

금전초 추출물의 케라티노사이트 내 collagen 합성능 및 MMPs 억제효과

김주은^{1*} · 최윤식^{2,3} · 김혜경² · 장영아^{3,†}

¹대구한의대학교 화장품약리학과

²경성대학교 약학대학 약학과

³경성대학교 스마트헬스케어융복합연구센터

(2020년 8월 4일 접수: 2020년 8월 20일 수정: 2020년 8월 25일 채택)

Collagen synthesis ability and inhibitory effect of MMPs in keratinocytes of *Lysimachia christinae* Hance Extract

Ju-Eun Kim^{1*} · Yun-Sik Choi^{2,3} · Hye Kyung Kim² · Young-Ah Jang^{3,†}

¹Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan, 38578, Korea

²College of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan, 48434, Korea

³Convergence Research Center for Smart Healthcare, R&DB Foundation of
Kyungsoong University, Busan, 48434, Korea

(Received August 4, 2020; Revised August 20, 2020; Accepted August 25, 2020)

요약 : 본 연구에서는 기능성 화장품의 소재로서의 금전초(*Lysimachia christinae* Hance)의 항산화와 항주름 효과를 조사하였다. 최근 천연물의 주름 개선 개발의 연구가 지속적인 관심을 받고 있어 본 연구를 통해 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성과 pro-collagen 합성 및 MMPs의 연관성에 대해 알아보았다. 금전초는 70% 에탄올(LcHE)과 열수(LcHW)로 각각 추출하여 실험을 진행하였다. HaCaT cells에서 LcHE가 LcHW보다 ROS 저해효능이 더 우수하고 세포독성 결과 250 µg/mL 농도까지 독성을 보이지 않아 LcHE를 선택하여 주름 개선 소재연구를 진행하였다. pro-collagen 합성실험을 통하여 UVB에 의해 감소된 type-1 pro-collagen의 합성 활성을 유의미하게 확인하였다. Western blot 실험을 통하여 피부세포에서 UVB에 의해 유도된 MMPs 중 MMP-1 -3 -9의 증가를 억제함을 확인하였으며, Real time PCR을 통하여 상위단계인 mRNA levels에서도 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9의 mRNA levels가 농도 의존적으로 유의미한 감소를 보여 추출물의 효능을 확인하였다. 위의 실험결과에 따라 UVB에 의한 주름생성과 피부 광노화를 효과적으로 예방할 수 있는 화장품의 천연소재로서의 이용이 기대된다.

주제어 : 항노화, 금전초, 기질금속단백질분해효소 (MMPs), 프로콜라겐, 활성산소(ROS)

†Corresponding author
(E-mail: yaviol@nate.com)

Abstract: This study was conducted to investigate the anti-oxidant and anti-winkle efficacy as cosmetics ingredient of *Lysimachia christinae* Hance. Recently, the study of wrinkle improvement of natural products has received continuous interest, so we looked at relationship between reactive oxygen species (ROS) generation and pro-collagen synthesis and matrix metalloproteinases (MMPs) through this study. *L. christinae* Hance were extracted with 70% ethanol (LcHE) and distilled water (LcHW), respectively, and the experiment was conducted. LcHE had better ROS inhibition effect than LcHW and showed no toxicity up to 250 $\mu\text{g/mL}$ concentration as a result of MTT assay in HaCaT cells, so we selected LcHE and conducted the wrinkle improvement material study. We confirmed that the synthesis of type-1 pro-collagen reduced by UVB is activated through pro-collagen synthesis assay. we confirmed that LcHE inhibited the increase in MMP-1 -3 -9 of MMPs induced by UVB in skin cells through western blot and we also performed real-time PCR to confirm the effect of the extract with dependence of concentration at mRNA levels. Therefore, it is expected that *Lysimachia christinae* Hance is used as a natural material for cosmetics that can effectively prevent wrinkles and skin aging by UVB.

Keywords : Anti-aging, *Lysimachia christinae* Hance, matrix metalloproteinases (MMPs), pro-collagen, Reactive Oxygen Species (ROS)

1. 서론

현대 의학과 과학의 발달로 전 세계의 평균 수명은 계속 증가하고 있으며 건강하고 아름다운 피부를 오랫동안 유지하기 위해 현대인들의 피부 미용에 관한 관심은 계속적으로 증가하고 있다. 이에 따라 화장품 산업에서는 피부 노화 방지와 관련하여 항산화와 항주름 효과에 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다[1]. 노화는 여러 가지 요인들에 의해 일어나며 다음과 같이 2가지의 형태로 분류할 수 있다. 세월이 흐름에 따라 자연스럽게 일어나는 내인성 노화와 자외선에 오래 노출되어 얼굴, 손등, 목 뒤 등에서 발생하는 외인성 노화로 구분된다[2]. 자외선은 비타민 D의 합성에 필수적이거나 장기간 노출의 경우 피부의 색소를 침착시키고 피부 두께를 변화시키며 건조하고 거친 피부를 만든다[3]. 진피에서 세포의 기질 단백질, 특히 collagen을 감소시켜 피부의 탄력을 저하하고 주름을 생성한다[11]. 이렇듯 과도한 자외선의 노출로 인해 발생하는 광노화는 피부에 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)를 생성하는데, ROS는 자유라디칼을 포함하는 불안정한 산소로 세포 내에서 singlet oxygen (O_2) 을 비롯하여 superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) 등으로 존재하여 피부 내 산화적 스트레스로 세포막과 피부 구성 단백질 손상 및 염증을 일으키

