

인체 섬유아세포에서 인동덩굴 추출물의 MMP-1 생성 억제효과

정연수[†] · 이진영 · 고재영

(주)아모레퍼시픽 기술연구원

(2020년 3월 13일 접수, 2020년 3월 25일 수정, 2020년 3월 27일 채택)

Inhibitory Effect of *Lonicera japonica* Extract on MMP-1 Production in Human Dermal Fibroblast

Yeon Su Jeong[†], Jin Young Lee, and Jaeyoung Ko

AmorePacific R&D Center, 1920, Yonggu-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, 17074, Korea

(Received March 13, 2020; Revised March 25, 2020; Accepted March 27, 2020)

요약: 본 연구에서는 사람 피부 섬유아세포에서 콜라겐을 파괴하는 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)을 억제하는 새로운 항노화 천연물을 얻고자 하였다. 50 여종의 생약추출물을 스크리닝 한 후 그 중 인동덩굴 추출물을 선정하여 본 연구를 수행하였다. 인동 줄기를 70% 에탄올로 추출한 후 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 차례로 용매 분획을 하였다. 에틸아세테이트층 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 부탄올층 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의적으로 MMP-1 생성을 억제하였다. 이 효능 성분들을 모두 포함하는 분획을 얻기 위해 HP20 레진 컬럼 크로마토그래피를 통해 80% 에탄올 분획을 얻었다(LJ F80). LJ F80과 지표성분 loganin은 농도의존적으로 MMP-1 생성을 억제하였으며 그 활성을 비교하였을 때 같은 농도에서 LJ F80이 더 억제효과가 높게 나타났다. 이 분획에 대한 안정도를 각각 4 $^{\circ}\text{C}$, 상온, 40 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 HPLC로 분석하여 16 주간 평가하였다. Loganin을 기준으로 하여 초기값 대비 $\pm 10\%$ 내외의 안정도를 유지하였다. 따라서 인동의 LJ F80은 피부주름개선효과를 나타내는 유효 화장품 원료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

Abstract: In this study, we attempted to obtain an active ingredient that inhibits the production of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) that breaks down collagen in human skin fibroblasts. More than 50 plant extracts were screened, and *Lonicera japonica* was selected for this study. The stem of *L. japonica* was extracted with 70% ethanol and fractions with solvents in the order of hexane, ethyl acetate, and butanol. MMP-1 production were significantly inhibited at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the ethyl acetate layer and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the butanol layer. To get a fraction containing all of these effective components, 80% ethanol fraction (LJ F80) was obtained through HP20 resin column chromatography. The reference substance, loganin and LJ F80 inhibited dose-dependently MMP-1 production. At the same concentration, LJ F80 showed a higher inhibitory effect than loganin. The stability of this fraction was analyzed with HPLC while kept storing at 4 $^{\circ}\text{C}$, room temperature, and 40 $^{\circ}\text{C}$, for 16 week. The stability was maintained as $\pm 10\%$ of initial value with reference loganin. Therefore, it is thought that LJ F80 of *L. japonica* may be used to improve wrinkles.

Keywords: *Lonicera japonica*, Matrix metalloproteinase-1, Loganin, Stability, Anti-wrinkle

[†] 주 저자 (e-mail: ysu152@amorepacific.com)
call: 031-280-5924

1. 서 론

피부는 나이가 들어감에 따라 혹은 외부 자외선, 미세먼지 등의 자극원에 의해 여러 인자들을 분비하는데 피부의 진피세포는 이에 세포 외 기질 단백질 분해 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)를 분비하여 콜라겐, 엘라스틴 섬유 등의 기질단백질을 분해시킨다. 특히 콜라겐은 피부의 기질 구조의 대부분을 차지하여 이런 분해효소에 의해 감소되면 피부에 주름이 발생하고 탄력이 떨어지게 된다. 특히, MMP-1은 진피의 섬유아세포에 의해 생성되어 Type I, II, III 콜라겐을 분해하는 작용을 하므로 MMP-1을 억제하는 물질을 규명하기 위한 연구가 수행되고 있다[1-3]. 본 연구에서는 다양한 생약 추출물 50 여종의 추출물 라이브러리로부터 MMP-1 억제효과에 대해서 스크리닝하였고, 후보식물 중 하나인 인동덩굴 추출물을 선정하여 연구를 진행하였다.

