

예덕나무 피 추출물의 노화 방지 효과에 관한 연구

이 강 태[†] · 이 정 노 · 안 기 웅 · 정 지 현 · 조 병 기

(주)코리아나 화장품 연구소

The Study on the Anti-aging Effects of *Mallotus japonicus* Bark Extracts

Kang Tai Lee[†], Jeong No Lee, Gi Woong Ahn, Ji Hean Jeong, and Byoung Kee Jo

R&D Center, Coreana Cosmetics, 204-1, Jeongchon-ri, Seonggeo-eup, Cheonansi-si, Chungnam 330-830, Korea

요약: 노화는 크게 내인성 노화와 광노화로 분류된다. 내인성 노화는 시간이 지남에 따라 진행되는 자연적인 노화이며, 광노화는 자외선에 우리 몸이 노출되면서 발생하는 노화 현상으로 주로 피부에서 잘 나타난다. 대표적인 노화 기작으로는 체내 활성 산소의 증가로 인한 생체 구성 성분의 퇴화를 들 수 있다. 따라서, 효과적인 노화 방지를 위해서는 활성 산소를 억제할 수 있는 항산화제를 지속적으로 공급해 주어야 한다. 본 논문에서는 천연 식물 성분인 예덕나무 피 추출물이 노화 방지에 매우 우수한 효과가 있다는 실험 결과들을 보여준다. 먼저, 예덕나무 피 추출물(*Mallotus japonicus* bark extracts)은 hydroxy radical scavenging activity와 SOD like activity를 가지고 있으며 과산화 수소에 의해 발생하는 피부 손상을 억제하는 효과가 매우 뛰어나다. 또한 광노화 방지 효과도 매우 뛰어나 자외선 조사에 의해 발생할 수 있는 피부 세포 손상을 억제하여 주며 자외선에 의한 유전자 변이도 억제해 주는 것으로 나타났다. 결론적으로, 예덕나무 피 추출물은 피부에서 일어날 수 있는 노화 현상을 억제하는데 매우 뛰어난 효과를 가진 물질로서 화장품 원료로서의 이용 가능성이 매우 높다.

Abstract: Aging is divided into intrinsic aging and photo-aging. Intrinsic aging is naturally occurred as the time passed and photo-aging is induced by the UV radiation of skin. The main reason of aging is the free radicals and the degeneration of the cellular materials by free radicals. In this paper, we checked the anti-aging effects of *Mallotus japonicus* bark extracts. It has the ability to scavenge free radicals and the SOD like activity. Also, it reduced the cell damage by hydrogen peroxide treatment. *Mallotus japonicus* bark extracts showed the excellent activity on inhibiting the UV induced cell damage and DNA damage. In conclusion, *Mallotus japonicus* bark extracts can be used as active ingredients for anti-aging cosmetics.

Keywords: *Mallotus japonicus* bark extracts, free radicals, cell protection, anti-aging

1. 서 론

일반적으로 자외선에 노출되거나, 흡연, 정신적인 스트레스 또는 시간의 경과에 따라 우리 피부는 주름이 생기거나 탄력이 없어지며, 피부가 느슨해지고 수분 보유량이 떨어지는 등의 현상을 겪게 된다. 피부가 이러한 현상을 겪게 되는 이유는 매우 다양하며 복잡하다. 대표적인 원인으로서는 자외선 등의 외부 영향 또는 자연적인 노화 현상으로 인한 피부 세포의 손상을 들 수 있다. 피부 세포 손상의 주 원인으로는 자유 라디칼(free radical)을 들 수 있다. 자유 라디칼은 정상적인 대사 과정에서 생성되거나 질병상태나 스트레스를 받을 때는 과잉으로 생성된다. 특

히 피부는 자외선에 의해 노출되어 있어 활성 산소종을 만드는 광화학적 반응들이 많이 일어나고 있다. 즉 이러한 산화적 스트레스는 피부의 주요 구성 성분인 지질, 단백질, DNA, 탄수화물 등을 산화시켜 변질을 초래한다[1].

