

Effect of Saponin with Antioxidant Activity on Matrix Metalloproteinase in Human Dermal Fibroblasts

Hye-jung Park, Moon-Moo Kim and Dong-Hwan Lee*

Department of Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received July 4, 2011 / Revised July 27, 2011 / Accepted August 9, 2011

Saponin is a main component of ginseng widely known as an oriental traditional medicinal ingredient. A variety of biological effects of saponin has been reported, but its action related to skin regeneration has remained unclear so far. In this study, the effect of saponin on matrix metalloproteinase as well as its antioxidant effect in cell free system was examined in human dermal fibroblasts. First of all, as a result of investigating the effect of saponin on cell viability using MTT assay, it was shown to increase cell viability below 10 µg/ml, but it also showed cytotoxicity above 25 µg/ml. The antioxidant effect of saponin was exerted by inhibition of H₂O₂ in addition to reducing power above 1 µg/ml. In particular, saponin showed a protective effect on DNA oxidation. Furthermore, it was observed that saponin activates MMP-2 and increases MMP-1 activity in gelatin and casein zymography analyses, respectively, indicating that saponin could have potential a therapeutic agent for anti-aging and skin regeneration.

Key words : Saponin, skin regeneration, human dermal fibroblasts, ROS, matrix metalloproteinase

서 론

식물 사포닌은 배당체의 한 종류로 콩, 인삼, 홍삼, 도라지, 미나리, 양파, 마늘, 그 외 야생 식물 등 다양한 식물에서 다량 발견된다. 사포닌은 항산화 효능이 있는 것으로 알려져 있으며 항염증, 암세포의 증식 억제, 단백질 및 지질합성 촉진 등 다양한 생물학적 성질을 갖고 있다[16,19]. 예로부터 동양에서 상처나 여러 가지 병의 치료에 중요한 치료제로 사용되었으며, 지금까지도 사포닌이 풍부한 인삼 또는 홍삼 뿌리는 세계적으로도 널리 사용되고 있다[10].

나이가 들어감에 따라 활성산소에 의한 조직 손상이 증가하는데, 이는 효소의 활성을 상실 시키거나, DNA, RNA, 효소 및 세포막을 손상시키고, 결국 세포사를 일으켜 성인병이나 암 등의 여러 가지 질병과 병적 노화를 촉진시킨다[3,24]. 대부분의 활성 산소는 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등과 같은 항산화 효소에 의하여 생체내에서 제거되나, 남아 있는 활성산소는 β-carotene, tocopherol 등과 같은 항산화제에 의하여 제거된다[2,9]. 이러한 항산화제로 잘 알려져 있는 사포닌은 몸 안에서 DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6methyl-4H-pyran-4one) 라는 물질을 만들어 활성 산소와 반응하여 몸 안의 독성 산소 물질을 억제하여 세포의 산화를 막는다는 연구보고가 있다[7,29]. 뿐만 아니라 사포닌은 활성산소 억제효소인 nonprotein-SH, superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione (GSH) peroxidase 및

GSH reductase의 활성을 증가시킨다는 보고도 있다[1]. 활성 산소는 피부 노화를 일으키는 원인 중 하나로 자외선이 피부에 침투하여 유해한 활성산소를 생성하여 피부의 표피와 진피를 모두 변화시킨다[17]. 자외선에 의해 활성산소가 생성되면 진피층을 이루는 collagen이 분해되어 주름이 생기고 피부 노화가 진행되는데, 이를 광노화라고 한다. 노화가 진행 됨은 세포 재생과도 밀접한 관련이 있다. 활성산소에 의한 생체 구성 분자의 파괴, 섬유아세포의 사멸 등으로 인해 콜라겐 결핍이 생기면 노화가 진행 되는 것이다. 사포닌은 HDF와 같은 표피세포의 증식을 증가시키며, matrix metalloproteinases (MMPs)와 같은 기질 분해효소의 활성을 높인다[8]. MMPs는 기저막(besement membrane, BM)의 중요한 구성 성분 및 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 주요 단백질 구성요소들을 분해시킬 수 있어서 상처수복과 재생 및 세포의 침윤, 만성염증, 신 혈관생성, 암전이에 중요한 역할을 한다[5,25]. MMPs는 현재 약 20여 종류가 밝혀져 있으며 활성화된 MMPs는 단백질분해 억제제인 tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)와 복합체를 형성함으로써 활성이 조절된다 [27]. 이전의 연구 보고에 따르면 사포닌이 다량 함유된 홍삼 추출액은 혈관 내피 세포 성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)의 활성을 증가시켜 세포재생을 촉진 시키는 것으로 알려져 있다[28]. 따라서 saponin은 MMPs의 활성을 증가시켜 상처 부위의 재편성과 재형성 그리고 신 혈관 생성을 증가시키고 세포의 증식과 분화를 촉진하여 상처치유에 큰 효과가 있을 것으로 기대되어 진다. 따라서 본 연구에서는 사포닌의 항산화 효과와 및 사람 피부 섬유아세포(Human dermal fibroblasts, HDF)에서 MMPs의 활성 및