인동(忍冬)덩굴(*Lonicera japonica* Thunberg, honeysuckle)은 인동과 (*Caprifoliaceae*)에 속하는 덩굴성 식물이다. 인동은 줄기와 잎이 추운 겨울에도 시들지 않기 때문에 지어진 이름으로 이의 꽃은 금은화라고 하는데 꽃잎이 흰색을 띠다가 차차 노란색으로 변해서 흰색과 노란색이 동시에 보여 붙여진 이름이다. 금은화는 약용으로 기침감기, 장염, 후두염 등에 사용되어 왔고 항산화, 항염효과가 보고되었다[4,5]. 인동덩굴의 줄기는 예로부터 인동등으로 불리며 약용으로는 잎과 덩굴성 줄기를 해열, 해독, 종기 등에 사용해 왔다[4]. 그 밖에 약리작용은 신경세포 보호작용[6], 영실과 함께 소염, 진통작용이 보고되었다[7]. 인동에는 140 개 이상의 화합물이 분리 보고되었고 주요한 작용으로는 항염, 항균 항바이러스, 항산화, 간보호 효과 등이 알려져 있다[8-10]. 인동의 잎에서는 di-O-caffeoylquinic acid 유도체들과 secoxyloganin, luteoside의 항균효과가 보고되었다[11]. 인동의 피부와 관련된 효능은 항염, 미백효과가 알려져 있는데, 인동의 전초로부터 분리된 sweroside는 loganin과 같이 iridoid glycoside 성분으로 멜라닌 합성에 관여하는 효소의 발현을 조절하여 미백효과가 나타나는 것으로 보고되었다[12].

본 연구에서는 인동덩굴 추출물에서 세포 외 기질을 파괴하는 효소를 억제하는 유효성분 분획을 얻고 그 안정도를 평가하여 주름 개선 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 인동덩굴(*L. japonica*)은 강원 고성에서 채취된 것을 구입하여 사용하였다((주)토종마을, Korea). 용매인 에탄올, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올(삼전화학, Korea), HPLC 용 물, 아세토나이트릴(Burdick & Jackson, Korea)과 트리플루오로아세트산(TFA, Sigma, USA), 로가닌(loganin, TCI Chemicals, Japan), 페니실린과 스트렙토마이신(GibcoBRL, USA)을 사용하였다. 인체 섬유아세포 (normal human dermal fibroblast), 인체각질세포인 HaCaT 세포와 배지 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fibroblast basal medium (FBM), fetal bovine serum (FBS)은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)을 통해 구입하였다.

2.2. 용매 분획 및 레진 분획 제조

인동덩굴의 줄기 100 g을 10 배수의 70% 에탄올에 넣고 초음파로 30 min 추출한 후 24 h 동안 냉침하였다. 위 과정을 2 번 반복하여 필터 한 후 감압 농축하였다. 1 L의 증류수를 넣어 분산한 후 동량의 헥산을 넣어 분획하여 헥산층을 감압 농축하였다. 차례로 에틸아세테이트, 부탄올을 사용하여 동일한 방법으로 층을 나누었다.

위와 동일한 방법으로 70% 에탄올 층을 조제하여 1 L 증류수에 녹여 HP20 (Diaion, Mitsubishi Chemical, Japan) 레진이 충전된 컬럼을 통과시키고 증류수를 충분히 흘려 주어 당을 제거하였다. 80% 에탄올을 2 L 흘려주어 용출된 것을 감압농축하여 시료(LJ F80)로 하였다.

2.3. 세포배양

인체 섬유아세포를 배양 플라스크에 페니실린 (100 U/mL), 스트렙토마이신 (100 µg/mL), 보조제를 함유하는 FBM 배지를 넣고 37 °C, 5% CO₂를 포함하는 배양기내에서 배양한다. HaCaT 세포는 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지를 넣고 37 °C, 5% CO₂를 포함하는 배양기내에서 배양한다.