피부 세포의 손상은 곧 여러 가지 노화 현상들을 나타나게 하는데 먼저 진피 매트릭스를 구성하는 콜라겐, 엘라스틴, GAG의 생성 및 분해가 원활하게 일어나지 않으므로 인해 매트릭스의 견고성이 떨어져 피부에 탄력이 떨어지고 주름이 발생하는 것이다. 특히, 콜라겐은 나이가 들어도 그 생성량은 크게 변화가 없지만 외부 환경 등에 의해 발생하는 피부 내의 자유 라디칼(free radical) 등의 영향으로 인해 분해 속도가 점점 빨라져 나이가 들면서 전체적인 콜라겐 양은 줄어들게 된다[2].

또한, 자유 라디칼은 MMPs (matrix metalloproteinase)

[†] 주 저자 (e-mail: leektt@hanmail.net)

의 발현과 매우 밀접한 관련을 갖고 있는 것으로 나타났다[3,4]. 자유 라디칼에 의해 생성 촉진된 MMPs는 자외선 등의 영향에 의해 발현량이 더욱 증가하게 된다. 이렇게 발현된 MMPs는 진피 매트릭스 내의 콜라겐, 엘라스틴 등의 분해를 유도하여 궁극적으로는 피부의 탄력을 떨어뜨리며, 피부 주름 생성을 야기시킨다. 특히 진피 내에 존재하는 콜라겐의 분해를 유도하여 진피 매트릭스를 구성하고 있는 교원섬유(matrix fibrils)가 점진적 또는 급진적으로 분해됨으로써 피부 표면에 주름, 탄력 저하와 같은 현상들이 나타나게 된다. 결과적으로 노화 현상을 극복하기 위해서는 생체 내에서 발생하는 자유 라디칼을 효과적으로 제거해주는 것이 가장 중요한 방법이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 천연 식물 추출물을 이용하여 자유 라디칼을 제거하는 방법을 찾고자 하였으며 여러 가지 천연물들을 스크리닝하여 예덕나무 피 추출물을 개발하였다. 예덕 나무(*Mallotus japonicus*)는 대극과 식물(euphorbiaceae)로서 일명 야오동 또는 적아백으로 불린다. 낙엽 소고목으로 우리나라 산기슭 및 산골짜기에 자란다. 키는 10 m 정도이며 대개 관목 모양이다. 잎은 호생, 난형이며 길이는 10~20 cm이다. 꽃은 6월에 피고 녹색이다. 예덕나무는 주로 간질환과 관련된 질병 치료제로 많이 이용되며, 민간에서는 나무껍질을 이용하여 위산과다, 위궤양 치료제로도 이용되었다. 본 연구에서는 예덕나무 추출물이 항산화 효과가 뛰어나며 자외선으로부터 유도되는 피부 손상 특히 DNA 손상을 완화시켜주는데 매우 탁월한 효과를 가지고 있어 화장품 개발에 적용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 예덕나무 피 추출물 제조

먼저 예덕나무의 껍질 건조분 1 kg에 10% 에탄올 6배량을 넣어 25°C에서 7일간 추출한 다음 여과한다. 이 여액을 7일간 저온에서 숙성하고 여과하여 시료를 얻는다.

2.2. 예덕나무 피 추출물의 DPPH 소거 효과

예덕나무 피 추출물을 각각 다음과 같은 농도로 준비하고(0.5, 1, 2, 3, 5%), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) solution (60 μ m)을 준비한다. 시료 및 DPPH solution을 1:1 비율로 섞은 다음 흔들어 준다. 30 min 동안 20°C에서 반응한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 free radical scavenging activity를 구한다. 대조군은 시료 대신 에탄올을 사용한다.

2.3. Superoxide Radical 소거 효과

Xanthine, xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide

radical을 소거하는 효과를 SOD test wako방법으로 측정하였다[5]. 0.05 M Na_2CO_3 buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 예덕나무 피 추출물을 가한 후 25°C에서 10 min간 반응하였다. 이 반응액에 25 U/mL xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25 min 동안 반응 후 superoxide radical 소거 효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 예덕나무 피 추출물의 H_2O_2 유발 세포독성 억제 효과 시험

인체 정상 섬유아세포를 96웰 플레이트에 1×10^5 cells/well되게 접종하고 10% fetal bovine serum이 보충된 DMEM에서 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24 h 배양하였다. 여기에 배양액을 모두 버리고 PBS로 세척한 후 무혈청 배지에 H_2O_2 를 1.5 mM 첨가하고 예덕나무 피 추출물의 농도를 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0%로 조정하여 각각의 웰에 동시에 첨가하여 2 h 경과 후 배양 배지를 버리고 새로운 배지와 함께 MTT 용액을 10 μ L씩 첨가한다. 4 h 후 배지를 버리고 DMSO를 넣어 formazan을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산한다.

