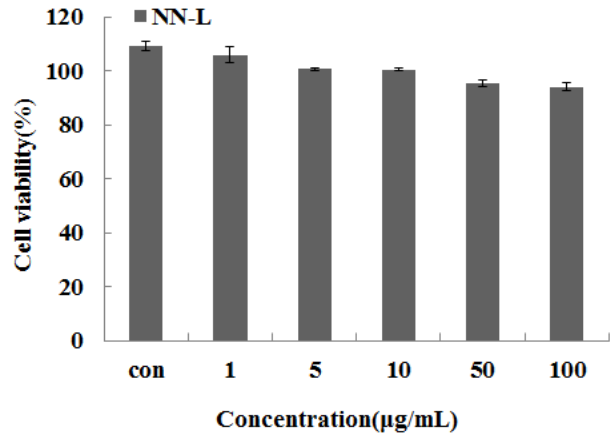


Fig. 5 Cell viability effects of NN-L on fibroblast cell (CCD-986sk). CCD-986sk cells (5×10^3 cells) were started in medium for 24 h the cells were treated with 5, 10, 50, 100 μ g/mL of NN-L extracted with 70% ethanol for 48 h.

4) 주름억제 효과

(1) Elastase 저해능

Elastase는 동물 결합조직의 불용성 탄성섬유 단백질인 elastin을 분해시켜 피부의 세포 기저층의 그물망 구조를 끊어주어서, 주름을 생성하는 주된 원인으로 알려져 있다. 피부 노화의 주원인중의 하나인 elastin 분해효소인 elastase의 활성을 저하시킴으로써 피부노화를 억제할 수 있다. 연의 꽃, 잎, 줄기 에탄올 추출물에서 주름 생성과 관련된 elastase 저해활성을 비교 측정 한 결과, 1000 μ g/mL에서 NN-L(42.8%), NN-F(9.5%), NN-S(17.9%)으로 NN-L에서 가장 우수한 elastase 억제능을 확인하였다(Fig 6). 같은 농도에서 Vit. C(62.4%)와 비교하면 다소 낮은 elastase 억제능이다. 본 연구 결과를 통해 대추 에틸아세테이트층이 elastase의 활성을 유의적으로 억제한 것을 확인하여 피부노화 억제에 도움을 줄 수 있음을 시사한다.

(2) Collagenase 저해능 측정

주름생성은 진피조직내의 섬유아세포의 기능저하로 인해 일어난다. 피부조직을 이루고 있는 콜라겐은 합성이 저하되고, 콜라겐 분해효소인 콜라게나제에 의해 분해된다. 광노화로 인한 피부주름 형성은 자외선에 의해 콜라겐의 합성은 촉진되나, 동시에 콜라게나제의 급격한 활성증가로 불규칙적인 콜라겐이 형성된다. 이로 인해 피부표면이 거칠고 비대해 지며 깊은 주름이 생기게 된다. 연의 꽃, 잎, 줄기 에탄올 추출물에서 주름 생성과 관련된 collagenase 저해활성을 비교 측정 한 결과 (Fig 7), 1000 μ g/mL에서 NN-L(77.2%), NN-F(26.1%), NN-S(47.9%)으로 NN-L에서 가장 우수한 collagenas 억

제능을 확인하였다. 양성 대조군인 Vit.C가 500 μ g/mL에서 78.8%의 collagenase 저해능을 보인 것보다는 낮은 결과이다.

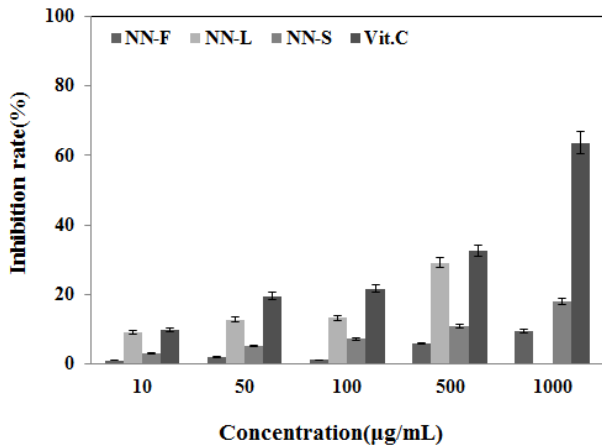


Fig. 6. Inhibition rate of *Nelumbo nucifera* G. extracts on elastase. NN-F : *Nelumbo nucifera* G. flower extracted with 70% ethanol NN-L : *Nelumbo nucifera* G. leaf extracted with 70% ethanol NN-S : *Nelumbo nucifera* G. stem extracted with 70% ethanol Vit. C : L-ascorbic acid. Results are means \pm S.D. of triplicate date.

