

양마에서 분리한 Kaempferol과 그 배당체의 항균 및 주름억제 효과

이근하* · 공혜진* · 조영룡* · 주철규* · 권순상* · 황재성** · 박청*†

*주 모아캠 기술연구소, **경희대학교 피부생명공학센터

Anti-Microbial and Anti-Wrinkle Effect of Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides isolated from *Hibiscus cannabinus* L.

Keun Ha Lee*, Hae Jin Kong*, Young Long Cho*, Chul Gue Joo*, Sun Sang Kwon*,
Jae Sung Hwang** and Chung Park*†

*R&D Center, Morechem Co., Ltd., Pyongtaek 450-818, Korea.

**Kyung Hee University, Skin Biotechnology Center, Suwon 443-766, Korea.

ABSTRACT : In this study, kaempferol and its rhamnosides (α -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin) were isolated electively by bioconversion technology from *Hibiscus cannabinus* L. leaves to evaluate the anti-wrinkles effects and anti-microbial effects. In order to evaluate anti-wrinkles activity, reduction of expression matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) protein and proliferation/pro-collagen production were investigated. Kaempferol and α -rhamnoisorobin showed inhibition activity of MMP-1 generated to compared to positive control. In HaCaT cell proliferation assay, kaempferol and α -rhamnoisorobin significantly promoted cell proliferation in a concentration-dependent manner. In addition, procollagen synthesis assays (by HDF-N cell) showd that TGF- β induced procollagen production and also, all four kinds of experimental significantly promoted procollagen synthesis in a concentration-dependent manner. Kaempferol and α -rhamnoisorobin exhibited strong antimicrobial activities on five of microbes, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*.

Key Words : Anti-Microbial, Anti-Wrinkles, Kaempferol, Kaempferol Rhamnosides

서 언

양마 (*Hibiscus cannabinus* L.)는 아욱목 아욱과에 속하는 쌍떡잎 식물로 상업적으로는 밭줄, 마대감으로 목질부가 많이 이용되며 인도, 아프리카에서 자생하는 한해살이풀이다. 잎에는 많은 양의 플라보노이드 (flavonoid)계의 물질이 존재하며 그 중 캠페리트린 이라고 명명되는 플라보노이드는 약 5~10%가 잎에 다량으로 존재하고 있다. 캠페리트린의 생리활성작용에 대해서는 우수한 항산화 활성 (Jin *et al.*, 2009), 항염효과 (Boller *et al.*, 2009; De Melo *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2005; Regasini *et al.*, 2008;), 항당뇨효과 (Jorge *et al.*, 2004; Tzeng *et al.*, 2009; Vishnu Prasad *et al.*, 2009) 등이 연구, 보고되어 있다.

플라보노이드는 항바이러스 작용, 항산화 작용, 항염작용 외에도 암 발생을 낮추며 다양한 질병의 발생을 예방하는 것으로 알려져 있으며 (Tapiero *et al.*, 2002) 수용성, 지용성 또는 그 중간극성 등 다양한 용해성을 나타내기 때문에 인체에 섭

취될 경우 세포의 여러 부분에서 기능을 발휘한다는 것이 임상학적으로 많이 증명되고 있으며 (Ross *et al.*, 1998; Rothwell *et al.*, 2005) 한 개의 작용기 변화만으로도 전체 분자구조 변형을 유도하여 더 우수한 효능을 기대할 수 있는 특성을 갖고 있다 (Navarro-Nunez *et al.*, 2009). 이러한 이유로 플라보노이드의 구조에 따른 생물학적인 활성관계에 관한 연구는 점차적으로 증가 추세에 있으며, 많은 임상학적인 실험을 통한 체내 활성기전의 연구 필요성이 대두되고 있다 (O'Leary *et al.*, 2001).

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 활성 중심부에 아연을 갖는 금속 단백질 분해효소로써 현재까지 약 20여종 이상의 종류가 있는 것으로 알려져 있다 (Arakaki *et al.*, 2009). 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서 1O_2 을 비롯한 ROS가 MMPs의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 1O_2 이 매개할 수 있다는 보고

†Corresponding author: (Phone) +82-31-658-7822 (E-mail) pc@morechem.net

Received 2012 September 12 / 1st Revised 2012 October 29 / Accepted 2012 November 26

도 있다 (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1993; Tyrrell and Pidoux, 1989; Vile and Tyrrell, 1995; Wlaschek *et al.*, 1995). 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발 하는데 있어서 $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사하는 것이다. $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 광노화에 포함되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소 (Oikarinen and Kallioinen, 1985; Oikarinen *et al.*, 1989)는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다 (Choi *et al.*, 2006).

