

수치에 의한 권백의 항산화 효과와 MMP 발현 저해 효과

이 범 천[†] · 심 관 섭 · 김 진 희 · 김 진 화 · 표 형 배

한불화장품(주) 기술연구소
(2005년 11월 22일 접수, 2005년 12월 15일 채택)

Effect of the Processed *Selaginella tamariscina* on Antioxidation and Inhibition of Matrix Metalloproteinase

Bum Chun Lee[†], Gwan Sub Sim, Jin Hui Kim, Jin Hwa Kim, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co. Ltd., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-gun, Chungbuk 369-830, Korea
(Received November 22, 2005; Accepted December 15, 2005)

요 약: 권백은 동양에서 암환자 치료를 위한 전통 약용식물로 알려져 있다. 본 연구에서는 포제기술을 이용한 권백을 항노화 화장품 소재로 적용하고자 다양한 생물학적활성을 평가하였다. 열과 모래를 이용한 포제 권백은 기존 권백을 다른 목적으로 이용하고자 비교하였다. 포제 권백은 페놀함량이 증가하였고 DPPH 라디칼 소거활성도 증가하였다. 세포내 활성산소 소거평가를 위해 사람 섬유아세포를 배양하여 UVB(20 mJ/cm²)에 의해 증가된 세포내 활성산소가 포제 권백을 처리함으로써 활성 산소 소거 효과가 증가 하였다. 사람 섬유아세포에서 UVA에 의해 발현되는 MMP-1효소는 포제 권백에 의해 농도 의존적으로 감소하였다. 결론적으로 포제 권백은 페놀함량의 증가와 항산화 효과가 증가하였고, 자외선에 의한 세포손상을 보호하여 항노화 화장품의 새로운 소재로 이용될 것으로 사료된다.

Abstract: *Selaginella tamariscina* with the popular Korean name Keoun Back, is a traditional medicinal plant for therapy of advanced cancer patients in the Orient. In this study, we evaluated anti-aging activity of *S. tamariscina* using processed technology and investigated diverse biological activities of processed *S. tamariscina* (PST) as an anti-aging ingredient of cosmetics. PST, heated with sand, used to different purpose compared with origin in medicine. PST raises total phenol concentration and enhances the DPPH radical scavenging activity. For testing intracellular ROS scavenging activity, the cultured human dermal fibroblasts were analyzed by increase in dichlorofluorescein (DCF) fluorescence upon exposure to UVB 20 mJ/cm² after treatment of PST. UVA-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblasts was reduced in a dose-dependent manner by PST. Taken together, these results suggest that PST may act as an anti-aging agent by preventing the skin cell from damage induced by UV irradiation, and imply that PST may be useful as a new ingredient for anti-aging cosmetics.

Keywords: *Selaginella tamariscina*, anti-aging, ROS, antioxidant activity, MMP

1. 서 론

최근 생활수준의 향상과 더불어 자연 친화적인 제품을 사용하고자 하는 소비성향이 두드러지며 천연소재를 이용한 각종 생활용품이나 화장품의 개발도 매우 활발하게 진행되고 있다. 화장품 원료로의 천연물은 효능을 나타내는 활성성분으로 민간처방에 의해 오랫동안 약재로 사용되어 인체에 대한 효능 및 부작용이 검증되어져 있고, 다양한 효능을 갖는 성분들이 풍부하게 존재하며 동시에

함유성분들의 구조 및 활성들이 비교적 상세히 보고 되어 있다. 뿐만 아니라 하나의 천연원료로부터 추출이나 정제방법에 따라 효능을 달리하는 다양한 활성성분을 얻어 사용할 수 있어 자연친화적인 green product의 개념이나 well-being concept과 같이 사회적으로 요구되어지는 trend에 적용할 수 있는 장점을 가지고 있다.

