

맨드라미 (*Celosia cristata* L.) 에탄올 추출물이 항산화 및 항노화 작용에 미치는 효과

¹표영희 · ¹윤미연 · ²손주현 · †²최태부
¹오산대학 피부미용과, ²건국대학교 미생물공학과
(접수 : 2008. 7. 30., 게재승인 : 2008. 10. 2.)

The Effect of *Celosia cristata* L. ethanol Extract on Anti-oxidant & Anti-aging Activity

Young-Hee Pyo¹, Mi-Yun Yoon¹, Ju-Hyun Son², and Tae-Boo Choe^{2†}

¹Dept. of Skin & Beauty, Osan college, ²Dept. of Bioengineering, Graduate School at Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
(Received : 2008. 7. 30., Accepted : 2008. 10. 2.)

For the experiment, to develop new materials for cosmetics, the *Celosia cristata* L. plant ethanol extract were used for physiological effect and cosmetics application research. The *Celosia cristata* L. is a Korean traditional variety grown. To investigate the effect of Ethanol extract of *Celosia cristata* L. on skin care, we measured anti-oxidant activity and anti-aging activity. *Celosia cristata* L. ethanol extract itself had anti-oxidant activity in a dose-dependent manner in 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging. Ethanol extract had anti-oxidant activity in a dose-dependent manner. Silica dose-dependently increased the intracellular ROS generation in RAW 264.7 cells. *Celosia cristata* L. ethanol extract inhibited silica-induced intracellular superoxide anion generation and H₂O₂ generation and hydro-peroxide generation in RAW 264.7 cells. For anti-aging effects, the hyaluronidase inhibition effects, were relatively strong and they also showed elastase activity inhibition effects, which suggesting the *Celosia cristata* L. ethanol extract might be used as hydration and anti-wrinkle agents. From the above results, it is referred that *Celosia cristata* L. ethanol extract appears to have potent anti-oxidant activity and anti-aging activity.

Key Words : *Celosia cristata* L., DPPH, ROS, anti-oxidant, anti-aging, cosmetics

서 론

맨드라미 (*Celosia cristata* L.)는 쌍떡잎식물 중심자목 비름과(一科 Amaranthaceae)에 속하는 1년생 한해살이풀이며 관상용으로 흔히 재배하는데, 계관(鷄冠)·계두(鷄頭)라고도 한다. 특히 한방에서는 맨드라미의 꽃을 계관화(鷄冠花, Cockscomb), 종자를 계관자(鷄冠子)라 하며, 중국이나 기타 여러 나라에서 맨드라미의 어린잎과 개화된 꽃은 채소로 사용되어졌으며(1), 또한 마른 잎이나 꽃과 씨는 중국의 전통 약제로 사용되어져 왔다(2-3). 생약의 이용으로는 꽃에서 양혈(涼血)과 지혈의 효능, 치루(痔瘻)로 인한 하혈, 적백리(赤白痢), 토혈, 객혈, 혈림(血淋), 부녀붕중(婦女崩中), 적백대하(赤白帶下)를 치료하며,

줄기와 잎은 치창(痔瘡), 이질, 토혈, 비출혈(鼻出血), 혈붕(血崩), 담마진(蕁麻疹)을 치료하며, 종자에서 양혈(涼血), 지혈의 효능, 장풍혈변(腸風血便), 적백리(赤白痢), 붕대(崩帶), 임탁(淋濁), 간장병(肝臟病) 및 안병(眼病)을 치료하는 효능을 가지고 있다(4).

일찍이 맨드라미의 빨간 꽃에 질소를 포함하고 있는 안료가 있음이 보고되었고(5), 후에 보라색 꽃에 hydroxycinnamoyl-amaranthins (celosianins)이 함유된 것과 빨간 꽃에 amaranthin (betanidin 5-O-β-glucuronosylglucoside)과 betanin이 함유된 것이 발견되어졌다(6-7).

또한 맨드라미 뿌리 수용 추출물에서 지방산 14종이 검출되었으며 특히 C16:2가 발견되었고 필수지방산도 모두 포함되어 있는 것으로 나타났으며(8), 맨드라미의 자주 꽃 천연 추출물에서 호소(cyclo-DOPA 5-glucoside glucuronosyltransferase)활성이 있음이 증명되었다(9).

맨드라미의 주요한 유효성분으로 betacyanin, kaempferitrin, amaranthin, pinitol 등이 함유되어 있으며(5), 많은 양의 질산칼륨

† Corresponding Author : Dept. of Bioengineering, Graduate School at Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
Tel : +82-2-450-3523, Fax : +82-2-3436-5594
E-mail : tbchoe@konkuk.ac.kr

과 이미 알려진 5개의 flavonoid와 새로운 isoflavone인 cristatein (5-hydroxy-6-hydroxymethyl-7, 2'-demethoxyisoflavone)과(10), 식물계에 널리 존재하는 phenolic이 있어 다양한 약리적, 생물학적인 활성과 항산화 작용을 하고 있다(11-12).

또한 강한 항 바이러스 단백질인 2개의 유력한 당단백질 CCP-25와 CCP-27가 꽃이 피고 있는 성장 시기 단계의 맨드라미 잎들에서 존재한다고 보고되었다(13).

생체 내에서 에너지 생산을 위한 산화 과정 중에 상당량의 활성 산소들이 생성된다. 이들 활성산소는 생체 내 제거기작에 의해 대부분 소멸되지만 순간적으로 활성산소가 다량으로 발생되거나 만성적으로 활성산소가 발생되어 항산화방어체와의 균형이 깨지면 각종 질환의 원인이 된다(14). 산소는 대사과정 중 일부분이 superoxide radical (O_2^-), 과산화수소 (H_2O_2), hydroxy radical (HO), singlet oxygen(O_2)과 같은 활성 유해 산소로 변환되는데, 이들은 피부세포 및 조직의 손상은 물론이며 항산화 효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 산화제와 항산화제 균형을 파괴하고 지질과산화, 단백질 산화, 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 멜라닌 생성반응의 촉진, DNA의 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 야기시킨다. 이에 따라 피부 탄력 감소, 주름살 및 기미·주근깨 등으로 특징 지워지는 피부 노화가 가속화된다. 따라서 피부노화를 지연시키고 억제하기 위해서는 생체 내 뿐만 아니라 피부에서의 과잉의 활성 산소 중을 억제하고 또한 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어시스템이 필요하다(15). 피부는 항상 산소와 접촉하고 자외선에 노출되어 있어 활성산소종에 의한 피부의 광산화적 손상 위험이 항상 존재한다. 활성산소종이란 반응성이 매우 큰 O_2 및 $\cdot OH$ 를 비롯하여 O_2^- , H_2O_2 , $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $ROOH$ 및 HOCl 등을 포함한다. 이들은 고에너지 복사선, 광증감 반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다. 이들 활성산소종 중에서 O_2 및 $\cdot OH$ 은 피부 광 손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부노화를 가속화시킨다(16). 사람 피부세포에 있어서 지질, 단백질 및 DNA 등 생체 구성 성분의 산화 손상뿐만 아니라 UVA (320~380 nm) 의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 활성산소종이 포함되는 것으로 기술되고 있다. 피부 노화에 있어 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 부분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서 O_2 을 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 O_2 가 매개할 수 있다는 보고도 있다(17).