며, 피부세포 내의 DNA 손상을 초래한다[2, 6, 7]. 증가한 활성산소종에 의해 분비된 염증성 사이토카인이 진피의 섬유아세포에서 합성되는 pro-collagen을 감소시켜 collagen 분해를 증가시켜 피부의 탄력이 감소하고 주름 형성을 촉진하여 노화를 일으킨다[5]. 산화적 스트레스는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 활성화시키는 것으로 알려져 있으며, MMP는 단핵구(monocyte), 대식세포(macrophage), 내피세포(endothelial cell), 평활근세포(smooth muscle cell)를 포함한 다양한 세포에서 생성되는 단백질 분해효소이다[2]. 특히, 자외선에 의한 ROS의 증가는 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 발현을 증가시키며 증가한 MMP-1은 주요 collagen 분해 효소로 세포 사이에 존재하여 collagen을 부분적으로 절단하는데 MMP-3와 MMP-9이 절단된 collagen 조각을 더 작게 분해한다. 이에 따른 결합조직의 손상으로 피부에 주름을 생성하고 건조함을 나타내는 광노화가 일어나게 된다[4]. 따라서 항산화 효과와 더불어 pro-collagen 합성을 돕고 MMPs의 발현을 억제함으로써 광노화 예방에 도움이 되는 물질들이 많이 연구되고 있다. 질병 치료 및 예방의 목적으로 한방 생약제를 포함한 약용식물들에 대하여 지난 수년 동안 항산화, 항균 활성, 항염증 및 항노화 등의 여러 효과가 보고되고 있으며 이들이 가지는 유용한 생리

활성 물질들을 이용하여 다양한 기능성 소재 및 제품 개발에 이용해 왔다[10, 5]. 중국에서 주로 사용되는 허브인 금전초는 식물의 종에 따라 2가지로 분류되는데 긴병꽃풀로 불리는 꿀풀과 *Glechoma longituba* Kupr와 과로항이라 불리는 앵초과 *Lysimachia christinae* Hance가 있다[8]. 일반적으로 한방치료제로 사용된 금전초는 주요 성분으로 myricetin, kaempferol, quercetin 배당체가 알려져 있으며, 현재까지 메탄올 추출물과 분획물의 간 독성 해독, 콜레스테롤 담석증 감소, 항염증제, 담즙 배출 작용, 이노제, 진통제, 산화방지제 등의 효능이 알려져 있다[8]. 또한, *L. japonica*에서 분리된 6-tri-decyl resorcylic acid와 gevillo의 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 활성 억제 작용이 보고되었다[9]. 현재까지 금전초에 관한 다양한 연구가 진행되었으나 피부세포를 이용한 항주름 활성에 대한 연구는 미흡하여 본 연구를 통하여 화장품에서 항산화와 항주름 소재로서의 가능성을 밝히고자 하였다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

2.1.1. 실험 재료 및 추출물 제조

본 연구에 사용한 금전초(*Lysimachia christinae* Hance)는 경북 영천에서 재배된 것을 받아 건조된 잎 부위를 다음과 같이 추출을 진행하였다. 열수 추출은 시료 중량의 10배 양의 증류수를 첨가하여 90°C에서 3 h마다 3번에 걸쳐 추출이 진행되었으며 추출물은 여과한 다음 rotary vacuum evaporator (HS-10SP; Hahnshin S&T, Korea)를 사용하여 농축한 후 동결기(FD5525; Ilshin BioBase, Korea)로 건조하였다. 에탄올 추출물은 70% 에탄올을 시료 중량의 10배의 양으로 첨가하여 실온에서 24 h 추출 후 여과하여 3번 반복하여 추출물을 얻었으며, 여과한 추출물은 감압 농축 후 동결 건조하였다. 최종 시료 수율은 열수 추출물(LcHW)이 31.3%, 에탄올 추출물(LcHE)이 15.2%이며 시료는 냉장실에 보관하여 사용하였다.

2.1.2 실험 세포 및 시약

본 연구에서 사용된 HaCaT 세포(Human keratinocyte cell line)는 German Cancer Reserch

Center (DKFZ, Germany)로부터 분양받아 사용하였다. HaCaT 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Introgen Therapeutics, USA)과 1% penicillin/streptomycin (Hyclone™, GE Healthcare Life Sciences, USA) 100 U/ml을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Forma™, Thermo Fisher Scientific, USA)에 적응시켜 계대 배양하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 세포생존율 측정

금전초 추출 시료에 대한 세포 생존율 실험은 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 이용한 Mosman (1983)의 방법[12]으로 진행되었다. HaCaT 세포를 96 well plate에 각 well 당 7×10^4 cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 배양 후 Serum free DMEM 배지로 교체하여 24 h 배양하고 LcHW와 LcHE를 농도별로 각 20 μ l씩 주입하여 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 그 후 5 mg/mL의 MTT 시약을 20 μ l 처리하여 4 h 배양한 후 상층액을 제거하고, 1:1 비율의 DMSO와 99% ethyl alcohol을 200 μ l 씩 처리하여 30 min 반응을 통하여 formazan crystal을 용해한 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.2. 세포 내 ROS 생성량 측정

