

## 바위취 에탄올 추출물의 항산화 및 항노화 작용

윤미연 · 임혜원\* · 심상수\*\* · 최태부#

건국대학교 미생물공학과, \*이화여자대학교 생명과학과, \*\*중앙대학교 약학대학  
(Received September 3, 2007; Revised October 4, 2007)

### Anti-oxidant and Anti-aging Activity on *Saxifraga stolonifera* MEERBURGH Ethanol Extract

Mi Yun Yoon, Hye Won Lim\*, Sang Soo Sim\*\* and Tae Boo Choe#

Dept. of Microbiological Engineering, Konkuk university, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul Korea

\*Dept. of Life Science, Ewha Womans university, 11-1 Daehyun-dong, Seodaemun-gu, Seoul Korea

\*\*College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221 Huksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — To investigate the effect of ethanol extract of *Saxifraga stolonifera* MEERBURGH on skin care, we measured anti-oxidant and anti-aging activity. *S. stolonifera* ethanol extract itself had anti-oxidant activity in a dose-dependent manner in DPPH radical scavenging. Silica dose-dependently increased the intracellular ROS generation in RAW 264.7 cells. *S. stolonifera* ethanol extract inhibited silica-induced intracellular superoxide anion generation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroperoxide generation in RAW 264.7 cells. *S. stolonifera* ethanol extract significantly inhibited both hyaluronidase and elastase activity, also significantly inhibited MMP-1(collagenase) activity as well. In NIH 3T3 fibroblast cells, *S. stolonifera* ethanol extract significantly increased collagen-like polymer synthesis, which suggesting the *S. stolonifera* ethanol extract might be used as hydration and anti-wrinkle agents. From the above results, it is suggested that the main ingredients of *S. stolonifera* ethanol extract play an important role in anti-oxidant and anti-aging activity.

**Keywords** □ *Saxifraga stolonifera*, ROS, collagen, anti-aging

사람이 나이가 들면서 나타나는 노화는 매우 복잡하게 생물학적으로 진행되고 있으며, 원인으로는 유전적인 요인뿐만 아니라 영양상태, 흡연, 알코올, 환경적인 원인과 같은 외인적인 요인에 의해 영향을 받게 된다. 특히 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인하여 노화가 가속화 시키게 되는데, 이러한 산화적 스트레스는 radical oxygen species(ROS)를 형성하는데 주도적인 작용을 하며,<sup>1)</sup> DNA를 손상시킨다. 이러한 손상된 DNA는 최종적으로 collagen을 파괴시킬 뿐만 아니라 형성된 ROS로 인하여 염증(inflammation), 광손상(Photodamage), 발암(Carcinogenesis) 등을 유발하게 된다. 특히 문제가 되는 것은 활성산소가 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질 과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 항산화물질은 산화적 손상을 무력화 시킬 뿐만 아

니라 세포내외의 스트레스요인으로부터 세포를 보호하는 작용을 하게 된다.<sup>2)</sup> 이러한 노화는 전신 장기 중에 특히 피부는 노화가 가장 현저하게 나타나는 조직이다. 노화가 진행된 노인에서 피부의 변화를 살펴보면 진피의 두께는 약 20% 소실되며 세포층 실성(cellularity)과 혈관이 감소하게 된다. 따라서 젊은 사람에 비하여 노인에서는 둔부의 유두 진피에서 비만세포가 50% 감소하며, 자외선 조사에 의한 염증 반응과 히스타민 유리가 감소하게 된다. 또한 혈관의 탄력성분이 변성되어 모세혈관이 유약해져 쉽게 멍이 들게 된다. 나이에 따라 진피 섬유아세포의 collagenase RNA 치는 증가하고 전교원질 형과 형은 감소하게 되어 교원질 합성은 감소하고 쉽게 분해되어 교원질은 1년에 약 1% 씩 감소하게 된다. 결국 진피의 노화로 인하여 피부는 경직되고, 탄력성이 없어지고 반응성이 떨어지며, 스트레스에 의한 반응에 잘 적응하지 못하게 된다.<sup>3)</sup> 피부의 노화는 피부의 주름 형성과 보습 작용의 감소로 인한 피부 건조가 대표적인 현상으로서 이들의 주된 원인은 피부 결합조직 내에 존재하는 collagen이나 elastin 섬유 및 hyaluronic acid의 감소를 들 수 있다. 피부의 주름은 여러 가지 원인이 있겠으나 결합조직 섬유의 손상과도 많은 연관성이

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-450-3523  
(E-mail) tbchoe@konkuk.ac.kr

있다.

