

CCD-986sk 세포 내 주박 분획물의 항주름 효능

장영아¹ · 이해정^{2,†}

¹대구한의대학교 화장품공학부

²덕성여자대학교 약학대학

(2024년 3월 19일 접수: 2024년 4월 25일 수정: 2024년 4월 29일 채택)

Anti-wrinkle effects of solvent fractions from Jubak on CCD-986sk

Young-Ah Jang^{1,*} · Hyejeong Lee^{2,†}

¹*Division of Cosmetic Science and Technology, Daegu Haany University,
Gyeongsan 38610, Republic of Korea*

²*College of Pharmacy, Duksung Women's University,
Seoul 01369, Republic of Korea*

(Received March 19, 2024; Revised April 25, 2024; Accepted April 29, 2024)

요약 : 본 연구에서는 주박의 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 평가하기 위해 분획물에 따른 항산화 활성평가와 인간섬유아세포인 CCD-986sk 세포에서의 주름효능 평가를 진행하였다. ABTS⁺ radical 소거능 측정을 통해 항산화 활성을 확인한 결과, 주박 Ethyl Acetate 분획물 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 75.5%로 나타나 분획 용매 중 가장 높은 항산화 활성을 보였다. Elastase, Collagenase 저해 활성 측정을 통해 주름 개선 효과를 확인하였으며, 두 실험 결과 모두 주박 Ethyl Acetate 분획물이 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 가장 높은 효능을 나타내었다. UVB로 유도된 CCD-986sk 세포 내 pro-collagen type I의 합성율을 측정된 결과 주박은 동일농도에서 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 Ethyl Acetate, Water, Acetonitrile, Hexan 분획물 순으로 높은 효능을 보였다. 콜라겐 분해효소인 MMP-1의 저해율을 측정된 결과 4가지 용매 분획물은 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 모두 70% 이상의 효능을 나타내었다. Real time PCR 실험에서 pro-collagen type I, MMP-1 및 MMP-3의 mRNA 발현량을 측정된 결과 UVB 단독군 대비 Jubak 추출물을 함께 처리했을 때 pro-collagen type I의 단백질 발현량이 증가되었고, MMP-1과 MMP-3의 mRNA 발현량은 감소하는 것을 확인하였으며 대조군(EGCG) 다음으로 Ethyl Acetate 추출물이 주름 개선에 가장 효능이 우수하였다. 이상의 결과로 주박의 용매 분획물 중 Ethyl Acetate 분획물은 UVB 자극에 의한 광노화에 대한 항주름 효과가 있음을 확인하여 화장품의 천연물 소재로서의 이용이 기대된다.

주제어 : 주박, 항주름, 기질금속단백질분해효소 (MMPs), 프로콜라겐, CCD-986sk 세포

[†]Corresponding author

(E-mail: hjeonglee@duksung.ac.kr)

Abstract : In this study, in order to evaluate the possibility of using Jubak as a functional cosmetic material, evaluation of antioxidant activity according to fractions and anti-wrinkle efficacy in CCD-986sk cells, a human fibroblast, were conducted. As a result of confirming the antioxidant activity by measuring ABTS⁺ radical scavenging ability, Jubak's Ethyl Acetate fractions was found to be 75.5% at a concentration of 1,000 $\mu\text{g/ml}$, showing the highest antioxidant activity among the extraction solvents. The wrinkle improvement effect was confirmed by measuring the inhibitory activity of elastase and collagenase, and in both test results, Jubak's Ethyl Acetate fractions showed the highest efficacy at a concentration of 1,000 $\mu\text{g/ml}$. As a result of measuring the synthesis rate of pro-collagen type I in CCD-986sk cells induced by UVB, Jubak showed the highest efficacy in the order of Ethyl Acetate, Water, Acetonitrile, and Hexan fractions at the same concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$. As a result of measuring the inhibition rate of MMP-1, a collagen degrading enzyme, all four solvent fractions showed an efficacy of more than 70% at 20 $\mu\text{g/ml}$. As a result of measuring the mRNA expression levels of pro-collagen type I, MMP-1, and MMP-3 in a real-time PCR experiment, the protein expression level of pro-collagen type I increased when treated with Jubak fractions compared to the UVB group alone. The mRNA expression levels of MMP-1 and MMP-3 were confirmed to be decreased, and Ethyl Acetate fractions was the most effective in improving wrinkles after the control group (EGCG). As a result, it was confirmed that the Ethyl Acetate fractions among Jubak's solvent fractions has an anti-wrinkle effect against photoaging caused by UVB stimulation, and is expected to be used as a natural material for cosmetics.

Keywords : Jubak, Anti-wrinkle, MMPs, Procollagen, CCD-986sk

1. 서론

자외선(UV) 노출은 피부 노화 및 피부 질환의 주요 원인 중 하나로 알려져 있다. UV 파장은 자외선 A(UVA), B(UVB) 및 C(UVC)로 구성되어 있으며, 이들 중 피부에 도달하는 UVA, UVB는 피부 내에서 활성산소(ROS, reactive oxygen species)를 생성하는 주요 원인으로 알려져 있다 [1]. UVB는 피부의 최외곽 층에 주로 흡수되며, DNA에 직접적인 손상을 일으키며 이에 대한 세포 자기수리 메커니즘을 활성화시킨다[2]. 그러나 이러한 과정에서 필연적으로 ROS가 생성되어 세포 손상을 유발하고 세포 외 기질의 주요 구성요소인 콜라겐과 엘라스틴의 변화를 초래하여 피부의 탄성을 감소시키고 주름을 형성한다[3]. 따라서 ROS의 증가는 다양한 생리학적 메커니즘을 통해 피부의 구조적 변화를 초래하며 기타 환경요인과 상호작용하여 피부 노화를 가속화시키는데 중요한 역할을 한다.