권백(*Selaginella tamariscina*)은 바위에 붙어 자라며, 한국, 일본, 중국, 타이완, 필리핀 등에서 자생한다. 겨울 철에도 죽은 것처럼 오그라들었다가 봄철 비가 오면 금방 새파랗게 살아나는 생명력이 몹시 절길 식물이다. 만년송, 만년초, 장생불사초, 불사초, 부처손, 회양초, 교시

[†] 주 저자 (e-mail: bclee@hanbul.co.kr)

등의 많은 이름으로 불리고 한약명으로는 권백(卷柏)이라고 부른다. 권백은 마음을 안정시키고 혈액순환을 좋게 하며, 피를 멎게하며 기침을 멈추게 하고 독성이 없어 오래 먹으면 장수한다고 한다. 또한 간암, 폐암, 모발상피암 같은 종양에 탁월한 효과를 나타내는 생약으로 알려져 있다[1]. 이러한 권백의 성분은 amentoflavone, hinokiflavone, isocryptomerin, sotetsuflavone, cryptomerin B 등과 같은 biflavonoid 및 여러 페놀성 화합물들을 함유하는 것으로 보고 되어 있다[2].

포제(炮製)는 한의학에서 사용되는 전통 생약 가공법제로서 수치(修治) 또는 포자(炮炙)라고도 한다. 약물의 의료적인 목적, 조제(調製) 또는 제제(製劑) 등의 수요에 의거하여 가공 처리하는 방법의 총칭으로 약물의 형태가 바뀐 것을 선별하고 잡질을 제거하며 정제, 가열처리, 보조(輔料)를 이용한 가공 등이 포함된 용어이다. 보료는 포제에 사용되는 보조제로서 그 특성과 사용방법에 따라 약효의 증감, 약재의 성질 등이 달라지는데, 술과 식초, 꿀, 약즙, 식염수와 같은 액체보료와 쌀, 밀기울, 백반, 모래, 두부 등의 고체보료가 있다. 포제는 중국의 가장 오래된 의서인 내경(內經), 신농본초경(神農本草經)에도 기재되어 있는 만큼 2000년이 넘는 역사를 가지며 초기에는 약재를 세절, 세절 등의 간단한 손질을 시작으로 술의 발명으로 포제기술은 급속도로 발전, 오랜 처방과 치료의 경험으로 수정, 보완되어 왔다[3].

한의학에서 포제를 사용하는 목적은 약물의 독성과 부작용을 줄이고 치료효과를 높이거나 조제와 제제 및 환자의 복용을 편하게 하고 원료의 저장성 개선과 표준화를 이루기 위한 것이다[4]. 본 연구에서는 화장품 원료개발에 있어서 천연물 가운데 피부에 유용한 성분 함량을 높여 효과를 배가하고 제형에 부적절한 영향을 미치는 인자는 제거하여 성상을 개선시키기 위해 한방의 포제 원리와 방법을 도입, 응용하였다. 본 실험에서는 생약제로 알려진 권백을 전통적인 포제(炮製) 방법 중 하나인 사초(砂炒) 방법을 이용하였다. 사초 포제 전후 권백의 페놀 함량, 플라보노이드 함량 변화를 측정하였고, 항산화 활성과 MMP 발현에 대한 저해 효과를 연구하여 향후 노화방지 화장품에 응용하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 권백의 사초포제

본 실험에 사용한 권백(*Selaginella tamariscina*)은 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 권백의 잡질을 제거하고 15~20 mesh의 해사(Seasand, Samchun Chemical, Korea)와 혼합하여 160~180°C에서 3 h 가열하여 사초포제 하였다. 포제된 권백(processed *Selaginella tamari-*

scina, PST)은 해사를 제거하고 70% 에탄올 수용액으로 70°C에서 3 h 환류 추출한 다음 여과하여 감압 농축, 동결건조 하여 사초권백을 얻었다. 포제하지 않은 권백(unprocessed *Selaginella tamariscina*, UST)도 동일한 방법으로 추출하였다.

2.2. Total Phenol 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu Reagent (FCR)를 이용하여 측정하였다. FCR은 heteropolyphosphotunstate-molybdate를 함유하는 산화제로서 염기의 조건에서 phenol과 반응하면 tunstate와 molibdate가 환원되면서 푸른색을 띠는 반응물로 전환된다[5].