바위취(*Saxifraga stolonifera* Meerburg.)는 장미목 · 범의귀과이며 그늘진 습지에 자생하는 다년초로 우리나라를 위시해서 일본과 중국에도 널리 분포되어 있다. 자생력이 강하여 추운겨울에도 잘 자라며 민간요법에서 다양한 질병의 치료제로 사용되기도 하였다.<sup>4)</sup> 바위취는 caffeic acid, quercetin, bergenin 등의 phenolic 계열의 성분을 포함하고 있으며, 이러한 성분들은 많은 연구에서 항산화, 항염증 작용 및 collagen 합성을 증가시키는 성분으로 보고되어있다.<sup>5-7)</sup> 바위취는 이러한 효과적인 성분으로 이루어져있음에도 불구하고 아직 이 식물의 추출물에 대한 다양한 약리 작용에 대한 보고는 없는 실정이다. 그러므로 이 실험에서는 phenolic 계열의 성분을 포함하고 있는 바위취를 에탄올 추출하여 항산화 작용과 보습 및 주름살 방지에 대한 작용을 관찰하고, 천연화장품, 기능성 화장품의 개발 가능성이 있는지를 규명하였다.

## 실험 방법

### 시약

Human leukocyte elastase(HLE), hyaluronic acid, hyaluronidase, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), MTT, collagen, collagenase type I 등은 Sigma chemical Co.로부터 구입하였으며, DQ collagen, dihydroethium(DHE), dihydrorhodamine(DHR), dihydroethidium, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)는 Molecular Probe Co.(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. RAW 264.7 세포와 NIH 3T3 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 구입하였다.

### 세포 배양

RAW 264.7(rat macrophage) 세포와 NIH 3T3(mouse fibroblast) 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin(100 IU/50 µg/ml)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. RAW 264.7 세포를 이용하여 세포내 superoxide 생성, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성, hydroperoxide 생성을 측정하였다. NIH 3T3 세포를 이용하여 collagen-like polymer 생성을 측정하였다.

### 시료의 제조

본 실험에 사용한 바위취는 전라북도 익산 함라초당에서 재배한 한국 재래종으로 바위취 지상부 및 구근 6 kg을 채취하여 시료로 사용하였다. 시료는 이화여자대학교 생명과학부 환경생태학연구실에서 감정한 후 그대로 사용하였다(# SE-10). 360 g의 바위취를 세척한 후 absolute ethanol 3 l를 가해서 상온에서 48 시간 추출하여 원심분리로 에탄올 추출액을 얻었다. 조작을 2회

반복하였으며 모은 같은 여액을 실링지 멸균필터지를 이용하여 필터링 한 후 감압농축하고 동결건조 하였다.<sup>8)</sup> 이상의 표본은 이화여자대학교 생명과학부 환경생태학 연구실에 보관 중이다.

### MTT assay

바위취 에탄올 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여, MTT assay를 하였다. 세포 주는 NIH 3T3 세포를 사용하였으며, 96 well plate에 well 당 1×10<sup>4</sup> 수로 분주하고 각각의 시료를 농도 별로 가한 후 48시간 동안 37°C에서 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 48시간 후 배양 용액을 버리고, Krebs buffer 용액(mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4, MgCl<sub>2</sub> 0.5, HEPES [pH 7.4] 10, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 5)에 녹인 MTT 용액 500 µg/ml을 각 well에 200 µl씩 가하고 어두운 곳에서 4시간 배양 후 상층액을 버리고, 100% DMSO를 각 well에 200 µl를 가하여 MTT formazan을 용해시킨다. 실온에서 15분간 MTT formazan을 완전히 용해 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 항산화 활성 측정

DPPH 라디칼은 매우 안정한 자유 라디칼 (free radical)이다. 이 라디칼을 소거하는 정도로서 항산화 작용을 평가하였다. 96 well plate에 에탄올에 녹인 100 µM 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) 용액 180 µl와 바위취 에탄올 추출물을 1, 3, 10, 30, 100 µg/ml의 농도로 각각 20 µl 씩 가하고 차광 상태에서 37°C에서 20분간 배양하였다. 배양 후 FL 600 spectrofluorometer(Bio-Tek, U.S.A.)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>9)</sup>

### 세포내 superoxide 생성 측정

RAW 264.7 세포를 10 ml의 Krebs buffer 용액에 분산시킨 후 10 µM dihydroethidium을 가하고 1시간 빛을 차단한 곳에서 배양하였다. dihydroethidium이 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후 10<sup>5</sup> cells/ml로 분주하고 각각의 시료를 전처리 한 후 silica 1 mg/ml을 가하여 30분간 superoxide 생성을 유도하였다. 원심 분리 후 cell pellet 을 200 µl의 Krebs 용액에 분산시킨 후 형광 (Ex: 480 nm; Em; 586 nm)을 측정하였다.<sup>10)</sup>

