

## 송라 추출물의 세포 수준에서 항노화 및 모유두세포 활성화 효과

김민정<sup>†</sup> · 최원영<sup>†</sup> · 심현우 · 신은진 · 이정노 · 박성민 · 유화선<sup>††</sup>

(주)코씨드바이오팜 피부사랑임상연구센터

(2023년 11월 21일 접수, 2023년 12월 18일 수정, 2023년 12월 29일 채택)

### *In Vitro* Anti-aging and Hair Follicle Dermal Papilla Cells Activation Effects of *Usnea diffracta* Vain Extract

Min Jeong Kim<sup>†</sup>, Won Yeoung Choi<sup>†</sup>, Hyun Woo Shim, Eun Jin Shin,  
Jung No Lee, Sung Min Park, and Hwa Sun Ryu<sup>††</sup>

SkinSaRang Clinical R&D Center, CoSeedBioPharm Corporation, 68, Osongsaengmyeong 2-ro,  
Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28161, Korea  
(Received November 21, 2023; Revised December 18, 2023; Accepted December 29, 2023)

**요약:** 송라(*Usnea diffracta* Vain.)는 송라속(*Usnea*)에 속하는 지의류 중 하나이며, 이전 연구에서 항산화, 항균, 항염, 항종양 및 심혈관 보호 등의 약리학적 활성이 보고되어 있으나 피부 및 모발에서의 효능은 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 세포 수준에서 송라 추출물(UDE)의 항노화 및 모유두세포 증식에 대한 효과를 검증하였다. 실험 결과, 송라 추출물은 인간 섬유아세포에서 UVA에 의해 증가된 MMP-1의 발현 및 상위기전인 MAPKs (ERK, p38, JNK)와 AP-1 (c-Fos, c-Jun)의 활성을 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 송라 추출물은 인간 모유두세포의 증식을 유의하게 증가시켰으며, 모발 성장인자인 VEGF 및 KGF의 mRNA 발현을 유의하게 증가시켰다. 이로 인하여, 모발 증식 및 성장인자의 발현에 관여하는 ERK/CREB의 인산화 농도 의존적으로 증가시켰다. 송라 추출물의 주성분 확인을 위해 송라 추출물을 농축 후 Prep-LC를 이용하여 main peak로 나타난 분획을 분리 정제하였고, NMR 및 Mess 분석을 통해 diffractaic acid로 동정하였다. Diffractaic acid는 인간 섬유아세포에서 UVA에 의해 증가된 MMP-1의 발현을 유의적으로 감소시켰으며, 인간 모유두세포의 증식을 농도 의존적으로 증가시켰다. 이를 통해 송라 추출물은 항노화 및 모유두세포 활성화 증가 효능을 갖는 화장품 천연소재로서의 활용 가능성을 입증하였다.

**Abstract:** Songla (*Usnea diffracta* Vain.) is one of the lichens belonging to the genus *Usnea*, and pharmacological activities such as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, anti-tumor and cardiovascular protection have been reported in previous studies, but its efficacy in skin and hair is not well known. In this study, the effect of *Usnea diffracta* extract (UDE) on anti-aging and dermal papilla cell proliferation was verified *in vitro*. As a result of the experiment, it was confirmed that the UDE significantly reduced the expression of MMP-1 and the activity of MAPKs (ERK, p38, JNK) and AP-1 (c-Fos, c-Jun), which were increased by UVA in HDFn. In addition, the UDE significantly increased the proliferation of HFDPC and significantly increased the mRNA expression of VEGF and KGF, which are hair growth factors. Accordingly, the phosphorylation of ERK/CREB involved in hair proliferation and expression of growth factors was increased in a concentration-dependent manner. The main component represented by the main peak was separated and purified using

†주 저자 (e-mail: rmd@coseed.co.kr)  
call: 070-5003-2222

†† 교신저자 (e-mail: rmd@coseed.co.kr)  
call: 070-5003-2221

Prep LC by concentrating the UDE, which was confirmed as diffractaic acid through NMR and Mess analysis. Isolated diffractaic acid significantly reduced the expression of MMP-1 increased by UVA in HDFn and increased the proliferation of HFDPC in a concentration-dependent manner. The result suggest that UDE proved its usability as a natural cosmetic material with anti-aging and dermal papilla cell activation effects.

**Keywords:** *usena diffracta Vain.*, MMP-1, MAPKs, hair growth, growth factor

## 1. 서 론

현재 우리나라는 의학 기술의 발달, 소득 증대 및 생활 수준이 향상함에 따라 인간의 평균 기대수명이 높아지면서 노령 인구가 증가하고 있다. 고령화 사회에 진입하면서 젊음을 유지하고자 하는 외모적인 욕구도 높아지고 있으며, 이에 따라, 노화에 대한 다양한 신체적 변화 중에서 주름과 탈모에 대한 연구들이 증가하고 있다.

