

## 계혈등 추출물의 항산화와 사람 피부 섬유아세포에서의 Matrix Metalloproteinase-1 발현저해 효과

심관섭 · 김진화 · 이동환 · 박성민 · 표형배 · <sup>1</sup>Yong He Zhang · † 이범천  
한불화장품 기술연구소, <sup>1</sup>Department Of Pharmacology, Peking University  
(접수 : 2004. 9. 17., 게재승인 : 2005. 2. 11.)

## Effects of the *Spatholobi caulis* extract on Antioxidation and Inhibition of Matrix Metalloproteinase in Human Skin Fibroblasts

Gwan Sub Sim, Jin Hwa Kim, Dong Hwan Lee, Sung Min Park, Hyeong Bae Pyo,  
Yong He Zhang<sup>1</sup>, and Bum Chun Lee†  
R&D Center, Hanbul Cosmetics, 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk, 369-830, Korea  
<sup>1</sup>Department Of Pharmacology, Peking University, School of Basic Medical Science,  
38 Xueyuan Road, Beijing 100083, China  
(Received : 2004. 9. 17., Accepted : 2005. 2. 11.)

The production of matrix metalloproteinases (MMPs) by the UV irradiated skin fibroblast and the degradation of extracellular matrix (ECM) by these enzymes is known as one of the main reasons of photoaging. In this study, to investigate the relationship between aging and *Spatholobi caulis* extract, we examined the effects of antioxidant, in vitro MMP inhibition and expression of UVA-induced MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Spatholobi caulis* extract was found to show scavenging activities of radicals and reactive oxygen species (ROS) with the IC<sub>50</sub> values of 45.81  $\mu\text{g}/\text{ml}$  against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and 3.11  $\mu\text{g}/\text{ml}$  against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. *Spatholobi caulis* extract inhibited the activities of MMP-1 in a dose-dependent manner and the IC<sub>50</sub> value calculated from semi-log plots was 31.96  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Also, UVA induced MMP expression was reduced 74.66% by treatment with *Spatholobi caulis* extract, and MMP-1 mRNA expression was reduced in a dose-dependent manner. Therefore *Spatholobi caulis* extract was able to significantly inhibit MMP expression in protein and mRNA level. All these results suggested that *Spatholobi caulis* extract may act as an anti-aging agent by antioxidation and reducing UVA-induced MMP-1 production.

**Key Words :** *Spatholobi caulis*, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, radical scavenging activity, matrix metalloproteinase, human skin fibroblast

### 서론

피부의 노화는 시간의 흐름에 따라 생리적 노화 (chronological aging) 과정과 외재적 요인에 의한 노화 (extrinsic aging) 과정으로 나누어진다(1). 피부노화에 영향을 미치는 요인자들은 바람, 온도, 습도, 담배연기, 공해, 자외선 등에 의

해서 노화가 일어나며 특히 자외선에 의한 노화를 광노화라고 한다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 높은 농도의 reactive oxygen species (ROS)가 생성된다. 피부는 복잡한 항산화 방어망이 발달되어 있어서 ROS에 대하여 보호작용을 나타낸다. 하지만 계속된 활성산소의 공격은 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어계를 붕괴시킨다. 결과적으로 단백질, 지질, DNA와 같은 세포성분들은 ROS에 의한 작용으로 손상을 받게 된다(2, 3). 만성적 일광 손상을 입은 피부에서 볼 수 있는 현상은 진피의 상부쪽 교원질의 비정상적인 elastotic material의 침착 (solar elastosis)과 proteoglycan이 증가되고 진피의 주 단백질인 콜라겐이 현저히 감소되는 것이다(4, 5). 일반적으로 진피층은 대다수의 type I collagen과 약간의 type III

† Corresponding Author : R&D Center, Hanbul Cosmetics, 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk, 369-830, Korea  
Tel : +82-43-879-2281, Fax : +82-43-881-2128  
E-mail : bclee@hanbul.co.kr

collagen, elastin, proteoglycan, fibronectin 등으로 구성되어 있다 (6). 또한 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 부여하여 이로 인해 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층의 90%를 차지하고 있어 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다(7).