천연물로부터 노화억제활성이 있는 물질에 대한 연구는 다양하게 이루어져 왔으며, 특히 식물체로부터 많은 물질이 개발되어 왔다. 식물의 뿌리나 잎에서 만들어지는 모든 화학물질을 통틀어 일컫는 개념으로 식물 중에 존재하는 성분들 중 인체에 유익한 생리활성을 가진 성분들을 phytochemical(18)이라 하며, 현재 시판되고 있는 대부분의 화장품의 성분은 실제로 섭취하고 있는 채소와 과일들의 주성분인 phytochemical로 이에 대한

개발도 점차 늘어가고 있는 추세이다.

특히 식물 유래의 천연 항산화성 물질인 phytochemical의 개발과 피부노화와 많은 연관성이 있는 것으로 연구되고 있어 인체에 보다 안전하고 효력이 강한 항산화 물질에 대한 연구는 지속적으로 이루어져야 할 것으로 보여진다.

이에 본 연구에서는 예로부터 약용 또는 식용으로 사용되어온 맨드라미의 에탄올 추출물을 이용하여 화장품 응용을 위한 항산화 및 항노화 작용 정도를 평가, 정리하여 화장품 제제로서의 응용 가능성을 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

시약

DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydroazyl), NR solution, human leukocyte elastase (HLE), hyaluronic acid, hyaluronidase 들은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. dihydrorhodamine (DHR), dihydroethidium (DHE), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Molecular Probe Co., (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. RAW 264.7 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 구입하였다.

시료의 제조

- Plant

본 실험에 사용한 맨드라미는 서울시 제기동 경동시장에서 2008년 1월에 6kg 정도의 전초를 구매하여 시료로 사용하였다.

- 에탄올 추출

증류수에 녹지 않는 시료 침전물은 맨드라미의 부피의 10배 70% 에탄올을 가해서 상온에서 72시간 추출하여 원심분리로 지용성 여액을 얻었다. 같은 조작을 2회 반복하여 모은 여액을 whatman NO.2 여과지로 여과시킨 후 멸균 필터지로 필터링 한 다음 동결 건조하였다. 에탄올 추출물은 DMSO에 녹여 시료를 얻었다.

세포주

RAW 264.7 (rat macrophage) 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin (100 IU/50 $\mu g/ml$)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. RAW 264.7 세포를 이용하여 세포내 superoxide 생성, H_2O_2 생성, 세포내 hydroperoxide 생성을 측정하였다.

사용기기

이 실험에서 사용한 주요 기기는 centrifuge (UNION 32R, Hanil Science Industrial Co., Korea), hot plate Magnetic stirrer (HMS-10, YoungJi HANA Tech. Korea), CO_2 incubator (MCO 175, Sanyo Electric Co., Japan), FL spectrofluorometer (FL 600, Bio-Tek, USA), water bath (C-WB, CHANG SHIN Scientific Co., Korea)를 사용하였다.

NR (Neutral Red) assay를 이용한 세포독성 측정

맨드라미 추출물 및 대조군으로 사용한 시약들의 세포독성을

확인하기 위하여 NR assay를 하였다. 세포 주는 RAW 264.7 세포를 사용하였으며, 96 well plate에 well 당 1×10^4 수로 분주하여 24시간 부착하고 각각의 시료를 농도별로 가한 후 48시간 동안 37°C 에서 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양한 세포는 배양액을 NR solution (Sigma)이 1% 포함된 무혈청배지로 교환하여 3시간 배양 48시간 후 배양 용액을 버리고, neutral red의 결정화 유무확인 후 세포고정액으로 사용한 formaldehyde 용액 10%가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 각 well에 100 μ l로 20분 처리하여 고정시켰다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 μ l씩 분주하고 세포내 neutral red추출하여 ELISA microplate reader(540nm)로 측정하였다.

항산화 활성의 측정

DPPH 라디칼 소거 정량

DPPH 라디칼은 매우 안정한 자유 라디칼 (free radical)이다. 이 라디칼을 소거하는 정도로써 항산화 작용을 평가하였다. 96 well plate에 에탄올에 녹인 100 μ M 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 용액 180 μ l와 증류수를 용매로 한 맨드라미 수용 추출물과 에탄올을 용매로 한 맨드라미 추출물을 0.1, 1, 10, 100 μ g/ml의 농도로 각각 20 μ l씩 가하고 차광 상태에서 37°C에서 20분간 배양하였다. 배양 후 FL 600 spectrofluorometer (Bio-Tek, U.S.A.)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(19).

세포내 superoxide 생성 측정

세포내에서 생성되는 superoxide를 측정하기 위하여 dihydroethidium (DHE)을 이용하였다. RAW 264.7 세포를 10 ml의 Krebs buffer 용액 (mM : NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 0.4, MgCl₂ 0.5, HEPES (pH 7.4) 10, CaCl₂ 1.8, glucose 5)에 분산시킨 후 10 μ M dihydroethidium을 가하고 1시간 빛을 차단한 곳에서 배양하였다. dihydroethidium이 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후 10⁵ cells/ml로 분주하고 각각의 시료를 전 처리 한 후 silica 2 mg/ml을 가하여 30분간 superoxide 생성을 유도하였다. 원심분리 후 cell pellet을 200 μ l의 Krebs 용액에 분산시킨 후 형광 (Ex : 480 nm; Em : 586 nm)을 측정하였다(20).

