

자외선 조사 무모쥐 피부에 도포한 애엽(Mugwort) 추출물의 항산화 효과

박시향¹ · 조득문² · 최병대¹ · 최영준^{1*} · 최진호³

¹경상대학교 해양과학대학 해양생명과학부/해양산업연구소

²동부산대학 식품영양과

³부경대학교 식품생명공학부

Antioxidative Effects of Skinned Mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) Extracts on UV-Irradiated Hairless Mouse Skin

Si-Hyang Park¹, Duck-Moon Cho², Byeong-Dae Choi¹, Yeung Joon Choi^{1*}, and Jin-Ho Choi³

¹Division of Marine Life Science/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,
Tongyeong 650-160, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Dongbusan College, Busan 612-715, Korea

³Division of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract

This study investigated the antioxidative effect of mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) extracts in hairless mouse skin from oxidative stress induced by UV-irradiation. After topical application on hairless mouse back with basic skin lotion group (control), ascorbic acid group (AA-0.5%, AA-1.0%, AA-2.0%, and AA-5.0%), and mugwort extract group (ME-0.5%, ME-1.0%, ME-2.0%, and ME-5.0%), the animals were irradiated to increasing doses of UVB (60 mJ~100 mJ) for 4 weeks. Hydrogen peroxide of hairless mouse skin homogenate significantly decreased in 2% ($p<0.05$) and 5% ($p<0.05$) of ME and AA groups. Hydroxyl radicals were decreased significantly in both of 2% and 5% ME groups as compared to AA groups ($p<0.05$). Oxidative stress levels deduced by oxidized protein contents were greatly decreased (14.6~18.5%) in all ME treatment groups, while only at 2% of AA treatment group. Lipid peroxide contents were greatly inhibited in all ME and AA treatment groups ($p<0.01$). Application of ME significantly increased catalase activity, over 25% in all mugwort and AA groups. Glutathione peroxidase activities were increased up to 20.5%~32.8% in 2.0% and 5% ME groups, whereas it increased in all AA groups. These results suggested that mugwort extract was more effective than that of ascorbic acid in protecting hairless mouse skin from photo-irradiation, and can be used as an potential anti-aging cosmetic ingredients.

Key words: mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) extract, ascorbic acid, UVB, antioxidative effect, skin

서 론

피부의 노화현상은 나이가 들어감에 따라 피부의 구조와 생리 기능 등이 퇴화되어 나타나는 자연 노화현상과 자외선 등에 노출되어 피부의 조직학적인 변화가 일어나는 광노화 현상으로 크게 나눌 수 있다(1). 피부의 노화현상을 유발하는 자외선은 피부에 프리라디칼을 유도하여(2), 피부암, 광노화, 광감작증상 및 여러 광관련 피부병변을 일으킨다(3). 자외선으로부터 피부를 보호하기 위해 자외선 차단제 및 항산화제의 연구가 활발하게 이루어지고 있으나(4-7), 자외선에 노출된 피부조직내의 항산화제나 항산화효소 활성에 관한 연구는 미미한 편이다.

애엽은 잎에 백색점이 많고 뒷면은 백색의 면모로 덮여있

는 황해쑥을 일컫는 약재 명으로 잎 또는 잎이 붙은 윗가지를 따서 햇빛에 말린 것을 말한다. 주로 한국, 일본, 중국 등의 동아시아에 분포하는 국화과의 여러해살이풀로 번식력이 강한 식물이다. 쑥의 강한 향기 성분은 정화력과 살균력을 가지고 있으며, 배가 아플 때 쑥을 달여 먹었고 냉(冷)을 없애는 데 좋다고 보고하였다(8-10). 한방에서는 지혈제, 진통제 및 대하 치료에도 사용하고 있으며, 최근에는 쑥을 미용비누와 피부 마사지 팩의 재료로 이용하고 있다(11). 애엽의 생리활성 및 성분과 관련하여 애엽은 phellandrene, coprol, cadinene 등의 정유성분(12), eupatilin과 jaceosidin 같은 flavonoid 성분들을 함유하고 있으며(13) 이 같은 성분들이 위손상의 억제, 지혈, 항염증 작용 및 항산화작용에 기여한다고 보고하였다(9,12-15). 그러나 애엽 추출물이 피부

*Corresponding author. E-mail: yjchoi@gnu.ac.kr
Phone: 82-55-640-3115, Fax: 82-55-640-3111

조직에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 무모취를 대상으로 자외선 조사에 따른 활성 산소종 생성량, 산화적 스트레스와 활성 산소종 제거 효소 활성을 측정하여 애엽 추출물의 항산화 효과를 조사하였으며, 아스코르브산의 항산화 효과와 비교하였다.

