

산거울 추출물의 Elastase 활성 저해 및 Matrix Metalloproteinase-1 발현 억제 효과

박 선 희 · 이 강 혁 · 한 창 성 · 김 기 호 · 김 영 희[†]

(주)바이오랜드 생명공학연구소
(2010년 3월 22일 접수, 2010년 6월 5일 수정, 2010년 6월 8일 채택)

Inhibitory Effects of *Carex humilis* Extract on Elastase Activity and Matrix Metalloproteinase-1 Expression

Sun Hee Park, Kang Hyuk Lee, Chang Sung Han, Ki Ho Kim, and Young Heui Kim[†]

R&D center, Bioland Ltd., 39-4, Songjung-ri, Byongchon-myon, Chonan-si, Chungnam 330-860, Korea
(Received March 22, 2010; Revised June 5, 2010; Accepted June 8, 2010)

요약: 본 연구에서는 산거울 추출물의 항주름 활성을 연구하기 위하여 항산화, 엘라스타제 활성 억제, Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) mRNA 발현 및 단백질의 생성 억제 관련 실험을 진행하였다. 산거울의 뿌리부분을 95 % 에탄올로 추출하고 유기 용매로 분획하여 각 추출물 분획물에 대한 항산화 활성과 엘라스타제 억제 효능을 측정한 결과, EtOAc 분획이 각각 SC₅₀=4.89 μ g/mL, IC₅₀=23.5 μ g/mL 로 가장 우수한 결과를 나타내었다. 따라서 활성이 가장 좋은 EtOAc 분획물로 부터 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 활성물질을 분리하고, 분리된 물질이 α -viniferin임을 분광학적 분석결과로 확인하였다. RT-PCR을 이용한 MMP-1 mRNA 발현능 평가에서 EtOAc 분획물과 α -viniferin은 각각 50 ~ 60 % (10 ~ 100 μ g/mL), 약 60 ~ 75 % (0.5 ~ 2 μ g/mL)의 저해효과를 나타내었으며, Western-blot을 이용한 MMP-1 단백질 생성을 평가한 결과에서 역시 EtOAc 분획물과 α -viniferin은 같은 농도에서 각각 50 ~ 65 %와 55 ~ 65 % 저해 효과를 나타내었다. 결론적으로, α -viniferin을 함유한 산거울의 EtOAc 분획층의 주름 개선용 기능성 화장품 개발을 위한 소재로 개발 가능성을 확인하였다.

Abstract: In order to evaluate anti-wrinkle activity of *Carex humilis* extract, free radical scavenging activity, elastase inhibitory activity and reduction of expression Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) mRNA and MMP-1 protein were investigated. The roots of *Carex humilis* were extracted with 95 % ethanol and successively partitioned with organic solvents with increasing polarity of the solvents. Each fraction of organic solvent were investigated by using free radical scavenging activity and elastase inhibitory activity test. Among them, EtOAc fraction showed anti-oxidant activity (SC₅₀=4.89 μ g/mL) and elastase inhibitory activity (IC₅₀=23.5 μ g/mL). EtOAc fraction was developed on silica gel by open-column chromatography and consecutively re-developed on C18 resin by prep-HPLC to give α -viniferin as a major component, which was confirmed by spectrometric analysis. In the assay on expression of MMP-1 mRNA by RT-PCR and protein by western-blot, EtOAc layer (10 ~ 100 μ g/mL) was reduced about 50 ~ 60 %, 50 ~ 65 % respectively and α -viniferin (0.5 ~ 2 μ g/mL) was inhibited about 60 ~ 75 %, 55 ~ 65 % respectively in human fibroblast. Therefore, our findings suggest that EtOAc layer of *Carex humilis* containing α -viniferin can be useful as an active ingredient for cosmeceuticals of anti-wrinkle effects.

Keywords: antioxidant, elastase, MMP-1, α -viniferin, *Carex humilis*

[†] 주 저자 (e-mail: yhkim1st@biolandkorea.com)

1. 서 론

피부의 노화는 주름 증가와 탄력감소, 색소 침착 등의 여러 형태로 나타난다. 그 중 가장 대표적인 노화의 현상은 바로 주름이다. 이러한 주름을 생성하게 하는 피부 노화원인은 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있다. 나이가 들어감에 따른 자연적인 노화인 내적 요인과 외부환경으로 인한 외적 요인이다. 외적 요인으로는 자외선, 공해, 병, 음주, 흡연 등이 있고, 내적 요인으로는 프리라디칼과 염증의 발생, 스트레스, 세포 활성의 저하 및 돌연변이화, 세포대사 불균형 등을 들 수 있다[1].