Matrix metalloproteinase (MMP)는 extracellular matrix (ECM, 세포외기질)과 basement membrane (BM, 기저막)의 분해에 관여하는 여러 효소의 family로 구조와 기능적 특성에 따라 interstitial collagenase, stromelysin, gelatinase, membrane-type MMP (MT-MMP) 등 네개의 subfamily로 나누어진다(8). MMP는 활성중심부에 아연을 가지는 금속단백분해효소로 생체 내에서 잠재성 전효소 (zymogen) 형태로 분비된다. 효소활성을 가지기 위해서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단, 활성화되며 활성화된 MMP는 2 $\alpha$ -macroglobulin이나 tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) 같은 저해제에 의해 활성이 조절되고 피부의 keratinocyte, fibroblast를 포함한 대다수의 많은 세포들이 MMP를 분비한다(9). Fisher 등(9)은 1회의 UV 조사에도 피부내의 MMP활성이 증가되며 피부내 콜라겐을 현저하게 붕괴시킴으로써 MMP들이 진피층의 콜라겐 붕괴에 영향을 미치며 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다.

최근 천연물로부터 항산화활성을 측정된 연구결과는 많이 보고되고 있으나 MMP-1활성억제에 대한 연구 결과는 미비하다(10-13). 이에 천연물로부터 항산화활성 및 MMP-1 억제 활성을 보여주는 물질을 검색하였다. 본 연구에 사용된 계혈등 (*Spatholobi caulis*)은 密花豆 (*Spatholobus suberectus* Dunn)의 줄기를 건조한 생약재로서 보혈, 활혈, 통락의 작용이 있어 월경 불순, 사지마비 등의 치료에 이용되며, 혈액순환을 돕고 혈류순환을 촉진시켜 동맥경화로 인한 고혈압 또는 심장병, 협심증에 효과를 나타내는 생약으로 알려져 있다(14). 그러나, 계혈등 추출물의 피부 노화에 대한 생리활성의 기능 접근이나 연구결과는 없었다.

본 연구는 계혈등 추출물의 항산화 효과, MMP-1 효소 활성 저해 효과 및 UVA를 조사한 배양된 사람섬유아세포에서 MMP-1 발현 저해 효과를 검색하여 항노화 소재로 이용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료의 추출

본 실험에서 사용한 계혈등은 *Spatholobi caulis*로서 중국 북경대학에서 제공받아 사용하였다. 계혈등 100 g을 분쇄하여 70% EtOH 1000 ml로 환류하면서 3시간씩 2회 반복 추출하고 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 사용하였다.

### 세포 및 시약

신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblast는 Modern Tissue Technology (MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 Human dermal fibroblast를 DMEM/F12 (3 : 1) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin 을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  조건하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6-10 세대 세포를 실험에 이용하였다. Anti-MMP-1

antibody, anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase, phosphatase substrate 는 Sigma (USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

### DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거효과

항산화 활성은 DPPH (Aldrich, USA)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과 (radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법 (15)을 활용하였다. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동일량의 계혈등 추출물을 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10분동안 반응시킨다. 이후 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Superoxide radical 소거효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법에 의해 측정하였다(16). 50 mM Na $_2$ CO $_3$  buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 계혈등 추출물을 가한 후 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/ml xanthine oxidase를 가하고 25 $^{\circ}$ C에서 25분동안 반응 후 superoxide radical 소거효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### MMP-1 (collagenase) 효소 활성저해 측정

MMP-1 효소 활성 저해 효과를 측정하기 위하여 형광 분석법을 이용하였다. 실험에 사용한 기질은 형광물질이 표지된 DQ-collagen, 효소 (collagenase)는 molecular probe사 (Eugene, OR, USA)에서 시판중인 제품을 사용하였으며, 반응완충액 (0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 50 mM CaCl $_2$ , 2 mM sodium azide, pH 7.6) 100  $\mu$ l에 0.25 mg/ml DQ collagen 20  $\mu$ l와 시료 40  $\mu$ l를 첨가하고 0.5 unit collagenase 40  $\mu$ l를 첨가하였다. 암소, 실온에서 20분 경과 후 형광 분광광도계 (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 흡수파장 495 nm, 방출파장 515 nm로 형광값을 측정하며, 대조군으로서 효소액 대신 반응완충액을 효소와 동량 첨가하여 형광값을 측정하였으며 시료 자체의 형광값도 측정하여 효소활성 계산시 보정하였다.

