



Anti-skin aging activities of ethanol extract from *Echinodorus cordifolius* L. in human keratinocytes

Haeun Mun¹ · Seung-Hong Lee^{1,2}

물수선화 에탄올 추출물의 피부 노화 억제 효과

문하은¹ · 이승홍^{1,2}

Received: 27 September 2022 / Accepted: 5 December 2022 / Published Online: 31 December 2022

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

Abstract *Echinodorus cordifolius* (L.) is an aquatic plant in the family *Alismataceae*. The anti-skin aging activity of *E. cordifolius* (L.) has not been yet reported. Therefore, the objective of the present study was to prepare 70% ethanol extract (ECEE) from *E. cordifolius* (L.) and investigate their antioxidant and anti-hyaluronidase activities for confirm the potential of anti-skin aging. ECEE showed good activities of DPPH, hydrogen peroxide scavenging, and hyaluronidase inhibition, with EC₅₀ and IC₅₀ values of 31.4, 300, and 450 µg/mL, respectively. ECEE also significantly improved cell viability and inhibited intracellular reactive oxygen species dose-dependently against 1 mM hydrogen peroxide-induced oxidative stress in immortalized human keratinocytes (HaCaT cells). Furthermore, ECEE upregulated hyaluronic acid (HA)-synthesizing enzyme hyaluronan synthase 2 (HAS2) expression level, but downregulated expression level of HA-degrading enzyme hyaluronidase 2, resulting in increased HA production in HaCaT cells. Taken together, these results suggest that ECEE shows antioxidant and anti-hyaluronidase potential and could be a functional cosmetic ingredients for anti-skin aging.

Keywords Anti-hyaluronidase · Antioxidant · Anti-skin aging activity · *Echinodorus cordifolius* L. · Human keratinocytes

서 론

노화는 유기체의 점진적인 생리적 변화를 의미하며 나이가 들어감에 따라 피부를 포함한 모든 장기의 구조와 기능이 자연적으로 퇴화되거나 저하된다[1,2]. 피부는 유해화학물질, 미생물, 자외선 등의 다양한 외부인자로부터 신체를 보호하는 물리적 장벽으로써의 기능을 하는 중요한 기관으로 다른 기관과 달리 피부 노화는 눈에 띄게 나타난다는 특징으로 인해 최근 남성과 여성 모두 피부 노화에 대한 관심이 높아지고 있다[3,4]. 인간의 피부 노화 과정은 복잡하며 시간적 요인과 다양한 환경적 요인 등에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다[4]. 특히 세포 내에서 과잉으로 생산된 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)에 의해 유발되는 산화 스트레스, DNA 및 세포 손상은 피부 노화 과정 촉진과 밀접한 관련이 있다[4,5]. 또한 ROS는 hyaluronidase, collagenase, elastase 등의 다양한 노화 관련 효소 시스템 활성화 촉진을 통해 콜라겐 및 히알루론산과 같은 피부의 세포외 기질을 병리학적으로 손상시킬 수 있는 위험인자로 알려져 있다[4,6]. 그러므로 피부 노화의 위험을 줄이기 위해서는 과도한 ROS 생성으로 인한 산화 스트레스를 약화시키는 것이 중요한 전략이 될 수 있다. 따라서 최근 피부 노화 예방과 개선과 관련된 연구는 항산화 활성화와 결합된 hyaluronidase 활성 억제에 초점을 맞추고 있다[7].

최근 삶의 질이 향상되면서 피부 건강에 대한 관심과 욕구가 증가함에 따라 피부 노화를 지연시키고 건강한 피부를 유지하기 위해 기능성 화장품 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[8]. 특히 케모포비아 이슈 및 합성 원료의 안전성에 대한

Seung-Hong Lee (✉)
E-mail: seunghong0815@gmail.com

¹Department of Medical Science, Soonchunhyang University, Asan 31538, Republic of Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Soonchunhyang University, Asan 31538, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

소비자의 우려가 증가하면서 피부 노화 방지 기능성 성분으로 천연 생리활성 물질이 주목받고 있다[9-11]. 식물은 오랜 기간 동안 식품 및 약용으로 이용하여 왔기 때문에 합성 화합물 보다 비교적 안전하다고 생각되며 다양한 phytochemical을 풍부하게 함유하고 있어 항산화, 미백, 주름개선, 피부노화 방지 등의 우수한 생리활성 효과를 나타낸다고 보고되고 있다[12-14]. 따라서 최근 식물을 활용한 기능성 화장품 소재로의 개발 및 산업적 활용이 활발히 추진되고 있다. 하지만 나고야의정서 발효에 대한 대응 및 해외 수입 의존도가 높은 식물자원 유래 화장품 소재의 국산화가 시급한 실정에 따라 새로운 국내 자생 식물을 대상으로 잠재적인 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성에 대한 연구가 필요하다.

물수선화(*Echinodorus cordifolius*)는 택사과(Alismataceae)의 여러해살이풀로 원산지는 북아메리카 중부와 남부 지역이다. 열대, 아열대 지역의 습지나 늪 등지에서 자생하는 수생식물로 번식력이 강하고 7, 8월에 흰색 꽃이 피는 특징을 가진다[15,16]. 우리나라에서는 작은 연못이나 정원 또는 가정 내에서 관상용으로 재배를 하며, 수질정화 식물로 알려져 있다. 현재 알려진 택사과 식물의 생리활성연구로는 항고혈압 효과와 신장 기능 장애 치료 효능이 보고된 바 있다[17,18]. 하지만 항산화 및 hyaluronidase 저해 효과 등을 통한 항피부노화 효과와 관련된 연구는 아직까지 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 국내 자생 식물을 활용한 잠재적인 기능성 화장품 소재 발굴을 목적으로 물수선화 추출물을 제조하고, 이의 항산화 활성 및 hyaluronidase 저해 활성을 구명하여 항피부노화 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 물수선화(*Echinodorus cordifolius* L.)는 참샘골 연꽃 농원에서 구입하여 추출물 제조에 사용하였다. 본 실험에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), hyaluronidase, hyaluronic acid 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), phosphate-buffered saline (PBS, 1×), penicillin/streptomycin, and fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Life Technologies, Burlington, ON, Canada)에서 구입하여 사용하였다. 1차 항체로 사용된 hyaluronan synthase 2 (HAS2)와 hyaluronidase 2 (HYAL2)는 Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 2차 항체로 사용된 anti-rabbit IgG은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 그 밖의 사용된 모든 화학 물질과 시약은 분석용 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

