

백림 추출물의 Matrix Metalloproteinase-1 발현 저해 효과

조영호[#] · 심관섭 · 김진희 · 박성민 · 이범천 · 표형배 · 윤여표* · 박흠대**
한불화장품 기술연구소, *충북대학교 약학대학, **대구대학교 공과대학 생물공학과
(Received November 3, 2004; Revised November 26, 2004)

Effect of *Melothria heterophylla* Extract on Expression of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Skin Fibroblasts

Young Ho Cho[#], Gwan Sub Sim, Jin Hui Kim, Sung Min Park, Bum Chun Lee, Hyeong Bae Pyo, Yeo Pyo Yun* and Hum Dai Park**

R&D Center, Hanbul Cosmetics Corporation, 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-830, Korea

*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Department of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

Abstract — Matrix metalloproteinases (MMPs) are known to play an important role in photoaging by mediating the degradation of extracellular matrix proteins. In this study, to develop a new anti-aging agent, we investigated the antioxidant activity and the inhibitory effect of *Melothria heterophylla* extract on expression of MMP-1 in UVA-irradiated human dermal fibroblasts and MMP-1 activity. The *M. heterophylla* extract was found to scavenge radicals and reactive oxygen species (ROS) with the SC₅₀ values of 13 µg/ml against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and 20 µg/ml against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. UVA-induced MMP-1 expression was reduced about 80% by 100 µg/ml of the *M. heterophylla* extract but MMP-1 mRNA expression was not inhibited. Therefore, we conclude that the *M. heterophylla* extract significantly inhibits MMP-1 expression at the protein level. Also, the *M. heterophylla* extract inhibited MMP-1 activity in a dose dependent manner. From these results, we suggest that the *M. heterophylla* extract can be used as a new anti-aging agent by antioxidant activity, regulation of UVA-induced MMP-1 production, and inhibition of MMP-1 activity.

Keywords □ *Melothria heterophylla*, antioxidant, MMP

피부 노화는 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화 현상인 내인성 노화(intrinsic aging)와 외적 노화(extrinsic aging)로 구분되며, 내인성 노화는 유전적 요소에 영향을 받기 때문에 인위적인 조절이 어려운 반면, 외적 노화는 환경적인 요소에 영향을 받기 때문에 인위적인 조절이 비교적 용이하다.¹⁾ 피부 노화에 영향을 미치는 환경 요소들은 기후, 흡연, 공해, 자외선 등을 들 수 있으며, 특히 자외선에 의한 노화를 광노화(photoaging)라고 한다. 자외선은 유해한 활성 산소종(reactive oxygen species)을 많이 만들어내고, ROS는 피부 세포에서 고분자 물질들인 불포화 지방산, 단백질, DNA 등과 반응하여 피부 콜라겐 등의 결합조

직형성 파괴, 세포막 기능 저해, DNA 변이 촉진, 단백질 작용 변형, 세포간 에너지 전이, 신진대사와 관련된 분자들의 변형 등을 유발하는 것으로 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 일반적으로 진피층은 대다수의 type I collagen과 약간의 type III collagen, elastin, proteoglycan, fibronectin 등으로 구성되어 있다.⁵⁾ 만성적 일광 손상을 입은 피부에서는 진피 상부쪽 교원질의 비정상적인 elastotic material의 침착⁶⁾과 proteoglycan이 증가되고 진피의 주 단백질인 콜라겐이 현저히 감소되는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 또한, 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 부여하여 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층의 약 90%를 차지하고 있다. 따라서 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다.⁸⁾

Matrix metalloproteinases(MMPs)는 활성 중심부에 아연을 갖는 금속 단백질 분해효소로서 약 20여종 이상의 종류가 있는 것

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-879-2283 (팩스) 043-881-2128
(E-mail) micael4282@hanmail.net

