

양하(*Zingiber mioga*) 추출물의 화장품 약리활성 검증을 통한 화장품 소재로서의 유효성 평가

엄미선[†]

[†]장안대학교 뷰티케어과, 교수
(2020년 8월 27일 접수: 2020년 10월 17일 수정: 2020년 10월 19일 채택)

The Evaluation on the Effectiveness of *Zingiber mioga extract* as a Cosmetic Material through Verification of Cosmeceutical Activations

Mi Sun Um[†]

[†]Department of Beauty Care, Jangan University
(Received August 27, 2020; Revised October 17, 2020; Accepted October 19, 2020)

요 약 : 본 연구는 화장품 소재로서 양하의 가능성을 확인하기 위한 것이다. 이를 위해 우리는 양하 추출물을 사용하여 항산화, 항염증, 주름개선 효과에 대한 생리 활성 평가를 실시하였다. 이 실험을 하기 위해, 양하꽃 추출물 (ZMF)과 양하잎 추출물 (ZML)을 70% 에탄올로 추출하였다. 항염증 효과를 알아보기 위해 macrophage (Raw 264.7)를 이용해 시료의 세포독성 평가와 nitric oxide 저해능을 측정하였다. ZMF와 ZML의 DPPH 라디칼 소거능, ABTS+ 라디칼 소거능, SOD 유사 활성 측정 결과 농도 의존적으로 활성이 증가하였다. ZMF는 ABTS+ radical scavenging activity와 superoxide dismutase (SOD)-like activity 측정 결과 ZML보다 높은 항산화 활성을 보였다. NO 저해능 측정 결과에 따르면 ZMF는 농도 의존적으로 NO가 저해되어 우수한 항염증 효과를 나타냈다. ZMF의 pro-collagen type-1 합성량은 25 µg/ml에서 110% 이상의 우수한 효과를 나타내었으며, MMP-1 저해능은 25 µg/ml에서 20%의 활성을 나타냈다. 이 결과로 ZMF는 주름개선용 화장품 소재로 응용이 가능할 것으로 판단된다. 항산화, 항염증, 주름개선 평가 결과, 양하의 생리 활성 효과가 검증되었으므로 천연 화장품 재료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

주제어 : 양하, 항산화, 항염증, 항주름, 천연화장품

Abstract : The purpose of this study was to confirm the possibility of *Zingiber mioga* as a cosmetic material. For this we carried out biologically activated material characteristic evaluation about anti-oxidant, anti-inflammatory, wrinkle reduction effects using *Zingiber mioga extract*. To carry out this experiment, we extracted *Zingiber mioga extract* from *Zingiber mioga* flowers extract (ZMF) and *Zingiber mioga* leaves extract (ZML) with 70% ethanol. In order to evaluate the

[†]Corresponding author
(E-mail: heorum12@jangan.ac.kr)

anti-inflammatory effect, we tested the toxicity and the hindrance activity to nitric oxide of samples using macrophages (RAW 264.7 cells). After we measured DPPH radical scavenging activity, ABTS+ radical scavenging activity and superoxide dismutase (SOD)-like activity of the *Zingiber mioga* extracts, we knew that they increased depending on their concentration. ZMF showed higher antioxidant activity than ZML after the measurement of ABTS+ radical scavenging activity and superoxide desmutase (SOD)-like activity. According to the measurement result of Nitric oxide inhibition activity we knew that ZMF reduced NO productions in a concentration-dependent manner. After the measurement of the biosynthesis quantity of pro-collagen type-1, we knew that its excellent effect appeared 110% or more at the concentration of 25 µg/ml. And at the same concentration, the result of the measurement of metalloprotease (MMP)-1 inhibition effect showed the 20% activation. In conclusion, ZMF is expected to be applied as a cosmetic material for wrinkle reduction. *Zingiber mioga* is believed to be used as a natural cosmetic material because it has been proven to have antioxidant, anti-inflammatory, and wrinkle-improving effects.

Keywords : *Zingiber mioga*, Anti-oxidant, Anti-inflammatory, wrinkle, Natural cosmetic

1. 서론

여성들의 사회적 지위의 향상과 소득의 증가로 건강과 천연화장품에 대한 관심이 높아지고 있어, 친환경 컨셉의 천연 기능성 원료에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이다[1]. 따라서 요즘 화장품 트렌드는 환경을 오염시키고 독성과 부작용을 갖는 합성원료에 비해 경쟁력이 있는 환경 친화적 천연 성분에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[2, 3]. 이러한 천연 성분은 주로 식물 추출물로, 식물은 광합성 과정 중 발생하는 활성산소를 제거하기 위해 항산화 물질을 생산하고[4], 각종 환경오염에 저항하기 위한 다양한 활성성분을 함유하고 있어, 식물의 활성 성분은 피부 노화와 만성질환을 완화하기 위해 사용되고 있다. 반복적인 자외선 노출 등으로 과잉 생산된 활성산소는 세포를 손상시켜 피부의 단백질 산화, 콜라겐과 엘라스틴의 기능 저하, DNA 산화, 지질 과산화 등의 손상이 일어나 피부노화와 색소침착의 원인이 되고[5-7], 세포 내에서 염증을 발생시킨다[8].