세포 내 산화적 스트레스인 H₂O₂를 이용하여 실험을 진행하였다. H₂O₂로 유도된 세포 내 ROS 생성량 측정 실험은 Kang *et al.*의 방법으로 진행되었다[13]. 실험에 사용된 비형광물질인 DCF-DA는 세포 내 유입 시 hydrogen peroxide (H₂O₂)와 관련된 물질에 대해 ROS에 의해 산화되어 탈 에스틸화로 2,7-dichlorofluorescein이 되어 형광을 띤다[16, 17]. HaCaT cells를 96 well plate에 7×10^4 cells/mL로 일정하게 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 18 h 배양하였다. Serum free DMEM 배지로 교체하여 24 h 배양 후 농도별 추출물을 20 μ l 주입하여 24 h 배양하였다. phosphate buffer saline (PBS)로 3번 washing 후 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 100 μ l 주입하여 1 h 반

응시켰다. 500 μ M의 H₂O₂를 첨가하여 30 min 동안 incubation 하였다. DCF 형광물질을 485 nm (excitation)와 535 nm (emission)에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.3. pro-collagen 합성실험

Human 유래 각질형성세포인 HaCaT cells에서의 pro-collagen의 양은 ELISA reader assay kit (Takara Bio Co., Japan)를 이용하여 배지 중에 분비된 pro-collagen type 1 C-peptide (PIP)를 측정하여 조사하였다[14]. HaCaT 세포를 6 well plate에 seeding 하여 24 h incubation 후 LcHE를 10, 50, 100 μ g/mL로 처리하여 다시 24 h incubation 하였다. 그 후 none 군을 제외하고 UVB (50 mJ/cm²)를 조사하여 자극을 준 뒤 24 h incubation 하여 각 well의 상층액을 취하여 실험을 진행하였다. 다음 실험은 kit 제조사의 protocol에 따라 다음과 같이 진행되었다. Antibody-PDA conjugate solution 100 μ l과 Sample 20 μ l를 넣고 차광하여 37°C에 3 h 반응하였다. 반응 후 PBS로 4번 세척 후 기질 용액을 100 μ l 첨가하여 상온에서 15 min 동안 반응하고 정지 시약을 100 μ l 첨가한 후 ELISA reader에서 450 nm로 흡광도를 찍어 결과값을 나타내었다.

2.2.4. Western Blot을 이용한 단백질 발현 측정

LcHE의 항주름 활성을 알아보기 위하여 western blot을 통하여 주름 관련 단백질 발현을 확인하였다. HaCaT cell을 100 ϕ dish에 1 \times 10⁶ cells/well로 seeding 하여 24 h incubation 한 후 배지를 제거한 후 시료를 농도별(10, 50, 100) μ g/mL로 처리하여 1 h 반응한 후 none군을 제외하고 UVB (50 mJ/cm²)를 조사하여 자극을 준 뒤 24 h incubation 하였다. 그 후 상층액을 제거하여 PBS로 3번 washing 하였다. Cellular protein을 추출하기 위해 cell을 harvest 하여 RIPA buffer (protein extraction buffer)로 cell을 용출시키고 2,000 rpm, 4°C에서 10 min 동안 centrifuge 하여 세포막을 제거하고 단백질을 분리하였다. 상층액은 Bradford assay에 따라 BSA 정량 곡선을 이용하여 단백질을 정량하였다. 12% SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)에서 전기영동 후 Gel에서 분리된 단백질을 membrane에 transfer 후 4°C에서 5% skim milk로 blocking

하였다. anti-MMP-1, anti-MMP-2, anti-MMP-3, anti-MMP-9 항체를 5% skim milk에 희석하여 4°C에서 overnight하고 Buffer (1X Tris-Buffered Saline buffer+0.1% tween 20)로 10 min 씩 3번 washing 하였다. 2차 항체인 anti-mouse, anti-goat 항체를 5% skim milk에 희석하여 6 h 이상 상온에서 처리한 후 4°C에서 overnight 하여 Tris-Buffer Saline Tween-20 (TBST)로 3번 washing 하였다. Membrane에 Clarity™ Western ELC Substrate solution을 가한 후 camera system EZ-Capture II와 CS analyzer ver. 6.00 software을 이용하여 밴드를 확인하였다.