피부의 구조에 따라 주름 발생 원인을 좀 더 자세히 설명하면, 피부는 크게 표피와 진피로 나뉜다. 표피와 진피의 경계부위는 표피세포 지지, 부착, 영양물질의 이동, 표피 분화의 조절 등에 관여하는데, 각종 노화 요인 가운데 특히 자외선은 외적 요인 가운데 대표적 원인으로, 피부가 자외선에 노출되면 콜라겐 IV, VII이 감소하고, 연속적 반응으로 표피 및 진피 지지기능이 감소되고, 선별 투과 기능이 약화되어 해로운 성분이 쉽게 진피에 영향을 미치게 되어 주름이 생성된다[2].

좀 더 자세히 설명하면, 진피는 표피의 아래에 있는 결합조직으로 이루어지는 조직으로 표피 세포인 keratinocyte 처럼 치밀하게 채워져 있지 않고 세포와 공간이 많으며, 세포외기질(extracellular matrix)이라 불리는 거대 분자의 망상 구조에 의해 채워져 있다. 세포외기질은 피부 탄력성, 신진대사, 생기 등에 직접적으로 관여하고 있다. 세포외기질의 성분인 산성 무코다당은, 대량의 물이 분자 내에 유지하여 겔 상을 나타내고, 이 겔 내의 물이 영양분, 대사산물, 호르몬 등을 혈관으로부터 조직 중의 세포까지 침투시키는 작용을 담당하고 있다. 따라서, 세포외기질에 있어서의 산성 무코다당의 생산이 촉진되면, 피부가 싱싱하게 될 뿐만 아니라, 피부의 신진 대사가 촉진되어, 피부 노화를 방지하는 것이 가능하게 된다. 또한, 섬유상 단백질은 조직의 형태를 유지하거나, 피부에 탄성을 부여하는 등의 기능을 담당하고 있다. 따라서 세포외기질에 있어서의 섬유상 단백질의 생산이 촉진되면, 피부에 탄력을 주게 되어, 주름 또는 잔주름이 억제된다. 이러한 세포외기질을 생산하는 섬유아세포의 활성이 내적, 외적인 노화 요인, 특히, UV에 의해 저하되게 되면 콜라겐 생합성이 감소하고 변성된 엘라스틴이 증가하게 된다. 또한 세포외기질을 분해하는 매트릭스 메탈로프로테나아제(Matrix Metalloproteinases, MMPs)의 증가로 콜라겐 등의 기질의 분해가 증가되고 진피 내 solar scar가 발생

하게 되고, 표피-진피 경계부가 파괴되어 유해 성분이 유입되고 진피 분해가 가속화된다. 결국에는 피부의 탄력성이나 싱싱함, 생기를 잃게 되고, 주름, 잔주름, 피부의 거칠어짐이 발생하게 되어 피부 노화를 초래하는 하나의 원인이 된다[3-5]. 특히, 콜라겐은 피부 진피의 주성분으로서 MMP-1에 의해 분해된다. 따라서 위에서 설명한 주름 생성 요인 중 가장 큰 부분을 차지하고 있는 콜라겐 등의 세포외기질의 합성량을 증가시키거나, 세포의 기질을 분해하는 효소인 MMPs를 저해함으로써 생기는 젊은 피부를 유지하기 위한 방법을 모색하기 위한 시도가 이루어지고 있다.

산거울(*Carex humilis* Leyss)은 우리나라 각처의 그늘진 바위틈이나 건조한 숲 속에 나는 사초과의 다년초로 그 종류만 2,000가지 정도가 분포하고 있다. 키는 6 ~ 10 cm, 근경은 굵고 짧으며, 줄기는 적고, 총생이다. 잎은 좁고 길며, 길이는 30 cm 정도, 폭은 1 mm 정도 되며, 가장 자리는 거칠거칠하고, 짧은 털이 나 있다. 작은 이삭은 2 ~ 3개, 수꽃 이삭은 1개가 줄기 끝에 붙고, 선상 피침형, 자루가 있으며, 길이 12 mm 정도의 엷은 적갈색이다. 암꽃이삭은 1 ~ 2개가 줄기 옆에 붙고, 선형이며, 길이는 3 mm 정도의 적갈색이다. 비늘조각은 타원형으로 끝이 날카롭고 작으며, 가는 까락이 있다. 과낭은 비늘조각보다 매우 짧으며, 암술머리는 3갈래로 갈라진다. 열매는 수과로 길이 2 mm의 세모진 넓은 도란형이다[6].

산거울에서 분리한 화합물인 α -viniferin은 COX (cyclooxygenase)-2의 활성과 TNF (tumor necrosis factor)의 방출을 동시에 억제하고(공개특허 특2003-0084271), 프로스타글란딘(prostaglandin)이라는 염증유발 물질을 합성하는 COX 활성을 억제하여 염증반응 억제에 관여한다는 보고가 있었으며[7-10], 또한 해외특허 항암제로서 토포아이스머레이즈 II(topoisomerase II)의 활성을 억제하여 항암 효과를 나타내거나[11-13], 아세틸콜린 가수분해 효소를 억제하여 기억력 향상에도 도움을 주는 것[14]으로 보고된 바 있다.