세포내 H₂O₂ 생성 측정

2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)가 RAW 264.7 세포내로 들어가서 세포내 생성된 산소라디칼 (ROS)에 의해 산화되어 deacetylation되면서 생성되는 DCF가 형광을 내는 물질로 전환되는 반응을 이용하여 형광도를 측정하였다. RAW 264.7 세포를 10 ml의 Krebs buffer 용액 (mM : NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 0.4, MgCl₂ 0.5, HEPES (pH 7.4) 10, CaCl₂ 1.8, glucose 5)에 suspend시킨 후, 20 μ M DCF-DA를 가하고 30분간 차광상태에서 배양하였다. DCF-DA가 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후 원심분리 하여 세포를 추출하였다. 10⁵ cells/ml로 소분하고 각각의 시료를 각각의 농도로 전처리한 후 silica (2 mg/ml)를 가하여 30분간 H₂O₂ 생성을 유도하였다. 원심분리 (3,000 g \times 10 min) 후 cell pellet을 200 μ l의 Krebs 용액에 재 분산시켜 96 well plate에 옮긴 후 형광도 (Ex 485 nm/ Em 535 nm)를 측정하였다(21).

세포내 hydroperoxide 생성 측정

Dihydrorhodamine (DHR)이 RAW 264.7 세포내로 들어가서 세포내 생성된 hydroperoxide에 의해 산화되어 형광을 나타내는 물질인 rhodamine 123으로 전환되는 반응을 이용하여 형광도를 측정하였다. RAW 264.7 세포를 10 ml의 Krebs buffer 용액 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 0.4, MgCl₂ 0.5, HEPES (pH 7.4)10, CaCl₂ 1.8, glucose 5)에 부유시킨 후, 10 μ M DHR을 가하고 30분간 차광장소에서 배양하였다. DHR이 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후, 10⁵ cells/ml로 소분하고 각각의 시료를 각각의 농도로 전처리한 후 silica (2 mg/ml)를 가하고 30분간 hydroperoxide의 생성을 유도하였다. 원심분리 (3,000 g \times 10 min) 후 cell pellet을 200 μ l의 Krebs 용액에 재 분산시켜 96 well plate에 옮긴 후 형광도 (Ex 488 nm/ Em 515 nm)를 측정하였다(22).

항노화 작용의 측정

Hyaluronidase 저해효과 측정

Hyaluronidase는 hyaluronic acid (glycosaminoglycan consisting of d-glucuronic acid and n-acetyl-d-glucosamine disaccharide units)를 가수분해하는 효소이며 hyaluronic acid가 hyaluronidase에 의해서 가수 분해되어 생성되는 N-acetylglucosamine을 Morgan-Elson assay를 이용하여 정량하였다(23). 96 well plate에 55°C로 가온된 hyaluronic acid-agarose mixture를 100 μ l씩 분주한 후 실온에 방치하여 gel화시켰다. 100 μ l hyaluronidase (40 unit)를 가하고 시료를 농도별로 10 μ l 첨가한 후 37°C에서 5시간 배양하였다. 상층액을 버리고, 10% (w/v) cetylpyridinium chloride를 100 μ l 가하여 실온에서 30분 방치하고 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Elastase 활성 측정

피부 조직의 탄력성을 나타내는 결합 조직 섬유로서 elastin이 관여하고 있다. elastin을 가수분해하는 elastase는 피부 주름과 관련성이 있는 효소로서 맨드라미 추출물이 elastase 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 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 DMSO에 녹여 20 mM stock solution을 만들었다. 각 시료가 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 elastase를 각각의 시료와 혼합한 후 10 μ l를 96 well plate에 분주하고 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 200 μ M p-nitroanilide를 200 μ l를 첨가하였다. 반응액은 37°C에서 20분 배양하고 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

세포독성 측정

맨드라미가 인체에 무독한지 알아보기 위해 맨드라미 추출물을 Macrophage에 독성 평가를 실험하였다. 맨드라미 에탄올 추출물에서 최고농도 100 μ g/ml에서 89.5%의 높은 세포 생존율을 나타냈다. 따라서 세포독성이 매우 낮아 피부에 안전하다는 것이 확인되었다. 이는 맨드라미의 구성 성분으로 알

려져 있는 Kaempferitrin 유도체이며, flavonoid종류 중 하나인 kaempferol을 처리하였을 때 통계적으로 유의하게 세포 독성이 없음을 확인한 연구(24)에서와 같이 화장품 원료 개발 및 응용에서 피부 안전성이 매우 우수할 것으로 사료된다(Fig. 1).

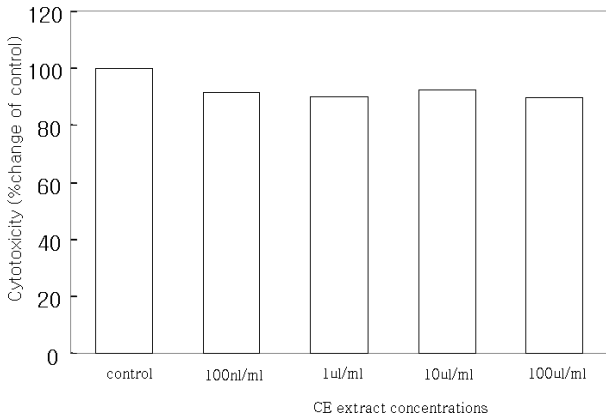


Figure 1. The cytotoxicity of *Celosia cristata* L. ethanol extract.

맨드라미 추출물의 항산화 효과

시험관내에서 맨드라미 추출물의 항산화 작용

생체 내 생체막에 존재하는 지질은 활성산소의 존재 하에 유리기와 연쇄 반응을 일으켜 산화되어 생체노화의 원인이 된다(25). 자유라디칼이 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 생성되는 과산화지질의 축적은 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 보고되고 있다(26). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 자체가 비교적 안정된 free radical을 지니고 있는 화합물로 항산화 물질에 의해 환원되어 항산화 능력을 확인하는데 널리 사용되는 물질로서 DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응은 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 자색이 탈색에 의해 나타내는 정도를 지표로 하여 항산화능을 측정하는 방법이다(27). 맨드라미는 항산화 효능이 있다고 알려진 성분을 포함하고 있으며, 이러한 성분과 맨드라미 추출물의 자체적인 항산화 작용을 규명하기 위하여 DPPH radical 소거 활성을 관찰하였다.