2.4. 세포독성

96 well plate에 인체섬유아세포를 6 × 10³cells/well씩 분주한 후, 24 h 동안 세포가 plate에 잘 붙도록 37 °C, 5% CO₂세포 배양기에 배양한다. 보조제를 포함하지 않은 FBM 배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어 준

후, 다음날 시료를 농도별로 처리하여 24 h 배양한다. 세포에 WST-1 solution (EZ-cytox, Korea)을 처리하여 반응시키고, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader로 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

2.5. Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) 생성량 측정

6 well plate에 HaCaT 세포를 2.5×10^5 cells/well씩 분주한 후, 세포 배양조건에서 24 h 배양한다. FBS를 포함하지 않은 DMEM배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어 준 후 UV (20 ml/cm², Dermlight cube 401, USA)를 처리해 배양하여 UV 자극을 받은 배양액 (UV irradiated-conditioned media, UV-CM)을 만든다.

96 well plate에 인체섬유아세포를 6×10^3 cells/well씩 분주한 후, 세포 배양조건에서 24 h 배양한다. 보조제를 포함하지 않은 FBM 배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어 준 후, UV-CM를 시료와 함께 인체섬유아세포에 처리하여 24 h 배양한다. MMP-1 ELISA kit (R&D systems, USA)를 이용하여 배양액의 MMP-1 생성량을 측정한다. 최종 MMP-1의 양은 일정 단백질당 MMP-1 양으로 환산하여 음성대조군과 비교한다[13]. 양성 대조물질은 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG, Wako, Japan)를 사용하였다.

2.6. 안정도 평가

LJ F80분획 10% 고형분 농도로 40% 부틸렌 글리콜에 조제하여 각각 4 °C, 상온 (RT), 40 °C에 보관하였다. 그

안정도를 loganin을 지표물질로 사용하여 분석하였다. 용매조건은 0.1% TFA를 함유한 물과 아세트나이트릴 조건으로 컬럼은 C₁₈ 250 × 4.6 mm를 사용하여 Waters 2695/2998 (HPLC-PDA)를 이용하여 분석하였다 (Table 1). 각 시료는 초기값 대비 지표물질 loganin 함량 %를 기준으로 평가하였다.

2.7. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서 각 실험군과 대조군간 평균은 t-test로 분석하여 p-value 값이 대조군과 비교하여 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. MMP-1 생성 억제

인동덩굴의 MMP-1 억제 활성 물질을 많이 포함하고 있는 분획을 찾고자 70% 에탄올로 추출한 후 각각 극성에 따라 hexan, 에틸아세테이트, 부탄올로 용매분획을 나누었다. Figure 1과 같이 농도별로 세포독성을 평가하였을 때 세포독성이 나타나지 않는 최대농도에서 그 활성을 평가하였고 효능이 알려진 EGCG를 양성 효능 대조물질로 사용하였다. 70% 에탄올 추출물은 800 µg/mL 농도부터 농도의존적으로 MMP-1 생성을 억제하였다. hexan층의 경우는 50 µg/mL의 경우 오히려 생성을 증가시키는 경향을 보였으며 에틸아세테이트층 50 µg/mL의 경우와 부탄올층 200 µg/mL 농도에서는 유의적으로 MMP-1 생

Table 1. Analytical Condition of HPLC

Instrument	Waters 2695/2998		
Column	Phenomenex Luna C18(2) 4.6 × 250 mm, 5 µm		
Mobile phase	A: 0.1% trifluoroacetic acid in water B: 0.1% trifluoroacetic acid acetonitrile		
	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
Gradient condition	0	90	10
	5	90	10
	30	2	98
	35	2	98
	40	90	10
Flow rate	1.0 mL/min		
Detection	254 nm		
Injection volume	10 µL		

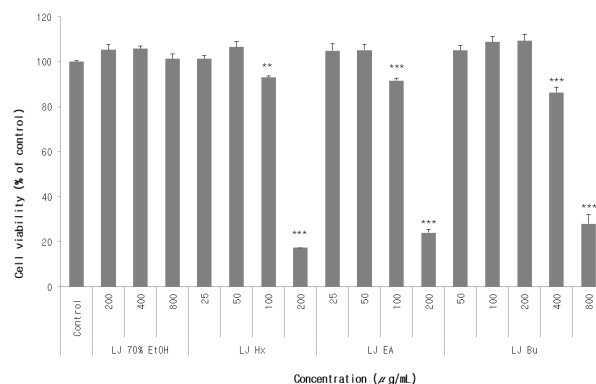


Figure 1. The cell viability of human dermal fibroblast incubated with *L. japonica* fractions. Each value represents the mean ± SD of triplicates and percentages of control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with control.