선행 연구에서는 산거울 추출물과 이것에서 분리한 α -viniferin에 대한 연구 중에서 성분과 작용에 대한 연구는 보고되어 있으나, 주름 관련 유전자인 MMP-1의 발현 및 생성에 대한 산거울 추출물과 이것에서 분리한 α -viniferin의 영향을 평가한 연구는 아직까지 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 산거울 추출물을 제조하여 이들 추출물(혹은 분획)의 MMP-1의 발현 저해능력을 측정하여 항주름 효과를 측정하고 항주름 화장품 소재로서의 개발 가능성이 있는

지를 검토하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

산거울(*Carex humillilis*)은 경동 약업 시장에서 구입한 것으로 음건 후 지상부를 제거한 뿌리 부분만을 사용하였다. 추출 및 분리정제에 사용한 methanol (MeOH), methylene chloride (MC), ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH), n-hexane은 덕산화학(Korea)에서 생산한 용매를 사용하였고, 정량에 사용한 acetonitrile (MeCN)은 J.T.Baker (USA)의 용매를 사용하였다. 초기 분리에는 silica gel (Fuji, Japan)를 사용하였고, α -viniferin 함량 분석과 정제에는 HPLC (10A, SHIMADZU SCC, JAPAN) 시스템을 사용하였다. 또한 정제에 사용한 컬럼은 ACE HPLC Column사에서 제조한 ACE 5C18 (250 × 21.2 mm, Japan)을 사용하였다. UV 측정은 UV500 (Perkin-Elmer, USA)을 사용하였고, IR은 FTS3000 (BIO RAD : USA)을 사용하였으며, 구조분석은 500 MHz NMR spectroscopy (BURKER: Australia)로 측정하였다. LC-Mass는 HEWRETT PACKARD 8453 Spectrophotometer (Varian, USA)를 사용하여 positive ESI로 분석하였다.

사람 섬유아세포(CRL-2076)는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 구입하였으며, 세포배양에 필요한 배지 및 시약은 Invitrogen (USA), Sigma (USA), Nunc (USA)로부터 구입하여 사용하였다. 흡광도 측정은 Tecan사(Austria)의 Infinity M200 microplate reader (Tecan, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. RT-PCR은 SuperBio사(Korea)의 All-in-one RT-PCR Kit (P7004)를 하였으며, Western blot을 위해 Bio-Rad (USA)의 western blot kit 및 semi-dry transfer system을 사용하였고 image analysis system (Bio-rad, USA)으로 결과를 확인하였다. 항체는 Santa Cruz Biotech (USA)에서 구입하였다.

2.2. 산거울 추출물의 제조

2.2.1. 추출 및 분리

건조한 산거울(*Carex humillilis*) 뿌리를(41 kg) 95 % 에탄올에 침적하여 상온에서 10일간 추출하였다. 추출이 끝난 후 추출액을 농축하여 농축물 0.88 kg을 획득하였다. 농축물을 10 L 정제수에 분산시키고 MC, EtOAc,

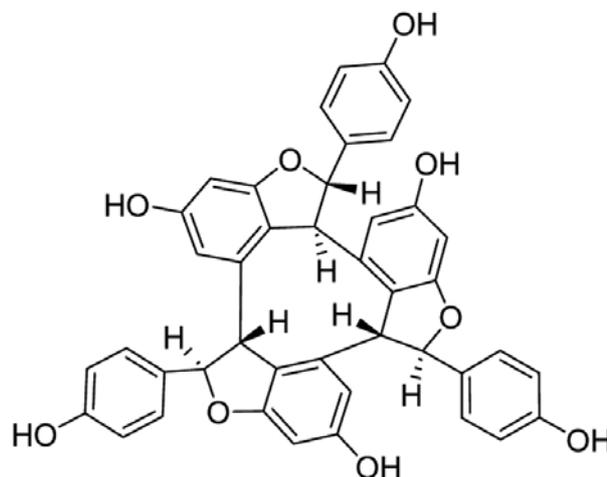


Figure 1. Structure of α -viniferin.

BuOH 순서로 분획하여 각각 MC층 0.02 kg, EtOAc층 0.48 kg, BuOH층 0.09 kg, 정제수층 0.29 kg을 얻었다.

또한 EtOAc 분획물(0.48 kg)을 실리카 컬럼(9 × 20 cm, FUJI silica gel)을 사용하여 n-Hexane/EtOAc를 전개용매(1 : 1)로 하여 HPLC 분석 후 정제(ACE HPLC Columns, 60 % MeCN isocratic, 286 nm)하여 순수한 α -viniferin(순도 ≥ 99 %)을 얻었다.