2.2.5. RNA 분리 및 real-time PCR

금진초의 항주름 효과를 확인하기 위하여 mRNA 수준의 MMPs 발현량을 측정하여 단백질 발현과의 연관성을 확인하였다. HaCaT 세포를 100 ϕ dish에 1 \times 10⁶ cells/well이 되도록 분주하여 24 h incubation 후 배지를 제거하여 시료를 10, 50, 100 μ g/mL의 농도별로 처리하였다. 1 h 뒤 UVB (50 mJ/cm²)를 처리하여 세포에 자극을 주었다. 24 h 뒤 cell을 PBS로 세척 후 RNA를 분리하였다. RNA의 분리는 High Pure RNA isolation Kit (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Germany)의 제조사의 지시에 따라 진행하였다[25]. 분리된 RNA는 260 nm/280 nm의 비율로 1.7-2.0 사이의 RNA 순도를 측정하여 정량하였다. 0.5 μ g/ μ L의 농도로 정량된 RNA는 Transcriptor first Stand cDNA synthesis kit (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 5 μ l의 희석한 cDNA와 primer 2 μ l, SYBR Green 10 μ l를 넣어 real-time PCR을 수행하였다. real-time PCR에 사용된 Primer의 sequence는 다음과 같다. MMP-1 (Forward, 5'-GTTTTCTCAGAAAGAGCAGCAT-3', Reverse, 5'-AGCGTGTGACAGTAAGCTAA-3'), MMP-2 (Forward, 5'-TTGCCATCCTTCTCAAAGTTGTAGG-3', Reverse, 5'-CACTGTCCACCCCTCAGAGC-3'), MMP-3 (Forward, 5'-TTGTTCTTTGATGCAGTCAGC-3', Reverse, 5'-GATTTGCGCCAAAGTGC-3'), MMP-9 (Forward, 5'-CCCGGACCAAGGATACAG-3'. Reverse, 5'-GGCTTTCTCTCGGTACTG-3'). 증폭조건에 따라 PCR

(LightCyber® Nano Real-Time PCR System; Roche Diagnostics) 기기를 이용하여 실시간 정량분석을 한 뒤 결과를 분석하였다.

2.2.6. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 statistical package for the social sciences (SPSS) software package (Version 22.0; IBM, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리 군 간의 유의성에 대한 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)을 이용하여 유의성을 확인한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 세포 생존율 측정

LcHW와 LcHE가 HaCaT 세포에 대해 독성이 있는지 확인하기 위하여 살아있는 세포 내의 미토콘드리아의 reductase 효소에 의해 Formazan을 생성하는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide를 이용한 MTT assay를 진행하였다. 세포에 50 mJ/cm²의 농도의 UVB를 조사하였으며, 시료의 농도는 10, 50, 100, 125, 250 µg/mL로 처리하였다. 그 결과 Human 유래 HaCaT cell에서 LcHW는 125 µg/mL의 농도에서 73.9%의 세포 생존율로 세

포독성을 보였으며, LcHE는 250 µg/mL에서 90.9%의 세포 생존율을 보여 LcHW 대비 세포 내 독성이 낮음을 나타내었다(Fig. 1).

3.2 세포 내 ROS 생성량 측정

H₂O₂로 유도된 ROS 생성량 측정은 DCFH-DA를 세포 내로 투과하여 아세틸기가 유리된 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH)의 형태가 되면, 세포 내 ROS의 하나인 H₂O₂와 만나 형광 DCF를 생성하는 DCFH를 형광화하는 성질을 이용하여 세포 내 ROS의 함량을 평가하였다[1]. Human 유래 HaCaT cell에 H₂O₂를 처리한 후 LcHE와 LcHW를 농도별로 처리한 결과, 500 µM의 H₂O₂의 자극이 가해진 control 군과 대비하여 100 µg/mL에서 LcHW는 60.8%, LcHE는 55.2%의 ROS level을 보였다. 또한, 금전초가 H₂O₂로 유도된 ROS 생성량에 농도별 유의미한 저해를 보였다(Fig. 2). 피부에는 항산화 시스템이 존재하여 UV를 비롯한 외부 자극에 의하여 ROS 생성이 증가한 경우 빠르게 제거하는 기전이 작동하고 있지만 반복적이거나 너무 강한 활성산소의 증가는 피부 손상을 피하기 어렵다. 일부 연구자들은 카로틴, Vit E, C, 폴리페놀 등이 풍부한 음식이 항산화제로 작용하여 피부 광노화의 예방 또는 개선을 할 수 있다는 연구결과를 내놓았으며 금전초 잎 에탄올 추출물은 ROS 생성을 낮추어 미용, 화장품의 항산화 소재로 기대를 보인다[20].

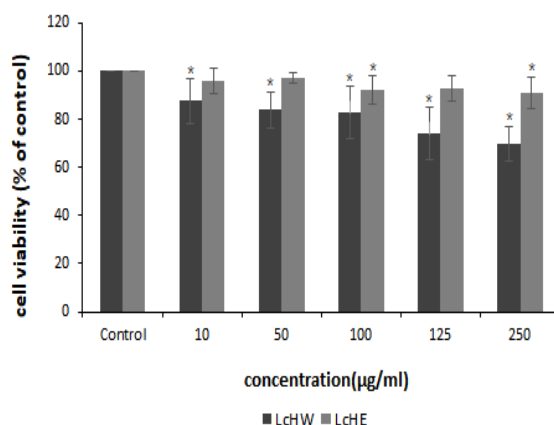


Fig. 1. Cell viability of *Lysimachia christinae* Hance on keratinocyte (HaCaT cell), LcHW: *Lysimachia christinae* Hance water extracts, LcHE: *Lysimachia christinae* Hance 70% ethanol extracts, Control: Non treated extracts, Results are expressed as means \pm S.D. of triplicate data. * $p < 0.05$, compared with control.