### 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성 측정

RAW 264.7 세포를 10 ml의 Krebs buffer 용액에 suspend시킨 후, 20 µM DCF-DA를 가하고 30분간 차광상태에서 배양하였다. DCF-DA가 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후 원심분리 하여 세포를 추출하였다. 10<sup>5</sup> cells/ml로 소분하고 각각의 시료를 각각의 농도로 전처리한 후 silica(1 mg/ml)를 가하여 30분간 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성을 유도하였다. 원심분리(3,000 g×10 min) 후 cell pellet을 200 µl의 Krebs 용액에 재 분산시켜 96 well plate에 옮

긴 후 형광도(Ex 485 nm/Em 535 nm)를 측정하였다.<sup>11)</sup>

**세포내 hydroperoxide 생성 측정**

RAW 264.7 세포를 10 ml의 Krebs buffer 용액에 부유시킨 후, 10 µM DHR을 가하고 30분간 차광장소에서 배양하였다. DHR 이 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후, 10<sup>5</sup> cells/ml로 소분하고 각각의 시료를 각각의 농도로 전처리한 후 silica(1 mg/ml)를 가하고 30분간 hydroperoxide의 생성을 유도하였다. 원심분리 (3,000 g×10 min) 후 cell pellet을 200 µl의 Krebs 용액에 재 분산시켜 96 well plate 에 옮긴 후 형광도(Ex 488 nm/ Em 515 nm)를 측정하였다.<sup>12)</sup>

**Hyaluronidase 저해효과 측정**

96-well microplate에 55°C로 가온된 hyaluronic acid-agarose mixture를 100 µl씩 분주한 후 실온에 방치하여 gel화시켰다. 100 µl hyaluronidase(40 unit)를 가하고 시료를 농도별로 10 µl 첨가한 후 37°C에서 5시간 배양하였다. 상층액을 버리고, 10% (w/v) cetylpyridinium chloride를 100 µl 가하여 실온에서 30분 방치하고 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Elastase 활성 측정**

Human leukocyte elastase를 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.3)에 녹여 1 unit/ml 용액을 만들었다. elastase 기질 용액은 MeO-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Val-pNa(p-nitroanilide)를 DMSO 에 녹여 20 mM stock solution을 만들었다. 각 시료가 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 elastase를 시료와 혼합한 후 10 µl 를 96 well plate 에 분주하고 10 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 200 µM p-nitroanilide를 200 µl를 첨가하였다. 반응액은 37°C에서 20분 배양하고 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**MMP-1(collagenase) 저해효과 측정**

반응완충액(phosphate buffer saline, PBS pH 6.0) 100 µl에 0.25 mg/ml로 PBS에 용해한 DQ collagen 20 µl와 시료 40 µl를 첨가하고 0.5 unit로 희석한 collagenase 40 µl을 첨가한다. 암소, 실온에서 20분경과 후 형광 분광광도계를 이용하여 흡수파장 495 nm, 방출파장 515 nm로 형광값을 측정하며, 대조군으로서 효소액 대신 PBS 을 효소와 동량 첨가하여 형광값을 측정하였다.<sup>13)</sup>

**NIH 3T3 fibroblast 세포에서 collagen-like polymer 정량**

NIH 3T3 세포를 10% FBS이 함유한 DMEM에서 충분히 배양한 후 직경이 35 mm인 6 well plate 에 10<sup>5</sup> cells/3 ml로 분주하였다. 24시간이 지난 후에 각각의 시료를 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 상층액은 버리고 scraper를 이용하여 세포를 분

리하여 eppendorf tube에 이전시켰다. 세포를 Buffer A(20 mM Tris-HCl, pH 7.5+5 mM CaCl<sub>2</sub>)에 넣고 sonication후 원심분리 (12,000 rpm, 20 min)하여 cell debris를 제거하였다. Crude cell lysate를 80°C에서 10분간 열처리하고 원심분리(12,000 rpm, 20 min)하여 침전된 단백을 제거하였다. Collagen-like polymer (CLP)는 상층액에 녹아있는 상태로 있다. 한 sample 당 4개의 tube를 준비하여 37°C에서 1시간 배양하였다. 바로 만든 ninhydrin reagent 1 ml를 각각의 tube에 가하고 boiling water bath 에서 20분간 배양하였다. Ice-cold water bath로 옮겨 급속히 냉각시켜 반응을 정지시키고 희석용 용액(n-propanol : water =1 : 1, v/v)으로 5배 희석하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. collagenase type IA에 의해 유리된 양을 collagen-like polymer (CLP)로 간주하였다.<sup>14)</sup>

**자료분석 및 통계적 검정**

실험 결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 실험 성적은 non-paired Student's t-test로 검정하였다.