MMPs (Matrix Metalloproteinases)는 주름 형성과 관련하여 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데 세포 외 기질 (Extracellular matrix, ECM)

의 대사를 조절하는 효소로서, 주로 콜라겐과 엘라스틴을 분해하는데 관여한다[4, 5]. MMPs는 인간에게서 28종이 발견되며 각각 다양한 생리적 및 병리학적 과정에 관여하며 특히 피부 노화 및 피부 질환과 관련된 MMPs는 MMP-1, -2, -3 및 -9으로 알려져 있다[6]. Fibroblast collagenase라고 불리는 MMP-1은 주로 collagen type I을 분해하는 효소로서, 피부의 주름 형성에 가장 많은 역할을 하며 MMP-3은 피부 내에서 collagen type I 외 다양한 단백질을 분해하는데 관여하며 특히 자외선 노출은 MMP-3의 발현은 피부의 염증 반응을 증가시키고 콜라겐의 분해를 촉진한다[7]. MMP-2와 MMP-9는 주로 젤라틴과 같은 세포 외 기질 단백질을 분해하는데 관여한다. 자외선 노출과 관련된 이러한 MMPs의 증가는 피부 염증 및 피부 손상에 연결되어 있으며, 피부의 보습, 탄력 손실과 주름 형성을 초래한다 [8]. 항산화 물질과 UV 자극에 의한 MMPs 활성의 연관성에 대한 연구는 피부 건강 및 노화 관련 질병의 예방 및 치료에 대한 이해를 높이는 데 중요한 역할을 하며 많은 연구자들이 관심을 갖는 분야이다.

주박(Jubak)은 청주, 약주 등의 술을 빚고 남은 양조 부산물로서, 알코올, 효소, 유기물 등을 포함하는 천연소재로 다양한 항산화 활성물질을 함유하고 있으며, 특히 폴리페놀류 화합물이 풍부하다고 알려져 있다[9]. 이러한 화합물들은 자유 라디칼과 같은 산화 스트레스를 줄이고 세포 손상을 방지하는 데 도움을 주는 것으로 밝혀졌다[9,10]. 주박 추출물은 항염증, 항균, 항암, 간 보호 등의 다양한 약리활성에 대한 선행연구 결과가 있으며 피부학적 측면에서는 항산화 및 미백 효능이 있다고 알려져 있다[11]. 선행연구를 바탕으로 주박이 피부 주름에 연관이 있는 것으로 추측되며 몇 가지 연구는 진행 되었지만 현재까지 주박의 분획물에 따른 피부 주름 형성에 미치는 효과에 대한 작용기전의 보고는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 주박의 Acetonitrile 추출물과 Hexan, Ethyl acetate, Water 분획물을 이용한 항산화, 주름 개선에 대한 화장품 소재 활성을 평가하고, 피부 섬유아세포 CCD-986 sk에 대한 세포 독성 시험 결과를 바탕으로 주박의 항주름 소재로서 이용 가능성에 대해 연구하였다.

2. 실험

2.1. 시료의 추출

본 연구에서 사용한 주박(*Makgeolli Lee*)은 ‘안심탁주’로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 막걸리를 걸러내고 얻은 주박을 시료 중량의 3배 양의 Acetonitrile을 넣어 실온에서 2시간마다 3번에 걸쳐 추출물을 얻었다. 이를 거름종이(Whatman No.2, GE healthcare, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 여과한 뒤, 여과액을 감압농축하여 액체 추출물을 얻었다. 이 추출물을 물에 희석 후 분별 깔때기를 사용하여 추출용매 hexane 으로부터 3번 추출하여 Hexane에 추출된 용액을 얻게 되었다. Hexane 추출 후 물에 희석된 추출물은 다시 회수되었다. 이렇게 회수된, 물에 희석된 추출물을 다시 분별 깔때기를 사용하여 추출용매 Ethyl Acetate로부터 3번 추출하여 Ethyl Acetate에 추출된 용매도 얻었다. 추출된 용매들은 모두 4 °C에 보관하여 실험에 사용하였다.

2.2. 재료 및 기기

항산화 실험에 사용된 시약인 ABTS [2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic

acid) diammonium salt]와 주름 효능 측정을 위한 시약인 porcine pancreas elastase, *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala-3-p-nitroanilide, Collagenase from *Clostridium histolyticum*는 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양 배지와 시료인 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)에서, 세포독성 측정 시약 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 항노화 활성 측정은 MMP-1 ELISA kit (Abcam, Cambridge, MA, USA), Pro-collagen type I C-peptide kit (Takara Shuzo, Kyoto, Japan)에서 각각 구입하여 사용하였다.

2.3. ABTS⁺ radical 소거능 측정

ABTS⁺ radical 소거능 측정은 다음의 방법에 따라 측정하였다. ABTS⁺ radical은 7.4 mM 2,2-Azino-bis (ABTS)와 2.6 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈)을 1:1로 혼합하여 차광 후 실온에서 24시간 동안 반응시켰다. 사용 전에 ABTS 용액을 99% EtOH에 희석하고 시료의 용매 0.1 ml을 첨가한 control 군의 흡광도 값이 734 nm에서 0.706±0.001이 되게 하여 사용하였다.

2.4. Elastase 저해 활성 측정

Elastase 저해 활성 측정은 다음의 방법에 따라 측정하였다. 시료용액 0.1 ml에 0.4 M Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 elastase (0.6 units/ml) 용액을 첨가하고 37 °C에서 차광 후 30분간 반응을 시켰다. 그 후 기질 *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala-3-p-nitroanilide (1 mg/ml)을 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹여 20분간 반응시켜 측정했다. 405 nm에서 흡광도 값이 0.5~0.7이 되게 하여 사용하였고 elastase 저해 활성은 시료의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.5. Collagenase 저해 활성 측정

Collagenase 저해 활성 측정은 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/ml)를 녹인 기질액 0.25

ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/ml) 0.15 ml를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% Citric acid 0.5 ml를 넣어 반응을 정지시켰다. 그리고 ethyl acetate 1.5 ml를 첨가하여 3,000 RPM에서 10분간 centrifugation을 해준 뒤 상층액을 뽑아 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해 활성은 시료의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.6. 세포 배양

본 연구에서 사용된 섬유아세포 (CCD-986sk fibroblast cell)는 대구한의대학교 화장품약리학과 피부면역약리실험실에서 분양받아 사용하였다. CCD-986sk 세포의 배양은 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 사용하였으며, 37 °C, 5% CO₂ incubator (Forma™, Thermo Fisher Scientific, USA)에 적응시켜 계대 배양하였다.

