

어리연꽃으로부터 분리한 Sweroside의 항노화 효과

김 유 아 · 김 동 희* · 박 채 빈 · 박 태 순* · 박 병 준†

한국콜마(주) 피부과학연구소

*한약진흥재단 한의약기술본부

(2018년 3월 14일 접수, 2018년 5월 16일 수정, 2018년 5월 28일 채택)

Anti-aging Effects of Sweroside Isolated from *Nymphoides indica*

You Ah Kim, Dong Hee Kim*, Chae Bin Park, Tae Soon Park*, and Byoung Jun Park†

Skin Science Research Institute, Kolmar Korea Co., Ltd., 76, Yeongudanji-ro, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28116, Korea

*Traditional Korean Medicine Technology Division, National Development Institute of Korean Medicine, 94, Hwarang-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 38540, Korea

(Received March 14, 2018; Revised May 16, 2018; Accepted May 28; 2018)

요약: 본 연구에서는 신규 기능성 화장품 소재 개발을 위해 어리연꽃으로부터 분리한 sweroside를 이용하여 섬유아세포 내에서의 항노화 효과를 확인하였다. CCD-986sk 세포를 이용하여 sweroside의 항노화 효과를 측정된 결과, UVB에 의해 증가된 ROS의 발현을 억제하였으며, pro-collagen의 발현을 증가시키며 MMP-1의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다. 이 결과를 종합해보면, sweroside는 화장품 분야에서 신규 항노화 기능성 소재로서의 활용 가능성이 있는 것으로 판단된다.

Abstract: To develop a new functional agent for cosmetics, we investigated the anti-aging activities in fibroblasts using sweroside isolated from *Nymphoides indica*. The anti-aging effect of sweroside was validated in CCD-986sk cells. Results showed that sweroside inhibited expressions of UVB-induced ROS and increased pro-collagen. Furthermore, sweroside had inhibited MMP-1 expression. Taken together, the results suggested that sweroside has considerable potential as a new cosmetics ingredient with an anti-aging effect.

Keywords: *Nymphoides indica*, sweroside, anti-aging

1. 서 론

피부 노화는 크게 내인성 노화와 외인성 노화로 구분되는데, 시간적·유전적 요소에 의해 발생하는 전자와 달리 후자는 자외선 노출, 대기 오염, 흡연, 알코올 남용, 영양 부족 등 외부 환경에 의한 것으로 알려지고

있다[1-3]. 이러한 환경 요인 중 UV 방사선에 의한 광노화(photoaging)는 피부 노화, 특히 조기 노화에서 중요한 원인으로 작용하기에 관리가 필요한 부분이라 할 수 있겠다[1,4]. 광노화에 따른 주요 피부 변화는 주름 증가, 피부 두께 및 탄력 감소가 대표적이며, 이러한 피부 변화는 자외선에 의해 활성화된 activating protein-1 (AP-1)에 의해 matrix metalloproteinase (MMPs)의 발현이 유도되어 피부 결합조직을 구성하는 콜라겐 합성이 저해되어 야기된다[5-7]. 따라서 피부 주름 예방

† 주 저자 (e-mail: a2001@kolmar.co.kr)
call: 043)218-1057

을 위해 섬유아세포 내에서 MMP의 작용을 억제시켜 콜라겐 합성을 증가시키는 요소의 발굴이 중요하다 할 수 있다.