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1514, Fax : +82-51-890-2620

E-mail : dhlee@deu.ac.kr

발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 제조

세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin / streptomycin / amphotericin (각각 10,000 U/ml, 10,000 µg/ml 및 2,500 µg/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, Scotland)로 부터 구입하였다. HDF 세포는 ㈜ LG 생활건강 기술원으로부터 제공받았다. 사포닌 (Sigma 84510), MTT reagent, gelatin, agarose와 spermidine 기타시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

DPPH radical assay

Brand-Williams [14] 실험방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 사포닌의 소거능력을 측정하였다. 시험농도의 사포닌을 DPPH 용액을 가하여 10 sec 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20 min 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 시료 첨 가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

Hydroxyl radical assay

Chung 등 [30]의 실험방법을 변형하여 hydroxyl radical을 측정하였다. 50 µl의 10 mM FeSO₄와 50 µl의 10 mM H₂O₂를 이용한 Fenton 반응으로 hydroxyl radical를 발생시켰다. 발생된 radical을 25 µl의 10 mM EDTA, 25 µl의 10 mM 2-deoxyribose, 150 µl의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)의 존재 하에서 시험농도의 사포닌과 반응시킨 다음 37°C에서 4 hr 동안 반응시켰다. 여기에 250 µl의 2.8% TCA (trichloroacetic acid) 및 250 µl의 1% TBA (thiobabutaric acid)를 첨가한 후에 100°C로 가열하였다. 그 후 상온에서 식힌 다음 1,000× g에서 5 min 동안 원심분리하였다. 회수한 상등액은 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 사포닌의 항산화 활성은 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 % 값으로 환산하였다.

Hydrogen peroxide scavenging assay

Choi 등[6]의 실험방법을 변형하여 Hydrogen peroxide에 대한 소거활성을 측정하였다. 80 µl의 사포닌, 20 µl의 10 mM hydrogen peroxide 및 100 µl의 0.01 M 인산완충용액(pH5.0)을 37°C에서 5 min 동안 반응시켰다. 그 후, 15 µl의 1.25 mM ABTS 및 30 µl의 peroxidase 37°C에서 10 min 동안 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 사포닌의 항산화 활성은 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 % 값으로 환산하였다.

환원력 assay

Oyaizu [23]의 방법에 따라 측정하였다. 시료 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 수욕상에서 20 min 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA (trichloroacetic acid) 용액을 1 ml 가하여 13,500× g에서 15 min 동안 원심분리하여 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ml을 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환원력은 시료첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하였다.

세포배양

Human dermal fibroblast (HDF) 세포는 5% CO₂ 및 37°C에서 95% 이상의 습도를 유지한 배양기에서 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 100 µg/ml penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다.

MTT assay

Hansen [11]의 방법에 따라 HDF세포에 대한 사포닌의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

Hydroxyl radical에 의한 DNA 손상을 전기영동법으로 분석

Genomic DNA는 약간 변형된 표준 과정에 따라 HDF 세포로부터 추출 하였다[20]. Fenton반응에 의하여 발생된 hydroxyl radical에 노출된 DNA 산화 는 기존에 실험된 방법에 따라 수행되었다 [23]. 먼저 100 µl의 DNA 용액에 시험농도의 사포닌, 200 µM FeSO₄, 1 mM H₂O₂ 및 50 µg/ml genomic DNA를 첨 가하였다. 반응 혼합물을 30 min 동안 상온에서 반응시킨 후 10 mM EDTA를 첨가하여 반응을 종결시킨다. 1 µg의 DNA를 포함하는 20 µl의 반응혼합물을 1% agarose gel에서 100 V로 30 min 동안 전기영동 하였다. Gel은 1 mg/ml ethidium bromide로 염색하여 물로 세척하여 UV로 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

Gelatin zymography

MMP-2 활성은 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지에서 배양한 HDF 세포에 사포닌을 처리한 후에 이전에 기술된 방법에 따라 실험을 수행하였다[15]. 50 µg의 총단백질을 함유하는 세포배양액을 1.5 mg/ml gelatin을 포함하는 비환원조건의 10% polyacrylamide gels를 이용하여 전기영동하였다. Gelatin이 분해된 bands는 청색배경에 투명한 bands로 나타난다. Bands의 진하기는 MMPs의 활성에 비례하여 나타나는데 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 관찰한 후 촬영하였다.

Casein zymography

MMP-1 활성은 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지에서 배양한 HDF 세포에 사포닌을 처리한 후에 이전에 기술된 방법을 변형하여 실험을 수행하였다[15]. 50 µg의 총단백질을 함유하는 세포배양액을 1.5 mg/ml casein을 포함하는 비환원조건의 10% polyacrylamide gels를 이용하여 전기영동하였다. Casein이 분해된 bands는 청색배경에 투명한 bands로 나타난다. Bands의 진하기는 MMPs의 활성에 비례하여 나타나는데 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 관찰한 후 촬영하였다.

