

## 드럼스틱 잎 추출물의 항산화 및 세포보호 효과

현 송 화 · 김 아 랑 · 정 윤 주 · 이 난 희 · 박 수 남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 정밀화학학과 화장품종합기술연구소, 코스메틱 용·복합산업 지원 센터  
(2016년 6월 17일 접수, 2016년 7월 13일 수정, 2016년 7월 18일 채택)

### Antioxidant and Cellular Protective Effects of *Moringa oleifera* Leaves Extract

Song Hua Xuan, A Rang Kim, Yoon Ju Jeong, Nan Hee Lee, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center,  
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea  
(Received June 17, 2016; Revised July 13, 2016; Accepted July 18, 2016)

**요 약:** 본 연구에서는 드럼스틱 잎 추출물과 분획들의 항산화 활성 및 HaCaT 세포와 적혈구 세포에서의 세포보호효과를 측정하였다. 모든 실험은 드럼스틱 잎의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획을 이용하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical을 이용한 자유 라디칼 소거 활성(FSC<sub>50</sub>)은 50% 에탄올 추출물(77.10  $\mu\text{g/mL}$ ) < 에틸아세테이트 분획(20.63  $\mu\text{g/mL}$ ) < 아글리콘 분획(17.00  $\mu\text{g/mL}$ ) 순으로 증가하였다. 루미놀을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서의 활성산소 소거 활성(총항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 아글리콘 분획의 OSC<sub>50</sub> 값이 0.63  $\mu\text{g/mL}$ 로 추출물 중 가장 큰 항산화능이 나타났으며, 이는 L-ascorbic acid (1.50  $\mu\text{g/mL}$ )의 항산화 활성보다 컸다. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>로 유도된 적혈구 세포 손상에 있어서 50% 에탄올 추출물 및 아글리콘 분획의 세포 보호 효과( $\tau_{50}$ )는 10  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 46.9 및 122.1 min을 나타냈다. 이는 지용성 항산화제로 알려진 (+)- $\alpha$ -tocopherol (37.7 min)보다도 훨씬 큰 세포 보호 활성을 보여주었다. 400 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 HaCaT 세포에 조사하여 세포손상을 유도한 후 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 0.20 ~ 1.56  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 농도 의존적으로 세포보호효과를 나타내었다. 이상의 결과들은 자외선에 노출된 피부에서 드럼스틱 잎 추출물과 분획들이 ROS 소거를 통하여 세포를 보호함으로써 화장품에서 천연 항산화제로서 사용 가능성을 시사하였다.

**Abstract:** In this study, we investigated the antioxidative and cellular protective effects on HaCaT cells and erythrocytes of *Moringa oleifera* (*M. oleifera*) leaves extract and its fractions. All experiments were performed with 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction of *M. oleifera* leaves. The free radical scavenging activity (FSC<sub>50</sub>) of the extract and fractions of *M. oleifera* leaves were in the following order: 50% ethanol extract (77.10  $\mu\text{g/mL}$ ) < ethyl acetate fraction (20.63  $\mu\text{g/mL}$ ) < aglycone fraction (17.00  $\mu\text{g/mL}$ ) by using the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. In Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system using the luminol, reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (total antioxidant capacity, OSC<sub>50</sub>) of aglycone fraction (OSC<sub>50</sub> = 0.63  $\mu\text{g/mL}$ ) was the strongest among all extracts, which was much higher than L-ascorbic acid (1.50  $\mu\text{g/mL}$ ). In the <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-induced cellular damage of erythrocytes, the cellular protective effects of 50% ethanol extract ( $\tau_{50}$  = 46.9 min) and aglycone fraction ( $\tau_{50}$  = 122.1 min) were higher than (+)- $\alpha$ -tocopherol ( $\tau_{50}$  = 37.7 min), known as a lipophilic antioxidant at 10  $\mu\text{g/mL}$ . After cell damage induced by 400 mJ/cm<sup>2</sup> UVB irradiation, the cellular protective effects of ethyl acetate and aglycone fraction of *M. oleifera* leaves extract were showed on the concentration from 0.20 to 1.56  $\mu\text{g/mL}$ . These results suggest that *M. oleifera* leaves extract and its fractions can function as a natural antioxidant agent in cosmetics on skin exposed to UV radiation by protecting cellular membrane against ROS.

