

고온고압 처리된 파극천 추출물의 MMP-1 발현 억제 효능 증진

강정욱[†]·오정영·배준태·김진화·이근수·표형배

한불화장품(주) 기술연구원
(2014년 12월 15일 접수, 2015년 1월 12일 수정, 2015년 3월 9일 채택)

Effects of Autoclaved *Morinda officinalis* Root Extract on the Suppressive Efficacy of MMP-1 Enzyme

Jung Wook Kang[†], Jung Young Oh, Jun Tae Bae, Jin Hwa Kim, Geun Soo Lee, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul cosmetics Co. Ltd, 62, Daeseong-ro 547beon-gil, Samseong-myun, Eumseong-gun, Chungcheongbuk-do
369-834, Korea

(Received December 15, 2014; Revised January 12, 2015; Accepted March 9, 2015)

요약: 파극천은 전통적으로 피부염증 치료에 사용되어온 약초이다. 본 연구에서는 파극천 뿌리를 고온(132 °C) 및 고압(1.2 kgf/cm²)에서 15분 동안 처리한 후 추출물을 분리하여 이들의 MMP-1 효소 억제 효능을 확인하였다. 고온고압 처리된 파극천 추출물의 성분변화를 확인한 결과, 고온고압 처리가 파극천 추출물의 페놀 및 플라보노이드 함량을 약 1.5배 이상 증가시키는 것으로 나타났다. DPPH 및 superoxide 라디칼 소거능을 확인해 본 결과 500 µg/mL에서 각각 79.25%, 94.5%의 라디칼 소거 효과가 나타났으며, 기존 추출물 대비 농도 의존적으로 활성 증가를 확인하였다. 또한, 항염 효과를 5-LOX 및 COX-2 저해능을 통해 확인한 결과 고온고압 처리된 파극천 추출물에서 약 45% 증가된 저해능이 나타났다. 이에 자외선에 대한 고온고압 처리된 파극천 추출물의 피부 콜라겐 단백질 분해효소 발현 저해 양상도 농도 의존적으로 발현이 억제되었으며 약 16% 정도 저해 효과가 유의적으로 증가되었다. UVB의 세포보호 효과도 고온고압 처리된 파극천 추출물을 함께 처리하였을 때 세포생존율이 증가됨을 확인할 수 있었다. 결론적으로 파극천 추출물에 고온고압 처리를 통해 기존 추출물보다 뛰어난 항산화, 항염 및 MMP-1 발현 억제 효과의 증가를 확인하였으며, 앞으로 기능성 소재로서 화장품에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: *Morinda officinalis* (Rubiaceae) is a medicinal herb that has traditionally been used for the treatment of skin inflammation. The present study was to investigate the inhibitory efficacy of matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) of the extracts of the root of *M. officinalis*, which was autoclaved at 132 °C and 1.2 kgf/cm² for 15 min using an autoclave. The composition of the extracts were compared with that prepared without autoclaved treatment. Total phenol and flavonoid contents were analyzed for the autoclaved *M. officinalis* root extract (AME) and *M. officinalis* root extract (ME). Results showed that the autoclaved AME contained total phenol and flavonoid contents 1.5-fold times more than those from ME. AME showed DPPH and superoxide radical scavenging activities as 79.25% and 94.5%, respectively, at the concentration of 500 µg/mL. In anti-inflammatory assay, AME inhibited the activity of COX-2 and 5-LOX metabolites. In addition, AME showed higher an inhibition rate in MMP-1 expression than ME in UVA-irradiated human dermal fibroblast (HDF) without any significant cytotoxicity. UVB-induced cytotoxicity and cell death were effectively suppressed by AME. In conclusion, autoclaving the *M. officinalis* root increased the phenol and flavonoid contents. The

[†] 주 저자 (e-mail: jwkkang@hanbul.co.kr)
call: 043)879-2286

extracts of the autoclaved *M. officinalis* enhanced the antioxidant, anti-inflammatory and anti-MMP-1 effects. Thus, the extracts could be an useful active ingredient in cosmetics.