Western blot analysis

HDF 세포에 용출 완충용액(50 mM Tris - HCl, pH 7.5, 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 80 µg/ml leupeptin, 3 mM NaF and 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30 min 동안 처리하였다. 10 µg의 세포용출액을 10% Tris - HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에 전 처리하고 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-Nrf2, anti-SOD-1, anti-SOD-2, anti-SOD-3, anti-beta-actin)를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

RT-PCR analysis

실험에 사용된 RNA는 사포닌을 전처리 한 HDF 세포로부터 추출하였다. 추출을 위해 세포는 Trizol®로 분해시키고 25°C, 12,000× g에서 15분 동안 원심분리 한 뒤 chloroform을 첨가하였다. Isopropanol은 상등액에 1:1 비율로 첨가되었고 RNA pellet은 원심분리에 의해 얻어졌다. Ethanol로 씻어낸 뒤, 추출된 RNA는 diethyl pyrocarbonate - treated RNase - free waster에 녹이고 GENios® microplate reader (Tecan Austria BmbH)를 이용하여 260 nm에서 정량하였다. 같은 양의 RNA (1 µg)는 42°C에서 1X reverse transcriptase (RT) buffer, 1 mm dNTPs, 500 ng of oligo (dT) 15 primers, 140 U of murine Moloney leukaemia virus (MMLV) reverse transcriptase 그리고 40 U of RNase inhibitor를 포함하는 master-mix에 45분 동안 방치함으로써 역전사 되었다. PCR은 MMP-1, MMP-2 그리고 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) mRNA를 증폭시키기 위해 automatic Whatman thermocycler (Bionmetra, Kent, UK)를 사용하여 수행되었다. 원하는 cDNA를 증폭시키기 위해 사용된 프라이머 시퀀스는 다음을 따른다. MMP-1 (forward primer: 5-ATGCTGAAACCCTGAAGGTG-3, reverse primer: 5-

CTGCT TGACCCTCAGAGACC-3), MMP-2 (forward primer: 5'- TGCTGAAGGA CACACTAAAGAAGA-3', reverse primer: 5'-TTGCCATCCTTCTCAA AG TTGTAGG-3'), G3PDH (forward primer: 5'-TGAAGGTCGGTGTG AAC GGATTGGC-3' reverse primer: 5'-CATGTAGGCCAT GAGG ATCCA CCAC-3) PCR 생성물을 2% agarose gel에 전기영동 시킨뒤 ethidium bromide로 염색하였으며, AlphaEase® gel image- analysis software (alpha Inotech, San Leandro, CA, USA)를 사용하여 정량하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 농도군에 대한 유의차 검정은 대조군과 비교하여 Student's test 한 후 $p < 0.05$ 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

사포닌의 세포 증식 효과

사포닌의 사람 섬유아세포에 독성을 미치지 않는 농도를 결정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 사포닌은 대조군과 비교하여 10 µg/ml 이하의 농도에서 19.8%의 세포생존력이 증가되는 것으로 판정되었다. 그 이상의 농도에서는 급격히 생존율이 저하되는 경향을 보였다. 따라서 사포닌은 10 µg/ml 이하의 범위에서는 세포독성이 없는 것으로 판단되어 이 농도 이하에서 지속적인 실험을 수행하였다.

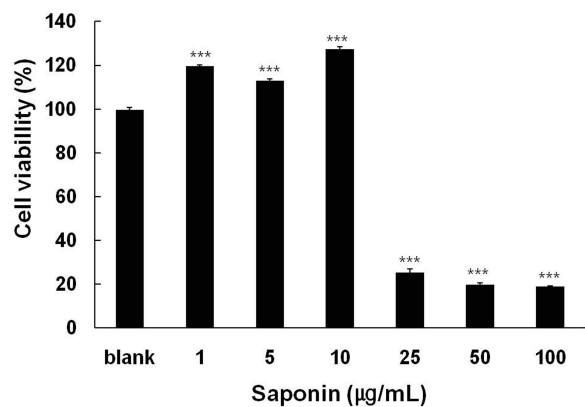


Fig. 1. Effect of saponins on viability of human dermal fibroblasts. HDF cells were treated with saponin at the indicated concentration and cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (***, $p < 0.001$) using Student's *t* test.

Cell free systems에서 DPPH, hydrogen peroxide 및 lipid peroxidation에 대한 사포닌의 항산화 효능 및 환원력

생체에서 산화적 스트레스와 관련되어 있는 DPPH, hydroxyl radical, hydrogen peroxide와 같은 활성산소종에 대한 사포닌의 소거능력 및 환원력에 대하여 조사하였다. DPPH radical 소거법은 DPPH radical이 항산화 물질로 인해 환원되면, 자색이 탈색되는 정도를 지표로 하여 지질과산화의 초기 억제 정도를 예측 할 수 있다. 사포닌의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정한 결과 Fig. 2A에서 보는 바와 같이, DPPH에 대하여 사포닌의 소거효과가 없는 것으로 나타났다. 양성 대조군은 vitamin C는 100 µg/ml를 사용하였는데 80%의 소거효과를 나타내었다. 그 다음 사포닌의 H₂O₂ 소거능을 확인 하기 위하여 Hydrogen peroxide scavenging assay를 수행 하였다. 양성 대조군은 100 µg/ml의 vitamin C를 사용하였다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 사포닌은 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml로 처리하여 농도 의존적으로 소거능이 증가함을 확인 할 수 있었다. 사포닌의 환원력 측정에는 potassium ferricyanide reduction법을 사용하여 사포닌의 금속이온을 환원시키는 환원력을 조사하기 위하여 흡광도를 측정한다