으로 알려져 있다. 구조와 기능에 따라 interstitial collagenase, gelatinase, stromelysin, membrane type MMP 등으로 구분하기도 한다.⁹⁾ 특히 MMPs는 피부의 keratinocytes, fibroblasts를 비롯한 많은 세포들로부터 분비되어 세포외 기질(extracellular matrix; ECM)과 기저막(basement membrane; BM)을 구성하는 대부분의 단백질 성분을 분해함으로써 피부 탄력을 유지하는 결합조직을 파괴하여 주름과 탄력저하 및 피부 처짐의 원인이 되는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 또한, MMPs는 세포에서 저장되지 않고 불활성화된 proenzyme 및 zymogen 형태로 분비되어 아미노 말단 부위가 절단되는 등 구조적 변형이 일어나 활성화되며, 활성화된 MMP는 $\alpha 2$ -macroglobulin이나 TIMPs(tissue inhibitors of metalloproteinases) 같은 저해제에 의해 활성이 조절된다.¹¹⁾ Brenneisen 등은 UV 조사와 ROS에 의해 피부내의 MMPs 활성이 증가되어 진피층내의 콜라겐 등과 같은 세포외 기질들의 붕괴에 영향을 미치며, MMPs가 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다.¹²⁾

생약재인 백련(*Melothria heterophylla*(Lour.) Cogn.)은 박과에 속하는 다년생 덩굴성 초본으로 인후종통, 결막염, 임파선결핵, 고환염, 피부습진 등에 효과가 있는 생약으로 알려져 있다. 그러나, 백련 추출물의 피부 노화에 대한 생리기전이나 연구결과에 대해서는 알려진 바가 거의 없는 실정이다.¹³⁾

본 연구에서는 백련 추출물의 항산화 효과와 MMP-1의 활성 저해 효과 및 UVA에 의한 human dermal fibroblasts에서 MMP-1 생성 억제 효과 등을 관찰하였고, 기능성 화장품의 천연 항노화 소재로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

실험 방법

시료의 제조

본 실험에서 사용한 백련은 서울 경동시장 내의 한약 건재상에서 구입하여 사용하였다. 백련을 분쇄하여 70% 에탄올을 넣은 후 3시간씩 3회 환류 추출하고 여과지를 이용하여 여과 하였다. 이 여과액을 감압 농축하고 동결 건조하여 그 분말을 사용하였다.

세포 및 시약

신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblast (HDF)는 Modern Tissue Technology 사(MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 DMEM/F12(3:1) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10세대 세포를 실험에 이용하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 위해 사용된 MMP-1에 대한 1차 항체와 alkaline phosphatase가 결합된 2차 항체는 Sigma

Chemical 사로부터 구입하여 사용하였다. *In vitro* MMP-1 활성 저해효과 측정을 위해 사용된 형광물질이 표지된 DQ gelatin, DQ collagen, collagenase, 1,10-phenanthroline은 Molecular probe사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약들은 Sigma Chemical사에서 구입하여 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거 효과 측정

Free radical의 소거 작용은 Blois¹⁴⁾가 사용한 방법을 약간 변형하여 각 시료의 DPPH radical(Aldrich, USA)에 대한 소거 효과를 측정하였다. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동일량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10분 동안 반응시킨다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 비교하여 DPPH radical의 소거활성을 백분율로 나타내었다.

Superoxide radical 소거 효과 측정

Superoxide radical의 소거작용은 Furuno 등¹⁵⁾의 방법에 따라 각 시료의 xanthine-xanthine oxidase system에 의해 생성된 superoxide radical을 소거하는 효과를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃ buffer에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM nitroblue tetrazolium(NBT), 0.15% bovine serum albumin (BSA) sol'n과 시료를 각각 첨가하여 혼합한 다음, 25°C에서 10분간 반응하였다. 그 후 각 tube에 xanthine oxidase(0.25 U/ml) 용액을 첨가하여 25°C에서 30분간 반응한 후, 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 비교하여 superoxide radical 소거활성을 백분율로 나타내었다.

세포 생존률 측정

세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약을 이용하여 세포 생존률을 측정하는 Mosmann¹⁶⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. HDF를 2×10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 투여하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액(5 µg/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고, 100 µl acid-isopropanol(0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가한 후 푸른 색의 formazan이 용출 되도록 하여 micro plate reader(Model ELx 800, BIO-TEK Instruments, USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

UVA 조사 및 시료의 처리

HDF를 1.5×10⁵ cells/ml의 농도로 35 mm dish에 약 80%의 confluency에 도달할 때 까지 배양하였다. UV 조사 전에 원배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum 성분을 제거한다

음, UV 조사장치(F15T8.BLB, Sankyo Denki, Japan)로 UVA (6.3 J/cm²)를 조사하였다. UVA 조사 후 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12(3:1) 배지에 시료를 투여하여 24시간 배양하였다.

