

이너뷰티 소재로서의 시계꽃 추출물의 활용 가능성

이재남^{1,*} · 김영삼^{2,†}

¹건국대학교 산업대학원 화장품학과, 조교수

²건국대학교 산업대학원 이미지산업학과, 조교수

(2020년 9월 30일 접수: 2020년 10월 28일 수정: 2020년 10월 29일 채택)

Availability of *Passiflora Caerulea* Extract as Inner Beauty Material

Jae-Nam Lee^{1,*} · Young-Sam Kem^{2,†}

^{1,*} Department of Cosmetology, Graduate School of Engineering, Konkuk University,
120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea

^{2,†} Dept. of Image Industry, Graduate School of Engineering, Konkuk University
Seoul, 05029, Korea

(Received September 30, 2020; Revised October 28, 2020; Accepted October 29, 2020)

요약 : 본 연구는 시계꽃 추출물의 생리활성 효능을 확인하여 이너뷰티 소재로서의 활용 가능성을 검증하여 기초자료를 제공하고자 한다. 실험 방법으로는 항산화, 항염증, 항노화 효과를 확인하기 위하여 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거능, RAW 264.7 대식세포와 HDF 세포 내에서의 세포 독성 및 NO 생성 억제 효과, HDF 세포에서의 MMP-1의 발현 억제능 효과를 측정하였다. 실험 결과, 시계꽃 추출물의 폴리페놀함량과 플라보노이드 함량은 10 mg/mL의 농도에서 각 157 mg/g, 173.5 mg/g의 우수한 함량을 확인하였고, DPPH radical 소거능을 확인하였다. RAW 264.7 대식세포와 HDF 세포에서는 시계꽃 추출물에 대해 세포독성은 나타나지 않았다. 또한 RAW 264.7 대식세포에서의 NO 생성 억제를 통해 100 μ g/mL에서 69.3%의 항염증 효과를 확인하였으며, HDF 세포에서 MMP-1의 발현 억제능이 유의하게 억제되는 것을 확인하였다. 이상과 같이 본 연구의 시계꽃 추출물은 항산화 효과와 항염증 효과, 피부세포에 대한 낮은 독성, MMP-1의 발현 억제를 통한 항노화 효과가 확인됨에 따라 다양한 이너뷰티 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

주제어 : 시계꽃 추출물, 항산화, 항염증, 이너뷰티

Abstract : This study attempted to investigate the physiological activities of *Passiflora caerulea* extract and provide basic data needed to verify its availability as an inner beauty material. To examine its anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-aging effects, the followings were measured: total polyphenol contents, total flavonoid contents, DPPH radical scavenging activity, cytotoxicity and NO inhibition effects in RAW 264.7 macrophage cells and HDF cells and MMP-1 inhibitory effects in

[†]Corresponding author
(E-mail: gracehelen@konkuk.ac.kr)

HDF cells. The results found the followings: First, polyphenol and flavonoid contents were great with 157 mg/g and 173.5 mg/g respectively at 10mg/mL, and DPPH radical scavenging activity was confirmed. In RAW 264.7 macrophage cells and HDF cells, no cytotoxicity was observed for *Passiflora caerulea* extract. In addition, 69.3% anti-inflammatory effects were found at 100 μ g/mL through NO inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. In addition, a significant inhibition of MMP-1 expression in HDF cell was confirmed. The above results confirmed the anti-oxidant and anti-inflammatory effects of *Passiflora caerulea* extract, low toxicity on skin cells and its anti-aging effects by inhibiting MMP-1 expression. Therefore, it appears that *Passiflora caerulea* extract would be available as diverse inner beauty materials.

Keywords : *Passiflora caerulea* extract, anti-oxidant, anti-inflammatory, Inner Beauty

1. 서론

외면의 아름다움과 내면의 신체 건강 유지 및 질병 등의 예방에 도움을 주는 건강지향적 식품, 미용건강제품인 이너뷰티에 대한 소비자의 관심과 요구가 증가하고 있다. 이너뷰티는 기존의 바르는 화장품과 달리 꾸준한 섭취를 통해 건강과 피부미용 효과를 나타내는 먹는 제품으로[1, 2] 다양한 제형 및 효과를 가지며[3], 코스메틱 푸드, 먹는 화장품, 보조식품 등의 다양한 명칭으로 불린다. 이러한 이너뷰티는 피부의 건강과 식습관의 연관성 인식, 건강하고 아름다운 피부는 신체 내부로부터 시작된다는 인식하에 이너뷰티에 대한 소비자들의 관심과 시장 점유율이 증대되고 있다.