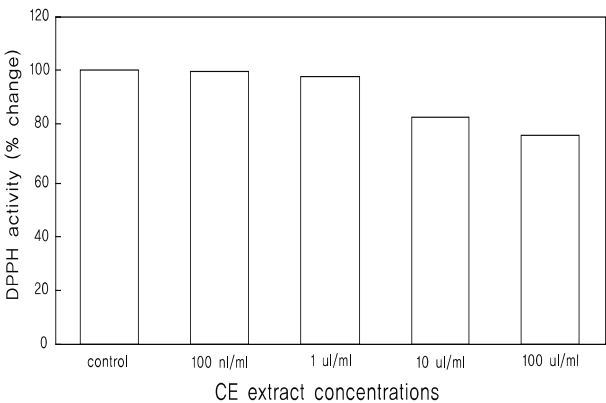


Figure 2. Anti-oxidant activities of *Celosia cristata* ethanol extract in the DPPH radical scavenging activity assay. A solution of 180 μl of 100μM DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 μl of *Celosia cristata* extract for 20 min and the absorbance was measured at 517 nm. Results are means±SD from 4 separate experiments.

맨드라미의 DPPH에 의한 항산화 활성을 측정한 결과 에탄올 추출물 (CE) 0.1 μg/ml에서 100 μg/ml까지의 농도에서 농도의존적으로 항산화 작용을 보였으며 최고농도 100 μg/ml에서 25%의 억제율을 나타내었다(Fig. 2).

이러한 결과는 맨드라미 구성성분 중 특히 플라보노이드 계열의 Kaempferitrin이 E. coli에 대항하는 항 박테리아 효과와 강한 항산화력을 가지며 항 당뇨 활성이 있다고 연구(28)되어진 것과 일치하며, 또한 캠퍼롤 (Kaempferol)이 SOD (superoxidase dismutase) 활성을 유의하게 증가시키고 ROS 생성을 억제시키는 항산화 효능 연구(29)와도 일치하여 맨드라미 추출물 자체의 항산화 효능이 있는 것으로 사료되며, 맨드라미 성분 중의 betalain은 항산화력이 뛰어나 여기에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며(30-32), betacyanin이 항산화 요소로 인식되어지고 있음을 연구한 것과(31) Yizhong 등(33)은 betalain의 주요성분인 betanin (betacyanin의 일종)이 강한 항산화력을 나타내었다고 보고하고 있다.

RAW 264.7 세포에서 reactive oxygen species (ROS) 소거 활성

지구상에서 건조 대기의 21%를 차지하고 있는 산소는 호기성 생물에게 없어서는 안 되는 에너지 획득 요소이다. 이렇듯 생물에 있어 생명유지에 절대적으로 필요한 요소이지만 식품 또는 동물의 세포 등과 같은 여러 유기물질에 대해 산화 반응을 유발시켜 많은 부작용을 일으키는 양면성을 가지고 있다(34). 이러한 산소에 의해 발생되는 것이 free radical로 제일 바깥쪽 전자각에 짝지어지지 않은 전자 (unpaired electron)를 포함하는 화학종으로 대체로 강한 반응성을 나타낸다. 이들은 탐식작용, prostaglandin 합성과 같은 생리적 과정에서 뿐만 아니라 많은 효소촉매반응의 중간물질로서 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 강한 반응성 때문에 인접한 세포성분들을 무차별 공격하여 손상을 일으킬 수 있다(35). 산소를 이용하는 세포는 끊임없이 ROS가 생성된다. ROS 중 가장 먼저 생성되는 것이 superoxide anion으로써 이를 제거하는 효소인 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(36). 따라서 본 실험에서는 세포내에서 생성되는 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical을 각각 DHE, DCF, DHR 형광물질을 이용하여 측정하였다.

Table 1. Dose-response of reactive oxygen species generation to silica in RAW 264.7 cells

Silica (mg/ml)	% Increase of Control		
	DHE	DCF-DA	DHR
0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
0.5	134.2 ± 15.2	185.2 ± 21.2	153.2 ± 11.4
1.0	286.0 ± 17.1	223.4 ± 18.2	217.0 ± 12.4
2.0	432.2 ± 26.3	512.2 ± 33.9	456.2 ± 24.8
4.0	642.2 ± 33.2	751.7 ± 42.3	712.2 ± 52.8

DHE : used for measurement of intracellular superoxide anion production.
 DCF-DA : used for measurement of intracellular H₂O₂ production.
 DHR : used for measurement of intracellular hydroperoxide production.

Stimulant로 사용한 silica는 macrophage에서 뿐만 아니라 fibroblast 에서도 reactive oxygen species를 생성하는 물질로 알려져 있다(37). RAW 264.7 세포에서 silica는 농도 의존적으로 ROS 생성을 증가시켰고(Table 1), 맨드라미 추출물의 세포내 ROS 소거 활성 효과를 확인하는데 있어서 silica 2 mg/ml를 사용하였다.

DHE는 superoxide anion과 반응하여 형광을 내는 물질로 전환되는 것을 이용하여 세포내 superoxide anion을 측정하였다. 2 mg/ml silica는 RAW 264.7 세포에서 superoxide anion의 생성을 44.4% 증가시켰다. 맨드라미 에탄올 추출물은 silica에 의한 superoxide anion을 농도 의존적으로 강하게 억제하였으며 100 µg/ml에서 49.5% 억제하여 맨드라미 추출물 중에 강력한 항산화 물질이 존재할 가능성을 시사한다(Fig. 3).

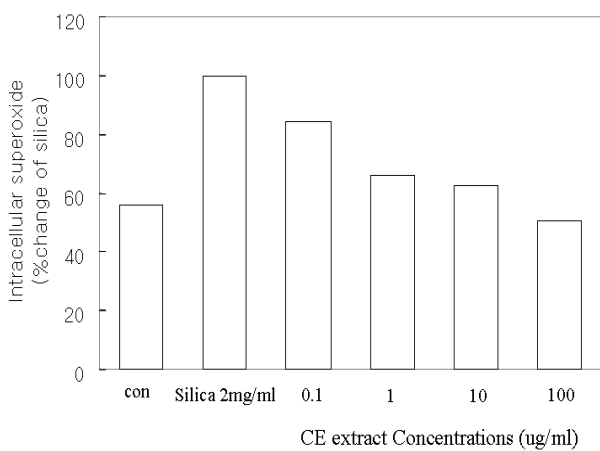


Figure 3. Effects of *Celosia cristata* L. ethanol extract on intracellular superoxide generation in RAW 264.7 cells. Data were expressed as % change of silica. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

DCF-DA를 이용한 세포내 H₂O₂ 생성을 측정한 실험에서 맨드라미 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 silica에 의한 H₂O₂ 생성을 강하게 억제하였다. 에탄올 추출물의 최고 농도 100 µg/ml에서 73%로 H₂O₂ 생성을 억제하는 강력한 항산화력을 보였다(Fig. 4).