2.7. 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 MTT를 이용하여 다음과 같이 진행하였다. CCD-986sk 세포를 96 well plate에 5×10^5 cells/well로 0.2 ml씩 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 serum free DMEM 배지로 교체하고 시료의 최종 농도가 5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/ml 농도가 되도록 처리한 후 24시간 뒤 MTT를 well당 0.1 ml씩 처리하고 차광 후 2시간 동안 반응시켰다. well 내의 시약을 suction 해준 뒤 formazan crystal를 용해하기 위하여 유기용매인 DMSO 0.1 ml를 넣어주었다. plate reader를 이용하여 well을 20초 동안 shaking하고 570 nm에서 cell viability를 측정하였다.

2.8. Pro-collagen type I 생합성 및 MMP-1 저해 활성 측정

CCD-986sk 세포를 5×10^4 cells/ml 농도로 12 well plate에 seeding 한 후, UVB (25 mJ/cm²)를 조사한 후 시료를 농도별로 처리하여 CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 이렇게 처리한 세포의 배양액을 모아서 실험에 사용하였다. 세포 배양액 내 콜라겐 생합성 정도는 Pro-collagen

type I C-peptide (PIP) ELISA kit를 사용하여 Pro-collagen의 양을 측정하였으며, MMP-1 저해 활성 측정은 MMP-1 ELISA kit를 이용하여 제조사의 protocol 순서대로 측정하였다.

2.9. Real-time PCR

CCD-986sk 세포를 24 well plate에 4×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 뒤 시료를 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 cold PBS로 2번 세척 후, TRI-Solution (Bio Science Technology, Daegu, Korea)을 이용하여 세포벽을 깨고 chloroform을 넣어 수용액층과 유기용매층으로 분리하여 phenol성분을 제거한 뒤, isopropanol로 RNA를 침전시켜 75% 에탄올로 세척하였다. 이후 에탄올을 제거하고 RNA pellet만 남겨 air-dry 하여 RNase free D.W를 넣고 pellet을 녹여 최종적으로 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 nano drop (microdigital, Seongnam, Korea)을 이용하여 정량하고 RT master mix를 이용해 역전사 반응하여 cDNA를 합성한 후 filaggrin, aquaporin-3의 mRNA 발현 확인을 위해 TB Green® Premix Ex Taq II를 이용하여 증폭하였다. PCR조건은 94 °C에서 30초 (denaturation), 55 °C에서 30초 (annealing), 72 °C에서 30초 (extension)를 40회 반복하였다. 실험에 사용된 primer 염기서열은 Table. 1에 요약하였다.

2.10. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software package (Version 22.0; IBM, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)를 이용하여 유의성을 확인한 후, Duncan's multiple test와 *t*-test를 이용한 다중비교를 실시하여 유의수준 $p < 0.05$ 에서 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ABTS⁺ radical 소거능 측정

본 연구에서는 주박 추출물과 분획물의 항산화능을 평가하기 위해 ABTS⁺ radical 소거능 측정하였다. ABTS⁺ 라디칼 소거능 측정 방법은 ABTS 라디칼과 항산화 물질 간의 전자 전달 과정에 의

Table 1. Primer sequences.

Gene name		Sequence (5' → 3')
<i>GAPDH (human)</i>	Forward	CAGCCTCAAGATCATCAGCA
	Reverse	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA
<i>MMP-1 (human)</i>	Forward	GTTTTCTCAGAAAGAGCAGCAT
	Reverse	AGCGTGTGACAGTAAGCTAA
<i>MMP-3 (human)</i>	Forward	TTGTTCTTTGATGCAGTCAGC
	Reverse	GATTTGCGCCAAAAGTGC
<i>Pro-collagen (human)</i>	Forward	CTCGAGGTGGACACCACCT
	Reverse	CAGCTGGATGGCCACATCGG

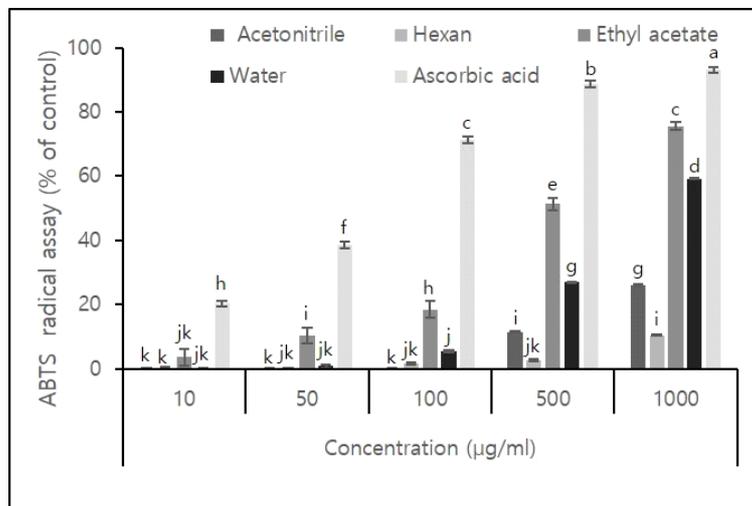


Fig. 1. ABTS⁺ radical scavenging activity of Jubak fractions. The result was presented as mean ± S.D from three independent experiments. Statistical analysis was performed using Duncan's multiple range test. Means with different letters (a-k) above the bars are significantly different at p<0.05.