물수선화 에탄올 추출물 (ECEE)의 제조

건조된 물수선화를 분쇄기로 곱게 분쇄한 분말 시료 1 g을 취한 후 70% 에탄올 100 mL에 혼합하여 상온의 shaking incubator에서 24시간 동안 교반 추출하였고, 추출액 만을 분리하기 위해 여과지를 이용하여 여과한 후 추출물을 제조하였다. 제조된 추출물은 회전식 진공증발기로 감압 농축하고 동결 건조하여 추출 시료로 사용하였다. 이후 세포 실험에서는 처리되는 DMSO의 농도가 0.1%가 되도록 하여 시료를 사용하였다.

DPPH radical 소거 활성 평가

ECEE의 DPPH radical 소거 활성은 Blois[19]의 방법을 변형하여 측정하였다. 메탄올에 용해시킨 0.15 mM DPPH 용액 100 μ L에 ECEE의 최종 농도가 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 μ g/mL가 되도록 조절한 각 시료 100 μ L를 처리하여 30분 동안 실온의 암실에서 30분 동안 반응시킨 후 microplate reader (Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTeK, Santa clara, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH radical 소거능 (%)

$$= [(대조군의 흡광도 - 시료 처리군의 흡광도) / 대조군의 흡광도] \times 100$$

Hydrogen peroxide 소거 활성 평가

ECEE의 hydrogen peroxide 소거 활성은 Muller[20]의 방법에 따라 측정하였다. 96 well plate에 ECEE의 최종 농도가 125, 250, 500, 1000, 2000 μ g/mL가 되도록 조절한 각 시료 20 μ L에 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0) 100 μ L와 20 mM H₂O₂ 20 μ L를 차례로 가하여 혼합한 후, 37 °C에서 15분간 반응시켰다. 그 후, 반응액에 1.25 mM ABTS 용액과 peroxidase (1 unit/mL)를 각각 30 μ L 첨가하여 37 °C에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTeK, Santa clara, CA, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydrogen peroxide 소거능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

Hydrogen peroxide 소거능 (%)

$$= [(대조군의 흡광도 - 시료 처리군의 흡광도) / 대조군의 흡광도] \times 100$$

총 폴리페놀 함량

ECEE의 총 폴리페놀 함량은 AOAC[21]의 방법을 변형하여 측정하였다. ECEE 100 μ L에 95% ethanol 100 μ L, 증류수 500 μ L, 50% Folin-Ciocalteu reagent 50 μ L를 넣고 5분간 반응시켰다. 5% sodium carbonate (Na₂CO₃) 100 μ L를 첨가한 후 1 시간 동안 암실에서 반응시켰다. 반응액 200 μ L를 취하여 96 well microplate로 옮긴 후 microplate reader (Synergy HTX Multi-Mode Reader)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였고 표준 물질은 gallic acid를 이용하였다. 표준 곡선을 작성한 후 시료의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid equivalent (μ g GAE/ μ g)로 표시하였다.

Hyaluronidase 저해 활성 평가

Hyaluronidase 저해 활성은 Im 등[22]의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. ECEE의 저해 활성은 hyaluronic acid가 hyaluronidase에 의해 분해되어 생성되는 *N*-acetylglucosamine을 *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB)를 이용하여 585 nm에서 비색 정량 하였다. 0.1 M acetate buffer (pH 3.6)에 녹인 hyaluronidase (8 mg/mL) 10 μ L와 ECEE 최종 농도 250, 500, 1000, 2000, 4000 μ g/mL가 되도록 조절한 각 시료 10 μ L를 혼합한 후 37 °C에서 20분 동안 반응시켰다. 불활성 상태의 hyaluronidase를 활성화 시키기 위해 20 μ L의 12.5 mM CaCl₂를 반응액에 첨가한 후 37 °C에서 다시 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.1 M acetate buffer (pH 3.6)에 녹인 기질용액 hyaluronic acid (2.4 mg/mL) 50 μ L를 반응액에 첨가한 후 37 °C에서 40분 동안 반응시킨 다음 기질-효소 반응 정지를 위해 2 μ L의 0.4 N NaOH와 20 μ L 0.4 N potassium tetraborate를 각각 첨가한 후 100 °C에서 3분간 반응시켰다. 그 후 반응액에 발색제인 DMAB solution (DMAB 0.4 g, 100% acetic acid 35 mL, 10N hydrochloric acid 5 mL)을 600 μ L를 첨가하고 37 °C에서 20분 동안 반응시킨 다음 반응액 200 μ L를 취하여 96 well microplate로 옮겨 microplate reader (Synergy HTX Multi-Mode Reader)를 이용하여 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hyaluronidase 저해능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

Hyaluronidase 저해능 (%)

$$= \frac{[(\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 처리군의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}] \times 100}{1}$$

세포 배양

인체 유래 피부각질형성세포(keratinocyte)인 immortalized human keratinocytes cell (HaCaT)은 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)로부터 분양 받아 사용하였다. 세포 배양을 위해 10% (v/v) FBS와 1% (v/v) antibiotics가 포함된 DMEM 배지를 사용하여 CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