2.2.2. α -Viniferin

α -Viniferin (C₄₂H₃₀O₉)는 적갈색의 분말로 이것을 에탄올 용액 5,000배로 용해하여 UV를 측정하면 λ_{max} 203 ± 2 nm, 287 ± 2 nm에 나타났다. 브롬화칼륨정제법에 따라 적외선을 측정할 때 파수 3,308, 1,590, 1,504, 1,436, 1,350, 1,218, 1,165, 1,109 및 817 cm⁻¹ 부근에서 흡수하였다. LC-MS로 측정한 결과 m/z = 679 [M+H], 678[M]로 확인 되었으며 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 자료는 이미 보고된 자료와 동일한 것을 확인 하였다[15,16].
¹H-NMR (500 MHz, Acetone-d₆) : δ ppm 4.11 (s, 1H, H-3(I)), 4.77 (d, 1H, H-3(III)), 4.85 (d, 1H, H-3(II)), 5.05 (d, 1H, H-2(III)), 6.09 (d, 1H, H-2(II)), 6.14 (d, 1H, H-5(I)), 6.22 (s, 1H, H-2(I)), 6.38 (m, 3H, H-7(I,II,III)), 6.74 (d, 1H, H-5(III)), 6.87 (m, 3H, H-3', 5'(I), H-5(II)), 6.92 (m, 4H, H-3',5'(II,III)), 7.18 (m, 4H, H-2', 6'(I,III)), 7.36 (m, 2H, H-2', 6'(II)) :
¹³C-NMR (125MHz, Acetone-d₆) : δ ppm 46.4 (C-3(I)), 52.8 (C-3(II)), 55.7 (C-3(III)), 86.4 (C-2(I)), 90.0 (C-2(II)), 95.6 (C-2(III)), 96.6 (C-7(II,III)), 98.0 (C-7(I)), 105.8 (C-5(III)), 106.2 (C-5(II)), 108.5 (C-5(I)), 115.7 (C-3',5'(I)), 116.1 (C-3',5'(III, II)), 118.8 (C-3a(I)),

119.7 (C-3a(III)), 120.9 (C-3a(II)), 128.1 (C-2'6'(I)), 128.2 (C-2'6'(II)), 128.6 (C-2'6'(III)), 132.0 (C-1'(I)), 132.3 (C-1'(II)), 132.5 (C-1'(III)), 138.7 (C-4(III)), 139.7 (C-4(II)), 141.2 (C-4(I)), 157.8 (C-4'(I)), 158.2 (C-4'(II)), 158.4 (C-4'(III)), 159.4 (C-6(II,I)), 160.7 (C-7a(II)), 160.8 (C-6(III)), 161.6 (C-7a(I)), 161.8 (C-7a(III)).

2.3. 항산화 활성

Hatano 등의 방법을 변용하여[17] 0.2 mM 의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 0.5 mL에 시료를 농도별로 1 mL을 첨가하고, Voltex mixer로 10 s 간 진탕 후 상온에서 10 min 간 반응시킨 후, 520 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조물로는 ellagic acid를 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 SC₅₀치(scavenging concentration₅₀: DPPH 라디칼 형성을 50 %로 억제하는 데 필요한 $\mu\text{g/mL}$ 농도)로 나타내었다.

2.4. 엘라스타제 활성 억제 평가

123.2 mM Tris-Cl 완충용액 (pH 8.0)에 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 1.015 mM이 용해된 기질액 1,300 mL에, 시료를 일정농도로 정제수로 희석한 액을 100 mL 첨가한다. 여기에 효소액(0.037 u/mL양의 elastase 수용액)을 100 mL 첨가하여 25 °C 수욕상에서 10 min 간 반응시켜 UV-Visible spectrum 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조구로는 oleanolic acid를 조제하여 측정하였다. 각 시료의 억제 작용은 SC₅₀치(N-Succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide를 N-succinyl-(Ala)₃와 p-nitroanilide로 분해되는 것을 50 %로 억제하는데 필요한 $\mu\text{g/mL}$ 농도)로 나타내었다.

색보정은 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 123.2 mM Tris-Cl 완충용액 1,300 mL를 첨가하며, 실험군과 동일한 농도의 시료를 첨가하였다.

[계산식 1]

$$\text{Elastase 저해율(\%)} = 1 - \left\{ \frac{\text{실험군-색보정}}{\text{대조군-색보정}} \right\} \times 100$$

2.5. 세포 배양

ATCC사로부터 구입한 사람 섬유아세포(CRL-2076)를 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin-streptomycin을 첨가한 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)으로 세포수가 5×10^5 cells/dish가 되도록

하여 배양하였다. 배양용기는 100 mm cell culture dish를 사용하였으며, 10 ~ 12 mL의 배지로 37 °C, 포화습도로 유지되는 5 % CO₂ 배양기에서 단층 배양하였다. 배지는 일주일에 두 번씩 갈아주고, confluency에 도달한 세포는 0.25 % trypsin-EDTA를 사용하여 trypsinization한 후 계대 배양하여 유지하였다.