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)  
call: 02)970-6451

**Keywords:** *M. oleifera*, antioxidant, reactive oxygen species, cellular protective effect

## 1. 서 론

피부 노화는 일반적으로 내인적 노화(intrinsic aging)와 외인적 노화(extrinsic aging)로 나눌 수 있다[1]. 내인적 노화는 나이가 증가함에 따라 나타나는 자연적인 노화이며, 외인적 노화는 자외선[2], 흡연[3] 및 환경요소 등의 원인으로 나타나는 노화이다. 그중에서 피부 노화의 가장 큰 원인은 자외선에 노출에 의한 광노화(photoaging)이다[4]. 피부가 자외선에 노출되면 다양한 종류의 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 피부에서 생성된다. 이러한 활성산소의 종류로는 singlet oxygen ( $^1O_2$ ), superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), alkoxy radical ( $\cdot OR$ ) 및 hydroperoxy radical ( $\cdot OOR$ ) 등이 있다. 피부에서 생성된 ROS는 피부의 지질, 단백질 및 DNA 등의 생체 구성 성분을 산화 손상시켜서 피부 노화를 야기시킨다. 하지만 피부에는 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소와 비타민 E, C 및 글루타치온 등의 비효소적 항산화제가 존재한다. 이들 항산화제들은 피부에 항산화 방어망을 구축하여 자외선 및 ROS로부터 피부 세포 및 그 구성 성분들을 보호하는 역할을 한다. 하지만 지속적인 자외선에 피부가 노출될 때는 과잉의 ROS가 생성되고 이들 ROS는 일차적으로 피부 항산화제들을 파괴시킴으로써 피부의 항산화 방어망을 붕괴시켜서 피부를 산화적 스트레스 하에 놓이게 한다. 과잉의 ROS는 세포막을 손상시킬 뿐만 아니라 단백질 산화, DNA 손상, 지질 과산화 반응을 개시시키고 피부 진피층의 매트릭스 성분인 콜라겐, 엘라스틴 및 히알루론산 등을 분해 절단시키거나 비정상적인 교차결합을 일으킴으로써 주름 생성을 동반한 피부 노화를 가속화시킨다[5-7]. 따라서 피부에서 생성되는 과잉의 활성산소 생성을 억제하거나 생성된 활성산소를 효율적으로 제거하고 피부 항산화 방어망 구축에 보다 적합한 항산화제를 개발하는 것은 기능성 항노화 화장품 개발에 있어서 매우 중요하다[8].

본 연구에 사용한 드럼스틱(*Moringa oleifera*, *M. oleifera*)은 Moringaceae과에 속한다. 드럼스틱은 높이가 5 ~ 10 m 크기의 나무이며, 아시아, 남아메리카 및 아프리카

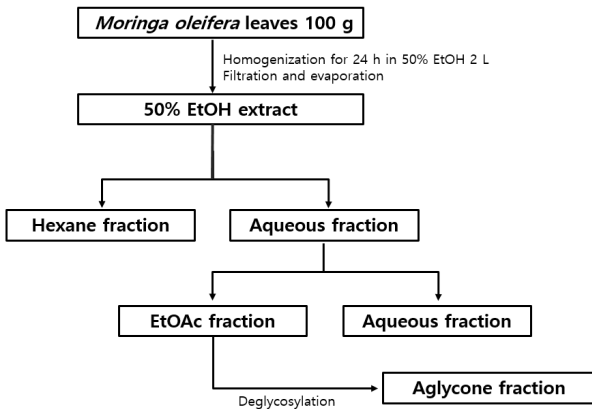
카 등의 지역에 주로 분포되어 있으며 “Moringa” 또는 “Molunggay” 라고도 불리 운다. 드럼스틱의 뿌리, 줄기, 잎, 열매, 꽃, 씨 등은 동남아세아에서 질병치료 등에 사용되고 있으며 항균, 항염증 및 항암 등의 약리작용이 있는 것으로 보고되고 있다[9-12]. 최근 드럼스틱 잎 추출물에는 플라보노이드, 페놀성 화합물 및 알칼로이드 성분들이 존재한다고 보고되었다[13-18]. 하지만 화장품에서 추출물이나 특정 분획을 대상으로 한 항산화 소재로서의 응용 연구는 아직도 미흡한 실정이다. 특히 드럼스틱 잎 추출물을 이용한 각종 ROS가 생성되는  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 계에서의 총 항산화능에 대한 연구나 피부노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인  $^1O_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호효과 및 UVB로 유도된 사람 각질형성세포인 HaCaT 세포에 대한 자외선 조사 후의 세포보호 효과에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 드럼스틱 잎 추출물과 분획을 이용하여 피부 노화와 관련된 항산화 효능을 확인하고 기능성 화장품의 항산화 소재로서의 가능성이 있는지를 알아보려고 하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

본 연구에서 UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50을 사용하였으며, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를 사용하였다. 적혈구 광용혈 실험에 사용한 spectronic 20D는 Milton Roy (USA) 제품이며, pH 미터는 Mettler-Toledo (Switzerland) 제품을 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼, luminol, heparin, 증감제로 사용된 rose-bengal, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA),  $H_2O_2$ , (+)- $\alpha$ -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g) 및 L-ascorbic acid은 Sigma (USA)에서 구입하였다. 기타  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei (Japan) 제품을 사용하였다. 완충 용액 제조에 사용된  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , NaCl,  $H_2SO_4$  그리고 에탄올(EtOH), 에틸아세테이트(EtOAc), n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 드럼스틱 잎은 2016년 4월경 경동시장에서



**Figure 1.** Fractionation scheme of *M. oleifera* leaves 50% EtOH extract and its fractions.

구입하여 실험에 사용하였다.

**2.2. 드럼스틱 잎 추출물 및 분획의 수율**

건조된 드럼스틱 잎 100 g에 50% 에탄올 2 L에 24 h 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 농축하여 50% 에탄올 추출물 파우더를 얻었으며, 일부를 에틸아세테이트로 분획한 후 감압 농축하여 건조된 에틸아세테이트 분획 파우더를 얻었다. 에틸아세테이트 분획 파우더의 일부를 산으로 가수분해 하여 당을 제거시킨 후 아글리콘 분획을 얻었다. 실험 방법은 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 아세톤을 혼합한 용액에 에틸아세테이트 분획 파우더 일정량을 첨가한 후 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시켰다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정 후 증류수로 세척하여 산, 염기 및 당 등을 모두 제거하였다. 이 용액을 다시 에틸아세테이트로 분획한 후 감압·농축하여 제조된 아글리콘 파우더를 실험에 사용하였다(Figure 1).