천연물 중 다년생 초본인 양하는 생강목(Zingiberales), 생강과(Zingiberaceae), 생강속(Zingiber), 양하종(*Zingiber mioga*)이고 동아시아가 원산지이며 우리나라에서는 남해안과 제주

도 일대에서 자생한다. 양하에는 shogaol, β -phellandrene, zingerene, zingirone 등의 성분의 함유로 진통, 건위, 거담의 효과가 있어[9], 동의 보감에는 성질이 따뜻하고 맛은 매우며 고독과 학질을 치료한다고 기록되어 있고, 본초강목에도 양하의 효능에 대한 기록이 있다[10, 11].

원산지인 아시아 지역인 양하에 대한 주로 일본에서 연구되었고, 국내에서는 양하의 성분 분석 등 기초 연구와 기능성 식품 연구에 국한되었다. 여수산 양하꽃의 일반성분 및 무기질함량 측정 실험에서 조단백질 0.30%, 조지방 0.23%, 탄수화물 3.42%, 조회분 1.10%이었고, 칼륨 581.30 mg/100 g, 칼슘 40.21 mg/100 g, 나트륨 23.55 mg/100 g, 철분 3.24 mg/100 g이었다. 양하꽃의 향기성분은 테르펜류인 β -phellandrene, β -pinene, β -terpinene, α -pinene, 1,4-terpineol 등 이었다[9, 12-14].

본 연구에서는 양하 추출물의 항산화 효과, NO (Nitric oxide) 측정, Procollagen 생성능, Matrix metallo proteinases (MMP)의 저해활성을 측정하는 피부 생리 활성에 대한 연구를 통해 천연 화장품 소재 개발의 기초 자료로 활용하고자 한다.

2. 실험

2.1. 실험재료

2.1.1. 실험 재료

이 실험에 사용한 양하는 제주도 지역에서 자생하는 것을 채취하여 깨끗하게 세척한 후, 50°C 건조기에서 7일간 건조하였다. 건조한 양하꽃 (*Zingiber mioga* flower; ZMF) 419 g과 양하잎 (*Zingiber mioga* leaf; ZML) 504 g을 각각 분쇄기로 잘게 분쇄하여 에탄올에 침전시켜 추출하였다.

2.1.2. 실험 세포 및 시약

이 실험에 이용된 세포주 Raw 264.7 mouse macrophages (murine macrophage cell line)는 한국세포주은행(Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Introgen Therapeutics, USA)과 1% penicillin/streptomycin (Hyclone™, GE Healthcare Life Sciences, USA)을 100 µg/ml 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA) 배지를 이용하여, 37°C, 5% CO₂ incubator (Forma™, Thermo Fisher Scientific)로 배양하였다. radical 소거능 실험에 이용된 시약은 DPPH (1, 1 - Diphenyl - 2 - picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)-diammonium salt), Trizma base, Pyrogallol은 Sigma-Aldrich Co.(Saint Louis, USA)에서 구입하였다. 세포 독성 측정을 위해 3-[4,5-dimethylthiazol]2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA), ELISA reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 분석하였다.

2.1.3. 추출물의 제조

잘게 분쇄한 양하꽃과 양하잎을 각각 70% 시료 중량의 10배의 에탄올에 넣어 24시간 동안 담가 두었다. 침출물은 여과지 (150 mn filter Paper, Advantec, Japan)를 이용하여 상층액과 침출물을 3회 여과하였다. 양하꽃 여과액은 회전 감압증류기 (R-215, Buchi labortechnik AG Co., Switzerland)를 이용하여 50°C, 90 rpm의 조건으로 농축 후 동결건조기를 사용하여 72시간

동안 건조시켜 사용하였다. 수율은 아래의 같은 식으로 계산하였다. 건조한 양하꽃 419 g을 70% 시료 중량의 10배의 에탄올에 침전시켜 여과한 침출물을 감압 농축하여 얻은 추출물은 44.1 g으로 수율은 10.52%였고, 건조한 양하잎 504 g을 감압 농축하여 얻은 추출물은 49.95 g으로 수율은 9.91%였다.

$$\text{Extraction Yield} = \frac{B}{A} \times 100$$

A : 시료의 건조 중량

B : 농축액 중량

2.2. 실험 방법

2.2.1. DPPH 라디칼 소거능 측정

양하꽃 추출물 (ZMF)과 양하잎 추출물 (ZML)의 DPPH radical 소거능 측정은 Blis의 방법을 응용하여 실험하였다[15]. radical 소거능을 측정하기 위해 ZMF와 ZML은 70% 에탄올로 희석하여 100 ~ 1000 µg/ml의 농도로 제조하였다. ZMF와 ZML 시료 농도 별로 각 100 µl와 DPPH (Sigma-Aldrich Co) 50 µl를 96well에 혼합하고 30분간 착광 후 반응시키고, ELISA reader로 517 nm 조건에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 70% 에탄올로 희석한 BHA (Butylated hydroxyanisole)를 사용하여 측정하였다.

2.2.2. ABTS+ radical cation scavenging activity 측정

ABTS+ radical cation 소거능 측정은 Fellegrini 등의 방법을 응용하여 실시하였다[16]. ABTS를 7.4 mM로 증류수로 용해 후 2.6 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈)와 1:1로 혼합하여 실온의 암실에서 24시간 동안 방치 후 사용하였다. ABTS+ 용액은 99% 에탄올에 희석하여 734 nm에서 흡광도가 0.706±0.001인 것을 사용하였다. radical 소거능은 시료 용액 첨가군과 무첨가군 간의 흡광도 감소율로 표시하였다.