에탄올에 용해한 시료, 1 mL를 증류수 10 mL과 혼합하고 FCR 2 mL을 첨가하여 상온에서 5 min간 반응시킨 다음 2 mL의 20% sodium carbonate 용액을 첨가하였다. 상온에서 60 min 반응시킨 후 UV/visible spectrophotometer (Cary 1E, Varian, USA)를 사용하여 680 nm에서 흡광도를 측정하였으며 standard phenolic compound는 gallic acid를 사용하였다.

2.3. Total Flavonoid 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 $AlCl_3$ 용액으로 측정하였다. 플라보노이드 구조 내에 알루미늄과 결합하여 플라보노이드 고유의 UV spectrum을 장파장 쪽으로 shift시킴으로써 aluminum complex의 함량을 비교하였다[6].

에탄올에 용해한 시료 1.5 mL와 동량의 2% $AlCl_3$ 용액을 혼합하여 상온에서 10 min간 반응시킨 후 367 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard flavonoid 화합물로서 quercetin을 사용하였다.

2.4. DPPH에 의한 라디칼 소거 효과

자유라디칼 소거 효과 측정[7]은 0.1 mM 2,2-di(4-tert-phenyl)-1-picrylhydrazyl radical (DPPH)에 PST와 UST를 농도별로 동량 첨가하여 37°C에서 10 min간 반응시킨 후 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 세포 배양(Cell Culture)

신생아의 표피조직에서 분리한 human dermal fibroblasts (HDFs)는 Modern Tissue Technology (MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 DMEM/F12 (3 : 1) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO_2 조건하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10 세대 세포를 실험에 이용하였다.

2.6. UV 조사 및 시료의 처리

HDFs을 1.5×10^5 cells/mL의 농도로 35 mm dish에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때 까지 배양한다. UV조사 전에 배양배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum을 제거 후 6.3 J/cm^2 UVA (UVA F15T8.BLB, Sankyo Denki, Japan), 20 mJ/cm^2 UVB (UVB G15T8E, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. UV 조사 후 배양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3 : 1) 배지에 PST를 투여하여 배양하였다.

2.7. 사람 섬유아세포에서의 자유라디칼 소거 효과

HDFs를 96 well plate에 1×10^5 cells/mL로 분주하여 약 80%의 confluency에 도달할 때 까지 배양한다. 자외선(UVB) 조사 전에 배양 배지를 제거한 후 HEPES-buffered control salt solution (HCSS : 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl_2 , 2.3 mM CaCl_2 , 15 mM Glucose, 20 mM HEPES, 10 mM NaOH)로 세척하여 배지 내 serum을 제거하였다. HCSS에 0.1% Pluronic F-127 (molecular probe)을 혼합한 후 $4 \mu\text{M}$ 5-(6-chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein)diacetate (CM-H2DCFDA, Molecular Probe사, Eugene, OR, USA)를 처리하고 PST를 농도 별로 처리하였다. 37°C 에서 반응 후 20 mJ/cm^2 UVB를 조사 후 luminescence spectrophotometer (Perkin Elmer, UK)를 사용하여 DCF (Ex: 488 nm, Em: 525 nm)에 의한 세포내 형광값을 측정하였다 [8,9].

2.8. MMP-1 발현 측정(ELISA법)

HDFs에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24 h 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4°C 에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 3% bovine serum albumin (BSA)/PBS로 37°C , 1 h 동안 blocking한 후 $0.3 \mu\text{g/mL}$ monoclonal anti-MMP-1 (mouse)을 $150 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 37°C , 90 min간 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척 후 $0.2 \mu\text{g/mL}$ 의 anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 $150 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 37°C , 90 min간 반응시킨 후 다시 PBS-T로 세척한 다음 diethanolamine buffer에 1 mg/mL *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP)를 포함한 기질용액 $150 \mu\text{L}$ 를 넣어 실온에서 30 min간 반응시켰다. 3 N NaOH를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 microplate reader을 사용하여 405 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