세포 독성 평가

HaCaT 세포에 대한 ECEE의 세포 독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 1×10⁵ cells/mL로 분주하고 CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂)에서 24 시간 배양한 후, ECEE를 최종 농도(25-500 μ g/mL)로 10 μ L씩 처리하였다. 24시간 후 각 well에 MTT 용액(2 mg/mL in PBS) 50 μ L를 처리하여 4시간 동안 37 °C에 반응시켰다. 이후 상층액을 완전히 제거하고 DMSO 150 μ L를 넣어 well에 생성된 formazan을 완전히 용해시킨 후, microplate reader (Synergy HTX Multi-Mode Reader)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성은 다음의 식을 이용하여 계산하였다. 세포 생존율 (%) = (시료 처리군의 흡광도) / (대조군의 흡광도) × 100 방법으로 계산하였다.

H₂O₂로 유도된 세포손상에 대한 보호효과 측정

H₂O₂로 유도된 HaCaT 세포손상에 대한 ECEE의 보호효과를 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 1×10⁵ cells/mL로 분주하고 CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂)에서 24시간 배양한 후 ECEE를 최종 농도(25-250

μ g/mL)로 처리하였다. 24시간 동안 ECEE 처리 후 1 mM의 H₂O₂를 처리하여 세포손상을 유도하고 20시간 동안 추가로 배양하였다. 그 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인하였다.

세포 내 ROS 소거 활성 평가

H₂O₂로 유도된 HaCaT 세포 내 ROS 생성 저해에 대한 ECEE의 효과를 알아보기 위해 Yoon 등[23]의 DCFH-DA assay 방법을 변형하여 세포 내 ROS 생성량을 측정하였다. HaCaT 세포를 96-well black plate에 1×10⁵ cells/mL로 분주하고 CO₂ incubator (37 °C, 5% CO)에서 24시간 동안 배양하고, ECEE를 최종 농도 (25-250 μ g/mL)로 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 1 mM의 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유발한 다음 곧바로 에탄올과 증류수로 희석한 1 mM의 DCFH-DA 용액 10 μ L을 처리 하고 30분 동안 반응 시킨 뒤, PBS로 2회 washing을 진행하고 spectrofluorometer를 이용하여 Excitation 485 nm/Emission 528 nm에서 DCF-DA fluorescence intensity를 측정 후 다음의 식을 이용하여 세포 내 ROS 소거능을 계산하였다.

세포 내 ROS 소거능(%)

$$= \frac{[(\text{대조군의 형광 intensity} - \text{시료 처리군의 형광 intensity}) / \text{대조군의 형광 intensity}] \times 100}{1}$$

Hyaluronic acid 함량 측정

HaCaT 세포의 hyaluronic acid 생성에 ECEE가 미치는 영향을 확인하기 위해 hyaluronic acid 함량을 측정하였다. HaCaT 세포를 24-well plate에 1.5×10⁵ cells/mL로 분주하고 CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 배양하였다. 이 후에 serum-free DMEM으로 교체하고 24시간 뒤에 ECEE를 최종 농도 (25-250 μ g/mL)로 처리하여 추가적으로 24시간 동안 배양시켰다. 이 후 4 °C, 3000 rpm의 조건에서 10분 동안 원심 분리하여 배양 상층액을 수집하고 hyaluronan immunoassay (ELISA) Kit (R&D Systems, Inc. MN, USA)의 방법에 따라 표준물질 hyaluronan 사용하여 표준 곡선을 작성한 후 hyaluronic acid 함량을 분석하였다.

Western blot analysis

ECEE가 HaCaT 세포에서 hyaluronic acid의 합성과 분해에 관여하는 단백질 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해 western blot assay를 실시하였다. HaCaT 세포를 6-well plates에 1×10⁶ cells/mL로 CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 배양 하였다. 이 후에 serum-free DMEM으로 교체하고 24시간 뒤에 ECEE를 최종 농도 (50-250 μ g/mL)로 처리하여 추가적으로 24시간 동안 배양시켰다. Ice cold-PBS로 2회 세척한 후 lysis buffer (20 mM Tris, 5 mM EDTA, 10 mM Na₂P₂O₇, 100 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 1% NP-40, 10 mg/mL Aprotinin, 10 mg/mL Leupeptin, 1 mM PMSF) 65 μ L를 처리하여 1시간 동안 4 °C에서 균질화하고 microtube에 옮겨서 13,000 rpm, 4 °C에서 20분 동안 원심분리 하여 상층액을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도를 Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, MD, USA)로 정량하여 40 μ g의 단백질을 10%의 sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

로 분리하고, nitrocellulose (NC) membrane으로 이동시켰다. 이후 membrane을 5% non fat dry milk를 포함하는 TBS-T (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2.65 mM KCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 용액으로 실온에서 2시간 동안 blocking 한 뒤 1차 antibody (HAS2, HYAL2)를 1:1000의 비율로 희석하여 처리하고 4 °C에서 overnight하였다. 이후 TBS-T로 3회 세척한 뒤 1:3000의 비율로 희석된 anti-rabbit 2차 항체(Thermo Fisher Scientific)를 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 TBS-T로 3회 세척하고 ECL chemiluminescence reagents (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)에 반응시켜 단백질의 발현 정도를 FusionCaptAdvance FX7program (Vilber Lourmat, Australia)을 이용해 분석하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실행하여 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 실험 결과의 통계 분석은 SPSS statistics program (Version 28, IBM, Armonk, NY, USA)을 이용해 실시하였고 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test를 통해 각 시료 간의 유의적인 차이를 검증하였다.