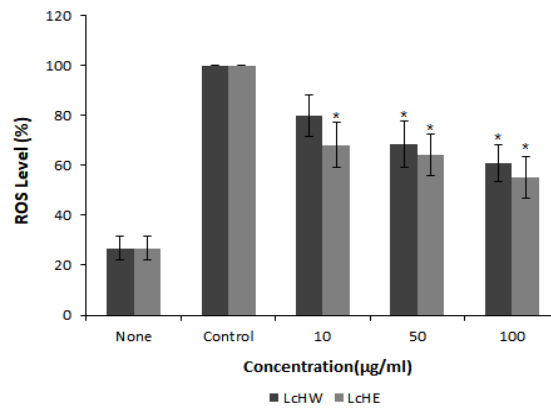


Fig. 2. H_2O_2 -induced Reactive oxygen species (ROS) activity of *Lysimachia christinae* Hance on H_2O_2 -induced HaCaT cells, LcHW: *Lysimachia christinae* Hance water extracts, LcHE: *Lysimachia christinae* Hance 70% ethanol extracts, None: Non treated any extract and stimulation with H_2O_2 , Control: Treated stimulation with H_2O_2 , Results are expressed as means \pm S.D. of triplicate data. * $p < 0.05$, compared with control.

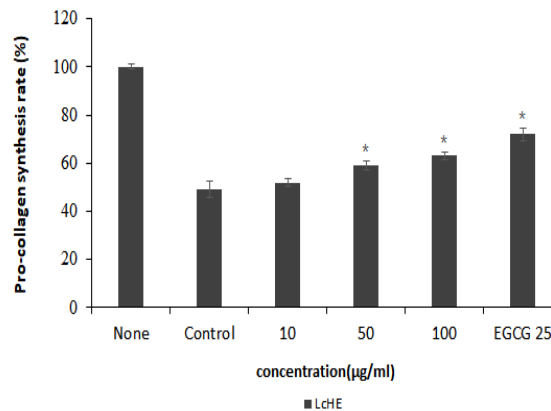


Fig. 3. Inhibitory effects of *Lysimachia christinae* Hance 70% ethanol extracts on anti-wrinkle related mRNA expression on HaCaT cells, LcHE: *Lysimachia christinae* Hance 70% ethanol extracts, None: Non treated any extract and UVB (50 mJ/cm²), Control: Only treated UVB (50 mJ/cm²), EGCG 25: 25 µg/ml of Epigallocatechin gallate, Results are expressed as means \pm S.D. of triplicate data. * $p < 0.05$, compared with control.

3.3. pro-collagen 합성실험

진피의 결합조직 내에 존재하는 collagen은 세포 내에서 pro-collagen이라는 전구물질로 합성된 후 세포 외로 분비되어 collagen 섬유로 중합되는데, pro-collagen의 N-말단 및 C-말단의 pro-peptide가 endopeptidase에 의해 유리되는 것으로 밝혀졌다[3, 15]. 실험은 pro-collagen type-1 C-peptide ELISA kit.를 사용하여 pro-peptide의 함량을 측정하여 pro-collagen의

합성을 평가하였다. 25 µg/mL 농도에서 EGCG의 72.0%, LcHE가 10, 50, 100 µg/mL 농도에서 각각 52.4%, 59.6%, 63.6%의 pro-collagen 합성능을 보여 농도 의존적으로 값이 높아짐을 확인하였다. 특히 (50, 100) µg/mL 농도에서 유의미한 효과를 나타내었다(Fig. 3).