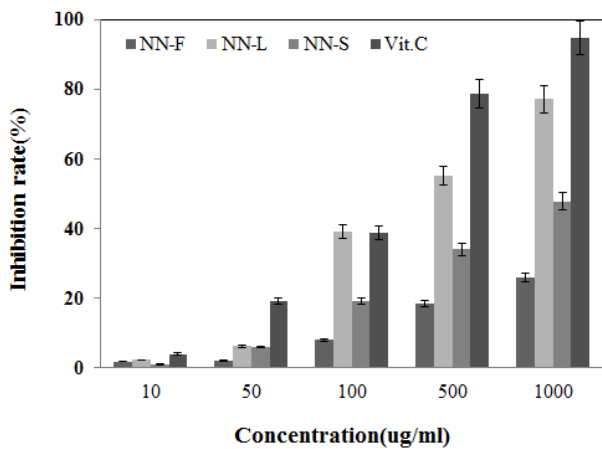


Fig. 7. Inhibition rate of *Nelumbo nucifera* G. extracts on collagenase. NN-F : *Nelumbo nucifera* G. flower extracted with 70% ethanol NN-L : *Nelumbo nucifera* G. leaf extracted with 70% ethanol NN-S : *Nelumbo nucifera* G. stem extracted with 70% ethanol Vit. C : L-ascorbic acid. Results are means \pm S.D. of triplicate date.

(3) MMP-1 저해활성 측정

체내에서 생성되는 수종의 MMPs 가운데 MMP-1은 collagen에 특이적으로 작용하는 protease로서 MMP-1의 활성을 억제하여 collagen의 분해를 감소시키면, 피부조직의 탄력을 유지하고 주름생성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 NN-L이 MMP-1 활성에 미치는 영향을 확인한 결과(Fig 8), UV-B를 처리하지 않은 군과 처리한 군은 각각 21.3%, 100%의 MMP-1을 생산하여 UV-B를 처리함으로써 MMP-1 양이 활성화됨을 확인할 수 있었다. NN-L 50 μ g/mL에서 29.5%의 MMP-1의 발현 저해효과를 나타내었다. 본 연구 결과를 통해 NN-L 에탄올추출물이 collagenase 분해에 영향을 미치는 MMP-1의 활성을 억제함으로써 피부노화 억제에 도움을 줄 수 있음을 의미한다.

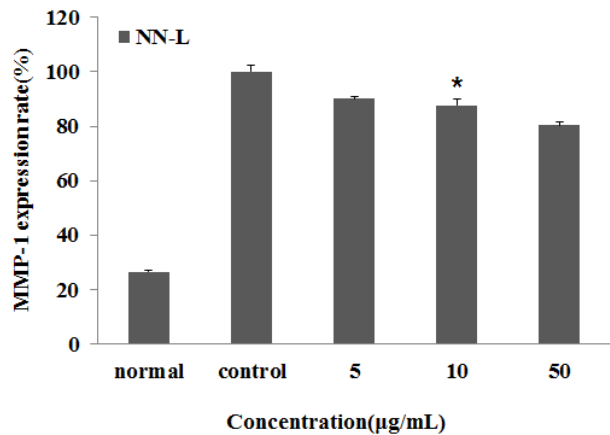


Fig. 8 MMP-1 inhibition rate of NN-L extracts on fibroblast cell (CCD-986sk).

The cells were treated with various concentrations of 5, 10, 50 μ g/mL of NN-L extracted with 70% ethanol for 48 h. The contents of MMP-1 in culture media was determined by the MMP-1 ELISA kit as detailed under the materials and methods. The data represent the mean \pm SD of three separate experiments (Significant as compared to control. *p < 0.05).

(4) Western blot을 통한 MMP-1 유전자 발현의 억제

MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, type I과 III collagen을 기질로 하며, stromelysin 1라고도 불리는 MMP-3은 기저막의 type IV collagen을 분해하며 zymogen인 pro MMP-1을 활성화 시키는데, 이러한 MMPs의 발현증가는 자외선에 의해 유도된다. NN-L 에탄올 추출물 처리군에서 MMP-1의 단백질 발현을 확인한 결과, NN-L 에탄올 추출물 50 μ g/mL의 농도에서 35.0%의 MMP-1의 단백질 발현 억제능을 확인 하였다(Fig 9). 결과에 따라 NN-L 에탄올추출물이 피부탄력 및 주름 개선 효능에 기여할 것으로 판단된다.