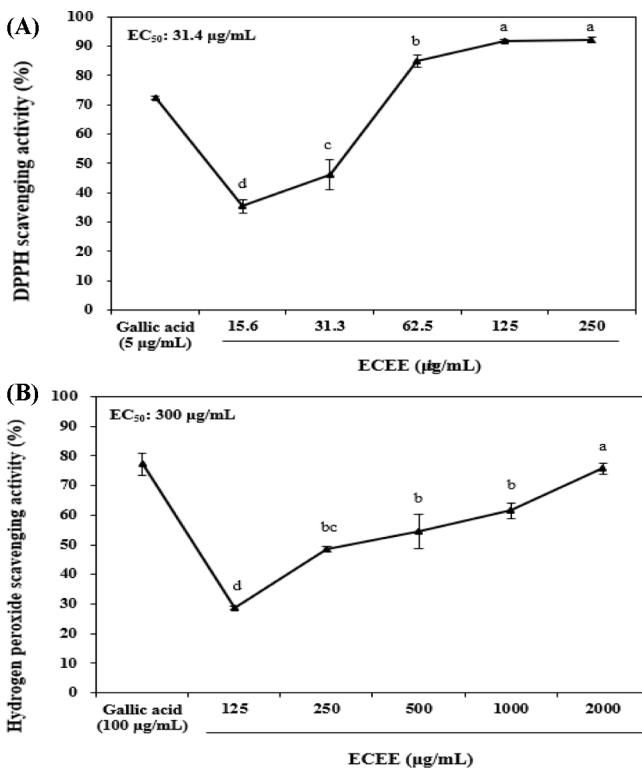


Fig. 1 DPPH (A) and hydrogen peroxide (B) scavenging activities of 70% ethanol extract (ECEE) from *Echinodorus cordifolius* L. Gallic acid was used as positive control. EC_{50} value is the concentration of sample required for 50% scavenging activity. These values are expressed as mean ± SD of triplicate experiments. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

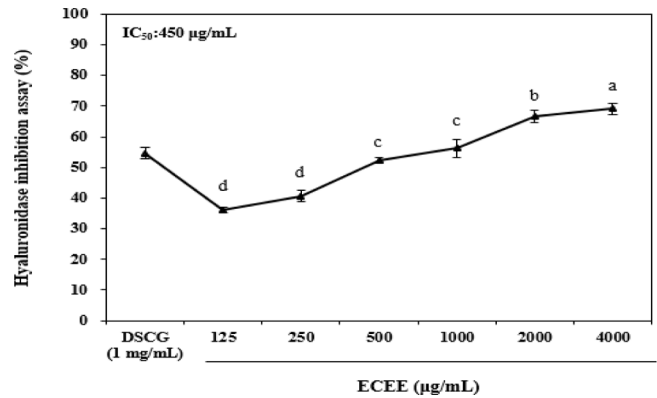


Fig. 2 Hyaluronidase inhibition activity of ECEE. DSCG was used as positive control. These values are expressed as mean ± SD of triplicate experiments. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

결과 및 고찰

물수선화 에탄올 추출물 (ECEE)의 항산화 활성

자유 라디칼 공여체인 DPPH에 대한 소거 활성은 일반적으로 항산화제의 활성을 측정하는 지표로 사용되며, DPPH를 환원시키는 능력이 클수록 우수한 항산화 활성을 기대할 수 있다[23]. 따라서 ECEE의 항산화 효과를 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거 활성을 평가하였다. ECEE의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정된 결과 최종 농도 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 µg/mL에서 35, 46, 84, 91, 92%로 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가함을 확인하였다(Fig. 1A). ECEE의 DPPH 라디칼 소거 활성에 대한 EC_{50} 값은 31.4 µg/mL로 양성 대조군인 gallic acid보다 우수하지는 않았지만, 125 µg/mL의 비교적 낮은 농도에서 90%가 넘는 우수한 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다. hydrogen peroxide는 반응성이 큰 산소화합물의 일종으로 생체조직을 공격하고 세포의 산화 및 손상을 초래하여 각종 질병과 노화를 유발한다고 알려져 있다[23]. ECEE의 hydrogen peroxide 소거 활성을 측정된 결과를 Fig. 1(B)에 나타내었다. 125, 250, 500, 1000 및 2000 µg/mL의 농도에서 ECEE의 hydrogen peroxide 소거 활성은 각각 29, 48, 54, 61, 76%로 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 ECEE의 hydrogen peroxide 소거 활성에 대한 EC_{50} 값은 300 µg/mL로 확인되었다. 이러한 결과는 ECEE가 자유 라디칼과 활성 산소에 의해 매개되는 유해한 영향에 대한 보호 효과를 가지고 있음을 나타내며 이를 통해 ECEE는 우수한 항산화 효과를 가진 잠재적인 천연 항산화 물질로서 충분한 가치가 있다고 판단된다. 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사물질로서 수산기를 통한 수소 공여와 페놀 고리구조의 공명 안정화에 의해 우수한 항산화 효과를 나타낸다고 보고되고 있다[24,25]. ECEE에 존재하는 총 폴리페놀의 함량을 측정된 결과 16.34 µg/100 µg으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 확인한 ECEE의 우수한 항산화 효과는 ECEE 내에 함유되어 있는 폴리페놀 성분으로부터 기인된 것으로 판단된다.