해 라디칼이 중화되어 흡광도의 변화를 측정하는 방법이다[12]. 실험 결과는 Fig. 1과 같다. 실험결과 주박을 용매별 (Acetonitrile 추출물과, Hexan, Ethyl acetate, Water 분획물)로 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/ml 농도로 처리하였을 때 1,000 µg/ml 농도에서 각각 25.9, 10.4, 75.5, 59.2%의 활성을 보였으며 대조군인 ascorbic acid는 1,000 µg/ml에서 93.1%의 활성을 나타내었다. 주박의 Ethyl acetate 분획물이 항산화력이 가장 우수함을 확인하였다(Fig. 1).

3.2. Elastase 저해 활성 측정

엘라스틴(elastin)과 콜라겐(collagen), 그리고 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans, GAGs)은 모두 피부의 구조를 형성하고 유지하는 데 중요한 역할을 하는 성분들로 알려져 있다. 그 중 엘라스틴은 탄성 섬유로 구성되어 있으며, 피부가 늘어나고 원래 형태로 돌아오는 데 필요한 탄력을 제공하여 피부의 탄력을 유지하고 주름 형성을 방지하는 데 중요한 역할을 한다[13]. 엘라스타아제 (elastase)는 엘라스틴을 분해하는 효소로,

피부의 노화 과정에서 증가하는 경향이 있으며, 이는 피부의 탄력을 감소시키고 주름을 형성하는데 기여하는 것으로 알려져 있다[14]. 일부 천연물은 엘라스타아제 활성을 억제하거나 감소시키는 성분을 포함하고 있으며 이러한 연구는 기능성화장품 소재개발에 중요한 요소로 작용되고 있다. 주박의 elastase 저해 활성을 확인한 결과 Acetonitrile 추출물과 Hexan, Ethyl acetate, Water 분획물 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 28.3, 10.9, 53.2, 24.7%의 활성을 보였으며 대조군 epigallocatechin gallate (EGCG)는 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 66.9%를 나타내었다. 합성물질인 대조군 EGCG가 동일농도에서 가장 높은 elastase 저해 활성을 나타내었지만 천연물의 장점인 안전성과 부작용이 적은점, 비타민, 미네랄, 항산화물질 등을 함유하고 있어 체내 다양한 약리기전을 통해 피부의 건강을 향상시키는 데 도움을 줄 수 있기 때문에 천연물 사용추세가 늘어나고 있다. 또한 환경에도 친화적이며 생태학적으로 지속 가능하다는 의미에서 주박이라는 소재는 주류로 생산되는 공정에서 폐기물로 버려지지 않고 리사이클 하는 자연친화적인 소재로서 그 활용도가 우수하다고 볼 수 있다.

3.3. Collagenase 저해 활성 측정

Collagenase 저해 활성 측정 실험은 콜라겐 분해 효소인 콜라게나아제(collagenase)의 활성을 측정하여 콜라게나아제의 활동을 억제하는 물질의 효능을 평가하는 실험으로 피부 노화 및 염증 관련 질환과 관련된 약물 개발 및 화장품 성분 평가 등에 널리 사용된다[15]. 주박의 collagenase 저해 활성을 확인한 결과 Acetonitrile 추출물과 Hexan, Ethyl acetate, Water 분획물 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 32.9, 12.8, 61.7, 23.7%의 활성을 보여 Ethyl acetate 분획물이 가장 높은 효능을 나타내었다. 따라서, 주박추출물의 주름 개선 천연 화장품 소재로 이용가치를 확인할 수 있었다.

3.4. 세포 생존율 측정

화장품 소재로서 시료가 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하기 위해 인간섬유아세포인 CCD-986sk 세포에서 MTT assay를 통해 주박 추출물의 세포 독성을 확인하였다. MTT assay는 MTT 화합물이 살아있는 세포 내에서 산화되어 형성되는 형광염료인 formazan의 생성을 측정한다[16]. 산화된 formazan의 양은 세포 내 미토콘드리아의

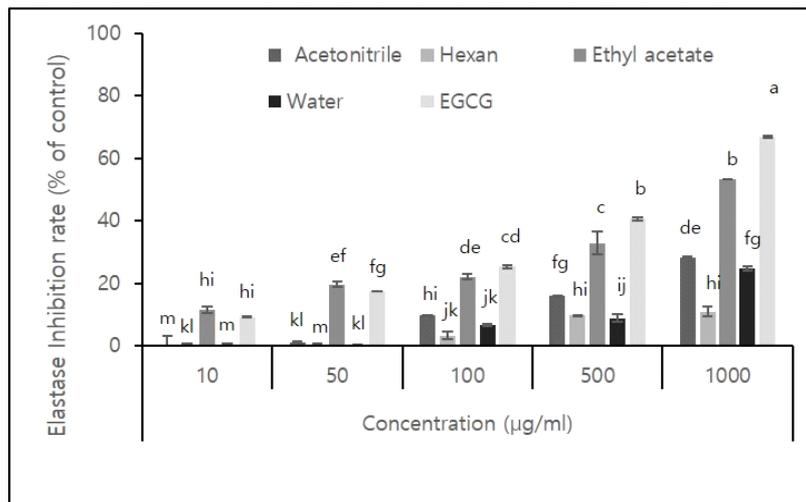


Fig. 2. Elastase inhibition activity of Jubak fractions. EGCG: Epigallocatechin gallate (Positive control). The result was presented as mean \pm S.D from three independent experiments. Statistical analysis was performed using Duncan's multiple range test. Means with different letters (a-m) above the bars are significantly different at $p < 0.05$.