MMP-1 발현 저해 효과 측정(ELISA법)

UVA 조사에 의해 유도되는 MMP-1 발현량 측정은 Dunsmore¹⁷⁾ 등이 사용한 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 HDF에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24시간 배양한 배지를 96-well plate에 분주하여 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline +0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 3% BSA /PBS-T로 37°C에서 1시간 동안 blocking한 후, 1차 항체(monoclonal anti-MMP-1)을 blocking buffer로 1:3000으로 희석하여 처리하고 37°C에서 90분간 반응시켰다. PBS-T로 세척한 다음 2차 항체(alkaline phosphatase conjugated Goat anti-mouse IgG)를 blocking buffer에 1:3000으로 희석하여 처리하고 37°C에서 90분간 반응시킨 후 PBS-T로 세척한 다음 alkaline phosphatase 기질용액(1 mg/ml *p*-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer)을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 3 N NaOH로 반응을 완전히 중지시킨 후 micro plate reader을 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA 추출은 RNeasy mini kit(Qiagen, Germany)을 이용하였다. cDNA 합성은 1 µg의 total RNA를 oligo(dT)₁₅ primer, dNTP(0.5 µM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase(Qiagen, Germany)로 37°C에서 60분, 93°C에서 5분 heating시킴으로써 반응을 중지시켰다. Polymerase Chain Reaction(PCR)은 cDNA로부터 MMP-1, β-actin을 증폭하기 위하여 1 µl cDNA, 0.5 µM의 5'과 3' primer, 10 × buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200 µM dNTP, 25 mM MgCl₂, 2.5 unit Taq polymerase(Qiagen, Germany)를 섞고 distilled water로 전체를 25 µl로 맞추고 다음 PCR을 실시하였다. PCR 증폭은 94°C 0.5분, 50°C 0.5분, 72°C 1분, 25 cycles로 반응시켰다. PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다. 본 실험

Table I – Sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis

| Gene | Primer sequences | Fragment size (bp) |
|---------|------------------------------|--------------------|
| MMP-1 | F 5'-AAAGGGAATAAGTACTGGGC-3' | 237 |
| | R 5'-AATTCCAGGAAAGTCATGTG-3' | |
| β-Actin | F 5'-ATGCAGAAGGAGATCACTGC-3' | 248 |
| | R 5'-CTGCGCAAGTTAGGTTTTGT-3' | |

의 RT-PCR에 사용된 primer는 Table I에 제시하였다.

MMP-1 활성 저해 효과 측정

시료의 MMP-1 활성 저해 효과 측정은 Wang¹⁰⁾ 등이 사용한 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 즉, 반응완충액 100 µl에 0.25 mg/ml로 반응완충액에 용해한 DQ collagen 20 µl와 시료 40 µl를 첨가하고 0.5 unit로 희석된 collagenase 40 µl를 첨가하였다. 암소, 실온에서 20분 경과 후 형광 분광 광도계(LS55, PERKIN ELMER, USA)를 이용하여 흡수과장 495 nm, 방출과장 515 nm로 형광값을 측정하였고, 대조그룹으로서 효소액 대신 반응완충액을 효소와 동량 첨가하여 형광값을 측정하였다. 시료 자체의 형광값도 측정하여, 효소활성 계산시 보정하였다.