**2.3. 드럼스틱 잎 추출물의 항산화 효과 측정**

**2.3.1. DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성**

피부노화의 주요 원인 물질은 자유 라디칼이다. 본 연구에서는 드럼스틱 잎 추출물의 자유 라디칼 소거 활성을 평가하기 위해 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자 주개 능력을 통하여 시료의 환원력을 측정하였다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가한 후 드럼스틱 잎 추출물과 분획을 각각 1 mL씩 농도별로 첨가하

여 섞는다. 그리고 실온에서 10 min 동안 방치한 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료가 포함되지 않은 용매를 첨가한 것으로, 이때 DPPH 라디칼은 최대 흡광도를 나타낸다. 실험군(experiment)은 시료를 첨가한 것으로, 시료에 의해 DPPH가 환원될 경우 517 nm에서의 흡광도가 감소하게 된다. 시료 바탕실험군(sample blank)은 DPPH를 첨가하지 않고 시료만을 첨가한 것으로, 시료 자체의 흡광도를 나타낸다. 각각의 흡광도(A)로부터 다음 식(1)에 의해 DPPH 라디칼 소거율(%)을 구할 수 있다. 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소하는 데 필요한 시료의 농도(자유 라디칼 소거 활성, FSC<sub>50</sub>, µg/mL)로 표기하였다.

Radical Scavenging (%) =

$$\left( 1 - \frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

**2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성산소 소거활성(총 항산화능)**

Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계는 다양한 종류의 ROS를 생성시킨다. 특히 철과 같은 전이금속의 촉매 작용은 반응성이 매우 큰 하이드록실 라디칼 (•OH)을 발생시킨다. 이 계를 이용하여 luminol과 ROS 간의 반응으로 나타나는 화학발광의 변화를 측정함으로써 시료의 총 항산화능을 평가할 수 있다. 총 항산화능은 시료의 환원력 뿐만 아니라, 활성산소의 생성을 억제하는 킬레이트 능력도 포함한다.

실험 방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 드럼스틱 잎 추출물과 2.5 mM EDTA 40 µL, 5 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10 µL, 35 mM luminol 80 µL를 첨가하여 섞은 후 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고, 5 min 동안 37 °C에서 항온 시켰다. 그 후 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 µL를 넣고 25 min 동안 화학발광을 측정하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 공시험(blank)은 실험군(experiment)과 조건이 동일하나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 첨가하지 않은 것으로 하였으며, 대조군(control)은 시료 용액 대신 증류수를 첨가하였다. 다음의 식(2)로 ROS 소거율(%)을 구하였다. 활성산소 소거 활성의 크기는 화학발광

의 세기(counts per minute, cpm)가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>, µg/mL)로 표기하였다.

ROS Scavenging (%) =

$$\frac{\text{cpm}_{\text{control}} - \text{cpm}_{\text{experiment}}}{\text{cpm}_{\text{control}} - \text{cpm}_{\text{blank}}} \times 100 \quad (2)$$

## 2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포 보호 효과 측정

### 2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

본 실험에서 사용된 적혈구는 건강한 성인으로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 혈액을 넣고, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, 9.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 1.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O)로 3회 세척하여 실험에 사용하였으며, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 광학 밀도(optical density, O.D.) 값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 약  $1.5 \times 10^7$  cells/mL이었다.

### 2.4.2. 드럼스틱 잎 추출물과 분획의 광용혈 억제 효과

$1.5 \times 10^7$  cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣고, 드럼스틱 추출물과 분획을 농도별로 각각 50 µL씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제인 12 µM rose bengal을 0.5 mL를 첨가하고 파라필름으로 시험관의 입구를 봉한 뒤 15 min 동안 광조사 하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 5 cm 거리에 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 수행하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴 정도를 15 min 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 수행하였다. 드럼스틱 잎 추출물과 분획이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈 되는 시간( $\tau_{50}$ )을 구하

여 비교 평가하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은  $\tau_{50}$ 이 30.6 min으로 오차범위 ± 1.5 min 이내로 재현성이 양호하게 나타났다.

## 2.5. UVB로 유도된 HaCaT 세포 손상에 대한 세포보호 효과 측정

### 2.5.1. 세포배양

사람 각질형성 세포주인 HaCaT 세포는 Dr. Fusenig (German Cancer Research Center, DKFZ)로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)는 10% fetal bovine serum (FBS, PAA, Austria), 1% penicillin / streptomycin, (P/S, PAA, Austria)을 혼합하여 사용하였고, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 2.5.2. 드럼스틱 잎 분획 처리에 따른 세포독성 평가

$1 \times 10^5$  cells/mL 농도의 HaCaT 세포를 96-well plate에 접종한 후 37 °C 세포배양기에서 70 ~ 80% 정도까지 배양하였다. 세포배양액을 배지흡입기를 이용하여 제거한 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)를 이용하여 세포를 2회 세척하였다. 드럼스틱 잎 추출물과 분획을 농도별로 세포에 24 h 처리한 후 MTT assay를 통해 세포생존율을 확인하여 세포독성이 없는 농도범위를 실험에 사용하였다.

