

## MMP-1 and PIP Expressions from Ethanol Extract of *Hydnocarpus anthelmintica* Pierre in Human Fibroblast Cells

Eun-Young Choi<sup>1</sup>, Young-Ah Jang<sup>2</sup> and Se-Gie Kim<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyungbuk 38578, Korea

<sup>2</sup>Convergence Research Center for Smart Healthcare of KS R&DB Foundation, Kyungshung University, Busan 48434, Korea

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Catholic University, Gyungbuk 38430, Korea

Received September 23, 2022 / Revised December 8, 2022 / Accepted December 13, 2022

This study aims to evaluate the effects of antioxidant activities, protein and mRNA expressions of matrix metalloproteinase (MMP) -1 and procollagen type I C-peptide (PIP) in 70% ethanol extract from *Hydnocarpus anthelmintica* Pierre (HE). DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals scavenging assays were measured for antioxidant activities and HE had 73.5% and 74.4% of scavenging activities at 1,000 µg/ml concentration, respectively. And we investigated the inhibition of collagenase by HE, and the result was a 78.8% inhibition effect on concentrations of 1,000 µg/ml. In addition, an MTT assay was performed to confirm the toxicity of the CCD-986sk fibroblasts to the HE, and as a result, the cell viability rate was about 91.7% at a concentration of 50 µg/ml or less, and subsequent cell experiments were performed at a concentration of 50 µg/ml or less. We treated the cells with UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>) for stimulation, treated HE at various concentrations, and performed ELISA tests and RT-PCR experiments. And HE increased the PIP and mRNA in a dose-dependent manner and showed an expression rate of about 64.2% and 83.4%, respectively, at a concentration of 50 µg/ml compared with Cont (50.3% and 45.8%, respectively). And HE suppressed the MMP-1 protein and mRNA in a dose-dependent manner and showed a low expression rate of about 48.7% and 35.9%, respectively, at a concentration of 50 µg/ml. These results can be applied to developing anti-wrinkle materials for functional food and cosmetics with HE.

**Key words :** *Hydnocarpus anthelmintica* Pierre, matrix metalloproteinase-1, antioxidant, procollagen type I C-peptide

### 서 론

피부는 표피, 진피와 피하지방조직으로 이루어져 있으며 그 중 진피는 피부의 약 90% 이상을 차지하는 결합조직층이다. 일반적으로 진피층의 70%를 차지하고 있는 콜라겐은 피부의 강도와 장력을 부여한다[9]. 콜라겐은 진피에 존재하는 섬유아세포에서 procollagen이라는 전구물질로 합성된 후 세포 외로 분비되어 콜라겐 섬유로 중합되며, 29가지의 콜라겐 가운데 collagen type I 은 인간의 피부 세포에서 가장 풍부한 단백질이다[9]. propeptide는 소포체 내에서 procollagen 분자의 folding을 도와줌과 동시에 콜라겐 중합반응이 일어날 때 콜라겐 분자로부터 절단되어

분리된다고 알려져 있으며[7], 자외선에 의해 procollagen의 양이 감소하면 콜라겐 양이 감소하게 되고, 이는 피부 노화의 주요 원인이 되는 것으로 알려져 있다[5]. 피부의 진피 조직 속에는 피부 탄력성에 관련된 엘라스틴이 그물망 구조를 형성하고 있는데[29], 엘라스틴의 감소는 피부 탄력의 감소를 유발하고 결과적으로 피부 주름을 형성하게 된다[14]. 노화가 진행되면 피부 두께를 변화시키고 건조하고 거친 피부를 만든다[7]. 이러한 피부의 노화를 악화시키는 요인이 자외선이다[42]. 피부가 자외선에 노출되면 교원섬유 및 탄력섬유 등의 기질 단백질이 손상되어 피부 내 교원질의 양이 부족해지고 탄력섬유가 변성되어 주름을 유발하며 기미, 주근깨 및 검버섯이 증가하는 현상을 보인다[32]. 세포외기질의 분해는 기질 단백질 분해 효소(matrix metalloproteinase, MMP, collagenase)에 의해 일어나며 자외선의 노출은 이를 가속화시킨다[32]. 특히 MMP-1은 collagen을 분해시켜 주름, 잔주름 등을 발생시킨다[8, 43]. Kim 등[19]의 연구에 따르면 섬유아세포에 자외선을 조사하면 세포 내 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 증가로 인하여 DNA가 손상될 뿐만 아니라

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-850-2564, Fax : +82-83-359-6823

E-mail : [sgkim7@cu.ac.kr](mailto:sgkim7@cu.ac.kr)

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.

세포의 성장 저해 및 MMP 발현을 증가시키며 콜라겐 분해가 촉진된다고 하였다. 따라서 피부노화와 주름의 개선에 있어 자외선 노출에 의한 활성산소의 생성을 억제할 수 있는 항산화 물질이나 collagenase의 작용을 억제하고 콜라겐의 합성을 촉진시키는 소재의 발굴이 중요하다.

대풍자는 대풍자과에 속하는 식물 대풍자(*Hydnocarpus anthelmintica* Pierre)의 다 익은 종자이며, 중국의 운남과 광서, 대만, 베트남 및 태국 등지에서 재배된다[31]. 대풍자는 중국이나 인도, 미얀마 등지에서 그 종유가 한센병 치료와 다른 피부 질환의 치료에 효능이 있다고 알려져 왔으며[31], 1946년에 설파제가 생산되기 전까지는 한센병 치료를 위한 약제로 사용되어 왔으며[35], 주성분은 hydnocarpic acid, chaulmoogric acid, goric acid로 알려져 있다[28]. 지금까지의 대풍자에 대한 연구는 염증과 궤양 등의 치료효과를 보고한 연구[27]가 있었으나 주름생성 억제 효과에 대한 보고는 아직 발표된 바가 없기에 본 연구에서는 human fibroblasts인 CCD-986sk에 UVB를 조사한 후 대풍자 에탄올 추출물을 처리하였을 때 MMP-1의 발현 억제와 procollagen type I의 생합성 효과를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료의 추출

본 연구에 사용된 대풍자는 (주)휴먼허브(Gyeongosan, Korea)에서 구입하였으며, 대풍자 에탄올 추출물(HE)의 제조과정은 다음과 같다. 구입한 종자를 세척, 건조과정을 통해 준비하였으며 시료 중량의 10배의 70% 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상층액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 추출물은 여과지(Whatman No. 2, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 여과하여 감압농축기(Rotavapor R-124, Buchi, Flawil, Switzerland)에서 60°C에서 농축한 후 동결건조기(Bondiro, Ilshin Freeze Dryer, Yangju, Korea)로 건조과정을 거쳐 분말을 얻었으며 그 수율은 10.8%이다. -20°C에 냉동 보관한 후 실험을 위해 사용하기 전에 3차 증류수를 용매로 사용하였다.