피부의 노화는 자연스러운 과정이며, 자외선과 같은 외부 자극으로 인한 광노화는 최외각에 있는 피부에 만성적인 손상이 누적되어 발생한다[1]. 자외선에 피부가 지속적으로 노출되면 화상, 피부색소 침착, DNA 및 단백질 변성, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 등의 생리학적 영향을 유발한다. 특히, 활성산소종은 인간 섬유아세포(human dermal fibroblasts, neonatal, HDFn)에서 피부 결합조직인 콜라겐, 엘라스틴 등과 같은 세포외기질 단백질의 합성을 줄이고, 구조를 변형시켜 피부 탄력을 감소시키는 효소인 금속 단백질 분해 효소(matrix metalloproteinases, MMPs)의 발현을 증가시킨다[2,3]. 이전의 연구들에 따르면 미토겐 활성화 단백질 인산화효소(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)는 세포 표면의 수용체에서 활성 단백질(activator protein-1, AP-1) 등의 인산화를 유도하고 유전자의 전사 및 조절에 영향을 주어 세포 증식, 분화, 형질전환, 세포사멸을 조절하는 것으로 알려져 있으며, MMPs 활성화에도 영향을 주는 것으로 보고되었다[4-6].

모발은 모낭에서 형성되며 성장기(anagen), 퇴화기(catagen), 휴지기(telogen)라는 세 단계의 모발 성장주기를 거치면서 성장과 자연 탈모를 반복한다[7,8]. 탈모는 퇴화기와 휴지기가 증가하고, 성장기가 감소하는 모발 성장주기의 불균형, 스트레스 및 유전적 요인 등 다양한 이유로 발생한다[9]. 모낭을 구성하는 다양한 세포 중 인간 모유두 세포(human follicles dermal papilla cells, HFDPC)는 성장인자와 사이토카인의 분비를 통해 모발 성장주기를 조절하는 중요한 역할을 한다[10]. 여러 모발 성장인자 중

vascular endothelial growth factor (VEGF)는 모낭 주위에 새로운 혈관 형성을 촉진시켜 탈모를 개선한다고 알려져 있으며, keratinocyte growth factor (KGF)는 모낭의 성장 발달 및 분화에 중요한 역할을 한다[11,12]. 이러한 모발 성장인자들은 세포 증식, 분화 및 세포사멸과 관련이 있는 세포외 신호 조절 키나아제(extracellular signal-regulated kinase, ERK)/cAMP 반응요소 결합 단백질(cAMP response element-binding protein, CREB) 신호전달 경로에 의해 조절되는 것으로 보고되어 있다[13]. ERK의 활성화에 의해 인산화된 CREB는 핵으로 이동하여 다양한 성장인자들의 유전자 발현을 자극시키는 전사인자 역할을 한다[14]. 따라서, ERK/CREB 신호전달 경로를 통해 모발 성장인자의 생성을 자극하는 것은 모발 주기 및 성장 활성을 유도하는 효과적인 방법이 될 수 있다.

송라(*Usnea diffracta Vain*)는 송라속(*Usnea*)에 속하는 지의류로 고산 지대에서 자라며, 한국, 일본, 중국 등에 분포하는 것으로 알려져 있다[15]. 송라는 예로부터 설사, 복통, 결핵, 폐렴, 기생충 질환 치료를 위한 민간약으로 널리 사용되었다[16]. 이전 연구에서는 항산화, 항균, 항염, 항종양, 항바이러스 및 심혈관 보호 효과와 같은 다양한 약리학적 활성에 대해 보고되어 있으나 피부 및 모발에서의 효능은 잘 알려져 있지 않다[17-20]. 따라서 본 연구에서는 송라 추출물이 UVA를 조사한 섬유아세포 및 모유두세포의 활성화에 미치는 영향을 분석하여 화장품 소재로서의 활용 가능성을 평가하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 기기 및 시약

본 실험에서 사용된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Thermo Fisher Scientific (USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO), adenosine, agarose, tween 20 및  $\beta$ -actin (#A5316) 항체는 Sigma-Aldrich (USA) 제품을 사용하였다. Skim milk는 Becton Dickinson

and Company (USA)에서 구입하였으며 anti-mouse IgG 항체는 Invitrogen (USA) 제품을 사용하였다. 96 well plate, 6 well plate 및 24 well plate는 SPL (Korea) 제품을 사용하였다. ERK1/2 (#9102S), phospho-ERK1/2 (#9101S), p38 (#9212S), phospho-p38 (#9211S), JNK (#9252S), phospho-JNK (#9251S), CREB (#9197S), phospho-CREB (#9198S), c-Jun (#9165S), phospho-c-Jun (#9261S), c-Fos (#4384S) 및 anti-rabbit IgG (#7074S) 항체는 Cell Signaling Technology (USA)에서 구입하였고, MMP-1 (#SC-58377) 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA)에서 구입하였다. 흡광도 측정을 위해 ELISA plate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, UK)를 이용하였다.