또한 피부노화 중 주름생성은 나이의 증가와 환경적 요인 외에 근육의 분포와 움직임, 유전적인 요인, estrogen 등의 호르몬에 의해 영향을 받으며, 궁극적으로는 진피 내의 기질 단백질이 결핍되어 주름이 발생한다. 피부의 기질 단백질은 피부에 강도와 장력을 주는 콜라겐이 90% 이상 함유되어 있는데 type I collagen이 대부분이고 type III collagen이 소량 포함되어 있으며 피부에 탄력을 주는 탄력섬유가 3~4% 정도 함유되어 있다. 콜라겐은 섬유아세포와 작용에 의해 합성되며 콜라겐 분해효소의 작용에 의해 분해되므로 세포의 기질 단백질의 결핍을 막아서 피부 주름을 예방하기 위해서는 교원질 합성을 증가시키고 교원질 분해효소의 작용을 억제시키는 것이 필요하다 (Zurick *et al.*, 2012). 이처럼 피부노화에 대한 연구는 콜라겐의 양과 콜라겐을 분해하는 효소 (Matrix metalloproteinases; MMPs)의 생합성을 억제하거나 활성을 저해하는 방식 혹은 항산화, 항노화 물질을 이용하여 피부 세포를 보호하려는 노력이 이루어지고 있다 (Neena *et al.*, 2011).

천연물질이 가지고 있는 생리활성 물질은 항균, 항암, 강장 작용 등의 기능이 있는 것으로 알려져 있으며 오늘날에도 의약품의 원료로 많이 이용되고 있다. 또한 합성제의 안정성 및 내성으로 천연물질을 이용한 항균제의 개발 요구가 더욱 거세지고 있는 실정이다. 따라서 천연항균 물질을 개발하고자 다양한 식물체로부터 항균물질을 탐색하고 분리하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 여러 대상 식물로부터 천연물질을 추출하여 항균활성 검증에 관한 연구가 진행되고 있다 (Im and Lee, 2011; Seo *et al.*, 2010).

따라서 본 연구에서는 양마에서 분리한 flavonoid계의 일종인 kaempferol과 그 배당체인 α -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin의 parameter를 중심으로 항주름 및 항균 연구를 수행함으로써 kaempferol과 그들의 rhamnoside 구조에 따른 생리활성의 상관관계 분석을 통해 기능성 식품, 의약품, 화장품 소재로의 응용가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에 사용된 양마 (*Hibiscus cannabinus* L.)는 전라북도 부안

군에서 2010년 4월에 파종하여 2010년 7월에 (120일) 수확하였으며, 실온에서 2주간 음건하고 세절하여 실험재료로 사용하였다.

2. 시약 및 기기

실험에 사용한 세포주인 HaCaT cell (Human Keratinocyte, HaCaT)과 HDF-N cell은 ATCC (USA)에서 구입하였으며, 흡광도 측정용은 TECAN (Infinite M200, Switzerland)사의 제품을 사용하였으며 TARC 양을 측정하기 위해 Human TARC Immunoassay kit (R&D System, DDN00, USA)를 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지 및 시약은 Welgene (Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 분석을 위해 사용된 FT-IR은 Bio-Rad (FTS, USA)사의 제품을 NMR은 Varian (Mercury 400 Mhz, CP-MAS, USA)사의 제품을 사용하였다.

3. 추출 및 분리

음건하고 세절된 양마잎을 70% EtOH에 1일간 침적시키고 추출된 여액을 감압, 농축하여 건조된 에탄올 추출물을 얻었다. 이후 용매 분획을 통해 비극성 성분을 제거하고 재결정법을 이용하여 고순도의 kaempferitrin (kaempferol-3,7-O- α -dirhamnoside)을 분리하였으며, 이 후 효소 또는 미생물을 이용한 가수분해를 통한 선택적인 분리 공정을 거쳐 지표수준의 고순도 α -rhamnoisorobin (kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside), afzelin (kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside) 및 kaempferol (4', 5, 7-trihydroxyflavonol)을 분리하였다. 상기의 방법으로 분리된 kaempferitrin은 HPLC, ESI-MS, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 기기분석을 통한 정성분석으로 화학적 구조를 밝혔다. 이후 가수분해를 통해 얻어진 3가지 화합물은 HPLC를 통해 표준물질과 비교하여 정성분석하였다. (Lee *et al.*, 2011)

Kaempferitrin (4); Pale yellow powder; ESI-MS m/z : 578 $[\text{M}]^+$; UV λ max: 265, 350 (MeOH); IR_{max} : KBr cm^{-1} 3369 (OH), 2984 (CH_3), 1657 (C=O), 1603, 1493 (C=C), 1449 (cycloalkane), 1179 (phenol); $^1\text{H-NMR}$ (400 Mhz, MeOH- d_4) d 7.77(2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.93(2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.69(1H, d, $J=2$ Hz, H-8), 6.43 (1H, d, $J=2$ Hz, H-6), 5.84(1H, d, H-1"), 5.39 (1H, d, H-1"), 1.27 (3H, d, H-6"), 0.94 (3H, d, H-6"); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 Mhz, MeOH- d_4) d 179.7 (C-4), 163.5 (C-7), 162.9 (C-5), 161.7 (C-4'), 159.7 (C-2), 158.0 (C-9), 136.4 (C-3), 132.0 (C-2'), 132.0 (C-6'), 122.3 (C-1'), 116.5 (C-3'), 116.5 (C-5'), 107.5 (C-10), 103.5 (C-1"), 101.4 (C-1"), 99.8 (C-6), 95.6 (C-8), 73.6 (C-4"), 73.1 (C-4"), 72.1 (C-2"), 72.0 (C-2"), 71.9 (C-3"), 71.9 (C-3"), 71.7 (C-5"), 71.3 (C-5"), 18.1 (C-6"), 17.7 (C-6").