### 전자공여능 측정

시료의 전자공여능(EDA; electron donating ability)은 Blois의 방법[3]을 변형하여 실시하였다. 농도별로 제조한 시료용액 0.1 ml에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich Co.) 용액을 0.05 ml 넣고 교반한 후 차광하여 30분간 반응시킨 다음 ELISA reader (Power Wave XS Microplate Spectrophotometer, Biotek, Inc., Winooski, VT, USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 대한 대조군으로는 항산화 효능이 우수한 합성비

타민인 ascorbic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였으며, 전자공여능의 효과는 시료용액을 첨가한 군과 시료용액을 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율로 나타냈다.

### ABTS<sup>+</sup> radical 소거능 측정

시료의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 ABTS<sup>+</sup> radical cation decolorization assay [41]의 방법을 변형하여 실시하였다. 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma-Aldrich Co.)와 2.6 mM potassium persulfate (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)를 1:1로 혼합한 후 차광하여 실온에서 24시간 동안 반응하였다. 그 후 ABTS<sup>+</sup> 용액은 734 nm에서 흡광도가 0.706±0.001이 되도록 에탄올에 희석하여 사용하였다. 시료에 대한 대조군으로는 항산화 효능이 우수한 합성비타민인 ascorbic acid를 사용하였으며, ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 시료용액을 첨가한 군과 시료용액을 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율로 나타냈다.

### Elastase 저해 활성 측정

시료의 elastase 저해활성은 Cannell 등[4]의 방법을 변형하여 실시하였다. 기질로서 N-succinyl-L-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 양을 측정하였다. 즉, 각 시료를 일정 농도가 되도록 조제하여 0.1 ml씩 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (0.6 units/ml, Sigma-Aldrich Co.) 용액 0.05 ml을 가한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-L-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (0.1 mg/ml)을 0.1 ml 첨가하여 20분간 상온에서 반응시킨 후 흡광도 445 nm에서 측정하였다. 시료에 대한 대조군으로는 epigallocatechin gallate (EGCG, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였으며, elastase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타냈다.

### Collagenase 저해 활성 측정

Collagenase 저해활성의 측정은 Cannell 등[4]의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 반응구로 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하고 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/ml, Sigma-Aldrich Co.)를 녹인 기질액 0.25 ml과 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/ml, Sigma-Aldrich Co.) 0.15 ml를 첨가하여 실온에서 20분간 정지한 후 6% citric acid 0.5 ml을 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 ml을 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 대한 대조군으로는 EGCG를 사용하였으며, collagenase 저해활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타냈다.

### 세포의 배양

Human 유래 fibroblast cell line인 CCD-986sk cells (passage number 6)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 10% fetal bovine serum (FBS, Hy Clone™, USA)과 penicillin/streptomycin (Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA) 100 units/ml이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WelGene Biopharmaceuticals, Gyeongsan, Korea) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다.

### 세포 생존율 측정

세포생존율 측정은 Mosmann의 방법[34]을 변형하여 측정하였다. CCD-986sk fibroblasts를 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml이 되게 0.2 ml 분주한 다음 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 2회 세척한 다음 시료를 농도별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 생존율을 측정하기 위하여 PBS에 용해시킨 5 mg/ml의 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.) 시약 0.02 ml을 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 배양한 다음 상층액을 제거한 후, 형성된 formazan에 각 well당 0.1 ml의 dimethyl sulfoxide (DMSO, Duksan, Ansan, Korea)를 첨가하여 실온에서 차광한 상태로 30분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

시료의 주름생성 억제 활성을 알아보기 위해 MMP-1 protein 발현과 procollagen type I C-peptide (PIP)의 생합성을 관찰하였다. CCD-986sk fibroblasts는 6 well culture plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 cell seeding 후 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양 후 무혈청 배지 처리하여 다시 24시간 배양하였다. UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>)를 조사하고 나서 무혈청 배지 9 ml과 시료를 농도별로 1 ml을 첨가하여 24시간 배양한 뒤 세포의 배양액을 harvest하여 human ELISA kit (Sigma Chemical Co.)를 사용하여 MMP-1과 PIP의 총 양을 확인하였다.

### Total RNA 추출 및 Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA는 High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland)을 이용하여 제조사의 실험방법에 준하여 추출한 후 1 µg/µl의 농도로 정량하였다. 정량화 한 total RNA는 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)로 역전사를 일으켜 cDNA를 합성하였다. MMP-1과 procollagen type I의 mRNA 발현을 확인하기 위하여 Fast start Essential DNA Green Master kit (Roche)을 이용하여 RT-PCR을 진행하였고, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogen-

ase (GAPDH, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA)를 internal control로 사용하였다. PCR의 조건은 94°C에서 60초 동안 30 cycle을 증폭시키고 60°C에서 60초, 72°C에서 65초 동안 진행하였다. 증폭 과정에서 만들어진 DNA를 0.5 µg/ml의 ethidium bromide를 첨가한 1.5% metaphor agarose gel에서 전기영동을 진행하였으며 cooled CCD camera system EZ-Capture II 시스템과 CA analyzer ver. 3.00 software (EZ-Capture MG, ATTO, Amherst, NY, USA)를 사용하여 mRNA의 발현 정도를 확인하였다.