3.4. Western Blot을 이용한 단백질 발현 측정

세포 외 기질을 분해하는 collagen 분해효소인

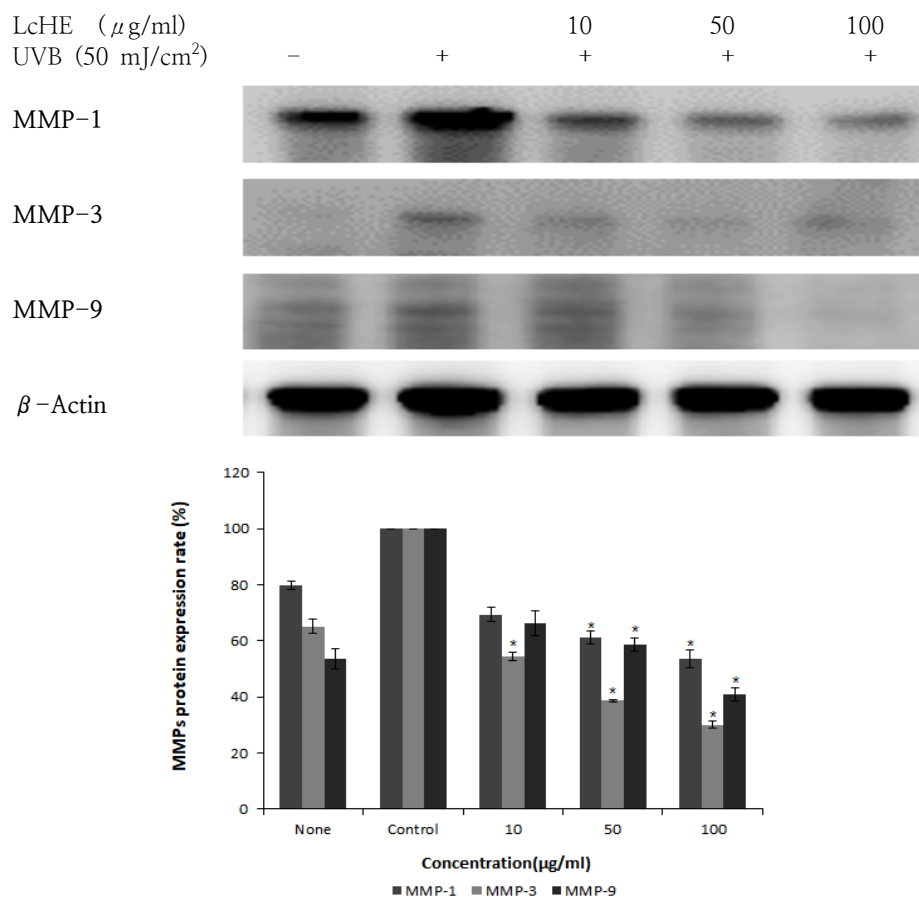


Fig. 4. Effects of MMPs protein expressing on *Lysimachia christinae* Hance 70% ethanol extracts in UVB-induced HaCaT cells, None: Non treated any extract and UVB (50 mJ/cm^2), Control: Only treated UVB (50 mJ/cm^2), Results are expressed as means \pm S.D. of triplicate data. * $p < 0.05$, compared with control.

MMPs 중 LcHE이 MMP-1 -3 -9의 단백질 발현을 억제하는지 확인하기 위해 western blot을 실시하였다. HaCaT cell에 UVB와 LcHE를 농도별 (10, 50, 100) $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 후 MMP-1 -3 -9의 발현량을 확인한 결과, UVB 단독 처리군에 비해 UVB와 LcHE를 동시에 처리하였을 때, MMP-1 -3 -9의 발현량이 농도 의존적으로 감소함을 보였다. MMPs는 구조와 기능적 특성에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysin, matrilysin, membrane-type MMP (MT-MMP) 등으로 나누어진다[23]. MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, type I과 III collagen을 기질로 하고 MMP-3는 stromelysin 1라고도 불

리며 기저막의 type IV collagen을 분해하며 zymogen인 pro MMP-1을 활성화시켜 피부 주름을 형성시킨다[24]. 금전초 잎 에탄올 추출물은 Fig. 4에서 나타나듯이 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 MMP-1이 53.7%, MMP-3이 30.0%, MMP-9이 41.1%로 UVB 단독 처리군의 100% 대비 발현량이 크게 줄어들었으며 특히 MMP-3 값은 70%의 높은 저해율을 보여 pro MMP-1을 활성화를 저해에 도움을 준다. 이러한 결과로 LcHE가 UVB 자극에 의한 MMPs의 발현으로 생성되는 주름생성의 저해에 효과가 있을 것으로 기대할 수 있다(Fig. 4).

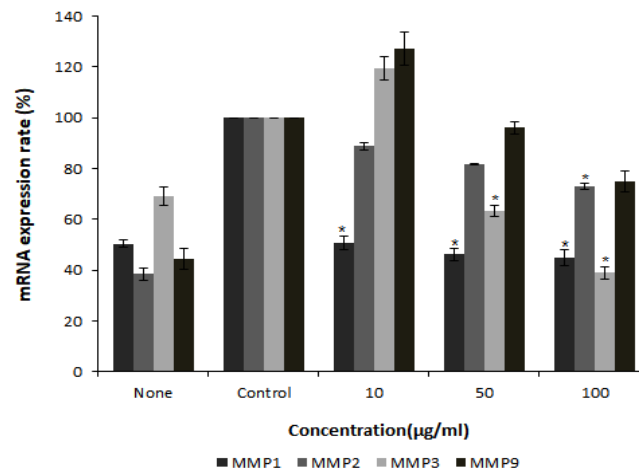


Fig. 5. Inhibitory effects of anti-wrinkle related mRNA expression on *Lysimachia christinae* Hance 70% ethanol extracts in UVB-induced HaCaT cells, None: Non treated any extract and UVB (50 mJ/cm²), Control: Only treated UVB (50 mJ/cm²), Results are expressed as means \pm S.D. of triplicate data. * $p < 0.05$, compared with control.

3.5. 주름 관련 인자들의 유전자 발현량 측정 (real-time PCR)

LcHE이 주름 관련 인자인 MMPs 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 real-time PCR을 통하여 mRNA 수준의 MMPs의 발현량을 확인하였다. 그 결과 UVB만 처리한 control 군과 비교하여 UVB와 LcHE를 동시에 처리하였을 때 MMP-1 -2 -3 -9의 발현량은 저농도에서는 유의미한 효능을 나타내지 않았으나, 100 µg/mL에서 MMP-1이 44.9%, MMP-2가 72.9%, MMP-3가 38.9%, MMP-9이 75.0%의 발현량을 보여 MMPs의 억제 효과를 보여주었다(Fig. 5). 단백질 합성은 DNA로부터 mRNA로 전사되어 mRNA의 뉴클레오티드 서열의 정보가 단백질 합성으로 사용되는데 LcHE도 이러한 단백질 합성 과정 중 mRNA 단계에서의 MMPs 억제로 단백질 발현이 감소하였음을 확인할 수 있었다.