2.6. 세포 독성 실험

살아있는 세포는 미토콘드리아에 존재하는 탈수소 효소에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)가 MTT-formazan으로 전환되므로 이것의 양을 재면 살아있는 세포의 수를 측정할 수 있다[18]. 24-Multiwell plate에 5×10^4 cells/well 농도의 사람 섬유아세포를 10 % fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 배지로 접종하여 24 h 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 serum-free 배지로 교체하고 시험품을 농도별 처리하여 24 h 배양하였다. 대조군으로 시험품을 녹인 용매만을 처리하여 배양하였다. 배양이 끝난 세포에 MTT 용액 (2.5 mg/mL) 100 mL를 첨가하여 37 °C에서 4 h 반응시켰다. 상등액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO) 500 mL를 첨가하여 생성된 MTT-formazan 결정체를 용해시킨 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정한다. 세포 독성은 대조군과 비교하여 흡광도의 백분율로 나타내었다.

2.7. MMP-1 발현 저해능 평가

2.7.1. UVA 조사 및 시험품 처리

사람 섬유아세포를 1×10^6 cells/dish의 농도로 60 mm cell culture dish에 24 h 배양하였다. 24 h 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하여 배지의 serum 성분 제거 후 PBS 3 mL을 넣어 6 J/cm² UVA를 조사하였다. UVA 조사 후 serum-free 배지로 교체하고 시험품을 처리하여 24 h 배양하였다.

2.7.2. RNA 분리 및 RT-PCR

RT-PCR을 사용하여 MMP-1 발현의 확인을 위하여 UVA를 조사하여 24 h 배양한 세포로부터 TRIzol reagent를 이용한 phenol-chloroform 추출 방법으로 total RNA를 분리하였다. 정량 후 1 μg 의 total RNA를 All-in-one RT-PCR kit를 사용하여 MMP-1과 β -actin의 RT-PCR를 수행하였으며, 반응 조건은 MMP-1은 95 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 1 min, 25 cycles이고, β -actin

은 95 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min, 25 cycles로 반응시켰다. RT-PCR product는 2 % (w/v) agarose gel에 전기 영동하여 image analysis system으로 결과를 정량하였으며, 발현률은 UVA만을 처리한 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다.

Actin Primer

- sense : 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'
 antisense : 5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'

MMP-1 Primer

- sense : 5'-TGGGAGCAAACACATCTGA-3'
 antisense : 5'-ATCACTTCTCCCCGAATCGT-3'

2.7.3. Western Blot

Western blot 방법으로 MMP-1 단백질 발현을 확인하기 위해, UVA를 조사하여 24 h 배양한 세포의 배지를 모아 ultra-filter concentrator로 농축하여 western blot에 사용한다. 단백질 정량은 BCA (SIGMA, USA) 시약을 함께 제공된 메뉴얼 방법에 따라 정량하였으며, 정량된 total protein을 protein electrophoresis system (BIO-RAD, USA)을 이용하여 10 % acrylamide gel에 전기영동한 후 semi-dry 방법으로 PVDF membrane에 전기영동한 단백질을 transfer하였다. 단백질이 transfer된 membrane을 5 % skim milk로 blocking하고 anti-MMP-1 primary antibody로 반응시킨 후 anti-MMP-1을 인지하는 HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody를 처리하여 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL)와 반응시켜 X-ray 필름에 감광하여 결과를 얻은 후 image analysis system으로 결과를 정량하였다. 발현률은 UVA만을 처리한 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH 활성 억제 효능

Hatano 등의 방법을 이용하여 산겨울 에탄올 추출물과 각각의 분획물의 항산화도를 측정한 결과 에탄올 추출물(SC₅₀ = 4.97 µg/mL)과 EtOAc 분획물(SC₅₀ = 4.89 µg/mL)에서 대조군으로 사용된 ellagic acid (SC₅₀ = 2.54 µg/mL)와 비슷한 정도의 우수한 억제 활성을 보였다(Table 1).