Keywords: *Morinda officinalis*, autoclaving, antioxidant, anti-inflammation, anti-aging

1. 서 론

파극천(*Morinda officinalis*)은 꼭두서니과에 속하는 다년생 식물의 뿌리를 건조한 것으로 굵은 원주형으로 길이는 일정하지 않고 지름은 1 ~ 2 cm이다. 한방에서 보신양(補腎陽), 강근골(強筋骨), 거풍습(祛風濕)의 효능이 있어 양위유정(陽痿遺精), 궁냉불임(宮冷不孕), 월경부조(月經不調), 소복냉통(少腹冷痛), 풍습비통(風濕痺痛), 근골위연(筋骨痠軟) 등에 사용된다. 특히 동의보감에는 파극천의 성질은 약간 따뜻하며 맛은 맵고 달며 독이 없으며 정력에 좋다고 알려져 있다[1]. 포제법은 제파극, 염파극, 거심파극, 주침파극으로 나뉘며, 생약규격집에는 생약명은 *Morindae Radix*, 기원은 파극천 *Morinda officinalis*이며 중국약전(CP)에서 생약명은 *Radix Morindae officinalis*, 기원은 *Morinda officinalis* How이고 일본약국방(JP)에는 수재되어 있지 않다[2]. 파극천의 주요성분으로 비타민 C와 당류, rubadin, rubiadin-1-methyl ether, physcion, β -stigmasterol, palmitic acid, nonadecane 등이 보고되어 있다. 또한, iridoid계 물질인 morindolide와 morofficaloside tectoquinone, alizarin 1-methyl ether, lucidin- ω -methyl ether, 1-hydroxy-3-gydroxymethyl anthraquinone, β -sitosterol, oxoditosterol, rotungenic acid, (4R,5S)-5-hydroxyhexan-4-olide 등의 성분도 보고된 바 있다[3]. 이들 성분 가운데 anthraquinone류 화합물은 항바이러스, 항박테리아, 항암활성 등의 치료 효과가 있다고 보고되었다[4]. 또한 3T3-L1 지방세포의 분화에도 관여하는 것으로 확인되었다[5].

최근 기존 천연물에서 새로운 지표물질을 분리하거나 활성을 증가시켜 생리활성을 높이는 기술적 방법이 다양하게 연구되고 있다. 효소를 처리하거나 미생물, 효모 등을 이용하여 생물 전환시켜 독성을 줄이고 효능을 높이는 연구가 많이 이루어지고 있다. 또한, 고온고압을 이용한 열처리로 구성성분들의 변화를 야기시키거나 새로운 화합물을 만들어내어 유용성분을 극대화시키는 연구도 활발히 진행되고 있다. 특히 인

삼에 증숙 공정을 적용하여 G-Rg3, G-Rh2과 새로운 사포닌의 생성을 확인하였으며 phenolic acid의 증가를 증명하였다. 더덕은 고온고압 후 기존보다 gallic acid와 terulic acid의 양이 증가함을 확인하였고 ferulic acid에 의해 tyrosinase 저해 기능을, gallic acid를 통해 멜라닌 합성 저해능을 확인하여 미백활성을 증가를 확인한 연구도 보고되었다[6]. 또한 감피의 저분자 물질들과 토마토의 lycopene 등은 고온고압으로 인해 항산화 효과가 증진된 것으로 확인되었다[7].

파극천의 약리활성이 뛰어나지만 정확한 연구 결과가 많이 보고되지 않았으며, 특히 피부와 관련된 연구가 활발히 진행되지 못한 상태이다. 이에 본 연구에서는 고온고압 처리를 통해 파극천의 활성을 극대화시켜 파극천의 생리활성을 관찰해보고 화장품 소재로서의 가능성을 확인해 보았다.

2. 실험 방법

2.1. 파극천 추출물 제조 및 고온고압 처리

본 연구에 사용한 파극천은 동의한재에서 거심파극을 구입하여 분쇄 후 사용하였다. 분쇄한 파극천을 증류수로 환류하면서 4 h씩 3회 반복 추출한 후 여과 후 사용하였다. 열수 추출한 파극천 추출물을 잘 밀봉한 후 고온고압 장비(Ilshin Autoclave, Korea)를 이용하여 132 °C, 1.2 kgf/cm²에서 15 min 동안 처리하였다. 이후 파극천 추출물과 고온고압 처리된 파극천 추출물을 감압 농축, 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

2.2. 총 페놀 및 플라보노이드 함량 측정

고온고압 처리에 의한 파극천 추출물의 변화 양상을 관찰하고자 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu방법을 이용하여 측정하였고[8], 플라보노이드 함량은 AlCl₃방법을 이용하였다[9]. 간단히 설명하면, 총 페놀 함량은 2 N Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 765 nm에서 흡광도를