### 통계처리

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

## 결 과

### 대풍자 에탄올추출물의 항산화 활성 결과

활성산소종은 산화적 스트레스에 의해 생성되며, singlet oxygen, superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, hydroperoxyl radical 등이 속한다[2]. ROS가 과도하게 생성되면 체내 항산화제 파괴, 지질 과산화 반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬 절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름 생성 등과 같은 세포와 조직에 산화적 세포손상을 일으켜 노화를 촉진시킨다고 알려져 있다[13, 39]. 한편 ROS에 대한 방어기구로서 사용되는 항산화제는 생체 이물, 약물, 발암물질, 유해한 radical 반응의 부작용에 대해 직접 또는 간접적으로 세포를 보호하는 물질로서 약용식물에 포함된 여러 성분들은 높은 항산화 활성을 나타내며, 많은 항산화제들이 free radical과 superoxide를 제거하거나 해독 및 방어하는 단백질을 활성화시키는 능력을 지니고 있다고 알려져 있다[11]. 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화 radical에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다[16]. 이때 수소 주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다[12]. DPPH 자체는 매우 안정한 free radical을 갖는 자색의 화합물로서 지질산화에 관여하며 517 nm에서 특징적인 광흡수를 갖는다. 즉 시료가 DPPH의 free radical을 소거하여 환원성을 높여 자색이 노란색으로 탈색될 경우 항산화 활성을 갖는다고 볼 수 있다[6]. 본 연구에서는 대풍자 에탄올추출물(HE)의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였고 그 결과는 Fig. 1A에 나타났다.

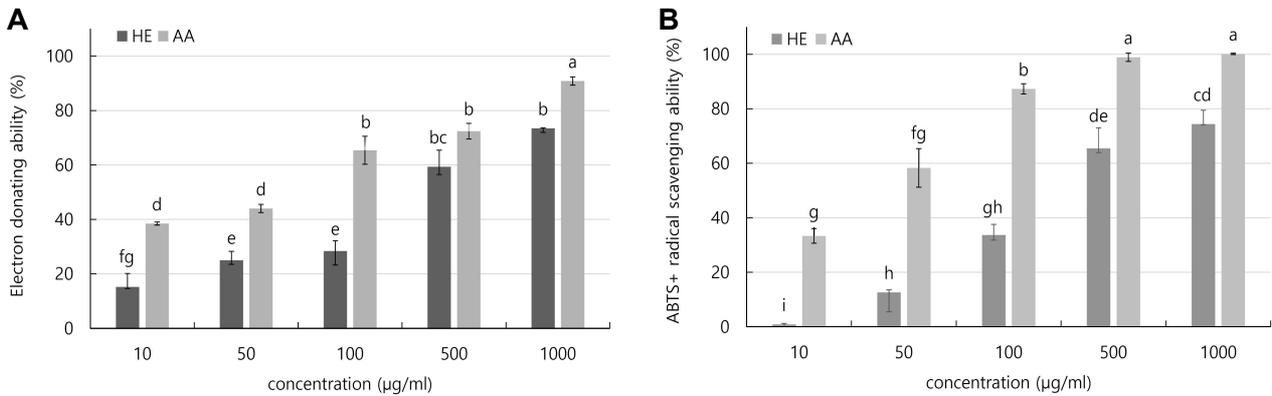


Fig. 1. Antioxidant assay. (A) Electron donating ability. (B) ABTS<sup>+</sup> radical scavenging ability. HE: 70% ethanol extract of *Hydnocarpus anthelmintica* Pierre, AA: Ascorbic acid (Positive control), Results are means ± S.D. of triplicate data. Means with different letters (a-i) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$

HE 10, 50, 100, 500 및 1,000 µg/ml 농도에서의 DPPH radical 소거 활성은 농도의존적으로 증가하였고, 특히 1,000 µg/ml 농도에서 약 73.5%의 소거능을 보였다. ABTS<sup>+</sup>는 cation radical를 갖는 화합물로서 ABTS와 potassium persulfate 간의 반응으로 생성된다[41]. 추출물의 항산화 활성에 의하여 ABTS<sup>+</sup>가 소거되면 특유의 색인 청록색이 탈색되고 이것을 흡광도 값으로 나타내어 소거활성을 확인할 수 있다[20]. ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성의 결과는 Fig. 1B에 나타났다. HE의 농도가 증가할수록 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능도 증가함을 확인하였고, HE 1,000 µg/ml 농도에서는 약 74.4%의 소거 활성을 나타냈다. 한편 다양한 유산균으로 발효한 아마씨 추출물의 전자공여능 실험의 결과, 1,000 ppm의 농도에서 70.72~81.56%의 소거효과가 있다고 한 Park 등[40]의 보고와, 오미자 씨 95% 에탄올 추출물 500 µg/ml의 농도에서 전자공여능이 38.92%였으며 ABTS 소거활성능은 66.16%의 결과를 나타냈다는 Kim 등[24]의 보고와 비교하였을 때 HE가 유의할 만한 우수한 항산화 효과를 보인 결과라 할 수 있다.

**대풍자 에탄올추출물의 collagenase와 elastase 저해 활성 결과**

피부노화는 진피내 섬유아세포에 의한 단백질 및 세포간 물질의 생체 합성기능 저하 등에 의해 나타난다[46]. 피부 진피는 피부의 유연성과 탄력성에 관여하고 완충작용으로 피부를 보호하며, 진피의 콜라겐 합성과 분해는 피부의 재생 과정에서 중요한 역할을 한다[49]. 피부의 진피 조직 속에는 콜라겐과 피부 탄력성에 관련된 엘라스틴이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 엘라스틴이 elastase에 의해 분해되면 그물망 구조가 깨지게 되면서 피부가 처지고 주름이 생기므로 내인성 피부노화가 발생하게 된다[29]. 이처럼 엘라스틴을 가수분해하는 elastase는 피부 주름과 관련성이 있는 효소이다. 본 연구에서는 HE가 elastase와 collagenase에 대하여 저해 활성을 나타내는지를 확인하였으며 그 결과는 Fig. 2에 나타났다. Elastase와 collagenase에 대한 HE의 저해효과는 농도의존적으로 증가하였으나 elastase는 1,000 µg/ml 농도에서 약 21.2%의 낮은 저해효과를 보인 반면(Fig. 2A), collagenase에 대한 저해