양미에서 분리한 kaempferol과 그 배당체의 항균 및 주름억제 효과

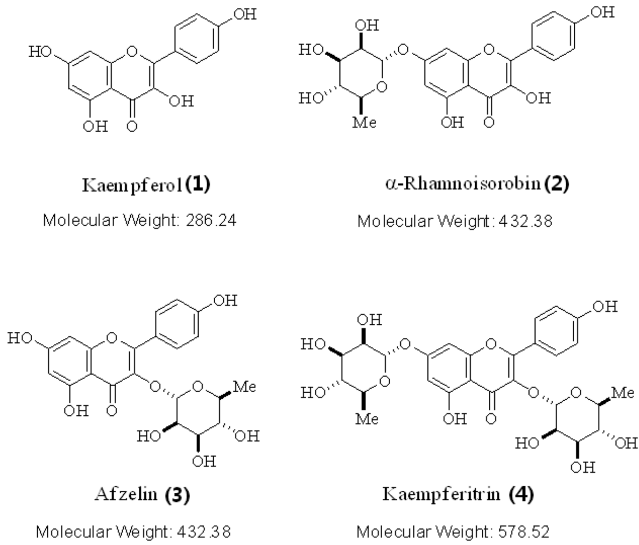


Fig. 1. Structure and molecular weight of kaempferol and its rhamnosides (α-rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin).

4. 세포주 및 배양

세포주는 시험항목에 따라 알맞게 선별하여 사용하였다. 항염증 실험에서 사용한 세포주는 human 각질세포인 HaCaT cell (Human Keratinocyte, HaCaT)이며, 배양접시 바닥에 접종한 후 페니실린 (100 IU/ml), 스트렙토마이신 (100 µg/ml), 10% FBS를 함유하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)를 넣고 37°C를 유지하며 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양하였다.

5. 검액의 조제

본 연구에서 사용되는 검액은 kaempferol (1), α-rhamnoisorobin (2), afzelin (3), kaempferitrin (4)이며 이들의 구조식 및 분자량은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 각 시료는 DMSO에 용해시켰으며 실험 시 농도는 WST-1 assay를 통하여 예비실험을 진행한 후 세포독성을 나타내지 않는 농도를 선택하였다. 실험 물질은 시험 항목에 맞는 세포주에 따라 세포 배양 배지에 희석하여 사용하였으며, 예비시험 후, 효력을 나타내는 농도를 찾아 3개를 선정 항염증 효능을 확인하였다. 각 실험의 양성 대조군 역시 세포주에 따른 세포 배양 배지로 희석하여 처리하였다.

6. 세포독성평가

검액의 독성을 확인하기 위해, HaCaT cell과 HDF-N cell에서의 세포독성을 측정하였다. HaCaT cell은 96 well plate에 well 당 5 × 10⁴ cell의 농도로, HDF-N cell은 96 well plate에 well 당 6 × 10³ cell의 농도로 분주한 다음 세포 배양 조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤, 12시간의 기아상태를 유지시킨 후 검액 및 새로운 배

지(media supplement 제외)를 넣고, 24시간 배양하였다. 또 검액 및 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 세포의 생존율을 측정하기 위해 WST-1 반응액을 supplement가 제외된 배지에 1/10로 희석하고 이를 각 well당 100 µl씩 처리하여 1시간 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 세포증식능평가

검액의 세포 증식능을 확인하기 위해, HaCaT cell과 HDF-N cell에서의 세포증식능을 측정하였다.

HaCaT cell은 96 well plate에 well 당 2 × 10³개의 농도로, HDF-N cell은 96 well plate에 well 당 1 × 10³개 농도로 분주한 다음 세포 배양조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤, 12시간의 기아상태를 유지시킨 후 검액 및 새로운 배지 (media supplement 제외)를 넣고, 48시간동안 배양하였다. 또 검액 및 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 세포의 생존율을 측정하기 위해 1 mg/ml의 MTT용액을 각 well 당 50 µl씩 처리하여 2시간동안 반응시킨 후, DMSO로 용해시켜서 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. Procollagen 합성능 시험

검액의 procollagen 합성능을 평가하기 위해 HDF-N cell을 48 well plate에 1.4 × 10⁴ cells/well로 분주하고 세포배양 조건에서 24시간 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고, 24시간 세포의 기아상태를 유지하며 이 후 시험 물질을 세포 배양 배지인 FBM (media supplement 제외)에 희석하여 농도별로 세포에 처리한 후 24시간 배양하였다. 양성대조군은 TGF-β를 사용하였으며, 농도는 10 ng/ml로 처리하였다 24시간후에 배양된 세포의 배지를 수거하여 procollagen type I c-peptide (PIP) EIA kit (TAKARA, MK101)를 사용하여 procollagen 양을 측정하였다. 한편, 바닥에 부착되어 있는 세포는 PBS로 세척한 후, 1N NaOH로 lysis 시켜 총 단백질 양을 측정하여 일정 단백질 당 procollagen 합성 양을 구하였다. 각각의 Procollagen 양과 단백질 양은 검량선에 따라 계산하였다.