**실험결과 및 고찰**

**바위취 에탄올 추출물의 세포독성 측정 및 DPPH radical 소거 작용**

섬유아세포에 나타난 바위취 에탄올 추출물의 세포독성을 실험하였다. 바위취 에탄올 추출물에서 최저 95.1%의 생존율을 나타내었으며(Fig. 1), 대조군과 비교하여 유의한 변화를 나타내지 않는 것으로 보아 세포독성이 매우 낮은 것으로 확인되었다. 또한 바위취는 항산화 효능이 있다고 알려진 성분을 포함하고 있으며, 바위취 추출물의 자체적인 항산화 작용을 규명하기 위하여 DPPH radical 소거 활성을 관찰하였다. DPPH radical 소거

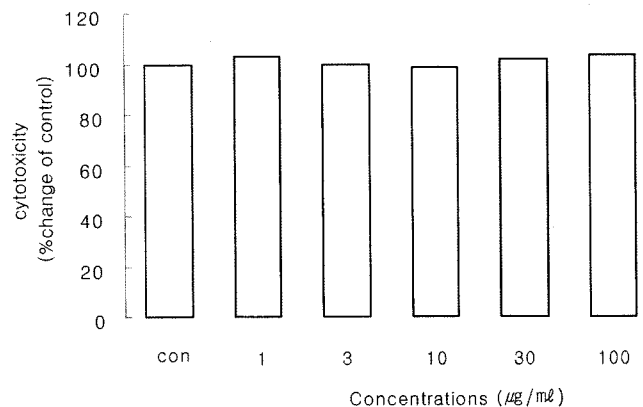
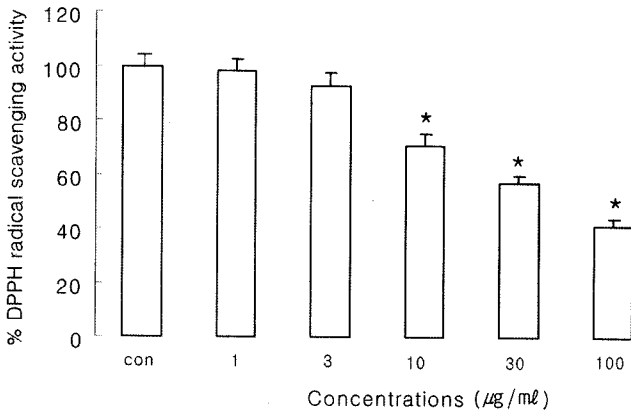


Fig. 1 - The cytotoxicity of *S. stolonifera* ethanol extract in NIH 3T3 fibroblast. Cells were treated with each concentration of *S. stolonifera* ethanol extract for 48 hr at 37°C. Cell cytotoxicity was measured by MTT assay.

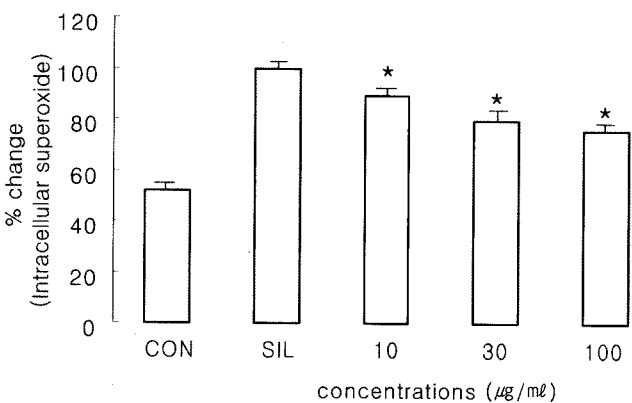


**Fig. 2** – Anti-oxidant effect of *S. stolonifera* ethanol extract in the DPPH assay. A solution of 180 µl of 100 µM DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 µl of *S. stolonifera* ethanol extract for 30 min and the absorbance was measured at 517 nm. Results are means±SD from 3 separate experiments. \*p<0.05 : Significantly different from control.

활성에서 바위취 에탄올 추출물을 농도 의존적으로 항산화 작용을 보였다. 특히 100 µg/ml 농도에서 58.9%의 억제율을 나타내었다. 따라서 바위취 에탄올 추출물 자체의 항산화 효능이 있는 것으로 사료된다(Fig. 2).