Table 1. DPPH Assay of *Carex Humilis* Extract

	Concentration (µg/mL)	Activity (%)	SC ₅₀ (µg/mL)
EtOH Extract	1	10.90	
	5	50.12	4.97
	10	82.16	
Hexane layer	1	-2.88	
	5	7.77	ND
	10	8.99	
EtOAc layer	1	13.77	
	5	51.19	4.89
	10	80.67	
BuOH layer	1	11.05	
	5	51.98	4.75
	10	80.74	
Water layer	1	11.35	
	5	48.41	6.07
	10	78.61	
Ellagic Acid	1	34.68	
	5	81.34	2.54
	10	87.83	

3.2. 엘라스타제 활성 억제 효능

산겨울 에탄올 추출물과 각각의 분획물의 엘라스타제 활성 억제 효능을 평가한 결과, 에탄올 추출물과 EtOAc 분획물에서 IC₅₀이 각각 31.2 µg/mL, 23.5 µg/mL으로 나왔으며, 대조군으로 사용한 oleanolic acid는 11.85 µg/mL으로 나왔다. 이들은 엘라스타제 활성 억제 효과가 oleanolic acid보다는 낮지만 비교적 우수한 억제 효과를 가짐을 확인하였다(Table 2).

3.3. α-viniferin의 분리

산겨울 추출물을 제조하여 각각의 분획물의 항산화 효능과 엘라스타제 활성 억제 효능을 측정한 결과, EtOAc 분획물에서 강한 활성을 보였다. 강한 활성을 보이는 EtOAc 분획물을 HPLC를 통하여 대략적인 성분들을 확인하고 많은 양을 차지하는 피크를 선별하여 분리/정제하였다. 이렇게 얻어진 α-viniferin을 이후 MMP-1 mRNA 발현 및 단백질 생성 억제 실험에 사용하였다.

3.4. 사람 섬유아 세포 독성

산겨울 에탄올 추출물의 EtOAc 분획물이 항산화 및 엘라스타제 활성 억제 효과가 가장 우수하였기 때문에,

Table 2. Elastase Inhibitory Activity (%) of *Carex humilis* Extract

	Concentration (μg/mL)	Activity (%)	IC ₅₀ (μg/mL)
EtOH Extract	33.33	52.77	31.2
	66.67	69.84	
	100.00	76.95	
	133.33	77.07	
Hexane fraction	33.33	4.95	ND
	66.67	17.45	
	100.00	21.69	
	133.33	36.98	
EtOAc frat	33.33	64.66	23.5
	66.67	76.38	
	100.00	89.52	
	133.33	93.04	
BuOH layer	33.33	1.50	ND
	66.67	5.47	
	100.00	10.45	
	133.33	7.89	
Water layer	33.33	4.03	ND
	66.67	15.83	
	100.00	11.82	
	133.33	9.71	
Oleanolic Acid	3.33	7.31	11.85
	6.67	20.59	
	10.0	39.72	
	13.3	58.09	

EtOAc 분획물과 EtOAc 분획물의 지표물질인 α -viniferin에 대한 사람의 피부 세포에서의 항주름 효과를 조사하였다. 먼저 일련의 항주름 실험을 진행하기 위해, 사람 섬유아세포에서 EtOAc 분획물의 세포 독성 시험을 실시한 결과, 시험 농도인 100 μg/mL까지 독성이 없었으며, EtOAc 분획물의 지표물질인 α -viniferin도 시험 농도인 2.0 μg/mL까지 독성이 없음을 확인하였다(Figure 2).

3.5. MMP-1 발현 저해능

주름 관련 유전자인 MMP-1의 발현 및 생성에 대한 EtOAc 분획물 및 그의 지표물질인 α -viniferin의 영향을 평가하기 위해 사람 섬유아세포를 이용하여 RT-PCR과 Western blot을 실시하였다. MMP-1 발현 및 생성을 유도하기 위해 UVA 6J를 조사하였으며, EtOAc 분획물을 처리하여 배양한 결과, EtOAc 분획물은 UVA 대조군과

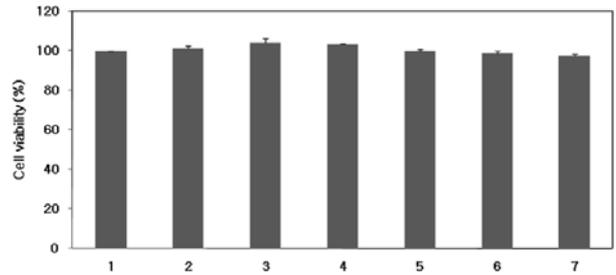


Figure 2. Cytotoxicity assay of *Carex humilis* extract and α -viniferin. The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of three experiments. The results were expressed as the mean \pm S.D. 1 : Control, 2 : EtOAc layer of *Carex humilis* extract 10 μg/mL, 3 : EtOAc layer of *Carex humilis* extract 50 μg/mL, 4 : EtOAc layer of *Carex humilis* extract 100 μg/mL, 5 : α -viniferin 0.5 μg/mL, 6 : α -viniferin 1 μg/mL, 7 : α -viniferin 2 μg/mL.