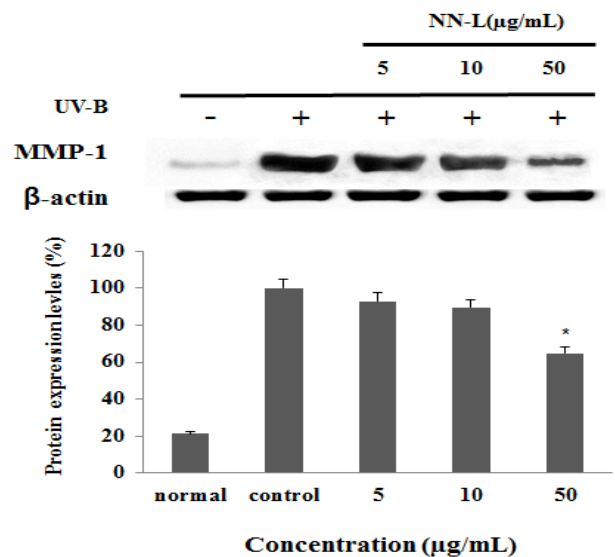


Fig. 9. MMP-1 protein expression rate of NN-L on fibroblast cell (CCD-986sk).

CCD-986sk cells (1×10^5 cells) were started in medium for 24 h. The cells were treated with 5, 10, 50 μ g/mL of NN-L extracted with 70% ethanol for 48 h. Histogram show the densitometry of MMP-1 protein normalized to β -actin. The data represent the mean \pm SD of three separate experiments (Significant as compared to control. *p < 0.05).

IV. 고 찰

피부노화는 다양하고 복잡한 생물학적 과정을 거쳐 일어나는 현상으로 내인적·외인적노화 모두 주름이 생성되고 피부면역 세포인 랑거한스세포와 진피의 교원섬유(collagen fiber)가 감소하는 공통점이 있으나 자연노화에서는 피부가 얇아지는 반면 외인적노화의 대부분을 차지하는 광노화의 경우에는 피부가 두꺼워지고 변형된 탄력섬유(elasticfiber)가 증가하는 특징이 있다. 반복적인 자외선의 노출로 생성된 과잉의 활성산소 종은 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어체계에 불균형을 초래하고 염증성 사이토카인의 생성을 촉진시킨다²⁷⁾. 이로 인해 피부를 구성하는 지질, 단백질, 핵산, 효소 등이 손상되어 탄력감소, 주름 및 기미, 주근깨와 같은 피부노화 징후가 나타난다. 산화에 의한 피부손상은 다양한 노화 징후 즉 기미, 주름, 건조 등의 증상과 밀접한 관련이 있으므로 항노화에 있어서 산화에 적극적으로 대응하는 것이 중요하다. 연의꽃(NN-F), 잎(NN-L), 줄기(NN-S) 에탄올 추출물의 페놀성 화합물 함량을 비교측정한 결과, NN-L(213.5 ± 1.12)에서 NN-F(182.7 ± 1.68)와 NN-S(49.6 ± 0.69) 보다 많은 폴리페놀 함량을 확인 하였다. NN-F, NN-L, NN-S에서 DPPH, ABTS+ radical 소거능을 측정된 결과 NN-L에서 가장 우수한 radical 소거능을 확인 하였으며 대조군인 Vitamin C 보다는 높지 않으나 유사한 radical 소거능을 확인 함으로 이후 분획 및 정제과정을 거친다면 더 우수한 효능효과를 기대할 수 있을 것이라 사료된다. Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는 기질 단백질인 elastin의 분해에 관련되며, 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발한다. 1000ug/mL에서 NN-L(42.8%)에서 가장 우수한 elastase 억제능을 확인하였다. 같은 농도에서 Vit. C(62.4%)와 비교하면 다소 낮은 elastase 억제능이다. 연구 결과를 통해 대추 에틸아세테이트층이 elastase의 활성을 유의적으로 억제한 것을 확인하여 피부노화 억제에 도움을 줄 수 있음을 시사한다. 피부세포의 결합 조직을 구성하는 성분 중 collagen은 피부 건조 증량의 90% 정도를 차지하는 주요 구성 단백질이다. collagen의 분해는 결합 조직의 탄력 저하와 주름 생성등에 직접적인 영향을 미치게 된다. 따라서 elastase 저해 효능과 collagenase 억제능에 효능을 나타내는 NN-L 추출물은 피부의 주름을 개선하는 효과를 갖게 된다. 체내에서 생성되는 MMPs는 활성 중심부에 아연을 갖는 금속 단백질 분해 효소로서 현재까지 약 20여 종 이상의 종류가 있는 것으로 알려져 있으며, 구조와 기능에 따라 interstitial, collagenase, gelatinase, stromelysin, membrane type MMP 등으로 구분하기도 한다. 수종의 MMPs 가운데 MMP-1은 collagen에 특이적으로 작용하는 protease로서 전사인자인 AP-1(activating protein-1)에 의해 유도되며 피부노화와 직접적으로 관련이 있다²⁹⁾. MMP-1의 활성을 억제하여 collagen의 분해를 감소시키면, 피부 조직의 탄력을 유지하고 주름 생성을 예방할 수 있으므로 MMP-1 활성을 저해하는 연구가 점차 증가되고 있다²⁸⁾. 본 연구에서 MMP-1 저해활성과 MMP-1 protein 발현을 비교 평가한 결과 MMP-1의 활성이 29.5% 감소된 것을 확인 하였으며