### 세포 생존률 측정

MTT[3-(4,5-dimethylthiazo2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 정량은 Mosmann(17)의 방법을 변형하여 실시하였다. 사람섬유아세포를 2 X 10 $^5$  cells/ml 농도로 96-well plate의 well에 계혈등 추출물을 세포에 처리하여 CO $_2$  배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액 (5  $\mu$ g/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100  $\mu$ l acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 570 nm에서 microplate reader (Model ELX 800, BIO-TEK instruments, USA)로 흡광도를 측정하였다.

### UVA 조사 및 시료의 처리

사람섬유아세포를 1.5 X 10 $^5$  cells/ml의 농도로 35 mm dish에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때 까지 배양한다. UV조사전에 원배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum성분을 제거 후 6.3 J/cm $^2$  UVA (UVA F15T8BLB, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. UVA 조사 후 배양배지는 FBS를 첨가하

지 않은 DMEM/F12 (3 : 1) 배지에 계혈등 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다.

### MMP-1 발현저해 측정 (ELISA법)

사람섬유아세포에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24시간 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 3% bovine serum albumin (BSA)/PBS로 37°C, 1시간 동안 blocking한 후 0.3 µg/ml monoclonal anti-MMP-1 (mouse)을 150 µl씩 분주하고 37°C, 90분간 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척후 0.2 µg/ml의 anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 150 µl씩 분주하고 37°C, 90분간 반응시킨 후 다시 PBS-T로 세척한 다음 diethanolamine buffer에 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate (pNPP)를 포함한 기질용액 150 µl를 넣어 실온에서 30분간 반응시켰다. 3 N NaOH 50 µl를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, Maryland, Germany)을 이용하였다. cDNA합성은 1 µg의 total RNA를 oligo (dT)15 primer, dNTP (0.5 uM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany)로 37°C에서 60분, 93°C에서 5분 heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase Chain Reaction (PCR)은 cDNA로부터 MMP-1, β-actin을 증폭하기 위하여 1 µl cDNA, 0.5 uM의 5'과 3'primer, 10 X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200 uM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 unit Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)를 섞고 distilled water로 전체를 25 µl로 맞춘 다음 PCR을 실시하였다. PCR증폭은 94°C 0.5분, 50°C 0.5분, 72°C 1분, 28 cycles로 반응시켰다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 MMP-1과 β-actin 유전자의 발현을 확인하였다. MMP-1의 oligonucleotide서열은 sense oligonucleotide가 5'-AAAGGGA ATAAGTACTGGGC-3', antisense oligonucleotide가 5'-AATTC CAGGAAAGTCATGTG-3'이며, β-actin의 oligonucleotide서열은 sense oligonucleotide가 5'-ATGCAGAAGGAGATCACTGC-3', antisense oligonucleotide가 5'-CTGCGCAAGTTAGGTTTT GT-3'이다.

### 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### DPPH radical 소거 효과

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 radical로 free radical의 안정된 모델이다. 따라서 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제 정도를 예측할 수 있다. 유해산소라 불리는 활성산소는 세

포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있으며 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되어 있다(18-20). 계혈등 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 효과가 알려진 BHT (2,[6]-Di-tert-Butyl-p-cresol)(21)를 이용하여 계혈등 추출물의 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 계혈등 추출물을 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> µg/ml의 농도로 처리한 경우 각 DPPH radical 소거능은 25.33%, 87.33%, 92.67%로 나타났으며, IC<sub>50</sub>은 45.81 µg/ml로 대조군인 BHT보다 우수한 free radical 소거효과를 나타내었다 (Table 1). 전자공여능은 radical에 수소를 공여함으로써 지질과산화를 억제할 뿐만 아니라 체내에서 radical에 의한 노화의 억제에 이용된다. 따라서 계혈등 추출물의 DPPH radical에 대한 전자 공여능의 작용은 수소 공여체로서 또한 지질 radical과 반응하는 primary 항산화제로서 매우 효과적임을 보여주었다.