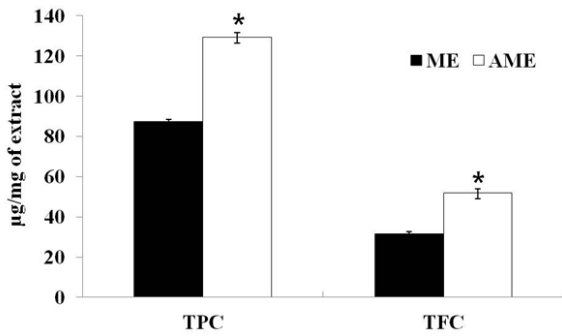


Figure 1. Comparison of total phenol and flavonoid concentrations in *Morinda officinalis* Extract (ME) and the Autoclaved-treated *M. officinalis* Extract (AME). The working concentration of ME and AME was 200 µg/mL. Results are presented as the average of triple determination with means ± S.D.

측정하였으며 양성대조군으로 gallic acid를 사용하였다. 또한, 플라보노이드 함량 측정은 AlCl₃ · 6H₂O를 이용하여 367 nm에서 흡광도를 측정하였으며 양성 대조군으로 quercetin을 사용하였다.

2.3. DPPH 및 Superoxide 라디칼 소거 효과

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)법은 피부 노화의 원인으로 알려져 있는 free radical에 대하여 식물추출물의 항산화 효능을 간단히 확인하기 위한 경우나 항산화 화장품 원료들의 활성을 비교하기 위한 실험방법이다[10]. 따라서 DPPH를 이용하여 파극천 추출물의 free radical 소거활성을 측정하였다. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동일량의 파극천 추출물을 더하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10 min 동안 반응시킨다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거 효과는 nitroblue tetrazolium (NBT)방법에 의해 측정하였다[11]. 0.05 M Na₂CO₃ buffer (pH 10.2)에 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 파극천 추출물을 가한 후 25 °C에서 10 min 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/mL xanthine oxidase를 첨가하고 25 °C에서 25 min 동안 반응 후 superoxide radical 소거 효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. COX-2 및 5-LOX 억제효능 측정

Cyclooxygenase-2 (COX-2) 억제효능은 Reddy 등의

방법을 변형하여 *in vitro*에서 수행하였다[12]. 96 well plate에 40 units/mL의 COX-2를 40 µL씩 넣고, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 90 µL, 30 µM EDTA 20 µL, 150 µM hematin 20 µL 그리고 시료 20 µL를 혼합하여 25 °C에서 5 min 반응시키고 5 mM TMPD 5 µL와 20 mM 아라키돈산 5 µL를 첨가하여 25 °C에서 5 min 반응시킨 후 microplate reader (Model ELX 800, BIO-TEK Instruments Inc, USA)를 사용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. COX-2 억제율(%)은 다음과 같은 식을 이용하여 IC₅₀ 값으로 나타내었으며 양성대조군으로 epigallocatechin gallate (EGCG)를 사용하였다.

$$\text{COX-2 억제율(\%)} = \frac{[(\text{대조군의 흡광도 값} - \text{실험군의 흡광도 값}) / \text{대조군의 흡광도 값}] \times 100}$$

활성 저해 효과 본 실험에 사용된 5-Lipoxygenase (5-LOX) 활성 저해 실험은 Frum 등의 실험방법을 변형하여 이용하였다[13]. 0.2 M Tris-HCl (pH 8.6) 3 mL, 10,000 units/mL 5-lipoxygenase 60 µL 및 샘플 100 µL를 혼합한 후 실온에서 5 min 동안 반응시킨다. 그 후 3 mM Linolic acid (Sigma, USA) 100 µL를 첨가한 후 다시 실온에서 5 min 동안 반응시킨다. 측정은 234 nm의 파장에서 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 양성 대조군은 nordihydroguaiaretic acid (NDGA)를 사용하였다. 측정 후 저해율(%)은 다음과 같은 식에 의해 나타내었다.

$$\text{5-LOX 저해율(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도 값} - \text{샘플의 흡광도 값}}{\text{대조군의 흡광도 값}} \times 100$$

2.5. 세포 배양

신생아의 표피조직에서 분리한 human dermal fibroblast (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 조건하에 배양하고 trypsinization으로 3 ~ 4일 간격으로 계대 배양한 뒤 6 ~ 15세대 세포를 이용하여 실험을 수행하였다.