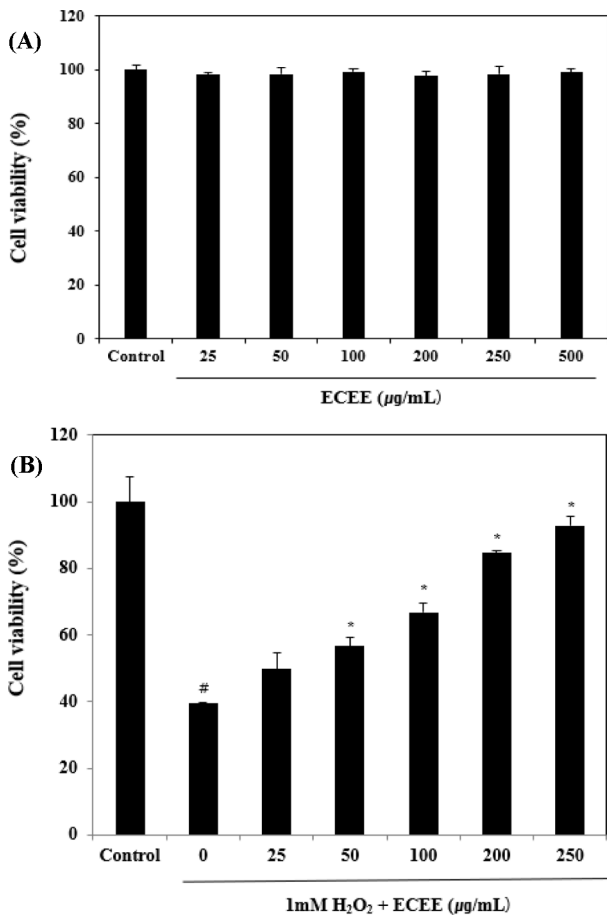


Fig. 3 Cytotoxicity of ECEE in HaCaT cells (A) and protective effect of ECEE against H_2O_2 -induced oxidative stress in HaCaT cells (B). Values are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. # $p < 0.05$ indicate significant differences compared to control group and * $p < 0.05$ compared to H_2O_2 treated group

몰수선화 에탄올 추출물 (ECEE)의 hyaluronidase 저해 활성

hyaluronic acid는 피부에 존재하는 가장 풍부한 세포의 기질 중 하나로 피부 노화에 관여하는 핵심분자로 알려져 있다[26,27]. hyaluronidase는 hyaluronic acid의 분해에 관여하는 핵심적인 효소로서 hyaluronidase 활성 억제제는 피부 노화 방지 효과를 측정하는데 이용되고 있다[26,27]. ECEE의 hyaluronidase 저해 활성을 측정된 결과 125, 250, 500, 1000, 2000 및 4000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 36, 41, 52, 56, 67 및 69%로 농도 의존적으로 hyaluronidase 저해 활성이 증가되는 것을 확인하였다. hyaluronidase에 대한 ECEE의 IC_{50} 값은 452 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났으며 특히 ECEE 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 양성 대조군인 DSCG와 유사한 저해 활성을 나타냈다(Fig. 3). 이러한 결과는 ECEE는 항산화 활성과 더불어 우수한 hyaluronidase 저해 활성을 통해 피부 노화 억제 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

몰수선화 에탄올 추출물 (ECEE)의 세포 독성

ECEE가 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. 25, 50, 100, 200, 250 및 500

$\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 ECEE를 처리한 후 24시간 후에 세포 생존율을 측정된 결과, 모든 처리 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 3A). 따라서 본 연구에서는 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지를 실험조건으로 설정하여 이후의 세포 실험을 진행하였다.

몰수선화 에탄올 추출물 (ECEE)의 H_2O_2 로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과

H_2O_2 는 체내 산화적 스트레스 유발뿐만 아니라 DNA, 단백질 및 세포막 손상에 관여하는 반응성이 큰 산소화합물로 대부분의 세포와 조직에 자유롭게 분포한다고 알려져 있다[28]. HaCaT 세포에서 H_2O_2 는 과도한 ROS 생성을 유도하여 산화적 스트레스를 일으키고 세포 사멸을 유발한다고 보고되고 있다[29]. 따라서 본 연구에서는 ECEE 처리에 따른 H_2O_2 로 유도된 HaCaT 세포의 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. Figure 3B에 나타난 바와 같이 1 mM의 H_2O_2 만을 처리하였을 때 세포 생존율을 유의하게 감소시켰다. 하지만 ECEE 처리는 농도 의존적으로 H_2O_2 에 의해 유도된 세포 손상으로부터 세포 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 ECEE가 H_2O_2 유도 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있음을 시사합니다.

몰수선화 에탄올 추출물 (ECEE)의 세포 내 ROS 소거 활성

피부에서 ROS의 생성을 억제하거나 생성된 ROS를 효율적으로 제거할 수 있는 피부 항산화 방어망 구축과 이를 통한 세포 보호 효과를 가지는 소재의 개발은 피부 항노화 기능성에 있어 중요한 의미를 갖는다[30]. HaCaT 세포에서 H_2O_2 처리로 유도된 세포 내 ROS 생성에 대한 ECEE의 효과를 확인하기 위하여 DCFH-DA assay를 수행하였다. HaCaT 세포의 세포 내 ROS 생성량은 H_2O_2 를 처리하지 않은 control군에 비해 H_2O_2 를 처리한 군에서 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 하지만 ECEE 처리는 H_2O_2 에 의해 유도된 세포 내의 ROS를 농도 의존적으로 소거하였다. 이러한 결과는 ECEE가 우수한 세포 내 ROS 소거 활성을 통해 ROS 유발 산화적 스트레스에 대한 보호 효과가 있어 세포 손상을 감소시킬 수 있음을 시사하며 이는 ECEE에 함유된 폴리페놀의 항산화 효과에 기인한다고 판단된다.