### 2.5.3. UVB 조사량에 따른 HaCaT 세포의 생존율

세포 배양기에서 70 ~ 80% 정도까지 배양한 HaCaT 세포의 세포배양액을 제거한 후 DPBS 이용하여 세포를 2회 세척하였다. 이후 CL-1000 ultraviolet crosslinker (UVP Co., USA)를 이용하여 DPBS 상태에서 UVB를 조사량별로(200, 300, 400 mJ/cm<sup>2</sup>) 조사하였다. 조사 후, 남아있는 DPBS를 제거하고 무혈청 DMEM 배지로 교체한 다음 37 °C 배양기에서 배양하였다. 24 h 후 MTT assay를 통해 세포생존율을 확인하여 세포손상을 유도한 자외선 조사량을 실험에 사용하였다.

### 2.5.4. UVB 로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

세포배양기에서 70 ~ 80% 정도까지 배양한 HaCaT 세포를 세포배양액을 제거한 후 DPBS 이용하여 세포를 세척하였다. 이후 DPBS 상태에서 400 mJ/cm<sup>2</sup> 조사

량의 UVB를 조사하여 세포손상을 유도하였다. 조사 후, 남아있는 DPBS를 제거하고 농도별 드럼스틱 잎 추출물과 분획을 포함하는 무혈청 DMEM 배지로 교체한 다음 37 °C 배양기에서 배양하였다. 24 h 후 MTT assay를 통해 세포생존율을 확인하여 UVB로 유도된 세포손상에 대한 드럼스틱 잎 분획의 세포보호 효과를 확인하였다[19].

### 2.5.5. MTT Assay

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA)를 이용하여 측정하였다. 살아있는 세포는 미토콘드리아에 dehydrogenase 효소를 가지고 있다. 이 효소는 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시킨다. 따라서 생성된 formazan의 양을 측정하면 살아있는 세포 수를 알 수 있다.

자외선 조사 후, 무혈청 DMEM 배지 또는 농도별 드럼스틱 잎 추출물이 함유된 무혈청 DMEM 배지를 넣고 24 h 배양하였다. 그리고 DPBS로 2회 세척하고 2 µg/mL 농도의 MTT 용액을 첨가하여 30 min 동안 반응시켜 formazan 결정을 생성시켰다. MTT 용액을 제거하고 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해하여 570 nm 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다[19]. 비처리군을 음성 대조군(100%)으로 하여 다음의 식(3)에 따라 상대적 세포 생존율을 구하였다.

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{A_{\text{treatment}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (3)$$

## 2.6. 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 3회 반복 실시하였고, 통계분석은 GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA) 프로그램을 이용하였다. One-way ANOVA 검정을 적용하여  $p < 0.05$  유의수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 드럼스틱 잎 추출물 및 분획의 수율

건조된 드럼스틱 잎을 50% 에탄올로 추출하여 여과 및 건조시켜 얻은 50% 에탄올 추출물의 수율은 드럼스틱 잎 건조 중량의 24.46%였다. 50% 에탄올 추출물

**Table 1.** Yields of *M. oleifera* Leaves 50% EtOH Extract and Its Fractions

	50% EtOH extract	EtOAc fraction	Aglycone fraction
Yields (%)	24.46	1.39	0.60

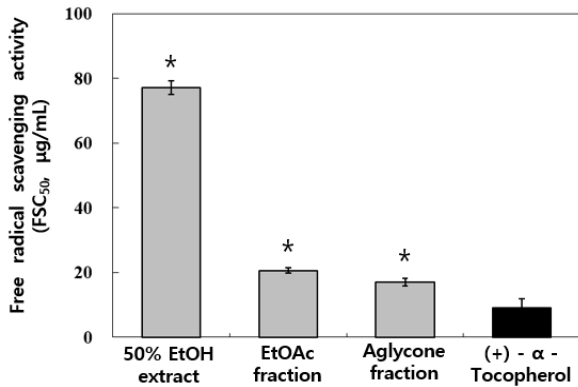
로부터 얻어진 에틸아세테이트 분획의 수율은 추출에 이용한 드럼스틱 잎의 건조 중량 대비 1.39%이었으며, 에틸아세테이트 분획으로부터 산가수분해 반응을 통해 얻어진 아글리콘 분획의 수율은 0.60%였다(Table 1).

### 3.2. 드럼스틱 추출물과 분획의 항산화 활성

#### 3.2.1. DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성

자외선 노출과 같은 외부 스트레스에 의해 피부에서 생성되는 과잉의 ROS는 세포 및 조직에 손상을 주어 노화를 가속화시킨다. 이러한 ROS에는 superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) 등이 있으며 이들과 생체분자와의 반응으로 생성된 유기 라디칼 ( $\cdot OR$  또는  $\cdot OOR$ )과 같은 라디칼 종이 포함된다. 라디칼은 원자가 전자 오비탈에 쌍을 이루지 않은 홀 전자가 존재하여 에너지가 높고 반응성이 매우 크다. 라디칼은 세포막에서 지질 과산화반응을 개시하여 자동 산화 연쇄 반응 과정으로 세포를 손상시킨다. 대표적인 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol은 생성된 지질라디칼에 전자를 제공하여 연쇄 반응을 종결시키고 세포를 보호한다. 위와 같이 시료의 전자 주개 능력을 측정하여 추출물의 항산화능을 평가할 수 있다. 비교적 안정한 라디칼로 존재하는 DPPH를 이용하여, 517 nm에서의 흡광도 변화를 통해 시료의 항산화능을 평가하였다. 시료가 DPPH 분자에 수소 원자 또는 전자를 제공해주는 능력, 즉 항산화 효과가 클수록 517 nm에서의 흡광도는 감소하게 된다.