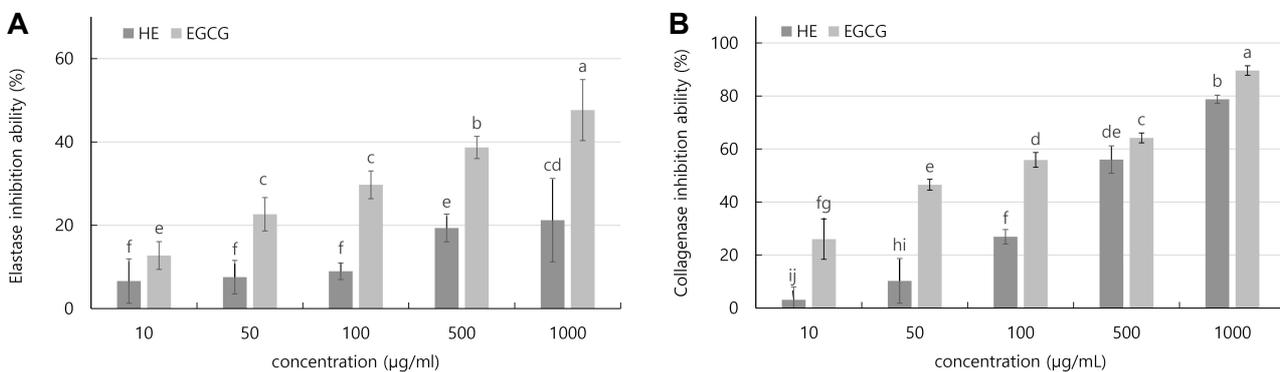


Fig. 2. Elastase inhibition ability (A) and collagenase inhibition ability (B). HE: 70% ethanol extract of *Hydnocarpus anthelmintica* Pierre, EGCG: Epigallocatechin gallate (Positive control), Results are means ± S.D. of triplicate data. Means with different letters (a-j) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$

활성은 1,000 µg/ml의 농도에서 약 78.8%의 높은 저해효과를 보였으며 대조군인 EGCG가 같은 농도에서 약 89.6%의 효과를 보인 것과 비교하여서도 유의할 만한 결과이다(Fig. 2B). 한편 Joo 등[15]의 참깨 에탄올 추출물에서의 collagenase 저해활성을 분석한 실험 결과, 1,000 µg/ml의 농도에서 약 45%의 활성을 보고하였고, Kwon 등[26]의 금화귀 추출물에서의 collagenase 저해 활성 분석에서는 1,000 µg/ml의 농도에서 에탄올 추출물이 약 64.9%의 결과를 보고한 결과와 비교했을 때 HE가 collagenase를 효과적으로 저해하고 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서는 이러한 결과를 바탕으로 HE가 콜라겐 분해 효소인 MMP-1 protein과 mRNA의 발현 및 콜라겐 전구물질인 PIP의 생합성과 mRNA 발현에 영향을 미치고 있음을 확인하였다.

**세포 생존율 측정 결과**

담황색 기질인 yellow tetrazolium salt MTT를 human CCD-986sk fibroblasts에 처치하였을 때 살아있는 세포의 미토콘드리아 내에서 MTT가 reductase에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 생성하게 된다. 만약 살아있는 세포가 많은 경우에는 formazan 또한 다량 생성되어 보라색이 뚜렷하게 나타나기 때문에 이를 통하여 세포의 생존에 미치는 시료의 영향을 확인할 수 있다[10]. HE를 농도별로 CCD-986sk에 처치하여 세포 생존율을 확인한 결과(Fig. 3), 50 µg/ml의 농도에서는 약 91.7%의 생존율을 보였으나 100 µg/ml의 농도에서는 약 76.0%로 생존율이 낮아진 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 세포에 독성을 주지 않는 50 µg/ml 이하의 농도에서 단백질 발현

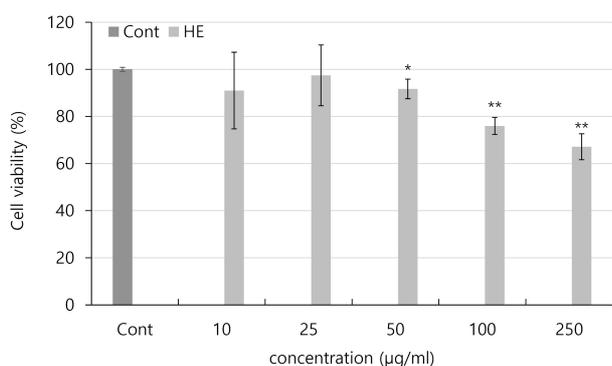


Fig. 3. Cell viability assay on Human CCD-986sk fibroblasts. The cells were treated for 24 hr with the indicated concentrations of HE. Cont: Extract not treated, HE: 70% ethanol extract of *Hydnocarpus anthelmintica* Pierre. The data are representative of three experiments. Each value is expressed as the mean ± SD of three independent experiments. The statistical analysis of the data was carried out by use of ANOVA test. \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.05$ , compared with absence of extract.

과 mRNA 발현에 대한 실험을 진행하였다.