**Table 1.** Free radical scavenging effect of SCE (*Spatholobi caulis* extract) in the DPPH assay

	Concentration	DPPH radical scavenging activity (%)	IC <sub>50</sub>
SCE	1000 µg/ml	92.67 ± 1.73	45.81 µg/ml
	100 µg/ml	87.33 ± 2.36	
	10 µg/ml	25.33 ± 1.73	
BHT <sup>1</sup>	1000 µg/ml	87.67 ± 3.27	402.2 µg/ml
	100 µg/ml	23.67 ± 2.85	
	10 µg/ml	1.67 ± 0.24	

BHT<sup>1</sup> : 2,[6]-Di-tert-Butyl-p-cresol

Values are means of triplicate determinations±standard deviation

### Superoxide radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide 음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타난다(22). Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion의 생성저해의 결과는 Table 2에 나타내었다. 양성 대조군으로 BHT를 이용하여 계혈등 추출물의 superoxide radical 소거효과를 비교하였다. 그 결과 계혈등 추출물은 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타내 1, 10, 100 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각 superoxide radical 소거능은 39.67%, 83.67%, 93%로 나타났으며, IC<sub>50</sub>은 3.11 µg/ml의 소거능을 보여 우수한 superoxide radical 소거효과를 나타내었다. 대조군인 BHT는 82.78 µg/ml에서 50%의 superoxide radical을 소거하였다.

**Table 2.** Superoxide radical scavenging effect of SCE (*Spatholobi caulis* extract) in the NBT assay

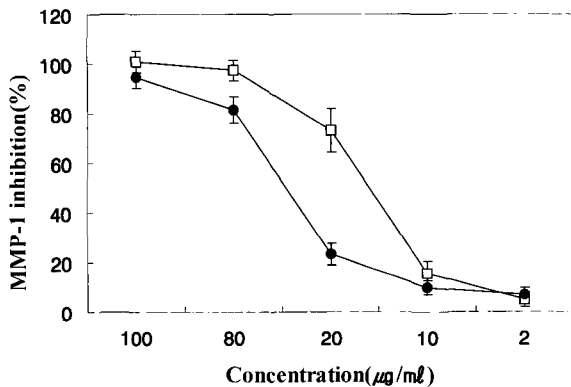
	Concentration	Superoxide radical scavenging effect (%)	IC <sub>50</sub>
SCE	100 µg/ml	93 ± 2.99	3.11 µg/ml
	10 µg/ml	83.67 ± 3.46	
	1 µg/ml	39.67 ± 2.85	
BHT <sup>1</sup>	100 µg/ml	54.67 ± 2.85	82.78 µg/ml
	10 µg/ml	30.33 ± 4.71	
	1 µg/ml	27.67 ± 2.85	

BHT<sup>1</sup> : 2,[6]-Di-tert-Butyl-p-cresol

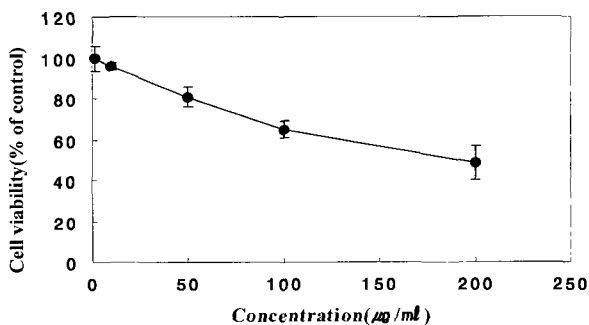
Values are means of triplicate determinations±standard deviation

**In vitro MMP-1 (Collagenase) 저해효과**

콜라겐은 결합조직의 탄력을 나타내며 진피를 구성하는 단백질의 70%를 차지한다. 이러한 콜라겐을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 콜라겐 type I을 분해하는 MMP-1으로 이러한 MMP-1의 효소활성을 저해하거나 발현을 억제하는 활성을 가진 물질은 콜라겐을 보호하여 피부조직의 기계적 특성을 유지시켜 탄력과 피부가 늘어지는 것을 방지한다(19). 따라서 MMP 저해 효과가 있는 소재는 주름을 개선하고 탄력 있는 피부유지에 유용하게 사용될 수 있으므로 계혈등 추출물에 대한 MMP-1의 효소활성 저해 효과를 측정하였다. 양성 대조군인 1,10-phenanthroline의 경우 100 µg/ml에서 94.66%의 효소활성을 저해하였으며, IC<sub>50</sub>은 49.74 µg/ml로 나타났고, 계혈등 추출물의 MMP-1 저해 효과는 2, 10, 20, 80 µg/ml 농도에서 효소활성을 각각 5%, 15.67%, 73%, 97.33% 저해하였으며, IC<sub>50</sub>은 31.96 µg/ml로 나타났다(Fig. 1), 이 실험 결과 계혈등 추출물이 MMP-1 효소활성 부위에 대한 직접적인 저해 활성에 우수한 효과가 있음을 확인하였다.



