

설련의 항산화능과 사람 섬유아세포에서 UVA에 의한 MMP-1 발현 저해효과

심관섭[†] · 김진화 · 나영 · 이동환 · 이범천 · Yong He Zhang* · 표형배

한불화장품(주) 기술연구소, *북경대학교 약리학과
(2005년 11월 22일 접수, 2005년 12월 19일 채택)

Anti-Oxidative and Inhibitory Effect of *Saussurea involucrata* on MMP-1 in UVA-irradiated Human Dermal Fibroblast

Gwan Sub Sim[†], Jin Hwa Kim, Young Na, Dong Hwan Lee, Bum Chun Lee, Yong He Zhang*, and Hyeong Bae Pyo

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

*Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Peking University, China

(Received November 22, 2005; Accepted December 19, 2005)

요약: 노화와 관련하여 설련의 항산화 효과, *in vitro* MMP 활성 저해능, 자외선 조사에 의해 유도된 MMP-1 발현에 대한 영향을 사람 섬유아세포를 이용하여 확인하였다. 설련의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH radical과 superoxide anion radical 소거효과를 측정하였다. 그 결과 DPPH radical 소거능의 IC₅₀ 값은 3.89 µg/mL이고, xanthine/xanthine oxidase에 의한 superoxide anion radical 제거능의 IC₅₀ 값은 67.29 µg/mL이었다. 설련 1000 µg/mL에서 93.27%의 지질과산화 저해효과를 나타내었다. MMP-1의 효소활성 저해 효과는 농도 의존적으로 활성을 억제하였으며, IC₅₀ 값은 97.18 µg/mL이다. 또한 자외선 조사에 의해 사람 섬유아세포에서 발현되는 MMP-1에 대해 단백질의 양적인 변화는 42.86% 감소되었으며, 설련에 의해 농도 의존적으로 MMP-1 mRNA의 발현량도 감소되었다. 이러한 실험결과를 통하여 설련은 항산화 효과뿐만 아니라 자외선 조사에 의해 유도되는 MMP-1 단백질 발현과 mRNA 유전자 수준에서의 조절이 가능함을 확인하였다. 결론적으로 설련은 항산화와 자외선으로부터 생성되는 MMP-1의 발현을 저해함으로써 노화와 따른 피부를 보호하는 항노화 소재로서의 응용가능성을 확인하였다.

Abstract: In order to investigate the effects of *Saussurea involucrata* on (relationship between) aging (and *Saussurea involucrata*), we examined the activities of antioxidation, *in vitro* MMP inhibition and UVA-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblasts. *S. involucrata* showed scavenging activities radicals and reactive oxygen species (ROS) with the IC₅₀ values of 3.89 µg/mL against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and 67.29 µg/mL against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. At the concentration of 1000 µg/mL, *S. involucrata* showed 93.27% inhibition on lipid peroxidation of linoleic acid. *S. involucrata* inhibited the activities of MMP-1 in a dose-dependent manner and the IC₅₀ value calculated from semi-log plots was 97.18 µg/mL. Also, UVA induced MMP expression in human dermal fibroblasts was reduced 42.86% by treatment with *S. involucrata*, and MMP-1 mRNA expression was reduced in a dose-dependent manner. Therefore *S. involucrata* was able to significantly inhibit MMP expression in protein and mRNA level. All these results suggested that *S. involucrata* might act as an anti-aging agent by antioxidation and reducing UVA-induced MMP-1 production.

Keywords: *Saussurea involucrata*, antioxidation, MMP, human dermal fibroblast, anti-aging

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 나타

나는 노화 즉, 피부의 구조적 변화와 생리적인 기능이 감소하는 자연노화(내인성노화, intrinsic aging)이며 둘째는 자외선, 주변 환경 등 누적된 외부자극에 의한 광노화(photoaging)로 구분된다[1-4]. 노화의 현상을 세포생물학적 관점에서 접근한 최근의 연구결과들을 보면, 자외선, 흡연 등에 의해 발생한 유해산소(oxygen free radical)와

[†] 주 저자 (e-mail: gssim@hanbul.co.kr)