자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성 검증은 Student's t-test로 실시하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

DPPH radical 소거 효과

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고, 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다. 유해 산소라 불리는 활성산소는 세포 생체막의 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발¹⁸⁾하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 종류의 식물성분 및 추

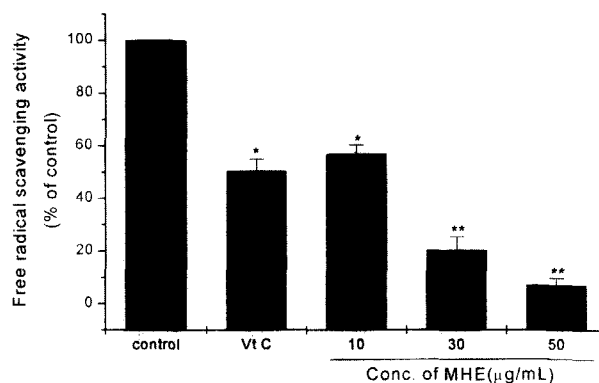


Fig. 1 – Scavenging effects of *Melothria heterophylla* extract (MHE) on DPPH radicals. A solution of 150 µl of 100 µM DPPH solution in methanol was gently mixed with 150 µl of MHE for 10 min and the absorbance was measured at 565 nm. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. **p*<0.05, ***p*<0.01 compared with control.

출물에 의한 항산화 작용이 보고되어 있다.^{19,20)} 백령 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조그룹으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 vitamin C를 이용하여 백령 추출물의 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 vitamin C는 11 µg/ml에서 50%의 DPPH radical을 소거하였으며, 백령 추출물은 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈다(Fig. 1). 즉, 백령 추출물을 10, 30, 50 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각각의 DPPH radical 소거능은 43.2%, 79.7%, 93.1%로 나타났으며, SC₅₀은 13 µg/ml로 우수한 free radical 소거효과를 나타내었다. 상기의 결과로 볼 때 백령 추출물의 free radical 소거효과는 단일 성분인 비타민 C에 뒤지지 않는 매우 우수한 효과를 가지는 것으로 밝혀졌다.

Superoxide radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase에 의해 생성되는 superoxide anion radical의 저해작용은 superoxide radical 소거작용과 xanthine oxidase의 효소 활성 저해에 의해 나타난다.²¹⁾ 백령 추출물의 xanthine oxidase에 의해 생성되는 superoxide radical의 소거 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 양성 대조그룹으로 3-t-butyl-4-hydroxyanisole(BHA)를 이용하여 백령 추출물의 superoxide radical 소거효과를 비교하였다. 그 결과 백령 추출물은 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타내 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리한 경우, 각각의 superoxide radical 소거능은 28.1%, 76.4%, 96.6%로 나타났으며, SC₅₀은 20 µg/ml로 우수한 superoxide radical 소거효과를 나타내었다. 양성 대조그룹인 BHA는 32 µg/ml에서 50%의 superoxide radical을 소거하였다. 상기의 결과로 볼 때 백령 추출물은 양성 대조그룹인 BHA보다 약 1.6배 정도 높은 superoxide radical 소거능을 가지는 것

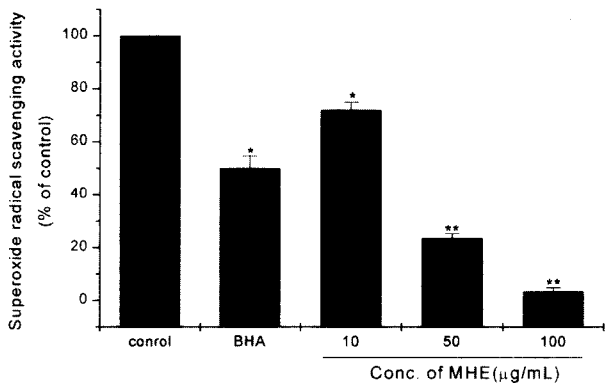


Fig. 2 – Scavenging effects of *Melothria heterophylla* extract (MHE) on superoxide radicals. Superoxide radicals were generated by a xanthine/xanthine oxidase system and measured by NBT reduction method as described in the Materials and Methods. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. **p*<0.05, ***p*<0.01 compared with control.

으로 밝혀졌다.