2.6. 세포 생존률 측정

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide] 정량은 Mosmann의 방법을 변형하여 실시하였다[14]. HDF를 2×10^4 cells/well 농도로 96-well plate의 well에 파극천 추출물을 투여하여 CO₂ 배양기에서 24, 48 h 배양하였다. 각 well의 배지들을 제거하고 MTT solution (5 mg/mL in PBS)을 첨가하였다. 37 °C에서 2 h 반응시킨 후 MTT solution을 제거하고 각 well에 100 μ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 15 - 20 min plate shaker로 흔들어 준 후 565 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

2.7. 자외선(UVA, UVB) 조사 및 시료의 처리

자외선에 의한 광노화 및 산화적 세포사멸에 대한 파극천 추출물의 항노화 효능을 확인하기 위해서 UVA와 UVB를 아래와 같은 조건으로 처리하였다. HDF를 1.5×10^5 cells/mL의 농도로 48 well에 배양한다. 자외선 조사 전에 배양배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지 내 serum을 제거한 후 PBS상태에서 6.3 J/cm² UVA (UVA F15T8BLB, Sankyo Denki, Japan) 및 40 mJ/cm² UVB (UVB G15T8E, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. 자외선 조사 후 배양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3:1) 배지에 파극천 추출물을 투여하여 24 h 배양하였다.

2.8. MMP-1 발현 저해 측정

PBS 완충용액 2%를 첨가한 음성대조군을 기준으로 MMP-1 합성량 측정은 MMP-1 Biotrok™ ELISA kit (GE, UK)를 이용한 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)방법으로 실시하였다. 먼저 48시간 배양한 배지를 MMP-1에 대한 단일클론 항체(monoclonal anti-MMP-1)로 coating된 microplate의 각 well에 100 μ L씩 분주한 후, 뚜껑을 덮어 실온에서 2시간 동안 보온하였다. 각 well의 내용물을 제거한 후 세척용 완충제로 세척과정을 3회 반복하였다. 세척액을 완전히 제거한 다음 각 well에 MMP-1에 대한 다클론 항체 (polyclonal anti-MMP-1) 100 μ L씩 분주한 후, 뚜껑을 덮어 실온에서 2시간 동안 보온하였다. 각 well의 내용물을 제거한 후 세척용 완충제의 세척과정을 3회 반복하였으며, 세척액을 완전히 제거한 후 각 well에 peroxidase conjugate 100 μ L씩 분주한 후 실온에서 1시간 동안 보온하였다. 보온이 끝난 후 세척용 완충제의 세척과정을 3회 반복하여 미반응 항체를 제거하였으

며, 희석된 기질(substrate) 용액을 각 well에 100 μ L씩 분주한 후 실온에서 30분간 보온하였다. 동일한 시간에 반응을 종료시키기 위하여 Stop 용액(2 N H₂SO₄)을 각 well에 100 μ L씩 넣고 30분 내에 micro plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 표준품에 대한 시료의 농도를 산출하였다. 산출된 농도는 최종적으로 BCA protein assay kit를 이용하여 정량한 총 단백질로 보정하였다.

2.9. 자료분석 및 통계처리

결과는 각 실험그룹별 평균 표준편차(Standard deviation, S.D)로 표기하였고, 실험데이터는 대조군과 샘플처리 그룹 간 Student's *t*-test법을 이용하여 처리하였다. 통계적 유의성은 *p* value가 0.05 미만인 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 파극천 추출물의 고온고압 활성 변화

고온고압 처리공정은 짧은 시간 내에 유효성분을 최대한 추출할 수 있으며 순도가 높은 단일 성분과 불순물이 거의 없는 추출물을 얻을 수 있다[15]. 이에 파극천 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 확인함으로써 고온고압 공정의 활성 변화를 관찰하였다. 고온고압 처리된 파극천 추출물에서 200 μ g/mL의 농도에서 129.4 μ g/mg의 페놀함량을 확인하였고 기존 추출물과 비교하였을 때 약 47% 이상 증가됨을 확인하였다. 또한, 플라보노이드 함량도 고온고압 처리에 의해 약 64% 증가를 관찰하였다(Table 1). 기존 연구에서도 고온고압처리로 마늘에서 총 페놀 및 플라보노이드 함량 증가를 확인하였고 항산화 활성과 상관관계가 높다고 발표하였다[16]. Kim 등의 연구에서도 더덕 추출물에 고온고압을 처리 시 ferulic acid, phenolic acid 등의 페놀성 화합물의 증가로 인해 항산화 및 미백 활성이 나타남을 보고하였다[17]. 본 실험에서 고온고압 처리된 파극천 추출물에서도 기존보다 페놀 및 플라보노이드 함량이 증가됨을 확인하였으며 이를 토대로 항주름 관련 활성을 확인해 보았다.