콜라겐 분해효소(collagenase)가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. 유해산소는 세포막에 있는 기질을 공격하여 이를 산화시키게 되고 산화된 기질에 의해 세포막은 손상되어 정상적인 피부세포의 역할이 제한된다. 콜라겐 분해효소의 증가로 인한 콜라겐 섬유질의 변성 및 파괴는 외적 노화에 의한 주름 발생에 매우 중요한 원인이다. 피부에 직접적으로 영향을 주는 자외선은 피부의 표피와 진피층에 깊숙하게 투과하며, 산화제로 작용하여 활성산소종을 생성한다. 이와 같이 자외선으로부터 생성된 활성산소종은 실질적으로 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어 체계의 불균형을 초래하여 피부는 산화상태 쪽으로 유리하게 기울어지고 세포 성분들에 대한 손상을 야기시켜 결과적으로 주름을 생성시키는 원인물질로 알려져 있다[5,6]. 생체내에서 콜라겐과 같은 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 합성과 분해는 적절하게 조절되거나 노화가 진행되면서 그 합성이 감소하며 자외선 조사에 의해 다양한 기질 단백질 분해 효소(matrix metalloproteinase, MMP)의 발현이 촉진된다[7]. 이러한 콜라겐을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 콜라겐 type I을 분해하는 collagenase (MMP-1)이다. 자외선 조사 후 MMP가 발현되면 세포는 항상성을 유지하기 위해 저해제도 생성되는데 이를 tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)라고 한다[5,7]. 그러나 MMP와 TIMP 사이의 생물학적 평형상태는 UV조사나 호르몬 불균형, 염증반응과 정상적인 노화과정에 의해 파괴된다. 그러므로 노화방지 연구에 있어 MMP의 조절기작에 관한 연구가 많아지고 있으며 최근에는 retinoic acid, retinol 유도체, 녹차 추출물과 그 주성분인 (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 등이 광노화에 매우 효과적인 방어 소재라고 알려지고 있으며 그 메커니즘도 서서히 밝혀지고 있다[8-11].

설련(*Saussurea involucreta* Kar. et Kir., Compositae)은 중국의 약용식물로 해발 고도 2800 ~ 3400 m의 A'er Tai와 Tianshan 지역에서 자란다. 민간요법으로 관절염, 감기, 복통, 고산병 등의 치료에 이용되며, 설련의 약리학적 연구로는 항염, 강심제, 항암, 피로회복제 등에 효과가 있다고 알려져 있다[12]. 설련의 이차 대사산물로는 apigenin, kaempferide, acacetin, luteolin, apigenin-5,6-dimethoxy-flavone, apigenin-6-methoxy-flavone, quercetin, rutin 등의 flavonoid와 alkaloids, steroids, lignans 등이 보고되었다[13,14].

본 연구는 설련의 항산화 효과, MMP-1 효소 활성 저해 효과 및 UVA를 조사한 배양된 사람섬유아세포에서 MMP-1 발현 저해 효과를 검색하여 항노화 소재로 이용하고자 하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 시료의 추출

본 실험에서 사용한 설련은 중국 북경대학에서 제공받아 사용하였다. 설련 100 g을 분쇄하여 70% EtOH 1000 mL로 환류하면서 3 h씩 2회 반복 추출하고 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 사용하였다.

2.2. DPPH에 의한 자유라디칼 소거 효과

항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Aldrich, USA)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법[15]을 활용하였다. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동일량의 설련 추출물을 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10 min 동안 반응시킨다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. Superoxide Radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법에 의해 측정하였다[16]. 0.05 M Na₂CO₃ buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 설련 추출물을 가한 후 25°C에서 10 min간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/mL xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25 min 동안 반응 후 superoxide radical 소거효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 지질과산화 억제효과

Linoleic acid (2.85 mg/mL)와 Tween 20 (2.85 mg/mL)을 40 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 혼합하여 반응기질로 사용하였다. 과산화 유도는 기질용액과 시료를 혼합하여 80°C에서 120 rpm으로 5 h 반응 후 37°C에서 24 h 반응시켰다. 과산화가 유도된 시료에 산화정지를 위해 3.6% BHA와 300 μ L TBA-TCA용액(thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid, 0.25 N HCl)을 혼합하여 boiling water bath에서 15 min간 반응 후 냉각하고 0.3 mL chloroform을 첨가한 후 2000 rpm에서 15 min간 원심분리하여 그 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다[17].