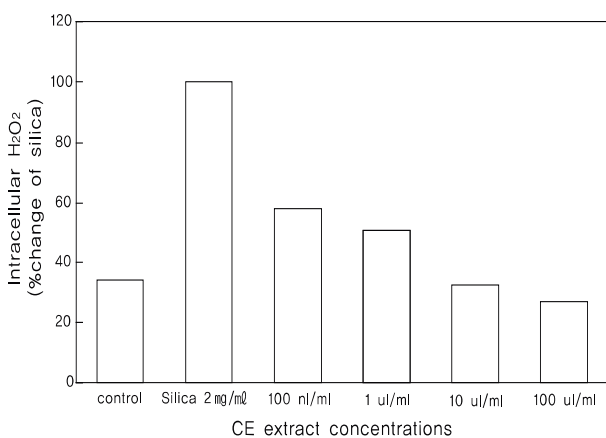


Figure 4. Effects of *Celosia cristata* L. ethanol extract on intracellular H₂O₂ generation in RAW 264.7 cells. DCF-DA-loaded RAW 264.7 cells were preincubated with *Celosia cristata* L. extract and stimulated with 2 mg/ml silica at 37°C for 20 min. Control was the cells treated with 1% DMSO in the absence of silica. Data were expressed as % change of control. Results are means ± SD from 3 separate experiments.

한편 ROS에 의한 세포내 hydroperoxide 생성은 DHR를 이용하여 측정하였다. hydroperoxide 중 특히 superoxide와 nitric oxide 반응에 의하여 생성되는 peroxynitrite는 주로 단백질의 tyrosine과 반응하여 nitrotyrosine을 만들거나 cysteine의 -SH 기와 결합하여 세포의 기능을 변화시키는 것으로 알려져 있다(38). 그러므로 세포내에서 hydroperoxide의 생성을 억제하는 작용은 세포의 기능 유지에 있어서 매우 중요한 작용이다. silica에 의한 형광도의 증가는 대조군에 비하여 2.7배 증가하였다. silica에 의한 세포내 hydroperoxide 생성에 있어서 맨드라미 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 강하게 억제하였고, 최고 농도인 100 µg/ml에서 69.7%의 강한 항산화력을 보였다(Fig. 5).

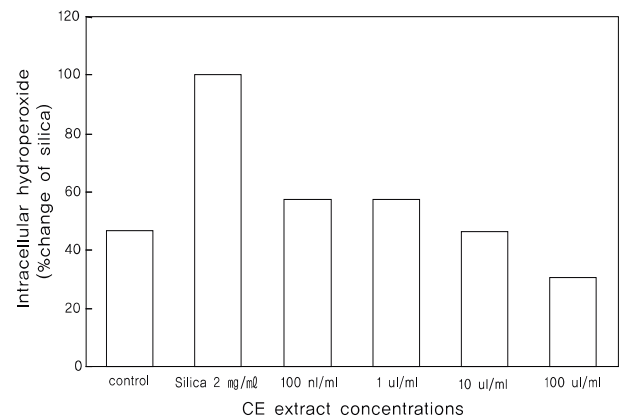


Figure 5. Effects of *Celosia cristata* L. ethanol extract on intracellular hydroperoxide generation in RAW 264.7 cells. DHR-loaded RAW 264.7 cells were preincubated with *Celosia cristata* L. extract and stimulated with 2 mg/ml silica (SIL) at 37°C for 20 min. Control (CON) was the cells treated with 1% DMSO in the absence of silica. Data were expressed as % change of control. Results are means ± SD from 3 separate experiments.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 맨드라미 에탄올 추출물에는 세포 내에서 활성산소에 대한 세포보호효과, 즉 세포내에서 ROS 생성을 강하게 억제하는 항산화 작용 및 이에 따른 생리활성 물질을 함유하고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 맨드라미의 구성 성분으로 알려져 있는 flavonoid종류 중 하나인 kaempferol 성분에 의해 우수한 항산화 활성을 보였던(39)의 연구와 betacyanin이 ROS를 소거하며 박테리아 침투와 상처로 유발된 손상을 제한한다는 연구(40)와 유사한 결과를 보여준다.

Moon 등(41)에 의하면 같은 성분이라도 항산화 측정 방법에 따라 항산화 활성이 다르게 평가된다고 하였는데, 본 연구에서도 같은 추출물에서 실험방법에 따라 활성이 다소 다르게 측정되는 경향을 확인하였다. 따라서 항산화 활성의 측정에 관한 연구가 다양한 측면에서 이루어져야하며, in vitro 실험은 물론 in vivo 실험도 함께 이루어질 필요가 있을 것으로 사료된다.

**맨드라미 추출물의 항노화 작용
hyaluronidase의 저해 효과**

Hyaluronidase (HAase)는 glucuronic acid와 glucosamine이 반복하여 연결된 고분자 다당류이며(42) 세포간 물질인 hyaluronic acid (glycosaminoglycan consisting of d-glucuronic acid and n-acetyl-d-glucosamine disaccharide units)와 결합조직간의 glucosaminic bond를 가수분해하여 용해시킴으로써 모세혈관

투과성에 관여하고, 조직간 장벽을 없애주는 작용과 함께 조직의 섬유 증식증을 감소시키며 동시에 조직의 부기와 부종을 감소시키는 특징을 가진 mucopolysaccharide-splitting enzyme의 하나로서 알려져 있다. 이 효소는 일반적으로 체내에서 불활성형으로 존재하고 금속이온 및 N-methyl-p-methoxyphenethylamin과 formaldehyde의 다중합체인 compound 48/80에 의해 활성화된다(43). 또한 Dermis (connective tissue)의 기본물질인 hyaluronic acid와 같은 산성다당류 (acidic mucopolysaccharides)에서 N-acetyl-glucosamic결합을 끊는 것을 촉진하며, 이들의 분해물질은 생물학적 시스템을 조절하는데 매우 중요하다(44).

Hyaluronic acid는 생물에 존재하는 고분자 물질로써 자연적으로 생겨나며, 포유류에서 높게 나타나고 있다. 1934년 처음 관찰되었으며, 여러 신경외과와 피부 상처 치유 및 염증 반응에 관여하는 등 의학계에서 다양하게 사용되어왔다. 고분자 hyaluronic acid는 염증 형성의 중요한 요소인 macrophage의 phagocyte ability를 저해하는 반면, hyaluronic acid의 분해산물 혹은 저분자 hyaluronic acid는 류머티스 관절염 등의 염증 환자에게서 특히 높은 농도로 관찰되고 있다. 이는 결국 고분자 hyaluronic acid의 분해효소인 Hyaluronidase의 저해에 의해 hyaluronic acid의 고분자 형태를 유지하게 함으로써 염증증 효과를 기대할 수 있다(45). 또한 hyaluronic acid는 피부의 보습 기능에 있어서 중요한 작용을 하는 물질로 자기보다 200배에 해당하는 수분을 함유할 수 있는 능력을 가지고 있어 피부에서 hyaluronic acid의 감소는 피부가 건조되는 원인이 되기도 한다.