따라서 본 실험에서는 드럼스틱 잎 추출물과 분획의 자유 라디칼 소거 활성을  $FSC_{50}$ 으로 나타내었다(Figure 2). 대조군으로는 지용성 항산화제로 널리 알려진 (+)- $\alpha$ -tocopherol을 사용하였다. 실험 결과, 50% 에탄올 추출물의  $FSC_{50}$ 은 77.10 µg/mL, 에틸아세테이트 분획은 20.63 µg/mL, 아글리콘 분획은 17.00 µg/mL 순으로 라디칼 소거활성이 증가하였다. 그중 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획의 라디칼 소거활성은 세포막



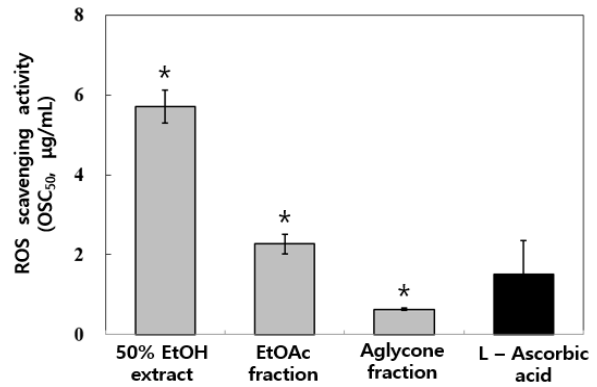
**Figure 2.** Free radical scavenging activities of extract and its fractions from *M. oleifera* leaves and reference. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$  compared with (+)- $\alpha$ -tocopherol.

의 중요한 지용성 항산화제로 알려져 있는 (+)- $\alpha$ -tocopherol (FSC<sub>50</sub> = 8.98  $\mu$ g/mL) 보다는 약간 작지만 여전히 상당히 상당한 수준의 라디칼 소거 활성이 있음을 보여주었다.

### 3.2.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> 및 •OH과 같은 다양한 ROS가 존재한다. Luminol은 ROS와의 반응을 통해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산으로 전환되며, 다시 바닥상태로 떨어지면서 420 ~ 450 nm에서 빛을 방출한다. 항산화제에 의해 ROS가 소거되면 luminol이 아미노프탈산으로 전환되는 양이 감소하며 따라서 화학발광은 감소하게 된다.

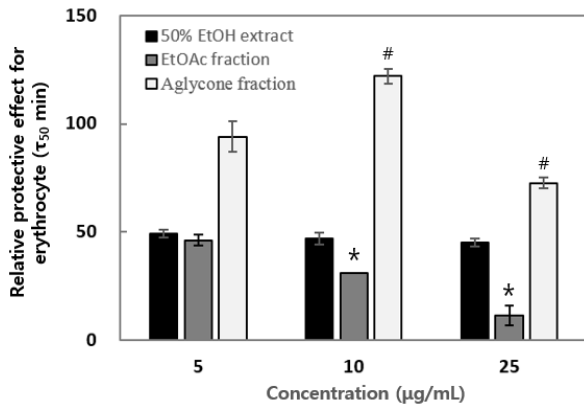
본 실험에서는 루미놀을 이용하여 드럼스틱 잎 추출물과 분획의 활성산소 소거능을 비교 평가하였다 (Figure 3). 비교 물질로는 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였다. 총 항산화능은 OSC<sub>50</sub>으로 나타났다. 드럼스틱 잎 50% 에탄올 추출물의 OSC<sub>50</sub>은 5.71  $\mu$ g/mL, 에틸아세테이트 분획 2.27  $\mu$ g/mL, 아글리콘 분획 0.63  $\mu$ g/mL 순으로 총 항산화능이 증가하는 경향을 나타냈다. 대조군인 L-ascorbic acid (1.50  $\mu$ g/mL)과 비교하였을 때, 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획은 총 항산화능이 조금 낮았으나, 아글리콘 분획은 L-ascorbic acid 보다도 약 2.4배 정도 더 큰 활성을 나타냈다.



**Figure 3.** Reactive oxygen species scavenging activities of 50% ethanol extract and its fractions from *M. oleifera* leaves and reference in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$  compared with L-ascorbic acid.

3.2.3. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포 보호 효과  
피부에 자외선이 조사되면 피부에 존재하는 광증감제(porphyrin 또는 riboflavin)에 의해 다양한 ROS가 생성된다. 그중 singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)은 반응성이 매우 큰 활성산소종으로 광증감 반응의 주 생성물이다. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>를 포함한 ROS는 피부 항산화 방어막을 붕괴시키고 세포막 구성 성분인 인지질을 산화시켜 지질 과산화 반응을 개시한다. 이러한 자동산화반응에 의해 세포막이 손상되고 세포는 파괴된다. 따라서 적혈구 세포를 이용한 광용혈 실험을 통해 활성산소에 의한 세포 손상을 방어하는 항산화제의 세포보호 효과를 측정할 수 있다. 본 실험에서는 rose bengal로 유도된 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>에 의한 세포 손상에 대하여 드럼스틱 잎 추출물의 항산화 능력을 평가하였다.