**PIP와 MMP-1 protein합성 결과**

피부를 이루는 콜라겐은 진피에 존재하는 섬유아세포에서 procollagen 형태로 합성되는데 자외선에 의해 procollagen의 양이 감소하면 콜라겐 양도 감소하므로 이러한 콜라겐의 분해는 피부의 탄력과 주름 생성에 큰 영향을 미친다[36]. 즉, 콜라겐에 작용하는 단백질 분해 효소인 MMP-1이 세포외기질 내에서 활성이 증가되면 콜라겐 섬유를 분해하여 콜라겐의 양을 감소시키고 주름을 형성하며 피부 처짐과 거친 피부 표면이 나타나게 되어 결국 피부노화를 유발한다[47]. 따라서 MMP-1 활성을 억제하여 콜라겐 분해를 감소시키면 피부 탄력을 강화할 수 있다. 또한 콜라겐은 세포 내에서 procollagen이라는 전구물질로 합성된 후 세포 외로 분비되어 콜라겐 섬유로 중합되므로[7, 23, 45] propeptide의 양을 측정함으로써 세포 내에서의 콜라겐 생합성 정도를 파악할 수 있다[37]. 본 실험은 human CCD-986sk fibroblasts에 UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>) 자극을 가하고 나서 HE를 농도별로 처리한 후 PIP와 MMP-1 proteins의 함량을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 그 결과 HE는 섬유아세포에서 PIP의 생합성을 농도의존적으로 증가시켰으며(Fig. 4A), UVB 자극을 가한 Cont (PIP 생성율 약 50.3%)과 비교하여 50 µg/ml의 농도에서 약 13.9%가 증가한 약 64.2%의 생합성 결과를 나타냈다. 그리고 MMP-1 protein의 발현은 농도의존적으로 감소하였는데(Fig. 4B), HE 50 µg/ml의 농도에서 약 48.7%의 발현을 보였으며, 이는 UVB만 자극한 Cont (MMP-1 발현율 100%)과 비교하여 약 51.3%의 발현 감소효과를 보인 것이다. 이는 HE가 콜라겐을 분해하는 효소의 발현을 억제할 뿐 아니라 procollagen의 생합성을 유도함으로써 자외선 노출에 의한 주름 유발로 인한 피부노화를 억제하는데 도움을 줄 것으로 기대할 수 있는 결과였다.

**Procollagen type I과 MMP-1의 유전자 발현 측정 결과**

세포외기질의 주요 구성 성분인 콜라겐은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질로 피부의 기계적 견고성, 결합 조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화의 유도 등의 기능을 가지고 있다[37]. 콜라겐(type I, II, III, IV, and V)들은 procollagen이라는 전구물질의 형태로 합성된다[49]. 콜라겐은 trypsin 등의 단백질 분해효소에는 영향을 받지 않지만, collagenase에 의해 분해된다[30, 49]. MMP-1은 type I collagen을 분해함으로써 콜라겐의 합성을 억제하는 collagenase group에 속하는 것으로 알려져 있다[18, 21, 25, 44]. 본 연구에서는 앞서 피부 탄력의 유지 및 주름 형성을 억제할 것으로 판단되는 PIP의 생합성 변화와 protein level에서의 MMP-1의 발현 변화를 측정하였으며 유의미한 결과

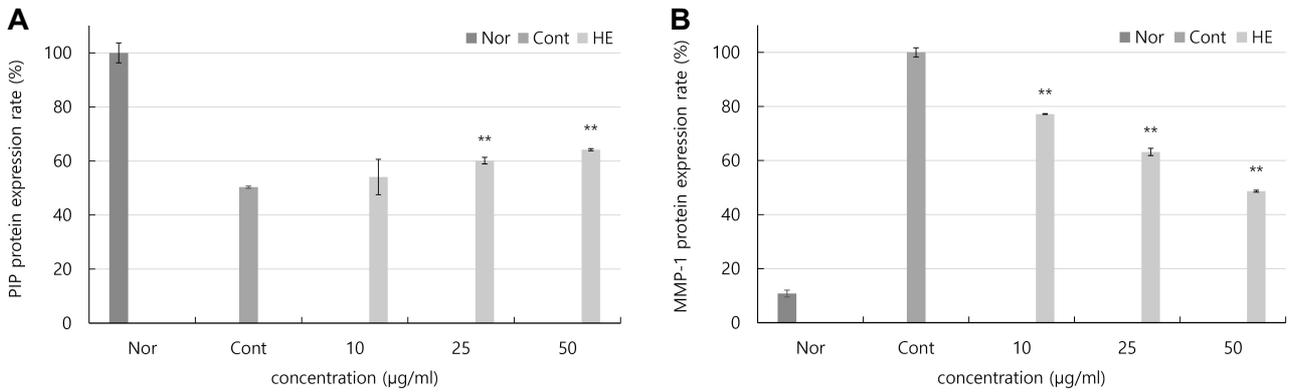


Fig. 4. Expression levels of procollagen type I C-peptide (PIP) protein (A) and MMP-1 protein (B) on UVB-irradiated Human CCD-986sk fibroblasts. The cells were treated for 24 hr with the indicated concentrations of extracts before treatment with UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>) for 24 hr. The results were analyzed using ELISA kits. Nor: Neither extract nor UVB treatment, Cont: only UVB treated, HE: 70% ethanol extract of *Hydnocarpus anthelmintica* Pierre. 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.

를 도출하였다. 이에 procollagen type I과 MMP-1의 mRNA 수준에도 HE가 영향을 미칠 수 있을지를 확인하였다. 그 결과 HE는 농도의존적으로 procollagen type I의 mRNA의 발현을 증가시켰으며(Fig. 5A), 특히 HE의 50 µg/ml의 농도에서 약 83.4%의 발현을 보였다. 이는 UVB만 자극한

Cont (약 45.8%)과 비교하여 약 37.6%의 높은 발현증가 효과이다. MMP-1 mRNA의 발현을 확인한 결과는 Fig. 5B에 나타났으며, HE의 50 µg/ml 농도에서 약 35.9%의 발현 억제 효과를 보였으며, UVB만 자극한 Cont (100%)과 비교하였을 때 약 64.1%의 우수한 발현 억제 효과였다. 또한