재료 및 방법

시료의 조제 및 동물 실험

애엽은 (주)화림제약에서 구입하여 사용하였으며, 잘 건조된 애엽 2 kg을 세절하여 시약용 1급 메탄올 80%에 3회 냉침하여 추출하고 회전진공증발기(R-3000, EYELA, Japan)로 40°C 이하에서 감압 농축한 후 동결건조하여 실험의 시료로 사용하였다. 동결 건조한 추출물의 중량은 215.5 g으로써 건조물에 대한 수율은 10.8%이었다.

본 실험에 사용한 무모취(female, 체중 20±2 g)는 (주)한국바이오제노믹스에서 구입하였으며 항온항습(22±2°C, 65±2% RH)하에서 12시간 싸이클(06:00~18:00)로 명암이 자동 조절되는 동물 사육실에서 사육하였다.

마우스의 피부에 도포할 기본 로션은 에탄올, 프로필렌글리콜, 증류수를 각각 30:50:20(v/v/v)의 비율로 잘 혼합하여 사용하였으며, 애엽추출물 실험군의 로션은 기본 로션에 애엽 추출물을 각각 0.5%(ME-0.5), 1.0%(ME-1.0), 2.0%(ME-2.0) 및 5.0%(ME-5.0)의 농도로 첨가하여 조제하였고, 대조군은 무시료 도포액, positive 비교군으로는 아스코르브산 0.5%(AA-0.5), 1.0%(AA-1.0), 2.0%(AA-2.0) 및 5.0%(AA-5.0)을 첨가한 도포액을 조제하였다. 각 그룹 당 5마리의 무모취를 사용하였으며, 처음 1주간은 사육실에서 안정을 시키고 매일 저녁 5시에 도포액 50 µL를 무모취의 등부분에 도포하여 잘 문질러 준 다음 30분 후 UV B filter로 여과된 UVB를 무모취의 등부분에 조사하였다. 광조사량은 최초 1주간은 1 MED에 해당하는 60 mJ를 조사하였고, 그 다음 2주에서 4주까지 3주 동안은 100 mJ로 일주일에 6번씩 조사하여 총 4주간 실시하였다. 무모취의 사료는 시판하는 고품 사료를 사용하였다.

피부균질액의 조제

4주간 급이하면서 자외선 조사한 무모취를 ethyl ether로 마취시킨 후 등부분의 피부조직을 잘라내었다. 피부조직을 4°C의 완충용액(5 mM EDTA를 포함하는 1.15% KCl/10 mM phosphate buffer, pH 7.4)으로 세척하고 피하지방을 제거한 다음 Kim과 Lee의 방법(16)에 따라 피부조직 균질액을 만들었다. 즉 피부조직을 세절한 후 피부조직의 10배에 해당하는 완충용액을 가하여 hand homogenizer로 균질화한 다음 원심분리(SUPRA 22K, Hanil, Korea; 3,000×g, 15분)하여 얻은 상층액을 피부조직 균질액으로 사용하였다.

단백질 함량의 측정

피부조직 균질액의 총 단백질 함량은 Lowry 등의 방법(17)을 다소 변형하여 측정하였다. 즉 피부조직 균질액 20 µL에 1% SDS 용액 12 µL를 혼합하고 증류수 120 µL를 가하여 6배 희석하였다. 희석 용액 15 µL와 20 µL를 각각 취해 증류수 85 µL와 80 µL를 넣고 다시 희석하였다. 희석 용액에 반응시약(0.5% copper sulfate:1% sodium tartrate:2% sodium carbonate=0.5:0.5:49.0, v/v/v) 1 mL를 가하여 잘 혼합하고 실온에서 20분 동안 방치한 후 0.1 mL의 1 N Folin 시약을 가하였다. Vortex로 혼합하고 실온에서 30분 방치한 후 분광광도계(UV-1700, Shimadzu, Japan)로 520 nm에서 흡광도를 측정하여 bovine serum albumin으로 작성한 표준 곡선에 따라 단백질 함량을 정량하였다. 이때 첨가한 1%의 SDS 용액은 흡광도에 영향을 미치지 않았다.

활성산소종 생성량의 측정

수퍼옥시드 라디칼(superoxide radical: O₂^{·-})의 생성량은 McCord와 Fridovch의 방법(18)을 변형한 Chan과 Bielski의 방법(19)에 따라 superoxide dismutase를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원속도를 측정하였다. 즉 0.1 mM EDTA를 포함하는 인산 완충액(pH 7.8) 420 µL에 cyanide의 농도가 50 µM이 되도록 20 mM cyanide 용액을 가한 후 피부 균질액 300 µL와 0.1 mM cytochrome C 50 µL를 첨가하여 550 nm에서 2분 동안 흡광도의 차이를 측정하였다. Cytochrome C의 양은 분자흡광계수 19500/M/cm를 사용하여 계산하였다.