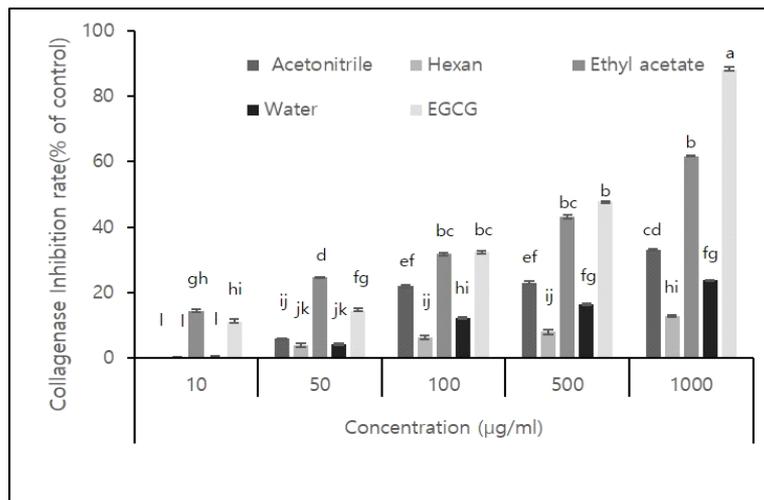


Fig. 3. Collagenase inhibition activity of Jubak fractions. EGCG: Epigallocatechin gallate (Positive control). The result was presented as mean ± S.D from three independent experiments. Statistical analysis was performed using Duncan's multiple range test. Means with different letters (a-l) above the bars are significantly different at $p < 0.05$.

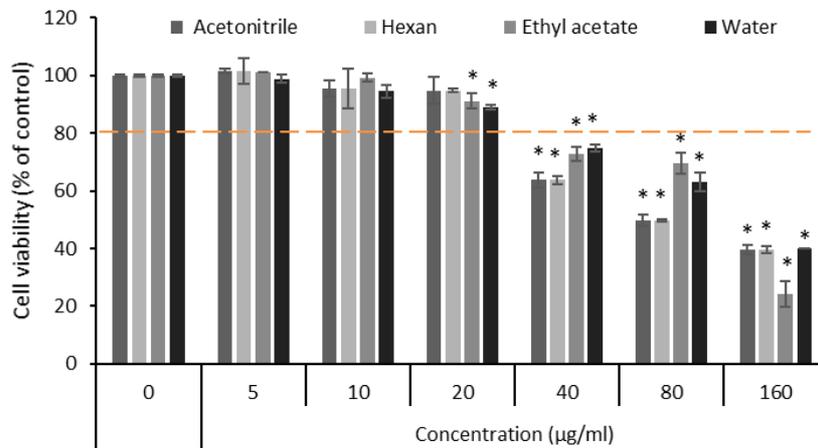


Fig. 4. Cell viability of Jubak fractions in CCD-986sk fibroblast cells. The cells were treated with concentrations (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/ml) of Jubak extract. Cell viability was measured using the MTT assay. The result was presented as mean ± S.D from three independent experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by t -test (significant compared to the extract treated only group. * $p < 0.05$).

활성 상태 및 대사 활동과 관련이 있으며 이 측정은 살아있는 세포에서 발생하며, 시료의 세포 독성 실험이나 약물 효과 등을 평가하는 데 널리 사용된다. 주박 추출물과 분획물을 5, 10, 20,

40, 80 µg/ml의 농도로 시료를 처리한 결과 20 µg/ml 이하의 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어 향후 실험의 유효농도를 20 µg/ml로 진행하였다.

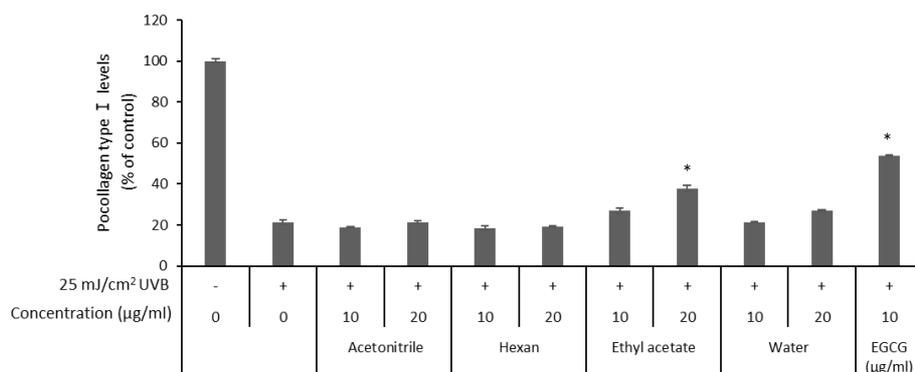


Fig. 5. Effect of Jubak fractions on UVB-induced pro-collagen type I production in CCD-986sk fibroblast cells. The cells were treated with Jubak fractions (10, 20 µg/ml) and EGCG (10 µg/ml). The production of pro-collagen was determined by ELISA kit. EGCG: Epigallocatechin gallate (Positive control). The result was presented as mean ± S.D from three independent experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by *t*-test (significant compared to the extract treated only group.. **p* < 0.05).

3.5. Pro-collagen type I 생합성 측정

프로콜라겐(procollagen)은 콜라겐의 전구체로, 콜라겐 섬유가 형성되기 전에 세포 내에서 합성되며 콜라겐 분자의 초기 형성 단계로서 중요한 역할을 한다. 프로콜라겐은 일종의 세포 외 기질 단백질로서 세포 외 매트릭스에 분비되어 콜라겐 섬유의 형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다[17]. 이러한 섬유는 피부의 구조적 지지를 제공하고, 특히 피부의 탄력을 유지하는 데 중요한 역할을 하기 때문에 Pro-collagen type I 생합성량을 측정함으로써 주름개선 효능을 평가할 수 있다[18]. ELISA kit를 통해 주박 추출물과 분획물이 UVB 자극을 받은 CCD-986sk 세포 내 pro-collagen의 합성량을 확인한 결과, 정상군을 100% 두었을 때 비해 UVB 단독 처리군의 pro-collagen 합성률이 21.2%로 감소했으며, Acetonitrile 추출물과 Hexan, Ethyl acetate, Water 분획물 1,000 µg/ml 농도에서 각각 21.4, 19.2, 37.8, 21.1%의 합성률을 나타내어 주박 Ethyl acetate 분획물이 UVB 단독 처리군 대비 Pro-collagen type I 생합성이 가장 높게 나타났으며 유의미한 결과를 나타내었다.