어리연꽃(*Nymphoides indica* (L.) Kuntze)은 조름나물과(Menyanthaceae)에 속하는 다년생의 부엽성 수생식물로 정원 식재 및 습지에 분포하는 대표적인 수생식물이다. 잎은 원심형으로 직경이 6 cm 정도이며, 원줄기는 가늘고 길며 1-3개의 잎이 자라 물 위에 수평으로 뜬다. 꽃은 2 cm 폭으로 8월경에 수면 위로 피고, 흰색 바탕에 중심부는 황색이다. 근연식물인 노랑어리연꽃과 꽃색(노란색)에 큰 차이가 있다. 열매는 10월경에 성숙하고, 종자는 타원형으로 길이가 0.8 mm 정도로 황백색을 띈다. *Nymphoides*속은 전 세계적으로 생물학적 특징에 따라 분류되어 약 50여 종이 보고되어 있으며, 일부 종은 다소 넓은 분포를 가지고 있지만 대다수는 단일 대륙 또는 일부 지리적 영역으로 제한되어 분포한다. 우리나라는 어리연꽃, 노랑어리연꽃(*N. peltata* (J. G. Gmelin) Kuntze) 및 좀어리연꽃(*N. coreana* (Lev.) Hara) 3종이 자생한다. 그 가운데 어리연꽃은 전 세계적으로 분포도가 넓은 종으로 다양한 지역에서 전통 약용작물로 이용되었으며, 한방에서는 금은련화(金銀蓮花)라고 불리우며 갈증을 풀어주고 건위 효과가 있는 약재로 사용된다[8-12]. 주요 성분으로는 플라보노이드, 쿠마린, 페놀산, 테르펜 계열의 화합물이 알려져 있으며, 이들 성분에 대한 항박테리아, 항균, 항산화 및 항당뇨 효능이 보고되었다[13]. 또한, 본 연구진은 최근 어리연꽃속 식물인 어리연꽃 및 노랑어리연꽃 추출물로부터 각각 미백 및 주름개선 효과를 확인하여 화장품 소재로써의 가능성을 확인한 바 있다[2,3]. 이처럼 어리연꽃속 식물 추출물에 관한 연구에서 다양한 약리학적 연구가 보고되고 있으나 여전히 국내에 자생하는 어리연꽃속 식물 추출물 및 성분을 활용한 화장품 약리학적 연구는 미미한 실정이다.

이에 본 연구에서는 어리연꽃속 식물로부터 유효성분을 분리하고 피부세포에서의 주름개선 유효성을 평가하여 어리연꽃의 새로운 주름 기능성 소재로써 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

유효성분의 분리와 정제를 위해 preparative-liquid chromatography (prep-LC) (LC-Forte/R, YMC, Japan)를 실시하였다. 분리정제된 화합물들의 구조·동정을 위한 NMR 측정은 Bruker Ascend 400 (Bruker, Germany)을 사용하였다. 용매는 CD₃OD (99.8% D)(Cambridge Isotope Laboratories, USA)를 사용하였으며, 내부 표준물질로 사용한 tetramethylsilane (TMS)를 기준으로 δ (ppm)으로 나타내었다. 항산화, 주름억제 효과 측정에 사용된 시약인 potassium acetate-1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), porcine pancreas elastase (PPE), N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide, collagenase 및 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 세포 독성 실험 및 배양을 위한 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (USA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 Penicillin Streptomycin (100X)는 Hyclone (USA) 제품을 사용하였다. 유효성평가를 위한 MMP-1, Pro-COL1A1, β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA)에서 구입하여 사용하였으며, ROS-Glo™ H₂O₂, Go Script™ Reverse Transcriptase, GoTaq® Flexi DNA Polymerase는 Promega (USA) 제품을 MMP-1, Pro-collagen kit는 각각 Abcam (USA), TaKaRa (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 microplate reader 장비는 Spectrostar Nano (BGM LabTech, Germany)를 사용하였으며, Chemi-Doc은 LAS4000 (Fuji Film, Japan) 제품을 사용하였다.

2.2. 어리연꽃의 추출 및 분리

본 실험에 사용된 어리연꽃은 농업회사법인 (주)로터스그린에서 국내산으로 2015년 11월 구매하여 사용하였으며, 국립생물자원관 확증표본(NIBRVP0000592689)으로 생물 종 판별 시스템에 의해 확인되었다. 어리연꽃의 전초는 음건하여 건중량 150 g을 실온에서 methyl alcohol (MeOH)에 72 h 동안 침지시키고, 이를 3회 반복하여 농축 후 동결 건조하여 추출물(22.7 g)을 얻었

다. 어리연꽃 추출물(17.6 g)은 증류수로 용해하고 유기용매의 극성에 따라 *n*-hexane (Hex), methylene chloride (MC), ethyl acetate (EA) 및 *n*-butyl alcohol (BuOH)을 순차적으로 가하여 각 분획물(0.4 g, 1.0 g, 0.6 g, 2.2 g)을 얻었다. 주성분이 포함된 BuOH 분획물은 2단계에 걸쳐 medium pressure liquid chromatography (1차 이동상 - gradient, Water : ACN = 95 : 5 → 0 : 100, 40 min; 2차 이동상 - Isocratic, EA : MeOH = 9 : 1, 20 min)를 수행하였으며, 순차적으로 반복 실시하여 화합물 1 (20 mg)을 순수하게 분리하였다.