**RAW 264.7 세포에서 reactive oxygen species(ROS) 소거 활성**

산소를 이용하는 세포는 끊임없이 ROS가 생성된다. ROS중 가장 먼저 생성되는 것이 superoxide anion으로서 이를 제거하

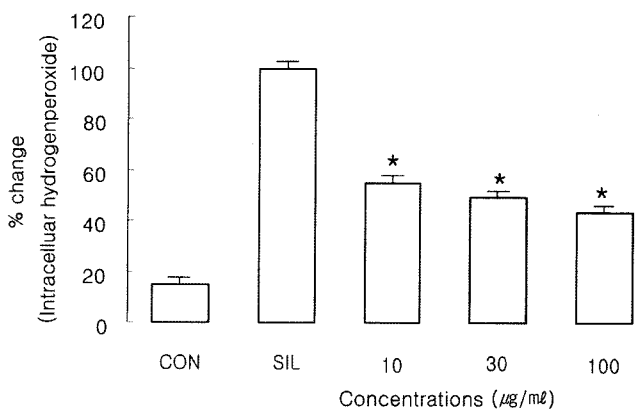


**Fig. 3** – Effects of *S. stolonifera* ethanol extract on intracellular superoxide generation in RAW 264.7 cell. DHE-loaded RAW 264.7 cells were preincubated with *S. stolonifera* ethanol extract and stimulated with 1 mg/ml silica (SIL) at 37°C for 20 min. Control (CON) was the cells treated with 1% DMSO in the absence of silica. Data were expressed as % change of silica. Results are means±SD from 3 separate experiments. \*p<0.05 : Significantly different from control.

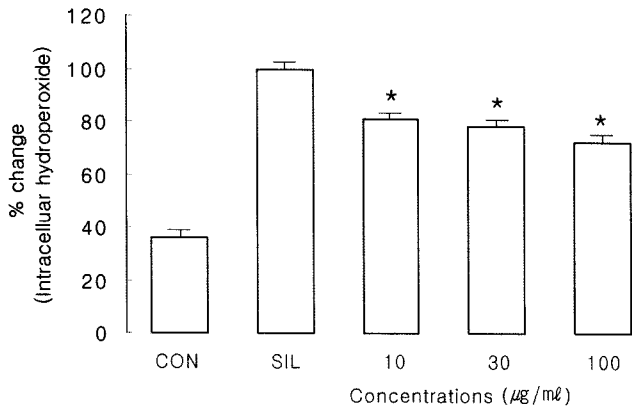
는 효소로서 superoxide dismutase가 hydrogen peroxide로 전환시킨다. Hydrogen peroxide는 세포내 catalase나 peroxidase에 의해서 무해한 물과 산소로 전환된다. 그러나 이러한 과정에서 세포내에는 peroxynitrite나 lipid hyperoxide와 세포내 hydroperoxide가 생성되기도 한다. 시험관내에서 바위취 추출물 자체가 강한 항산화 작용을 나타내고 있는데, 이 실험에서는 세포내에서 생성되는 ROS의 생성에도 영향을 주는 지를 관찰하였다. Silica는 macrophage에서 뿐만 아니라 fibroblast 에서도 reactive oxygen species를 생성하는 물질로 알려져 있다.<sup>15)</sup> RAW 264.7 세포에서 바위취 추출물의 세포내 ROS 소거 활성 효과를 확인하는데 있어서 silica 1 µg/ml를 사용하였다. DHE는 superoxide anion과 반응하여 형광을 내는 물질로 전환되는 것을 이용하여 세포내 superoxide anion을 측정하였다. 바위취 에탄올 추출물은 silica에 의한 superoxide anion을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 3).

DCF-DA를 이용한 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성을 측정한 실험에서 바위취 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 silica에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성을 강하게 억제하였다. 이 추출물의 100 µg/ml 농도에서 60.8%로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성을 억제하였으며(Fig. 4), 이러한 결과는 DPPH radical 소거 결과와 잘 일치하고 있다.

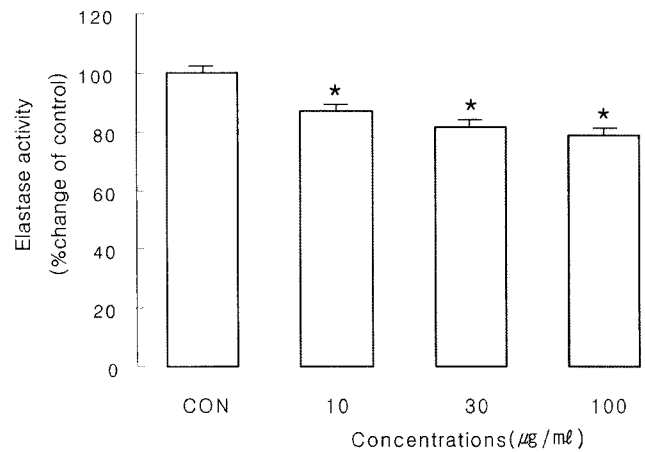
한편 DHR를 이용하여 ROS에 의한 세포내 hydroperoxide 생성은 측정하였다. 바위취 에탄올 추출물은 silica에 의한 세포내 hydroperoxide 생성을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 5). 이는 바위취 에탄올 추출물의 구성성분으로 알려진 caffeic acid와 quercetin, bergenin이 모두 항산화 효능이 있는 성분들로 알려진 보고와 일치하고 있다.<sup>16-18)</sup> 따라서 이러한 성분을 포함하고