2.2.3. SOD(Superoxide Dismutase) like activity 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund의 방법을 응용하여 실험하였다[17]. 이 실험에서는 과산화수소(H₂O₂)와의 반응을 촉매하는 pyrogallol 자동

산화물 측정하여 SOD 유사활성으로 나타냈다. Tris-HCl buffer (50mM tris+10mM EDTA, pH 8.5) 2600 μ l와 7.2mM pyrogallol 200 μ l를 각 시료에 0.2 ml 첨가하여 37°C에서 10분간 방치하고, 1M HCl 100 μ l를 가하여 반응을 정지시키고 그 중 산화된 pyrogallol의 양을 ELISA reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD like activity는 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 표시하였다.

2.2.4. MTT Assay

세포생존율 측정은 Carmichael 등의 방법을 응용하여 실험하였다[18]. 96 well plate에 Raw 264.7 세포를 0.6×10^5 cells/well의 세포수로 180 μ l 분주하고, 37°C, 5% 조건으로 CO2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 ZMF와 ZML는 10, 25, 50, 100 μ g/ml의 농도로 각각 20 μ l씩 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 넣어 같은 조건으로 배양하였다. 그 다음 5 mg/ml 농도의 MTT (Tetrazolium bromide salt, Sigma Chemical Co., USA) 용액 20 μ l를 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide)와 에탄올을 1:1로 섞어 각 well에 150 μ l씩 첨가하여 실온에서 30분 동안 반응시킨 뒤 ELISA reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 시료의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 표시하였다.

2.2.5. NO (Nitric oxide) 측정

Nitric oxide radical 측정은 Marocci 등의 방법을 응용하여 실험하였다[19]. 6 well plate에 Raw 264.7 세포를 1×10^5 cells/well로 24시간 동안 습윤 배양기에서 배양하였다. PBS (phosphate buffered saline; Sigma-Aldrich)로 2번 세척하고 무혈청 배지에 24시간 배양한 후 ZMF는 10, 25, 50, 100 μ g/ml 농도로 전처리하였다. 2시간 후에 LPS ((lipopolysaccharide) 1 μ g/ml를 control과 ZMF 추출물 시료가 든 well에 넣어서 반응시켰다. 24시간 후 상층액 100 μ l와 griess reagent 100 μ l를 1:1로 10분간 반응시키고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 산출하였다.

2.2.6. Matrix metallo proteinases (MMP)의 저해활성 측정

MMP의 저해활성 측정은 Gross 등의 방법을 응용하여 실시하였다[20]. Raw 264.7 세포를 96 well plate을 사용하여 1×10^5 cells/well로 24시간 동안 배양하였다. 배양된 배지를 제거하고 10% PBS을 1 ml 첨가한 다음 자외선을 조사한다. 이때 MMP-1의 활성을 돕기 위하여 10 ng/ml의 TNF- α 를 첨가하고 48시간 동안 배양하였다. 실험에는 세포의 배양액을 사용하였으며 MMP-1 biotrack activity assay kit (Amersham Bioscience, USA)로 측정하였다.

2.2.7. Procollagen type I 측정

Procollagen type I 측정은 Krupsky 등의 방법을 응용하여 실험하였다[21]. Raw 264.7 세포를 사용하여 pro-collagen type I의 함량을 측정하였다[22]. 1×10^4 cells/well 농도의 세포를 96-well plate에 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 10% PBS를 사용하여 세포를 2회 세척하고 무혈청 배양액을 첨가하였다. 24시간 후 양하꽃 추출물 (ZMF)을 농도 별로 전처리하고 48시간 동안 배양하였다. 각 well의 상등액을 수집하여 pro-collagen Type-I C-Peptide EIA kit (Takara-Bio Inc.) 각 well에 첨가하여 procollagen type I의 함량을 측정하였다.

2.2.8. 통계처리

본 실험에 대한 통계처리는 SPSS ver 23.0을 사용하여 평균과 표준편차로 나타냈고, 처리군 간의 유의성 검증의 경우 DPPH, ABTS, SOD는 분산분석을 실시하여 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple test를 실시하였으며, MTT, NO, MMP, Procollagen은 독립표본 t검증을 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH Radical 소거능 측정

Radical 소거능을 측정하는 보라색의 DPPH 시약은 항산화 물질과 반응하면 탈색되는 성질을 갖고 있어 Radical 소거능 측정에 많이 쓰이는 방법이다[23]. Radical은 호흡 등과의 생리작용에 의한 독성의 발생으로 세포를 손상시키므로 여러 종류의 질병의 원인이 되고 있다. Radical 소거능

을 측정할 때 시료가 항산화 활성을 많이 가질수록 DPPH의 환원성을 높여 탈색이 된다[24]. 이러한 Radical을 억제하는 효과를 측정하기 위해 양하꽃 추출물 (ZMF)과 양하잎 추출물 (ZML)은 70% 에탄올로 희석하여 100 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 제조하였다. ZMF와 ZML 추출물은 농도별로 각 100 μL 와 0.2 mM의 DPPH 50 μL 를 96well에 혼합하고 30분간 착광 후 반응시킨 후 ELISA reader (Bio Tek, Co)로 517 nm 조건에서 흡광도를 측정하였다. Positive control은 70% 에탄올로 희석한 BHA (Butylated hydroxyanisole)를 사용하였다. Fig. 1과 같이 ZMF의 DPPH radical 소거능은 100 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 24.15 ~ 79.12%, ZML의 DPPH radical 소거능은 22.67 ~ 85.10%였다. ZMF와 ZML은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 높은 항산화 활성을 보였다. 이는 폴리페놀 함량과 유사한 경향임을 알 수 있다[25]. 양하는 건조 방법에 따라 DPPH Radical 소거능 측정값이 변화하여 생양하는 49.35%, 건양하 61.78%, 분말양하 76.61%의 항산화 활성을 보였고[26], 양하꽃의 착즙 추출 시료와 열수 추출 시료의 DPPH Radical 소거능 측정 실험에서는 착즙 추출 시료(55.70%)가 열수 추출 시료(45.78%) 보다 우수하였다[27]. 이 결과는 유효성분 함량과 항산화 활성이 에탄올 용매로 추출한 시료가 물 용매로 가열 추출한 시료에 비해 높은 것을 알 수 있다.