2.2. 시료 추출, 분획 및 분리정제

2.2.1. 송라 추출물의 제조

본 실험에 사용된 송라(*U. diffracta* Vain)는 백두산 심마니약재(Korea)에서 구매하였고, 증류수로 세척한 후 건조 및 분쇄하여 사용하였다. 분쇄한 송라 100 g에 70% (v/v) 에탄올을 송라 중량의 10 배를 혼합하여 80 °C에서 5 h 동안 환류 추출한 후 Watman No. 2 (Watman, UK)로 여과하였다. 이후 여과액을 감압 농축하여 8 g의 송라 추출물을 수득하였다.

2.2.2. Diffractaic Acid의 분리

송라 추출물을 극성에 따라 분획하기 위해 n-헥산 및 메

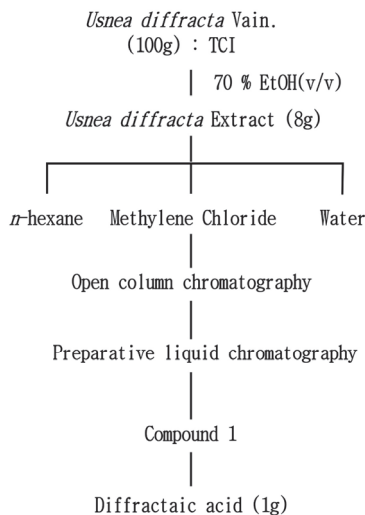


Figure 1. The flowchart of *Usnea diffracta* extracts liquid-liquid separation.

틸렌클로라이드(Daejung, Korea)를 이용한 용매 분획을 실시하였다. 얻어진 송라 추출물을 10 배의 정제수에 현탁하여 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 메틸렌클로라이드 분획물을 얻었다. 메틸렌클로라이드 분획물에서 활성 성분을 분리하기 위해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (n-hexane : methylene chloride = 100 : 0 → 50 : 50)를 수행하여 그 분획물을 preparative liquid chromatography (Prep-LC, LC-Forte/R, YMC, JPN)를 통해 분리하여 화합물 1을 1 g 수득하였다. 수득한 화합물 1은 NMR (BRUKER AVANCE III 400 MHz, Bruker Corporation, USA) 분석을 통해 구조를 규명하였으며(Figure 1), 액체크로마토그래프/하이브리드 질량분석기(maXis 4G, Bruker BioSciences, USA)로 질량을 분석하여 동정하였다.

2.3. 세포배양

인간 섬유아세포(HDFn)와 인간 모유두세포(HFDPC)는 각각 American Type Cell Culture (ATCC, USA)와 Promocell (DEU)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. HDFn cell은 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Corning, USA), 1% (v/v) penicillin/streptomycin (P/S, Gibco, USA)이 함유된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco, USA)과 Dulbecco's modified eagle medium/ham's F-12 (DMEM/F-12, Gibco, USA) 배지를 1 : 1로 혼합하여 사용하였고, HFDPC cell은 전용 배지인 Follicle dermal papilla cell growth medium (Promocell, DEU)을 사용하였다. 세포는 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하여 실험에 사용하였으며, 계대 배양은 2 ~ 3 일 간격으로 실시하였다.

2.4. 세포 독성 평가

세포 독성 평가를 위하여 96 well plate에 HDFn 세포를 1 × 10<sup>5</sup> cells/mL의 농도로 well에 동일하게 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 h 배양하였다. 배양된 세포에 시료를 농도 의존적별로 희석 후 처리하여 24 h 배양한 뒤, MITT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 첨가하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2 ~ 3 h 동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 뒤, DMSO 100 μL를 분주하여 생성된 formazan을 용해시킨 후, ELISA plate reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(%)은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

2.5. 세포 증식 평가

세포 증식 평가를 위하여 96 well plate에 HFDPC 세포

를  $2 \times 10^4$  cells/mL의 농도로 well에 동일하게 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 h 배양시켰다. 배양된 세포에 시료를 농도별로 희석 후 처리하여 48 h 배양한 뒤, MIT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 첨가하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2 ~ 3 h 동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 뒤, DMSO 100  $\mu$ L를 분주하여 생성된 formazan을 용해시킨 후, ELISA plate reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식률(%)은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