Table 1. Antioxidant Inhibitory Activities of *M. officinalis* Extract (ME) and Autoclaved-treated *M. officinalis* Extract (AME)

Sample	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Superoxide radical scavenging (%)	DPPH radical scavenging (%)
BSA ¹⁾	100	79.2 \pm 2.5	85.4 \pm 1.5
Quercetin	100	103.7 \pm 2.7	33.9 \pm 2.1
ME	100	71.4 \pm 1.7	23.2 \pm 4.1
	200	74.1 \pm 2.9	44.7 \pm 2.4
	500	88.4 \pm 1.6	61.0 \pm 4.2
AME	100	80.5 \pm 2.2*	29.1 \pm 3.1*
	200	89.8 \pm 2.9*	55.1 \pm 3.2*
	500	94.5 \pm 1.7*	79.2 \pm 1.6*

¹⁾BSA (3-t-butyl-4-hydroxyanisole)

Values are means of triplicate determinations \pm S.D. (* p < 0.05 vs. ME)

Table 2. Anti-inflammatory Inhibitory Activities of *M. officinalis* Extract (ME) and Autoclaved-treated *M. officinalis* Extract (AME)

		IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
		5-lipoxygenase	Cyclooxygenase-2
Control	NDGA ¹⁾	24.55 \pm 2.85	
	EGCG ²⁾		73.8 \pm 1.05
ME		89.33 \pm 3.91	213.3 \pm 2.1
AME		40.79 \pm 2.15	90.39 \pm 1.45

¹⁾NDGA: Nor-dihydroguareatic acid (standard control of 5-LOX)

²⁾EGCG: Epigallocatechin gallate (standard control of COX-2)

Values are means of triplicate determinations \pm S.D

3.2. 항산화 및 항염 효과

3.2.1. DPPH 및 Superoxide radical 소거 효과

고온고압 처리 파극천 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH 및 superoxide radical 소거능을 확인하였다. DPPH는 활성 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기 반응의 억제정도를 예측할 수 있다[18]. 고온고압 처리된 파극천 추출물의 DPPH radical 소거능을 확인해 본 결과 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 79.25%의 free radical 소거 효과가 나타났으며 통계적으로 유의한 차이가 나타났다. 이는 기존 파극천 추출물과 비교하여 약 30% 정도 증가된 것을 확인하였다. Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion의 생성 저해를 NBT 방법을 통해 측정한 결과, 고온고압 처리된 파극천 추출물의 100,

200, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 모두 기존 추출물보다 우수한 superoxide radical 소거능을 가진 것으로 확인되었다(Table 2). 이는 총 페놀 및 플라보노이드 함량의 증진을 통해 항산화 활성이 증가되었을 것으로 사료된다. 최근 고온고압처리에 의해 메틸추출물에서도 라디칼 소거능의 증가를 확인되었다[19]. 즉, 기존의 항산화 활성을 가지고 있는 파극천 추출물도 고온고압 처리에 의해 동반 상승효과가 나타난 것으로 사료된다.

3.2.2. 5-LOX 및 COX-2 발현 억제 효과

꼭두서니과인 노니 추출물에서도 항염 효과가 나타남이 보고되어[20], 파극천 추출물에서의 항염 활성 및 고온고압 처리에 따른 변화를 효소 실험을 통해 확인하였다. 고온고압 처리된 파극천 추출물의 5-LOX

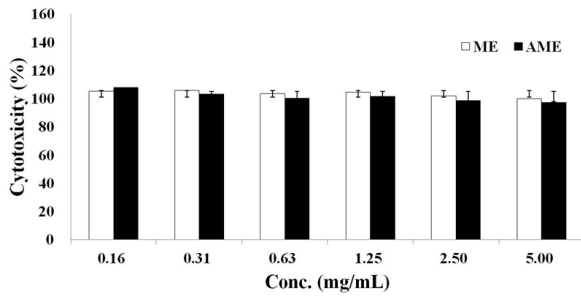


Figure 2. Effect of ME and AME on human dermal fibroblast by MTT assay. The cells were treated with various concentration of ME and AME. The results were expressed as the means of triplicate samples with S.D.

