

백령 에틸 아세테이트 층의 항산화 활성과 Matrix Metalloproteinase-1 발현 저해효과

조영호[†] · 김진희 · 심관섭 · 이동환 · 이범천 · 표형배

한불화장품(주) 기술연구소
(2005년 2월 11일 접수, 2005년 3월 4일 채택)

Effects of Ethyl Acetate Fraction from *Melothria Heterophylla* on Antioxidant Activity and Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Ultraviolet A-irradiated Human Dermal Fibroblasts

Young Ho Cho[†], Jin Hui Kim, Gwan Sub Sim, Dong Hwan Lee, Bum Chun Lee, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Corporation, 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-834, Korea
(Received February 11, 2005; Accepted March 4, 2005)

요약: 자외선은 콜라겐 분해와 같은 피부 결합조직에서 특이적인 변화를 유발한다. 세포외 기질(extracellular matrix)내에서의 많은 변형들은 기질 금속 단백질 분해효소(matrix metalloproteinases)에 의해 매개된다. 본 연구에서는 천연물 유래의 새로운 노화 방지소재를 개발하기 위해 백령 추출물의 용매별 분획들의 항산화 활성을 검색하고, 그 중에서 활성이 가장 높게 나타난 에틸 아세테이트 층에 대해 MMP-1 활성 및 human dermal fibroblasts에서 자외선에 의한 MMP-1 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 백령 추출물의 에틸 아세테이트 층은 MMP-1의 활성을 농도 의존적으로 저해하였다(IC₅₀ = 9 µg/mL). 또한, 자외선에 의해 증가되는 MMP-1의 발현이 에틸 아세테이트 층을 100 µg/mL 처리한 경우 약 90% 정도 저해되었다. 반면에 MMP-1 mRNA의 발현에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 백령 에틸 아세테이트 층은 MMP-1의 발현을 단백질 수준에서만 저해함을 알 수 있다. 결론적으로 백령 에틸 아세테이트 층은 자외선에 의해 손상된 피부를 보호할 수 있는 새로운 노화방지 소재로 이용될 수 있다.

Abstract: UV irradiation leads to distinct changes in skin connective tissue, which is degradation of collagen. Many of these alterations in the extracellular matrix are mediated by matrix metalloproteinases. In this study, to develop a new anti-aging agent, we screened the antioxidant activity of solvent fractions from ethanolic extract of *Melothria heterophylla*. Among the four solvent fractions tested, the EtOAc fraction exhibited the highest antioxidant activity. It was investigated the inhibitory effect of the EtOAc fraction on the expression and activity of MMP-1 in UVA-irradiated human dermal fibroblasts. The EtOAc fraction inhibited the activity of MMP-1 in a dose dependent manner with the IC₅₀ values of 9 µg/mL. Also, UVA-induced MMP-1 expression was reduced about 90% by 100 µg/mL of the EtOAc fraction but MMP-1 mRNA expression was not inhibited. Therefore, we conclude that the EtOAc fraction significantly inhibits MMP-1 expression at the protein level. From these results, we suggest that the EtOAc fraction from *M. heterophylla* could be used as a new anti-aging agent for the photo-damaged skin.

Keywords: antioxidant, fibroblasts, *Melothria heterophylla*, MMPs, UVA-irradiation

1. 서 론

사람의 피부는 나이를 먹으면서 끊임없이 변화하게 된다. 피부 노화는 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노

화 현상인 내인성 노화(intrinsic aging)와 외적 노화(extrinsic aging)로 구분되며, 내인성 노화는 유전적 요소에 영향을 받기 때문에 인위적인 조절이 어려운 반면, 외적 노화는 자외선과 같은 여러가지 환경적인 요소에 영향을 받기 때문에 인위적인 조절이 비교적 용이하다[1]. 자외선에 의해 생성되는 유해한 활성 산소종(reactive oxygen

[†] 주 저자 (e-mail: cyh@hanbul.co.kr)

species)은 피부 세포에서 고분자 물질들인 불포화 지방산, 단백질, DNA 등과 반응하여 피부 콜라겐 등의 결합조직형성 파괴, 세포막 기능 저해, DNA 변이 촉진, 단백질 작용 변형, 세포간 에너지 전이, 신진대사와 관련된 분자들의 변형 등을 유발하는 것으로 알려져 있다[2,3]. 일반적으로 진피층의 약 90%를 차지하고 있는 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 부여하여 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다. 따라서 피부내 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다[4].