9. Collagenase inhibition assay (MMP-1 inhibition assay)

본 시험을 통해 시험물질이 섬유아세포 내 콜라게나제 생성 억제 정도를 공시료액과 비교하고자 하였다. HDF-N cell을 24 well plate에 1 × 10⁴ cells/well 농도로 분주한 다음 세포 배양 조건에서 24시간 배양하였다. 24시간 이후 배지를 버리고 DPBS로 세척한 다음, DPBS 200 µl를 첨가하여 UV-A 5 J/cm²를 조사하였다. 시료를 적당한 농도로 배지에 희석한 후 세포에 처리하여 세포 배양 조건에서 48시간 배양하였다.

양성대조군은 retinoic acid를 사용하였으며, 농도는 10 µM로 처리하였다. 배양액을 취하여 Human total MMP-1 ELISA

kit (R&D system, DY901, USA)을 사용하여 콜라게나제 양을 측정하였다. 측정된 콜라게나제 양은 총 단백질 양으로 보정하였다.

10. 항균활성 측정 (Paper disc diffusion)

본 실험에서 항균활성을 측정하기 위해 시료의 최종 농도는 0.01%가 되게 하여 실험을 수행하였다. 시험 방법으로 원형여과지법 (paper disc method)을 이용하였으며, 사용한 균주로는 그람양성균으로 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538P), 그람음성균으로 대장균 (*Escherichia coli*, ATCC 8739), 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027), 효모로는 캔디다 효모 (*Candida albicans*, ATCC 10231), 사상균으로 흑국균 (*Aspergillus niger*, ATCC22343)을 사용하였다.

배양한 각각의 균주를 응고된 평판 배지 위에 약 100 μ l를 가하여 평판배지에 분주하고 스프레더 (spreader)를 이용하여 균일하게 도말 하였다. 측정하고자 하는 각 추출물을 지름이 10 mm인 페이퍼디스크 (paper disc)에 약 60 μ l를 흡수시킨 후 용매를 건조시키고 균주가 도말된 배지 표면에 밀착시켜 25~35°C조건의 배양기에서 48시간 이상 배양 후 페이퍼디스크 주변에 형성된 투명환 (clear zone)의 크기를 측정하여 항균효과를 확인하였다.

11. 미생물 성장 최소저해농도 측정 (minimum inhibitory concentration: MIC)

상기 추출물들의 항균 효과를 측정하기 위하여 최소 저해농도 (Minimum Inhibition Concentration, MIC)를 측정하여 항균활성을 조사하였다. 항균 효과를 측정하기 위하여 사용한 균주로는 그람양성균으로 포도상구균 (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P), 그람음성균으로 대장균 (*Escherichia coli* ATCC 8739), 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), 효모로는 캔디다 효모 (*Candida albicans* ATCC 10231), 사상균으로 흑국균 (*Aspergillus niger* ATCC22343)을 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC, Korea)로부터 분양받아 사용하였다.

각각의 균주는 영양배지 (Nutrient Broth) 용액을 제조하여 121°C에서 15분간 멸균한 후 각각의 배양된 균주 1 백급이를 영양배지 용액 (10 ml)에 접종하고, 진탕배양기 (shaking incubator)에서 24시간 배양하여 항균실험을 위한 균주를 준비하였다.

미생물 균주의 성장을 억제하는 항생물질의 최소억제농도를 측정하기 위해, 멸균된 배지에 배양된 균주를 세균은 1×10^6 cfu/ml, 진균은 1×10^5 cfu/ml이 되도록 각각을 접종하여 세균의 경우 35°C에서 2일간 배양하고, 진균류의 경우 25°C에서 5일간 배양하여 이를 대조군으로 하여 관찰하였다.

한편, 각각의 시료는 0.01 내지 1 중량%가 되도록 배지에 첨가하여 제조한 후 제균하여 대조군과 마찬가지로 세균은

1×10^6 cfu/ml, 진균은 1×10^5 cfu/ml이 되게 각각 접종하여 세균의 경우 35°C에서 2일간 배양하고, 진균류의 경우 25°C에서 5일간 배양하여 이를 실험군으로 하여 관찰하였다.