2.9. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며 *p* 값이 0.05 미만

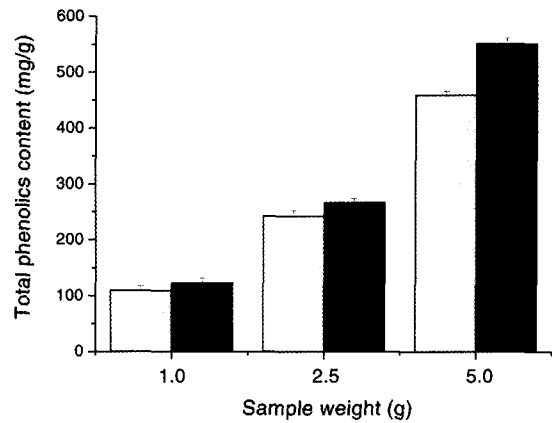


Figure 1. The contents of total phenolic compounds of UST and PST. □; UST, ■; PST.

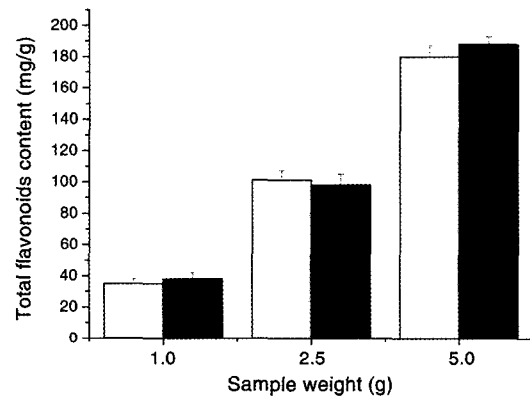


Figure 2. The contents of total flavonoids of UST and PST. □; UST, ■; PST.

일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1. 권백의 총 페놀 및 플라보노이드 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 페놀성 하이드록실기(OH)를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하며, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다. 본 실험에서는 포제 방법을 이용하여 권백의 포제 전후의 페놀 및 플라보노이드 함량 변화를 알아보려고 UST와 PST의 1.0, 2.5, 5.0 g에 대하여 g 당 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 총 페놀 함량의 경우 UST의 경우 g 당 99.3 mg 으로 약 9.9%의 함량을 차지하는 것으로 나타났고, PST는 g 당 113.4 mg 으로 11.3%의 함량을 차지하는 것으로 나타나 포제가공 이후 페놀함량은 14.2% 가량 증가된 것으로 나

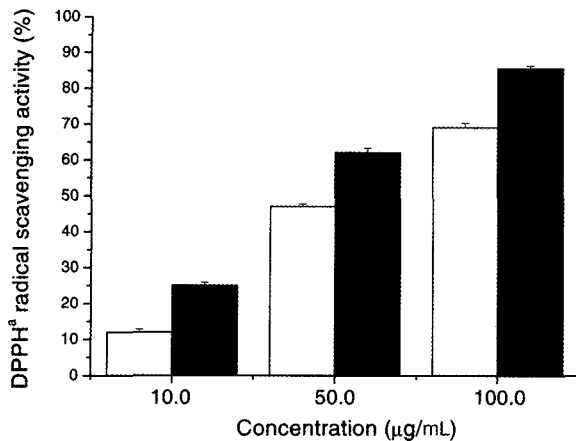


Figure 3. Antioxidant effect of UST and PST, in DPPH assay. a) DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical; □; UST, ■; PST.

타났다(Figure 1).

UST의 플라보노이드 함량은 g당 37.2 mg으로 약 3.7%이고 PST의 경우는 38.6 mg으로 3.9% 함량을 나타내어 포제가공 이후 플라보노이드 함량의 변화는 거의 나타나지 않았다(Figure 2).