과산화수소(hydrogen peroxide: H₂O₂)의 생성량은 Thurman 등의 방법(20)을 변형하여 측정하였다. 즉 피부조직에서 생성된 과산화수소에 의해 발색되는 적색의 ferri-thiocyanate 복합체를 기초로 400 mM 인산완충액(pH 7.4) 400 µL, 200 mM nicotinamide 200 µL, 100 mM MgCl₂ 200 µL, 50 mM NaN₃ 200 µL와 피부조직 균질액 64.1 µL, 증류수 735.9 µL를 첨가하여 혼합한 후 60 mM NADPH 200 µL를 첨가하였다. 37°C의 항온수조에서 30분 동안 항온한 후 1.2 M trichloroacetic acid(TCA) 용액 1 mL를 첨가하여 반응을 중지시키고 원심분리(3000×g, 10분)하여 상층액을 취하였다. 상층액 1 mL에 ferrous ammonium 200 µL와 2.5 M potassium thiocyanate 100 µL를 첨가하고 혼합한 후 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 반응액의 흡광도를 480 nm에서 측정하여 hydrogen peroxide로 작성한 표준검량선을 이용하여 과산화수소(nM/mg-protein/min)의 함량을 측정하였다.

히드록실 라디칼(hydroxyl radical: ·OH) 함량의 측정은 Halliwell과 Gutteridge의 방법(21)을 다소 수정하여 사용하였다. 0.1 M 인산완충액(pH 7.4), 10 mM NaN₃, 7 mM deoxyribose, 5 mM ferrous ammonium sulfate, 0.54 M NaCl을 각각 60 µL 첨가하고 증류수 430 µL와 피부조직 균질액 200 µL를 첨가한 후 잘 혼합하고 37°C의 항온수조에서 15분 동

안 향온하였다. 반응 혼합물에 8.1% SDS 용액 75 μ L, 20% acetic acid 500 μ L, 증류수 25 μ L를 각각 첨가하고, 1.2% thiobarbituric acid(TBA) 용액 400 μ L를 첨가하여 잘 혼합하였다. 30분 동안 가열한 후 실온까지 냉각시키고 원심분리(800 \times g, 5분)하여 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 malondialdehyde로 작성한 표준곡선에 따라 검체군과 대조군의 흡광도 차이를 이용하여 히드록실라디칼의 생성량(nM/mg-protein/min)을 계산하였다.

산화적 스트레스의 분석

피부조직의 산화단백질의 함량은 Levine 등의 방법(22)에 따라 카르보닐기의 생성량으로 측정하였다. 시료 0.1 mL에 30% TCA 0.5 mL를 넣고 잘 혼합한 다음 원심분리(800 \times g, 10분)하여 상층액을 제거하고 남은 잔사에 10 mM dinitrophenyl hydrazine(DNPH) 0.5 mL를 첨가하고 잘 혼합하여 1시간 동안 실온에서 방치한 후 원심분리(800 \times g, 10분)하였다. 잔사에 ethanol/ethyl acetate(1:1, v/v) 3 mL를 첨가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 10분 동안 방치하고 원심분리(800 \times g, 10분)하여 얻은 잔사에 6 M guanidine/20 mM potassium phosphate(pH 2.3) 용액 1 mL를 첨가하였다. 37°C의 향온수조에서 30분 동안 향온하고 원심분리(800 \times g, 10분)하여 얻은 상층액의 carbonyl 생성량은 360 nm에서 분자흡광계수(E=22000)을 이용하여 계산하였다.

피부조직 중의 과산화지질(lipid peroxide, LPO)의 함량은 Choi와 Yu의 방법(23)에 따라 TBA법으로 malondialdehyde 함량을 측정하였다. 즉 피부조직 균질액 20 μ L에 증류수 180 μ L를 혼합한 것을 각 시험관에 취하였다. 8.1% SDS 용액 200 μ L를 가하여 약 5초 동안 혼합하고 20% 초산 1.5 mL를 넣어 다시 5초 동안 혼합하였다. 1.2% TBA 시약 1.0 mL를 첨가하고 마개를 한 후 30분 동안 향온하였다. 반응 혼합물을 원심분리(800 \times g, 10분)하여 얻은 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 malondialdehyde로 작성한 검량곡선에 따라 과산화지질의 함량(nM/mg-protein)을 측정하였다.

활성산소종 제거효소의 활성 측정

카탈라아제의 활성 측정은 Rigo와 Rotilio의 방법(24)에 따라 시험관에 피부조직 균질액 20 μ L, 0.13 M phosphate 완충액 250 μ L, 증류수 330 μ L를 가하고, 과산화수소 용액 900 μ L를 첨가하여 vortex에서 5초간 잘 혼합한 다음, 즉시 240 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 1분 동안 제거되는 과산화수소의 속도를 계산하여 효소의 활성을 측정하였다.