**Figure 1.** Determination for IC<sub>50</sub> values for the inhibition of collagenase (MMP-1). Fluorometric assays of the activities of MMP-1 was performed in the presence of increasing concentrations of *Spatholobi caulis* extract (□) and 1, 10-phenanthroline (●).



**Figure 2.** Relative cell viability of *Spatholobi caulis* extract (SCE) on human dermal fibroblasts by MTT assay. The cells were treated with various concentration of SCE for 24 h. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \* p<0.05 compared with control.

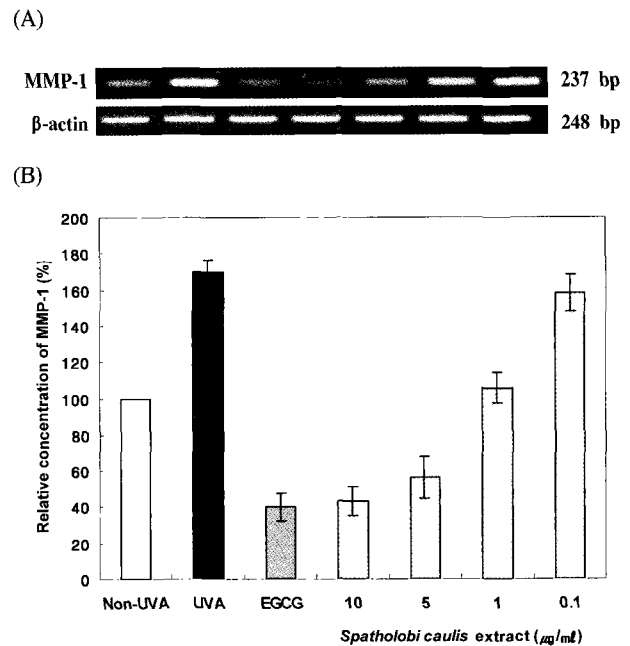
**세포독성**

계혈등 추출물의 세포독성 측정과 더불어 실험에 사용될 농도 범위결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. 사람섬유아 세포에 대한 계혈등 추출물의 세포 독성을 측정한 결과, 계혈

등 추출물은 50 µg/ml 이하의 농도로 처리시 세포생존율은 80% 이하로 저하되었으며 그 이상의 농도에서는 급격히 생존율이 저하되었다(Fig. 2). IC<sub>50</sub>값은 181 µg/ml이었다.

**UVA에 의한 MMP-1 발현 저해 효과**

피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 activator protein-1 (AP-1)의 활성도가 증가되는 신호전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다(23). 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 계혈등 추출물이 미치는 영향을 알아보고자 사람섬유아세포에 6.3 J/cm<sup>2</sup> UVA를 조사하고 계혈등 추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 MMP-1 발현저해 효과를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)을 통해 알아 보았다. 그 결과 계혈등 추출물은 농도 의존적으로 MMP-1 발현저해 효과를 나타내었다. 계혈등 추출물을 0.1, 1, 5, 10 µg/ml의 농도로 처리한 경우 MMP-1 발현저해 효과는 6.87%, 37.73%, 66.8%, 74.66%로 나타났으며, UV에 의한 AP-1과 NF-κB의 활성도 증가를 억제하여 MMP발현 저해 효과가 보고된 (24) (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)의 경우는 5 µg/ml에서 76.42% 발현저해 효과를 나타내었다(Fig. 3B).



**Figure 3.** Inhibitory effect of *Spatholobi caulis* extract the expression of MMP-1 in the UVA irradiated human dermal fibroblasts. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Spatholobi caulis* extract (0.1-10 µg/ml) for 24 h. RT-PCR (A) and ELISA analysis (B) were performed. Total RNA that was extracted from human dermal fibroblasts was analyzed by RT-PCR and each lane in (A) corresponds to each bar in (B). The results were expressed as the average of triple determination with S.D. \* p<0.05, significantly different from control (UVA: 6.3 J/cm<sup>2</sup>, EGCG: 5 µg/ml).