몰수선화 에탄올 추출물(ECEE)의 hyaluronic acid 생성에 미치는 영향

hyaluronic acid는 collagen 및 elastin과 함께 피부를 구성하는 중요한 세포의 기질 중 하나로 인체 피부의 대부분을 차지한다. N-acetyl-D-glucosamine과 D-glucuronic acid가 교대로 결합한 고분자 화합물로 우수한 수분 보유 능력을 통해서 조직의 수분 유지, 세포 간 간격 유지, 세포 분열과 분화, 세포의 성장 인자의 저장과 확산 및 조직 치유 반응 등에 관여하여 피부 노화에 밀접한 기능을 한다고 보고되어 있다[31,32]. 따라서 항산화 활성과 hyaluronidase 저해 활성이 확인된 ECEE의 피부노화 방지 효능을 추가로 확인하기 위하여 HaCaT 세포에서 HA 생성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 ECEE는 HA 함량을 크게 변화시키지 않았지만 100, 200 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 ECEE 처리는 처리되지 않은 control군보다 HaCaT 세포에서 HA 생성량을 유의하게 증가시켰다. 이러한 결과는 ECEE가 hyaluronidase 활성 억제를 통해

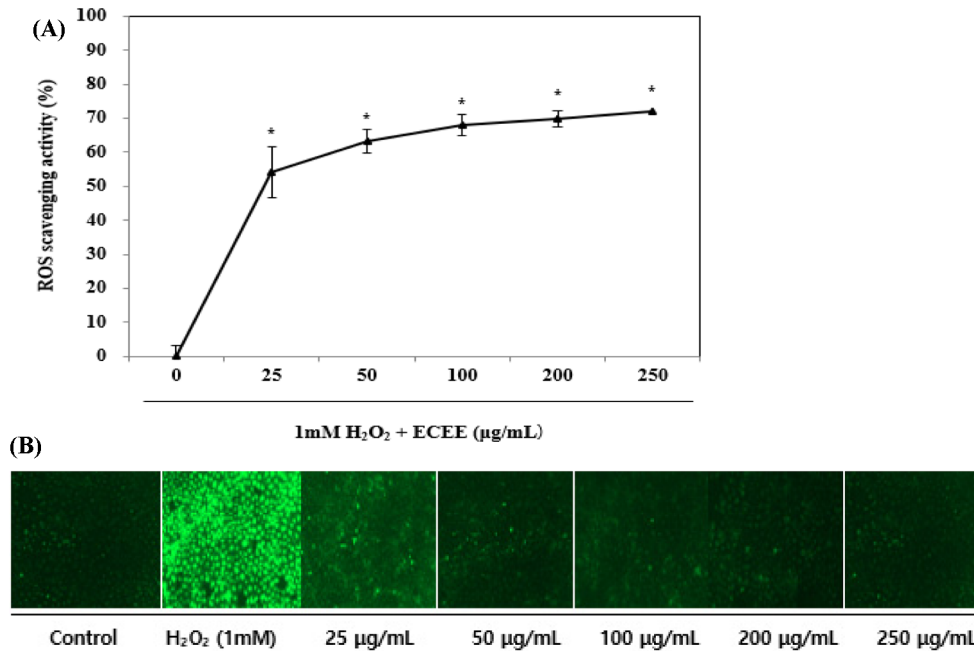


Fig. 4 Effect of ECEE on intracellular ROS scavenging in H₂O₂-induced HaCaT cells. ROS levels were assessed by fluorescence microscopy after DCF-DA staining (A) and ROS scavenging activity was assessed by the DCF-DA assay (B). Values are expressed as mean ± SD of triplicate experiments. **p* < 0.05 indicate significant differences compared with the H₂O₂ treated group

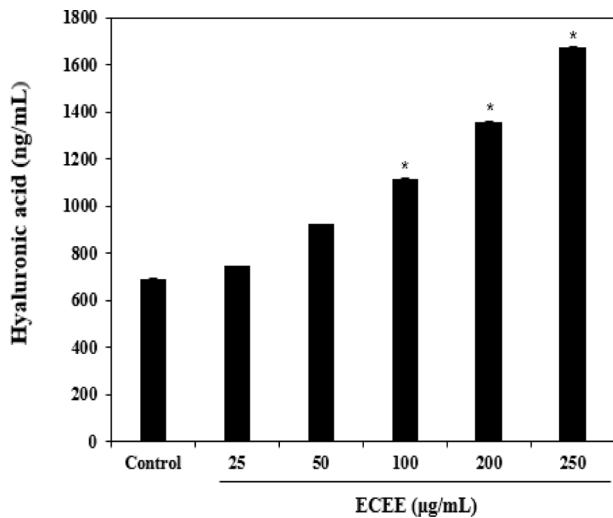


Fig. 5 Effects of ECEE on hyaluronic acid (HA) contents. HA content in HaCaT cells treated with ECEE was determined using an ELISA kit. Values are expressed as mean ± SD of triplicate experiments. **p* < 0.05 indicate significant differences compared with the untreated control group

피부 세포에서 HA 생성을 증가시킬 수 있음을 시사하며 이를 통해 ECEE는 우수한 피부 노화 억제 천연 소재로서 충분한 가치가 있다고 판단된다.

Hyaluronic acid synthase 2 (HAS2)와 hyaluronidase 2 (HYAL2)에 발현에 대한 물수선화 에탄올 추출물 (ECEE)의 효과
 피부에서 hyaluronic acid는 합성과 분해의 조절은 hyaluronic acid synthase (HAS)와 hyaluronidase (HYAL)에 의해 밀접하게 조절된다. 특히 HAS 중 HAS2는 hyaluronic acid 합성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 HYAL2는 HA를 분해하여 피부의 손상 및 노화 진행에 연관되어 있다고 알려져 있다[32]. 따라서 ECEE가 HA의 합성 및 분해에 관여하는 조절 인자들의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 Western blot assay를 실시하였고 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. ECEE 처리는 HYAL2의 발현 수준을 유의하게 감소시켰지만 HAS2 발현 수준을 유의하게 증가시켰다. 이러한 결과는 ECEE가 HaCaT 세포에서 HYAL2를 하향 조절하고 HAS2를 상향 조절함으로써 HA 합성을 촉진할 수 있음을 시사한다.