결과, vitamin C는 0.01 µg/ml의 농도에서 대조군에 비교하여 448%의 환원력을 나타냈으며, 사포닌은 1 µg/ml 이상의 농도에서 환원력이 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 2C). 사포닌은 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각각의 환원력은 265%, 269%, 274%, 290%, 316%로 나타나 그 효과가 우수한 것으로 나타났다. 마지막으로 지질 과산화에 대한 사포닌에 의한 항산화 효과를 조사하기 위하여 linolenic acid를 Fenton반응으로 발생시킨 hydroxyl radical에 노출시켰다. 먼저 hydroxyl radical에 의한 지질 과산화 확인을 위하여 기존에 알려진 친유성 항산화제인 100 µg/ml의 vitamin E의 지질 과산화에 대한 억제효능을 평가한 결과, Fig. 2에서 보여지는 바와 같이 38%의 지질과산화 억제효과가 관찰되었다. 사포닌은 농도 의존적인 효과는 보여주지 않았으나 1 µg/ml 이상의 농도에서 유의성 있는 지질과산화 억제효과를 관찰 할 수 있었다.

사포닌의 hydroxyl radical에 의한 DNA 손상에 대한 항산화 효과

Fenton reaction에 의해 생성되는 hydroxyl radical에 ge-

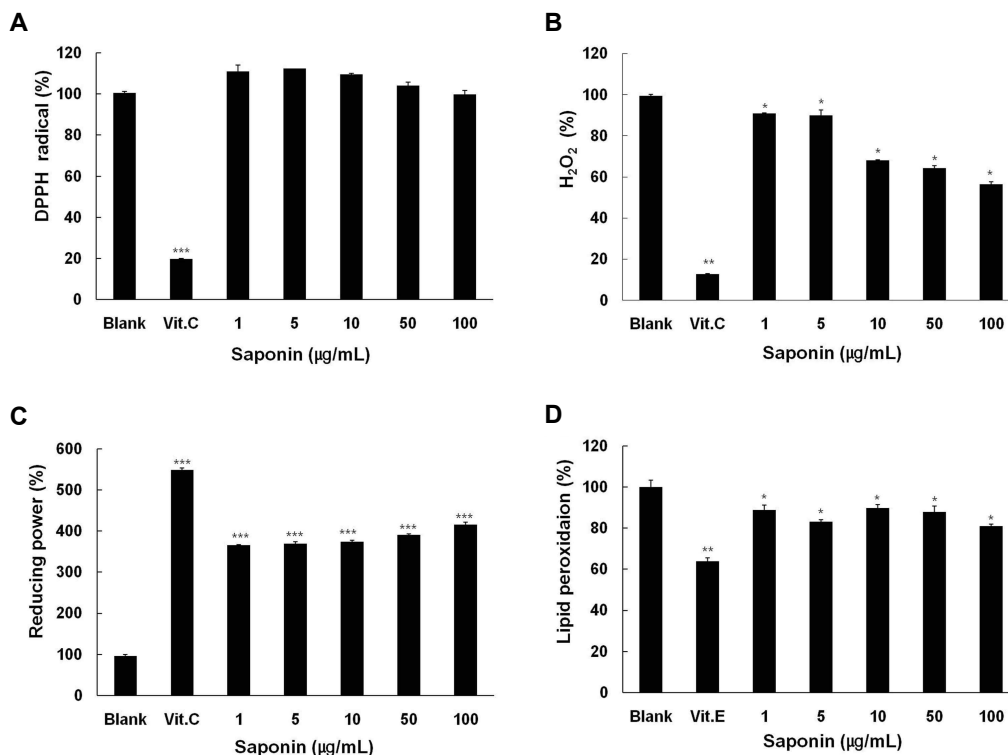


Fig. 2. Scavenging activities of saponin on DPPH radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, reducing power and lipid peroxidation. (A) hydrogen peroxide, (B) hydroxyl radical by Fenton reaction, (C) reducing power, and (D) lipid peroxidation were evaluated in the presence of saponin. After saponin at the indicated concentration was reacted with each radical, the optical density of each reaction mixture was measured at a specific wavelength with spectrophotometer. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) using Student's *t* test.

nomical DNA가 노출되면 분해가 일어난다. 사포닌의 DNA 손상에 대한 항산화 효과를 조사하기 위하여 사람 섬유아세포로부터 genomic DNA를 분리하여 Fenton reaction에 의하여 생성된 hydroxyl radical에 노출시켰다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, Fenton reaction 군과 비교 시 100 µg/ml의 사포닌의 농도에서 DNA 분해가 억제되어, 사포닌이 이 농도에서 hydroxyl radical에 의한 DNA의 손상을 유의성 있게 감소시킴을 확인할 수 있었다.

PMA로 자극된 사람 섬유아세포에서 사포닌의 MMP-1 활성에 대한 효과

MMP-1은 피부세포의 결합조직을 구성하는 성분들 가운데 콜라겐을 특이적으로 분해하는 단백질 분해효소로서 상처치료의 단계 중 기질 재형성에 필수적인 요소이다. 사포닌의 MMP-1 활성 조절 효과를 알아 보기 위하여 사람 섬유아세포에 사포닌을 처리 한 후 PMA로 자극하여 72시간 동안 배양 후 상등액을 이용하여 casein zymography를 수행하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, 사포닌은 농도에 비례하여 MMP-1의 활성이 뚜렷하게 증가시키는 것으로 확인되어, 상처치료에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 나타내었다.