3.6. MMP-1 저해 활성 측정

MMP-1 (Matrix Metalloproteinase-1)은 콜

라겐 분해 효소의 일종으로서 주로 콜라겐 타입 I을 분해하는 데 관여하며 콜라겐 섬유를 분해하는 데 중요한 역할을 한다. 주로 세포외매트릭스(ECM)에서 활성화되며 섬유아세포(fibroblast) 및 염증 세포에서 발견되고 원인으로서는 자외선이 가장 큰 영향으로 작용하여 MMP-1의 활성도가 증가된다고 알려져 있다[19,20]. 이는 콜라겐 섬유의 분해를 촉진하여 피부의 탄력을 감소시키고 주름 등의 노화 피부로 표현된다. MMP-1의 과발현은 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환에서도 조직 파괴를 야기시켜 다양한 질병을 일으키기도 한다[21]. MMP-1의 활성은 TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase)에 의해 억제될 수 있으며 TIMP는 MMP들의 활성을 제어하여 세포외매트릭스(ECM)의 분해를 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[22]. ELISA kit를 이용해 UVB를 조사한 CCD-986 sk 세포 내 주박 추출물과 분획물을 처리하였을 때 MMP-1의 발현 정도를 측정된 결과, UVB 단독 처리군에 비해 주박추출물과 분획물을 처리하였을 때 20 µg/ml에서 89.0, 91.5, 72.5, 60.2, 90.1%로 나타나 4가지 시료 모두 MMP-1의 활성이 저해되었으며 Ethyl acetate 분획물은 농도 10, 20 µg/ml에서 모두 MMP-1 저해 활성에 유의미한 결과를 나타내었다(Fig. 6). 추출 용매별

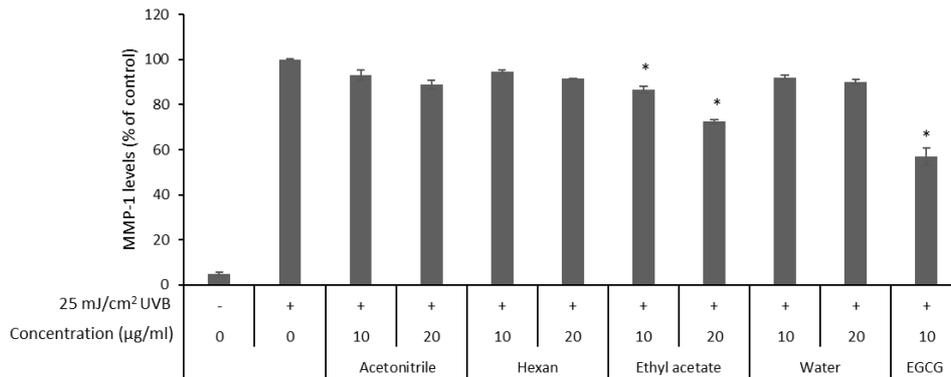


Fig. 6. Effect of Jubak fractions on UVB-induced MMP-1 expression in CCD-986sk fibroblast cells. The cells were treated with Jubak fractions (10, 20 $\mu\text{g/ml}$) and EGCG (10 $\mu\text{g/ml}$). The expression of MMP-1 was determined by ELISA kit. EGCG: Epigallocatechin gallate (Positive control). The result was presented as mean \pm S.D from three independent experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by *t*-test (significant compared to the stimulus only group. **p*< 0.05).

실험을 진행함에 있어 결과값이 상이한 것은 분획물의 페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 능력 및 발현 억제 효과에 대한 상관관계가 있을 것으로 판단되며 향후 실험에서는 주박의 유효성분들을 표준물질로 지정하여 용매별 함량을 HPLC로 분석하여 비교하는 실험이 필요하다고 사료된다.

3.7. MMP-1, 3 및 pro-collagen의 mRNA 분석

주박 추출물과 분획물이 주름 관련 인자인 MMPs 유전자 발현과 pro-collagen 합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 real-time PCR을 통하여 mRNA 수준의 발현량을 확인하였다. 그 결과 UVB만 처리한 control 군과 비교하여 UVB와 추출물 동시에 처리하였을 때 MMP-1-3 pro-collagen의 발현량은 Ethyl acetate 분획물을 제외한 3시료의 저농도에서는 유의미한 효능을 나타내지 않았으나 Ethyl acetate 분획물의 농도 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 모두 MMP-1 저해 활성능이 대조군인 EGCG와 유사한 값으로 유의미한 결과를 나타내었다(Fig. 7A). MMP-3의 mRNA 발현 결과, UVB 단독군의 mRNA level 값을 100%로

보았을 때 Ethyl acetate 분획물은 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 30% 정도의 억제능을 나타내어 천연물로서의 높은 효능을 보였다(Fig. 7B). Pro-collagen에 대한 mRNA 발현량은 UVB 단독군의 mRNA level 값을 100%로 보았을 때 Ethyl acetate 분획물은 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 40% 정도의 Pro-collagen 생성능을 나타내었고 EGCG는 UVB를 처리하지 않은 normal군의 Pro-collagen 생성량과 유사한 값을 나타내어 가장 높은 효능을 보였다(Fig. 7C). MMPs의 mRNA 단계에서의 억제능은 단백질 합성과 관련된 다양한 생리적 및 병리학적 프로세스에 영향을 주는 것으로 알려져 있어 mRNA 단계 실험은 중요한 요소라고 볼 수 있다[23]. MMP와 Pro-collagen의 mRNA 및 단백질의 발현 관계 실험을 통해 노화와 관련된 유전자 및 단백질을 식별할 수 있으며 결과를 토대로 밝혀진 화장품은 피부 노화를 어떻게 개선하거나 예방할 수 있는지 평가할 수 있다. 이를 통해 피부 노화 매커니즘을 연구하고, 전이되는 기전을 예방하거나 개선할 수 있는 새로운 신소재를 평가하여 우수한 기능성화장품을 개발할 수 있다.