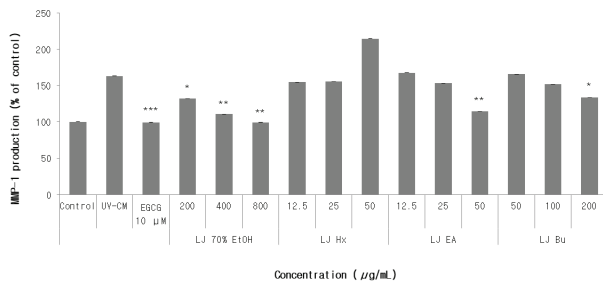


Figure 2. MMP-1 production in human dermal fibroblast incubated with *L. japonica* fractions. Each value represents the mean \pm SD of triplicates and percentages of control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with UV-CM control.

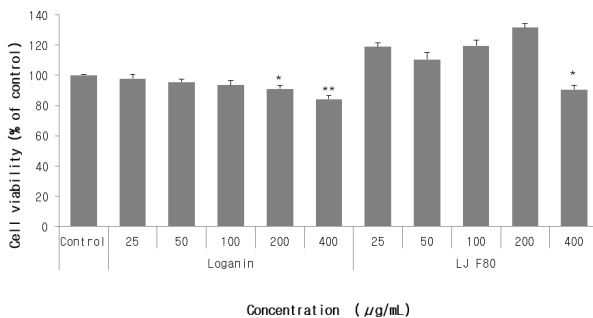


Figure 3. The cell viability of human dermal fibroblast incubated with *L. japonica* fraction, LJ F80. Each value represents the mean \pm SD of triplicates and percentages of control. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with control.

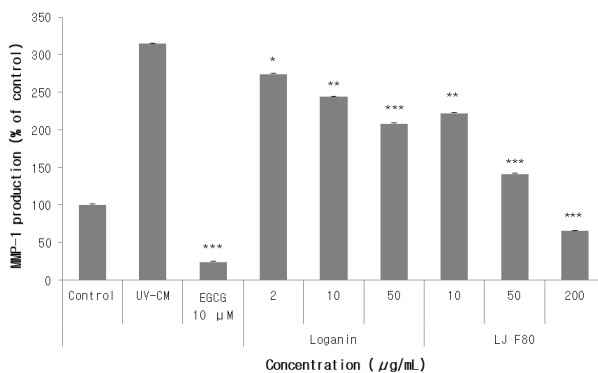


Figure 4. MMP-1 production in human dermal fibroblast incubated with *L. japonica* fraction, LJ F80. Each value represents the mean \pm SD of triplicates and percentages of control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with UV-CM control.

성을 억제하였다(Figure 2). 이를 통해 70% 에탄올 추출물의 활성 성분이 에틸아세테이트층과 부탄올층에 동시에 존재함을 알 수 있었고 활성성분을 동시에 포함하는 분획을 얻기 위해 HP20레진을 이용하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 당과 같은 수용성 성분을 제외하고 80% 에탄올로 용출시킨 LJ F80의 분획을 이용하여 세포독성을 확인한 후 독성이 없는 농도에서 MMP-1 생성 억제 효능을 평가하였다. LJ F80은 Figure 3와 같이 200 μ g/mL 농도까지 세포독성을 나타내지 않았고 50 μ g/mL, 10 μ g/mL 농도 의존적으로 유의적인 억제활성을 나타내었다(Figure 4). 또한 지표성분인 logenin과 비교하였을 때 같은 농도인 50 μ g/mL, 10 μ g/mL에서 LJ F80이 더 MMP-1 억제효과가 좋은 것으로 나타났다. Logenin은 산수유(*Cornus officinalis*)에도 들어있는 성분으로 산수유는 항산화, 피부 주름 개선 효능이 보고되었으며 logenin의 콜라겐 합성 증가, TNF- α 자극에 의한 MMP-1 생성억제 효능이 알려져 있다[14,15]. 본 연구에서 자외선에 의해 실제 피부에서 일어나는 환경을 잘 반영하기 위해서 각질 형성세포에 자외선을 처리하여 다양한 사이토카인 분비가 일어난 조건 배지를 이용하여 섬유아세포에서 MMP-1 생성을 증진시켰다. 따라서 LJ F80의 활성이 동일농도에서 logenin보다 MMP-1 억제 효과가 높게 나타난 것은 LJ F80에 logenin과 인동 덩굴의 다른 성분들이 자외선 자극에 따라서 피부에서 일어나는 다양한 반응을 조절 할 수 있었을 것으로 추측해 볼 수 있다.