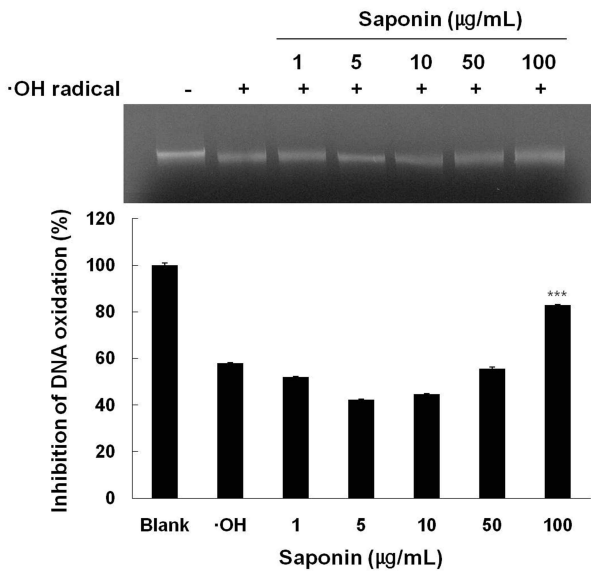


Fig. 3. Protective effect of saponin on DNA oxidative damage induced by hydroxyl radical. Genomic DNA purified from human dermal fibroblasts were pre-treated with saponin for 1 hr exposed to •OH using Fenton reaction. After 30 min, reaction mixture containing about 1 µg of DNA was electrophoresed on a 1% agarose gel for 30 min at 100 V and visualized by UV light after stained with 1 mg/ml ethidium bromide. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (***, $p < 0.001$) using Student's *t* test.

PMA로 자극된 사람 섬유아세포에서 사포닌의 MMP-2 활성 조절 효과

Gelatin과 fibronectin 같은 세포의 기질을 분해한다고 알려져 있는 MMP-2는 형태형성 및 상처치유와 같은 생리적인 과정에 필수적인 요소임으로, 사포닌의 MMP-2 활성 조절에 미치는 영향을 조사하기 위하여 gelatin zymography를 수행하였다. Fig. 5A에서는 사람 섬유아세포에 사포닌을 처리 한 후 72시간 동안 배양 한 상등액에서 MMP-2의 활성을 측정하였고 Fig. 5B에서는 사포닌을 처리 한 후 PMA로 자극하여 72시간 동안 배양 한 상등액을 이용하였다. Fig. 5A에서 보는 바와 같이, MMP-1에서의 결과와 마찬가지로 사포닌은 농도의존적으로 MMP-2의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. Fig. 5B에서는 사포닌이 5 µg/ml 이상의 농도에서 MMP-2의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

HDF 세포에서 MMP-1, MMP-2, p-Erk 단백질의 발현에 대한 사포닌의 효과

사포닌이 세포외기질을 분해하는데 가장 중요한 기질분해 단백질인 MMPs의 단백질 발현을 어떻게 조절하는지 조사하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, 사포닌은 5 µg/ml의 농도 처리군에서 PMA 처리군과 비교 시 MMP-1과 MMP-2의 발현은 억제되는 것으로 나타났다. MMPs의 발현을 조절한다고

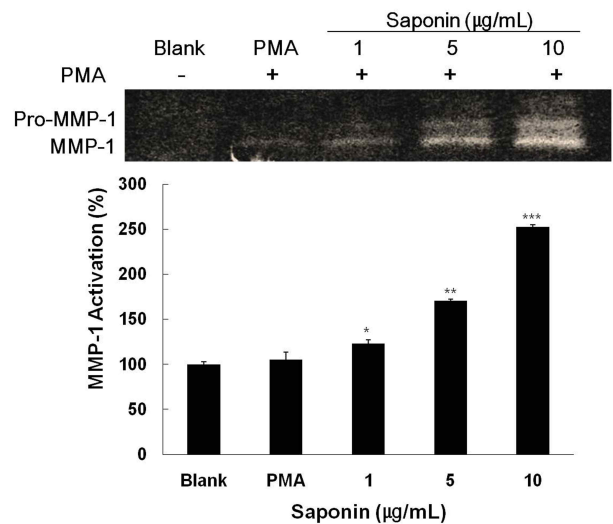


Fig. 4. Effect of saponin on activities of MMP-1 in human dermal fibroblasts stimulated with PMA. The cells stimulated with PMA to induce MMPs expression were treated with saponin at 1, 5 and 10 µg/ml under serum-free conditions for 72 hr. MMP-1 activity in conditioned media was determined by gelatin zymography. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), using Student's *t* test.