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 활성 중심부에 아연을 갖는 금속 단백질 분해효소로서 약 20여종 이상의 종류가 있는 것으로 알려져 있다. 특히, MMPs는 많은 피부 세포들로부터 분비되어 세포외 기질(extracellular matrix)과 기저막(basement membrane)을 구성하는 대부분의 단백질 성분을 분해함으로써 피부 탄력을 유지하는 결합조직을 파괴하여 주름과 탄력저하 및 피부 처짐의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[5,6]. Brenneisen 등은 UV 조사와 ROS에 의해 피부내의 MMPs 활성을 증가시켜 진피층내의 콜라겐 등과 같은 세포외 기질들의 붕괴에 영향을 미치며, MMPs가 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다[7].

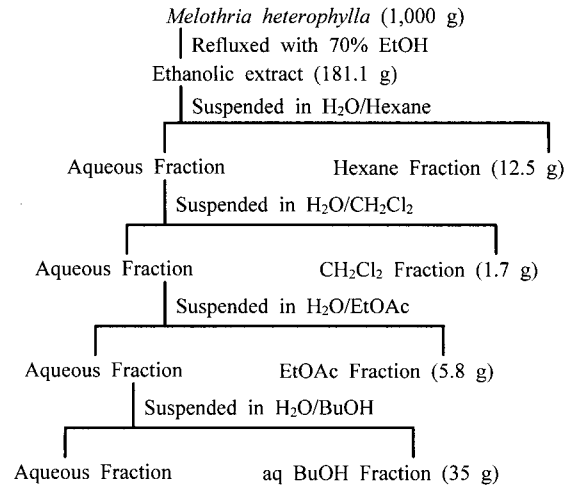
생약제인 백렴(*Melothria heterophylla* (Lour.) Cogn.)은 박과에 속하는 다년생 덩굴성 초본으로 인후종통, 결막염, 임파선결핵, 고환염, 피부습진 등에 효과가 있는 생약으로 알려져 있다[8]. 최근에 백렴 에탄올 추출물의 항산화 효과와 MMP-1 발현 저해 효과에 대한 보고가 있었지만[9], 백렴 추출물의 용매별 분획에 대한 연구결과는 알려진 바가 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 백렴 추출물 유래의 MMP-1의 발현을 저해하는 화합물의 구조를 규명하기 위한 시도로 백렴 추출물의 각 용매별 분획에 대한 항산화 효과를 검색하였으며, 에틸 아세테이트(EtOAc) 분획의 MMP-1의 활성 저해효과 및 UVA에 의한 human dermal fibroblasts에서 MMP-1 생성 억제효과 등을 관찰하였다.

2. 실험 방법

2.1. 시료의 추출 및 분리

본 실험에서 사용한 백렴은 서울 경동시장 내의 한약 건재상에서 구입하여 사용하였다. 건조된 백렴 뿌리 1 kg을 70% 에탄올 수용액으로 3회 환류 추출하여 여과한 후, 감압 농축하여 에탄올 추출물 181.1 g을 얻었다. 에탄올 추출물을 물에 분산시킨 후, n-hexane 1 L로 3회 분배 추출하여 n-hexane 분획을 얻고, 포화 NaCl 용액으로 back washing하고, 무수 Na₂SO₄로 탈수한 후, 감압 농축



Scheme 1. Extraction of *Melothria heterophylla*.

하여 12.5 g의 분획을 얻었다. 남은 물층에 대하여 메틸렌 클로라이드(CH₂Cl₂)와 EtOAc, 수포화 부탄올(aq BuOH) 등을 이용하여 n-hexane 분획과 같은 방법으로 탈수, 농축하여 각각 1.7 g, 5.8 g, 35 g의 분획을 얻었다(Scheme 1).