MMP-1 protein 발현은 35.0% 감소되었다. 이들 결과는 NN-L이 피부노화 억제에 연관이 있다고 사료된다. 연의 각 부위(NN-F, NN-L, NN-S)별 추출물의 항산화, elastase, collagenase 저해활성에 대한 효능을 평가한 결과 NN-L이 가장 우수하였으며, 전체적으로 농도 의존적으로 활성이 나타남을 알 수 있었으며, 추가로 NN-L의 MMP-1 저해능과 protein 발현능에서도 유의한 결과를 확인하였다.

V. 결 론

본 연구는 연의 잎(荷葉)의 항산화 및 항노화 효능을 조사하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH radicle 소거능을 비교 측정한 결과, 1000ug/mL에서 NN-L(91.43%)서 가장 우수한 DPPH radicle 소거능을 확인하였으며 대조군인 Vit. C (93.16%) 보다 우수한 결과를 확인 하였다.
2. ABTS⁺ radicle 소거능을 비교 측정한 결과, 100 μ g/mL에서 NN-L(97.1%)에서 가장 우수한 radicle 소거능을 확인하였으며 대조군인 Vit. C (99.7%)와 유사한 결과를 확인 하였다.
3. Superoxide anion radical 소거능을 비교 측정한 결과, 1000 μ g/mL에서 NN-L(73.7%)에서 가장 우수한 radical 소거능을 확인하였으며 대조군인 Vit. C (81.2%)와 유사한 결과를 확인 하였다.
4. Elastase 저해활성을 비교 측정한 결과, 1000ug/mL에서 NN-L(42.8%)에서 가장 우수한 elastase 억제능을 확인하였다.
5. Collagenase 저해활성을 비교 측정한 결과, 1000μ g/mL에서 NN-L(77.2%)에서 가장 우수한 collagenase 억제능을 확인하였다. 양성 대조군인 Vit.C가 500 μ g/mL에서 78.8%의 collagenase 저해능을 보인 것보다는 낮은 결과이다.
6. 피부섬유아세포(CCD986-sk)에서 높은 안전성을 나타내었으며, NN-L 에탄올추출물 5, 10, 50, 100 μ g/mL 농도구간에서 100%에 가까운 세포 생존율을 확인 하였다.
7. CCD986-sk 세포에 자외선 B를 노출시킨 경우 추출물을 처리한 군에서는 MMP-1 수준이 TNF-α 단독 처리군보다 감소되었으며, elastase 저해활성 측정에서도 농도에 비례하여 우수한 효능을 나타냄을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 하엽(荷葉) 에탄올 추출물은 낮은 세포독성을 나타내며 농도 의존적으로 항산화, 항노화 효능을 나타냄으로 피부 주름개선에 도움을 주는 소재로서 가능성을 보여 주었다고 사료된다.