피부는 자외선, 환경오염물질과 같은 외부 환경적 요인, 신체의 생리적 요인, 영양학적 요인, 생활 습관적 요인[4], 스트레스로 인한 정신적 요인, 과도한 가공식품의 섭취 등의 다양한 요인에 의해 영향을 받고 있다. 이와 같은 체내외의 여러 가지 원인으로 생성된 반응성이 강한 자유라디칼과 활성산소는 여러 생체물질과 반응을 일으키며, DNA 및 RNA, 단백질 세포막 세포구조의 손상 및 염증 유발, 알레르기, 암, 피부노화 등에 영향을 준다[5, 6]. 이러한 질병을 초래하는 위험요소인 자유라디칼과 활성산소를 효과적으로 제거할 수 있는 방법 중의 하나는 천연 항산화제의 섭취이다[7]. 따라서 건강하고 아름다운 신체와 피부를 위해서는 항산화 작용 등의 효과를 지닌 인체에 무해한 천연물 소재 성분의 이너뷰티 제품 개발의 필요성이 요구되고 있다. 특히, 국내

에서는 자색 백향과의 재배 면적과 수요가 증가함에 따라 백향과의 꽃인 시계꽃을 활용한 가공식품이나 이너뷰티 천연 원료에 대한 연구가 필요하다.

시계꽃(*Passiflora caerulea*)은 라세모사 혹은 꽃시계덩굴이라고 불린다. 대부분 열대와 아열대 지역에서 발견되는 식물로 전 세계적으로 500여 종이 분포한다[8, 9]. 꽃은 여름부터 초가을에 걸쳐 개화하고 꽃잎의 모양은 시계처럼 생겼으며 열매와 꽃은 식용이나 약제로 사용하고 있다. 맛은 쓰면서 따뜻한 성질로 통증을 줄여주고, 긴장감을 풀어주는 효능을 가지고 있어 신경통과 생리통, 불면증과 불안 증상 해소에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 또한 남미대륙에서는 눈에 종기가 나거나 피부염이 생기면 약제로 이용하기도 하였다. 일반적으로 *Passiflora* 종은 알칼로이드, 페놀, 글리코실 플라보노이드 및 시안화 화합물과 같은 여러 가지 화합물을 함유하고 있으며[9], *Passiflora incarnata*의 대표적인 C-glycoside 플라보노이드 종류에는 vitexin, isovitexin, orientin, isoorientin등이 있다[10]. 특히, 시계꽃 추출물은 항불안제 및 진해제의 성질[11, 12], 경련을 조절하는 기능을 갖고 있으며[13]. 대장염에 대한 실험에서 항염증 및 항산화 효과[14] 등이 보고되었다. 최근에는 시계꽃추출물분말의 지표성분 Vitexin 분석법[15] 등의 시계꽃 추출물에 대한 연구들이 진행되고 있으나, 본 연구와 같이 시계꽃 추출물을 이너뷰티 소재로서의 활용에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 시계꽃 추출물의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 통한 항

산화활성과 DPPH radical 소거능, RAW 264.7 대식세포와 HDF 세포에 대한 세포독성 및 NO 생성억제효과, MMP-1 발현 억제능을 측정하여 시계꽃 추출물의 이너뷰티 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 한다.

2. 실험

2.1. 실험재료

2.1.1. 시료준비

본 연구에 사용된 시계꽃은 전라도 함양에서 채취하여 건조시킨 것을 실험재료로 구입하였다. 시료의 추출은 시계꽃 100 g에 70% 에탄올 용액에 중량의 10배의 양을 가한 후 72시간 실온에 방치하여 추출하였다. 추출액만 분리하기 위하여 8000 rpm에서 20분간 원심분리 후 여과지(whatman No.2)를 이용하여 상층액을 여과하였다. Rotary evaporator (EYELA, Japan)로 추출 용매인 에탄올을 제거 하였으며, 감압 농축 후 동결건조를 실시하여 액상의 추출물을 분말형태로 얻어 본 실험의 시료로 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정의 경우 AOAC (Association of Official Agricultural Chemists)의 Folin-Denis 방법을[16] 일부 수정하여 Folin-Denis reagent가 추출물의 페놀성 화합물에 의해서 환원시켜 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리를 통해 함량을 정량하였다. 본 연구에 사용된 시계꽃 추출물을 농도별(0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL)로 희석한 후 추출물 400 μ L와 Folin-Denis reagent (Sigma-Aldrich, USA) 시약 400 μ L를 혼합하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 이후 10% Na_2CO_3 용액(Samchun, Korea) 400 μ L를 혼합하여 60분 동안 실온에서 차광된 상태로 반응시켰고, 반응 후 상등액 200 μ L씩을 96 well plate에 분주한 후에 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3회 반복하여 동일한 조건으로 실험 후 평균값을 사용하였으며, 표준물질은 Caffeic acid (Sigma-Aldrich, USA)로 표준 검량선을 구한 후 시계꽃 추출물의 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