초 록

Echinodorus cordifolius (L.)은 택사과(*Alismataceae*)에 속하는 수생 식물이다. *Echinodorus cordifolius* (L.)의 피부 항노화 활성에 대한 연구는 아직까지 보고되지 않았다. 따라서 본 연구의 목적은 *Echinodorus cordifolius* (L.)로부터 70% 에탄올 추출물 (ECEE)을 제조하고 항산화 및 hyaluronidase 억제 활성을

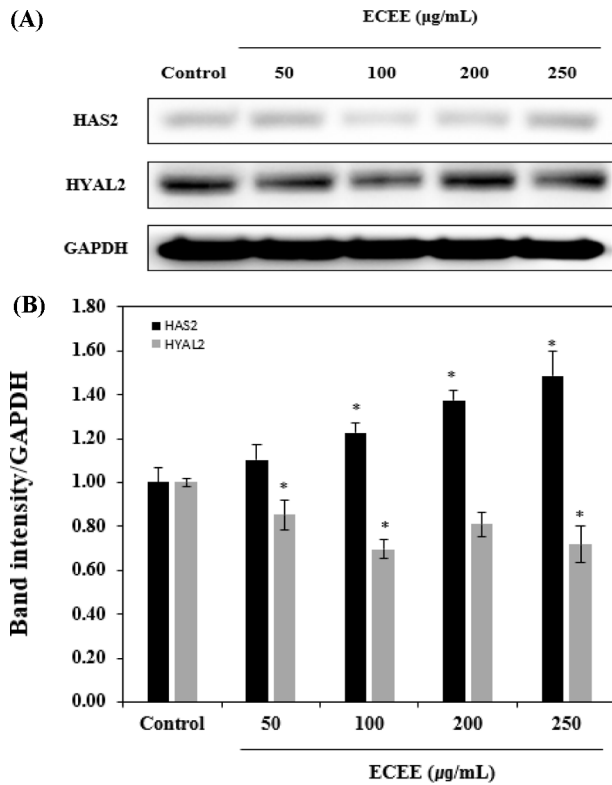


Fig. 6 Effects of ECEE on expression levels of HA synthesis and degradation-related proteins in HaCaT cells. Protein expression levels of HAS2 and HYAL2 were measured by western blot analysis (A) and quantified by ImageJ (B). GAPDH was used as an internal control. Values are expressed as mean ± SD of triplicate experiments. **p* < 0.05 indicate significant differences compared with the untreated control group

통해 피부 항노화 기능성 소재로서의 가능성을 확인하였다. ECEE는 EC₅₀과 IC₅₀ 값이 각각 31.4, 300, 450 µg/mL로 우수한 DPPH, hydrogen peroxide 소거 활성 및 hyaluronidase 억제 활성을 가지는 것으로 나타났다. ECEE는 불멸화된 인간 각질세포인 HaCaT 세포에서 1 mM H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스에 대해 농도 의존적으로 세포 보호 효과 증가 및 세포 내 활성산소종을 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 ECEE는 hyaluronic acid (HA) 합성 효소인 hyaluronan synthase 2 발현 수준을 상향 조절하고 HA 분해 효소인 hyaluronidase 2 (HYAL2)의 발현 수준을 하향 조절하여 HaCaT 세포에서 HA 생성량을 증가시켰다. 따라서 이러한 결과를 종합하면 ECEE는 항산화, hyaluronidase 억제 및 HA 생성 촉진의 우수한 잠재력을 가진다는 것을 확인하였고 이를 통해 피부 노화를 방지하기 위한 천연 기능성 화장품 소재로서의 충분한 활용 가치가 있다고 판단된다.

Keywords 물수선화(*Echinodorus cordifolius* L.) · 인간 유래 각질형성세포 · 피부 노화 방지 활성 · 항산화 · 항히알루로니다제

감사의 글 본 연구는 순천향대학교 학술연구비 지원을 받아 수행하였습니다.