따라서 맨드라미 추출물이 hyaluronidase 활성화에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였다. 맨드라미 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 효소 활성을 억제하여 고농도인 100 µg/ml에서는 40%의 높은 억제율을 보였다(Fig. 6).

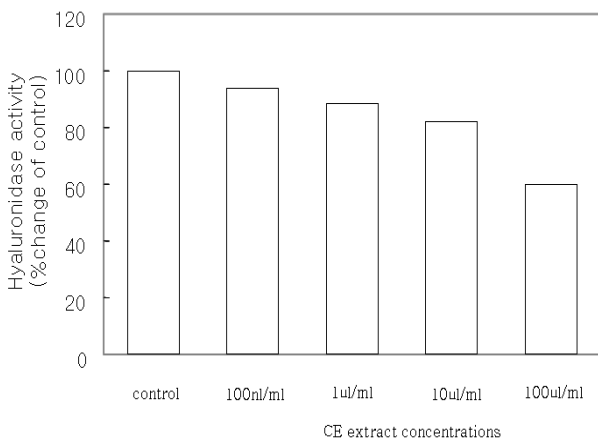


Figure 6. Hyaluronidase inhibition activity of *Celosia cristata* L. ethanol extract. Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

이러한 결과를 종합하여 볼 때 맨드라미 추출물은 hyaluronidase 활성을 강하게 억제하는 물질임을 알 수 있으며, 이는 이미 기존 연구에서 flavonoid류인 kaempferol을 인체 표피 피부 세포주, 즉 각질형성 세포주인 HaCaT cell에 처리하였을 때 HAS 유전자 발현의 증가와 이로 인한 인체 세포내의 HA의 생성을 촉진하는 효능이 있음을 발견(46)한 연구와 kaempferol이 hyaluronidase를 억제하는 물질임이 보고된 연구(47)와 유사한 결과를 나타내었다.

따라서 HA 합성을 촉진하는 효능이 있는 것으로 밝혀진

kaempferol은 HA를 이용하는 각종 피부 외용제의 유효성분으로 사용하여 피부탄력 증진, 건조 방지, 노화 방지 등의 용도로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Elastase 활성 저해효과

피부노화 현상은 피부세포 내 생체결합수의 손실, 피부 각질층의 구조변화, 표피세포의 분화감소, 진피내 섬유아세포에 의한 단백질 및 세포간 물질의 생체합성기능 저하 등에 의해 나타난다(48). 많은 연구에서 나이와 주름이 피부 탄력과 상호연관성이 있음을 보고하였으며, elastin은 주름의 형성과 밀접하게 연관되어 있으며 피부 탄력의 감소는 주름을 형성하게 된다(49). 자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되는 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부노화, 특히 주름 생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요 성분으로 collagenase, gelatinase, elastase 등이 있으며 피부의 탄력 감소 및 주름 생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다(50). 피부의 진피 조직 속에는 collagen과 피부의 탄력에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 그물망 구조가 깨어지면 즉, elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생기므로 내인성 피부노화가 발생한다(51). 그러므로 피부노화의 주원인 중의 하나인 elastin 분해효소인 elastase의 활성을 저하시킴으로써 피부노화를 억제할 수 있다. Elastase는 동물 결합 조직의 불용성 탄성 섬유 단백질인 elastin을 분해시켜 피부의 진피조직의 그물망 구조 결합을 끊어 줌으로 주름생성의 주원인 효소로 알려져 있다. 이 효소는 1949년 췌장 추출물에서 처음 발견되었으며, 미생물과 고등생물 등에서도 발견되었다. 또한 다형핵 백혈구 (PMNs)와 단핵 백혈구 (monocyte), 혈소판, 평활근 세포 등에서도 확인 되었다. elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는데 중요한 기질 단백질인 elastin을 분해하면서 다른 중요한 기질 단백질인 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해효소로서 elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타내며, ursolic acid 등이 elastase 저해제로 이용되고 있다(52).

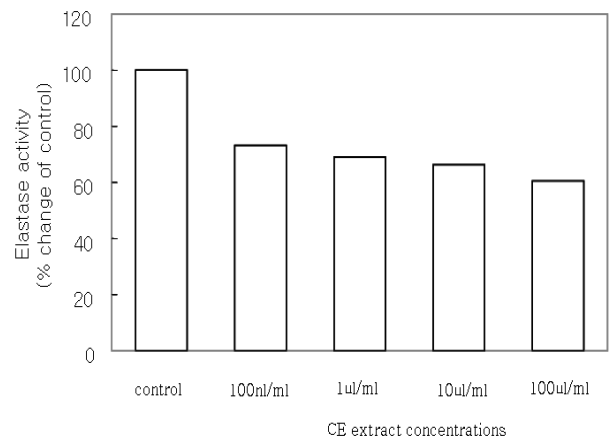


Figure 7. Elastase inhibition activity of *Celosia cristata* L. ethanol extract. Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

이처럼 elastin을 가수분해하는 elastase는 피부 주름과 연관성이 있는 효소로서 맨드라미 추출물이 elastase 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 맨드라미 에탄올 추출물에서 농도 의존적

으로 효소활성을 억제하였으며, 최고농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 39.7%로 효소활성을 억제하였다(Fig. 7). 이는 맨드라미 추출물의 elastase 활성 억제 작용이 두드러짐을 알 수 있으며 일반적으로 HA가 collagen과 elastin 등과 같이 노화와 더불어 피부 내 함량도 감소되며, 피부탄력 저하 및 주름생성과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(53). 따라서 맨드라미 추출물이 항노화 기능성 소재로서 주름 개선 제품 및 보습 제품으로서의 응용 가능성을 시사하여 준다.

요 약

본 연구에서는 화장품 신소재 개발을 위하여 맨드라미 (*Celosia cristata* L.) 식물의 에탄올 추출물을 이용하여 생리활성 효과 정도 및 화장품의 응용에 대한 연구를 하였다. 맨드라미는 자생력이 강하고 전국 어디서나 재배가 용이한 장점을 가지고 있으나 세포수준이나 in vivo에서 맨드라미의 항산화 및 항노화 효과에 대한 실험 결과는 보고된 바 없다.