글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase: GPx)의 활성은 Tappel의 방법(25)에 따라 0.1 M phosphate 완충액(pH 7.0) 1 mL, 10 mM sodium azide 0.5 mL, 증류수 1.295 mL를 각 시험관에 넣은 후 20 mM glutathione 0.06 mL와 200 unit/mL의 GSH 0.01 mL를 가하였다. 반응혼합물에 8.4 mM NADPH 0.11 mL와 피부조직 균질액 0.03 mL를 첨가하

고 1 mM H₂O₂ 0.32 mL를 가하여 혼합한 후 2분 동안 340 nm에서 NADPH의 흡광도 감소를 측정하여 nM/min/g-protein의 단위로 표시하였다.

통계처리

통계처리는 Minitab(ver. 14, PA, USA) 통계 패키지 프로그램을 사용하였으며, 유의성 검정은 Student's t test를 이용하여 신뢰도를 검정하였다. 유의성 검정은 p<0.05와 p<0.01일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

단백질 함량의 변화

애엽 추출물과 아스코르브산을 농도별로 4주 동안 무모쥐의 등부분에 도포하고 자외선을 조사한 후 무모쥐 피부조직의 단백질 함량을 측정하였다(Table 1). 애엽 추출물 도포그룹의 단백질 함량은 2.0%와 5.0% 도포그룹에서 각각 62.02 \pm 2.79 mg/g skin과 63.01 \pm 2.22 mg/g skin이었다. 그러나 애엽 추출물의 모든 도포군에서 유의성은 없었으며, 아스코르브산 도포그룹 단백질 함량에서도 대조군과 유의적인 상관관은 보이지 않았다. 이 같은 결과는 애엽 혹은 아스코르브산을 도포할 때 피부조직 내의 전체 단백질 함량에는 영향을 없음을 지적한다.

수퍼옥시드 라디칼 생성량의 변화

무모쥐의 피부에 애엽 추출물을 바른 후 산화적 스트레스를 유도했을 때 피부조직 내에서 수퍼옥시드 라디칼 생성량에 미치는 영향을 측정하였으며 활성산소를 제거하는 강한 항산화제로 알려진 아스코르브산을 같은 방법으로 도포하여 애엽 추출물의 항산화작용과 비교하였다(Table 2). 대조군의 수퍼옥시드 라디칼 생성량은 58.44 \pm 4.38 nM/g protein이었으며 애엽 추출물 2% 도포군은 54.27 \pm 6.97 nM/g protein, 5.0% 도포군은 54.59 \pm 5.61 nM/g protein이었으나 유의적인 변화는 없었다. 그러나 아스코르브산 2.0% 도포군은

Table 1. Effects of mugwort extracts on protein contents in UV-irradiated hairless mouse skin

Sample	Protein contents (mg/mL fraction)	
Control	58.55 \pm 3.31 ¹⁾	-
ME-0.5	57.28 \pm 5.30	97.8% ²⁾
ME-1.0	58.23 \pm 1.46	99.5%
ME-2.0	62.02 \pm 2.79	105.9%
ME-5.0	63.01 \pm 2.22	107.6%
AA-0.5	55.65 \pm 1.98	95.1%
AA-1.0	56.36 \pm 3.28	96.3%
AA-2.0	60.76 \pm 5.51	103.8%
AA-5.0	63.37 \pm 4.82	108.2%

ME-0.5, ME-1.0, ME-2.0 and ME-5.0: Mugwort extracts of 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0%; AA-0.5, AA-1.0, AA-2.0 and AA-5.0: Ascorbic acid of 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0%.

¹⁾Mean \pm SD (n=5). ²⁾Percent of control.

Table 2. Effects of mugwort extracts on superoxide radical in UV-irradiated hairless mouse skin

Sample	Superoxide radical contents (nM/g protein)	
Control	58.44 ± 4.38 ¹⁾	-
ME-0.5	58.66 ± 7.89	100.4% ²⁾
ME-1.0	55.82 ± 2.72	95.5%
ME-2.0	54.27 ± 6.97	92.9%
ME-5.0	54.59 ± 5.61	93.4%
AA-0.5	58.80 ± 4.33	100.6%
AA-1.0	56.72 ± 4.66	97.1%
AA-2.0	50.55 ± 3.60*	86.7%
AA-5.0	51.47 ± 5.59	88.1%

Refer to the comment in Table 1. ¹⁾Mean ± SD (n=5). ²⁾Percent of control. *p<0.05 compared with control group.

Table 3. Effects of mugwort extracts on hydrogen peroxide in UV-irradiated hairless mouse skin

Sample	Hydrogen peroxide contents (nM/mg protein)	
Control	1.21 ± 0.19 ¹⁾	-
ME-0.5	1.16 ± 0.07	95.9% ²⁾
ME-1.0	1.17 ± 0.04	96.4%
ME-2.0	1.02 ± 0.12*	84.3%
ME-5.0	0.89 ± 0.09**	73.8%
AA-0.5	1.17 ± 0.16	96.4%
AA-1.0	1.13 ± 0.20	93.5%
AA-2.0	1.07 ± 0.12*	88.4%
AA-5.0	0.92 ± 0.35**	75.8%

Refer to the comment in Table 1. ¹⁾Mean ± SD (n=5). ²⁾Percent of control. *p<0.05, **p<0.01 compared with control group.