화합물 1 - Amorphous powder, ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) : δ 7.60 (1H, *d*, *J* = 2.4 Hz, H-3), 5.56 (1H, *s*, H-1), 5.55 (1H, *m*, H-8), 5.31 (1H, *d*, *J* = 17.2 Hz, H-10a), 5.25 (1H, *d*, *J* = 10.4 Hz, H-10b), 4.69 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 4.40 (2H, *m*, H-7), 3.89 (1H, *dd*, *J* = 1.6, 12.0 Hz, H-6'b), 3.68 (1H, *m*, H-6'a), 3.39 (1H, *m*, H-5'), 3.32 (1H, *m*, H-3'), 3.31 (1H, *m*, H-4'), 3.20 (1H, *t*, *J* = 8.6 Hz, H-2'), 3.16 (1H, *m*, H-5), 2.70 (1H, *dd*, *J* = 5.6, 8.8 Hz, H-9), 1.73 (2H, *m*, H-6); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz): 167.2 (C-11), 152.6 (C-3), 131.9 (C-8), 119.5 (C-10), 104.6 (C-4), 98.3 (C-1'), 96.6 (C-1), 76.9 (C-3'), 76.4 (C-5'), 73.3 (C-2'), 70.1 (C-4'), 68.4 (C-7), 61.3 (C-6'), 42.4 (C-9), 27.0 (C-5), 24.5 (C-6).

2.3. DPPH 라디칼 소거능 측정

전자공여능(electron donating ability)은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 측정하였다[14]. 각 시료용액 50 μL에 0.2 mM의 DPPH 100 μL 넣고 교반한 후 30 min 간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다. 전자공여능은 시료용액의 첨가량과 무첨가량의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.4. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolorization assay 방법을 변형하여 측정하였다[15]. 7 mM 2,2-azino-bis (3-ethyl-benthiiazoline-6-sulfonic acid)와 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24 h 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성시킨 후 ethanol로 희석하고, ABTS⁺ 100 μL에 시료 50 μL를 각 3회 반복

처리하여 1 min 동안 방치한 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Elastase 저해 활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등(1988)의 방법을 변형하여 측정하였다[16]. 기질로서 *n*-succinyl-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilide를 사용하여 37 °C에서 20 min 기질로부터 생성되는 *p*-nitroanilide의 생성량을 405 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 40 μL씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (0.5 U/mL)용액 40 μL를 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 *n*-succinyl-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilide(mg/mL)를 80 μL 첨가하여 20 min 반응시켜 측정하였다. Elastase 저해활성은 각 3회 반복 실험하여 시료용액의 첨가량과 무첨가량의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.6. Collagenase 저해활성 측정

Collagenase 저해활성 측정은 Lee 등(2012)의 방법을 변형하여 측정하였다[17]. 즉 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzyl-oxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.5 mg/mL)를 녹인 기질액 125 μL 및 시료용액 50 μL의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/mL) 75 μL를 첨가하여 실온에서 20 min 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1500 μL를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 각 3회 반복 실험하여 시료용액의 첨가량과 무첨가량의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.7. 세포배양 및 세포 생존율 측정

세포 독성에 측정에 사용된 섬유아세포 CCD-986sk 세포(human skin fibroblast)는 american type culture collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37 °C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. 본 실험에서 CCD-986sk 세포에 대한 시료의 유효농도를 결정하기 위해 세포생존율 측정은 MTT assay로 진행하였다. 배양된 CCD-986sk 세포를 48 well plate에 각각 5 × 10³ cells/well로 접종하고 24 h 배양하였다. 동일 배

지로 교체한 후 시료를 농도별(1, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$)로 희석하여 각 3회 반복 처리하고 48 h CO_2 incubator에서 배양하였다. 5 mg/mL MTT 용액을 배양된 세포에 20 μL 씩 처리하여 4 h 반응시킨 후 demethyl sulf-oxide 100 μL 넣어 10 min 교반하고 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. ROS (Reactive Oxygen Species) 생성량 측정

CCD-986sk 세포를 배양한 후 96 well white plate에 5×10^3 cells/well로 접종하고 24 h 배양하였다. 24 h 후 PBS로 교체하고 UVB (20 mJ/cm^2)을 조사한 뒤, 시료를 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 희석하여 각 3회 반복 처리한 후 24 h 배양하였다. 그 후 제조사의 매뉴얼에 따라 ROS Glo H_2O_2 assay를 수행하였다.