4. 결론

본 연구에서는 기능성 화장품의 소재로서의 금전초(*Lysimachia christinae* Hance)의 항산화와 항주름 효과를 조사하였다. 대표적인 주름 개선 기능성 고시원료는 retinol (Vit A), adenosine 등으로 알려져 있는데, 이들은 collagen 합성 증가

와 표피 각화에 대하여 피부 재생에 도움을 주어 주름 개선에 도움을 주는 물질로 많이 활용되고 있으나 합성 화학성분으로 피부에 자극을 주고 빛과 열에 불안정하다는 단점이 있다[18]. 이에 따라 천연물의 주름 개선 개발의 연구가 지속적인 관심을 받고 있어 본 연구를 통해 ROS 생성과 pro-collagen 합성 및 MMPs의 연관성에 대해 알아보았다. 광노화 된 피부는 피부 기저층으로부터 각질층까지 이행되는 각화주기의 이상반응을 나타내어 표피층의 수분량을 감소시키고 각질층을 두텁게 하며 진피층 내 collagen 섬유 굵기가 감소하고, 배열도 엉성해지며, 탄력섬유의 복잡하고 정교한 결합이 끊어져 있는 것으로 나타난다[21]. 이러한 현상은 지속적인 UV 노출이 원인이며 ROS 발생에 따른 활성산소의 증가는 collagen과 탄력섬유 분해효소인 MMPs의 발현을 증가시켜 pro-collagen의 합성을 억제하는 경로를 통하여 collagen matrix를 손상시킨다[22]. 본 연구에서 사용된 금전초는 70% 에탄올(LcHE)과 열수(LcHW)로 각각 추출하여 실험을 진행하였다. MTT assay로 진행된 HaCaT cell의 세포독성을 평가한 결과 에탄올 추출물은 250 µg/mL까지 세포독성을 보이지 않았으며, 열수 추출물은 125 µg/mL의 농도에서 세포독성을 보여 125 µg/mL 미만의 농도로 실험을 진행하였다. 금전초의 H₂O₂로 유도된 세포 내 reactive

oxygen species (ROS) 생성 억제율을 측정한 결과 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 열수 추출물이 60.8%, 에탄올 추출물이 55.2%의 활성을 보였다. 금전초 에탄올 추출물의 항주름 활성 평가 중, pro-collagen 합성 실험결과 대조군인 EGCG가 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 72.0%의 활성을 보였으며, 이에 비교하여 금전초 에탄올 추출물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 63.6%의 활성을 보여주었다. Western Blot을 통하여 금전초의 matrix metalloproteinases (MMPs) 중 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 발현량을 측정한 결과 UVB 자극에 대해 금전초를 처리하였을 때 발현량이 줄어드는 것을 확인하였다. Real time PCR을 통하여 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9의 mRNA levels을 측정한 결과 농도 의존적으로 유의한 감소를 보였다. 따라서, 이러한 결과는 기능성 화장품의 소재로 금전초의 항노화 효과의 가능성을 보여준다. 향후 금전초를 이용한 세포 외 기질 성분의 항노화 효능에 대한 분자생물학적인 작용기전을 통한 체계적인 데이터 확보를 통해 우수한 천연물로 사용되기를 기대해 본다.