References

- Mukherjee PK, Maity N, Nema NK, Sarkar BK (2011) Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine* 19(1): 64–73. doi: 10.1016/j.phymed.2011.10.003
- Harman D (1981) The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7124–7128
- Lee SJ, Choi HR, Lee JC, Park HJ, Lee HK, Jeong JT, Lee TB (2014) The anti-aging effects of various berries in the human skin keratinocyte (HaCaT) cells. *Korean J Food Sci Technol* 46(2): 198–204. doi: 10.9721/KJFST.2014.46.2.198
- Tobin DJ (2017) Introduction to skin aging. *J Tissue Viability* 26(1): 37–46. doi: 10.1016/j.jtv.2016.03.002
- Miracle Uwa L (2017) The anti-aging efficacy of antioxidants. *Curr Trends Biomedical Eng & Biosci.* 7(4): 66–68. doi: 10.19080/CTBEB.2017.07.555716
- Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K (2015) Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* 5(2): 545–589. doi: 10.3390/biom5020545
- Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC (2012) Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol* 4(3): 308–319. doi: 10.4161/derm.22804
- Nguyen JK, Masub N, Jagdeo J (2020) Bioactive ingredients in Korean cosmeceuticals: Trends and research evidence. *J Cosmet Dermatol* 19(7): 1555–1569. doi: 10.1111/jocd.13344
- Faria-Silva C, Ascenso A, Costa AM, Marto J, Carvalheiro M, Ribeiro HM, Simões S (2020) Feeding the skin: A new trend in food and cosmetics convergence. *Trends Food Sci Technol* 95: 21–32. doi: 10.1016/j.tifs.2019.11.015
- Amberg N, Fogarassy C (2019) Green Consumer Behavior in the Cosmetics Market. *Resources* 8(3): 137. doi: 0.3390/resources8030137
- Ahmed IA, Mikail MA, Zamakshari N, Hussah AS (2020) Natural anti-aging skincare: role and potential. *Biogerontology* 21: 293–310. doi: 10.1007/s10522-020-09865-z
- Liyanaarachchi GD, Samarasekera JKRR, Mahanama RR, Hemalal KDP (2018) Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. *Ind Crops Prod* 111: 597–605. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.11.019.
- Cho YJ, Kim SH, Choi YJ, Lee JB (2022) Antioxidant and Anti-inflammatory activity of *Colpomenia sinuosa* extract. *Journal of Convergence for Information Technology* 12(1): 135–143. doi: 10.22156/CS4SMB.2022.12.01.135
- Lee TB, So YK, Kim SY, Hwang JY (2020) Biological Activities of Cosmetic Material from Ten Kinds of Flower Ethanol Extracts. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 28(4): 260–275. doi: 10.7783/KJMCS.2020.28.4.260
- Teamkao P, Thiravetyan P (2010) Phytoremediation of ethylene glycol and its derivatives by the burhead plant (*Echinodorus cordifolius* (L.)): Effect of molecular size. *Chemosphere* 81: 1069–1074. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.049
- Bercu R (2009) Histoanatomy of *Echinodorus cordifolius* (L.) Griseb. (Alismataceae). *Studia Univ. VG, SSV* 19: 283–286
- Yu SR, Kim SH, Shin SM (2018) The effect of *Alisma canaliculatum* and *Polyporus umbellatus* extracts on adipogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stromal stem cells. *Korean J Orient Int Med* 39: 1181–1190. doi: 10.22246/jikm.2018.39.6.1181
- Tibirică E, Almeida A, Caillleaux S, Pimenta D, Kaplan MA, Lessa MA, Figueiredo MR (2007) Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandifloras*. *J Ethnopharmacol* 111(1): 50–55. doi: 10.1016/j.jep.2006.10.030
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199–1200
- Müller HE (1995) Detection of hydrogen peroxide produced by

- microorganism on ABTS peroxidase medium. Zentralbl Bakterio Mikrobiol Hyg 259: 151–158. doi: 10.1016/S0176-6724(85)80045-6
21. AOAC (1980) Official methods of analysis. 13th ed, Association of Official Analysis Chemists, Washington, DC, USA. Method 914–915
 22. Im ST, Kang NL, Kim JS, Heo SJ, Lee SH (2022) Antioxidant and anti-hyaluronidase activities of taurine-enriched enzymatic hydrolysates prepared from *Turbo cornutus*, a by-product of fish processing in Jeju Island. Fish Sci 88: 509–517. doi: 10.1007/s12562-022-01605-1
 23. Yoon Y, Lee YM, Song S, Lee YY, Yeum KJ (2018) Black soybeans protect human keratinocytes from oxidative stress-induced cell death. Food Sci. Nutr. 6: 2423–2430. doi: 10.1002/fsn3.842
 24. AK T, Gülçin I (2008) Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chem. Biol. Interact. 174(1): 27–37. doi: 10.1016/j.cbi.2008.05.003
 25. Herrmann K (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. Crit Rev Food Sci Nutr 28: 315–347. doi: 10.1080/10408398909527504
 26. Shahidi F (1992) Phenolic antioxidant. Crit Rev Food Sci Nutr 32: 67–103. doi: 10.1080/10408399209527581
 27. Kim PJ, Ha HY (2018) Effect of *Lonicera japonica* ethanol extract on hyaluronic acid production in HaCaT cells. J Invest Cosmetol 14: 441–446. doi: 10.15810/jic.2018.14.4.005
 28. Razak DLA, Jamaluddin A, Rashid NYA, Sani NA, Manan MA (2020) Assessment of Cosmeceutical Potentials of Selected Mushroom Fruitbody Extracts Through Evaluation of Antioxidant, Anti-Hyaluronidase and Anti-Tyrosinase Activity. J 3(3): 329–342. doi: 10.3390/j3030026
 29. Seo SH, Choi MO (2013) Protective effects of *Lonicerae Japonicae* Flos against hydrogen peroxidase-induced oxidative stress on Human keratinocyte, HaCaT cells. Kor J Herbology 28: 57–62. doi: 10.6116/kjh.2013.28.4.57
 30. Chang TM, Tsen JH, Yen H, Yang TY, Huang HC (2017) Extract from *Periostracum cicadae* Inhibits Oxidative Stress and Inflammation Induced by Ultraviolet B Irradiation on HaCaT Keratinocytes. Evid Based Complement Alternat Med 2017. doi: 10.1155/2017/8325049
 31. Kim AR, Jung MC, Jeong HI, Song DG, Seo YB, Jeon YH, Park SH, Shin HS, Lee SL, Park SN (2018) Antioxidative and cellular protective effects of *Lysimachia christinae* hance extract and fractions. Appl Chem Eng 29: 176–184. doi: 10.14478/ace.2017.1113
 32. Kolakul P, Sripanidkulchai B (2017) Phytochemicals and anti-aging potentials of the extracts from *Lagerstroemia speciosa* and *Lagerstroemia floribunda*. Ind Crops Prod 109: 707–716. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.09.026
 33. Kang MS, Ha HY, Kim HT (2015) An experimental study on the effect of *Angelica acutiloba* ethanol extract on hyaluronic acid synthesis. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol 28: 32–40. doi: 10.6114/jkood.2015.28.1.032