배양이 끝난 대조군과 실험군의 배지 용액에 대해서 각 균주의 증식 유무를 확인하기 위하여 무균공간에서 시료를 약 300 μ l씩 취하여 멸균된 96 well microplate에 분주하고 분광광도계 (spectrophotometer)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하여 미생물의 증식을 확인하였고 대조군과 비교하여 각각의 균주에 대하여 낮은 증식도를 보인 최소 농도를 측정하여 이를 최소저해농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)로 하였다.

12. 통계분석

모든 자료는 mean \pm SD로 나타내었고, 통계처리는 Student's t-test를 사용하였으며 P < 0.005의 유의확률과 양측검정을 사용하였다.

결 과

1. 세포독성 평가

시료 4종에 대한 *in vitro* 세포독성은 HaCaT cell과 HDF-N cell에서 수행하였으며, 세포의 미토콘드리아 활성에 의존하여, 세포의 생존을 결정할 수 있는 WST-1 반응액에 의해 측정되었다. 세포 생존율은 시료를 제외한 배양배지만 처리한 값 (control)에 대한 백분율로 나타내었다. 그 결과, HaCaT cell에 대한 시료 독성은 4종 시료 모두 100 μ M 농도까지 90.0% 이상의 생존율을 보였다. 또한, HDF-N cell에 대한 세포독성은 4종 시료 모두 100 μ M 농도까지 80.0% 이상의 생존율을 보여 세포독성을 나타내지 않았다. 그러므로 추후 실험에 사용할 시료의 최고 농도는 4종 시료 모두 100 μ M 농도로 선택하였다.

2. 세포증식능 평가

시료 4종의 세포증식능을 알아보기 위해 앞서 진행한 세포독성시험을 통해 독성을 보이지 않는 농도를 설정하여 HaCaT cell과 HDF-N cell에서의 증식능을 평가하였다. 세포증식능 평가는 MTT 시약 1 mg/ml을 처리한 후 DMSO에 용해시켜 570 nm에서 측정하였다.

그 결과, 대조군과 대비하여 4종의 시료는 Fig. 2와 같이 HDF-N cell의 증식을 촉진시키지 않은 것으로 보였다. 그러나 HaCaT cell에서 4종의 시료를 처리한 후 MTT로 세포증식능을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 1번 시료와 2번 시료는 농도 의존적으로 HaCaT cell의 증식을 촉진시켰다. 즉, 1번 시료를 10, 50, 100 μ M 처리하였더니 각각 93.4%, 95.7%, 128.6%로 증가하였으며, 2번 시료를 10, 50, 100 μ M 처리한 결과

양미에서 분리한 kaempferol과 그 배당체의 항균 및 주름억제 효과

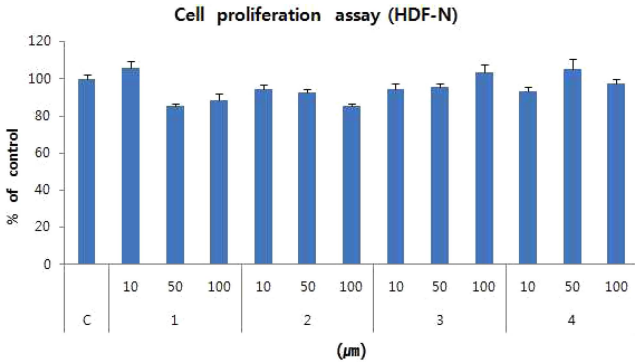


Fig. 2. Cell proliferation of kaempferol and its rhamnosides on HDF-N cell. 1: kaempferol, 2: α-rhamnoisorbin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin.

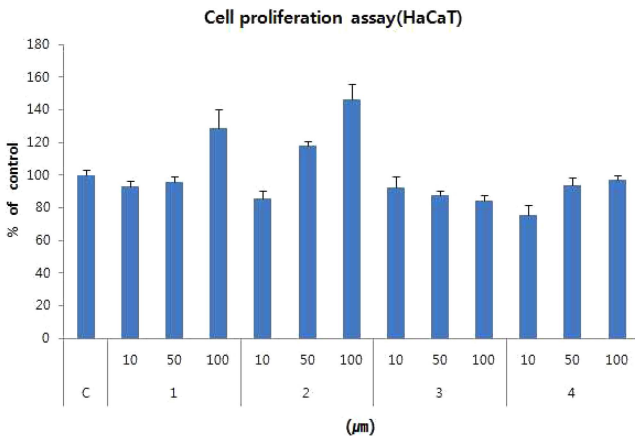


Fig. 3. Cell proliferation of kaempferol and its rhamnosides on HaCaT cell. 1: kaempferol, 2: α-rhamnoisorbin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin. (**P<0.005).

각각 85.4%, 118.3%, 146.6%로 증가함을 확인하였다. 이에 4종의 시료는 HDF-N cell의 증식에는 관여하지 않으나 시료 1번과 2번은 HaCaT cell의 증식에 관여하는 것으로 판단된다.

3. Procollagen 합성능 시험

시료의 procollagen 합성능을 알아보기 위해 앞서 진행한 세포 독성시험을 통해 독성을 보이지 않는 농도를 설정하여 평가하였다. Procollagen 양은 총 단백질 양으로 보정하여 계산하였다.