References

1. D. Y. Jang, Y. S. Han, J. C. Yang, B. A. Kim, "Anti-oxidative and protective effect of *Arthrospira platensis* ethanol extracts on zebrafish ROS Induced by UVB Induction", *Oil & Applied Science*, Vol. 35, No. 2, pp. 423-432, (2018)
2. E. Y. Choi, H. Y. Sohn, J. T. Lee, "The Antioxidant and Anti-aging Effects of Treatment with *Schisandra chinensis* Seed Fractions in UVB-irradiated Human HaCaT cells", *J. Life sci.*, Vol. 29, No. 10, pp. 1071-1079, (2019)
3. E. Y. Choi, J. T. Lee, "The effects of antioxidant and anti-aging treatment of UVB-irradiated human HaCaT keratinocytes with ethanol extracts of colored rice varieties", *Korean J. FOOD Sci. Technol.*, Vol. 50, No. 6, pp. 653-659, (2018)
4. C. S. Kwak, J. W. Yang, "Prevention Effect of *Prunus Persica* Flos Extract from Reactive Oxygen Species Generation and Matrix Metalloproteinase Production Induced by UVB Irradiation in Human Skin cells", *Asian J Beauty Cosmetol.*, Vol. 14, No. 2, pp. 179-190, (2016)
5. S. J. Seo, G. E. Park, M. J. Jang, Y. S. Lee, "Anti-aging Effects of *Ailanthi Radicis* Cortex Extract", *J Invest Cosmetol.*, Vol. 14, No. 2, pp. 179-186, (2018)
6. R. S. Schal, R. Weindruch, "Oxidative stress, caloric restriction, and aging". *Science*. Vol. 273, No. 5271, pp. 59-63, (1996)
7. G. M. Martin, S. N. Austad, T. E. Johnson, "Genetic analysis of aging: role of oxidative damage and environmental stresses", *Nat. Genet.*, Vol. 13, No. 1, pp. 25-34, (1996)
8. A. R. Kim, M. C. Jung, H. I. Jeong, D. G. Song, Y. B. Seo, Y. H. Jeon, S. H. Park, H. S. Shin, S. L. Lee, S. N. Park, "Antioxidative and Cellular Protective Effects of *Lysimachia christinae* Hance Extract and Fractions", *Appl. Chem. Eng.*, Vol. 29, No. 2, pp. 176-184, (2018)
9. H. Y. Kim, S. S. Kim, C. K. Lee, J. W. Choi, "Biological Activities of *Lysimachiae* Herba. I. Effects of the Pretreatment of *Lysimachiae* Herba on the Enzyme Activities in Galactosamine-intoxicated Rats", *Kor. J. Pharmacogn.*, Vol. 27, No. 1, pp. 58-64, (1996)
10. S. J. Park, "Walnut Husk Ethanol Extract Possess Antioxidant Activity and Inhibitory Effect of Matrix Metalloproteinase-1 Expression Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha in Human Keratinocyte", *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, Vol. 11, No. 4, pp. 715-719, (2013)
11. J. Y. Seo, K. H. Cho, H. C. Eun, J. H. Chung, "Skin Aging from Phenotype to Mechanism", *Korea J Invest Dermatol.*, Vol. 8, No. 4, pp. 187-194, (2001)
12. J. Carmichael, W. G. Degraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, J. B. Mitchell, "Evaluation of a tetrazolium-based

- semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing”, *Cancer Res.*, Vol. 47, No. 4, pp. 936-942, (1987)
13. K. A. Kang, R. Zhang, M. J. Piao, S. W. Chae, H. S. Kim, J. H. Park, K. S. Jung, J. W. Hyun, “Baicalein inhibits oxidative stress-induces cellular damage via antioxidant effects”, *Toxicol. Ind. Health.*, Vol. 28, No. 5, pp. 412-421, (2011)
 14. Takara Bio Inc, Procollagen Type I C-peptide (PIP) ELA kit cat. #MK101 v1009
 15. M. S. Kim, T. J. Park, J. S. Lim, S. Y. Kim, “Effect of Agaricus bio renovate Extract on Collagen Synthesis and Matrix Metalloproteinase-1 Production in Human Dermal Fibroblast”, *KSBB Journal.*, Vol. 34, No. 1, pp. 49-53 (2019)
 16. S. Y. Kim, M. J. Kim, K. J. Ahn, I. S. An, S. K. An, “Antioxidant Effects of Kinetin on HaCaT Human Keratinocytes Damaged by Hydrogen Peroxide(H₂O₂)”, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, Vol. 13, No. 13, pp. 59-64, (2015)
 17. Y. R. Cheon, J. W. Hwang, H. S. Lee, S. Y. Yun, Y. S. Choi, S. J. Kang, “Anti-oxidant and Anti-aging Activities of Sericinjam Gland Hydrolysate Extract in Human Dermal Fibroblasts”, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, Vol. 39, No.1, pp. 9-17, (2013)
 18. M. J. Jang, D. H. Jun, S. H. Kim, S. I. Han, J. T. Lee, “Anti-wrinkle Effect of Chestnut Leaf”, *J. Life Sci.*, Vol. 23, No. 6, pp. 751-756, (2013)
 19. Y. Shindo, E. Witt, L. packer, “Antioxidants defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light”, *J. Invest Dermatol.*, Vol. 100, No. 3, pp. 260-265, (1993)
 20. E. Fernández-Garcia, “Skin protection against UV light by dietary antioxidants”, *Food & Function*, Vol. 5, No. 9, pp. 1994-2003, (2014)
 21. S. M. Kim, J. H. Chung, “Berberine prevents UV-induced MMP-1 and reduction of type I procollagen expression in human dermal fibroblasts”, *Phytomedicine*, Vol. 15, No. 9, pp. 749-753, (2008)
 22. P. Schroeder, T. Gremmel, M. Berneburg, J. Krutmann, “Partial depletion of mitochondrial DNA from human skin fibroblasts induces a gene expression profile reminiscent of photoaged skin”, *J. Invest Dermatol.*, Vol. 128, No. 9, pp. 2297-2303, (2008)
 23. G. L. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, F. McPhillips, Z. Wang, X. Li, Y. Wan, S. Kang, J. J. Voorhees, “Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo”, *J. Clin. Invest.*, Vol. 101, No. 6, pp. 1432-1440, (1998)
 24. G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. Kang, J. J. Voorhees, “Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism”, *Nature*, Vol. 379, No. 6563, pp. 355-339, (1996)
 25. Roche, High Pure RNA Isolation Kit, cat. no. 11 828 665 001