2.5. MMP-1 (Collagenase) 활성저해 측정

MMP-1 활성 저해 효과를 측정하기 위하여 형광 분석법을 이용하였다. 실험에 사용한 기질은 형광물질이 표지된 dye quenched collagen (DQ-collagen), 효소(collagenase)는 Molecular Probe사 (Eugene, OR, USA)에서 시판중인 제품을 사용하였으며, 반응완충액(0.5 M Tris-

HCl, 1.5 M NaCl, 50 mM CaCl₂, 2 mM sodium azide, pH 7.6)은 10배 희석 후 사용하였다. 반응완충액 100 μ L에 0.25 mg/mL로 반응완충액에 용해한 DQ collagen 20 μ L와 시료 40 μ L를 첨가하고 0.5 unit로 희석한 collagenase 40 μ L를 첨가한다. 암소, 실온에서 20 min 경과 후 형광 분광광도계(Perkin Elmer, UK)를 이용하여 흡수 파장 495 nm, 방출파장 515 nm로 형광값을 측정하며, 대조군으로서 효소액 대신 반응완충액을 효소와 동량 첨가하여 형광값을 측정하였으며 시료 자체의 형광값도 측정하여 효소활성 계산시 보정하였다.

2.6. 세포 배양

신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblasts (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 조건 하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10 세대 세포를 실험에 이용하였다.

2.7. 세포 생존률 측정

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 정량은 Mosmann[18]의 방법을 변형하여 실시하였다. HDF를 2 × 10⁴ cells/well 농도로 96-well plate의 well에 설련 추출물을 투여하여 CO₂ 배양기에서 24 h 배양하였다. MTT 용액(5 μ g/mL)을 첨가하고 4 h 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100 μ L acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 570 nm에서 microplate reader (Model ELX 800, BIO-TEK Instruments Inc, USA)로 흡광도를 측정하였다.

2.8. UVA 조사 및 시료의 처리

HDF를 1.5 × 10⁵ cells/mL의 농도로 35 mm dish에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한다. UV 조사 전에 배양배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum을 제거 후 6.3 J/cm² UVA (UVA F15T8BLB, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. UVA 조사 후 배양 배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3:1) 배지에 설련 추출물을 투여하여 24 h 배양하였다.

2.9. MMP-1 발현저해 측정(ELISA법)

HDF에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24 h 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 3% BSA (bovine serum albumin)/PBS로 37°C, 1 h 동안 blocking한 후 mono-

clonal anti-MMP-1 (mouse)을 1:3000으로 blocking solution (3% BSA)에 희석하여 150 μ L씩 분주하고 37°C, 90 min간 반응시켰다. Anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 1:3000으로 blocking solution에 희석하여 150 μ L씩 분주하고 37°C, 90 min간 반응시킨 후 PBS-T로 세척한 다음 diethanolamine buffer에 1 mg/mL pNPP (p-nitrophenyl phosphate)를 포함한 기질용액 150 μ L를 넣어 실온에서 30 min간 반응시켰다. 3 N NaOH 50 μ L를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 microplate reader을 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.10. 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 μ M), 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 X 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 맞춘 다음 PCR을 실시하였다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 MMP-1과 GAPDH 유전자의 발현을 확인하였다.

2.11. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

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 불리는 활성산소는 세포 생체막의 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발[19]하는 것으로 알려져 있으며 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되어 있다[20,21]. 설련의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작

Table 1. Antioxidative Activities of *S. involucrata*

Sample	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH radical scavenging (%)	Superoxide radical scavenging (%)	Inhibition of lipid peroxidation (%)
<i>S. involucrata</i>	1000	98.47 \pm 4.32	92.7 \pm 3.56	93.27 \pm 4.33
	100	91.21 \pm 3.17	69.28 \pm 2.11	51.31 \pm 2.98
	10	72.41 \pm 2.98	18.65 \pm 1.01	32.5 \pm 1.71
	1	16.67 \pm 0.99	6.76 \pm 0.79	10.87 \pm 1.09
BHA ^{d)}	100	81.44 \pm 3.69	53.62 \pm 2.13	84.83 \pm 2.14

^{d)} BHA (3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole)

The data were expressed as mean Values (\pm S.D.) of three experiments.