2.5. 자외선에 의한 세포 보호 효과

인체 정상 섬유아세포를 12웰 플레이트에 5×10^4 cells/well되게 접종하고 10% fetal bovine serum이 보충된 DMEM에서 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24 h 배양하였다. 여기에 배양액을 모두 버리고 PBS로 세척한 후 인산 완충액 0.5 mL를 첨가한 다음 자외선(UVB)을 0.5 J/cm^2 조사 후 새로운 배지를 첨가하면서 예덕나무 피 추출물을 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0% 첨가하여 3일간 배양한다. 배양 후 crystal violet을 처리하고 30 min간 실온에서 반응 한 후 PBS로 세척한다. 여기에 1% SDS를 처리한 후 560 nm에서 흡광도를 측정한다.

2.6. 예덕나무 피 추출물의 DNA 손상 억제 효과

12-웰 세포배양 플레이트에 5×10^4 cells/well로 세포를 넣은 후 2.5의 방법과 동일하게 세포를 배양하였다. 여기에 자외선을 조사하고 2 h 후에 단세포 전기영동(일명 Comet assay)을 실시하고 영상분석기(image analyzer: Komet 3.1, Kinetic imaging, England)를 사용하여 테일 길이(tail length: μ m)를 척도로 하여 DNA 손상 정도를 분석하였다[6].

2.7. 예덕나무 피 추출물의 세포 독성 시험

인체 정상 섬유아세포를 96웰 플레이트에 1×10^4 cells/well되게 접종하고 10% fetal bovine serum이 보충된 DMEM에서 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24 h 배양하였다. 여기에 예덕나무 피 추출물의 농도를 0.1, 0.2, 0.5, 1.0,

Table 1. Anti-oxidative Effects of *Mallotus japonicus* Bark Extracts

Bark extracts (%)	Free radical scavenging activity (DPPH test)	SOD like activity (NBT method)
0.1	5.3 ± 0.55	27.5 ± 0.78
0.2	9.4 ± 1.67	54.3 ± 1.56
0.5	19.7 ± 2.26	68.9 ± 1.64
1.0	37.4 ± 2.56	79.44 ± 2.55
2.0	55.7 ± 1.04	84.5 ± 2.74
5.0	76.5 ± 4.03	88.9 ± 2.35

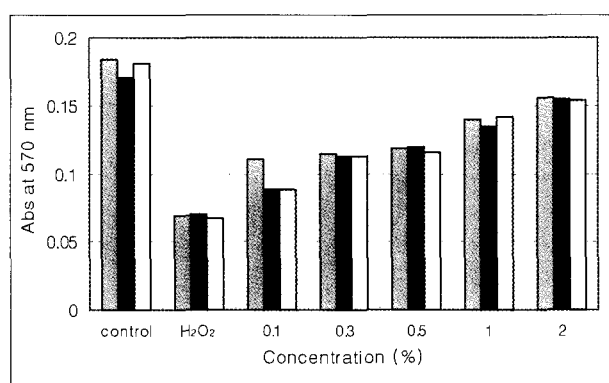


Figure 1. Inhibition of H₂O₂ induced cytotoxicity by *Mallotus japonicus* bark extracts (MTT assay).