UVA에 의한 MMP-1 발현 저해 효과

피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성화도가 증가하고 전사인자인 AP-1의 활성화도가 증가되는 신호 전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다.²²⁾ 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 백령 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 HDF에 UVA(6.3 J/cm²)를 조사하고 백령 추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 MMP-1 발현저해 효과를 ELISA로 측정하였다. 그 결과 백령 추출물은 농도 의존적으로 MMP-1 발현 저해 효과를 나타내었다(Fig. 3). 또한, 실험에 사용된 백령 추출물 각각의 처리농도에서 세포 생존률에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 3). 백령 추출물을 1, 10, 100 µg/ml의 농도로 처리한 경우 MMP-1의 발현 저해 효과는 40.6%, 60.4%, 80.2%로 나타났으며, UV에 의한 c-Jun 단백질의 발현증가를 억제하여 MMP-1 발현저해 효과가 보고된²³⁾ retinoic acid의 경우는 1.1 µg/ml에서 44.5% 발현저해 효과를 나타내었다. 또한, HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1 mRNA에 백령 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과 양성 대조그룹으로 사용된 retinoic acid에 비해 뚜렷한 저해효과를 나타내지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 결론적으로 백령 추출물은 HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1을 단백질^{24,25)} 수준에서만 발현을 저해하는 효과가 있음이 확인 되었으며, 이는 기존 보고된 retinoic

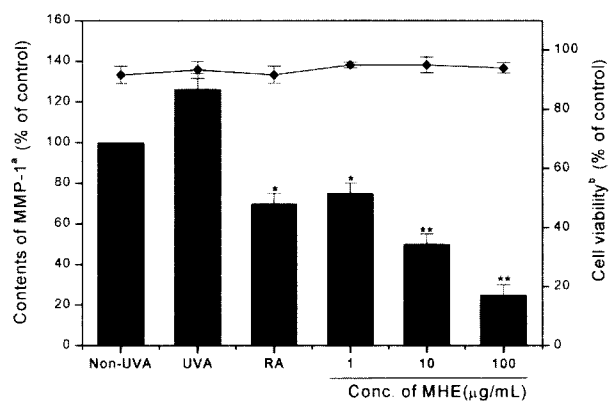


Fig. 3 – Effect of *Melothria heterophylla* extract (MHE) on the production of MMP-1 in UV irradiated human dermal fibroblasts. The cells were treated with various concentration of MHE for 24 h. ^aMMP-1, matrix metalloproteinase-1 (■). The MMP-1 contents in culture media were determined by ELISA as detailed under the Materials and Methods. ^bCytotoxicity was measured by MTT assay (◆). The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. **p*<0.05, ***p*<0.01 compared with UVA-irradiated control.

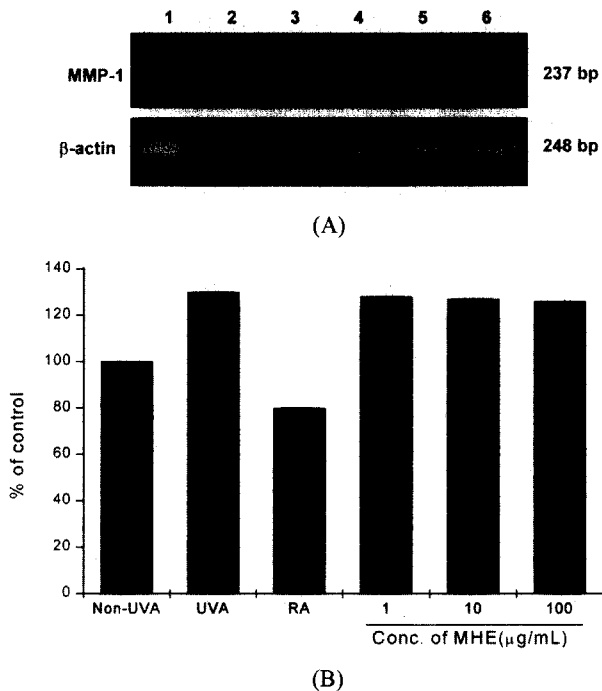


Fig. 4 – Effect of *Melothria heterophylla* extract (MHE) on MMP-1 mRNA expression in UV irradiated human dermal fibroblasts. (A) After irradiated UVA, HDF were treated with various concentration of MHE for 12 h. Total RNA extracted from human dermal fibroblasts was analyzed by RT-PCR. Lane 1; UVA non-irradiated, lane 2; UVA (6.3 J/cm^2) irradiated, lane 3; UVA+10 μ g/ml of retinoic acid, lane 4; UVA+1 μ g/ml of MHE, lane 5; UVA+10 μ g/ml of MHE, lane 6; UVA+100 μ g/ml of MHE. (B) Each band was quantitated by a densitometer using β -actin bands as references.