2.9. MMP-1 발현 및 Pro-collagen 합성 측정

CCD-986sk 세포를 배양한 후 6 well plate에 1×10^5 cells/well로 접종하고 24 h 배양하였다. 24 h 후 배지를 제거하고 PBS 1 mL를 첨가하여 UVB (20 mJ/cm^2)를 조사한 뒤, PBS를 제거하고 10% FBS와 1% penicillin streptomycin이 들어 있지 않은 DMEM 배지로 교체한 후 시료를 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 희석하여 각 3회 반복 처리하여 48 h 배양하였다. 상등액을 취하여 pro-collagen과 MMP-1을 각 kit사의 protocol에 따라 실험을 진행한 뒤, microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.10. MMP-1 및 Pro-collagen 단백질 발현 측정

CCD-986sk 세포를 1×10^5 cells/well로 6 well plate에 분주하여 24 h 배양한 후에 UVB (20 mJ/cm^2)를 조사한 뒤 시료를 농도별로 각 3회 반복 처리하여 48 h 배양하였다. 세포를 RIPA buffer (Pierce, USA)로 용해하고 원심분리한 후 얻은 상층액을 BCA protein assay (Pierce, USA)로 protein을 20 μg 의 농도로 정량하였다. 준비된 protein sample은 10% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 PVDF membrane으로 transfer 시킨 뒤, 5% skim milk가 함유된 tris 완충용액으로 1 h blocking 한 후, pro-collagen, MMP-1, β -actin 각각의 1차 및 2차 항체와 반응시켰다. 반응 후 immobilized western chemiluminescent HRP substrate (Millipore, USA)를 이용하여 5 min 반응시킨 후 chemi-Doc을 이용하여 현상하였다.

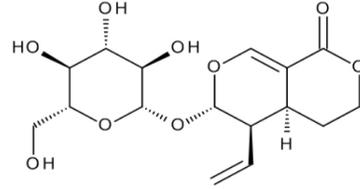


Figure 1. Chemical structure of sweroside isolated from *N. indica*.

2.11. 통계처리

본 실험의 통계처리는 SPSS 12.0을 사용하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 측정하였고 각 실험군의 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 각 실험군 간의 결과는 t 검정을 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준(* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$)에서 유의성이 있는 것으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분리한 화합물의 구조결정

화합물 1은 무정형의 파우더 형태로 분리되었으며, ELSD를 이용한 HPLC 분석 결과, 순도는 95% 이상으로 확인되었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 5.56 (1H, *s*, H-1), δ 7.60 (1H, *d*, $J = 2.4$ Hz, H-3), 3.16 (1H, *m*, H-5), 1.73 (2H, *m*, H-6), 4.40 (2H, *m*, H-7), 5.55 (1H, *m*, H-8), 2.70 (1H, *dd*, $J = 5.6, 8.8$ Hz, H-9), 5.31 (1H, *d*, $J = 17.2$ Hz, H-10a), 5.25 (1H, *d*, $J = 10.4$ Hz, H-10b)에서 전형적인 secoiridoid lactone의 존재를 확인할 수 있었으며, 4.69 (1H, *d*, $J = 8.0$ Hz, H-1')의 피크에서 한 개의 sugar moiety가 있음을 알 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼은 16개의 피크가 확인되었다. 그 가운데 6개는 β -glucopyranosyl moiety (δ 98.3, 76.9 ~ 61.3)에 의한 것이며, 5개는 iridoid dihydropyran ring (δ 152.6, 104.6, 96.6, 42.4, 27.0)에서 기인된 것으로 확인되었다. 또한, δ 131.9와 δ 119.5의 피크에서 exocyclic double bond와 나머지 3개의 피크에서 conjugated lactone moiety (δ 167.2, 68.4, 24.5)의 존재를 확인할 수 있었다. 위의 결과를 바탕으로 화합물 1은 iridoid glucoside 계열의 화합물인 sweroside로 추정되었으며, 보고된 문헌의 분광학적 data와 비교하여 최종 확인, 동정하였다(Figure 1)[18].