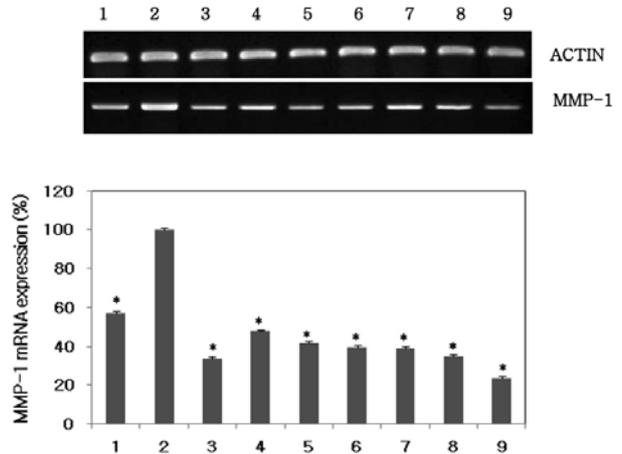


Figure 3. Effect of *Carex humilis* extract and α -viniferin on the expression of MMP-1 mRNA. The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of three experiments. The results were expressed as the mean \pm S.D. (* p < 0.05) 1 : Control, 2 : UVA (6J), 3 : EGCG 4.6 μg/mL, 4 : EtOAc layer of *Carex humilis* extract 10 μg/mL, 5 : EtOAc layer of *Carex humilis* extract 50 μg/mL, 6 : EtOAc layer of *Carex humilis* extract 100 μg/mL, 7 : α -viniferin 0.5 μg/mL, 8 : α -viniferin 1 μg/mL, 9 : α -viniferin 2 μg/mL.

비교하여 MMP-1 mRNA 발현과 단백질 발현을 유의성 있게 감소시켰다(Figures 3, 4). RT-PCR을 이용한 MMP-1 mRNA 발현 조사에서, EtOAc 분획물은 10 μg/mL에서부터 UVA 대조군의 발현량보다 약 50 % 이상 감소시켰으며, 100 μg/mL에서는 약 60 % 이상 감소시켰다. EtOAc 분획물의 지표물질인 α -viniferin 또한 0.5 μg/mL에서 약 60 % 이상 감소시켰으며, 2 μg/mL에서는 약 75 % 이상 감소시켰다. Western blot을 통한

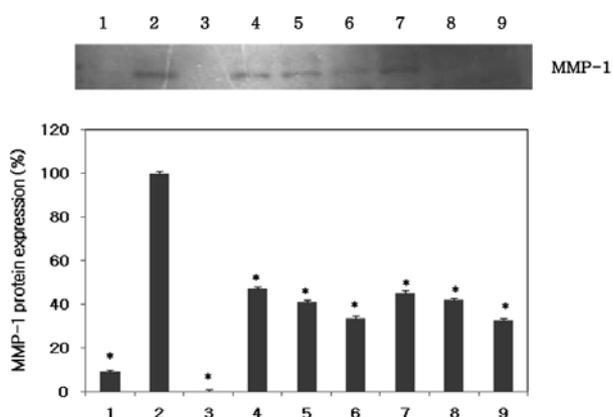


Figure 4. Effect of *Carex humilis* extract and α -viniferin on the production of MMP-1 protein. The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of three experiments. The results were expressed as the mean \pm S.D. (* $p < 0.05$) 1 : Control, 2 : UVA (6J), 3 : EGCG 4.6 $\mu\text{g/mL}$, 4 : EtOAc layer of *Carex humilis* extract 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 : EtOAc layer of *Carex humilis* extract 50 $\mu\text{g/mL}$, 6 : EtOAc layer of *Carex humilis* extract 100 $\mu\text{g/mL}$, 7 : α -viniferin 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 8 : α -viniferin 1 $\mu\text{g/mL}$, 9 : α -viniferin 2 $\mu\text{g/mL}$

MMP-1 단백질 생성량 조사 결과, RT-PCR 결과와 비슷한 양상을 보였으며, EtOAc 분획물은 10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 약 50 ~ 65 % 저해율을 보였고, α -viniferin은 0.5 ~ 2 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 약 55 ~ 65 % 저해율을 보였다.

4. 결 론

산겨울 추출물의 항주름 활성을 연구하기 위하여 항산화, 엘라스타제 활성 억제, MMP-1 mRNA 발현 및 단백질의 생성 억제 관련 실험을 진행하였다. 산겨울 뿌리 95 % 에탄올 추출물과 용매 극성을 변화시키며 추출한 유기용매 분획물을 항산화 활성과 엘라스타제 억제 효능을 측정된 결과, EtOAc 분획물이 가장 활성이 뛰어남($SC_{50} = 4.89 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50} = 23.5 \mu\text{g/mL}$)을 확인하고, 활성 성분 규명을 위하여 활성에 따른 분획을 추적하여 단일 물질을 분리하고, 분광학적 분석법을 통하여 α -viniferin임을 확인하였다. EtOAc 분획층과 α -viniferin의 MMP-1 mRNA 발현 및 단백질 생성을 평가한 결과, EtOAc 분획층은 10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 각각 약 50 ~ 60 %, 50 ~ 65 % 저해 효과를, α -viniferin은 0.5 ~ 2 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 각각 약 60 ~ 75 %, 55 ~ 65 % 저해 효과를 보였다. 결론적으로, α -viniferin을 함유한 산겨울의 EtOAc 분획층의 주름 개선용 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인하였으며, 추후 제형을 통한 임상시험 결과