3.2. ABTS+ radical 소거능 측정

ABTS+ radical 소거능 측정법은 DPPH 항산화 활성 측정방법과 마찬가지로 항산화 물질과 반응하여 라디칼이 탈색하는 원리를 이용하여 항산화 효능을 측정하는 방법이다[28]. ABTS+는 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성되는 free radical로, 항산화 활성이 있는 시료에 의해 라디칼이 소거되면 탈색되어 색이 없어진다. Van den berg 방법을 응용하여 탈색된 시료의 흡광도 수치로 항산화 활성을 평가하였고[29], 양하꽃 추출물 (ZMF)과 양하잎 추출물 (ZML)의 ABTS+ radical scavenging activity 측정 결과는 Fig. 2와 같다. 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 ZMF은 89.89%, ZML은 83.68%로 ZML보다 ZMF의 항산화 활성이 우수하였고, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 99.72%, ZML은 99.87%로 ZMF와 ZML은 비슷한 우수한 항산화 활성을 나타냈다. 양하꽃의 착즙 추출 시료와 열수 추출 시료의 ABTS+ radical 소거능 측정 실험에서는 착즙 추출 시료(55.70%)가 열수 추출 시료(45.78%) 보다 우수하였다[27].

3.3. Superoxide Dismutase 유사 활성 측정

SOD(Superoxide Dismutase)는 생리활성을 나타내는 항산화 효소 중 하나로, 과산화수소는 SOD에 의해 생성되어 peroxidase 또는 catalase에 의해 물과 산소로 전환되어 항산화 역할을 하

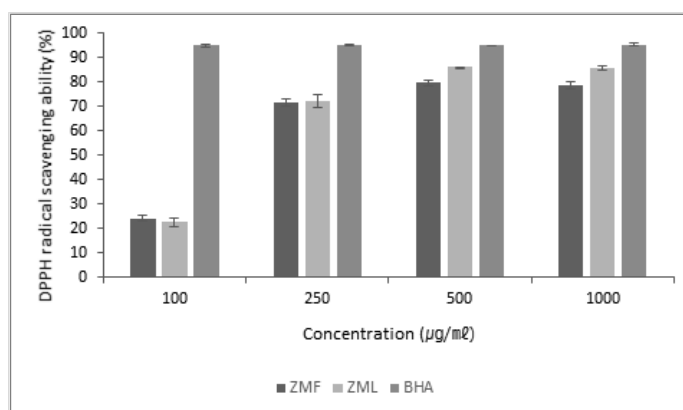


Fig. 1. DPPH radical scavenging ability (%) of depending on concentration from extracts of *Zingiber mioga*. ZMF(*Zingiber mioga* flower), ZML(*Zingiber mioga* leaf) extracted by ethanol, BHA in ethanol. Results are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments.

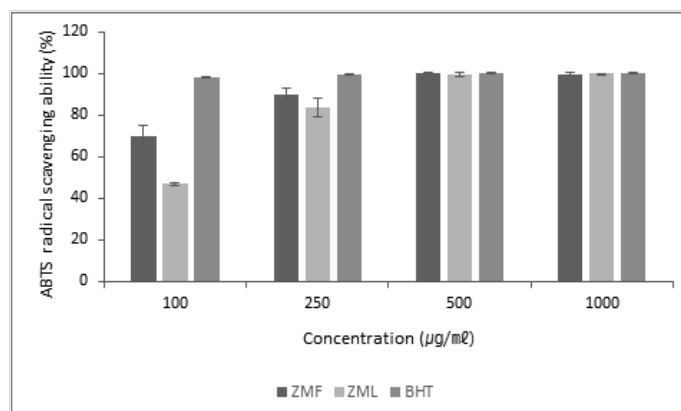


Fig. 2. ABTS+ cation radical scavenging activity(%) of depending on concentration from extracts of *Zingiber mioga*. ZMF(*Zingiber mioga* flower), ZML(*Zingiber mioga* leaf) extracted by ethanol, BHA in ethanol. Results are expressed as mean±SD of triplicate experiments.

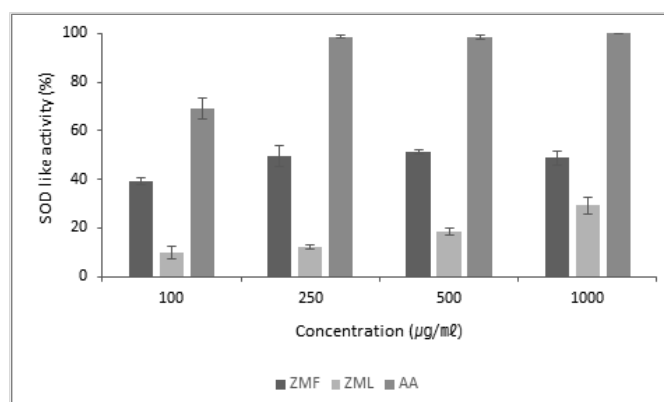


Fig. 3. SOD like activity(%) of depending on concentration from extracts of *Zingiber mioga*. ZMF(*Zingiber mioga* flower), ZML(*Zingiber mioga* leaf) extracted by ethanol, AA in ethanol. Results are expressed as mean±SD of triplicate experiments. * $p < 0.001$ compared with control.