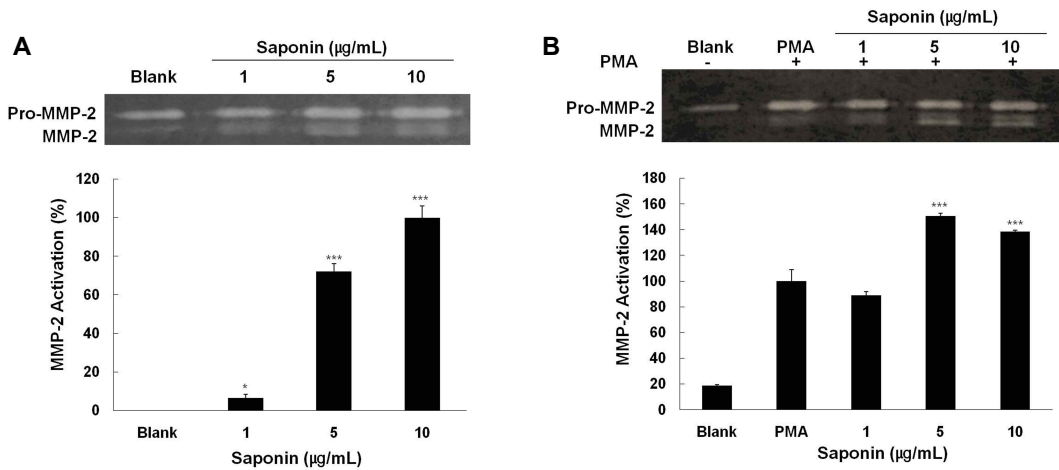


Fig. 5. Effect of saponin on activities of MMP-2 in human dermal fibroblasts treated with/without PMA. The effect of saponin on activities of MMP-2 without PMA (A) with PMA (B) was evaluated in HDF. The cells stimulated with PMA to induce MMPs expression were treated with saponin At 1,5 and 10 µg/ml under serum-free conditions for 72 hr. MMP-2 activities in conditioned media were derermined by gelatin zymography. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$) using Student's *t* test.

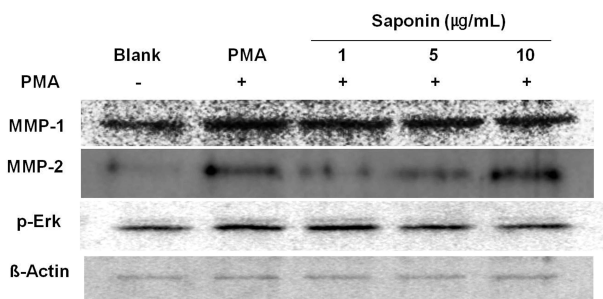


Fig. 6. Effect of saponin on protein expressions of MMP-1, MMP-2 and p-Erk in human dermal fibroblasts. The cells were treated with saponin at 1, 5 and 10 µg/ml prior to stimulation of cells with PMA at 1 ng/ml. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated.

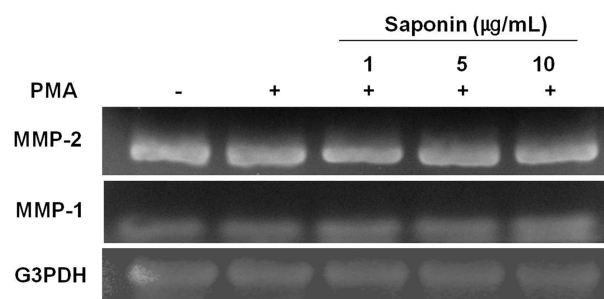


Fig. 7. Analyses of gene expression of MMP-1 and MMP-2 in HDF cells treated with saponin. Cells were stimulated with PMA and their gene expressions were analyzed using RT-PCR. Respective G3PDH mRNA expression levels were used to confirm the equal amounts of RNA used for cDNA synthesis.

알려진 p-Erk의 발현도 사포닌에 의하여 억제되는 것으로 관찰되어, 사포닌은 Erk의 활성을 억제하여 MMP-1과 MMP-2의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

HDF 세포에서 MMP-1 그리고 MMP-2 유전자 발현에 대한 사포닌의 효과

사포닌의 MMP-1과 MMP-2의 유전자적 발현 효과는 mRNA 수준에서 RT-PCR을 수행하여 연구되었다. 사포닌으로 전 처리된 HDF에 PMA로 자극하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 HDF 세포에서 MMP-1과 MMP-2의 mRNA 발현 정도는 농도와 관계없이 일정한 것으로 관찰되어, 사포닌은 MMP-1과 MMP-2의 유전자적 발현에 미치는 영향은 없는 것으로 나타났다.

고 찰

여러 가지 요인들에 의해 체내에 생성된 유해 활성산소종은 다양한 질병과 병적 노화 등과 매우 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다[3,24]. 광노화로 알려진 자외선에 의한 피부 노화 현상 역시 자외선에 의해 유해한 활성산소가 피부 세포 내에서 생성되어 조직을 파괴하기 때문에 일어나는 현상이다[17]. 피부 세포 내에서 생성된 활성산소는 효소나 단백질과 같이 복잡한 분자구조를 갖는 고분자와 가교결합을 이룸으로써 그 기능을 저하시키고, 피부의 중요 구성성분인 콜라겐과 결합조직, DNA 등을 파괴함으로써 표피와 진피를 모두 변형 시킨다. 사포닌의 유해 활성산소종 소거능력을 측정하여 본 결과, 사포닌은 과산화수소 소거 능력을 나타내었다. Superoxides와