를 진행한다면 기능성 화장품 신소재로 개발할 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2005년 보건복지가족부의 보건 의료기술 진흥사업 “기능성 화장품 신소재 개발센터(과제번호 2005-A050432)”의 일환으로 이루어진 것으로, 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. T. Peter, Physiology Of The Skin, Allured Publishing Corporation, Pugliese, MD, **1**, 61, (2001).
2. D. R. Keene, L. Y. Sakai, G. P. Lunstrum, N. P. Morris, and R. E. Burgeson, Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils, *J. Cell Biol.*, **104**, 611 (1987).
3. K. Takeda, S. Harada, and M. Ando, Funtional Cosmetology, society of cosmetic chemists of Japan, Yakuji Nippo Ltd, **1**, 163 (2004).
4. K. Fraizer, S. Williams, D. Kothapal, H. Klapper, and G. R. Grotendorst, Stimulation of fibroblast cell-growth, matrix production, and granulation-tissue formation by connective-tissue growth-factor, *Journal of Investigative Dermatology*, **107**(3), 404 (1996).
5. P. Brenneisen and J. S. Oh, et. al., Ultraviolet B Wavelength Dependence for the Regulation of Two Major Matrix-Metalloproteinases and Their Inhibitor TIMP-1 in Human Dermal Fibroblasts, *Photochemistry & Photobiology*, **64**(5), 877 (1996).
6. 이영노, 한국식물도감, 교학사, **1**, 1086 (1998).
7. S. H Lee, N. H. Shin, and S. H. Kang, α -Viniferin: A Prostaglandin H2 Synthase Inhibitor from Root of *Carex humilis*, *Planta Med.*, **64**(3), 204 (1998).
8. E. Y. Chung, B. H. Kim, and M. K. Lee, Anti-inflammatory effect of the oligometric stilbene alpha-viniferin and its mode of the action though inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase, *Planta. Med.*, **69**(8), 710 (2003).
9. R. J. Pryce and P. Langcake, α -viniferin: an anti-fungal resveratrol trimer from grapevines, *Physiological Plant Pathology*, **18**(2), 213 (1981).

10. S. Kitanaka, T. Ikezawa, and K. Yasukawa, (+)- α -Viniferin, an anti-inflammatory compound from *Caragana chamlagu* root, *Chem. Pharm. Bull.* **38**(2), 432 (1990).
11. S. A. Chowdhury, K. Kishino, R. Satoh, K. Hashimoto, and H. Kikuchi, Tumor-specificity and apoptosis-inducing activity of stilben and flavonoids, *Anticancer Research*, **25**(3B), 2055 (2005).
12. B. H. Malgorzata, L. Magdalena, M. Lucyna, and W. Anna, Resveratrol oligomer are potent MRP1 transport inhibitors, *Anticancer Research*, **26**(3A), 2081 (2006).
13. H. H. Euis and D. J. Lia, Cytotoxic resveratrol oligomers from the tree bark of *Dipterocarpus haseltii*, *Fitoterapia* **77**, 550 (2006).
14. S. H. Sung, S. Y. Kang, and K. Y. Lee, (+)- α -Viniferin, a stilbene Trimer from *Caragana Chamlague*, inhibits acetylcholinesterase, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**(1), 125 (2002).
15. S. Kitanaka, T. Ikezawa, K. Yasukawa, S. Yamanouchi, M. Takindon, H. K. Sung, and I. H. Kim, (+) α -Viniferin, an Anti-inflammatory Compound from *Caragana Chamlagu* Root, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 432 (1990).
16. S. H. Sung, S. Y. Kang, K. Y. Lee, M. J. Park, and J. H. Kim, (+)- α -Viniferin, a Stilbene Trimer from *Caragana chamlague*, Inhibits Acetylcholinesterase, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**(1), 125 (2002).
17. J. S. Choi, Screening on radical scavenging activity of marine microalgae, *Kor. J. Pharmacogn.*, **21**(2), 252 (2000).
18. A. A. Van de Loosdrecht, E. Nennie, G. J. Ossenkoppele, R. H. Beelen, and M. M. Langenhuisen, Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J. Immunol Methods*, **141**(1), 15 (1991).