고, 생체를 보호하는 기능을 한다[30]. SOD는 소의 적혈구에서 발견되어 현재까지 활발된 연구가 진행되고 있다[31]. SOD 유사 활성 물질은 SOD와 유사한 역할을 하고 phytochemical에 속하는 저분자 물질이다. SOD 유사 활성 측정은 Superoxide와 반응할 때 갈변하는 pyrogallol의 산화반응을 이용하여 측정한다. 염기성인 pyrogallol 수용액은 산소를 흡수하여 흑갈색으로 변색되는데 이러한 탈색된 시료의 흡광도 수치로 항산화 활성을 평가하였다. SOD 유사 활성 측정 결과는 Fig. 3과 같다. 250 µg/ml 농도에서 ZMF

은 49.48%, ZML은 11.95%로 ZML보다 ZMF의 항산화 활성이 우수하였고, 1000 µg/ml 농도에서는 48.83%, ZML은 18.82%로 ZMF이 ZML보다 우수한 항산화 활성을 나타냈다.

3.4. MTT Assay

양하(*Zingiber mioga*) 추출물을 화장품소재로 활용하기 위해 Raw 264.7 세포를 사용하여 세포독성을 확인하였다. 세포독성실험으로 일반적으로 사용되는 MTT assay를 실시하였다. MTT assays는 전자전달계에 존재하는 탈수소 효소가

tetrazolium salt를 분해하여 formazan을 생성하는 원리를 이용하며, 살아있는 세포를 정량적으로 평가할 수 있고[32], 많은 시료를 간단히 빠르고 객관성 있게 판독할 수 있어 배양된 세포 독성 실험에 주로 사용되어 진다[33]. 이 방법은 대사 과정이 정상적인 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 노란색의 tetrazolium salt인 MTT가 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan 결정으로 환원되는 원리를 이용한다. MTT assay는 항산화 생리활성 효과가 좋은 ZMF만 진행하였다. ZMF 추출물의 농도는 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였고 그 결과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서 세포생존율이 90% 이상으로 나타났다. 이 결과를 토대로 ZMF의 cell NO 활성측정 농도를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이내의 범위에서 진행하였다. ZMF의 세포생존을 측정 결과는 Fig. 4과 같다.

3.5. NO (Nitric oxide) 측정

NO의 생성은 L-arginine이 L-citrulline으로 산화되는 과정에서 생성되며, 신경 전달 체제, 면역반응 등 여러 생물학적 신호에 관여하나, 과도한 NO 생성은 세포의 파괴, 염증 반응을 증가시킨다고 알려져 있다[34]. NO 측정은 cell 상층액을 안전한 형태인 질산염으로 환원시켜 griess reagent를 사용하여 측정하였다. 염증원인 LPS 등으로 활성화된 대식세포는 사이토카인(proinflammatory cytokine)과 NO를 생성하여 염증성 질환을 유도한다[35, 36]. NO 측정은 항

산화 생리활성 효과가 좋은 ZMF만 진행하였다. LPS 처리군인 control군은 LPS 무처리군 Normal군 보다 약 4배의 NO 생성을 나타내었고, ZMF 추출물은 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 결과 농도가 증가할수록 ZMF는 각 107.1, 108.4, 110.7, 113.7%의 NO 발현량이 증가되었다($p < 0.01$). ZMF 추출물의 NO 저해능의 결과는 Fig. 5와 같다.

3.6. Matrix metallo proteinases (MMP-1)의 저해활성 측정

콜라겐은 피부의 결합조직을 구성하는 성분으로 콜라겐의 분해가 감소하면 피부의 탄력 강화와 주름 생성을 방지하는 효과가 있다[37]. MMP-1은 콜라겐에 작용하는 단백질 분해 효소이므로 MMP-1 활성의 억제는 collagen 분해를 감소시켜 피부탄력을 강화할 것이라는 사실을 예측할 수 있다. MMP-1의 저해활성 측정은 항산화 생리활성 효과가 좋은 ZMF만 진행하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well 농도로 분주하여 24시간 동안 방치하였다. 배양된 배지를 제거하고 PBS를 첨가한 후 자외선을 조사한다. 이때 MMP-1의 발현을 증가시키기 위하여 TNF- α 를 10 ng/ml 농도로 첨가하여 시료를 농도 별로 전처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 세포의 배양액을 MMP-1 biotrack activity assay kit (Amersham Bioscience, USA)을 이용하여 측정하였다. TNF- α 무처리군과 처

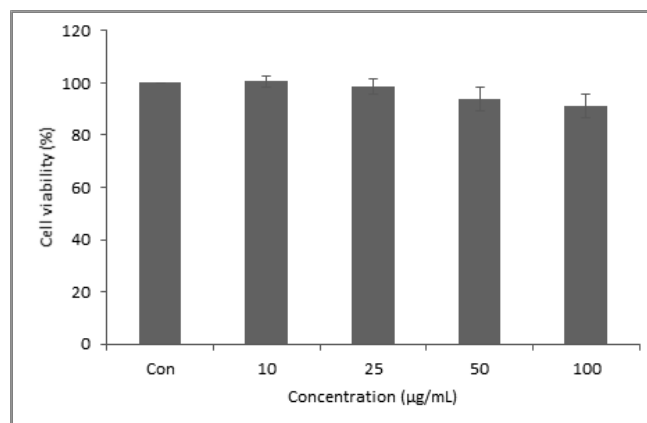


Fig. 4. Cell viability of depending on concentration of ZMF using MTT assay. ZMF (*Zingiber mioga* flower) extracted by water. The data illustrate the mean \pm SD of three separate experiments.