2.2. 세포 및 시약

신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblasts (HDFs)는 Modern Tissue Technology사(Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDFs를 DMEM/F12 (3:1) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10세대 세포를 실험에 이용하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 위해 사용된 MMP-1에 대한 1차 항체와 alkaline phosphatase가 결합된 2차 항체는 Sigma Chemical 사로부터 구입하여 사용하였다. *In vitro* MMP-1 활성 저해효과 측정을 위해 사용된 형광물질이 표지된 DQ gelatin, DQ collagen, collagenase, 1,10-phenanthroline은 Molecular probe사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약들은 Sigma Chemical사에서 구입하여 사용하였다.

2.3. DPPH Radical 소거 효과

Free radical의 소거 작용은 Blois [10]가 사용한 방법을 약간 변형하여 각 시료의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (Aldrich, USA)에 대한 소거 효과를 측정하였다. 0.1 mM DPPH 메탄올 용액에 동일량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10 min 동안 반응시킨다. 이후 spectrophotometer (ELx 800, BIO-TEK Instruments, USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 비교하여 DPPH radical의 소거활성을 백분율로 나타내었다.

2.4. Superoxide Radical 소거 효과

Superoxide radical의 소거작용은 Furuno 등의 방법[11]에 따라 각 시료의 xanthine-xanthine oxidase system에 의해 생성된 superoxide radical을 소거하는 효과를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃ buffer에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM nitroblue tetrazolium (NBT), 0.15% bovine serum albumin (BSA) sol'n과 시료를 각각 첨가하여 혼합한 다음, 25°C에서 10 min간 반응하였다. 그 후 각 tube에 xanthine oxidase (0.25 U/mL) 용액을 첨가하여 25°C에서 30 min간 반응한 후, 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 비교하여 superoxide radical 소거활성을 백분율로 나타내었다.

2.5. 세포 생존률 측정

세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 세포 생존률을 측정하는 Mosmann의 방법[12]을 변형하여 실시하였다. HDFs를 2 × 10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 접종한 후 각 well에 시료를 투여하여 CO₂ 배양기에서 24 h 배양하였다. MTT 용액(5 µg/mL)을 첨가하고 4 h 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100 µL acid-iso-propanol (0.04 N HCl in iso-propanol)를 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 micro plate reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. MMP-1 활성 저해 측정

시료의 MMP-1 활성 저해 효과 측정은 Wang 등이 사용한 방법[6]을 약간 변형하여 실시하였다. 즉, 반응 완충액 100 µL에 0.25 mg/mL로 반응 완충액에 용해한 DQ collagen 20 µL와 시료 40 µL를 첨가하고, 0.5 Unit로 희석된 collagenase 40 µL를 첨가하였다. 암소, 실온에서 20 min 경과 후 Luminescence Spectrophotometer (LS55, PERKIN ELMER, USA)를 이용하여 흡수파장 495 nm, 방출파장 515 nm로 형광값을 측정하였고, 대조그룹으로서 효소액 대신 반응 완충액을 효소와 동량 첨가하여 형광값을 측정하였다. 시료 자체의 형광값도 측정하여, 효소 활성 계산시 보정하였다.

2.7. UVA 조사 및 시료의 처리

HDFs를 1.5 × 10⁵ cells/mL의 농도로 35 mm dish에 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양하였다. UV 조사전에 원배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum 성분을 제거한 다음, UV 조사장치 (F15T8.BLB,

Table 1. Sequence of Primers and Fragment Sizes of the Investigated Genes in RT-PCR

Gene	Primer sequences	Fragment size (bp)
MMP-1	F 5'-AAAGGGAATAAGTACTGGGC-3'	237
	R 5'-AATTCCAGGAAAGTCATGTG-3'	
β-Actin	F 5'-ATGCAGAAGGAGATCACTGC-3'	248
	R 5'-CTGCGCAAGTTAGGTTTTTGT-3'	

Sankyo Denki, Japan)로 UVA (6.3 J/cm²)를 조사하였다. UVA 조사후 배양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3:1) 배지에 백령 추출물의 EtOAc 분획을 투여하여 24 h 배양하였다.