## 2.6. Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석을 통한 유전자 발현 평가

HDFn 세포를 6 well plate에  $4 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 h 배양하였다. 배양된 세포를 UV-irradiation system (UV-1000, BoTeck, Korea)을 이용하여 UVA를 2 J/cm<sup>2</sup>로 조사하였고, 조사 후에 시료를 농도별로 희석하여 처리한 뒤 6 h 배양하였다. HFDPC 세포는 6 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 h 안정화시킨 후, 시료를 농도별로 희석하여 처리한 뒤 6 h 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 scrapper를 이용하여 수집하고 10 X phosphate buffered saline (PBS, Gibco, USA) 용액을 10배 희석한 1 X PBS 용액으로 한번 세척 후, Trizol (Invitrogen, USA) 시약을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. Nanodrop (Epoch2 NSC-SN, BioTek, USA)을 이용하여 RNA를 정량하고 PCR (ABS-4375786, Applied Biosystems, USA)을 수행한 후 2% agarose gel에서 전기영동 하여 밴드를 검출하였다. 밴드는 Enhanced chemiluminescence (ECL, WSE-6100 LuminoGraph, Atto, JPN)/UV transilluminator (WUV-M20, Atto, JPN)를 사용해 밴드를 관찰하고 ImageJ 1.47 software

를 이용하여 밴드를 수치화하였다. 실험에 사용된 primer sequences는 Table 1에 나타내었다.

## 2.7. Western Blot을 통한 단백질 발현 평가

HDFn 세포를 6 well plate에  $4 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 h 안정화시켰다. 배양된 세포를 UV-irradiation system을 이용하여 UVA를 2 J/cm<sup>2</sup>로 조사하였고, 조사 후에 시료를 농도별로 희석하여 처리한 뒤 15 min ~ 6 h 동안 배양하였다. HFDPC 세포는 6 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 h 안정화시킨 후, 시료를 농도별로 희석하여 처리한 뒤 30 min 배양하였다. 배양이 끝난 세포의 배지를 제거한 후 1 X PBS로 3 회 세척하고 scrapper를 이용하여 세포를 수득하였다. 수득한 세포에 radioimmunoprecipitation assay buffer (Cell Signaling Technology, USA)를 첨가하여 30 min 동안 반응시킨 후, 12,000 rpm, 4 °C에서 15 min 동안 원심 분리하여 상층액을 수득하였다. 수득한 단백질은 bicinchoninic acid assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA)로 정량 후 20  $\mu$ g의 단백질을 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (BioRad, USA)를 수행하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride membrane (Merckmillipore, USA)으로 transfer 시킨 후 5% skim milk (in tris-buffered saline and tween 20, TBST)로 1 h 동안 상온에서 blocking 하였다. TBST를 이용하여 15 min 간격으로 3 회 세척하고 1 차 항체를 4 °C에서 overnight 반응시켰다. 그 후, TBST를 이용하여 15 min 간격으로 3 회 세척하고 2 차 항체(in 5% skim milk)를 상온에서 2 h 동안 반응 시킨 후 다시 TBST를 이용하여 3 회 세척하였다. ECL를 사용해 밴드를 관찰하고 ImageJ 1.47 software를 이용하여 밴드를 수치화하였다.

**Table 1.** Polymerase Chain Reaction (PCR) Primer Sequences

Gene	Primer	Sequences (5'-3')	Genebank accession no.
MMP-1	Forward	GGAGGGGATGCTCATTTTGATG	NM_002421.3
	Reverse	TAGGGAAGCCAAAGGAGCTGT	
VEGF	Forward	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT	NM001025368
	Reverse	TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT	
KGF	Forward	GACATGGATCCTGCCAACTT	S81661.1
	Reverse	AATTCCAACTGCCACTGTC	
GAPDH	Forward	TCCATGACAACTTTGGTATC	NM_001289745.2
	Reverse	TGTAGCCAAATTCGTTGTCA	