Table 1. Biological Activity of Sweroside on Each Inhibitor Rate Experiments

Samples (100 $\mu\text{g/mL}$)	Electron donating ability	ABTS cation radical	Elastase	Collagenase
	Inhibition rate (%)			
Sweroside	83.7 \pm 2.3	95.8 \pm 3.2	35.4 \pm 5.7	75.1 \pm 1.3
Vit.C	91.9 \pm 7.4	98.1 \pm 6.9	-	-
EGCG	-	-	53.5 \pm 1.4	94.2 \pm 3.8

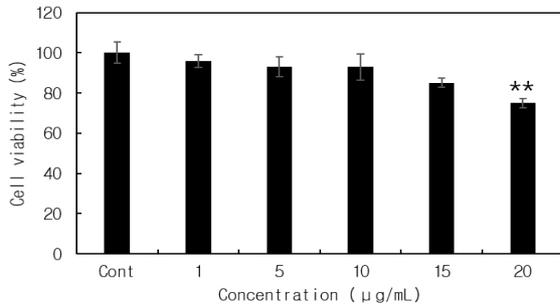


Figure 2. Viability effect of sweroside in CCD-986sk. The data represent the mean \pm S.D. derived from three independent experiments. (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with none-treated Control (Cont)).

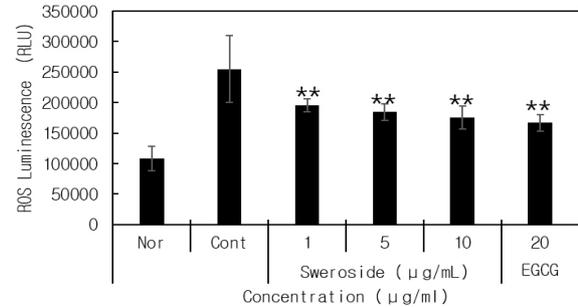


Figure 3. Sweroside suppresses UVB-induced reactive oxygen species (ROS) generation in CCD-986sk. The data represent the mean \pm S.D. derived from three independent experiments. (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with none-treated control (Cont)).

3.2. 항산화 및 주름개선 효과 평가

Sweroside의 항산화능을 측정하기 위하여 전자공여능과 ABTS의 radical 소거능을 실시한 결과, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 83.7%, 95.8%의 라디칼 소거능을 나타내었으며, 주름관련 효소들인 elastase, collagenase 저해 활성을 측정한 결과 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 35.4%, 75.1%의 높은 저해능을 나타냄을 확인하였다(Table 1).

3.3. CCD-986sk 내에서의 세포생존을 평가

Sweroside를 세포 생존율과 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 MTT assay를 수행하였다. CCD-986sk 세포에 sweroside를 1, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 결과, 10 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 세포생존율이 90% 이상으로 나타내어 CCD-986sk 세포의 생존율에 큰 영향을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다(Figure 2).

3.4. 세포 내 활성산소종(ROS) 억제 효과

UVB에 노출된 피부는 활성산소종(ROS) 생성을 야기시키며[19-21], 활성화된 ROS는 피부세포 내에서의 여러 신호전달체계를 통해 피부 주름과 관련된 인자들을 활성화 시키며 광노화를 일으킨다[14]. 이러한 광노

화 방어와 자외선 보호제를 개발하는데 있어서 ROS의 역할이 중요함을 시사하여 준다. 또한, 녹차의 주성분인 EGCG는 인체에 대한 다양한 유용성 및 기전 연구가 보고되었으며, 특히 강력한 항산화 기능이 입증되어 양성대조군으로 이용된 사례가 있다. 이에 EGCG 양성대조군과 비교하여 sweroside의 항노화 소재로서의 활성을 비교하고자 하였다[24]. Sweroside의 ROS 억제효과를 알아보기 위하여 CCD-986sk 세포에서의 UVB 조사에 따른 ROS 생성을 측정한 결과, UVB로 유도된 그룹에서는 정상군에 비해 ROS 생성물이 2.5 배 이상 증가하였으며, sweroside를 농도별로 처리한 결과 농도 의존적으로 ROS 생성이 23, 28, 31% 수준으로 감소시키는 것을 확인하였다(Figure 3). 양성대조군으로 사용된 EGCG가 20 $\mu\text{g/mL}$ 일 때 35% 감소 효과로 sweroside 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 EGCG와 유사한 ROS 생성 억제효과가 있음을 확인할 수 있었다.