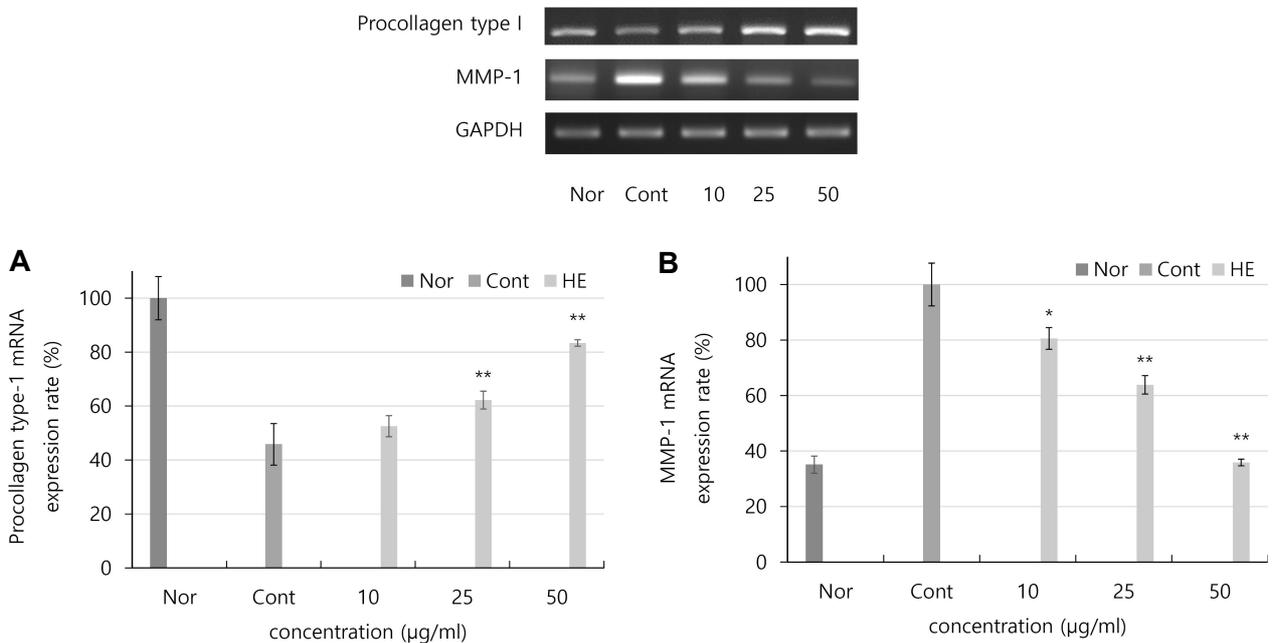


Fig. 5. Procollagen type I mRNA and MMP-1 mRNA expressions on UVB-irradiated Human CCD-986sk fibroblasts. The cells were treated for 24 hr with the indicated concentrations of extracts before treatment with UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>) for 24 hr and subjected to RT-PCR using procollagen type I and MMP-1. Nor: Neither extract nor UVB treatment, Cont: only UVB treated, HE: 70% ethanol extract of *Hydnocarpus anthelmintica* Pierre. The bands are representative of three experiments. The percentage indicated the procollagen type I and MMP-1 ratios relative to the GAPDH. 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*<0.01 and \*\**p*<0.05, compared with absence of extract.

추출물의 농도가 증가할수록 효과적으로 발현을 억제하였다.

## 고 찰

피부노화의 결과인 주름형성의 근본적 이유는 진피에 있다. 진피의 섬유성분에는 피부를 팽팽하게 하는 콜라겐 섬유가 약 70%를 차지하며 엘라스틴은 2% 정도의 소량으로 존재한다[1]. 이 섬유성분들은 진피에 존재하는 섬유아 세포에 의해 합성되며 collagenase와 elastase라는 효소의 작용에 의해 분해됨으로써 섬유성분의 합성과 분해가 반복된다. 이렇듯 진피층에 존재하는 세포외기질의 구조적인 변화는 피부노화로 나타나게 되는데[33], 구성요소 중 탄력섬유(elastic fiber)의 변성과 콜라겐 양의 감소는 피부의 주름을 야기한다[17]. 또한 피부의 노화를 이끄는 주요 요인 중에는 콜라겐의 감소와 관련하여 자외선이나 스트레스에 의한 활성산소의 생성을 들 수 있다. 피부에서의 활성산소의 생성은 세포막을 공격함으로써 세포에 손상을 입혀 그 기능을 상실하게 한다[22, 48]. 이러한 피부세포의 기능상실은 피부가 거친 상태를 형성하거나 윤기를 없애는 결과를 초래함으로써 피부의 주름을 유발하게 된다[17]. 결국 생체 내 활성산소의 생성은 MMPs 유전자의 연쇄적인 활성화를 유도함으로써 콜라겐의 구조적인 파괴를 유발하고 피부의 탄력 감소와 피부의 주름 형성을 이끌게 된다[38]. 따라서 콜라겐 분해효소와 활성산소의 생성억제, 콜라겐의 합성을 촉진시킴으로써 피부노화의 완화 효과를 얻을 수 있다. 본 연구에서는 HE의 항산화 활성과 elastase 및 collagenase의 활성 저해를 확인하였고, 이러한 결과를 바탕으로 CCD-986sk fibroblasts에서의 PIP 생합성과 mRNA 발현 및 MMP-1 protein과 mRNA의 발현 억제 효과를 확인하였다. 먼저 HE의 항산화 효과를 확인하기 위하여 전자공여능과 ABTS<sup>+</sup> radical 소거활성 실험을 실시하였고, 1,000 µg/ml의 농도에서 DPPH radical과 ABTS<sup>+</sup> radical이 각각 약 73.5%와 74.4%의 소거를 보였으며, 주름생성 억제 활성에서는 피부의 주름과 탄력성에 관여하고 완충작용을 통하여 피부를 보호하는 콜라겐을 분해하는 효소인 collagenase를 유의적으로 감소(1,000 µg/ml의 농도에서 약 78.8%)시켰다. 이러한 결과를 바탕으로 collagenase group 가운데 procollagen type I을 분해하는 것으로 잘 알려진 MMP-1의 protein 및 mRNA 발현과 PIP의 생합성 및 mRNA 발현을 분석하였으며, 이 또한 HE가 농도의존적으로 유의하게 PIP의 생합성과 mRNA 발현을 증가시켰으며, MMP-1 protein 및 mRNA의 발현은 억제하였음을 확인하였다. 이러한 결과는 HE가 피부 주름 개선을 위한 소재로서의 가능성을 보인 것으로 판단되며 향후 추가적인 주름억제 유전자에 대한 연구를 진행함으로써 화장품, 식품 및 제약 등의 분야에 효과적인 기능성 소재