50.55 ± 3.60 nM/g protein으로 13.3%의 유의적인 저해효과를 보였다(p<0.05).

과산화수소 생성량의 변화

활성 산소 중 과산화수소의 생성량을 측정된 결과(Table 3), 애엽 추출물과 아스코르브산 도포그룹 모두 농도가 증가함에 따라 과산화수소의 생성량이 감소하는 경향을 보였다. 애엽 추출물 2% 도포 그룹(1.02 ± 0.12 nM/mg protein)에서는 15.7%의 감소를 보였고(p<0.05), 아스코르브산 2% 도포 그룹(1.07 ± 0.12 nM/mg protein)에서는 11.6%의 유의적인 감소 효과가 있었다(p<0.05). 그리고 애엽 추출물 5.0% 도포 그룹(0.89 ± 0.09 nM/mg protein)과 아스코르브산 5.0% 도포 그룹(0.92 ± 0.35 nM/mg protein)은 각각 26.2%와 24.2%의 과산화수소 생성량의 감소를 보였다(p<0.01). 이 같은 결과는 애엽 추출물과 아스코르브산 2%와 5% 도포가 과산화수소의 생성량을 크게 감소시켜 항산화 작용에 기여함을 제시한다.

히드록실 라디칼 생성량의 변화

애엽 추출물과 아스코르브산을 함유한 로션을 무모쥐 등 부분에 바른 후 광손상을 받은 무모쥐 피부의 히드록시 라디칼의 함량을 측정된 결과(Table 4), 대조군의 히드록실 라디칼 함량은 1.70 ± 0.13 nM/mg protein/min이었으며, 애엽 추

Table 4. Effects of mugwort extracts on hydroxyl radical in UV-irradiated hairless mouse skin

Sample	Hydroxyl radical contents (nM/mg protein/min)	
Control	1.70 ± 0.13 ¹⁾	-
ME-0.5	1.63 ± 0.11	96.4% ²⁾
ME-1.0	1.59 ± 0.09	93.8%
ME-2.0	1.51 ± 0.25*	89.0%
ME-5.0	1.49 ± 0.13*	87.4%
AA-0.5	1.71 ± 0.12	101.0%
AA-1.0	1.66 ± 0.19	98.0%
AA-2.0	1.60 ± 0.16	94.0%
AA-5.0	1.64 ± 0.19	96.3%

Refer to the comment in Table 1. ¹⁾Mean ± SD (n=5). ²⁾Percent of control. *p<0.05 compared with control group.

출물의 경우는 추출물의 함유량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보여주었다. 2.0% 애엽 추출물 도포 그룹의 경우 히드록실 함량은 1.51 ± 0.25 nM/mg protein/min으로 11%정도 저해되었고(p<0.05), 가장 높은 농도인 5.0%에서 히드록시 라디칼 함량은 1.49 ± 0.13 nM/mg protein/min으로 대조군에 비해 12.6% 정도로 감소하였다(p<0.05). 그러나 아스코르브산 도포 그룹에서는 모든 그룹에서 유의성이 없었다. 이 같은 결과는 애엽 추출물이 강력한 항산화제로 알려진 아스코르브산에 비하여 효과적인 라디칼 소거능을 가지고 있음을 제시한다.

피부조직 내 활성 산소종의 함량은 애엽 추출물의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 특히 과산화수소의 함량 감소율과 히드록실 라디칼의 감소율이 컸다. UV 조사는 과산화수소와 활성 산소 종(reactive oxygen species; ROS)인 슈퍼옥시드 라디칼이나 히드록실 라디칼 등의 생성을 증가시키고, 피부조직 내의 항산화제인 아스코르브산, 토코페롤 및 글루타치온 등을 고갈시킨다. 활성 산소 종의 증가와 항산화제의 감소는 세포내의 활성산소의 축적을 유도한다. 축적된 활성 산소 종은 체내의 유전자와 단백질 구조와 기능을 바꾸고, 주름 형성 등의 조직학적인 변화를 일으켜 피부의 손상을 유도한다(26,27). 애엽 추출물에 의한 과산화수소와 히드록실 라디칼의 효과적인 제거는 활성 산소 종에 기인한 피부 노화 현상을 지연 또는 억제하는 데 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

산화 단백질의 생성량 변화

산화적 스트레스 정도를 알아보기 위한 산화 단백질의 생성은 과산화물이나 당당류의 분해 산물인 카르보닐기의 생성량으로 측정하였다. 도포한 애엽 추출물의 농도가 증가함에 따라 산화 단백질의 생성량은 감소하는 경향을 보였다(Table 5). 대조군의 산화 단백질 생성량인 6.00 ± 0.50 nM/mg protein에 비해 모든 애엽 추출물 도포군의 산화 단백질의 생성량은 크게 감소하였다. 그중 애엽 추출물 2%와 5% 도포 그룹의 산화 단백질 함량은 각각 4.95 ± 0.63 nM/mg protein과 4.89 ± 0.50 nM/mg protein로 17.6%와 18.5%까지