3.2. HPLC 분석결과 및 안정도 확인

인동덩굴 분획 LJ F80의 HPLC 분석조건을 Table 1과 같이 설정하여 지표 물질 logenin과 LJ F80 분획을 분석하였다. Figure 5에서와 같이 logenin은 11.6 min의 피크 머무름 시간을 나타내었으며, 254 nm 파장에서 LJ F80 분획 중 logenin이 가장 높은 흡광도를 나타내었다. 농도 단계별로 희석한 logenin 흡광도로 검량선을 구한 후 LJ F80 분획 보관조건별 시료의 흡광도를 비교하여 그 안정도를 평가하였다. 4 $^{\circ}$ C, 상온 (RT), 40 $^{\circ}$ C에 보관조건에서 같은 경향을 나타내었는데, 4 주를 제외한 8 주, 16 주까지 초기값 대비 $\pm 10\%$ 정도 수준의 안정도를 유지하였다(Figure 6). 4 주차의 감소는 8 주차에서 유지되는 것으로 볼 때 시료처리 오차로 보여진다. 색과 취는 4 $^{\circ}$ C, 상온에서 변화 없었고, 40 $^{\circ}$ C 보관조건에서 8 주차부터 색이 약간 진해지는 경향을 보였으나 취의 변화는 없었다. 원

료화를 위해서는 항산화제등 변색방지제를 첨가하여 추가적인 안정성을 평가하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

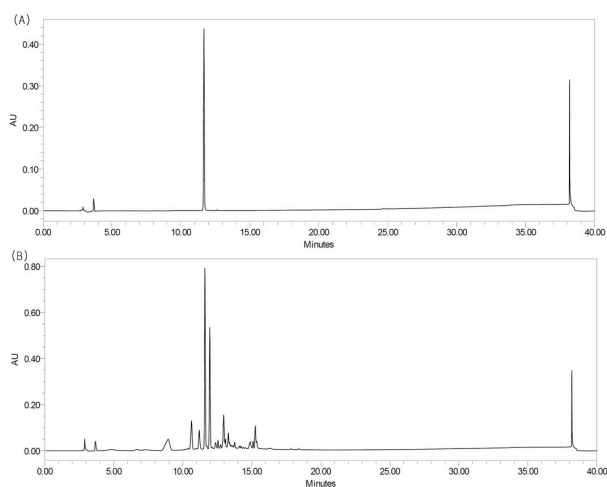


Figure 5. The HPLC chromatographs of *L. japonica* fraction and loganin. (A) Standard (loganin), (B) LJ F80 fraction. The separation conditions are described in Section 2.2.

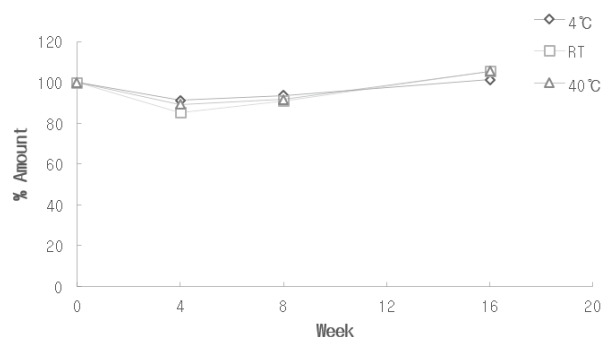


Figure 6. The stability of *L. japonica* fraction, LJ F80. Each value represents the mean of duplicates and percentages of initial value.