2.8. MMP-1 발현 저해 측정(ELISA법)

UVA 조사에 의해 유도되는 MMP-1 발현량 측정은 Dunsmore 등이 사용한 방법[13]을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 HDFs에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24 h 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 3% BSA/PBS-T로 37°C에서 1 h 동안 blocking한 후, 1차 항체(monoclonal anti-MMP-1)를 blocking buffer로 1:3,000으로 희석하여 처리하고 37°C에서 90 min간 반응시켰다. PBS-T로 세척한 다음 2차 항체(alkaline phosphatase conjugated Goat anti-mouse IgG)를 blocking buffer에 1:3,000으로 희석하여 처리하고, 37°C에서 90 min간 반응시킨 후 PBS-T로 세척한 다음 alkaline phosphatase 기질 용액(1 mg/mL, *p*-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer)을 첨가하여 실온에서 30 min간 반응시켰다. 3 N NaOH로 반응을 완전히 중지시킨 후 micro plate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.9. RNA 분리 및 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하였다. cDNA합성은 1 µg의 total RNA를 oligo(dT) 15 primer, dNTP (0.5 mM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Germany)로 37°C에서 60 min, 93°C에서 5 min heating 시킴으로써 반응을 중지시켰다. PCR은 cDNA로부터 MMP-1, β-actin을 증폭하기 위하여 1 µL cDNA, 0.5 mM의 5'과 3'primer, 10 X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200 mM dNTP, 25 mM MgCl₂, 2.5 unit Taq polymerase (Qiagen, Germany)를 섞고 증류수로 전체를 25 µL로 맞추는 다음 실시

Table 2. Antioxidant Activity of Various Fractions Obtained from the EtOH Extract of *M. heterophylla*

Samples	SC ₅₀ ^{a)} values (μg/mL)	
	DPPH ^{b)}	Superoxide anion ^{c)}
EtOH ext.	13	20
n-Hexane fraction	> 300	> 900
CH ₂ Cl ₂ fraction	> 200	> 600
EtOAc fraction	10	30
aq BuOH fraction	15	40
Vitamin C*	11	ND ^{d)}
BHA*	ND ^{d)}	32

Concentration giving a 50% decrease of DPPH and superoxide anion radicals. The values are the means of triplicate experiments with SD.

^{a)} 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

^{b)} Superoxide anion radicals were produced from xanthine/xanthine oxidase oxidation system.

^{d)} Not determined

* Used as a positive control

하였다. PCR 증폭은 94°C 0.5 min, 50°C 0.5 min, 72°C 1 min, 25 cycles로 반응시켰다. PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다. 본 실험의 RT-PCR에 사용된 primer는 Table 1에 제시하였다.

2.10. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성 검정은 Student's *t*-test로 실시하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 각 용매별 분획의 항산화 활성 측정

백련에 대한 최근 연구에서 백련 에탄올 추출물이 우수한 항산화 효과를 가지는 것으로 밝혀졌다[9]. 이에 백련 추출물로부터 항산화 활성 화합물을 규명하기 위해 DPPH 및 superoxide radical을 이용하여 백련 추출물의 각 용매별 분획의 항산화 효과를 측정하고, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고, 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다. Xanthine/xanthine oxidase에 의해 생성되는 superoxide anion radical의 저해작용은 superoxide radical 소거작용과 xanthine oxidase의 효소 활성 저해에 의해 나타난다[14]. 양성 대조그룹으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 vitamin C와 3-*t*-butyl-4-hydroxy-anisole (BHA)를 이용하여 백련 추출물의 각 용매별 분

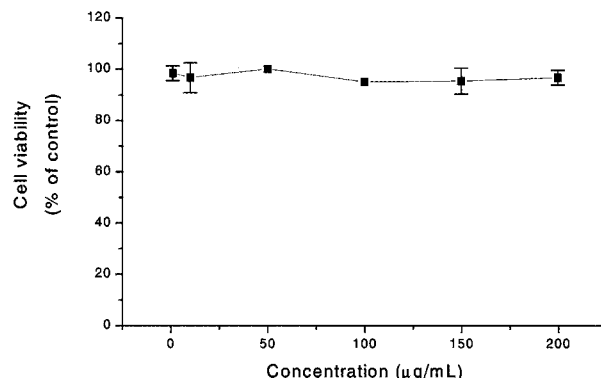


Figure 1. Effect of the EtOAc fraction from *M. heterophylla* on the viability of human dermal fibroblasts. The cells were cultured in the presence of various concentrations of the EtOAc fraction for 24 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. The results were expressed as the average of triplicate samples with SD.