2.8. 통계 분석

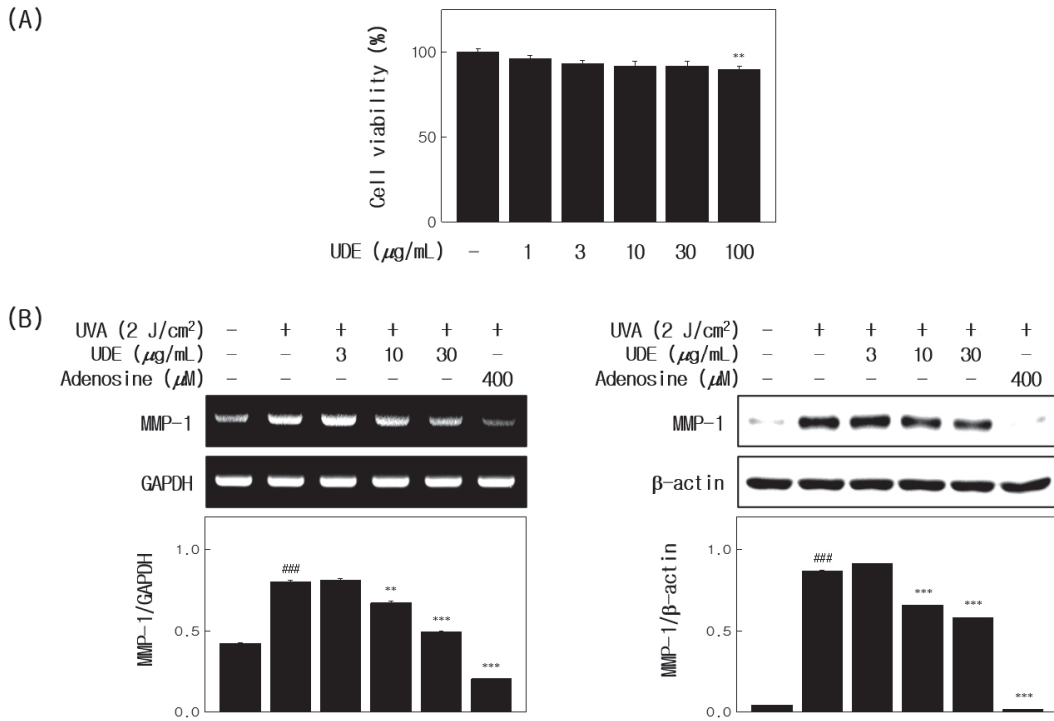
본 연구의 실험은 3 회 반복하여 수행하였으며, 실험 결과는 mean ± SD로 나타내었다. 통계적 유의성은 student's *t*-test를 이용하여 분석하였으며, 유의성 수준은 \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 및 \*\*\**p* < 0.001을 기준으로 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 송라 추출물의 MMP-1 발현에 미치는 효과 확인

MMP-1 발현 억제 효능을 평가하기 전, HDFn 세포에서 송라 추출물의 세포 생존율을 MTT assay를 통해 평가하였다. 송라 추출물을 1 ~ 100 µg/mL 농도로 처리한 결과, 30 µg/mL까지 90% 이상의 생존율을 확인하였고(Figure 2A), 세포 독성이 없는 3, 10, 30 µg/mL의 농도에서 송라 추출물의 MMP-1 발현 억제 효능을 분석하였다. MMPs는 Zinc

의존성 endoprotease로 세포외기질 단백질을 분해하는 효소이다. 그중, MMP-1은 collagenase 1이라고 불리며, UV에 의해 활성화되면 피부조직의 지지체 역할을 하는 type I 과 III collagen을 분해시키고 세포의 손상을 유도하여 노화를 유도한다[21-23]. 송라 추출물의 MMP-1 발현에 대한 영향을 확인하기 위하여 HDFn 세포에 UVA를 조사한 후 RT-PCR과 western blot을 통해 평가하였다. UVA를 조사한 세포에서 MMP-1의 mRNA 및 protein level이 모두 증가하는 것을 확인하였으며, Figure 2B에 나타난 바와 같이 송라 추출물을 3, 10, 30 µg/mL 농도로 처리하였을 때 mRNA 및 protein level에서 MMP-1의 발현이 농도 의존적으로 억제되었다. 또한 송라 추출물을 처리한 최고 농도인 30 µg/mL에서 mRNA 및 protein level의 MMP-1의 발현이 각각 82.2%, 34.6% 억제됨을 확인하였다.