2.0%로 조정하여 각각의 웰에 첨가한다. 24 h 배양 후 배지를 버리고 새로운 배지와 함께 MTT 용액을 10 μL씩 첨가한다. 4 h 후 배지를 버리고 DMSO를 넣어 formazan을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 예덕나무 피 추출물의 항산화 효과

자외선이 조사되면 사람의 피부에는 여러 가지 자유 라디칼(hydroxyl radical, peroxy radical, superoxide)의 생성이 증가된다. 이와 같은 자유 라디칼은 유전자의 손상, 세포막 파괴(지질 과산화 작용), 인 단백질, 구조 단백질의 변형을 시켜 피부노화를 일으키는 주 원인 물질이 된다. 우리 몸은 이러한 활성 산소를 제거해 주는 항산화 물질들이 많이 존재하는데 노화가 진행되면서 피부 속 라디칼을 제거해 주는 항산화 능력이 점진적으로 떨어지게 된다. 대표적인 항산화 효소로는 superoxide dismutase (SOD)와 catalase가 있다. SOD는 피부 내에 생성되는 superoxide radical (O₂⁻)을 과산화 수소(H₂O₂)로 전환시켜주는 역할을 수행하며 생성된 과산화 수소는 catalase

에 의해 물과 산소로 다시 전환되어 피부 내에서의 여러 가지 손상을 억제하는 특징을 가지고 있다. 노화된 피부에서는 항산화 효과가 떨어지므로 외부로부터 항산화 역할을 수행할 수 있는 물질을 공급해 주어야 하는데 대표적인 항산화제로는 비타민 C, 비타민 E, 카로테노이드, 플라보노이드 등이 있다. 본 연구에 이용된 예덕나무피 추출물은 라디칼을 제거하여 주는 효과가 매우 뛰어난 항산화제로서의 이용가능성이 매우 크다고 할 수 있다. Table 1에서 예덕나무 피 추출물은 2%의 농도에서 hydroxyl radical의 소거 효과(2~55.7%) 및 superoxide radical (O₂⁻)을 제거해 주는 효과 (2~84.5%)가 있는 것으로 확인되었으며 이 결과는 대표적 항산화제인 BHT와 유사한 결과이다(data not shown). 또한, Figure 1에서 보는 바와 같이 예덕나무 피 추출물은 과산화 수소에 의해 야기되는 세포 독성을 억제해주는 효과가 매우 뛰어난 것으로 나타났다. 과산화 수소는 SOD에 의해 생성되는 중간 부산물로서 피부세포의 손상에 중요한 역할을 수행하는 라디칼이며 주로 catalase에 의해 물과 산소로 전환된다. Figure 1은 예덕나무 피 추출물이 catalase like activity가 매우 높다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있다. 이상의 결과로부터 우리는 예덕나무 피 추출물이 항산화제로서 매우 이용 가능성이 높다는 것을 알 수 있다.

3.2. 예덕나무 피 추출물의 광노화 방지 효과

자외선은 피부 세포에 조사되면 직, 간접적으로 손상을 주게 되는데 직접적으로 DNA구조 변화를 유도하거나 산화 반응을 통해 세포 구성 물질에 손상을 주게 된다. 손상된 DNA는 올바르게 수선되지 않으면 돌연변이나 피부암의 원인이 된다. 따라서, 자외선에 의한 피부 손상을 최소화 하기 위해서는 자외선 차단 제품을 사용하거나 피부 내에서 자외선에 의한 생리적 변화를 억제시키는 것이 좋은 방법이다. 본 실험에서는 예덕나무 피 추출물이 자외선에 의해 야기되는 세포 독성을 억제해주며 DNA 손상을 억제해주는 결과를 보여 주고 있다. Table 2는 예덕나무 피 추출물이 자외선을 조사한 후 첨가되면 세포의 생존을 증가시켜 주는 결과를 보여주었으며 특히, Figure 2에서는 예덕나무 피 추출물이 자외선에 의해 야기되는 DNA 손상을 억제해주는 효과가 매우 높다는 것을 보여 준다. 이상의 결과는 예덕나무 피 추출물이 자외선에 의해 야기되는 노화 현상을 억제하는데 매우 탁월한 효과가 있다는 것을 보여준다고 할 수 있다. 한편 예덕나무 피 추출물이 세포의 생존에 영향을 주는지 여부를 조사하기 위하여 예덕나무 피 추출물을 첨가한 후의 세포 독성 여부를 확인하였다. 그 결과 예덕나무 피 추출물은 세포의 생존에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Figure 3).