Scharffetter 등(25)은 배양된 섬유아세포에 5-60 J/cm<sup>2</sup>의 UVA를 1회 조사하여 MMP-1 유전자 발현이 증폭됨을 관찰하였으며 Wlaschek 등(26)도 UVA를 조사시 MMP-1 유전자 발현

이 증폭되는 것을 관찰한 바 있다. UVA 조사로 인해 MMP-1 유전자의 발현이 증가되는 기전은 아직 확실치 않으나 MMP-1 유전자가 발현되는 과정 중 신호전달 (signal transduction) 과정과 전사 (transcription) 과정 모두에 UVA의 자극이 관여 할 것으로 생각되고 있다. 즉 UVA조사에 의해 섬유아세포에서 protein kinase C 활성도가 증가되는 것이 관찰된 바 있으며(27, 28) MMP-1의 유전자 발현을 자극하는 전사 인자 (transcriptional factor)로 알려져 있는 AP-1의 활성도도 증가됨이 보고된 바 있다(29). Barthelman 등(30)과 Fisher 등(31)은 각각 EGCG와 all-trans-retinoic acid가 자외선에 의한 AP-1의 활성도 증가를 방지함으로써 MMP-1 유전자 발현이 감소함을 보고하였다. 따라서, 계혈등 추출물이 사람섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과 농도 의존적으로 MMP-1 mRNA 발현을 저해하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3A). 결론적으로 계혈등 추출물은 사람섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1을 단백질 및 mRNA(32, 33) 수준에서 발현을 저해하는 효과가 확인되었으며 이는 기존 보고된 EGCG와 유사한 우수한 효과를 나타내었다. 따라서 사람섬유아세포에서 계혈등 추출물은 UVA로부터 생성된 ROS를 소거하거나 신호전달 (signal transduction) 과정에 관여하여 MMP 발현을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 계혈등 추출물에 의한 항산화 효과, *in vitro* MMP-1 효소 활성 저해 효과 및 사람섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 미치는 영향을 관찰하였다. 계혈등 추출물의 DPPH와 superoxide radical 소거효과는 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 소거효과를 나타냈으며, IC<sub>50</sub>은 각각 45.81 µg/ml, 3.11 µg/ml로 DPPH와 superoxide radical을 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. MMP-1 효소 활성 저해 효과도 80 µg/ml에서 97.33%를 저해하는 것으로 나타나 우수한 효과를 나타내었다. 사람섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현저해효과는 계혈등 추출물 10 µg/ml에서 74.66%로 단백질 수준에서 우수한 발현저해효과를 나타내었으며, mRNA수준에서도 계혈등 추출물은 모두 농도 의존적으로 발현 저해효과가 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 계혈등 추출물은 항산화효과, MMP-1 효소 활성저해 효과와 UVA에 의한 MMP-1의 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 보아 우수한 항노화 소재로써 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감 사