저해율을 측정된 결과, 양성 대조군인 NDGA의 IC_{50} 값은 $24.55 \mu\text{g/mL}$ 이었으며, 고온고압 처리된 파극천 추출물의 경우에는 $40.79 \mu\text{g/mL}$ 로 대조군과 비교하였을 때 약 45% 이상 저해 효과가 증가된 것으로 나타났다. 또한 COX-2 저해율을 측정된 결과에서도 5-LOX와 유사한 경향을 나타내었으며, 고온고압 처리된 파극천 추출물의 IC_{50} 값은 $90.39 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 대조군에 비해 약 42% 이상의 증가된 활성을 나타내었다(Table 2). Gallic acid 등과 같은 페놀성 화합물은 항산화 및 항염 등의 활성이 보고되고 있다 [21]. 본 실험에서도 고온고압처리로 증가된 파극천 추출물의 증가된 페놀 함량으로 인해 항염증 효과도 영향을 끼친 것으로 사료된다.

3.3. 세포 독성

파극천 추출물 및 고온고압 처리된 파극천 추출물의 농도 증가에 따른 세포 증식에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였다. 그 결과 최대 농도 5 mg/mL 의 경우 각각 99.7%, 97.1%의 세포 생존율을 보이며, 최소 농도인 0.16 mg/mL 에서도 105.3%, 107.7%의 세포 생존율을 보인 것으로 확인하였다(Figure 2). 이는 파극천 추출물과 고온고압 처리된 파극천 추출물 모두 섬유아세포의 생존에 영향이 없는 것으로 나타났다.

3.4. UVA에 의해 유도된 MMP-1 발현 저해 효과

MMPs의 family 중 하나인 MMP-1은 피부의 광노화에 UVA 등의 외부 자극에 의해 발현이 증가되어 피부에 교원질의 결핍을 초래한다[22]. 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 고온고압 처리된 파

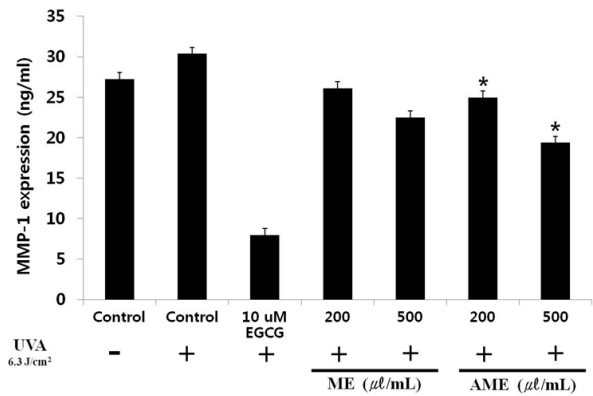


Figure 3. Effect of ME and AME on MMP-1 production in UVA-irradiated human dermal fibroblast. The cells were treated with various concentration of the extracts for 24 h. Data are expressed as mean \pm S.D of triplicates, ($p < 0.05$ vs. ME).

극천 추출물의 영향에 대해 조사하였다. 이때, 섬유아세포에 6.3 J/cm^2 UVA를 조사하고 고온고압 처리된 파극천 추출물을 첨가하여 24 h 동안 배양한 후 MMP-1 발현 저해를 조사한 결과, 농도 의존적으로 발현이 억제됨을 확인하였다(Figure 3). 구체적으로 기존 파극천 추출물과 비교하였을 때 최대 약 16% 정도 저해 효과가 유의적으로 증가된 것으로 나타났다($p < 0.05$). UVA조사로 인해 MMP-1 유전자 발현이 증가되는 기전은 아직 확실치 않으나 신호전달 과정에서 발현을 자극하는 전사 인자로 알려져 있는 AP-1의 활성이 증가됨이 확인되었다[23]. Masuda 등은 노니 추출물에서 Mitogen-activated protein kinase (MAPKs) phosphorylation에 의해 UVA에 의해 MMP-1 발현을 조절하는 것으로 확인하였다[24]. 고온고압 처리에 의해 파극천 추출물도 신호전달 과정에서 관여하는 MMP-1 발현인자의 활성증가로 인한 유의적 변화로 생각된다.

3.5. UVB로 인한 세포 손상으로부터의 보호효과

UVB 조사는 피부에서 DNA 손상, reactive oxygen species (ROS) 생성 등을 통해 다양한 피부 세포의 기능을 파괴시킨다. 특히 ROS는 직접 또는 간접적으로 콜라겐을 파괴할 뿐만 아니라, MMPs의 합성 및 활성화를 유도하는 등 콜라겐 신진 대사에 중요한 역할을 한다[25]. 따라서 고온고압 처리된 파극천 추출물의 항산화 활성이 UVB에 의해 광노화를 일으킨 피부세포의 손상을 보호하는지 세포 생존율로 확인하였다.