3.5. 세포 내 Pro-collagen 합성 및 MMP-1 발현 측정 결과

피부 광노화의 증상인 주름, 피부탄력감소의 원인으로는 진피 내 세포 외 기질 단백질의 감소이며, 자외선

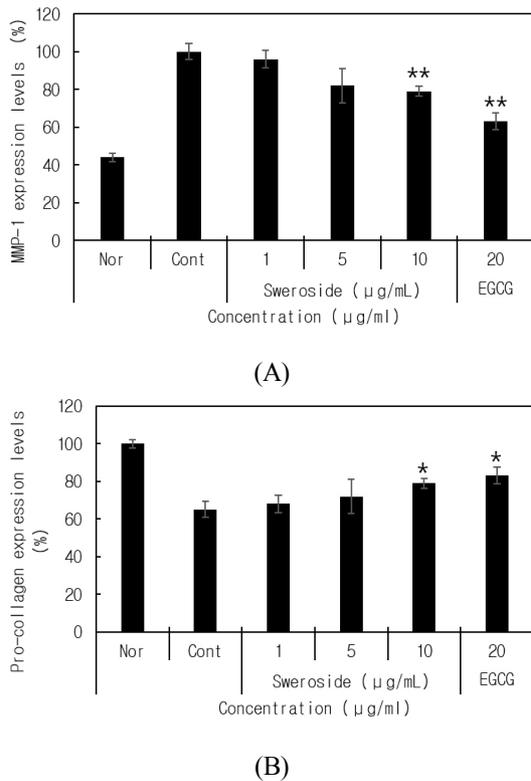


Figure 4. Sweroside effect on UVB-induced (A) reduction of MMP-1 expression and (B) increment of pro-collagen type 1 synthesis in CCD-986sk. The data represent the mean ± S.D. derived from three independent experiments. (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with none-treated Control (Cont).

의 자극을 받은 섬유아세포 내에서는 collagenase, elastase 등의 MMPs에 의하여 분해되어 콜라겐 섬유의 손상을 초래하게 되며, 콜라겐 합성의 전구 물질인 프로콜라겐 또한 자외선으로 인해 양이 감소된다[22,23]. 따라서 MMP-1과 pro-collagen 양을 측정함으로써 세포 내에서의 콜라겐 합성 정도를 파악할 수 있다. pro-collagen 합성 및 MMP-1 발현을 억제 시킬 수 있는 소재는 탄력 있는 피부를 만들어 주는 화장품 원료로서 사용 가능성이 높다고 생각되며 이에 sweroside를 이용하여 MMP-1 발현 및 pro-collagen 합성 실험을 각각 및 Western blot 및 ELISA 기법으로 수행하였다. 그 결과, 양성대조군인 EGCG는 20 µg/mL 농도에서 37%의 MMP-1 발현 저해능을 보였으며, sweroside는 1, 5, 10 µg/mL의 농도에서 4%, 18%, 21%의 MMP-1 발현 저해능이 있음이 확인되었다. Pro-collagen 합성능을 측정한 결과 역시 농도 의존적으로 합성능을 나타내었으며,