2.2.2. 총 플라보노이드 함량 측정

본 연구 시계꽃 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Moreno방법을[17] 이용하여 측정하였다. 시계꽃 추출물을 농도별(0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL)로 희석한 후 추출물 100 μ L와 10% aluminum nitrate (Sigma-Aldrich, USA) 20 μ L, 1M potassium acetate (Sigma-Aldrich, USA) 20 μ L, ethanol (Duksan, Korea) 860 μ L를 순서대로 혼합하여 실온에서 40분 동안 반응시켰다. 반응 후 원심 분리기로 부유물을 가라앉힌 다음 200 μ L씩 96 well plate에 분주하여 415 nm에서 흡광도를 측정하고, 동일한 조건을 이용하여 3회 반복적으로 실험한 후 평균값을 사용하였다. 표준물질은 quercetin (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 표준 검량선을 구한 후 시계꽃 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

2.2.3. DPPH 라디칼 소거능 측정

본 연구에서는 시계꽃 추출물의 DPPH radical 소거활성은 안정한 상태의 활성산소인 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH; Sigma-aldrich, USA) 용액을 사용하여 측정하였다[18]. 시계꽃 추출물을 각 농도별(0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL)로 희석한 후 96 well plate에 95% ethanol로 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L와 시료액 20 μ L를 첨가하였다. incubator 37°C에 30분 동안 반응시킨 후 microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, USA)를 이용하여 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 ascorbic acid를 사용하였다.

DPPH 라디칼소거활성(%)=

$$100 - \left[\left(\frac{\text{시료첨가군흡광도}}{\text{시료무첨가군흡광도}} \right) \times 100 \right]$$

2.2.4. 세포 배양

본 연구에 사용한 RAW 264.7 macrophage cell, HDF(Human Dermal Fibroblast) cell을 사용하였고, 한국세포주은행에서 구입하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)과 1% penicillin (100 IU/mL, GE Healthcare Life Sciences, USA), 1% streptomycin (50 μ g/mL, GE Healthcare Life

Sciences)를 High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, USA) 배지에 첨가하여 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포 주기는 36~48 시간으로 유지하며 계대배양 하였다.

2.2.5. Neutral red assay를 이용한 세포 생존율 측정

본 연구에서는 시계꽃 추출물의 세포 독성 평가를 통해 세포 생존율을 확인하고자 Neutral red (NR) assay를 이용하여 측정하였다[19]. 실험에 사용한 세포주는 RAW 264.7 macrophage cell과 HDF cell을 사용하였으며, 각 세포를 96 well plate에 well당 3×10^4 cells/well의 농도로 분주한 후 24시간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간 후 시계꽃 추출물을 농도별로 희석하여 처리한 다음 48시간 동안 추가 배양하였다. 이후 NR solution (Sigma-Aldrich, USA)이 1% 첨가된 무 혈청배지로 교환하여 3시간 동안 배양 후 현미경으로 NR의 결정화를 확인하였다. 10% formaldehyde 용액이 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 세포고정액으로 사용하여 각 well에 100 μ L씩 분주하여 20분 동안 실온에 방치하였다. 세포내의 NR를 추출하기 위해 NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 μ L씩 분주한 후, 세포 내의 NR을 추출하였다. 이후 microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 동일한 조건을 이용하여 3회 반복 실험으로 평균값을 측정하였으며, 다음의 식에 따라 세포생존율을 산출하였다.

세포 생존율(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

2.2.6. Nitric oxide (NO) 생성 저해능 측정

본 연구에서는 시계꽃 추출물의 항염 효과를 확인하기 위해 세포 배양액 내 NO (nitric oxide) 양을 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 96 well plate에 well당 5×10^4 cell/well의 농도로 분주한 후 24시간 동안 incubator(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 24시간 후 배양 후

control을 제외한 나머지 배지에 LPS (lipopolysaccharide)를 첨가하여 최종 농도가 1 μ g/mL가 되도록 처리하고, 시계꽃 추출물을 농도별로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 새로운 96 well plate에 griess reagent 100 μ L와 배양된 세포 배양 상층액 100 μ L을 가하여 차광상태에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 다음의 식에 따라 NO 생성 저해능을 산출하였다.

NO 생성 저해능(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

2.2.7. HDF cell에서의 MMP-1의 발현 억제능 측정

본 연구에서는 시계꽃 추출물이 MMP-1 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HDF cell를 96 well plate에 well당 3×10^4 씩 부착시켜 배양하였다. 12시간 후 상층액을 버리고 DMEM에 녹인 추출물을 농도별로 처리한 후 UVB를 20분간 조사하고 24시간 배양하였다. 배양 상층액 100 μ L를 96 well plate에 옮긴 후 coating buffer 100 μ L을 첨가하여 고정시킨 후, 다시 배양 상층액을 제거한 다음 PBS-T (PBS, 0.05% Tween-20)로 washing을 하고 blocking buffer (PBS, 0.1% BSA) 처리 후 37°C에서 1시간 동안 방치시킨 후 PBS-T로 washing 하였다. blocking solution으로 1,000배 희석한 primary antibody (anti-MMP-1 mouse antibody)를 처리한 후, 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 이후 PBS-T로 washing 후 4,000배 희석한 secondary antibody (alkaline phosphate conjugated anti-mouse IgG antibody)를 각 well에 처리하여 37°C에서 1시간 방치시켰다. 마지막으로 PBS-T로 3회 washing하고, 1 mg/mL의 농도로 녹인 p-nitrophenyl phosphate (in 9.7% diethanolamine buffer, 0.5 mM MgCl₂, pH 9.8)를 각 well에 처리 후 37°C 암실에서 1시간 동안 방치시켜 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. 통계 처리