적혈구 파괴에 대한 세포보호효과를 추출물과 분획을 농도별로 비교하여 그래프로 나타내었다(Figure 4). 세포보호 효과는 적혈구가 50% 용혈되는 데 걸리는 시간인  $\tau_{50}$ 으로 나타내었다. 드럼스틱 잎 추출물과 분획을 5, 10 및 25  $\mu$ g/mL의 농도로 적혈구 광용혈 실험에 사용하였다. 그 결과 드럼스틱 잎 50% 에탄올 추출물은 5, 10 및 25  $\mu$ g/mL의 농도에서  $\tau_{50}$ 이 각각 49.1, 46.9 및 45.3 min로 세포 보호효과를 나타냈으나 농도 의존성은 보이지 않았다. 에틸아세테이트 분획은 46.1, 31.0 및 11.4 min으로 농도가 증가할수록 용혈을 촉진하는 것으로 나타났다. 아글리콘 분획은  $\tau_{50}$ 이 각각 94.1, 122.1 및 72.1 min으로 25  $\mu$ g/mL를 제외하고 농도



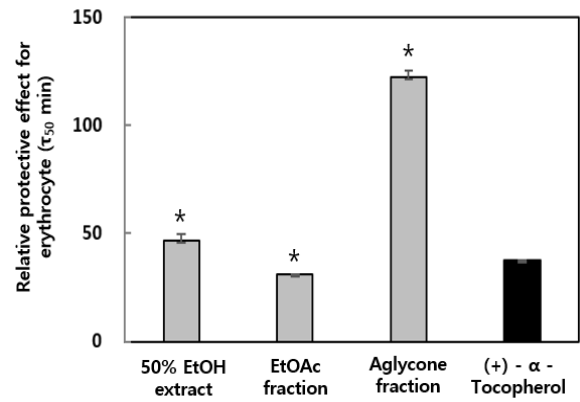
**Figure 4.** Cellular protective effects of extract and its fractions from *M. oleifera* leaves on rose-bengal sensitized photohemolysis of erythrocytes. Data are presented as mean ± S.D. \**p* < 0.05 compared with concentration of 5 μg/mL in ethyl acetate fraction dose-treated groups, #*p* < 0.05 compared with concentration of 5 μg/mL in aglycone fraction dose-treated groups.

의존적으로 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 10 μg/mL 농도에서 세포보호 효과를 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 비교한 결과, 에틸아세테이트 분획(31.0 min) < (+)- $\alpha$ -tocopherol (37.7 min) < 50% 에탄올 추출물(46.9 min) < 아글리콘 분획(122.1 min) 순으로 나타났으며 50% 에탄올 추출물과 아글리콘 분획은 대조군인 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다 높은 세포보호 효과를 나타냈다(Figure 5). DPPH와 총 항산화능 결과를 볼 때 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 농도가 증가하면서 항산화 활성은 증가하였다. 반면 세포를 대상으로 하는 실험에서 아글리콘 분획은 5, 10 μg/mL 농도에서는 농도 의존적으로 세포보호 효과가 나타났지만 에틸아세테이트 분획일 경우에는 세포보호 작용을 상쇄하여 오히려 세포막 파괴를 촉진시키는 작용을 나타냈다.

### 3.3. UVB로 유도된 HaCaT 세포 손상에 대한 세포보호 효과

#### 3.3.1. 드림스틱 잎 분획 처리에 따른 세포독성 평가

MTT 방법으로 드림스틱 잎 추출물 분획물의 HaCaT 세포에 대한 세포 독성을 확인함으로써 실험에 사용할 시료의 농도를 결정하였다. 0.20 ~ 100.00 μg/mL의 드림스틱 분획물을 HaCaT 세포에 24 h 처리하고 세포생존율을 확인한 결과, 1.56 μg/mL까지는 세포 독성을



**Figure 5.** Cellular protective effects of extract and its fractions from *M. oleifer* leaves and (+)- $\alpha$ -tocopherol at 10 μg/mL on the photohemolysis of erythrocytes. Data are presented as mean ± S.D. \**p* < 0.05 compared with (+)- $\alpha$ -tocopherol.

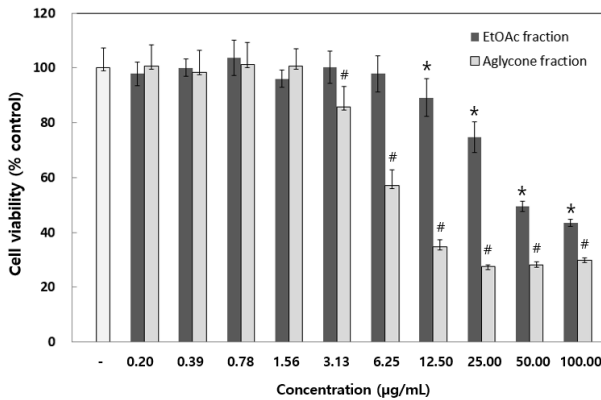
나타내지 않았다(Figure 6). 따라서 본 연구에서는 드림스틱 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획의 세포보호 효과를 측정할 때 최고 농도를 1.56 μg/mL로 설정하였다.