그 결과, 양성대조군으로 사용한 TGF-β는 10 ng/ml을 처리하였을 경우 대조군에 비해 procollagen 합성이 189.5% 증가함을 통해 HDF-N 세포는 TGF-β에 의해서 procollagen 생합성이 촉진됨을 알 수 있었다.

한편, 시료를 0.1, 1, 10 μM 처리한 후 procollagen 합성능을 평가한 결과 1번 시료는 Fig. 4와 같이 대조군에 비하여 각각 150.8%, 131.0%, 124.8% 증가하였다. 2번 시료는 대조군에 비하여 각각 182.9%, 126.6%, 148.4% 증가하였으며, 4번 시료 역시 대조군에 비하여 각각 155.9%, 133.2%, 134.9% 증

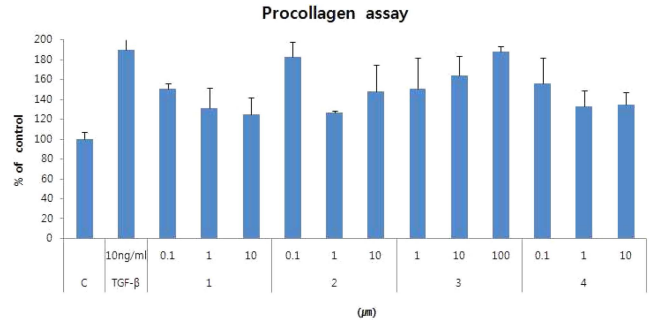


Fig. 4. Procollagen synthesis assay of kaempferol and its rhamnosides on HDF-N cell using procollagen type I c-peptide EIA kit. 1: kaempferol, 2: α-rhamnoisorbin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin. (*P<0.05, **P<0.005, ***P<0.0005).

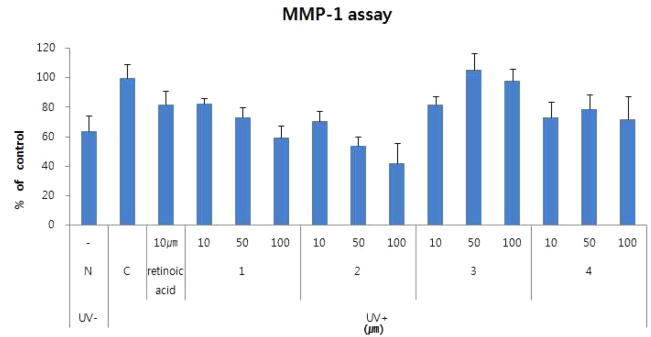


Fig. 5. Collagenase inhibition assay of kaempferol and its rhamnosides on HDF-N cell at 24 h after irradiated with 5 mJ/cm² UVA using human total MMP-1 ELISA kit. 1: kaempferol, 2: α-rhamnoisorbin, 3: afzelin, 4: kaempferitrin. (*P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0005).

가하였다. 또한 3번 시료를 1, 10, 100 μM 처리한 결과 procollagen 합성능이 대조군에 비하여 각각 151.1%, 163.7%, 188.5% 증가하여 통계적으로 유의한 결과를 나타내었다.

4. Collagenase inhibition assay (MMP-1 inhibition assay)

자연노화 및 광노화로 인하여 주름이 생성되는 여러 기전 중에 본 시험은 콜라겐 분해효소인 MMP-1 (Matrix metalloproteinases)의 활성 정도를 immuno ELISA assay를 이용하여 측정함으로써 시료의 주름개선효능을 평가하고자 하였다.

HDF-N cell에 4종의 시료를 10, 50, 100 μM 농도로 처리한 후 Human total MMP-1 ELISA kit (R&D system, DY901)로 측정된 결과 Fig. 5와 같이 1번 시료의 경우 대조군과 대비하여 각각 81.6%, 73.1%, 59.4%로 감소하였으며, 2번 시료의 경우 역시 대조군과 대비하여 각각 70.4%, 53.5%, 41.9%로 감소하였다. 시료 3번은 농도와 상관없이 통계적으로 유의한 감소결과를 나타내지 못하였으며, 시료 4번은 10 μM와 100 μM로 처리하였을 경우에 각각 73.1%, 71.5%로 통계적인 유의차를 보였다. 따라서 시료 1번과 2번에서 농도 의존적으로 UV-A에 의해 유도되어지는 MMP-1이 감소하는 경향

Table 1. Antimicrobial activity of kaempferol and its rhamnosides by paper disc method.

Microorganisms	Diameter of clear zone (mm)			
	Flavonoids (10 mg/disc)*			
	1	2	3	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	14.5	13.6	11.4	-
<i>Escherichia coli</i>	12.5	11.0	8.5	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.0	10.5	-	-
<i>Candida albicans</i>	9.5	9.0	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	9.5	9.0	-	-

*1; kaempferol, 2; a-rhamnoisorobin, 3; afzelin, 4; kaempferitrin.