획의 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 vitamin C는 11 μg/mL에서 50%의 DPPH radical을 소거하였으며, BHA는 32 μg/mL에서 50%의 superoxide radical을 소거하였다. 백련 추출물의 각 용매별 분획 중에는 EtOAc 분획 > BuOH 분획 > CH₂Cl₂ 분획 > Hexane 분획 순으로 EtOAc 분획이 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다.

3.2. 세포독성

가장 강한 항산화 활성을 보인 EtOAc 분획을 1 μg/mL에서 200 μg/mL까지 다양한 농도로 처리하고, 48 h 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 EtOAc 분획을 최고 200 μg/mL 처리시에도 세포 생존율은 유의할만한 변화를 볼 수 없었다. EtOAc 분획을 처리하고 세포수를 조사해본 결과 세포수에는 별다른 차이가 없었으며, 또한, 세포의 형태학적 변화를 관찰해 본 결과 대조그룹과 큰 차이를 보이지 않았다(data not shown). 따라서 이 농도 범위에서 EtOAc 분획은 세포독성이 거의 없는 것으로 사료되어 이 농도 범위를 기준으로 실험을 실시하였다.

3.3. MMP-1 활성 저해 효과

피부세포의 결합조직을 구성하는 성분들 가운데 콜라겐은 피부 건조중량의 약 90%에 달하는 주요 구성 단백질이다. 따라서 콜라겐의 분해는 곧 결합조직의 탄력 저하와 피부의 주름 및 처짐에 직접적인 영향을 미친다. 체내에서 생성되는 수십 종의 MMPs 가운데 MMP-1은 콜라겐에 특이적으로 작용하는 단백질 분해효소로서 MMP-1의 활성을 억제하여 콜라겐을 보호하면 피부조직의 탄

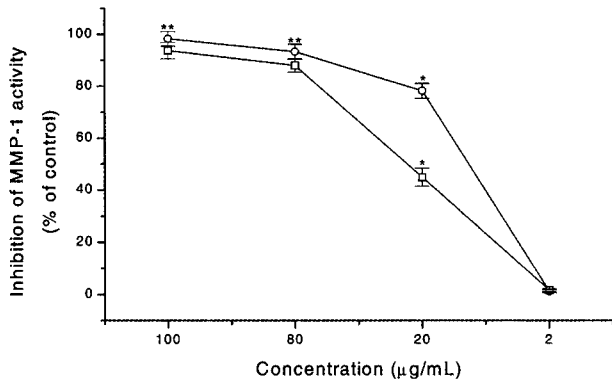


Figure 2. Inhibitory effects of the EtOAc fraction from *M. heterophylla* on MMP-1 activity. Fluorometric assays for the activities of MMP-1 was performed as detailed under the Materials and Methods in the presence of increasing concentrations of 1, 10-phenanthroline (-□-), the EtOAc fraction (-○-). The results were expressed as the average of triplicate samples with SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.

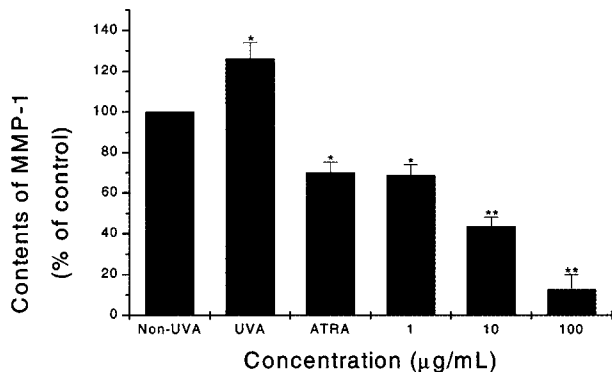


Figure 3. Effects of the EtOAc fraction from *M. heterophylla* on the production of MMP-1 in UVA-irradiated human dermal fibroblasts. The cells were treated with various concentrations of the EtOAc fraction for 24 h. The MMP-1 contents in culture media were determined by ELISA as detailed under the Materials and Methods. The results were expressed as the average of triplicate samples with SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with UVA-irradiated control.