3.2. 피부 유해 라디칼 소거효과

활성산소는 체내 각종 세포들의 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되며, 자외선 및 외부환경에 의해서도 세포내에서 발생된다. 활성산소와 지질이 반응하면 과산화 지질이 생성되어 혈관벽이나 세포막의 구조가 파괴되어 조직이 손상된다. 이런 산화반응에서 활성산소에 의해 피부노화가 가속화될때, 활성산소의 프리라디칼에 대한 피부보호효과를 측정하기 위해 프리라디칼인 DPPH에 대한 라디칼 소거효과를 실험하였다[10].

UST와 PST의 프리라디칼인 DPPH에 대한 소거효과는 PST가 약 15% 정도 DPPH에 대한 소거효과가 증가하는 것으로 나타났다(Figure 3). Cai 등[11]의 연구에 의하면 페놀성 화합물은 강력한 항산화제로서 천연물에서 그 함량이 증가할수록 천연물의 항산화 활성은 비례적으로 증가한다고 보고하였다. 따라서 사초, 포제 이후, 약 14% 가량 증가된 페놀 함량이 항산화 활성 증가에 기여하였을 것으로 판단된다.

3.3. 사람 섬유아세포에서의 자유라디칼 소거 효과

DCFH의 산화로 생성된 DCF의 형광값을 측정한 실험으로 세포내에 생성된 과산화수소나 산화적 스트레스를 실험하였다. DCFH는 hydroxyl radical, nitrogen oxide radical($\text{NO} \cdot$), thyl radical, bicarbonate radical anion 등에 의해 산화된다. DCFH는 apoptosis 동안 세포내 산화

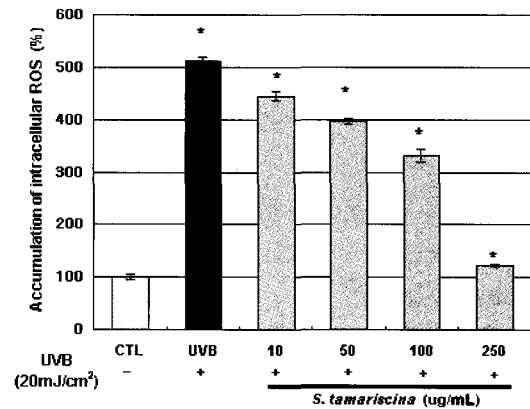


Figure 4. The effect of PST on the production of intracellular reactive oxygen species (ROS) in human dermal fibroblasts. The values of intracellular ROS are significant (* $p < 0.05$). Values are expressed as mean \pm S.E.M.

적 스트레스를 평가하는데 사용되어져 왔으며, H_2O_2 나 자외선에 의해 생성된 라디칼 및 세포내 신호전달과 관련된 연구에 최근 사용되고 있다[12]. 형광 스펙트로포토미터를 이용하여 세포가 well plate에 부착되어 살아있는 상태에서의 형광값을 측정한 결과, HDFs를 배양함으로써 세포자체의 생리작용에 의한 기본적인 형광값과 비교하여 자외선(UVB 20 mJ/cm²) 조사 결과 약 5배 정도로 급격히 증가함을 알 수 있었다. 이러한 조건에서 PST를 농도 별로 처리한 결과 자외선에 의해 높아졌던 형광값이 농도 의존적으로 다시 감소하여 프리라디칼 소거효과를 나타내었다(Figure 4).

3.4. UVA조사에 의한 MMP-1단백질 발현 억제 효과 (ELISA)

피부의 광노화에 있어 MMP-1은 자외선, mitogenic growth factor, proinflammatory cytokine 등이 발현을 촉진한다고 알려져 있으며 세포내 신호전달 경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다[13,14]. 이러한 UV 및 활성산소에 의해 유도되는 MMP-1 발현 억제 효과 실험은 MMP-1의 효소활성에 대한 직접적인 저해작용만 관찰하는 평가 방법과는 달리 자외선에 의해 유도되는 사람 섬유아세포의 MMP 발현조절 기능을 평가할 수 있어 생체 내에서 콜라겐과 같은 세포외기질의 합성과 분해를 적절하게 조절할 수 있는 유용한 방법으로 알려져 있다. PST에 대한 MMP-1 발현 억제 효과를 실험한 결과, UVA를 6.3 J/cm² 조사하는 경우 자외선을 조사하지 않은 대조군에 비해 약 53%의 MMP-1 발현을 촉진하는 것을 확인하였으며, 100 µg/mL의 농도에서 자외선에 의한 MMP-1 발현