**Fig. 4** – Effects of *S. stolonifera* ethanol extract on intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in RAW 264.7 cells. DCF-DA-loaded RAW 264.7 cells were preincubated with *S. stolonifera* ethanol extract and stimulated with 1 mg/ml silica (SIL) at 37°C for 20 min. Control (CON) was the cells treated with 1% DMSO in the absence of silica. Data were expressed as % change of silica. Results are means±SD from 3 separate experiments. \*p<0.05 : Significantly different from control



**Fig. 5** – Effects of *S. stolonifera* ethanol extract on intracellular hydroperoxide generation in RAW 264.7 cells. DHR-loaded RAW 264.7 cells were preincubated with *S. stolonifera* ethanol extract and stimulated with 1 mg/ml silica (SIL) at 37°C for 20 min. Control (CON) was the cells treated with 1% DMSO in the absence of silica. Data were expressed as % change of silica. Results are means±SD from 3 separate experiments. \*p<0.05 : Significantly different from control.

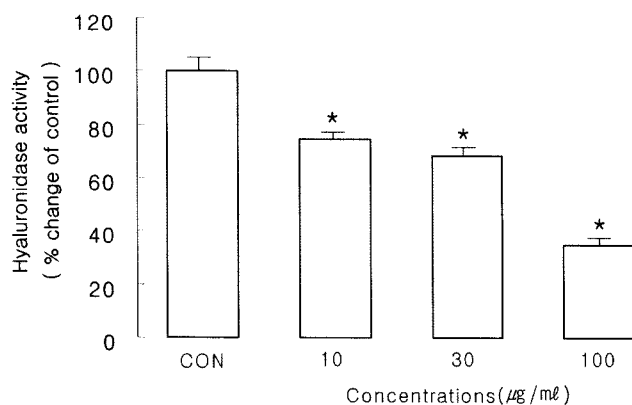


**Fig. 7** – Effects of *S. stolonifera* ethanol extract on elastase activity. Results are means±SD from 3 separate experiments. \*p<0.05 : Significantly different from control.

있는 바위취 에탄올 추출물이 시료 자체의 항산화 작용뿐만 아니라 세포내 ROS 생성 또한 강하게 억제하는 것으로 보아 항산화 효능 물질로의 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

**Hyaluronidase의 저해 효과**

Hyaluronidase는 hyaluronic acid를 가수분해하는 효소이다. Hyaluronic acid는 피부의 보습 기능에 있어서 중요한 작용을 하는 물질로 자기보다 200배에 해당하는 수분을 함유할 수 있는 능력을 가진 물질로서 피부에서 이 물질의 감소는 피부가 건조 되는 원인이 되기도 한다. 따라서 바위취 추출물이 hyaluronidase 활성에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였다. 바위취 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 효소 활성을 억제하였고, 100 µg/ml 농도에서는 65.1%의 높은 억제율을 보였다(Fig. 6). 따라서 바위취



**Fig. 6** – Effects of *S. stolonifera* ethanol extract on hyaluronidase activity. Results are means±SD from 3 separate experiments. \*p<0.05 : Significantly different from control.

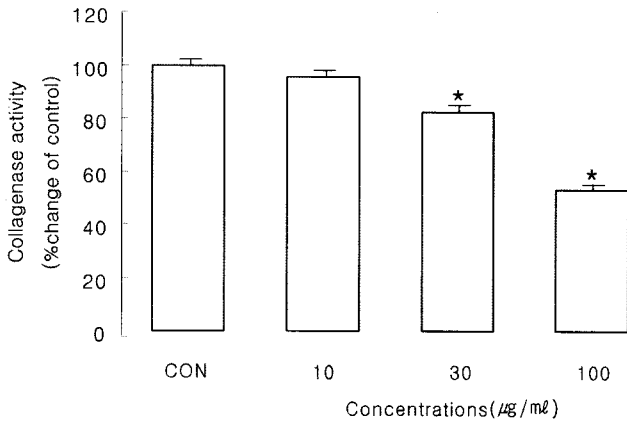
에탄올 추출물이 피부 보습 작용에 있어서 우수한 효과를 나타내고 있는 것으로 보아 보습제로서의 개발 가능성이 있음을 시사하여 준다.