본 실험은 모두 3회 이상 동일한 조건에서 측

정한 결과를 사용하였다. 평균 \pm 표준편차 (Mean \pm SD)로 표기 하였고, 통계 처리는 SPSS Window Version 20.0 (SPSS Inc., st. Chicago, Illinois, USA)을 이용하여 분석하였다. 유의성 검증은 Student t-test로 실시하였으며, 실험 결과 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 폴리페놀 함량 측정 결과

폴리페놀은 식물이 자외선, 활성산소, 포식자로부터 자신을 보호하기 위해 만든 물질로 분자구조 내에 phenolic hydroxyl기를 가지고 있으며 자유라디칼의 형성을 방지하는 특성을 가지고 있다[20]. 또한 인체 건강에 중요한 천연물질 중 하나로 항염증, 항노화, 항암 및 심혈관계 질환과 같은 만성질환의 예방에 관련이 있다고 보고되었다[21-23]. 본 연구에서는 시계꽃 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 총 폴리페놀 함량을 측정하여 Fig. 1에 그 결과를 나타내었다. 시계꽃 추출물을 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL 농도로 처리 시 8.69, 30.28, 67.37, 94.53, 157.07 mg/g의 높은 총 폴리페놀 함량을 나타냈으며, 농도가 증가할수록 폴리페놀 함량이 증가하는 경향을 확인하였다. Choi *et al.*의 연구[24]에서는 페놀류 화합물들의 함량이 높아질수록 항산화 활성이 높다고 보고됨에 따라 본 연구의 시계꽃 추출물에 다량

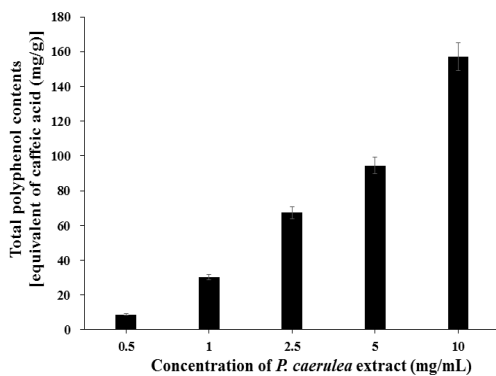


Fig. 1. Total polyphenol of *Passiflora caerulea* extract. The results are presented as the mean \pm standard of three independent experiments.

함유되어 있는 폴리페놀 함량이 항산화 활성을 나타낼 것으로 사료된다.

3.2. 총 플라보노이드 함량 측정 결과

플라보노이드는 폴리페놀과 같이 채소류, 식물, 곡물, 과실류 등에도 풍부하게 함유되어 있으며 [25, 26], 산화스트레스를 감소시키는 역할을 한다. 또한 넓은 범위의 활성산소종의 소거제 (scavenger) 및 지질과산화 억제제로 알려져 있어 [27] 의약품과 기능성 식품, 화장품 등 많은 분야에서 활용되고 있다. 본 연구에서는 시계꽃 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 총 플라보노이드 함량을 측정하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 시계꽃 추출물을 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL 농도로 처리 시 28.98, 42.31, 68.31, 125.63, 173.50 mg/g의 총 플라보노이드의 함량이 확인 되었고, 농도가 증가할수록 높아지는 경향을 확인하였다. Jo *et al.* 연구[28]에서는 플라보노이드 함량이 높은 아마란스 보라색꽃 메탄올 추출물에서 항산화 활성이 보고되었다. 이와 같이 본 연구의 시계꽃 추출물에서도 플라보노이드 함량이 다량 확인됨에 따라 이너뷰티 소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

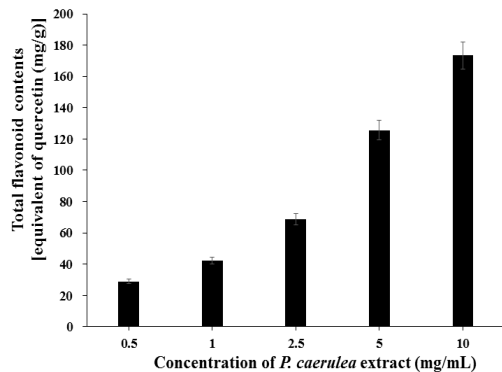


Fig. 2. Total flavonoid of *Passiflora caerulea* extract. The results are presented as the mean \pm standard of three independent experiments.