Table 2. Inhibitory Effects of UV-induced Cytotoxicity by *Mallotus japonicus* Bark Extracts

<i>Mallotus japonicus</i> bark extracts (%)	Abs at 560 nm (Inhibition of UVB-induced cytotoxicity)
UVB untreated cells	0.887 ± 0.045
0.0	0.135 ± 0.066
0.1	0.197 ± 0.078
0.2	0.285 ± 0.032
0.5	0.458 ± 0.025
1.0	0.524 ± 0.045
2.0	0.685 ± 0.056

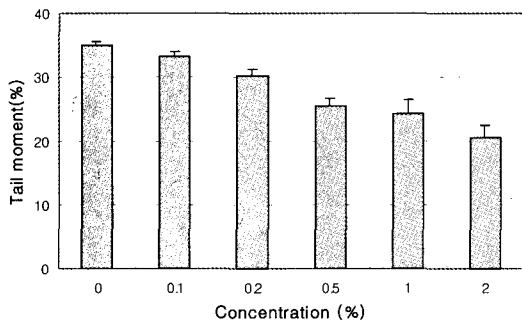


Figure 2. Protective effects of *Mallotus japonicus* bark extracts on H₂O₂-induced DNA damage (COMET assay).

4. 결 론

본 연구는 노화가 진행되면서 그 양이 증가하는 활성 산소를 억제할 수 있는 방법으로서 천연물을 이용한 방법을 제시하였다. 활성 산소는 피부에 여러 가지 해로운 영향을 미치며 피부 노화의 대표적인 원인 물질이다. 본 연구에 발표한 예덕나무 피 추출물은 이러한 활성 산소를 소거해주는 효과를 다양하게 가지고 있는 천연물이다. 피부에 유해한 대표적 활성 산소인 hydroxy radical, superoxide, hydrogen peroxide 등의 라디칼들을 제거해주는 효과가 매우 뛰어나서 노화 방지 원료로서 이용 가능성이 매우 크다. 또한 자외선에 의한 피부 손상을 억제하는 효과도 매우 크며 특히 자외선에 의해 야기되는 DNA 손상을 억제해주는 효과가 뛰어나 광노화 방지에도 매우 우수한 작용을 한다. 이러한 결과를 종합하면 예덕나무 피 추출물은 우리 피부에서 발생하는 여러 가지 활성 산소를 제거해주며, 자외선에 의한 피부 손상을 억제해 줌으로써 피부 노화를 억제할 수 있는 특징을 가지고 있는 원료로서 화장품 분야에 이용 가능성이 매우 크다고 할 수 있다.

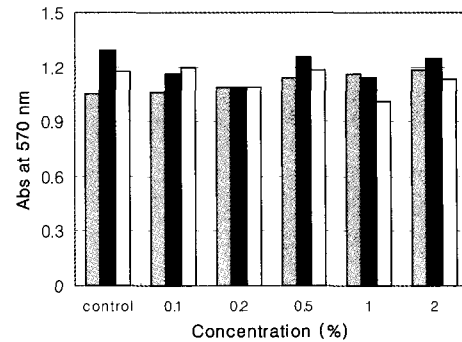


Figure 3. Cytotoxicity of *Mallotus japonicus* bark extracts.

참 고 문 헌

1. P. Brenneisen, K. Briviba, M. Wlaschek, J. Wenk, and K. Scharffetter-Kochanek, Hydrogen peroxide increases the steady state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts, *Free Radical Biology & Medicine*, **22**(3), 515 (1997).
2. H. Tanaka, T. Okada, H. Konishi, and T. Tsuji, The effects of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycan in cultured human dermal fibroblasts, *Arch Dermatol. Res.*, **285**, 352 (1993).
3. Y. Kawaguchi, H. Tanaka, T. Okada, H. Konishi, M. Takahashi, M. Ito, and J. Asai, The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts, *Arch Dermatol. Res.*, **288**, 39 (1996).
4. G. Rhie, M. H. Shin, J. Y. Seo, W. W. Choi, K. H. Cho, K. H. Kim, K. C. Park, H. C. Eun, and J. H. Chung, Aging and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vitro*, *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 1212 (2001).
5. K. Furuno, T. Akasako, and N. Sugihara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Null.*, **25**, 19 (2002).
6. K. T. Lee, Y. K. Yoo, S. W. Kim, J. H. Jeong, and B. K. Jo, Inhibitory effects of *Prunus persica* flower extracts on UV-induced skin damage, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **27**(1), 73 (2001).