#### 3.3.2. UVB 조사량에 따른 HaCaT 세포 생존율

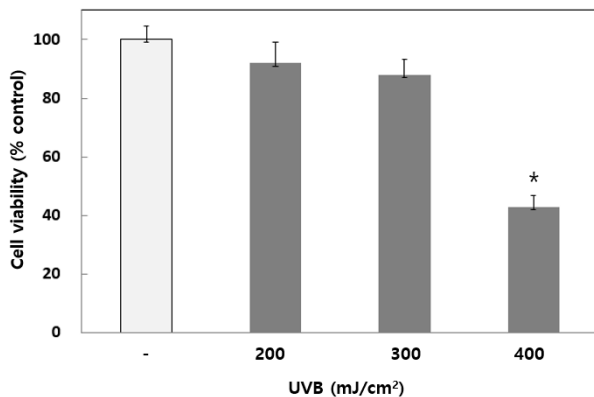
UVB를 HaCaT 세포에 200, 300 및 400 mJ/cm<sup>2</sup>로 각각 조사한 후 세포 생존율을 관찰하였다. UVB를 200 및 300 mJ/cm<sup>2</sup>로 조사한 군은 자외선을 조사하지 않은 군에 비해 각각 92%, 88%의 세포 생존율을 나타내었고, 400 mJ/cm<sup>2</sup> 처리한 군은 약 40%의 생존율을 나타내었다(Figure 7). 따라서 본 연구에서는 UVB 조사량을 400 mJ/cm<sup>2</sup>로 설정하였다.

#### 3.3.3. UVB로 유도된 세포 손상에 대한 드림스틱 분획물의 세포 보호 효과

피부가 자외선에 노출되면 ROS가 생성된다. 피부에서의 ROS의 생성은 세포의 구성 성분인 지질, 단백질 및 DNA를 손상시키고 콜라겐 섬유와 같은 매트릭스 조직을 파괴함으로써 피부노화를 가속화 시킨다. 그러므로 ROS 소거작용이 있는 항산화물질은 피부노화를 억제할 수 있다[20,21]. 본 연구에서는 항산화 활성이 큰 드림스틱 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획이 UVB로 유도된 HaCaT 세포의 산화적 손상에 대한 세포보호 효과가 있는지를 확인하였다. 실험 결과, UVB를 조사한 실험군은 조사하지 않은 군에 비

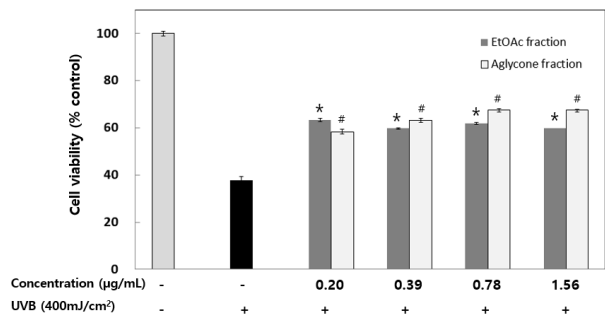


**Figure 6.** Effects of fractions obtained from *M. oleifera* leaves extracts on HaCaT cells viability. HaCaT cells were treated with different concentration of ethyl acetate fraction and aglycone fraction for 24 h, and cytotoxicity was then determined by the MTT assay. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. \* $p$  < 0.05 compared with untreated control in ethyl acetate fraction dose-treated groups, # $p$  < 0.05 compared with untreated control in aglycone fraction dose-treated groups.



**Figure 7.** Cell viability on UVB-induced cell damage in HaCaT cells. HaCaT cells were irradiated with 200, 300, 400 mJ/cm<sup>2</sup> UVB and stained with MTT to show survival cells. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. \* $p$  < 0.05 compared with UVB-untreated control.

하여 38%의 생존율을 나타내었다. UVB 조사 후 0.20, 0.39, 0.78 및 1.56  $\mu\text{g/mL}$  농도의 에틸아세테이트 분획을 HaCaT 세포에 24 h 처리하였을 때, 세포 생존율은 각각 63, 60, 62 및 60%로 증가하였다. 즉 드림스틱 잎 추출물 중 에틸아세테이트 분획은 UVB 조사에 의한 세포손상을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 0.20, 0.39, 0.78 및 1.56  $\mu\text{g/mL}$  농도의 드림스틱



**Figure 8.** Protective effects of fractions obtained from *M. oleifera* leaves extracts against UVB-mediated decreased cell viability in HaCaT cells. HaCaT cells were treated with different concentration of ethyl acetate fraction and aglycone fraction from *M. oleifera* for 24 h after being exposed to oxidative stress. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. \* $p$  < 0.05 compared with untreated control in ethyl acetate fraction dose-treated groups, # $p$  < 0.05 compared with untreated control in aglycone fraction dose-treated groups.

잎 추출물로부터 얻은 아글리콘 분획을 처리한 경우는 세포 생존율이 58, 63, 67 및 68%로 UVB만을 조사한 대조군에 비해 농도 의존적으로 UVB로 유도된 세포 손상에 대한 보호효과를 나타냈다(Figure 8).

#### 4. 결 론

본 연구에서는 드림스틱 잎 추출물과 분획물의 항산화 및 세포보호 효과를 조사하였다. DPPH법을 이용하여 드림스틱 잎 추출물과 분획별 자유 라디칼 소거 활성(FSC<sub>50</sub>)을 측정된 결과, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 FSC<sub>50</sub>가 각각 20.63 및 17.00  $\mu\text{g/mL}$ 으로 큰 라디칼 소거활성을 나타냈다. 루미놀을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서 드림스틱 잎 추출물의 활성산소 소거 활성(OSC<sub>50</sub>)은 드림스틱 잎 추출물과 분획 중에서 아글리콘 분획(OSC<sub>50</sub> = 0.63  $\mu\text{g/mL}$ )이 가장 큰 것으로 나타났다. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구의 파괴에 대한 드림스틱 잎 추출물과 분획의 세포보호 효과( $\tau_{50}$ ) 또한 아글리콘 분획( $\tau_{50}$  = 122.1 min)에서 가장 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 이는 대조군인 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다도 2.4배나 더 큰 세포보호 효과를 나타냈다. 각질형성세포인 HaCaT 세포에 자외선(UVB)을 조사했을 때 세포생존율은 약 38% 정도 감소하였으며, UVB 조사 후 드림스틱 잎 분획물을 HaCaT 세포에 처



리하였을 때 UVB로 감소되었던 세포생존율이 유의적으로 증가함을 확인하였다.