3.3. DPPH 라디칼 소거 활성 측정 결과

Phenolic acids, flavonoid 및 기타 페놀성 물질은 환원력이 클수록 DPPH 라디칼의 소거 활성이 높으며[29, 30], free radical은 인체의 지질 또는 단백질과의 반응을 통해 노화의 원인이 되

는 것으로 알려져 있다[31]. 본 연구에서는 시계꽃 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 시계꽃 추출물을 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL 농도로 처리 시 24.18, 34.56, 43.92, 62.55, 81.31%의 radical 소거활성을 보여 시계꽃 추출물의 항산화 활성을 확인하였으며, 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가하는 경향을 확인하였다. You & Moon[32]의 구절초 꽃 추출물 연구에서는 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 높은 추출물에서 DPPH radical 소거능이 높게 나타난다고 보고하였다. 이와 같이 본 연구의 시계꽃 추출물에서도 DPPH radical 소거 활성이 확인됨에 따라 이너뷰티 소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

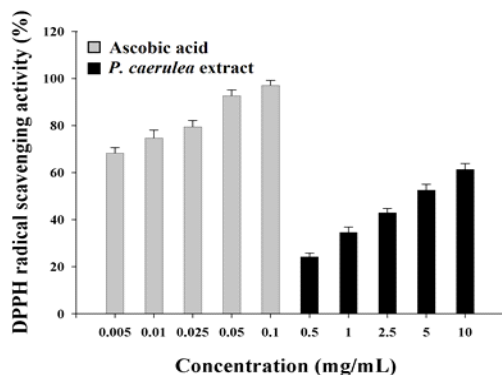


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of *Passiflora caerulea* extract. The results are presented as the mean \pm standard of three independent experiments.

3.4. Neutral red assay를 이용한 세포 생존율

3.4.1. RAW 264.7 대식세포의 세포독성 측정 결과

본 연구에서는 시계꽃 추출물의 RAW 264.7 대식세포에 대한 세포독성을 확인하기 위하여 NR assay를 수행하여 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. RAW 264.7 macrophage cell에 시계꽃 추출물을 농도별로 처리하여 세포독성을 측정하였다. 무 처리군인 control 생존율 100%로 보았을 때, 시계꽃 추출물의 5, 10 μ g/mL 처리 농도까지는 각 96.86, 92.84%를 보여 90% 이상의 세포 생존율이 나타났고, 25, 50, 100 μ

g/mL 농도에서는 각 87.71, 83.18, 80.47%로 80% 이상의 세포 생존율로 감소하였으나 세포 생존율에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다. 따라서 시계꽃 추출물이 RAW 264.7 macrophage cell에 대한 유의한 세포독성은 없는 것을 확인하였고, 이후 실험은 최고 농도 100 μ g/mL로 희석하여 진행하였다.

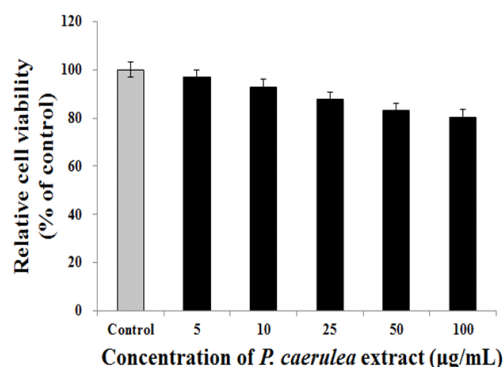


Fig. 4. Cytotoxicity in RAW 264.7 macrophage cells. The results are presented as the mean \pm standard of three independent experiments.

3.4.2. HDF cell의 세포독성 측정 결과

본 연구에서는 시계꽃 추출물의 HDF cell에 대한 세포독성을 확인하고자 NR assay를 수행하여 측정된 결과를 Fig. 5에 나타내었다. HDF cell에 시계꽃 추출물을 농도별로 처리하여 세포독성을 측정하였다. 시계꽃 추출물의 5, 10, 25 μ g/mL 처리 농도까지는 각 99.04, 98.60,

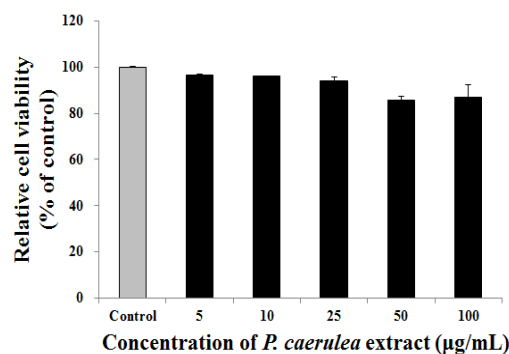


Fig. 5. Cytotoxicity in HDF cells. The results are presented as the mean \pm standard of three independent experiments.

96.63%로 90% 이상의 세포 생존율이 나타났으며, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 80% 이상의 세포 생존율로 감소하였으나 세포 생존율에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다. 따라서 시계꽃 추출물이 HDF cell에 대한 유의한 세포 독성이 없는 것을 확인하였고, 이후 실험은 최고 농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 희석하여 진행하였다.