**Elastase 활성 저해효과**

피부 조직의 탄력성을 나타내는 결합 조직 섬유로서 elastin이 관여하고 있다. Elastin은 collagen 이나 reticular fiber와 같이 결합조직의 섬유의 일종으로 조직의 탄력성을 나타내며 노란색을 띄고 있어 yellow fiber로 불리는 물질이다. Elastin을 가수분해하는 elastase는 피부 주름과 연관성이 있는 효소로서 바위취 추출물이 elastase 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 바위취 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 효소활성을 억제하였으며(Fig. 7), 이러한 결과는 바위취의 구성성분으로 알려진 quercetin이 elastase 활성을 억제한다는 보고<sup>19)</sup>와 일치하며 elastase 활성에서 바위취 에탄올 추출물이 주름개선제로서의 개발가능성을 시사하여 준다.

**MMP-1(collagenase) 저해효과**

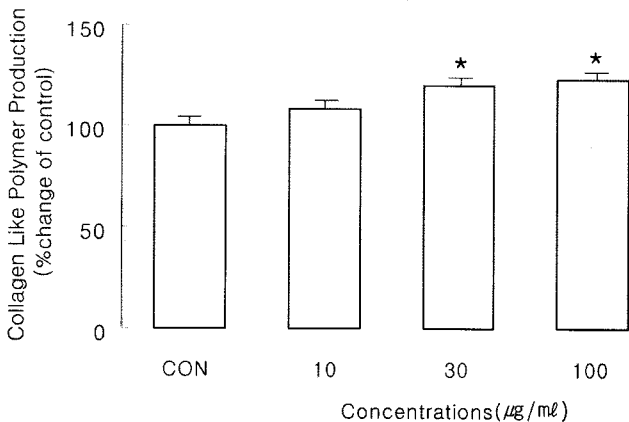
Collagen 은 결합조직의 탄력을 나타내며 진피를 구성하고 피부의 주름과 보습 기능을 갖고 있으며, 사람이 나이가 들면서 생합성이 감소하는 대표적인 물질이다. Collagen 을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 collagen type 을 분해하는 MMP-1(matrix-metalloproteinase, collagenase)이다. 따라서 MMP-1 효소활성을 억제하거나 저해하는 물질은 피부조직의 탄력을 유지시켜 준다. 바위취 에탄올 추출물의 MMP-1 저해효과를 관찰한 결과 농도 의존적으로 강한 저해효과를 나타냈다(Fig. 8). 이는 바위취 추출물의 collagen 생성과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료되며, 섬유아세포 내에서의 collagen 생성과의 관계를 미루어 짐작할 수 있는 결과이다.



**Fig. 8** - Effects of *S. stolonifera* ethanol extract on collagenase activity. Results are means±SD from 3 separate experiments. \*p<0.05 : Significantly different from control.

**NIH 3T3 세포에서 collagen 합성에 미치는 바위취 추출물의 영향**

노화 과정에 있어서 피부의 노화가 가장 현저하게 나타난다. 피부의 노화는 피부의 탄력성 감소와 주름 형성 및 건조 현상이 나타나는데 이러한 현상은 피부 결합조직 내에 존재하는 collagen 및 elastin 섬유 양과 밀접한 관계가 있다. Collagen은 섬유아 세포에서 합성되는 물질로 다른 단백질 달리 4-hydroxyproline 아미노산이 10% 정도되며 4-hydroxyproline을 합성하는 과정에서 vitamin C가 관여하기 때문에 vitamin C 부족 시 scurvy가 나타나게 된다. 바위취 에탄올 추출물도 항산화 작용이 있는 물질이기 때문에 섬유아세포에서 생성되는 collagen 합성에 영향을 줄 것으로 사료된다. 이 실험에서는 collagenase에 의해 소화된



**Fig. 9** - Effects of *S. stolonifera* ethanol extract on collagen production in NIH 3T3 cells. NIH 3T3 cells were incubated with *S. stolonifera* ethanol extract at 37°C for 48 h. Control (CON) was the cells treated with 1% DMSO. Results are means±SD from 3 separate experiments. \*p<0.05 : Significantly different from control.

아미노산을 ninhydrin과 반응시켜 간접적으로 collagen-like polymer를 측정하였다. NIH 3T3(mouse fibroblast) 세포에 바위취 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 후 48시간 뒤에 collagen을 정량한 결과 30과 100 µg/ml 농도에서 추출물 모두 유의하게 농도 의존적으로 collagen 합성을 증가시켰다(Fig. 9). 이는 바위취 식물의 성분 중 quercetin이 collagen 합성을 증가시키는 것으로 이미 연구되어진 것과 일치하는 것으로 나타났다.<sup>20)</sup> 또한 caffeic acid 역시 라디칼에 의한 collagen fiber 손상을 억제한다는 보고<sup>21)</sup>를 미루어 볼 때 이들을 포함하고 있는 바위취 에탄올 추출물이 주름제거에 있어서 우수한 효과를 나타내고 있음을 시사하였다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 바위취 에탄올 추출물은 항산화 작용을 갖고 있으며, 보습작용 및 주름완화 효능을 통한 항노화 작용이 있음을 시사하였다. 이러한 활성은 바위취 식물 자체의 주요 성분들인 caffeic acid, quercetin, bergenin 등의 유효한 성분들의 작용에 의한 결과라 사료되며, anti-wrinkle 제품으로서의 가능성이 있는 것으로 사료된다.