acid보다 우수한 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 또한, HDF에서 UVA로부터 ROS가 생성되며, ROS로 인한 MMP발현^{26,27}이 촉진되는 것을 백련 추출물이 ROS 소거작용을 통하여 MMP 발현을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

MMP-1 활성 저해 효과

피부세포의 결합조직을 구성하는 성분들 가운데 콜라겐은 피부 건조증량의 약 90%에 달하는 주요 구성 단백질이다. 따라서 콜라겐의 분해는 곧 결합조직의 탄력 저하와 피부의 주름 및 처짐에 직접적인 영향을 미친다. 체내에서 생성되는 수십 종의 MMPs 가운데 MMP-1은 콜라겐에 특이적으로 작용하는 proteinase로서 MMP-1의 활성을 억제하여 콜라겐을 보호하면 피부조직의 탄력을 유지하고 주름의 생성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다.⁹ 따라서 백련 추출물의 MMP-1 활성 저해 효과를 알아보기 위해 형광물질이 표지된 DQ gelatin, DQ-collagen을 이용하여 MMP-1 활성 저해 작용을 측정하였다. 양성 대조그룹으로 MMP-1 활성 저해 작용이 있는 것으로 알려진 1,10-

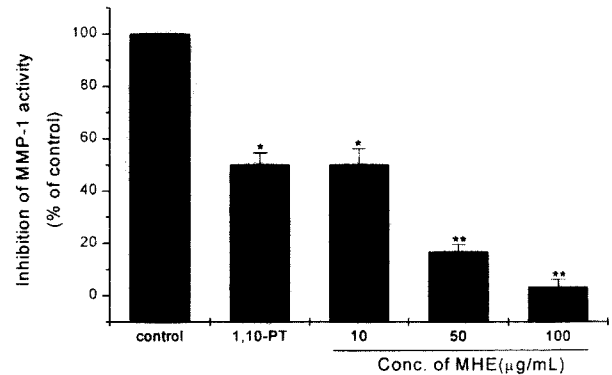


Fig. 5 – Inhibitory effect of *Melothria heterophylla* extract (MHE) on MMP-1 activity. A solution of 20 μ l of DQ collagen (0.25 mg/ml) and 40 μ l of MHE were gently mixed with 40 μ l of 0.5 U collagenase for 20 min and the luminescence was measured at 495 nm (excitation wavelength) and 515 nm (emission wavelength). The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.

phenanthroline¹⁰을 이용하여 백련 추출물의 MMP-1 활성 저해 효과를 비교하였다. 그 결과 1,10-phenanthroline은 24 μ g/ml에서 50%의 MMP-1의 활성을 저해하였으며, 백련 추출물의 경우 투여 농도 의존적으로 MMP-1의 활성을 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 즉, 백련 추출물을 10, 50, 100 μ g/ml의 농도로 처리한 경우 MMP-1의 활성을 각각 50%, 83.3%, 96.7% 저해하는 것으로 나타났으며, IC_{50} 은 10 μ g/ml로 우수한 MMP-1 활성 저해 효과를 나타내었다. 상기의 결과로 볼 때 백련 추출물은 양성 대조그룹인 1,10-phenanthroline보다 약 2.4배 정도 높은 MMP-1 활성 저해능을 가지는 것으로 밝혀졌다.

결론

본 연구에서는 백련 추출물에 의한 항산화 효과, MMP-1 활성 저해 효과 및 HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 백련 추출물의 DPPH와 superoxide radical 소거효과는 처리농도가 증가함에 따라 효과가 높아지는 농도 의존적인 경향을 나타냈으며, DPPH와 superoxide radical을 각각 50 μ g/ml에서 93%, 100 μ g/ml에서 97% 정도 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현 저해 효과에 있어서 백련 추출물은 100 μ g/ml에서 80%로 단백질 수준에서 우수한 발현저해효과를 나타냈지만, mRNA 수준에서는 뚜렷한 발현 저해효과를 나타내지 못하는 것으로 확인되었다. 또한, 백련 추출물의 MMP-1 활성 저해 효과는 100 μ g/ml에서 약 97%로 매우 우수한 활성 저해 효과를 나타내었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 백련 추출물은 항산화 효과 및 MMP-1 활성 저해 효