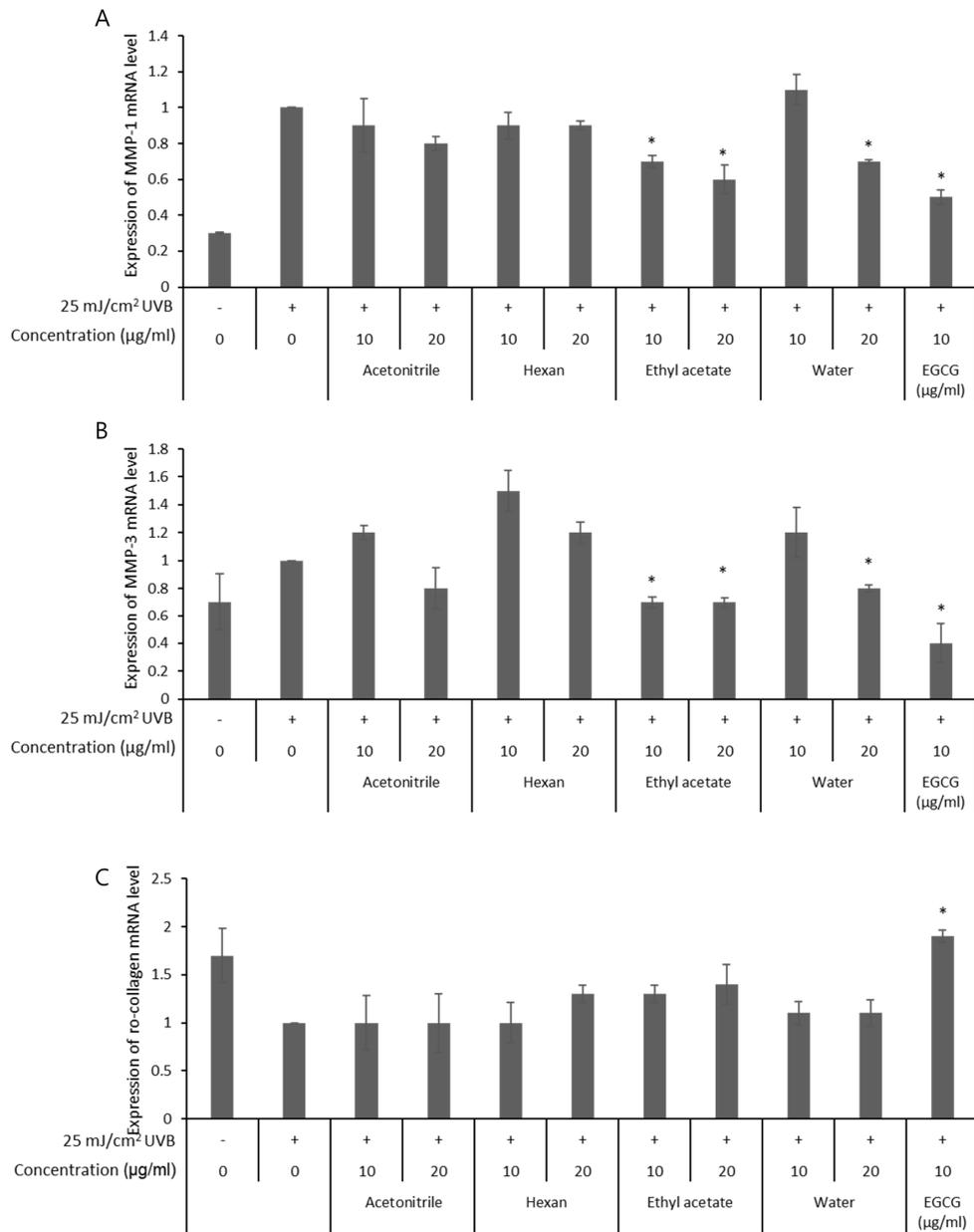


Fig. 7. Procollagen, MMP-1 and MMP-3, pro-collagen, mRNA expressions on UVB-irradiated human fibroblasts treated with Jubak fractions. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of extracts before treatment with UVB (25 mJ/cm²) for 24 h. Normal : Neither extract nor UVB treatment, UVB (25 mJ/cm : only UVB treated. The data are representative of three experiments. Each value is expressed as the mean ± SD of three independent experiments. The statistical analysis of the data was carried out by use of ANOVA test. **p* < 0.05, compared with absence of extract.

4. 결론

본 연구에서는 기능성 화장품 소재로서 주박 (Jubak)의 항산화와 UVB로 유도된 인간섬유아세포인 CCD-986sk 세포에서의 항주름 효과를 알아보았다. 실험에 사용된 주박은 Acetonitrile로 추출하고 Hexan, Ethyl acetate, Water로 분획하여 실험을 진행하였다. 항산화 활성 실험으로 대표적인 ABTS⁺ radical 소거능 측정을 통한 항산화 활성과 Elastase, Collagenase 저해 활성 측정을 통해 항주름 효과를 확인한 결과, 모두 주박 Ethyl Acetate 분획물이 다른 용매 대비 가장 높은 효능을 나타내었다. UVB로 유도된 CCD-986sk 세포 내 pro-collagen type I의 합성률과 MMP-1의 저해률을 측정결과에서도 Ethyl Acetate 분획물이 가장 효능이 우수하였다. Real time PCR 실험에서 pro-collagen type I, MMP-1 및 MMP-3의 mRNA 발현량을 측정 결과에서도 주박 분획물은 주름개선에 효능이 있는 결과를 나타내었다. 이상의 결과로 주박 Ethyl Acetate 분획물은 UVB 자극에 의한 광노화에 대한 항주름 효과가 있음을 확인하여 주름개선 기능성화장품 천연물 소재로서의 이용이 기대된다.