Table 2. Antimicrobial activity of kaempferol and its rhamnosides by MIC test.

Microorganisms	Minimum inhibition concentration			
	Flavonoids (mg/ml)*			
	1	2	3	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	7.5	20	-
<i>Escherichia coli</i>	5	7.5	20	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.5	10	-	-
<i>Candida albicans</i>	15	15	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	15	15	-	-

*1; kaempferol, 2; a-rhamnoisorobin, 3; afzelin, 4; kaempferitrin.

을 확인하였다. 또한, 본 시험에서 사용된 양성 대조균인 retinoic acid는 대조군과 대비하여 81.6%로 감소하였다.

5. 항균활성 측정 (Paper disc diffusion)

5개의 균주를 응고된 평판 배지 위에 약 100 μ l를 가하여 평판배지에 분주하고, 측정하고자 하는 각 추출물을 페이퍼디스크 (paper disc)에 처리하여 disc 주변에 형성된 투명환 (clear zone)의 크기를 측정한 결과 Table. 1에서와 같이 kaempferol (1)이 *S. aureus*에서 14.5 mm의 가장 큰 clear zone이 관찰되었으며 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* 순이었다. 그 다음으로 a-rhamnoisorobin (2)에서 kaempferol (1)과 같은 균종 순으로 항균력을 나타내었으며, afzelin (3)은 yeast와 fungi 종류인 *C. albicans*, *A. niger*에서는 항균력을 나타내지 않았고, Kaempferitrin (4)는 모든 균종에서 항균활성을 나타내지 않았다.

6. 미생물 생장 최소화해농도 측정 (minimum inhibitory concentration: MIC)

Kaempferol 과 그 배당체의 사용균주에 따른 항균활성 결과는 Table 2와 같다. Kaempferol의 경우 그람 양성균인 *S. aureus*과 그람 음성균인 *E. coli*에 대하여 5 mg/ml의 농도에서 우수한 항균활성을 나타내었으나 그람 양성균인 *P. aeruginosa*에 대해서는 상대적으로 약한 항균활성을 나타냈으며, 효모인

*C. albicans*와 fungi류인 *A. niger*에 대해서는 상대적으로 약한 농도인 15 mg/ml에서 항균활성을 나타내었다. α -rhamnoisorobin (2)는 kaempferol (1)과 같은 양상의 항균 효과를 보였으나 약 50% 높은 농도에서 항균효과를 나타내 kaempferol (1)에 비하여 효과가 50% 반감하는 것으로 나타났다. Afzelin (3)은 그람 양성균인 *S. aureus*와 그람 음성균인 *E. coli*에 대하여 20 mg/ml의 농도에서 항균활성을 나타내었으나 그람 양성균인 *P. aeruginosa*와 효모인 *C. albicans*, fungi류인 *A. niger*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다. 또한 kaempferitrin (4)는 전 균종에서 활성을 나타내지 않았다.

고찰

본 연구에서는 양마로부터 분리한 플라보노이드 종류인 시료 4종 (kaempferol, α -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin)을 대상으로 항염증 효능을 평가함으로써 kaempferol과 그들의 rhamnoside의 구조적 활성 상관관계를 조사하였다. 그 결과 4종의 시료는 최고 농도 100 μ M까지 HaCaT cell과 HDF-N cell에서 80% 이상의 세포 생존률을 보여 세포 독성은 없는 것으로 판단되었다.

또한 주름개선 효능 실험으로는 procollagen 생합성 실험과 MMP-1 억제실험을 진행한 결과 procollagen 생합성 실험에서는 시료 4종 모두 유의적으로 생합성을 촉진시켰으므로써 주름 개선에 효능을 보였으며 MMP-1 억제 실험에서는 kaempferol (1)과 α -rhamnoisorobin (2)가 농도 의존적으로 MMP-1 활성을 억제시켰으므로써 주름 개선이 효능이 있는 것으로 판단되었다. 또한 항균 실험에서는 kaempferol (1)과 α -rhamnoisorobin (2)은 그람 양성균인 *S. aureus*과 그람 음성균인 *E. coli*에 대하여 우수한 항균활성을 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼때 시료 4종 중 kaempferol (1)과 α -rhamnoisorobin (2)은 주름개선 및 항균에 우수한 것으로 사료되며 이는 4개 물질의 구조식과 대비하여 비교해 볼 때 본 연구에서 효능을 나타내었던 kaempferol (1)과 α -rhamnoisorobin (2)의 구조식에서 3번 위치에서 hydroxyl 작용기를 갖고 있었으나, 비교적 우수한 효능을 보이지 않았던 afzelin (3)과 kaempferitrin (4)은 3번 위치에서 hydroxyl 작용기를 가지고 있지 않음을 통해 3'-hydroxyl기는 주름개선 및 항균과 관련된 활성을 나타내는데 중요한 작용을 하는 것으로 사료된다 (Zuo et al., 2006).