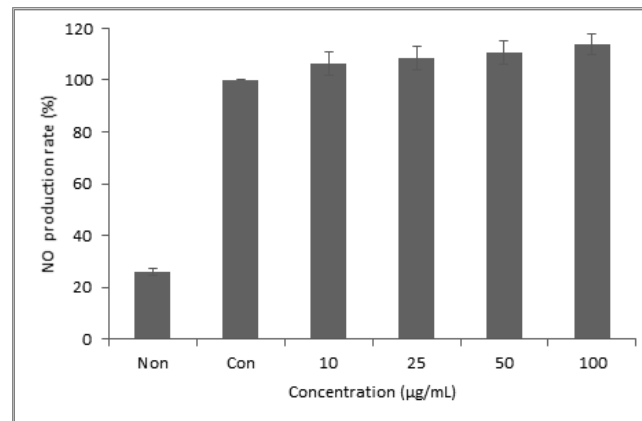


Fig. 5. Inhibitory effects of extracts of ZMF on the production of NO Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were cultured with LPS in the presence or absence of sample for 24 hours to determine the level of NO. Nor : LPS not induced group, Cont : LPS induced group. ZMF extracted by water. The data show the mean \pm SD of three separate experiments. *p < 0.05, ** p < 0.01 compared with control.

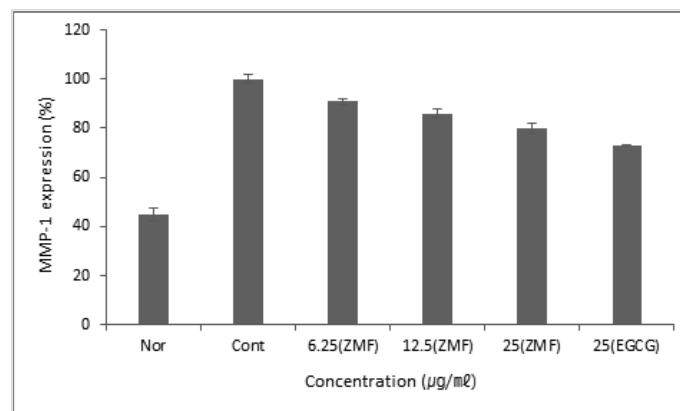


Fig. 6. MMP-1 inhibition rate of ZMF on macrophage (Raw 264.7). The cells were treated with various concentrations of ZMF for 48 hours. The contents of MMP-1 in culture media was determined by the MMP-1 ELISA kit as detailed under the materials and methods. ZMF; *Zingiber mioga* flower. The data show the mean \pm SD of three separate experiments (Significant as compared to control. *p < 0.05). Nor; normal (not UVB), Cont; control (UVB, not treated ZMF).

리군은 MMP-1을 각각 45, 100.0% 생산하여 TNF- α 처리 시 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하였다. ZMF를 농도별(6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하였을 때 농도가 증가할수록 ZMF는 각 9, 14, 20%의 MMP-1의 저해활성 효과를 나타내었다(p < 0.05). ZMF는 자외선에 의한

MMP-1의 활성을 조절하여 콜라겐 분해를 억제하고 콜라겐 생합성을 촉진함으로써 광노화를 억제하여 피부 노화 개선에 효과적인 천연 성분임을 입증하였다. ZMF의 MMP-1 저해활성은 다음과 같이 측정하였다(Fig. 6).

3.7. Procollagen type I C-peptide 측정

피부의 대부분을 차지하는 진피는 피부의 유연성, 표면장력, 탄력성 등의 특징을 갖고 있어 진피의 콜라겐 합성과 분해는 피부의 노화 및 재생 과정에서 중요한 역할을 하고 있다[38]. Procollagen type I C-peptide 측정은 항산화 생리활성 활성 효과가 좋은 ZMF만 진행하였다. 피부를 이루는 주 단백질인 콜라겐은 피부조직의 진피에 존재하는 섬유아세포에서 procollagen 형태로 합성되고 자외선에 의해 procollagen의 양이 감소하면 콜라겐 양이 감소한다. 프로펩타이드와 MMP-1의 함량을 측정하면 활성화된 콜라겐 함량을 측정할 수가 있다. ZMF를 농도별(6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였을 때 농도가 증가할수록 ZMF는 각 99, 105, 111%의 유의성 있는 procollagen 합성량을 나타내었다. 자외선에 의한 procollagen 합성량 활성을 조절하여 콜라겐 분해를 억제하고 콜라겐 생합성을 촉진함으로써 광노화의 억제 및 피부 노화 개선에 효과적인 천연 소재로서의 가능성을 확인하였다. ZMF의 procollagen 합성량을 다음과 같이 측정하였다 (Fig. 6). UVB (20 mJ/cm^2)는 콜라겐 분해의 자극원으로 radical에 의해 MMPs 활성을 증가시켜 진피 내의 콜라겐 등의 분해에 영향을 미치고, MMPs의 증가는 광노화에 많은 영향을 미친다 [39]. 따라서, 광노화를 예방하기 위해서는

MMPs를 생성시켜 콜라겐 합성을 증가시킬 수 있는 화장품 소재를 개발하는 것이 중요하다.