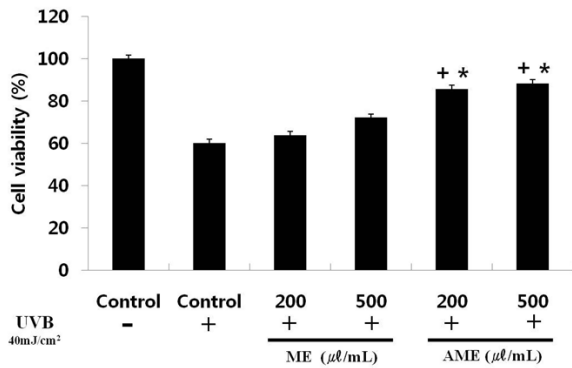


Figure 4. Cell protective effect of ME and AME on the UVB-induced cytotoxicity. HDF cells were exposed to UVB (40 mJ/cm²) and treated with various concentration (200 and 500 µg/mL) for 24 h. Data are expressed as mean ± S.D of triplicates, (⁺*p* < 0.05 vs. ME, ^{*}*p* < 0.05 vs. UVB).

UVB를 40 mJ/cm²로 조사 후 확인한 결과 파극천 추출물 및 고온고압 처리된 파극천 추출물 모두 세포 생존율이 증가된 것을 확인하였다(Figure 4). 또한 고온고압에 의해 처리된 시료가 기존 추출물 보다 활성이 증가하였으며 500 µg/mL의 농도에서는 유의적으로 증가된 것을 확인하였다(*p* < 0.05). Jeong 등은 오디 및 자조추출물에서도 항산화 효과에 의해 피부세포에서 UVB에 의해 생산된 ROS 감소에 따른 피부손상의 보호를 확인하였다[26]. 결국, 고온고압 처리로 인해 증가된 항산화 효과가 UVB의 자극에 의한 세포손상 보호에도 유의적으로 영향을 끼친 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 파극천 추출물의 항주름 효과에 대해 알아보고 고온고압 처리 시 나타나는 변화에 대해 확인하였다. 이에 파극천 추출물의 고온고압 전 후 변화를 관찰한 결과, 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 고온고압에 의해 약 50% 이상 증가됨을 확인하였다. 이에 고온고압을 통해 파극천 추출물의 항산화 및 항염 효과와 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP에 미치는 영향을 알아보았다. 또한, UVB에 의해 대한 세포 보호 효과를 관찰하였다. 고온고압 처리된 파극천 추출물의 DPPH radical 소거능을 확인해 본 결과 79.25%의 free radical 소거 효과가 나타났으며 농도 의존적인 경향을 확인하였으며 기존 파극천 추출물 보

다 약 30% 정도 활성증가를 확인하였다. superoxide radical 소거능 또한 고온고압 처리된 파극천 추출물의 100, 200, 500 µg/mL의 농도에서 모두 기존 추출물보다 우수한 superoxide radical 소거능을 가진 것으로 확인되었다. 항염 효과를 확인한 결과 고온고압 처리된 파극천 추출물의 5-LOX 및 COX-2 모두 기존 추출물에 비해 약 40% 이상 저해율이 증가된 것을 확인하였다. 이에 자외선에 대한 외부자극을 통해 고온고압 처리된 파극천 추출물의 MMP-1 변화양상을 확인한 결과 농도 의존적으로 발현이 억제되었으며 약 16% 정도 저해 효과가 유의적으로 증가되었다. 자외선에 대한 세포보호 효과는 UVB 조사한 경우 세포생존율이 약 62% 정도 감소하였으며, 고온고압 처리된 파극천 추출물을 함께 처리하였을 때 세포생존율이 유의 있게 증가됨을 확인할 수 있었다. 결론적으로 고온고압 처리된 파극천 추출물은 기존 추출물보다 우수한 항주름 효과를 증가시킨 소재로서 화장품에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2014년 산업협력권사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다(과제번호 R0002894).