맨드라미 추출물의 피부 자극성을 알아보기 위해 세포 독성을 관찰하였으며 맨드라미 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 89.5%의 비교적 낮은 세포 독성을 나타내어 사람 섬유아세포에서의 세포활성 효과가 우수하였다. DPPH를 이용한 항산화 작용측정에 있어서 맨드라미 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 항산화 작용을 나타내었고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 25%의 항산화력을 보였으며, silica에 의한 RAW 264.7 세포내 superoxide anion 생성을 최고 농도인 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 49.5%로 억제하여 강한 항산화력을 나타냈으며, DCF-DA를 이용한 세포내 H_2O_2 생성을 측정 한 실험에서에서도 맨드라미 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 항산화 작용을 나타내어 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 73%로 강력하게 항산화력을 보였다. 또한 hydroxyl radical 생성을 모두 농도 의존적으로 억제하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 69.7%의 강력한 억제력을 나타내어 항산화 효능이 매우 우수하다고 보여진다.

항노화 효능에 있어서 hyaluronidase 억제 결과 농도 의존적으로 효과가 우수하여 최고 농도인 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 40%의 높은 억제율을 보였으며, 그 외 elastase에서는 39.7%의 억제율을 나타냈다. 이는 맨드라미가 hyaluronidase나 elastase발현의 전사 단계에 관련하거나 혹은 단백질 번역 후 변형 (post-translation modification) 단계에 관여하여 효소를 억제하는 효과를 나타내는 것으로 추정해 볼 수 있다.

결론적으로 자원의 재생산이 용이한 맨드라미의 식용 및 약용 자원으로서의 활용가능성을 시사하며, 맨드라미 추출물을 제조하여 화장품에 응용하면 우수한 보습제 및 항산화제, 노화 방지 화장품을 개발할 수 있다고 판단되어진다.

REFERENCES

- Palada, M. C. and S. M. A. Crossman (1999), Evaluation of tropical leaf vegetables in the Virgin Islands, In: Janick, J. (Ed.), Perspectives on New Crops and New Uses. *ASHS Press, Alexandria*. 338-393.
- Wong, K. Y. (1994), *Chinese Herbal Medicine*, *Wokman Press, Hong Kong*.
- Xu, G. J., Zi Ji Guan, Hua Ji Guan, and Miao Ji Guan (1996), Encyclopedia of Chinese Medicine, *China Medicine Sci. Technol., Beijing*. 2, 509-511.
- Medical plants of Korea, www.medicalplant.org.
- Wehmer, C. (1929), *Die Pflanzenstoffe*, 2nd Edition, *Fischer Verlag, Jena*. 1, 299.
- Piattelli, M. and G. Impellizzeri (1970), 2-Descarboxybetanidin, a minor betacyanin from *Carpobrotus acinaciformis*, *Phytochemistry* **9**, 2553-2556.
- Minale, L., M. Piattelli, S. De Stefano, and R. A. Nicolaus (1966), Pigments of centrospermae-VI. acylated betacyanins, *Phytochemistry* **5**, 1037-1052.
- Nam, H. K. and G. H. Rho (1988), Composition of fatty acid and amino acid in water extracted material Cockscomb plant root, *J. Korea Soc. Food Nutr.* **17**(2), 172-175.
- Nobuhiro Sasaki, Yutaka Abe, Katsuhiko Wada, Takatoshi Koda, Yukihiko Goda, Taiji Adachi, and Yoshihiro Ozeki (2005), Amaranthin in feather cockscombs is synthesized via glucuronylation at the cyclo-DOPA glucoside step in the betacyanin biosynthetic pathway, *Journal of Plant Research*.
- Yaolin Wen, Md. Tofazzal Islam, and Satoshi Tahata. (2006), Phenolic constituents of *celosia cristata* L. susceptible to spinach root rot Pathogen *Aphanomyces cochlioides*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2567-2570.
- Ahn, D. K. (1988), *Illustrated book of korea medicinal herbs*. *Kyohak Publishing Co., Seoul, Korea*. p309.
- Takamasa Ohno, Inoue Makoto, Ogihara Yukio, and Saracoglu Iclal (2002), Atimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside, *Biol. Pharm. Bull.* **25**(5), 666-668.
- Begam M., S. Narwal, S. Roy, S. Kumar, M. L. Lodha, and H. C. Kapoor (2006), An antiviral protein having deoxyribonuclease and ribonuclease activity from leaves of the post-flowering stage of *Celosia cristata*, *Biochemical.* **1**, 44-48.
- Kim Jeung-Hoan, So-Jung Yoon, Kyoung-Hwan Lee, Hyo-Jung Kwon, Sung-Sook Chun, Tae-Wan Kim, and Young-Je Cho (2005) Screening of biological activities of the extracts from *Basil (Ocimum basilicum L.)*, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**(2), 173-177.
- Rhu, I. S. (2006), A study of dermal bioactive properties of the ethanol extract from flowers of *Lespedeza bicolor*, Ph. D. Dissertation, Dept. of Oriental medical, Wonkwang University, Seoul.
- Fantone J. C. and P. A. Ward (1982), Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Ann. J. Path.* **107**, 397.
- Scharffetter-Kochanek K. (1997), Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy, *ed. H. Sies*. **38**, 639.
- Andreadou I, F. Sigala, E. K. Iliodromitis, M. Papaefthimiou, C. Sigala, N. Aligiannis, P. Savvari, V. Gorgoulis, E. Papalabros, and D. Kremastinos (2007), Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**, 549-558.
- Perez G. R. M., S. R. Vargas, M. F. J. Martinez, and R. II. Cordova (2004), Antioxidant and free radical scavenging activities of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxy flavone from *Brickellia veronicaefolia*, *Phytotherapy research.* **18**, 428-430.
- Nomura K, H. Imai, T. Koumura, M. Arai, and Y. Nakagawa (1999), Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway, *The Journal of biological chemistry.* **274**, 29294-29302.
- Huang H. M., H. Zhang, H. C. Ou, H. L. Chen, G. E. Gibson (2004), Alpha-Keto-beta-methyl-n-valeric acid diminishes reactive oxygen species and alters endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores, *Free radical biology & medicine.* **37**, 1779-1789.
- Jacob C, G. E. Arteel, T. Kanda, L. Engman, and H. Sies (2000), Water-soluble organotellurium compounds : catalytic protection