Table 5. Effects of mugwort extracts on oxidized protein in UV-irradiated hairless mouse skin

Sample	Oxidized protein contents (nM/mg protein)	
Control	6.00±0.50 ¹⁾	-
ME-0.5	5.13±0.82*	85.4% ²⁾
ME-1.0	5.05±0.72*	84.1%
ME-2.0	4.95±0.63**	82.4%
ME-5.0	4.89±0.50**	81.5%
AA-0.5	5.64±0.67	94.0%
AA-1.0	5.42±0.78	90.3%
AA-2.0	5.35±1.03*	89.1%
AA-5.0	5.56±0.67	92.6%

Refer to the comment in Table 1. ¹⁾Mean±SD (n=5). ²⁾Percent of control. *p<0.05, **p<0.01 compared with control group.

Table 6. Effects of mugwort extracts on lipid peroxide (LPO) in UV-irradiated hairless mouse skin

Sample	Lipid peroxide contents (nM/mg protein)	
Control	60.81±5.02 ¹⁾	-
ME-0.5	50.24±3.22**	82.6% ²⁾
ME-1.0	47.27±2.62**	77.7%
ME-2.0	46.19±3.43**	76.0%
ME-5.0	43.98±3.47**	72.3%
AA-0.5	54.95±4.44*	90.4%
AA-1.0	48.36±3.85**	79.5%
AA-2.0	47.55±1.54**	78.2%
AA-5.0	49.22±2.48**	81.0%

Refer to the comment in Table 1. ¹⁾Mean±SD (n=5). ²⁾Percent of control. *p<0.05, **p<0.01 compared with control group.

유의적으로 감소한 반면(p<0.01), 아스코르브산의 경우는 2.0% 도포군에서만 10.9%의 저해효과가 인지되었다(p<0.05). 이 같은 결과는 애엽 추출물의 피부 도포가 아스코르브산 도포에 비하여 피부의 노화 억제에 더욱 효과적임을 제시한다.

과산화지질(LPO)의 생성량 변화

과산화지질의 함량을 비교한 결과(Table 6), 애엽 추출물 도포군과 아스코르브산 도포군 모두에서 과산화지질 함량이 크게 감소하였다. 대조군의 경우 LPO의 생성량은 60.81±5.02 nM/mg protein이었으며 애엽 추출물 1.0% (47.27±2.62 nM/mg protein, 77.7%), 2.0%(46.19±3.43 nM/mg protein, 76.0%) 및 5.0%(43.98±3.47 nM/mg protein, 72.3%) 도포군에서 모두 약 20%가 넘는 과산화지질의 감소효과를 보였다. 아스코르브산의 경우에는 1.0%(48.36±3.85 nM/mg protein)와 2.0%(47.55±1.54 nM/mg protein) 도포 그룹에서 모두 20% 정도의 과산화 지질의 감소를 보였으나 5.0%의 경우에는 오히려 약간 상승하여 49.22±2.48 nM/mg protein이었다. 애엽 추출물과 아스코르브산 피부 도포군의 모든 그룹에서 유의적인 과산화지질 생성량의 감소효과가 나타났다(p<0.05, p<0.01). Kari 등(28)과 Podda 등(29)은 자외선 조사가 인간의 keratinocyte에서 과산화지

Table 7. Effects of mugwort extracts on catalase activities in UV-irradiated hairless mouse skin

Sample	Catalase activities (nM/min/mg protein)	
Control	303.33±21.49 ¹⁾	-
ME-0.5	381.13±37.36**	125.6% ²⁾
ME-1.0	385.03±55.73**	126.9%
ME-2.0	400.20±38.49**	131.9%
ME-5.0	413.06±68.67**	136.2%
AA-0.5	394.92±27.19**	130.2%
AA-1.0	410.15±49.12**	135.2%
AA-2.0	414.38±45.38**	136.6%
AA-5.0	401.23±89.56**	132.3%

Refer to the comment in Table 1. ¹⁾Mean±SD (n=5). ²⁾Percent of control. **p<0.01 compared with control group.

질과 산화 단백질의 함량이 증가한다고 보고하였다. 이 같은 보고에 미루어 애엽 추출물은 자외선에 의해 생성되는 산화적 스트레스물인 과산화 지질과 산화단백질의 생성을 효과적으로 억제하여 자외선으로 인한 피부의 광노화 현상을 억제하는 것으로 판단된다.