로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Ahn, J. H. and Kim, G. J. 2016. The effect of wrinkle care and whitening by *Rhus verniciflua* Stokes. *J. Kor. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **29**, 124-133.
- Aral, M., Shibata, Y., Pugdee, K., Abiko, Y. and Ogata, Y. 2007. Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC<sub>3</sub>T<sub>3</sub>-E<sub>1</sub> cells. *IUBMB Life* **59**, 27-33.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Cannell, R. J., Kellam, S. J., Owsianka, A. M. and Walker, J. M. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* **54**, 10-14.
- Cho, Y. H., Kim, J. H., Shim, G. S., Lee, D. H., Lee, B. C. and Pyo, H. B. 2005. Effects of ethyl acetate fraction from *Melothria heterophylla* on antioxidant activity and matrix metalloproteinase-1 expression in ultraviolet A-irradiated human dermal fibroblasts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **31**, 103-109.
- Choe, M., Kim, D. J., Lee, H. J., You, J. K., Seo, D. J., Lee, J. H. and Chung, M. J. 2008. A study on the glucose-regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medicinal herbs. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 542-547.
- Choi, E. Y. and Lee, J. T. 2018. The effects of antioxidant and anti-aging treatment of UVB-irradiated human HaCaT keratinocytes with ethanol extracts of colored rice varieties. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **50**, 653-659.
- Fisher, G. J., Datta, S. C., Talwar, H. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J. J. 1996. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* **379**, 35.
- Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S. and Voorhees, J. J. 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol.* **138**, 1462-1470.
- Gross, J. and Lapiere, C. M. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **48**, 1014-1022.
- Halliwell, B. 1995. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 1341-1348.
- Heo, J. C., Park, J. Y., An, S. M., Lee, J. M., Yun, C. Y., Shin, H. M., Kwon, T. K. and Lee, S. H. 2006. Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Kor. J. Food Preser.* **13**, 83-87.

13. Hong, C. O., Hang, S. T., Koo, Y. C., Yang, S. Y., Lee, J. Y., Lee, Y. H., Ha, Y. M. and Lee, K. W. 2011. Protective effect of *Plantago asiatica* L. extract against ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced renal oxidative stress in wistar rats. *J. Fd. Hyg. Safety* **26**, 107-113.
14. Imokawa, G., Takema, Y., Yorimoto, Y., Tsukahara, K., Kawai, M. and Imayama, S. 1995. Degree of ultraviolet-induced tortuosity of elastic fibers in rat skin is age dependent. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 254-258.
15. Joo, D. H., Yoo, D. H. and Lee, J. Y. 2016. A study on the anti-wrinkle activities of *Sesamum indicum* L. ethanol extracts on CCD-986sk. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **42**, 377-385.
16. Kim, D. H., Park, T. S. and Son, J. H. 2015. Anti-wrinkle activities verification of *Bulperum falcatum* extracts on CCD-986sk. *J. Appl. Biol. Chem.* **58**, 183-187.
17. Kim, E. J., Kim, M. K., Jin, X. J., Oh, J. H., Kim, J. E. and Chung, J. H. 2010. Skin aging and photoaging alter fatty acids composition, including 11,14,17-eicosatrienoic acid, in the epidermis of human skin. *J. Kor. Med. Sci.* **25**, 980-983.
18. Kim, H. H., Cho, S., Lee, S., Kim, K. H., Cho, K. H. and Eun, H. C. 2006. Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin *in vivo*. *J. Lipid Res.* **47**, 921-930.
19. Kim, J., Lee, C. W., Kim, E. K., Lee, S. J., Park, N. H., Kim, H. S., Kim, H. K., Char, K., Jang, Y. P. and Kim, J. W. 2011. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* **137**, 427-433
20. Kim, J. E., Joo, S. I., Seo, J. H. and Lee, S. P. 2009. Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 989-995.
21. Kim, L. D., Kwon, R. H., Heo, Y. Y., Jung, H. J., Kang, Y. Y. and Bae, J. H. 2008. Supercritical extraction of oriental herb: anti-aging and anti-wrinkle effects. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 529-534.
22. Kim, M. J., Kim, J. Y., Jung, T. K., Choi, S. W. and Yoon, K. S. 2006. Skin anti-aging effect of *Forsythia viridissima* L. extract. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 444-450.
23. Kim, M. S., Park, T. J., Lim, J. S. and Kim, S. Y. 2019. Effect of *agaricus* biorenovate extract on collagen synthesis and matrix metalloproteinase-1 production in human dermal fibroblast. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **34**, 49-53.
24. Kim, M. S., Sung, H. J., Park, J. Y. and Sohn, H. Y. 2016. Evaluation of anti-oxidant, anti-microbial and anti-thrombosis activities of fruit, seed and pomace of *Schizandra chinensis* Baillon. *J. Life Sci.* **27**, 131-138.
25. Kim, S. Y., Kim, S. J., Lee, J. Y., Kim, W. G., Park, W. S. and Sim, Y. C. 2004. Protective effects of dietary soy isoflavones against UV-induced skin-aging in hairless mouse model. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**, 157-162.
26. Kwon, H. J., Beom, S. H., Hyun, J. A., Kang, E. B., Park, H. E., Han, D. G., Kim, H. J., Choi, E. Y. and An, B. J. 2021. An *in vitro* study on the activity of *Abelmoschus manihot* L. flower extract on skin anti-wrinkle and skin whitening. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **47**, 353-360.
27. Lee, G. S., Lee, K. M., Yim, D., Cheong, J. H. and Kang, T. J. 2015. The effect of the butanol fraction from *Hydnocarpi Semen* extract on activation of keratinocyte and fibroblast. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**, 59-64.
28. Lee, G. S., Yim, D., Cheong, J. H. and Kang, T. J. 2012. The n-hexane, ethylacetate, and butanol fractional from *Hydnocarpi Sement* enhanced wound healing in a mice ulcer model. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **34**, 968-974.
29. Lee, S. Y., An, J. H. and Cho, H. Y. 2003. Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* bunge in fibroblast cell line HS68 cells. *J. Appl. Biol. Chem.* **46**, 60-65.
30. Lee, Y. S., Jin, D. Q., Beak, S. M., Lee, E. S. and Kim, J. A. 2003. Inhibition of ultraviolet-A-modulated signaling pathways by asiatic acid and ursolic acid in HaCaT human keratinocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **476**, 173-178.
31. Levy, L. 1975. The activity of chaulmoogra acids against *Mycobacterium leprae*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **111**, 703-705.
32. Lin, J. W., Chiang, H. M., Lin, Y. C. and Wen, K. C. 2008. Natural products with skin-whitening effects. *J. Food Drug Anal.* **16**, 1-10.
33. Makrantonaki, E. and Zouboulis, C. C. 2007. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1119**, 40-50.
34. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
35. Muir, E. 1931. The treatment of leprosy. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **25**, 87-102.
36. Nagase, H. and Woessner, J. F. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494.
37. Parfitt, A. M., Simon, L. S., Villanueva, A. R. and Krane, S. M. 1987. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J. Bone Miner. Res.* **2**, 427-436.
38. Park, H. J., Ock, S. M., Kim, H. J., Park, H. J., Lee, Y. B., Choi, J. M., Cho, C. S., Lee, J. Y., Cho, B. K. and Cho, D. H. 2010. Vitamin C attenuates ERK signaling to inhibit regulation of collagen production by LL-37 in human dermal fibroblasts. *Exp. Dermatol.* **19**, 258-264.
39. Park, S. N. 2003. Antioxidative properties of baicalein, components from *Scutellaria baicalensis* georgi and its application to cosmetics (I). *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **14**, 657-665.
40. Park, Y. E., Kim, B. H., Yoon, Y. C., Kim, J. K., Lee, J. H., Kwon, G. S., Hwang, H. S. and Lee, J. B. 2018. Total polyphenol contents, flavonoid contents, and antioxidant activity of roasted-flaxseed extracts based on lac-