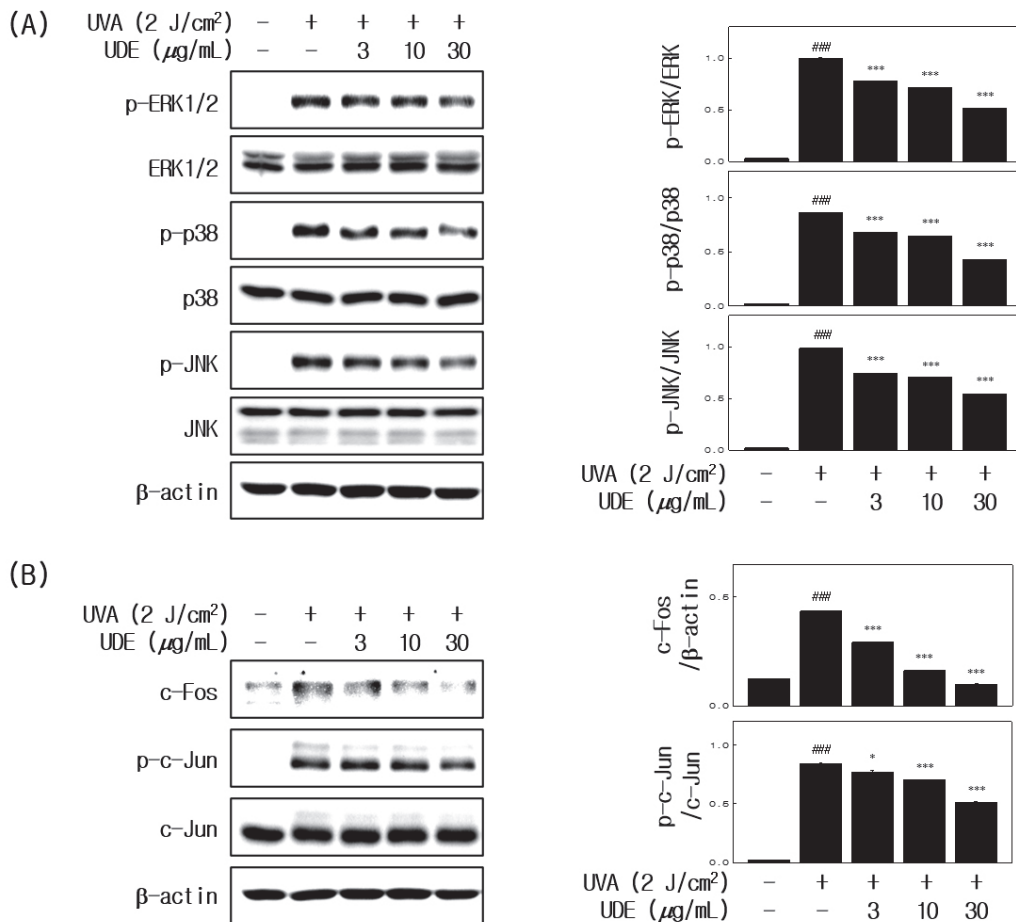


**Figure 2.** Effect of *Usnea diffracta* extracts (UDE) on MMP-1 expression in HDFn cells. (A) Cells were treated with UDE for 24 h. Cell viability was determined using MTT assay. (B) Cells were irradiated with UVA (2 J/cm<sup>2</sup>) followed by treatment various concentrations with UDE for 6 h. mRNA and protein expressions of MMP-1 were examined using RT-PCR and western blot analysis. Band intensities relative expression levels were calculated using the ImageJ 1.47 software. All data are the mean ± SD of three independent experiments. ###*p* < 0.001 represent significant difference compared to control and \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 compared to UVA treated group.

### 3.2. 송라 추출물의 MAPKs/AP-1 활성화에 미치는 효과 확인

UV 조사에 의한 산화적 스트레스와 지속적인 염증은 피부 섬유아세포에서 외인성 피부 노화의 주요 원인이다 [24]. UV에 의해 생성된 ROS는 MAPKs (ERK, JNK, p38) 신호경로를 활성화하고, AP-1 (c-Fos, c-Jun)의 활성화를 초래하며, 전사인자의 역할을 하는 활성화된 AP-1은 핵 내부로 들어가 target 유전자의 promoter 부분에 결합하여 MMP-1과 같은 유전자의 발현을 상향 조절한다. 이러한 연쇄적인 신호전달 반응은 피부의 구조와 탄력을 유지하는 콜라겐, 엘라스틴 등의 세포외기질을 분해하는 원인이 된다 [25]. 앞의 결과에서 송라 추출물이 MMP-1의 발현을 억

제함에 따라, UVA에 의해 활성화되는 MAPKs/AP-1 신호 경로에 송라 추출물이 미치는 영향을 western blot을 통해 확인하였다. 송라 추출물은 UVA에 의해 증가된 ERK, p38 및 JNK의 인산화를 농도 의존적으로 억제하였으며 최고 농도인 30  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 ERK, p38 및 JNK의 발현을 각각 49.7%, 51.3% 및 45.9% 억제하였다(Figure 3A). 또한 MAPKs의 연쇄신호로 활성화되는 AP-1의 활성을 확인한 결과, 송라 추출물은 UVA에 의해 증가된 c-Jun의 인산화 및 c-Fos의 발현을 각각 40.2%, 100% 억제하였다(Figure 3B). 이는 송라 추출물이 MAPK/AP-1 활성 억제를 통해 MMP-1의 발현을 억제함을 나타낸다.