카탈라아제(CAT)의 활성 변화

피부조직의 강력한 항산화 효소인 카탈라아제의 활성은 대조군(303.33±21.49 nM/min/mg protein)에 비하여 모든 애엽 추출물 도포군에서 25.6~36.2% 증가하였다(Table 7). 즉 카탈라아제 활성은 0.5% 도포군에서 25.6%, 1.0% 도포군은 26.9%, 2.0% 도포군은 31.9%, 5.0% 도포군은 36.2% 증가하였다(p<0.01). 그리고 아스코르브산 도포군에서도 모두 30% 이상의 높은 활성 증가를 보였다(p<0.01). 카탈라아제 활성은 자외선 조사에 저하된다고 알려져 있으나(30,31), 애엽 추출물과 아스코르브산을 도포했을 때 카탈라아제의 활성은 농도 증가와 함께 크게 증가하였다. 이 같은 결과는 광노화에 의해 발생한 활성산소들을 신속하게 제거함으로써 피부를 자외선으로부터 보호할 것으로 기대된다.

글루타치온 퍼옥시다아제(GPx)활성의 비교

애엽 추출물 2.0% 도포군과 5.0% 도포군에서 GPx 활성은 각각 20.5%(1.80±0.47 nM/min/mg protein)와 32.8%(1.99±0.38 nM/min/mg protein) 증가하였다(p<0.01)(Table 8). 아스코르브산의 경우에는 모든 도포군에서 10% 이상의 유의적인 활성 증가가 관측되었으며, 특히 2% 도포군은 그 활성이 1.77±0.46 nM/min/mg protein으로 18.2%까지 증가하였다(p<0.01).

자외선에 노출된 피부의 항산화 효소들의 활성 변화와 관련하여 Fuchs 등(30)은 GPx와 SOD의 활성은 변화가 없었으나, 카탈라아제와 글루타치온 환원 효소 활성은 저하한다고 하였으며, Punnonen 등(31)은 카탈라아제와 SOD의 활성은 초기 자외선 조사 시에 감소한다고 보고하였다. 애엽 추출물 도포는 자외선으로 인한 항산화효소의 활성저하를 억제하였고, 특히 CAT의 활성증가율이 매우 높아 자외선 조

Table 8. Effects of mugwort extracts on glutathione peroxidase activities in UV-irradiated hairless mouse skin

Sample	Glutathione peroxidase activities (nM/min/mg protein)	
Control	1.50±1.01 ¹⁾	100.0% ²⁾
ME-0.5	1.48±0.32	98.2%
ME-1.0	1.64±0.41	109.4%
ME-2.0	1.80±0.47**	120.5%
ME-5.0	1.99±0.38**	132.8%
AA-0.5	1.70±0.44*	113.4%
AA-1.0	1.72±0.27*	114.4%
AA-2.0	1.77±0.46**	118.2%
AA-5.0	1.99±1.03*	116.7%

Refer to the comment in Table 1. ¹⁾Mean±SD (n=5). ²⁾Percent of control. *p<0.05, **p<0.01 compared with control group.

사로 인한 광노화 현상으로부터 효과적으로 피부를 보호할 수 있을 것으로 보인다. 그리고 Han 등(32)이 비단가리비로부터 추출한 폴리펩티드를 피부에 도포한 후 UV 조사했을 때 SOD와 GPx활성이 증가하였다는 보고와 본 연구 결과는 같은 경향을 보이고 있었다.

요 약

무모쥐의 피부에 도포한 애엽 추출물과 positive 비교군인 아스코르브산이 피부 조직에 미치는 항산화효과를 조사하였다. 활성산소인 과산화수소의 생성량은 애엽 추출물과 아스코르브산 2%와 5% 도포군에서 유의적으로 감소하였다. 히드록시 라디칼의 생성량은 애엽 추출물 2%와 5% 도포군에서만 유의적인 감소효과가 있었다. 산화적 스트레스의 지표인 산화 단백질의 함량은 모든 애엽 추출물 도포군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소(14.6%~18.5%)하였으나, 아스코르브산의 경우는 2% 도포군에서만 저해효과가 인지되었다. 과산화지질 생성량은 대조군에 비해 애엽 추출물과 아스코르브산 도포그룹 모두에서 크게 감소하였다. 항산화 효소인 카탈라아제의 활성은 애엽 추출물과 아스코르브산 모든 그룹에서 첨가 농도가 증가함에 따라 크게 증가하였으며, 글루타치온 퍼옥시다아제의 활성은 애엽 추출물 도포군은 2%와 5%에서, 아스코르브산의 경우는 모든 그룹에서 유의적인 활성 증가를 보였다. 이상의 결과는 피부 노화 억제 기능성 화장품 소재로서 애엽 추출물의 활용 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과입니다.

문 헌

1. Cha SH, Jung YD, Lee SC, Ahn BW, Kim TP, Lee MW.

1991. Oxidation of skin tissue proteins by ultraviolet-B irradiation. *Korean J Gerontol* 1: 82-86.

2. Black H. 1987. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *J Photochem Photobiol* 46: 213-221.

3. Witt EH, Motchnik P, Packer L. 1993. Evidence for UV light as an oxidative stressor in skin. In *Oxidative Stress in Dermatology*. Marcel Decker, New York. p 29-47.