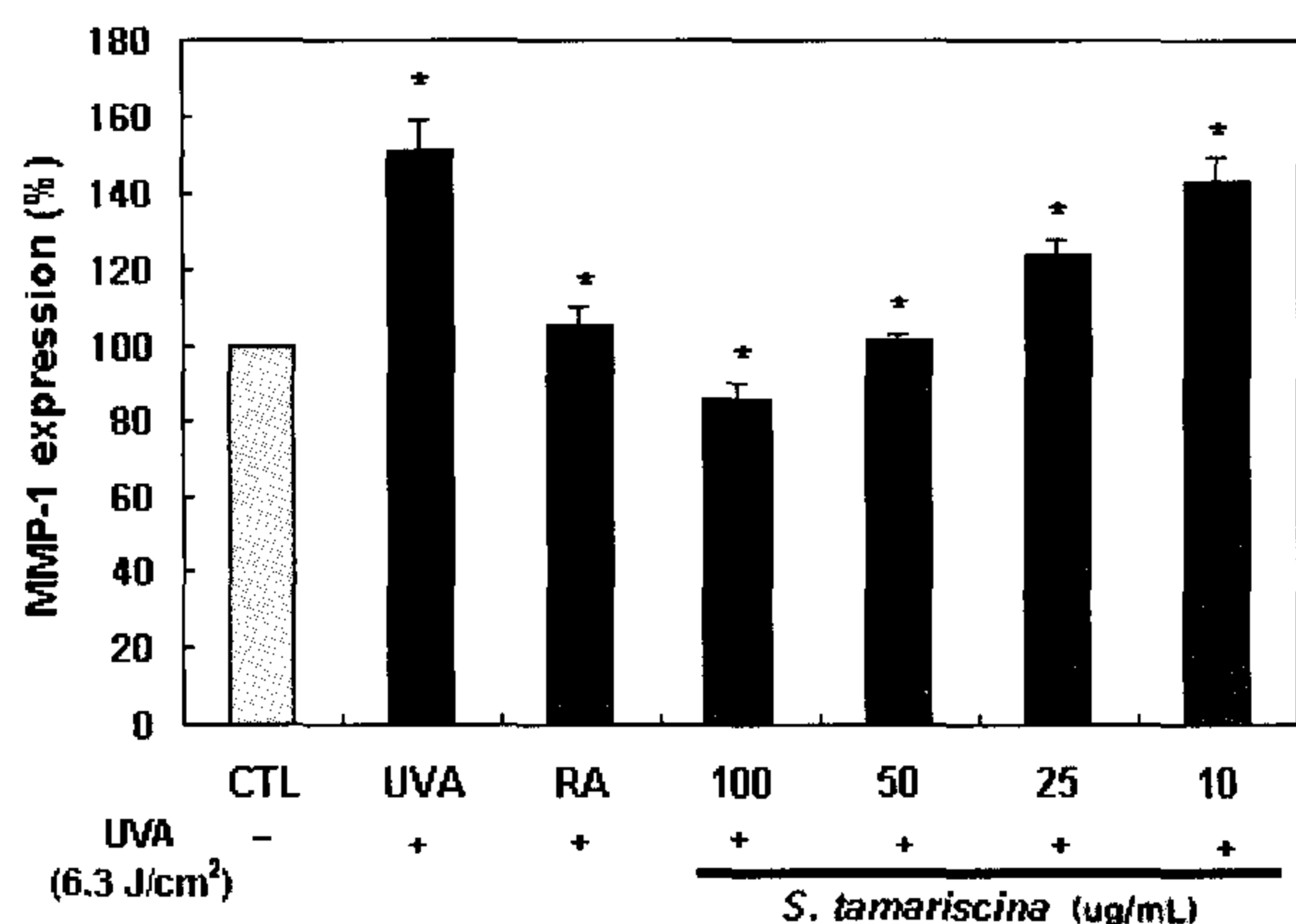


Figure 5. The effect of PST the production of MMP-1 by the UV irradiated human dermal fibroblast. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. * $p < 0.05$ compared with control. (RA, 3.5 μ M retinoic acid).