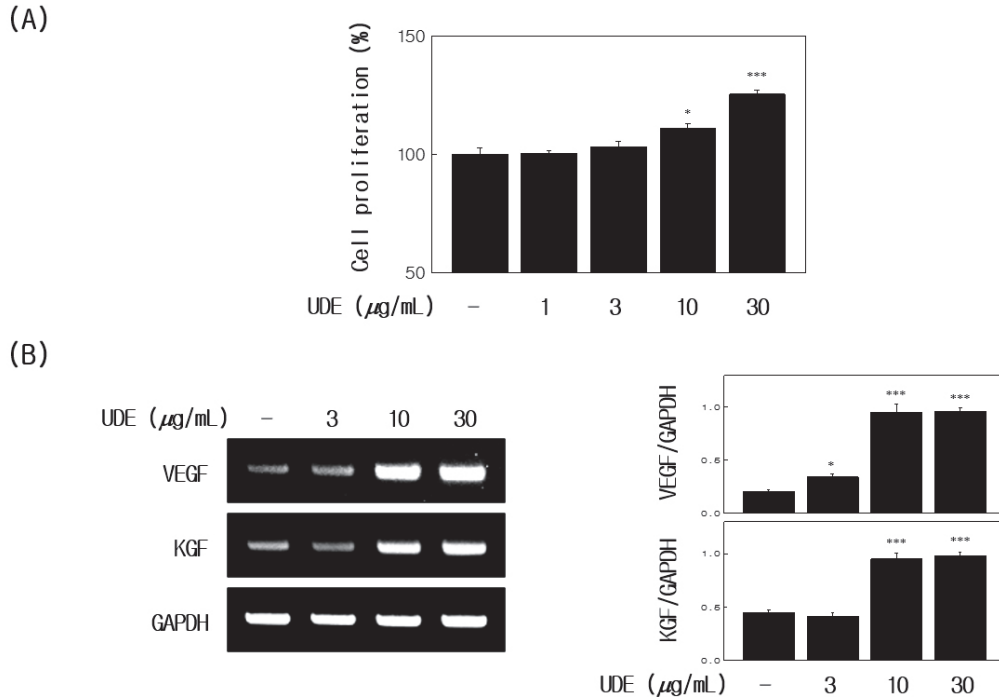
**Figure 3.** Effect of *Usnea diffracta* extracts (UDE) on MAPK/AP-1 signaling pathway expression in HDFn cells. Cells were irradiated with UVA (2 J/cm<sup>2</sup>) followed by treatment various concentrations with UDE for 20 min. Protein expressions of (A) MAPK and (B) AP-1 were examined using western blot analysis and relative expression levels were calculated using the ImageJ 1.47 software. All data are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. <sup>###</sup> $p < 0.001$  represent significant difference compared to control and <sup>\*</sup> $p < 0.05$  and <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  compared to UVA treated group.

3.3. 송라 추출물의 모유두세포 증식 및 성장인자 발현에 미치는 효과 확인

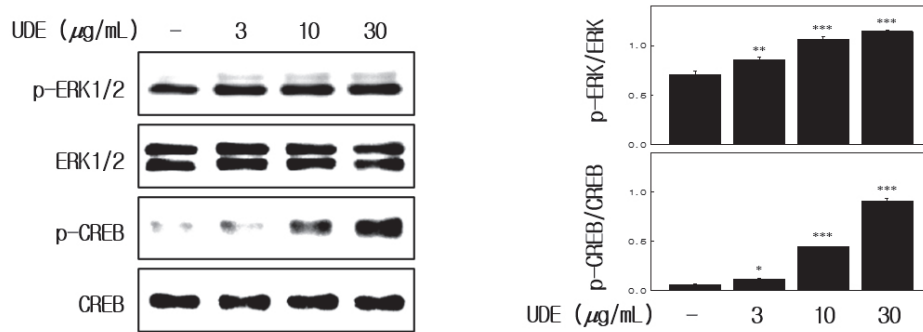
모발이 성장하기 위해서는 모낭 주위 여러 인자들의 작용과 관련 세포의 상호작용이 매우 중요하다. 모낭의 주요 구성 세포인 모유두세포는 모발 성장 주기를 조절하며, 이러한 기능은 VEGF, KGF와 같은 성장인자에 의해 조절된다고 알려져 있다[26,27]. 먼저 모발의 성장에 대한 효과를 확인하기 위해 HFDPC의 증식에 대한 송라 추출물의 영향을 확인하였다. 송라 추출물을 1 ~ 30  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 결과, 농도 의존적으로 HFDPC의 증식이 증가하였고, 최고 농도인 30  $\mu\text{g/mL}$ 에서 25.4%의 증식률을 나타내었다 (Figure 4A). 다음으로, HFDPC의 성장 조절에 관여하는 성장인자인 VEGF와 KGF의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 송라 추출물을 3, 10, 30  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 결과, VEGF 및 KGF의 발현이 최고 농도인 30  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 약 4.8배, 2.2배 증가함을 확인하였다 (Figure 4B).