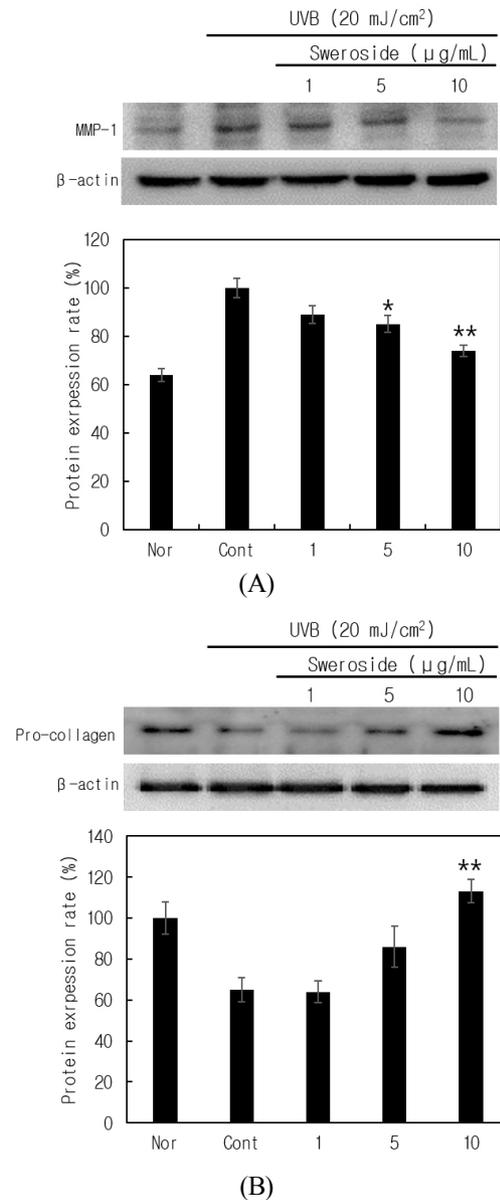


Figure 5. Sweroside effect on UVB-induced (A) inhibition of MMP-1 and (B) production of type-1 procollagen protein in CCD-986sk. UVB (20 mJ/cm²)-exposed cells were cultured for 48 h in the presence of sweroside. The data represent the mean ± S.D. derived from three independent experiments. (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with none-treated Control (Cont).

가장 높은 농도 구간인 10 µg/mL에서 14%의 합성능을 나타내었다(Figure 4). 이는 양성대조군 EGCG 20 µg/mL 농도에서 18%의 합성능과 유사한 결과로, sweroside가 pro-collagen의 합성에 의한 주름 생성 억제에 효능이

있음을 나타낸다. 또한 CCD-986sk 세포 내에서의 sweroside의 MMP-1 protein 발현 억제와 pro-collagen protein 합성능을 측정한 결과 농도 의존적으로 발현 억제 및 합성능이 증가하였다. 특히 pro-collagen 합성의 경우 대조군에 비해 sweroside 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 21%, 48% 증가하는 아주 높은 활성을 나타내었다(Figure 5). Sweroside의 이러한 결과는 섬유아세포 내에서의 UV-B로 인한 pro-collagen 감소를 증가 시켜 주며, 증가된 MMP-1 발현양을 저해 시켜 줌으로써 주름 생성을 예방할 수 있는 소재임을 확인하였다. 따라서 sweroside은 CCD-986sk 세포 내에서 ROS와 같은 노화 인자의 생성 억제와 동시에 피부의 주요 구성성분인 콜라겐의 합성 및 분해 억제 효능을 통해 항노화 소재로서의 활용가치가 있는 것으로 판단된다.

4. 결론

본 연구에서는 sweroside를 화장품의 항노화 소재로 이용하고자 항산화 및 주름개선 효과를 측정하고, 그 작용기전에 대해 확인하였다. 특히 sweroside는 주름 관련 효소인 elastase와 collagenase를 저해 시켰으며, CCD-986sk 세포를 이용하여 주름개선 효과를 측정한 결과, MMP-1의 발현 억제와 pro-collagen의 활성화 효능이 있음을 확인하였다. 이상의 결과를 보아 sweroside는 화장품에서 주름개선 항노화 소재로의 활용가치가 있는 것으로 판단되며, 앞으로 임상 수준에서 안정성 및 효능 연구를 진행 할 예정이다.

Acknowledgement

연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호HN15C0103).