결론적으로 드럼스틱 잎 추출물과 분획들은 ROS 및 자외선(UVB)으로부터 세포를 보호하는 천연 기능성 항산화 소재로서 화장품에의 응용 가능성이 있음을 시사하였다.

### Acknowledgement

이 연구는 2016년 서울과학기술대학교 교내연구비의 지원으로 수행되었습니다.

### Reference

1. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
2. M. Wlaschek, I. Tantcheva-Poor, L. Naderi, W. J. Ma, A. Schneider, Z. Razi-Wolf, J. Schuller, and K. Scharffetter-Kochanek, Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J. Photochem. Photobiol.*, **63**(1-3), 41 (2001).
3. D. Bernhard, C. Moser, A. Backovic, and G. Wick, Cigarette smoke - an aging accelerator?, *Exp. Gerontol.*, **42**(3), 160 (2007).
4. B. A. Gilchrest, Skin aging and photoaging - an overview, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**(3), 610 (1989).
5. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(3), 75 (1997).
6. Y. Al-Nuaimi, M. J. Sherratt, and C. E. Griffiths, Skin health in older age, *Maturitas*, **79**(3), 256 (2014).
7. J. Wohlrab, K. Hilpert, and L. Wolff, Epidermal aging and anti-aging strategies, *Hautarzt*, **67**(2), 107 (2016).
8. S. N. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, N. R. Jo, and M. H. Lee, *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts, *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**, 680 (2012).
9. C. Waterman, D. M. Cheng, P. Rojas-Silva, A. Poulev, J. Dreifus, M. A. Lila, and I. Raskin, Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation *in vitro*, *Phytochemistry*, **103**, 114 (2014).
10. R. S. G. Singh, P. S. Negi, and C. Radha, Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour, *J. Funct. Foods*, **5**(4), 1883 (2013).
11. W. Nouman, F. Anwar, T. Gull, A. Newton, E. Rosa, and R. Domínguez-Perles, Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam, *Ind. Crops Prod.*, **83**, 166 (2016).
12. M. Kurokawa, A. Wadhwani, H. Kai, M. Hidaka, H. Yoshida, C. Sugita, W. Watanabe, K. Matsuno, and A. Hagiwara, Activation of cellular immunity in herpes simplex virus type 1-infected mice by the oral administration of aqueous extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves, *Phytother. Res.*, **30**(5), 797 (2016).
13. P. R. Bhutada, A. J. Jadhav, D. V. Pinjari, P. R. Nemade, and R. D. Jain, Solvent assisted extraction of oil from *Moringa oleifera* Lam. seeds, *Ind. Crops Prod.*, **82**, 74 (2016).
14. S. Sreelatha and P. R. Padma, Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity, *Plant. Foods Hum. Nutr.*, **64**(4), 303 (2009).
15. J. O. Palafox, A. Navarrete, J. C. Sacramento-Rivero, C. Rubio-Atoche, P. A. Escoffie, and J. A. Rocha-Urbe, Extraction and characterization of oil from *Moringa oleifera* using supercritical CO<sub>2</sub> and traditional solvents, *Am. J. Anal. Chem.*, **3**(12A), 946 (2012).
16. S. K. Roy, K. Chandra, K. Ghosh, S. Mondal, D. Maiti, A. K. Ojha, D. Das, I. Chakraborty, and S. S. Islam, Structural investigation of a heteropolysaccharide isolated from the pods (fruits) of *Moringa oleifera* (Sajina), *Carbohydr. Res.*, **342**(16), 2380 (2007).
17. T. Ramabulana, R. D. Mavunda, P. A. Steenkamp, L. A. Piater, I. A. Dubery, and N. E. Madala, Perturbation of pharmacologically relevant poly-

- phenolic compounds in *Moringa oleifera* against photo-oxidative damages imposed by gamma radiation, *J. Photochem. Photobiol. B*, **156**, 79 (2016).
18. P. Siddhuraju, A. Abirami, G. Nagarani, and M. Sangeethapriya, Antioxidant capacity and total phenolic content of aqueous acetone and ethanol extract of edible parts of *Moringa oleifera* and *Sesbania grandiflora*, *IJRSE*, **8**(9), 1091 (2014).
  19. M. Kim, Y. G. Park, H. J. Lee, S. J. Lim, and C. W. Nho, Youngiasides A and C isolated from *Youngia denticulatum* inhibit UVB-induced MMP expression and promote type I procollagen production via repression of MAPK/AP-1/NF-kappaB and activation of AMPK/Nrf2 in HaCaT cells and human dermal fibroblasts, *J. Agric. Food Chem.*, **63** (22) 5428 (2015).
  20. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
  21. Y. R. Helfrich, D. L. Sachs, and J. J. Voorhees, Overview of skin aging and photoaging, *Dermatol. Nurs.*, **20**, 177 (2008).