4. 결론

양하(*Zingiber mioga*)의 화장품 소재 활용 가능성을 알아보기 위하여 항산화, 항염증, 주름개선 효과에 대한 생리 활성 평가를 실시하였다. 양하꽃 추출물 (ZMF)과 양하잎 추출물 (ZML)의 DPPH radical 소거능 측정결과 ZMF의 DPPH radical 소거능은 100 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 24.15 ~ 79.12%, ZML의 DPPH radical 소거능은 22.67 ~ 85.10%였다. ZMF와 ZML은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 높은 항산화 활성을 보였다. 이는 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 시료의 폴리페놀 함량과 관련이 있는 것으로 사료된다. ZMF와 ZML의 ABTS+ radical 소거능 측정 결과는 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 ZMF는 89.89%, ZML은 83.68%로 ZML보다 ZMF의 항산화 활성이 우수하였고, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 99.72%, ZML은 99.87%로 ZMF와 ZML은 비슷한 우수한 항산화 활성을 나타냈다. SOD 유사 활성 측정결과는 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 48.83%, ZML은 18.82%로 폴리페놀 함량이 높은 ZMF가 ZML보다 우수한 항산화 활성을 나

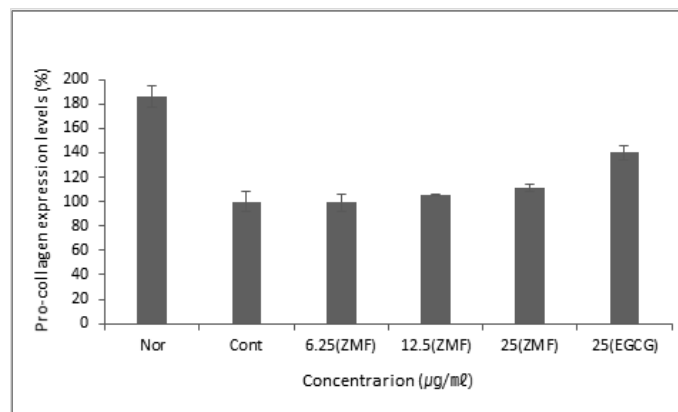


Fig. 7. Effect of ZMF in the expression of pro-collagen synthesis. Raw 264.7 cells were incubated for 24 hours in DMEM medium containing 10% FBS, were treated with various concentrations of ZMF for 48 hours. The supernatant was collected from each well and type I procollagen was determined by EIA kit. The values shown represent mean \pm SEM of three different assays.

타냈다. Nitric oxide 저해 활성 측정 결과는 ZMF를 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 농도가 증가할수록 ZMF는 각 107.1, 108.4, 110.7, 113.7%의 NO 발현량이 저해되어 ZMF의 우수한 항염증 효과를 입증하였다. ZMF의 MMP-1 저해활성은 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 20%의 저해활성을 나타냈고, pro-collagen type-1 합성량은 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 110% 이상 합성되었으므로 ZMF는 주름개선 소재로 주목할만 하다.

본 연구로 양하의 항산화, 항염증, 주름 개선 효과가 검증되었으므로 기능성 천연 화장품 재료로 활용가치가 클 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 장안대학교 2020년도 연구비 지원에 의하여 연구된 것으로 이에 감사드립니다.

References

1. W. K. Whang, Y. A. Lee, H. J. An, Y. K. Jo, "Buying Attitude on Cosmetics of Women with Life Style", *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, Vol.8, No.2, pp. 117-126, (2010).
2. Y. S. Han, E. S. Jung, "A study of correlation between antioxidant activity and whitening effect of plant extracts", *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, Vol.1, No.1, pp. 11-22, (2003).
3. N. Asano, E. Tomioka, H. Kizu, K. Matsui, "Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*", *Carbohydrate Research*, Vol.253, pp. 235-245, (1994).
4. C. S. Eun, E. Y. Hwang, S. A. Yang, M. H. Yu, "Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Barely sprout extract", *J. Life Sci.*, Vol.26, NO.5 pp. 537-544, (2016).
5. Y. J. Shin, "Antioxidant Activities of Medicinal Plant Extracts", *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.42, No.4, pp. 512-519, (2013).
6. A. J. Bailey, S. P. Robinson, G. Balian, "Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen", *Nature* 251, pp. 105-109, (1974).
7. H. Y. Kim, S. I. Y, J. T. Lee, "Antioxidant Effect of Solvent Fraction from *Sanguisorbae officinalis* L. with Acetone", *J. Appl. Biol. Chem.*, Vol.54, No.2, pp 89-93, (2011).
8. H. Lee, G. S. Jin, Y. R. Son, H. J. Kwon, B. W. Kim, "Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities of Desmodium heterocarpon Extract in RAW 264.7 Cells", *J. Life Sci.*, Vol.28, NO.2, pp. 216-222, (2018).
9. J. W. Lee, S. U. Chon, S. K. Han, D. G. Choi, J. Ryu, "Effects of antioxidant and flavor components of *Zingiber Miogar* Rosc", *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, Vol.15, pp. 203-209, (2007).
10. M. S. Cho, "Food Materials and Use Method in Donguibogam", *Youlchon org.*, pp. 569, (2012).
11. D. K. Ahn, "Illustrated Book of Korean Medicinal herbs", *Kyhaksa*, p. 578, (2003).
12. K. C. Jang, S. C. Kim, E. Y. Song, K. H. Kim, H. M. Kwon, S. H. Kang, K. H. Park, Y. H. Jung, "Isolation and substances from the rhizome of *Zingiber Miogar* Rosc", *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, Vol.46, pp. 246-250, (2003).
13. G. S. Jeong, S. I. Im, B. M. Jung, Comparison of nutritional constituents of native Yangha (*Zingiber Miogar*) in Yeosu and Cheju area. *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.37, pp. 715-716, (2005).
14. J. H. Shin, S. J. Lee, N. J. Sung, "Effects of *Zingiber Miogar* root and *Zingiber officinale* on the lipid concentration in hyperlipidemic rats", *J. Korean soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.31, pp. 679-684, (2002).
15. M. S. Blois, "Antioxidant determination by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol.181, pp. 1199-1200, (1958).