Reference

1. N. Puizina-Ivić, Skin aging, *Acta. Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.*, **17**(2), 47 (2008).
2. Y. A. Kim, D. H. Kim, J. M. Yu, C. B. Park, T. S. Park, and B. J. Park, Anti-wrinkle effects of extracts and solvent fractions from *Nymphoides peltata* on CCD-986sk, *J. Appl. Biol. Chem.*, **60**(4), 357 (2017).
3. D. H. Kim, Y. A. Kim, J. M. Yu, C. B. Park, B. J. Park, and T. S. Park, Inhibitory effect of *Nymphoides indica* extract on α -MSH induced melanin synthesis, *J. Appl. Biol. Chem.*, **60**(4), 327 (2017).
4. G. Jenkins, Molecular mechanisms of skin ageing, *Mech. Ageing Dev.*, **123**(7), 801 (2002).
5. S. J. Cheon, M. J. Jang, Y. A. Jang, E. Y. Choi, D. H. Jun, Y. H. Kim, W. A. Cho, Y. S. Jeong, H. B. Kwon, T. H. Kim, K. L. Choi, J. R. Do, C. E. Lee, and J. T. Lee, Anti-wrinkle effect of Cambodian *Phellinus linteus* extracts, *J. Life Sci.*, **18**(12), 1718 (2008).
6. J. H. Oh, A. Kim, J. M. Park, S. H. Kim, and A. S. Chung, Ultraviolet B-induced matrix metalloproteinase-1 and -3 secretion are mediated via PTEN/Akt pathway in human dermal fibroblasts, *J. Cell Physiol.*, **209**(3), 775 (2006).
7. N. A. Soter, Acute effects of ultraviolet radiation on the skin, *Semin. Dermatol.*, **9**(1), 11 (1990).
8. M. J. Oh, S. R. Min, J. R. Liu, and S. W. Kim, Plant regeneration from floral stem cultures of *Nymphoides indica* (L.) O. Kuntze. Via somatic embryogenesis, *J. plant Biotechnol.*, **34**(1), 7 (2007).
9. Y. O. Jeong, N. B. Park, J. S. Gwak, and S. J. Jeong, Yasaenghwadogam, Pureunhaengbok, Seoul, Korea (2010).
10. N. P. Tippery, D. H. Les, J. C. Regalado, L. V. Acveryanov, V. N. Long, and R. H. Raven, Transfer of *Villarsia cambodiana* to *Nymphoides* (Menyanthaceae), *Systemat. Bot.*, **34**(4), 818 (2009).
11. B. Y. Lee, G. H. Nam, J. Y. Lee, C. H. Park, C. E. Lim, M. H. Kim, S. J. Lee, T. K. Roh, J. A. Lim, J. E. Han, and J. H. Kim, National list of species of Korea (vascular plants). 292, National Institute of Biological Resources. Incheon (2011).
12. M. H. Chowdhury, Bioactivity guided separation and purification of secondary metabolites of *Nymphoides indica*, Bachelor thesis, East West Univ., Dhaka, Bangladesh (2008).

13. A. Amin, A. Upadhyay, M. Zafar, P. Cos, L. Maes, S. Apers, V. Exarchou, and L. Pieters, Antibacterial, antifungal, cytotoxic, antioxidant and antidiabetic compounds from *Nymphoides indica* the first comprehensive phytochemical and pharmacological study, *Planta. Med.*, DOI: 10.1055/s-0034-1394772 (2014).
14. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
15. R. Roberta, P. Nicoletta, P. Anna, P. Ananth, Y. Min, and R. E. Catherine, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free radical biol. Med.*, **26**(9-10), 1231 (1999).
16. R. J. P. Cannell, S. J. Kellan, A. M. Owsianks, and J. M. Walker, Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors, *Planta Med.*, **54**(1), 10 (1988).
17. J. Y. Lee and B. J. An, Whitening and anti-wrinkling effects of fractions from *Prunus persica* Flos, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **40**(4), 364 (2012).
18. D. Prasad, V. Juyal, R. Singh, V. Singh, G. Pant, and M. S. M. Rawat, A new secoiridoid glycoside from *Lonicera angustifolia*, *Fitoterapia*, **71**(4), 420 (2000).
19. G. J. Fisher, Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees, Pathophysiology of pre-mature skin aging induced by ultraviolet light, *New Engl. J. Med.*, **337**(20), 1419 (1997).
20. I. Yoon, J. H. Wee, J. H. Moon, T. H. Ahn, and K. H. Park, Isolation and identification of quercetin with antioxidative activity from the fruits of *Rubus coreanus* Miquel, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 499 (2003).
21. S. B. Han, S. S. Kwon, B. J. Kong, K. J. Kim, and S. N. Park, Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of the unripened fruit extract of *Rubus coreanus* Miquel, *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.*, **39**(4), 295 (2013).
22. J. H. Chung, Generation mechanism and cause of wrinkle, *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.*, **29**(2), 1 (2003).
23. S. J. Kim, Y. M. Nam, Y. M. Kim, and S. K. Ko, Inhibition of MMP-1 expression and collagen synthesis activity of ultrasonication processed ginseng flower buds extract, *Kor. J. Pharmacogn.*, **46**(2), 154 (2015).
24. S. H. Jeon, and D. H. Yi, Effects of alliin on cellular protection, up-regulation of collagen and down-regulation of MMP1 in human dermal fibroblasts, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **12**(2), 249 (2014)