용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 효과가 알려진 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)을 이용하여 설련의 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 BHA는 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 81.44%의 DPPH radical을 소거하였으며, 설련은 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈다(Table 1). 설련을 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 경우 각 DPPH radical 소거능은 16.67%, 72.41%, 91.21%, 98.47%로 우수한 free radical 소거효과를 나타내었다.

3.2. Superoxide Radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide 음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타난다[22]. Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion의 생성저해의 결과는 Table 1에 나타내었다. 양성 대조군으로 BHA를 이용하여 설련의 superoxide radical 소거효과를 비교하였다. 그 결과 설련은 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타내 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 경우 각 superoxide radical 소거능은 6.76%, 18.65%, 69.28%, 92.7%로 우수한 superoxide radical 소거효과를 나타내었다. 양성대조군인 BHA는 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 53.62%의 superoxide radical을 소거하였다.

3.3. 지질과산화 억제효과

생체막이나 지단백질로서 존재하는 지질은 체내에서 발생하는 free radical의 공격을 받아 여러 종류의 과산화물을 형성하는데, 이 과산화물들과 분해산물들은 반응성이 높아 주변의 생체분자들의 구조와 기능을 변화시켜 여러가지 만성질환을 초래하게 되는 것으로 알려지고 있다[23]. 이러한 지질의 과산화 억제를 측정하기 위하여 linoleic acid를 이용한 2-thiobarbituric acid (TBA)법을 이용하여 설련의 지질과산화 억제효과를 확인하였다(Table 1). 설련을 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 경우

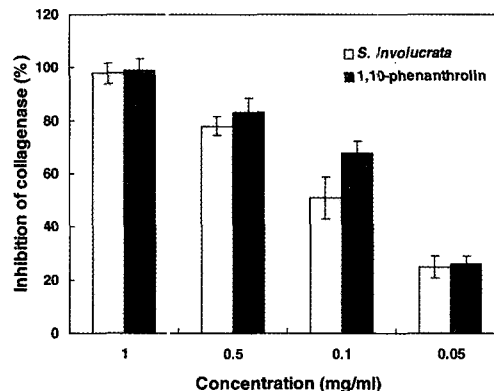


Figure 1. Determination of IC₅₀ values for the inhibition of collagenase (MMP-1). Fluorometric assays of the activities of MMP-1 were performed in the presence of increasing concentrations of *S. involucrata* and 1, 10-phenanthroline. The results were expressed as mean values (\pm S.D.) of triplicate samples.

각 지질과산화 억제효과는 10.87%, 32.5%, 51.31%, 93.27%로 우수한 지질과산화 억제효과를 나타내었다. 양성대조군인 BHA는 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 84.83%의 지질과산화 억제효과를 나타내었다.

3.4. In vitro MMP-1 (Collagenase) 저해 효과

콜라겐은 결합조직의 탄력을 나타내며 진피를 구성하는 단백질의 70%를 차지한다. 이러한 콜라겐을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 collagen type I을 분해하는 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)으로 이러한 MMP-1의 효소활성을 저해하거나 발현을 억제하는 활성을 가진 물질은 콜라겐을 보호하여 피부조직의 기계적 특성을 유지시켜 탄력과 피부가 늘어지는 것을 방지한다. 이러한 MMP-1의 효소활성 저해 효과를 가진 1,10-phenanthroline과 설련의 MMP-1 효소활성 저해 효과를 확인하였다(Figure 1). 양성 대조군인 1,10-phenanthroline의 경우 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/mL의 농도에서 각각 26%, 63%, 83%, 99% 효소활성을 저해하는 것으로 나타났으며, 설련 추출물의 MMP-1의 효소 저해 효과는 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 25%, 51%, 78%, 98% 효소활성을 저해하는 것으로 나타났다. 이는 설련이 양성대조군인 1,10-phenanthroline과 유사한 collagenase 저해 효과를 나타내는 것으로 설련 추출물이 collagenase 효소에 직접적인 저해활성을 가질 것으로 예상된다.

3.5. 세포독성

설련 추출물의 세포독성 측정과 더불어 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다.