력을 유지하고 주름의 생성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다[5]. 따라서 백림 추출물의 EtOAc 분획의 MMP-1 활성 저해효과를 알아보기 위해 형광물질이 표지된 DQ-gelatin, DQ-collagen을 이용하여 MMP-1 활성 저해작용을 측정하였다. 양성 대조그룹으로 MMP-1 활성 저해 작용이 있는 것으로 알려진 1,10-phenanthroline[6]을 이용하여 EtOAc 분획의 MMP-1 활성 저해효과를 비

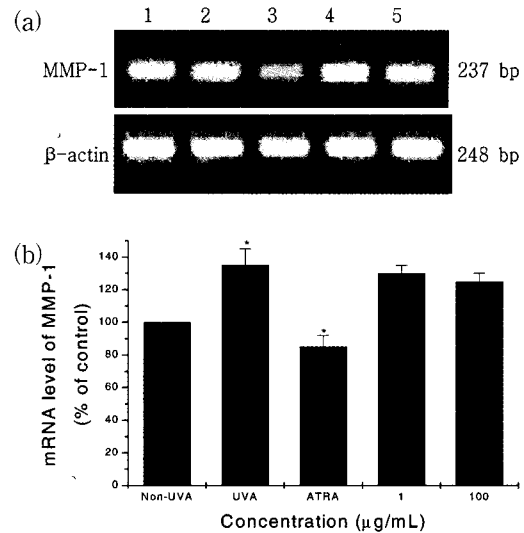


Figure 4. Effects of the EtOAc fraction from *M. heterophylla* on MMP-1 mRNA expression in UVA-irradiated human dermal fibroblasts. (A) After irradiated UVA, HDFs were treated with various concentrations of the EtOAc fraction for 12 h. Total RNA extracted from HDFs was analyzed by RT-PCR and each band, which is quantitated by a densitometer using β -actin transcripts as references, in Figure (A) corresponds to each bar in Figure (B). Lane 1; UVA non-irradiated cells, lane 2; UVA (6.3 J/cm²) irradiated cells, lane 3; UVA + 1 μ g/mL of all-*trans* retinoic acid (ATRA) treated cells, lane 4; UVA + 1 μ g/mL of the EtOAc fraction treated cells, lane 5; UVA + 100 μ g/mL of the EtOAc fraction treated cells. The results were expressed as the average of triplicate samples with SD. * $p < 0.05$ compared with UVA-irradiated control.

교하였다. 그 결과 1,10-phenanthroline는 24 μ g/mL에서 MMP-1의 활성을 50% 저해하였으며, EtOAc 분획의 경우 투여 농도 의존적으로 MMP-1의 활성을 저해하는 것으로 나타났다(Figure 2). 즉, EtOAc 분획을 2, 20, 80, 100 μ g/mL의 농도로 처리한 경우 MMP-1의 활성을 각각 1.3%, 78.3%, 93.3%, 98.3% 저해하는 것으로 나타났으며, IC₅₀은 9 μ g/mL로 양성 대조그룹인 1,10-phenanthroline보다 약 2.7배 정도 높은 MMP-1 활성 저해효과를 가지는 것으로 밝혀졌다.

3.4. UVA에 의한 MMP-1 발현 저해효과

피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 AP-1의 활성도가 증가되는 신호전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다[15]. 이러한

UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 미치는 백령 추출물의 EtOAc 분획의 영향을 알아보기 위하여 HDFs에 UVA (6.3 J/cm²)를 조사하고 EtOAc 분획을 첨가하여 24 h 배양한 후 MMP-1 발현 저해 효과를 ELISA로 측정하였다. 그 결과 EtOAc 분획은 농도 의존적으로 MMP-1의 발현을 저해하는 것으로 나타났다(Figure 3). 즉, EtOAc 분획을 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 처리한 경우 MMP-1의 발현을 각각 45.5%, 65.5%, 90.0% 저해하는 것으로 나타났으며, UV에 의해 증가되는 MMP-1의 발현을 저해하는 것으로 보고된[16] all-trans-retinoic acid (ATRA)의 경우는 1.1 µg/mL에서 44.5% 정도 저해하는 것으로 나타났다(Figure 3). 또한, HDFs에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1 mRNA에 미치는 EtOAc 분획의 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과, 양성 대조그룹으로 사용된 ATRA가 1.1 µg/mL에서 38.5%의 발현 저해효과를 나타낸 반면에, EtOAc 분획은 뚜렷한 저해효과를 나타내지 못하는 것으로 나타났다(Figure 4). 결론적으로 백령 추출물의 EtOAc 분획은 이전 연구에서 보고된[9] 백령 에탄올 추출물과 마찬가지로 단백질 수준에서만 MMP-1의 발현을 저해하는 것으로 확인되었다. 따라서, 백령 추출물의 EtOAc 분획은 UVA와 같은 여러 가지 외부 요인들에 의해서 생성되는 ROS를 1차적으로 소거함으로써 MMP의 발현을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, EtOAc 분획으로부터 항산화 효과와 MMP-1 발현 저해효과가 우수한 화합물의 구조규명을 위해 단일 화합물을 분리·정제 중에 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 백령 추출물로부터 MMP-1 발현 저해 효과를 가지는 화합물을 분리하기 위한 연구의 일환으로 백령 추출물의 각 용매별 분획에 대한 항산화 효과를 측정하고, 항산화 활성이 가장 우수하게 나타난 EtOAc 분획에 의한 MMP-1 활성 저해효과와 HDFs에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 미치는 영향을 관찰하였다. 백령 추출물의 각 용매별 분획의 DPPH와 superoxide radical 소거효과는 EtOAc 분획 > BuOH 분획 > CH₂Cl₂ 분획 > Hexane 분획 순으로, EtOAc 분획이 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. EtOAc 분획의 MMP-1 활성 저해효과는 100 µg/mL에서 98.3%로 매우 우수한 활성 저해효과를 나타내었다. HDFs에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현 저해효과는 EtOAc 분획 100 µg/mL에서 90.0%로 단백질 수준에서 우수한 발현 저해 활성을 나타냈으며, mRNA 수준에서는 뚜렷한 발현 저해활성을 나타내지 못했다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 백령 추출물의 EtOAc 분획은 항산화 효과 및 MMP-

1 활성 저해와 UVA에 의한 MMP-1의 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 보아 우수한 항노화 소재로써 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. B. A. Gilchrest, Skin aging and photoaging: an overview, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**, 610 (1989).
2. E. Cadenas, Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 79 (1989).
3. K. J. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radicals, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
4. C. Huang, W. Y. Ma, M. I. Dawson, M. Rincon, R. A. Flavell, and Z. Dong, 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 (1997).
5. S. Kondo, The roles of cytokines in photoaging, *J. Dermatol. Sci.*, **23**, S30 (2000).
6. Y. Wang, A. R. Johnson, Q. Z. Ye, and R. D. Dyer, Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain, *J. Biol. Chem.*, **274**, 33043 (1999).
7. P. Brenneisen, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **973**, 31 (2002).
8. J. H. Park, The encyclopedia of Chinese crude drugs, 310, Shinilbooks Publications, Seoul (2002).
9. Y. H. Cho, G. S. Sim, J. H. Kim, S. M. Park, B. C. Lee, H. B. Pyo, Y. P. Yun, and H. D. Park, Effects of *Melothria heterophylla* Extract on Expression of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Skin Fibroblasts, *Yakhak Hoeji*, **48**, 358 (2004).
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. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55 (1983).
13. S. E. Dunsmore, J. S. Rubin, S. O. Kovacs, M. Chedid, W. C. Parks, and H. G. Welgus, Mech-

- anisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production, *J. Biol. Chem.*, **271**, 24576 (1996).
14. P. Kuppusamy and J. L. Zweier, Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 9880 (1989).
15. 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).
16. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, P. McPhillips, Z. Q. Wang, X. Li, Y. Wan, S. W. Kang, and J. J. Voorhees, 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 (1998).