축진을 완전히 억제하는 것으로 나타났다(Figure 5). 이는 UV에 의한 c-Jun 단백질의 발현증가를 억제하여 MMP-1 발현저해 효과가 보고된[15] retinoic acid (3.5 μ M)보다 우수한 MMP-1 발현 억제효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 전통가공기술인 포제(炮製) 방법 중 하나로 사초(砂炒)방법을 이용한 권백(PST)의 항산화 효과 및 사람 섬유아세포에서 UV에 의한 MMP 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. PST는 UST에 비하여 총 페놀 함량이 증가하여 DPPH radical 소거효과도 역시 증가 함을 나타내었다. 세포 내에서 ROS에 의해 형광을 띠는 물질로 전환되는 CM-H2DCFDA를 이용하여 ROS의 양을 측정된 결과 자외선에 의해 증가된 세포내 ROS의 양이 PST를 처리함으로써 250 μ g/mL에서 약 80% 이상의 우수한 소거효과를 나타내었다. 또한 사람섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현 저해 효과는 PST 100 μ g/mL에서 75% 이상 저해효과를 나타내었다. 사초를 이용한 포제 권백은 항산화효과와 UVA에 의한 MMP의 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 보아 우수한 항노화 소재로써 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. I. S. Lee, A. Nishikawa, F. Furukawa, K. I. Kasahara, and S. U. Kim, Effects of *Selaginella tamariscina* on *in vitro* tumor cell growth, p53 expression, G1 arrest and *in vivo* gastric cell proliferation, *Cancer letters*, **144**, 93 (1999).

- D. I. Shin and J. Kim, Flavonoid constituents of *Selaginella tamariscina*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **22**, 207 (1991).
- 강병수, 서부일, 최호영, 한약포제와 임상응용, 영림사, 15 (2003).
- 김기영, 송호준, 한약포제학, 신일상사, 35 (2002).
- L. Vernon, Singleton, O. Rudolf, and M. L. Rosa, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, **299**, 152 (1999).
- T. Shinya, T. Tomoyuki, K. Waka, R. Neil, F. Lai, O. Munetaka, A. Shinya, H. Hiroshi, I. Okezie, Aruoma, and B. Theeshan, Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes, *Free radical Research*, **37**, 1215 (2003).
- M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
- S. Y. Seo, E. Y. Kim, H. Kim, and B. J. Gwang, Neuroprotective effect of high glucose against NMDA, free radical and oxygen-glucose deprivation through enhanced mitochondrial potentials, *J. Neurosci.*, **19**, 8849 (1999).
- I. D. Trayner, A. P. Rayner, G. E. Freeman, and E. Farzaneh, Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) or dihydrorhodamine 123 (H2R123), *J. Immunological Methods*, **186**, 275 (1995).
- H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Active oxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162 (1995).
- Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, and H. Corke, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Science*, **74**, 2157 (2004).
- Y. Tampo, S. Kotamraju, C. R. Chitambar, S. V. Kalivendi, A. Keszler, J. Joseph, and B. Kalyanaraman, Oxidative stress-induced iron signaling is responsible for peroxide-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein in endothelial cells, *Circ. Res.*, **92**, 56 (2003).
- S. J. Kondo, The roles of cytokines in photoaging,

- J. Dermatol. Sci.*, **23**, S30 (2000).
14. S. E. Fligiel, J. Varani, S. C. Datta, S. W. Kang, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Collagen degradation of in aged/photodamaged skin *in vitro*, *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 842 (2003).
 15. 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).