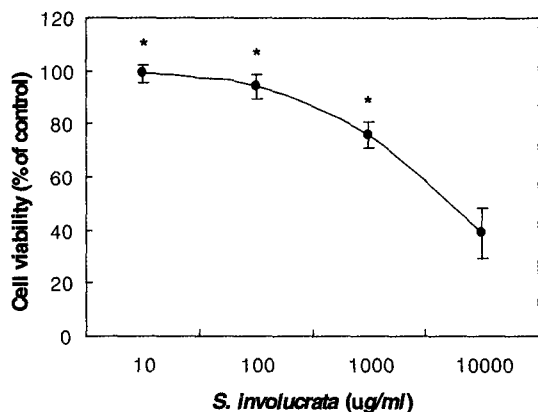


Figure 2. Relative cell viability of *S. involucrata* on human dermal fibroblasts by MTT assay. The cells were treated with various concentration of *S. involucrata* for 24 h. The results were expressed as mean values (\pm S.D.) of triplicate samples. * $p < 0.05$ compared with control.

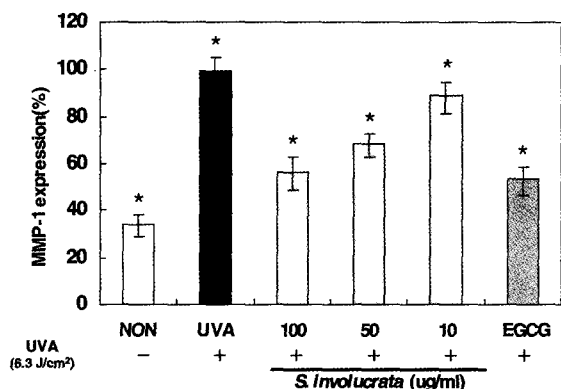


Figure 3. The effect of *S. involucrata* on the production of MMP-1 by the irradiated human dermal fibroblast. The cells were treated with various concentration of the extract for 24 h. The results were expressed as mean values (\pm S.D.) of triplicate samples. * $p < 0.05$ compared with control.

HDF세포에 대한 설련 추출물의 세포 독성을 측정한 결과, 설련 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도로 처리시 섬유아세포의 생존에 영향이 없는 것으로 확인되어 이후 실험에서는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도로 실험을 진행하였다(Figure 2).

3.6. ELISA를 이용한 MMP-1 발현 저해 효과

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

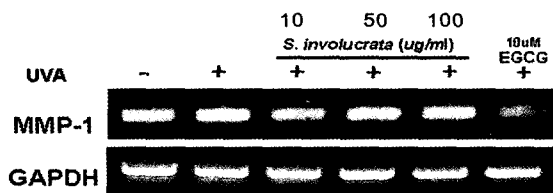


Figure 4. The effect of *S. involucrata* on MMP-1 mRNA expression in human dermal fibroblast irradiated with UVA. Fibroblast cultures were treated with varying doses of *S. involucrata* 24 h and compared with culture alone (control). Total RNA extracted from human dermal fibroblast was analyzed by RT-PCR.

증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다[24]. 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 설련이 미치는 영향을 알아보기 위해 섬유아세포에 6.3 J/cm² UVA를 조사하고 설련 추출물을 첨가하여 24 h 배양한 후 MMP-1 발현저해 효과를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)을 통해 알아보았다. 그 결과 설련은 농도 의존적으로 MMP-1 발현저해 효과를 나타내었다. 설련 추출물을 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우 MMP-1 발현저해 효과는 10.64%, 30.79%, 42.86%로 나타났으며, UV에 의한 AP-1과 NF- κ B의 활성도 증가를 억제하여 MMP발현 저해 효과가 보고된[25] (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)의 경우는 10 μM 에서 45.66% 발현저해 효과를 나타내었다(Figure 3).

3.7. RT-PCR를 이용한 MMP-1 mRNA 발현 저해 효과

설련 추출물이 섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1 mRNA발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과 농도 의존적으로 MMP-1 mRNA 발현을 저해하는 것을 알 수 있었다(Figure 4).