참고문헌

1. Song ZY. External use prescription for dermatolosis. Beijing:Renminweisheng. 2000 : 5-6.
2. Emerit I. Free radicals and aging of the skin. *EXS*. 1992 ; 62 : 328-41.
3. Chung JH. Photoaging in Asians. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003 ; 19(3) : 109-21
4. Lee KK, Kim JH, Cho JJ, Choi JD. Inhibitory Effects of 150 Plant Extracts on Elastase Activity, and Their Anti-inflammatory Effects. *Inter. J. Cosm. Sci*. 1999 ; 21 : 71-82.
5. Brenneisen P, Sies H, and Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases : from induction via signaling to initial events. *Ann. N.Y. Acad.* 2002 ; 973 : 31-43.
6. Puizina-Ivic N. Skin aging. *Acta Dermatoven APA*. 2008 ; 17(2) : 47-54
7. Seo JE, Kim S, Shin M H, Kim MS, Eun HC, Park CH, and Chung JH. Ultraviolet irradiation induces thrombospondin-1 which attenuates type I procollagen downregulation in human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci*. 2010 ; 59(1) : 16-24.
8. Maeda K and Fukada M. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem*. 1991 ; 42(6) : 361-368.
9. Kim CM, et al. Chinese materia medica dictionary. Seoul : Jeongdam. 1997 : 4623-5.
10. Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y, Hen YP, Furukawa H, Itoigawa M, Fujioka T, Mihashi K, Cosentino M, Natschke SM, Lee KS. Anti-HIV benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg Med Chem*. 2005 ; 13(2) : 443-8.
11. Agnihotri V, Elsohly H, Khan S, Jacob M, Joshi V, Smillie T, Khan I, Walker L. Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity. *Phytochemistry Lett*. 2008 ; 1(2) : 89-93.
12. Kim KH, Chang SW, Ryu SY, Choi Su, Lee KR. Phytochemical Constituents of *Nelumbo nucifera*. *Natural Product Sciences*. 2009 ; 15(2) : 90-5.
13. Ohkoshi E, Miyazaki H, Shindo K, Watanabe H, Yoshida A, Yajima H. Constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* stimulate lipolysis in the white adipose tissue of mice. *Planta Med*. 2007 ; 73(12) : 1255-1259.
14. Lin HY, Kuo YH, Lin YL, Chiang W. Antioxidative Effect and Active Components from Leaves of Lotus (*Nelumbo nucifera*). *J. Agric. Food Chem*. 2009 ; 57(15) : 6623-9.
15. Hyun SK, Jung YJ, Chung HY, Jung HA, Choi JS. Isorhamnetin glycosides with free radical and ONOO- scavenging activities from the stamens of *Nelumbo nucifera*. *Arch Pharm Res*. 2006 ; 29(4) : 287-92.
16. Jung HA, Jung YJ, Yoon NY, Jeong da M, Bae HJ, Kim DW, Na DH, Choi JS. Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* leaves on rat lens aldose reductase, advanced glycation endproducts formation, and oxidative stress. *Food Chem Toxicol*. 2008 ; 46(12) : 3818-26.
17. Ohkoshi E, Miyazaki H, Shindo K, Watanabe H, Yoshida A, Yajima H. Constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* stimulate lipolysis in the white adipose tissue of mice. *Planta Med*. 2007 ; 73(12) : 1255-9.
18. Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis DA, Barrow, Colin J. A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. 2006 ; 18 : 445-450.
19. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 4617 : 1199-2000.
20. Fellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*. 1999 ; 299 : 379-389.
21. Stirpe F and Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem*. 1969 ; 244(14) : 3855-3863.
22. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, JMinna JD and Mitchell JB. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Res*. 1987 ; 47(4) : 936 -942.
23. Cannell RJ, Kellam SJ, Owsianka AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Media*. 1988 ; 54(1) : 10-14.
24. Wünsch E and Heindrich HG. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem*. 1963 ; 333 : 149-151.
25. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues : a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962 ; 54 : 1197-1204.
26. Yuk CS. Coloured medicinal plants of Korea. Academy book Co, Seoul, Korea. 1990 ; 219-30.
27. Oikarinen A. Theaging of skin : Chronoaging versus photoaging. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 1990 ; 7(1) : 3-4.
28. Talwar HS, Griffiths CE, Fisher GJ, Hamilton TA, and Voorhees JJ. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult humanskin. *J Invenst Dermatol*. 1995 ; 105 : 285-90.
29. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, and Kang S. Molecular basis of sun-induced premature ageing and retinoid antagonism. *Nature*. 1996 ; 379 : 335-9.