4. Elaine S, Frederick AC, James AM, Lorraine HK. 1991. Topical all-trans retinoic acid stimulates collagen synthesis *in vivo*. *J Invest Dermatol* 96: 975-978.

5. Simon C, Ilona K, Trampusch KM. 1992. Effects of all-trans retinoic acid on UVB-irradiated and non-irradiated hairless mouse skin. *J Invest Dermatol* 98: 248-260.

6. Francesco B, Maria L, Lucia M, Claudio P, Antonio T, Domenico T, Francesco C, Antonella S. 1996. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *Int J Pharm* 145: 87-94.

7. Fuchs J, Stefan W, Maurizio P, Norber G, Thomas H, Lester P, Roland K. 2003. HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: Correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic Biol Med* 34: 330-336.

8. Ahn BY. 1992. Antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Korean J Food Hygiene* 7: 157-160.

9. Park SK, Park JC. 1994. Antimicrobial activity of extracts and coumaric acid isolated from *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Korean J Biotech Bioengineer* 9: 506-511.

10. Oh TY, Ahn BO, Ko JI, Ryu BK, Son MW, Kim SH, Kim WB, Lee EB. 1997. Studies on protective effect of DA-9601, an *Artemisiae herba* extract, against ethanol-induced gastric mucosal damage and its mechanism. *J Appl Pharmacol* 5: 202-210.

11. Kim NJ. 2005. Screening effect of natural materials for development of functional cosmetic. *MS Thesis*. Pukyong National University, Busan.

12. Hahn DR, Kim IH. 1973. Studies on the volatile oil constituents in *Artemisia* sp. isolation and determination of camphor by gas chromatography. *J Pharmacol* 4: 71-74.

13. Ryu SN, Kang SS, Kim JS, Ku BI. 2004. Quantitative analysis of eupatilin and jaceosidin in *Artemisia herba*. *Korean J Crop Sci* 49: 452-456.

14. Kim BN, Lee KS, Song BK. 2000. A study on the hemostatic effects of *Artemisiae asiaticae herba* aqua-acupuncture and gelatin aqua-acupuncture. *J Oriental Gynecol* 13: 46-59.

15. Choi BB, Lee HJ, Bang SK. 2004. Studies on the amino acid, sugar analysis and antioxidative effect of extracts from *Artemisia* sp. *Korean J Food Nutr* 17: 86-91.

16. Kim YP, Lee SC. 1987. Superoxide dismutase activities in the human skin. In *The Biological Role of Reactive Oxygen Species in Skin*. University of Tokyo Press, Tokyo. p 225-320.

17. Lowry OH, Roseborough NJ, Farr LA, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

18. McCord JM, Fridovch I. 1969. Superoxide dismutase; An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.

19. Chan PC, Bielski BH. 1974. Enzyme-catalyzed free radical reactions with nicotiamide adenine nucleotides. *J Biol Chem* 249: 1317-1319.

20. Thurman RG, Ley HG, Scolz R. 1987. Hepatic microsomal ethanol oxidation. *Eur J Biochem* 25: 420-430.

21. Halliwell B, Gutteridge JM. 1981. Formation of a thio-barbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett* 128: 347-352.
22. Levine RL, Garland CN, Oliver AA, Climent AG, Lenz BA. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. Vol 186, p 464-478.
23. Choi JH, Yu BP. 1990. Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *AGE* 13: 61-64.
24. Rigo A, Rotilio G. 1977. Simultaneous determination of superoxide dismutase and catalase in biological materials by polarography. *Anal Biochem* 81: 157-166.
25. Tappel AL. 1978. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. Vol 56, p 506-513.
26. Yamamoto Y. 2001. Role of active oxygen species and anti-oxidants in photoaging. *J Dermatol Sci* 27: 1-4.
27. Yasui H, Sakurai H. 2000. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 131-136.
28. Kari P, Krsi L, Pekka A, Urpo K, Parkku A. 1995. Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis in vivo. *J Photochem Photobiol B* 3: 43-48.
29. Podda M, Maret GT, Christine W, Yan LJ, Packer L. 1997. UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radic Biol Med* 24: 55-65.
30. Fuchs J, Margaret EH, Laurie MR, David S, Wilson CC, Lester P. 1989. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 93: 769-773.
31. Punnonen K, Christer T, Jansen AP, Marku A. 1991. Effect of in vitro UVA irradiation and PUVA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidant enzymes in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 4: 255-259.
32. Han YT, Han ZW, Yu GY, Wang YJ, Cui RY, Wang CB. 2004. Inhibitory effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on ultraviolet A-induced oxidative damage on human skin fibroblast MMEs in vitro. *Pharmacol Res* 49: 265-274.

(2007년 10월 4일 접수; 2007년 12월 11일 채택)