3.5. RAW 264.7 대식세포의 NO 생성 억제능 측정 결과

염증 반응의 주요한 작용인자인 nitric oxide (NO)는 대부분 iNOS에 의해 생성되며, 체내에서는 방어기능, 신호전달 기능, 혈관확장 등의 생리작용을 하지만 과도하게 생성될 경우에는 염증을 일으켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다[33, 34]. 본 연구에서는 시계꽃 추출물이 염증성 질환을 나타내는 NO 생성 억제 활성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. RAW 264.7 대식세포에 염증 매개 물질인 LPS를 처리하여 염증을 유도한 후, 시계꽃 추출물을 농도별로 처리하여 NO 생성 억제 효과에 대한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. RAW 264.7 대식세포에 LPS는 유의하게 염증을 증가 시켰으며, 시계꽃 추출물을 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 결과 86.88%, 84.07%, 81.03%, 75.17%로 LPS 처리군에 비해 모든 농도에서 뛰어난 NO 생성 억제효과가 확인되었다. 특히, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

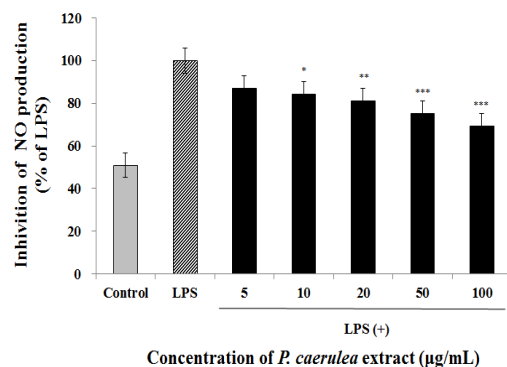


Fig. 6. Inhibitory effect of *Passiflora caerulea* extract on LPS-induced NO production by RAW 264.7 macrophage cells. The results are presented as the mean \pm standard of three independent experiments (* p <.05, ** p <.01, *** p <.001).

에서 69.32%의 NO 생성억제를 나타낸 시계꽃 추출물은 항염증 반응에 관여하는 것으로 확인되어 이너뷰티 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료된다.

3.6. HDF 세포에서 MMP-1의 발현 억제능 측정 결과

세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 분해시키는 중요한 효소 단백질인 matrix metallo proteinase (MMP)는 교원섬유와 더불어 피부노화 지표로 사용되고 있다[35, 36]. 특히, 교원질에 특이적으로 작용하는 Collagenase인 MMP-1의 활성이 높아지면 교원질이 분해되어 주름이 생성된다[37]. 본 연구에서는 시계꽃 추출물이 HDF 세포에서 MMP 발현 억제능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HDF 세포에 UVB 100 mJ/cm^2 를 조사하였다. 시료 무처리군은 Control로 설정하고 시계꽃 추출물을 농도별로 처리하여 Fig. 7에 나타내었다. 그 결과, 시계꽃 추출물의 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 농도에서 86.43%, 74.86%, 61.96%, 55.98%, 최고 농도인 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 50.79%로 MMP-1의 발현이 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 시계꽃 추출물은 교원섬유 콜라겐을 분해시키는 MMP-1의 발현을 감소시켜 피부의 노화 및 주름 형성을 억제할 수 있을 것으로 사료되어 이너뷰티 소재로서 활용이 가능할 것으로 판단된다.

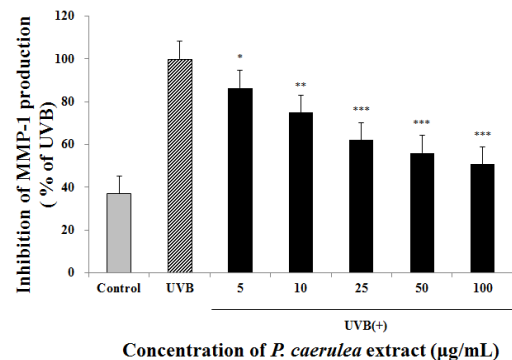


Fig. 7. Inhibitory effects of *Passiflora caerulea* extract on UVB-induced secretion of MMP-1 in HDF cells. The results are presented as the mean \pm standard of three independent experiments (* p <.05, ** p <.01, *** p <.001).