SODs (Superoxide dismutases)의 불균등화 촉매반응에 의하여 발생된 과산화수소는 산소결합이 깨지면서 hydroxyl radical을 생성하여 주변 조직 또는 DNA 등을 산화시킨다[4,26]. 생성된 과산화수소는 체내 제거 기전인 catalase 또는 glutathione (GSH)에 의하여 물과 산소로 분해되면서 소거된다. 즉 사포닌은 Superoxide와 같은 유해 활성산소 소거의 중간 산물인 과산화수소를 소거함으로써 항산화 방어기작을 나타낸다. 또한 사포닌은 유해 활성산소종의 산화작용을 억제하는 환원력이 우수한 것으로 나타났다. 이것은 활성산소 소거능력이 환원 능력과 연관성이 있음을 보여준다. 뿐만 아니라 사포닌은 DNA의 산화적 손상에 대한 보호 효과 역시 탁월했다. 이것은 사포닌의 과산화수소 소거 효과와도 일치한다. 과산화수소는 Superoxide와 Singlet oxygen와 함께 DNA의 가지 절단에 있어 중심 역할을 하기 때문이다. 따라서 사포닌은 과산화수소를 유의성 있게 소거함으로써 DNA의 산화를 막아 여러 가지 질병과 암으로부터 보호효과를 나타낸다. 반면 기질 단백질 분해 효소인 Matrix metalloproteinase (MMPs)는 유해 활성산소와 달리 세포외기질(ECM), 기저막(BM)의 중요한 구성요소인 콜라겐과 같은 결합조직을 특이적으로 분해함으로써 세포의 이동, 상처치유, 조직 재생 등과 같이 세포의 분리가 요구되는 생리적 과정에서 필수적인 요소로써 작용한다 [5,12,25]. 하지만 종양, 암 세포에서 MMPs가 자체적으로 분비되거나 숙주세포에서의 분비를 유도하는 경우에는 MMPs가 세포간 분리를 일으켜 주변 조직으로 종양, 암 세포의 침윤과 전이를 돕는다[26]. 최근의 연구 결과에 따르면, 사포닌은 섬유아육종세포인 HT-1080에서 암의 전이와 침윤에 필수적인 MMP-2와 MMP-9의 활성과 발현을 억제함으로써 항암효과를 갖는다는 연구결과가 보고되었다[15]. 본 연구에서 섬유아세포에 사포닌이 처리된 경우에는 MMP-1과 MMP-2의 활성이 증가되고, 단백질 발현이 감소되고 유전자 발현에는 영향이 없다는 것을 확인하였다. 즉, 사포닌이 정상 피부세포에서는 MMP-1과 MMP-2의 활성을 증가 시킴으로써 세포 재생을 촉진 시키고, 비정상적인 섬유아육종세포에서는 MMP-2와 MMP-9의 활성과 발현을 억제시킴으로써 선택적으로 MMPs의 활성을 조절 한다고 판단된다. 이는 예로부터 동양에서 사용되어 오는 상처 치료제에 사포닌이 주요 성분으로 포함됨을 잘 설명해 주는 것으로 실제로 사포닌의 세포생존력을 측정할 결과 섬유아세포의 생존력을 증가시켜 세포를 재생시킴을 확인 하였다. 이것은 사포닌의 정상 피부세포에서 MMP의 활성 증가 효과와도 잘 일치하는 결과이다. 사포닌이 정상 피부세포에서 MMPs의 분비와 활성을 촉진시킴으로써 상처 치유의 중요 단계인 세포 증식과 조직 재형성에 있어 큰 효과를 나타내 조직 재생을 증가시키는 것으로 사료된다. 사포닌이 피부 재생에 있어 필수요소인 혈관 내피세포 증식인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)의 활성을 증가시킨다는 연구보고 역시 우리의 결과와 일치하였다[28]. VEGF는 혈관형성에 있어 핵심적 인자로, Keratinocytes 세포를 자극하여

MMP-2의 분비를 증가시켜 세포의 재생을 돕는다[13,22]. 이러한 이전의 연구결과와 본 연구에서 사포닌이 MMP-2와 MMP-1의 활성을 증가시켜 세포의 재생을 돕는 연구결과와 일치한다[18]. 따라서 사포닌의 피부세포 증식 효과, 과산화수소 소거에 따른 항산화 효과, DNA의 산화적 손상으로부터의 보호 효과 그리고 MMPs의 단백질 발현을 억제시키나 피부세포에서 특이적으로 MMPs의 활성을 증가시키는 효과로 미루어 보아 사포닌이 상처치료제 및 항노화제의 주성분으로서 잠재적인 가능성이 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2011학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(2011AA095).

References

1. Ali, M. B., K. W. Yu, E. J. Hahn, and K. Y. Paek. 2005. Differential responses of anti-oxidants enzymes, lip-oxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain Panax ginseng CA Mayer and Panax quinquefolium L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. *Plant Sci.* **169**, 83-92.
2. Alscher, R., N. Erturk, and L. Heath. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **53**, 1331-1341.
3. Bandyopadhyay, U., D. Das, and R. Banerjee. 1999. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci.* **77**, 658-666.
4. Beckman, K. B. and B. N. Ames. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547-581.
5. Bogenrieder, T. and M. Herlyn. 2003. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**, 6524-6536.
6. Choi, C. W., S. C. Kim, S. S. Hwang, B. K. Choi, H. J. Ahn, M. Y. Lee, S. H. Park, and S. K. Kim. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* **163**, 1161-1168.
7. Cho, S. J., H. J. Baik., S. S. Lee, I. M. Chung, J. H. Ha, J. S. Kang, H. C. Koh, I. C. Shin, and C. H. Lee. 2000. Studies on the ROS (Reactive Oxygen Species)-scavenging activities of DDMP saponin isolated from glycine mac (L.) Merrill. *J. Appl. Pharmacol.* **8**, 32-37.
8. Choi, S. 2002. Epidermis proliferative effect of the Panax ginseng ginsenoside Rb 2. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 71-76.
9. Fath, A., P. Bethke, and R. Jones. 2001. Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiol.* **126**, 156-166.
10. Fukuda, N., H. Tanaka, and Y. Shoyama. 2000. Isolation of the pharmacologically active saponin ginsenoside Rb1 from ginseng by immunoaffinity column chromatography. *J. Nat. Prod.* **63**, 283-285.