본 연구는 2004년도 산업자원부 지역산업기술개발사업 (과제 번호 10015615)의 지원에 의한 결과이며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Claude, S., K. Manabu, M. Laura, and P. Lester (1999), Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NFκB activation in a human keratinocyte cell line, *Free radical Biol. Med.* **26**, 174-183.
- Jurkiewicz, B. A. and G. R. Buettner (1994), Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: An electron paramagnetic resonance study, *Photochem. Photobiol.* **59**, 1-4.
- Jurkiewicz, B. A., D. L. Bissett, and G. R. Buettner (1995), Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin, *J. Invest. Dermatol.* **104**, 484-488.
- Yaar, M. and B. A. Gilchrist (1998), Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors, *J. Investing. Dermatol. Symp. Proc.* **3**, 47-51.
- Li, J. J., Z. Dong, M. I. Dawson, and N. H. Colburn (1996), Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element, *Cancer Res.* **56**, 483-489.
- Bailly, C., S. Dreze, D. Asselineau, B. Nusgens, C. M. Lapiere, and M. Darmon, (1990), Retinoic acid inhibits the production of collagenase by human epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* **94**, 47-51.
- Huang, C., W. Y. Ma, M. I. Dawson, M. Rincon, R. A. Flavell, and Z. Dong (1997), Blocking activator protein-1 activity, but not activation retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5826-5830.
- Fisher, G. J., S. W. Kang, and J. J. Voorhees (1998), Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*, *J. Clin. Invest.* **101**, 1432-1440.
- Fisher, G. J. and J. J. Voorhees (1999), Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid, *Photochem. Photobiol.* **69**, 154-157.
- Kim, S. Y., H. H. Kim, S. K. Ki, M. J. Oh, and M. Y. Jung (1994), Antioxidant activities of selected oriental herb extracts, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **71**, 633-640.
- Choi, S. I., Y. M. Lee, and T. R. Heo (2003), Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 282-288.
- Lee, H. J., Y. A. Kim, J. W. Ahn, B. J. Lee, S. G. Moon, and Y. W. Seo (2004), Screening of peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities from salt marsh plants, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 57-61.
- Sim, G. S., J. H. Kim, S. M. Park, B. C. Lee, Y. P. Yun, Y. H. Zhang, and H. B. Pyo (2004), Effects of the *Selaginella tamariscina* extract on antioxidation and inhibition of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts, *Yakhak Hoeji* **48**, 165-170.
- Kang, I. C., S. A. Kim, G. Y. Song, N. I. Back, Y. D. Park, S. Y. Ryu, I. Saiki, and S. H. Kim (2003), Effects of the ethyl acetate fraction of *Spatholobi caulis* on tumour cell aggregation and migration, *Phytother. Res.* **17**, 163-167.
- Blois, M. S. (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* **181**, 1199-1200.
- Furuno, K., T. Akasako, and N. Sugihara (2002), The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 19-23.
- Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods.* **65**, 55-63.
- Kitahara, A., U. Matsumoto, H. Ueda, and R. Ueoka (1992), Are markable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of V-irradiated methyl linolate, *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2208-2015.
- Hatano, T. (1995), Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-Tannins and related polyphenol, *Natural Medicines* **49**, 357-362.
- Masaki, H., S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai (1995), Active oxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162-167.
- Fujisawa, S., Y. Kadoma, and I. Yokoe (2004), Radical scavenging activity of butylated hydroxytoluene (BHT) and its metabolites, *Chem. Phys. Lipids* **130**, 189-195.
- Kuppusamy, P. and J. L. Zweier (1989), Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.* **264**, 9880-9884.

23. Chun, J. H., S. W. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees (2000), Decreased extracellular signal regulated kinase and increased stress activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.* **115**, 177-182.
24. Kim, J. G., J. S. Hwang, Y. K. Cho, Y. G. Han, Y. J. Jeon, and K. H. Yang (2001), Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB- induced skin damage, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **14**, 11-19.
25. Scharffetter, K., M. Wlaschek, and A. Hogg (1991), UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts *in vitro* and *in vivo*, *Arch. Dermatol. Res.* **283**, 506-511.
26. Wlaschek, M., K. Bolsen, G. Herrmann, A. Schwarz, F. Wilmroth, P. C. Heinrich, G. Goerz, and K. Scharffetter (1993), UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast derived collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage?, *J. Invest. Dermatol.* **101**, 164-168.
27. Matsui, M. S. and V. A. DeLeo (1990), Induction of protein kinase C activity by ultraviolet radiation, *Carcinogenesis* **11**, 229-234.
28. Nishizuka, Y. (1984), The role of protein kinase C in cell surface transduction and tumor promotion, *Nature* **308**, 693-698.
29. Kim, H. C., J. S. Yang, Y. S. Chae, K. S. Suh, and S. T. Kim (1997), 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**, 1136-1142.
30. Barthelman, M., W. B. Bair, K. K. Stickland, W. Chen, B. N. Timmermann, S. Valcic, Z. Dong, and G. T. Bowden (1998), (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity, *Carcinogenesis* **19**, 2201-2204.
31. Fisher, G. J., S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. W. Kang, and J. J. Voorhees (1996), Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature* **379**, 335-339.
32. Seo, J. Y., G. E. Rhie, and J. H. Chung (2001), The effect of ultraviolet irradiation on the expression of type I procollagen and MMP-1 in human dermal fibroblast and human skin *in vivo*, *Kor. J. Invest. Dermatol.* **8**, 116-122.
33. Seo, J. Y., H. R. Choi, G. E. Rhie, C. S. Youn, W. W. Choi, J. A. Kim, J. H. Chung, K. H. Kim, K. H. Cho, and H. C. Eun (2001), The effect of retinoic acid and vitamin C on the expression of the procollagen  $\alpha 1(I)$ , tropoelastin, and MMP-1 in human dermal fibroblast, *Kor. J. Invest. Dermatol.* **8**, 23-28.