4. 결론

다양한 생리활성 성분을 함유하고 있으며 보다 높은 안전성과 기능성이 요구되는 천연소재의 이너뷰티 소재 개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 본 연구에서는 시계꽃 추출물을 70% 에탄올로 추출하여 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 통해 항산화 활성과 DPPH radical 소거활성, RAW 264.7 대식세포와 HDF cell에 대한 세포독성, NO 생성 억제 효과, MMP-1의 발현 억제를 확인함으로써 이너뷰티 소재로서의 활용가능성을 확인하고자 하였다. 연구 결과, 시계꽃 추출물은 10 mg/mL 농도에서 총 폴리페놀 함량 157.07 mg/g과 총 플라보노이드 함량 173.50 mg/g의 페놀성 화합물들이 함유되어 있는 것을 확인하였으며, 농도가 증가할수록 두 함량이 모두 증가하는 경향을 확인하였다. DPPH 라디칼 소거능은 10 mg/mL 농도로 처리 시 81.31%의 radical 소거활성을 보여 시계꽃 추출물의 항산화 활성을 확인하였으며, 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가하는 경향을 확인하였다. Neutral red assay를 이용한 세포 생존율 측정 결과에서 RAW 264.7 대식세포의 세포독성은 시계꽃 추출물 5, 10 μ g/mL 처리 농도에서 90%, 그 외 처리 농도에서는 80% 이상의 세포 생존율을 나타내어 세포독성이 없음을 확인하였다. 또한 HDF cell에 대한 세포독성은 시계꽃 추출물 5, 10, 25 μ g/mL 처리 농도까지는 90% 이상, 그 외 처리 농도에서는 80% 이상의 세포 생존율을 나타내어 세포독성이 없음을 확인하였으며, 이후 실험에서는 농도 100 μ g/mL로 희석하여 실험을 진행하였다. 염증 효과를 나타내는 NO 생성 억제 활성을 측정한 결과에서는 100 μ g/mL에서 69.3%의 항염증 효과를 확인하였으며 농도 의존적인 NO 생성 억제 효과를 확인하였다. HDF 세포에서 MMP-1의 발현 억제능을 측정한 결과에서는 100 μ g/mL에서 50.79%로 유의하게 억제되는 것을 확인하였다. 이상과 같이 본 연구의 시계꽃 추출물은 항산화 효과와 DPPH radical 소거활성, 염증 활성의 중요한 인자인 NO 생성 억제 효과를 통한 항염증 효과, 피부세포에 대한 낮은 독성, MMP-1의 발현 억제를 통한 항노화 효과가 확인됨에 따라 이너뷰티 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

References

1. J. Y. Kim, H. Y. Kim, K. H. Park, Y. H. Cho, "Understanding of Functional Foods for Nutritional Skin Care", *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, Vol.30, No.3, pp. 313-320, (2004).
2. M. K. Kim, The Utilization of Spinach Ethanol Extract as a Beauty Foo Material, *J. Korea Soc. Beauty Art*, Vol.19, No.4, pp. 215-229, (2018).
3. M. S. Lee, J. S. Han, A. J. Kim. "quality Characteristics of inner Beauty Foods (Mook) Prepared With Mixture of Mulberry Leaf and Fruit Powder", *Asian J Beauty Cosmetol*, Vol.16, No.4, pp. 487-498, (2018).
4. N. R. Youn, "A Study on the Perception and Satisfaction of Beauty Cosmetic Food in Middle-aged Women", Master's thesis, Seoul venture university, (2016).
5. A. J. Bailey, S. P. Robinson, G. Balian, "Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen", *Nature*, Vol.251, pp. 105-109. (1974).
6. H. H. Kim, K. S. Ko, "Study of Cosmetic Biological Activity and Cytotoxicity on Rosemary Extract", *J. kor. Soc. B&A*, Vol.14, No.4, pp. 235-248, (2013).
7. S. M. Jeon, S. Y. Kim, I. H. Kim, J. S. GO, H. R. Kim, J. Y. Jeong, H. Y. Lee, D. S. Park, "Antioxidant activities of processed deoduck (*Codonopsis lanceolata*) extracts", *J korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.42, No.6, pp. 924-932, (2013).
8. Kinghorn G. R. Passion, stigma, and STI. Vol.77, pp. 370-375, Sexually Transm Infections, (2001).
9. K. Dhawan, S. Dhawan, A. Sharma, "Passiflora: A review update", *J Ethnopharmacol*, Vol.94, No.1, pp.1-23. (2004);
10. L. I. QIMIN, "Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*)", *J Chromatogr*, Vol.562, No.2, pp. 435-446,