- against peroxynitrite and release of zinc from metallothionein, *Chemical research in toxicology*, **13**, 3-9.
23. Kim Y. S., Y. K. Noh, G. I. Lee, and Y. K. Kim (1995), Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity, *Korea Journal of Pharmacology*, **26**, 265-272.
 24. Kim Seung Hun, Gae Won Nam, Byung Young Kang, Hae Kwang Lee, Seong Joon Moon, and Ih Seop Chang. (2005), The effect of kaempferol, quercetin on hyaluronan-synthesis stimulation in human keratinocytes (HaCaT), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **31**, 97-102.
 25. Choi, H. S. (1994), Peroxide and nutrition of lipids, *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **23**, 867-878.
 26. Lim, S. Y., J. Y. Lee, C. S. Lee, Y. J. Jang, J. W. Park, and S. Yoon (2007), Antioxidant and cell proliferation effects of *Acanthopanax senticosus* extract in human osteoblast-like MG-63 cell line, *Korean J. Food Sci. Technol.* **6**, 694-700.
 27. Choi, C. H., E. S. Song, J. S. Kim, and M. H. Kang (2003), Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 1216-1220.
 28. Jorge, A. P., H. Horst, E. D. Sousa, M. G. Pizzolatti, and F. R. M. B. Silva (2004), Insulinomimetic effects of kaempferitin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chem. Biol. Interaction* **149**, 89-96.
 29. Eliandra de Sousa, Leila Zanatta, Ilana Seifriz, Tania Beatriz creczynski-Pasa, Moacir Geraldo Pizzolatti, Bruno Szpoganicz, and Fatima Regina Mena Barreto Silva (2004), Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-(α -dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves, *J. Nat. Prod.* **67**, 829-832.
 30. Francis F. J. (1999), Anthocyanins and betalains, In *Colorants*. francis FJ, ed, Eagan Press, St, Paul, MN. pp55-66.
 31. Escribano J, M. A. Pedreno, C. F. Garcia, and R. Munoz (1998), Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. root, *Phytochem Anal.* **9**, 124-127.
 32. Kanner K., S. Harel, and R. Granit (2001), Betalains-A new class of dietary cationized antioxidants, *J. Agric Food Chem.* **49**, 5178-5185.
 33. Yizhong C, S. Mei, and C. Harold (2003), Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae, *J. Agric Food Chem.* **51**, 2288-2294.
 34. Lee, B. H., B. W. Choi, J. H. Chun, and B. S. Yu. (1996), Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds, *J. Korean Ind. & Eng. Chemistry* **7**(6), 1066-1077.
 35. KoguKuchi, N. (1999), Protocol for free radical experiment, *suiyoonsa, Japan.* 40-45.
 36. Cortran R. S., V. Kumar, and T. Collins (1999), Pathologic basis of disease, 6th ed., pp50-112, W. B. Saunders Company.
 37. Cho Y.J., M. S. Seo, J. K. Kim, Y. Lim, G. Chae, K. S. Ha, and K. H. Lee (1999), Silica-induced generation of reactive oxygen species in Rat2 fibroblast: role in activation of mitogen-activated protein kinase, *Biochemical and biophysical research communication.* **262**, 708-712.
 38. Kuo W. N., R. N. Kanadia, and V. P. Shanbhag (1999), Denitration of peroxynitrite-treated proteins by "protein nitrates" from dog prostate, *Biochemistry and molecular biology international.* **47**, 1061-1067.
 39. Si Chuan-Ling, Jin-Kyu Kim, Dong-Joo Kwon, and Young-Soo Bae (2006), Phenolic Compounds from the Fruits of *Paulownia coreana* Uyeki, *Mokchae Konghak.* **34**(1), 79-85.
 40. Gabriela Sepulveda-Jimenez, Patricia Rueda-Benitez, Helena Porta, and Mario Rocha-Sosa (2004), Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst, *Physiological and Molecular Plant Pathology.* **64**, 125-133.
 41. Moon, H. L., S. H. Lyu, J. H. Roh, and O. P. Zee (2000), Antioxidative compounds of *Achillea sibirica* Ledeb, *Kor. J. Med. Crop Sci.* **8**, 1-8.
 42. Meyer, K. (1947), The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase, *Physiol. Rev.* **27**, 335-359.
 43. Kakegawa, H., H. Matsumoto, and T. Satoh (1985), Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase, *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 642-646.
 44. Golberg, R. L., J. P. Huff, M. E. Lenz, P. Glickman, R. Katz, and E. J. M. A. Thonar. (1991), Elevated plasma levels of hyaluronate in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis, *Arth. Rheum.* **34**, 799-807.
 45. Ghosh, P. (1994), The role of hyaluronic acid(hyaluronan) in health and disease : interactions with cells, cartilage and components of synovial fluids, *Clin. Exp. Rheumatol.* **12**, 82-85.
 46. Kim S. H., G. W. Nam, B. Y. Kang, H. K. Lee, S. J. Moon, and I. S. Chang (2005), The effect of kaempferol, quercetin on hyaluronan synthesis stimulation in human keratinocytes (HaCaT), *J. Soc. Cosmet Scientists Korea.* **33**(1), 97-102.
 47. Kuppusamy U. R., H. E. Khoo, and N. P. Das (1990), Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase, *Biochemical Pharmacology.* **40**, 397-401.
 48. Wiedow O. J., M. Schroder, and E. Christophers (1990), Elafin : An elastase specific inhibition of human skin, *J. Biol. Chem.* **265**(25), 14791-14801.
 49. Mokawa G., Y. Takema, Y. Yorimoto, K. Tsukahara, M. Kawai, and S. Imayama (1995), Degree of ultraviolet-induced tortuosity of elastic fibers in rat skin is age dependent, *The Journal of investigative dermatology* **105**, 254-258.
 50. Yang Hee Jung, Bo Ryoung Won, Young Jin Lim, Sun Kyeong Yoon, Dong Hwan Ji, Jee Yeon Choi, Seung Joo Han, Chung Woo Lee, and Soo Nam Park (2007), Antioxidative Activity, Component Analysis, and Anti-elastase Effect of *Aspalathus linearis* Extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* **4**, 251-262.
 51. Lee S. Y., J. H. An, and H. Y. Cho (2003), Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* bunge in fibroblast cell line HS68 cells, *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechno.* **46**(1), 60-65.
 52. Lee K. K. and J. D. Choi (1986), Inactivation of spinach glycolate oxidase by arginine-specific reagent, *Kor. Biochem. J.* **119**(1), 86-92.
 53. Fleischmajor R., J. S. Perlish, and R. I. Bashey (1972), Human dermal glucosaminoglycans and aging, *Bio chem. Biophys. Acta,* **279**(2), 265.