과와 UVA에 의한 MMP-1의 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 보아 우수한 항노화 소재로써 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Gilchrest, B. A. : Skin aging and photoaging: an overview. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 610 (1989).
- 2) Cadenas, E. : Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 79 (1989).
- 3) Lavker, R. M. and Kligman, A. M. : Chronic heliodermatitis : a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *J. Invest. Dermatol.* **90**, 325 (1988).
- 4) Davies, K. J. : Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **262**, 9895 (1987).
- 5) Bailly, C., Dreze, S., Asselineau, D., Nusgens, B., Lapiere, C. M. and Darmon, M. : Retinoic acid inhibits the production of collagenase by human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Derm.* **94**, 47 (1990).
- 6) Yaar, M. and Gilchrest, B. A. : Aging versus photoaging : postulated mechanisms and effectors. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **3**, 47 (1998).
- 7) Li, J. J., Dong, Z., Dawson, M. I. and Colburn, N. H. : Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Res.* **56**, 483 (1996).
- 8) Huang, C., Ma, W. Y., Dawson, M. I., Rincon, M., Flavell, R. A. and Dong, Z. : Blocking activator protein-1 activity, but not activation retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5826 (1997).
- 9) Kondo, S. : The roles of cytokines in photoaging. *J. Dermatol. Sci.* **23**, S30 (2000).
- 10) Wang, Y., Johnson, A. R., Ye, Q. Z. and Dyer, R. D. : Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 33043 (1999).
- 11) Baker, A. H., Edwards, D. R. and Murphy, G. : Metalloproteinase inhibitors : biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* **115**, 3719 (2002).
- 12) 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. Sci.* **973**, 31 (2002).
- 13) Park, J. H. : The encyclopedia of Chinese crude drugs. Shinilbooks Publications, Seoul, 310 (2002).
- 14) Blois, M. S. : Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199 (1958).
- 15) Furuno, K., Akasako, T. and Sugihara, N. : The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 19 (2002).
- 16) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
- 17) Dunsmore, S. E., Rubin, J. S., Kovacs, S. O., Chedid, M., Parks, W. C. and Welgus, H. G. : Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production. *J. Biol. Chem.* **271**, 24576 (1996).
- 18) Kitahara, A., Matsumoto, U., Ueda, H. and Ueoka, R. : A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of γ -irradiated methyl linolate. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2208 (1992).
- 19) Hatano, T. : Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *Natural Medicines* **49**, 357 (1995).
- 20) Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T. and Sakurai, H. : Active oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162 (1995).
- 21) Kuppusamy, P. and Zweier, J. L. : Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**, 9880 (1989).
- 22) Chun, J. H., Kang, S. W., Varani, J., Lin, J., Fisher, G. J. and Voorhees, J. J. : Decreased extracellular-signal regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 177 (2000).
- 23) Fisher, G. J., Talwar, H. S., Lin, J., Lin, P., McPhillips, P., Wang, Z. Q., Li, X., Wan, Y., Kang, S. W. and Voorhees, J. J. : 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).
- 24) Seo, J. Y., Rhie, G. E. and Chung, J. H. : The effect of ultraviolet irradiation on the expression of type I procollagen and MMP-1 in human dermal fibroblast and human skin *in vivo*. *Kor. J. Invest. Dermatol.* **8**, 116 (2001).
- 25) Seo, J. Y., Choi, H. R., Rhie, G. E., Youn, C. S., Choi, W. W., Kim, J. A., Chung, J. H., Kim, K. H., Cho, K. H. and Eun, H. C. : The effect of retinoic acid and vitamin C on the expression of the procollagen $\alpha 1(I)$, tropoelastin, and MMP-1 in human dermal fibroblast. *Kor. J. Invest. Dermatol.* **8**, 23 (2001).
- 26) Kochanek, S. K., Wlaschek, M., Briviba, K. and Sies, H. : Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblast. *FEBS Lett.* **331**, 304 (1993).
- 27) Wlaschek, M., Briviba, K., Stricklin, G. P., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. : Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 194 (1995).