16. N. Fellegrini, R. Ke, M. Yang, C. Rice-Evans, "Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay", *Method Enzymol*, Vol.299, pp. 379-389, (1999).
17. S. Marklund, G. Marklund, "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase", *Eur. J. Biochem*, Vol.47, pp. 469-474, (1974).
18. 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, pp. 936-942, (1987).
19. L. Marcocci, J. J. Maguire, M. T. Droylefaix, L. Packer, "The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. Biochemical and Biophysical Research Communications", Vol.201, pp. 748-755, (1994).
20. J. Gross, C. M. Lapierre, "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay", *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol.54, pp. 1197-1204, (1962).
21. M. Krupsky, A. Fine, J. L. Berk, R. H. Goldstein, "Retinoic acid-induced inhibition of type I collagen gene expression by human lung fibroblasts", *Biochimica. Biophysica. Acta*. Vol.1209, pp. 335-341, (1994).
22. E. K. Park, S. R. Ahn, D. H. Kim, E. W. Lee, H. J. Kwon, B. W. Kim, T. H. Kim, "Effects of unripe apple polyphenols on the expression of matrix metalloproteinase -1 and type-1 procollagen in ultraviolet irradiated human skin fibroblasts", *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*, Vol.57, pp. 449-455, (2014).
23. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Lebensm-Wiss. u-Tech*, pp. 28, 25-30, (1995).
24. J. E. Ancerewicz, P. A. Migliavacca, B. Carrupt, F. Testa, R. Bree, J. P. Zini, S. Tillerment, D. Labidalle, A. M. Guyot, C. A. Chauvent-Monges, A. L. Ridant, "Structure property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants", *Free Rad. Biol. Med*, Vol.25, pp. 113-120, (1998).
25. J. S. Lee, H. H. Jang, G. Y. Song, "Changes in Quality Characteristics and Bioactivity of Rehmanniae Radix Jung Kwa Obtained by Different Heat Processing Times", *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*, Vol.11, pp. 59-69, (2013).
26. Y. D. Kim, "Physicochemical Components and Physiological Activities in Root and Aerial Parts of *Zingiber Miogar* R", Sunchon National University, pp. 55-57, (2017)
27. H. J. Lee, N. W. A. J. Kim, "Antioxidant Activities and Quality Characteristics *Sulgidduk* Prepared with Yangha Buds (*Zingiber Miogar* R)", *J. Kor. Soc. Food Cult.*, Vol.29, No.6, pp. 615-622, (2014).
28. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements", *J. Agricultural and Food Chemistry*, Vol.53, No.10, pp. 290-4302, (2005).
29. R. Van den Berg, G. R. M. M. Haenen, H. Van den Berg, A. Bast, "Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures", *Food Chem*, Vol.66, pp. 511-517, (1999).
30. J. V. Bannister, G. R. Bannister, "Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase", *J. Crit Rev Biochem*, Vol.22, pp. 111-180, (1987).
31. J. M. McCord, I. Fridovich, "Superoxide dismutase an enzyme function for

- erythrocuprein(Hemocuprein). *J. Biol. Chem*, Vol.244, No.22, p. 6049, (1969).
32. J. G. Park, B. S. Karmar, S. M. Steninberg, J. Carmichael, J. M. Collins, J. D. Minna, A. F. Gazdar, "Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay", *J. Cancer Res*, Vol.47, pp. 5875-5884, (1987).
 33. T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods.*, Vol.65, pp. 55-63, (1983).
 34. S. Kwon, R. L. Newcomb, S. C. George, "Mechanisms of synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells", *Nitric Oxide*, Vol.5, No.6 pp. 534-546, (2001).
 35. T. J. Guzik, R. Korbut, T. Adamek-Guzik. "Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation", *Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol.54, No.4 pp. 469-487, (2003).
 36. J. K. Kundu, Y. J. Surh, "Emerging avenues linking inflammation and cancer", *J. Free Radical Biology and Medicine*, Vol.52, No.9 pp. 2013-2037, (2012).
 37. H. Nagase, J. F. Woessner, "Matrix metalloproteinases", *J. Biol. Chem*, Vol.274, pp. 21491-21494, (1999).
 38. J. M. Yoo, Y. J. Kang, H. B. Pyo, E. S. Choung, S. Y. Park, J. H. Choi, G. J. Han, C. H. Lee, T. J. Kim, "Anti-wrinkle effects of Korean rice wine cake on human fibroblast", *J. Life Sci*, Vol.20, pp. 1838-1843, (2010).
 39. M. Martínez-Esparza, C. Jiménez-Cervantes, F. Solano, J. A. Lozano, J. C. García-Borrón, "Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells", *Eur. J. Biochem*, Vol.255, No.27 pp. 139- 146, (1998).