4. 결론

인동등으로 불리는 인동덩굴의 줄기는 다양한 약리작용을 가지고 있어 예로부터 해열, 소염 등의 약재로 쓰여져 왔다. 본 연구에서는 생약추출물 라이브러리로부터 항염 효과가 있는 생약 중 하나인 인동덩굴을 선정하고 주름 개선 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다. 인동덩굴의 추출물로부터 HP20 크로마토그래피 공정을 통해 얻은 LJ F80의 유의적인 MMP-1 생성 억제효능을 확인하였

다. LJ F80은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 피부섬유아세포에서 음성 대조군 수준의 MMP-1를 보여 충분한 효능을 가진 것으로 보인다. 또한 예비적인 안정도 테스트에서 16 주까지 그 안정도가 유지되고 있어 피부 주름 개선 효과를 나타내는 유효 화장품 원료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

Reference

1. C. Garg, P. Khurana, and M. Garg, Molecular mechanisms of skin photoaging and plant inhibitors, *Int. J. Green Pharm.*, **11**(2), S218 (2017).
2. P. K. Mukherjee, N. Maity, N. K. Nema, and B. K. Sarkar, Bioactive compounds from natural resources against skin aging, *Phytomedicine*, **19**(1), 64 (2011).
3. I. Binic, V. Lazarevic, M. Ljubenovic, J. Mojsa, and D. Sokolovic, Skin ageing: natural weapons and strategies, *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, Article ID827248 (2013).
4. S. G. Song, Illustrated medicinal herb book, eds. Y. B. Ahn, 556, Nexus Co., Seoul (2010).
5. H. F. Hsu, P. C. Hsiao, T. C. Kuo, S. T. Chiang, S. L. Chen, S. J. Chiou, X. H. Ling, W. Y. Cheng, and J. Y. Houg, Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* Thunb. var. *sempervillosa* Hayata flower bud extracts prepared by water, ethanol and supercritical fluid extraction techniques, *Ind. Crops Prod.*, **89**, 543 (2016).
6. J. B. Weon, H. J. Yang, B. Lee, B. R. Yoon, and C. J. Ma, Neuroprotective compounds isolated from the methanolic extract of *Lonicera japonica* in glutamate-injured primary rat cortical cells, *Pharmacogn. Mag.*, **7**(28), 284 (2011).
7. B. C. Y. Cheng, H. Yu, T. Su, X. Q. Fu, H. Guo, T. Li, H. H. Cao, A. K. W. Tse, H. Y. Kwan, and Z. L. Yu, A herbal formula comprising *Rosae Multiflorae* Fructus and *Lonicerae Japonicae* Flos inhibits the production of inflammatory mediators and the IRAK-1/TAK1 and TBK1/IRF3 pathways in RAW264.7 and THP-1 cells, *J. Ethnopharmacol.*, **174**, 195 (2015).
8. X. Shanga, H. Pana, M. Li, X. Miaoa, and H. Ding,

- Lonicera japonica* Thunb.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine, *J. Ethnopharmacol.*, **138**(1), 1 (2011).
9. Y. D. Wang, Y. He, Z. Dai, S. Kang, J. Zhang, and S. C. Ma, A comparative study on bioactive constituents in different parts of *Lonicera japonica* determined by HPLC ESI-MS(n), *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **18**(10), 988 (2016)
 10. R. Ma, Z. Yin, C. Zhang, and W. Ye, Chemical constituents from n-butanol extract of the stems of *Lonicera japonica*, *J. China Pharm. Univ.*, **41**(4), 333 (2010).
 11. J. Xiong, S. Li, W. Wang, Y. Hong, K. Tang, and Q. Luo, Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. leaves, *Food Chem.*, **138**(1), 327 (2013).
 12. Y. T. Jeong, S. C. Jeong, J. S. Hwang, and J. H. Kim, Modulation effects of sweroside isolated from the *Lonicera japonica* on melanin synthesis, *Chem. Biol. Interact.*, **238**, 33 (2015).
 13. J. Lee, C. H. Myung, J. E. Lee, M. R. Jo, H. S. Kim, N. Y. Lee, H. Woo, J. You, H. J, and J. S. Hwang, Anti-inflammatory and moisturizing effect of *Centella* extracts fermented in Jeju lava water, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **45**(4), 363 (2019).
 14. Korea Patent 10-0036929 (2012).
 15. Korea Patent 10-0042212 (2016).