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원(KHIDI)에서 시행한 “2011년 글로벌코스메틱연구개발사업(과제단위번호: 45)”의 지원에 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Arakaki PA, Marques MR and Santos MC.** (2009). MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. *Journal of Biosciences*. 34:313-320.
- Boller S, Soldi C, Marques MC, Santos EP, Cabrini DA, Pizzolatti MG, Zampronio AR and Otuki MF.** (2009). Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 130:262-266.
- Choi JW, Kim SI, Kim JY, Yang HJ, Lee KH and Park SN.** (2006). Antioxidative and cellular protective effects of Jeju native plant extracts against reactive oxygen species (I). *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 32:181-191.
- De Melo GO, Malvar Ddo C, Vanderlinde FA, Rocha FF, Pires PA, Costa EA, de Matos LG, Kaiser CR and Costa SS.** (2009). Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 12:4228-4232.
- Fang SH, Rao YK and Tzeng YM.** (2005). Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmopholeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN- γ -activated murine macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13:2381-2388.
- Im DY and Lee KI.** (2011). Antioxidative and antibacterial activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from *Taraxacum coreanum* Nakai. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:238-245.
- Jin CW, Eom SH, Park HJ, Ghimeray AK, Yu CY and Cho DH.** (2009). Antioxidant activity of *Hibiscus cannabinus* L. leaves in different growth time. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:21-25.
- Jorge AP, Horst H, de Sousa E, Pizzolatti MG and Silva FR.** (2004). Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ^{14}C -glucose uptake in rats oleus muscle. *Chmico-Biological Interactions*. 14:989-996.
- Lee KH, Cho YL, Joo CG, Joo YJ, Kwon SS and Park C.** (2011). Study on the anti-inflammatory effect of kaempferol and kaempferol rhamnosides isolated from *Hibiscus cannabinus* L. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:426-434.
- Navarro-Nunez L, Castillo J, Lozano ML, Martinez C, Benavente-Garcia O, Vicente V and Rivera J.** (2009). Thromboxane A² receptor antagonism by flavonoids: structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:1589-1594.
- Neena P, Susan A and Raul H.** (2011). Beneficial regulation of matrix metalloproteinases for skin health. *Enzyme Research*. 42:72-85.
- O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Sly WS, O'Brien NM and Williamson G.** (2001). Flavonoid glucuronides are substrates for human liver β -glucuronidase. *FEBS Letters*. 503:103-106.
- Oikarinen A, Karvonen J, Uitto J and Hannuksela M.** (1985). Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation. *Photo-Dermatology*. 2:15-26.
- Oikarinen A and Kallioinen M.** (1989). A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin. *Photo-Dermatology*. 6:24-31.
- Regasini LO, Vellosa JC, Silva DH, Furlan M, de Oliveira OM, Khalil NM, Brunetti IL, Young MC, Barreiro EJ and Bolzani VS.** (2008). Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry*. 69:1739-1744.
- Rothwell JA, Day AJ and Morgan MR.** (2005). Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:4355-4360.
- Ross D, Mendiratta S, Qu ZC, Cobb CE and May JM.** (1998). Ascorbate 6-palmitate protects human erythrocytes from oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*. 26:81-89.
- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Briviba K and Sies H.** (1993). Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Letter*. 331 :304-306.
- Seo YC, Choi W Y, Kim JS, Zou Y, Lee YG, Ahn JH, Shin IS and Lee HY.** (2010). Enhancement of antimicrobial activity of nano-encapsulated horseradish aqueous extracts against food-borne pathogens. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:389-397.
- Tzeng YM, Chen K, Rao YK and Lee MJ.** (2009). Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Pharmacologica Neerlandica*. 60:727-734.
- Tapiero H, Tew KD, Ba GN and Mathe G.** (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 56:200-207.
- Tyrrell RM and Pidoux M.** (1989). Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblast by UVA and near visible radiations. *Photochemistry Photobiology*. 49:407-412.
- Vishnu Prasad CN, Suma Mohan S, Banerji A and Gopalakrishnapillai A.** (2009). Kaempferitrin inhibits GLUT4 translocation and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 380:39-43.
- Vile GF and Tyrrell RM.** (1995). UVA radiation- induced oxidative damage to lipid and protein *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radical Biology & Medicine*. 18:721-725.
- Wlaschek M, Briviba K, Stricklin GP, Sies H and Scharffetter-Kochanek K.** (1995). Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A in induced synthesis of interstitial collagenase. *The Journal of Investigative Dermatology*. 104:194-198.
- Zuo Z, Zhang L, Zhou L, Chang Q and Chow M.** (2006). Intestinal absorption of hawthorn flavonoids - *in vitro*, *in situ* and *in vivo* correlations. *Life Science*. 79:2455-2462.
- Zurick KM, Qin C and Bernards MT.** (2012). Adhesion of MC3T3-E1 cells bound to dentin phosphoprotein specifically bound to collagen type I. *Journal of Biomedical Materials Research*. 100:2492-2498.