- (1991).
11. Dhawan K, Kumar S, Sharma A, "Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*", *Fitoterapia*, Vol.72, No.6, pp. 698-702, (2001).
 12. Dhawan K, Sharma A, "Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves", *Fitoterapia*, Vol.73, pp. 397-399, (2002).
 13. S. M. Elsas, "Passiflora incarnata L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method", *Phytotherapy*, Vol.17, No.12, pp. 940-949, (2010).
 14. M. L. Anzoise, C. Marrassini, H. Bach, S. Gorzalczy, "Beneficial properties of *Passiflora caerulea* on experimental colitis", *J Ethnopharmacol*, Vol.194 No.24, pp. 137-145, (2016).
 15. M. K. Kim, "Analytical Method Validation of Vitexin in *Passiflora incarnata* Extract Powder as a Functional Ingredient for Functional Health Food", Master's thesis, Seoul National University of Science and Technology, (2017).
 16. O. Folin, Denis W, "On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents", *J Biol Chem*, Vol.12, No.2, pp. 239-243, (1912).
 17. M. I. Moreno, M. I. Isla, A. R. Sampietro, M. A. Vattuone, "Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina", *J Ethnopharmacol*, Vol.71, No.1-2, pp. 109-114, (2000).
 18. M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol.181, pp. 1199-1200, (1958).
 19. G. D. Repetto, A. Del, J. L. Zurita, A. Zurita, "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity", *Nature protocols*, Vol.3, No.7, pp. 1125, (2008).
 20. H. F. Azzawie, M. S. Alhamdami, "Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits", *Life Sci*, Vol.78 No.12, pp. 1371-1377, (2006).
 21. M. Naczek, F. Shahidi, "Phenolic compounds in plant foods: chemistry and health benefits", *Nutraceuticals & Food*, Vol.8, No.2, pp.200-218, (2003).
 22. M. Isemura, K. Saeki, T. Kimura, S. Hayakawa, T. Minami, M. Sazuka, "Tea catechins and related polyphenols as anti-cancer agents", *Biofactors*, Vol.13, pp. 81-85, (2000).
 23. J. M. Yoon, J. J. Jun, S. C. Lim, K. H. Lee, H. T. Kim, H. S. Jeong, J. S. Lee, "Changes in Selected Components and Antioxidant and Antiproliferative Activity of Peppers Depending on Cultivation", *Nutraceuticals & Food*, Vol.39, No.5, pp. 731-736, (2010).
 24. S. Y. Choi, S. H. Lim, J. S. Kim, T. Y. Ha, S. R. Kim, K. S. Kang, I. K. Hwang, "Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants", *Korean J Food Sci Technol*, Vol.37, pp. 549-556, (2005).
 25. M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman, B. V. D. Putte, "Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices", *J Agric Food Chem* Vol.41, pp. 1242-1246. (1993).
 26. C. J. Oh, H. O. Kim, E. S. Jung, S. H. Lee, G. Y. Jeon, Y. C. Kim, "Anti-wrinkle and Skin-whitening Efficacy of *Rhododendron micranthum* Methanol Extract", *Asian J Beauty Cosmetol*, Vol.14, No.4, pp. 405-411, (2018).
 27. R. J. Williams, J. P. Spencer, "Rice-Evans C: Flavonoids: antioxidant or signalling molecules", *Free Radic Biol Med*, Vol.36, No.7, pp. 838-849, (2004).
 28. H. J. Jo, J. W. Kim, J. A. Yoon, K. I. Kim, K. H. Chung, B. C. Song, J. H. An, "Antioxidant Activities of Amaranth (*Amaranthus* spp. L.) Flower Extracts",

- Korean Journal of Food and Nutrition*, Vol.27, No.2, pp. 175-182, (2014).
29. H. S. Kang, J. S. Kang, W. S. Jeong, "Cytotoxic and apoptotic effects of saponins from *Akebia quinata* on hepG2 hepatocarcinoma cells", *Korean J. Food Preserv.*, Vol.17, No.3, pp. 311-319, (2010).
 30. M. H. Kim, T. B. Choe "Anti-oxidant Activity of *Akebia quinata* fruit extract and the Effects of Skin", *The Korean Society of Applied Science and Technology*, Vol.32, No.3, pp. 439-450, (2015).
 31. H. E. Cho, Y. J. Choi, E. K. Cho, "Antioxidant and nitrite scavenging activity and α -glucosidase inhibitory effect of water extract from *Schizandra chinensis* Baillon", *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.39, No.4, pp. 81-486, (2010).
 32. S. H. You, J. S. Moon, "A Study on Anti-oxidative, Anti-inflammatory, and Melanin Inhibitory Effects of *Chrysanthemum Sibiricum* Extract", *The Korean Society of Applied Science and Technology*, Vol.33, No.4, pp. 762-770, (2016).
 33. S. Moncada, R. M. Palmer, E. A. Higgs, "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology", *Pharmacol Rev.* Vol.43, pp. 109-142, (1991).
 34. C. Nathan, Q. W. Xie, Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls, *pubmed*, Vol.78, No.6, pp. 915-918, (1994).
 35. W. Homebeck, "Downregulation of tissue inhibitor of matrix metallo protease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival", *Pathologie Biologie.*, Vol. 51, No.10, pp. 569-573, (2003).
 36. J. N. Lee, Y. S. Kim, "The Effects of *Paeonia Lactiflora* Pallas on Inhibition of Oxygen Free Radical, Anti-inflammation and MMP-1 Inhibitory Activity", *The Korean Society of Applied Science and Technology*, Vol.35, No.3, pp. 797-806, (2018).
 37. A. Pardo, M. Selman, "MMP-1: the elder of the family", *J Biochem Cell Biol*, Vol.37, No.2, pp. 283-288, (2005).