사 사

본 연구는 2023년도 덕성여자대학교 교내연구비 지원으로 이루어졌음(2023-3000008127)

References

1. J. H. Jeong, "한국인의 피부노화 특징 및 발생기전", *Journal of the society of cosmetic scientists of Korea*, Vol.27, No.2, pp. 31-35, (2001).
2. S. H. Hong, H. N. Lee, T. K. Jeong, Y. H. Kim, H. S. Jeong, J. S. Lee, "Protective Effect of Jujube Water Extract against UVB-Induced Skin Photoaging in Human Skin Fibroblasts", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, vol. 48, No. 10, pp. 1172-1177, (2019).
3. K. H. Lee, H. S. Park, I. J. Yoon, Y. B. Shin, Y. C. Baik, D. H. Koo, S. K. Kim, H. K. Jung, M. O. Sim, H. W. Cho, W. S. Jung, M. S. Kim "Whitening and Anti-Wrinkle Effects of Tremella Fuciformis Extracts", *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, Vol. 24, pp. 38-46, (2016).
4. Nagase, Hideaki, "Matrix metallo-proteinases." *Zinc Metalloproteases in Health and Disease*, pp.173-224, (1996).
5. S. C. Lim, "Expression of matrix metallo-proteinases and its inhibitor in gastric adenocarcinoma", *Cancer Research and Treatment*, Vol. 33, No. 3 pp. 199-206, (2001).
6. J. S. Roh, H. J. Yeom, M. J. Oh, J. Y. Lee, "A Study on the Antioxidant and MMPs Protein Expression Inhibitive Effect of Punica granatum L. Extract and Its Stabilization with Liquid Crystal Emulsion", *Journal of Life Science*, Vol. 31, No. 2 pp. 164-174, (2021).
7. S. Kim, T. j. Park, J. S. Lim, S. Y. Kim, "Effect of Agaricus biorenovate Extract on Collagen Synthesis and Matrix Metallo-proteinase-1 Production in Human Dermal Fibroblast" *KSBB Journal*, Vol. 34, No. 1, pp. 49-53, (2019).
8. E. H. Lee, S. Y. Lee, H. Y. Jung, I. K. Kang, D. H. Ahn, Y. J. Cho, "Photo-aging regulation effects of newly bred Green ball apple", *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol. 63, No. 1, pp. 75-82, (2020).
9. S. M. Lee, S. J. Lee, Y. Y. Kwon, S. H. Baek, J. S. Kim, H. Y. Sohn, W. C. Shin, "Skin whitening and anti-wrinkle effects of extract from Jubak of oriental herbal liquor", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 43, No. 11, pp. 1695-1700, (2014).
10. M. S. Kim, D. K. Kang, W. C. Shin, H. Y. Sohn, "Anti-microbial, anti-oxidant, and anti-thrombosis activities of the lees of Bokbunja wine (*Rubus coreanus Miquel*)", *Journal of Life Science*, Vol. 25, No. 7, pp. 757-764, (2015).
11. S. M. Kim, E. H. Kim, D. H. Song, Y. S.

- Jung, H. J. Jeon, Y. K. Choi, H. J. Kim, "Extraction and Fermentation of Rice Wine Lees for the Development of Cosmetic Ingredients", *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, Vol. 19, No. 3, pp. 501-508, (2013).
12. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements", *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol.53, No.10, pp. 4290-4302, (2005).
 13. M. J. Jang, D. H. Jun, S. H. Kim, S. I. Han, J. T. Lee, "Anti-wrinkle Effect of Chestnut Leaf", *Journal of Life Science*, Vol.23, No.6, pp. 751-756, (2013).
 14. D. H. Kim, T. S. Park, J. H. Son, "Anti-wrinkle Activities Verification of Buplerum falcatum Extracts on CCD-986sk", *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol.58, No.2, pp. 183-187, (2015).
 15. W. Y. Jung, J. M. Jeong, "Change of antioxidative activity at different harvest time and improvement of atopic dermatitis effects for persimmon leaf extract", *The Korea Journal of Herbology*, Vol. 27, No. 1, pp. 41-49, (2012).
 16. Y. B. Cho, J. Y. Kim, N. W. Kwon, B. Y. Hwang, J. G. Kim, S. H. Woo, M. S. Lee, "Purification and Identification of Cytotoxic Compounds from the Root of Rumex crispus L.", *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, Vol. 27, No. 3, pp. 208-217, (2019).
 17. Park hye ryeon, & AHN HONG SEOK, "Effect of Procollagen Type I Stimulation and Inhibition of MMP-2 mRNA Expression from Chenopodium album Ethanol Extract", *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, Vol. 21, No. 6, pp. 1189-1195, (2015).
 18. D. H. Kim, T. S. Park, J. H. Son, "Potential prevention effects of Rubus occidentalis seed on UVB-induced MMP-1 production and procollagen degradation in CCD-986sk cells", *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol. 59, No. 4, pp. 317-322, (2016).
 19. J. E. Kim, Y. S. Choi, H. K. Kim, Y. A. Jang, "Collagen synthesis ability and inhibitory effect of MMPs in keratinocytes of Lysimachia christinae Hance Extract", *The Korean Society of Applied Science and Technology*, Vol. 37, No. 4, pp. 820-829, (2020).
 20. Y. A. Jang, "A Verification of Cosmetic Effect about Anti-oxidant and Anti-wrinkle of 11 Native Plants", *Journal of Life Science*, Vol. 26, No. 7, pp. 782-788, (2016).
 21. S. H. Lee, D. Y. Choi, Y. H. Lee, "Response to Bee Venom Acupuncture and Polymorphism of Matrix Metalloproteinase -1 Gene in Korean Patients with Rheumatoid Arthritis", *Journal of Acupuncture Research*, Vol .21, No. 1, pp. 211-225, (2004).
 22. Y. A. Jang, J. T. Lee, "Anti-wrinkle effect of berberine by inhibition of MMP-2 and MMP-9 activity in fibroblasts", *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol. 61, No. 1, pp. 9-15, (2018).
 23. B. A. Kim, "Anti-aging effect of Codium fragile extract on keratinocytes damaged by fine dust PM10", *The Korea Journal of Herbology*, Vol. 38, No. 4, pp. 45-52, (2023).