Scharffetter 등[26]은 배양된 섬유아세포에 5 ~ 60 J/cm²의 UVA를 1회 조사하여 MMP-1 유전자 발현이 증폭됨을 관찰하였으며 Wlaschek 등[27]도 UVA를 조사시 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 관여 할 것으로 생각되고 있다. 즉 UVA조사에 의해 섬유아세포에서 MMP-1의 유전자 발현을 자극하는 전사 인자(transcriptional factor)로 알려져 있는 AP-1의 활성도도 증가됨이 보고된 바 있다[28]. Barthelman 등[29]과 Fisher 등[30]은 각각 EGCG와 all-trans-retinoic acid가 자외선에 의한 AP-1의 활성도 증가를 방지함으로써 MMP-1 유전자 발현이 감소함을 보고하였다. 결론적으로 설련은 섬유아세

포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1을 단백질 및 mRNA 수준에서 발현을 저해하는 효과가 확인되었으며, 이는 기존 보고된 EGCG와 유사한 우수한 효과를 나타내었다. 따라서 섬유아세포에서 설련 추출물은 UVA로부터 생성된 ROS를 소거하거나 신호전달 과정에 관여하여 MMP발현을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서는 설련에 의한 항산화효과 및 HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 미치는 영향을 관찰하였다. 설련의 DPPH와 superoxide radical 소거효과는 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 소거효과를 나타냈으며, 각각 1000 µg/mL에서 98.47%, 1000 µg/mL에서 92.7%로 DPPH와 superoxide radical을 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 또한 설련 추출물의 지질과산화 저해효과는 1000 µg/mL에서 93.27%로 지질과산화 효과도 우수하게 나타났다. MMP-1 효소 활성 저해 효과는 1000 µg/mL에서 98%를 저해하는 것으로 나타나 우수한 효과를 나타내었다. 사람 섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현 저해효과는 설련 추출물 100 µg/mL에서 42.86%로 단백질 수준에서 발현 저해효과를 나타내었으며, mRNA수준에서도 설련 추출물은 농도 의존적으로 발현 저해효과가 나타났다. 설련 추출물은 항산화효과, MMP-1 효소 활성저해 효과와 UVA에 의한 MMP-1의 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 보아 우수한 항노화 소재로써 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

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 α1(I), tropoelastin, and MMP-1 in human dermal fibroblast, *Kor. J. Invest. Dermatol.*, **8**, 23 (2001).
7. W. Meinhard, T. B. Iliana, N. Lale, M. Wenjian, A. S. Lars, R. W. Ziba, S. Jutta, and S. K. Karin, Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J. Photochem Photobiol. B.*, **63**, 41 (2001).
8. G. J. Fisher, 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).
9. G. J. Fisher and J. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid, *Photochem Photobiol.*, **69**, 154 (1999).
10. M. Barthelman, 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).
11. 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).
12. S. Konno, Maitake D-fraction. *Alternative & Complementary Therapies*, **7**, 102 (2001).
13. N. Kodama, K. Komuta, N. Sakai, and H. Nanba, Effects of D-fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa* on tumor growth involve activation of NK cells, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1647 (2002).
14. N. Kodama, Y. Murata, and H. Nanba, Administration of a polysaccharide from *Grifola frondosa* stimulates immune function of normal mice, *J. Med. Food*, **7**, 141 (2004).
15. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
16. 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).
17. A. M. Romero, M. M. Doval, M. A. Sturla, and M. A. Judis, Antioxidant properties of polyphenol-containing extract from soybean fermented with *Saccharomyces cerevisia*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **106**, 424 (2004).
 18. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
 19. A. Kitahara, U. Matsumoto, H. Ueda, and R. Ueoka, R. A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of γ -irradiated methyl linolate, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2208 (1992).
 20. T. Hatano, Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-Tannins and related polyphenols, *Natural Medicines*, **49**, 357 (1995).
 21. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Activeoxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162 (1995).
 22. P. Kuppusamy and J. L. Zweier, Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 9880 (1989).
 23. S. H. Cho, Lipid peroxidation and nutrition, *Korean J. Lipidology*, **3**, 23 (1993).
 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. J. G. Kim, J. G. Hwang, Y. K. Cho, Y. G. Han, Y. J. Jeon, and K. H. Yang, Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB-induced skin damage, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **14**, 11 (2001).
 26. 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).
 27. 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 possilbe mechanism in dermal photodamage?, *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 164 (1993).
 28. 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. Dermtaol.*, **35**, 1136 (1997).
 29. M. Barthelman, 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).
 30. 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).