11. Hansen, M. B., S. E. Nielsen, and K. Berg. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210.
12. Hofmann, U. B., J. R. Westphal, G. N. P. van Muijen, and D. J. Ruiter. 2000. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 337-344.
13. Hollborn, M., C. Stathopoulos, A. Steffen, P. Wiedemann, L. Kohen, and A. Bringmann. 2007. Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* **48**, 4360-4367.
14. Imai, J., N. Ide, S. Nagae, T. Moriguchi, H. Matsuura, and Y. Itakura. 1994. Antioxidant and Radical Scavenging Effects of Aged Garlic Extract and its Constituents. *Planta Med.* **60**, 417-417.
15. Kang, J. H., I. H. Han, M. K. Sung, H. Yoo, Y. G. Kim, J. S. Kim, T. Kawada, and R. Yu. 2008. Soybean saponin inhibits tumor cell metastasis by modulating expressions of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2. *Cancer Lett.* **261**, 84-92.
16. Kang, J., M. Sung, T. Kawada, H. Yoo, Y. Kim, J. Kim, and R. Yu. 2005. Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cancer Lett.* **230**, 219-227.
17. Kang, S., S. Cho, J. Chung, C. Hammerberg, G. Fisher, and J. Voorhees. 2005. Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor- κ B and activator protein-1 in inflammatory acne lesions *in vivo*. *Am J. Pathol.* **166**, 1691-1699.
18. Kim, H. G., I. S. Oh, S. S. So, and C. W. Park. 2001. Effect of VEGF on the secretion of MMP-2 and plasmin from human Keratinocytes cells. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 237-240.
19. Lee, K., S. Hwang, J. Choi, and H. Jeong. 2008. Saponins derived from the roots of *Platycodon grandiflorum* inhibit HT-1080 cell invasion and MMPs activities: Regulation of NF- κ B activation via ROS signal pathway. *Cancer Lett.* **268**, 233-243.
20. Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
21. Milne, L., P. Nicotera, S. Orrenius, and M. Burkitt. 1993. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 102-109.
22. Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* **13**, 9-22.
23. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**, 307-315.
24. Simon, H., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **5**, 415-418.
25. Sounni, N., M. Janssen, J. Foidart, and A. Noel. 2003. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol.* **22**, 55-61.
26. Stadtman, E. and C. Oliver. 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* **266**, 2005-2008.
27. Vihinen, P. and V. Kahari. 2002. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer* **99**, 157-166.
28. Wang, C., D. Shi, and H. Yin. 2007. Effect of panax quinquefolius saponin on angiogenesis and expressions of VEGF and bFGF in myocardium of rats with acute myocardial infarction]. *Zhongguo Zhong Yi Yan Jiu Yuan Zhu Ban.* **27**, 331-334.
29. Yoshiki, Y. and K. Okubo. 1995. Active oxygen scavenging activity of DDMP (2, 3-dihydro-2, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) saponin in soybean seed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1556-1557.
30. Zhao, H. and H. Yang. 2008. Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Sci. Hortic.* **116**, 442-447.

초록 : 항산화 효능을 가진 사포닌이 사람섬유아세포에서 기질 금속 단백질 분해효소에 미치는 영향

박혜정 · 김문무 · 이동환*

(동의대학교 화학과)

사포닌은 동양의 전통적인 약재로 널리 알려진 인삼의 주요한 성분이다. 사포닌의 다양한 생물학적 효능이 밝혀져 있으나, 피부재생과 관련된 효능은 현재까지도 명백하지 않다. 본 연구에서는 세포의 시스템에서 사포닌의 항산화 효과 뿐만 아니라 사람 진피 섬유아세포에서 기질금속단백질 분해효소(MMP)에 대한 효능이 조사되었다. 먼저 MTT assay를 이용한 세포생존력에 대한 사포닌의 효능을 조사한 결과, 10 μ g/ml 이하의 농도에서 사포닌은 세포생존력을 증가시켰으나 25 μ g/ml 이상의 농도에서는 세포독성을 나타내었다. 항산화에 대한 사포닌 효능을 조사한 결과, 1 μ g/ml 이상의 농도에서 사포닌은 환원력 뿐만 H_2O_2 에 대한 억제 효능을 보여주었다. 특히, DNA 산화에 대한 보호 효과도 나타내었다. 더욱이 gelatin 및 casein zymography 시험결과, 사포닌은 MMP-2를 활성화시키고 MMP-1의 활성을 증가시키는 것으로 보아, 항노화 및 피부재생 약효제로 잠재적인 가능성이 기대된다.