References

1. H. Lee, S. Park, B. Choo, J. Chun, A. Lee, and H. Kim, Standardization of *Morinda officinalis* How, *Kor. J. Pharmacogn.*, **37**, 241 (2006).
2. M. Yoshikawa, S. Yamaguchi, H. Nishisaka, J. Yamahara, and N. Murakami, Chemical constituents of chinese natural medicine, morindae radix, the dried roots of *Morinda officinalis* How.: Structures of morindolide and morofficaloside, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1462 (1995).
3. K. C. Joshi, P. Singh, and R.T. Pardasani, Chemical components of the roots of tectona grandis and gemlina arborea, *Planta Medica*, **32**, 71 (1977).
4. M. K. Kim, C. S. Jeong, Y. K. Shin, K. H. Park, W. J. Lee, E. J. Lee, and K. Y. Park, Effects of extraction condition on extraction efficiency of rubiadin

- in adventitious roots of noni (*Morinda citrifolia*), *Kor. J. Hort. Sci. Technol.*, **28**, 685 (2010).
5. Q. Liu, S. B. Kim, J. H. Ahn, B. Y. Hwang, S. Y. Kim, and M. K. Lee, Anthraquinones from *Morinda officinalis* roots enhance adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, *Nat. Prod. Res.*, **26**, 1750 (2012).
 6. K. Y. Nam, The comparative understanding between red ginseng, and white ginsengs, processed ginsengs (*Panax ginseng* C. A. Meyer), *J. Ginseng Res.*, **29**, 1 (2005).
 7. S. M. Jeong, S. Y. Kim, D. R. Kim, S. C. Jo, K. C. Nam, D. U. Ahn, and S. Lee, Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3389 (2004).
 8. E. Ragazzi, and G. Veronese, Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation, *J. Chromatogr.*, **77**, 369 (1973).
 9. J. L. C. Lamaison, and A. Carnet, Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D.C) en fonction de la vegetation, *Pharm. Acta. Helv.*, **65**, 315 (1990).
 10. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 11. 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).
 12. C. M. Reddy, V. B. Bhat, G. Kiranmai, N. M. Reddy, P. Reddanna, and K. M. Madyastha, Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277**, 599 (2000).
 13. Y. Frum and A. M. Viljoen, *In vitro* 5-lipoxygenase of south african medicinal plants commonly used topically for skin diseases, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **19**, 329 (2006).
 14. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 15. V. Dewanto, X. Wu, K. Adom, and R. H. Liu, Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3010 (2002).
 16. O. H. Kwon, K. S. Woo, T. M. Kim, D. J. Kim, J. T. Hong, and H. S. Jeong, Physicochemical characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **38**, 331 (2006).
 17. J. S. Kim, J. W. Kim, H. S. Kwon, H. W. Lim and H. Y. Lee, Screening of skin whitening activity of *codonopsis lanceolata* extract by complex steaming process, *Kor. J. Medicinal Crop Sci.*, **21**, 54 (2013).
 18. A. Kitahara, U. Matsumoto, H. Ueda, and R. Ueoka, A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation or γ -irradiated methyl linolate, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2208 (1992).
 19. M. Zhang, H. Chen, J. Li, Y. Pei, and Y. Liang, Antioxidant properties of tartary buckwheat extracts as affected by different thermal processing methods, *Food Sci. Technol.*, **43**, 181 (2010).
 20. K. Palu, S. Deng, B. J. West, J. Jensen, and R. A. Sabin, Sunburn (fohia) Healing Effects of Noni: Is it a Mechanism Involving Its Inhibitory effects on MMP, COX-2 and Cat-G Enzymes, *J. Applied Pharma. Sci.*, **2**, 40 (2012).
 21. N. W. Kim, E. Y. Joo, and S. L. Kim, Analysis on the components of the fruit of *Elaeagnus multiflora* Thumb, *Korean J. Food Preserv.*, **10**, 534 (2003).
 22. 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).
 23. H. C. Kim, J. S. Yang, T. 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. Dermatol.*, **35**, 1136 (1997).
 24. M. Masuda, K. Murata, S. Naruto, A. Uwaya, F. Isami, and H. Matsuda, Matrix metalloproteinase-1 inhibitory activities of *Morinda citrifolia* seed extract and its constituents in UVA-irradiated human dermal fibroblasts, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 210 (2012).

25. Y. W. Rtoo, S. I. Suh, K. C. Mun, B. C. Kim, and K. S. Lee, The effects of the melatonin on ultra-violet-B irradiated cultured dermal fibroblasts, *J. Dermatol. Science*, **27**, 162 (2001).
26. Y. S. Jeong, H. K. Jung, and J. Hong, Protective effect of mulberry and lithospermum erythrorhizon extracts on anti-aging against photo damage, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **42**, 1744 (2013).