- tic-acid bacteria fermentation. *J. Life Sci.* **28**, 547-554.
41. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
  42. Rittie, L. and Fisher, G. J. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **1**, 705-720.
  43. Smit, N., Vicanova, J. and Pavel, S. 2009. The hunt for natural skin whitening agents. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 5326-5349.
  44. Sukanuma, K., Nakajima, H., Ohtsuki, M. and Imokawa, G. 2010. Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* **58**, 136-142.
  45. Um, M. S. 2021. The evaluation of anti-oxidant, anti-inflammation and anti-wrinkle activity of Jeju native *Achyranthes japonica* Nakai. *KSAST.* **38**, 1209-1218.
  46. Wiedow, O., Schroder, J. M., Gregory, H., Young, J. A. and Christophers, E. 1990. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **265**, 14791-14795.
  47. Won, H. R., Lee, P. J., Oh, S. R. and Kim, Y. M. 2021. Epigallocatechin 3-gallate suppresses the expression of TNF- $\alpha$ -induced MMP-1 via MAPK/ERK signaling pathways in human dermal fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* **44**, 18-24.
  48. Yeom, M. H., Lee, J. Y., Kim, J. S., Park, C. W., Kim, D. H. and Kim, H. K. 2010. The anti-aging effects of Korean ginseng berry in the skin. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**, 26-30.
  49. Yoo, J. M., Kang, Y. J., Pyo, H. B., Choung, E. S., Park, S. Y., Choi, J. H., Han, G. J., Lee, C. H. and Kim, T. J. 2010. Anti-wrinkle effects of Korean rice wine cake on human fibroblast. *J. Life Sci.* **20**, 1838-1843.

## 초록 : 사람유래 섬유아세포에서 대풍자 에탄올 추출물의 MMP-1과 PIP의 발현에 대한 연구

최은영<sup>1</sup> · 장영아<sup>2</sup> · 김세기<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>대구한의대학교 화장품약리학과, <sup>2</sup>경성대학교 스마트헬스케어융복합연구센터, <sup>3</sup>대구가톨릭대학교 제약공학과)

본 연구는 대풍자 에탄올 추출물에 대한 항산화 활성 및 주름생성 억제 활성을 확인하고자 하였다. 대풍자 에탄올 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH와 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능을 측정하였고 그 결과 추출물 1,000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 73.5%와 74.4%의 높은 소거능을 나타냈다. 주름생성 억제 활성을 확인하기 위하여 collagenase 저해 활성을 실험하였으며, 그 결과 추출물 1,000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 78.8%의 유의할 만한 우수한 결과를 보였다. 또한 추출물에 대한 세포의 독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였으며, 50  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서 약 91.7%의 생존율을 보여, 이후의 세포 실험은 50  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서 진행하였다. 섬유아세포인 CCD-986sk에 UVB (20  $\text{mJ/cm}^2$ )의 자극을 주고 대풍자 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 후 procollagen type I과 MMP-1의 발현에 대한 영향을 확인하고자 ELISA 및 RT-PCR 분석을 하였다. 그 결과 대풍자 에탄올 추출물은 PIP의 생합성과 mRNA 발현은 농도의존적으로 증가하였으며, 특히 UVB 만 자극한 Cont (각각의 생합성율은 50.3%와 45.8%)과 비교하였을 때 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 약 64.2%와 83.4%의 생합성을 보였다. MMP-1의 protein과 mRNA 발현에 대한 결과는 농도의존적으로 감소했음을 확인하였으며, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 약 48.7%와 35.9%의 낮은 발현율을 보였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 본 연구는 대풍자 에탄올 추출물이 주름억제 기능성 소재로서의 활용 가능성을 제시해 줄 것으로 사료된다.