**문 헌**

- 1) Getoff, N. : Anti-aging and aging factors in life: the role of free radicals. *J. Rad. Phys. Chem.* **76**(10), 1577 (2007).
- 2) Christine, M., Choi, M. D., Diane, S. and Berson, M. D. : Cosmeceuticals. *Semin Cutan Med Surg.* **25**(3), 163 (2006).
- 3) 대한 피부과 교과서 편찬위원회: 피부과학, 4개정판, 여문각, 서울 p. 24 (2001).
- 4) 정찬조 : 산야초의 슬기로운 이용법, 한국 자생식물 보존회, 서울 p. 285 (1992).
- 5) Ozyurt, H., Sogut, S., Yilirim, Z., Kart, L., Iraz, M. and Armutcu, F. : Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clin Chim Acta* **339**, 65 (2004).
- 6) Chen, Y. T., Zheng, R. L., Jia, Z. J. and Ju, Y. : Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* **9**, 191 (1990).
- 7) Hironobu, T., Masamiti, K., Yasutoshi, W., Kousuke, N. and Yoshiyasu, F. : Synthesis and Neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 1781 (2003).
- 8) 김지은 : 약용식물 추출물의 항균 및 항산화 효과, 대구대학교 대학원 생물공학과, 석사학위논문 (2003).
- 9) Perez, G., Vargas, S. R., Martinez, M. F. J. and Cordova, R. I. : Antioxidant and free radical scavenging activities of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxy flavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytother Res.* **18**(5), 428 (2004).
- 10) Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Arai, M. and Nakagawa, Y. : Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione

- peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem.* **274**(41), 29294 (1999).
- 11) Huang, H. M., Zhang, H., Ou, H. C., Chen, H. L. and Gibson, G. E. : alpha-Keto-beta-methyl-n-valeric acid diminishes reactive oxygen species and alters endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  stores. *Free Rad. Biol Med.* **37**(11), 1779 (2004).
- 12) Jacob, C., Arteel, G. E., Kanda, T., Engman, L. and Sies, H. : Water-soluble organotellurium compounds : catalytic protection against peroxynitrite and release of zinc from metallothionein. *Chem. Res. Toxicol.* **13**(1), 3 (2000).
- 13) D'Angelo, M., Billings, P. C., Pacifici, M., Leboy, P. S. and Kirsch, T : Authentic matrix vesicle contain active metalloprotease (MMP). a role for matrix vesicle-associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **276**, 11347 (2001).
- 14) Yin, J., Tomycz, L., Bonner, G. and Wang, D. I. : A simple and rapid assay of collagen-like polymer in crude lysate from *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods* **49**(3), 321 (2002).
- 15) Cho, Y. J., Seo, M. S., Kim, J. K., Lim, Y., Chae, G., Ha, K. S. and Lee, K. H. : Silica-induced generation of reactive oxygen species in Rat2 fibroblast: role in activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **262**, 708 (1999).
- 16) Daels-Rakotoarison, D. A., Seidel, V., Gressier, B., Brunet, C., Tillequin, F., Bailleul, F., Luyckx, M., Dine, T., Cazin, M. and Cazin, J. C. : Neurosedative and antioxidant activities of phenylpropanoids from *ballota nigra*. *Arzneimittelforschung.* **50**(1), 16 (2000).
- 17) Agnieszka, R., Aneta, B. and Grzegorz, B. : Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell. Biol. Internat.* **31**, 1245 (2007).
- 18) Srinivasan, R., Chandrasekar, M. J. N., Nanjana, M. J. and Suresh, B. : Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 284 (2007).
- 19) Duarte, J., Perez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., Jimenez, J. and Tamargo, J. : Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **239**, 1 (1993).
- 20) Gomathi, K., Gopinath, D., Rafiuddin Ahmed, M. and Jayakumar, R. : Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. *Biomaterials.* **24**, 2767 (2003).
- 21) Kusano, A., Seyama, Y., Nagai, M., Shibano, M. and Kusano, G. : Effects of fukinolic acid and cimicifugic acids from *Cimicifuga* species on collagenolytic activity. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 1198 (2001).