3.4. 송라 추출물의 ERK/CREB 활성화에 미치는 효과 확인

모유두세포의 증식과 모발 성장인자는 ERK/CREB 신호 전달 경로에 의해 조절되는 것으로 보고되어 있다[13]. MAPKs family 중 하나인 ERK는 세포 증식 및 분화 등에 관여하며, CREB의 인산화를 유도하여 모발 성장인자의 전사를 조절하고[28,29], 활성화된 CREB는 성장인자인 VEGF 및 KGF의 유전자 발현을 자극한다[30]. 송라 추출물이 ERK/CREB 신호전달 경로에 미치는 영향을 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. 송라 추출물을 3, 10, 30  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때, Figure 5에 나타난 바와 같이 ERK 및 CREB의 인산화가 농도 의존적으로 증가하였으며, 최고 농도인 30  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 각각 1.6 배, 10 배 증가하였다. 이런 결과를 통해 송라 추출물이 ERK/CREB 신호전달 경로를 활성화시켜 HFDPC의 증식 및 성장인자의 발현을 증가시키는 효과를 나타냄을 확인하였다.



**Figure 4.** Effect of *Usnea diffracta* extracts (UDE) on Cell proliferation and growth factor expression in HFDPC cells. (A) HFDPC cells were treated with UDE for 48 h. Cell proliferation was determined using MTT assay. (B) HFDPC cells were treated with UDE for 6 h. mRNA expressions of VEGF and KGF was examined using RT-PCR analysis and relative expression levels were calculated using the ImageJ 1.47 software. All data are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  represent significant difference compared to control.



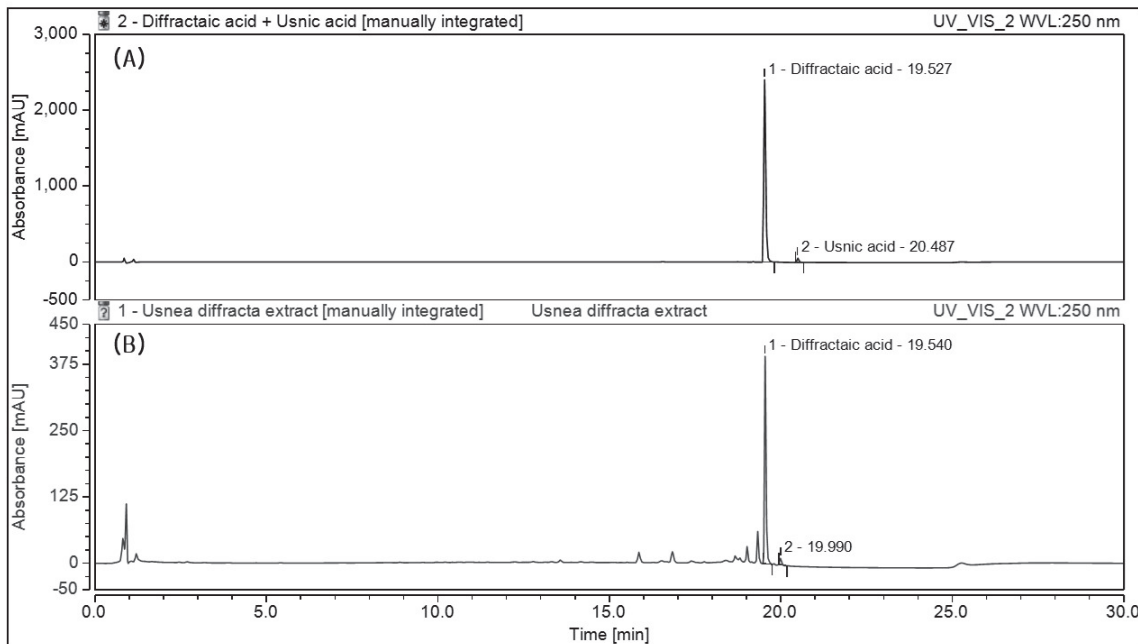
**Figure 5.** Effect of *Usnea diffracta* extracts (UDE) on ERK/CREB signaling pathway expression in HFDPC cells. Cells were treated with UDE for 30 min. Protein expressions of ERK, phospho-ERK, CREB, and phospho-CREB were examined using western blot analysis and relative expression levels were calculated using the ImageJ 1.47 software. All data are the mean ± SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  represent significant difference compared to control.

3.5. 송라 추출물의 메틸렌클로라이드 분획으로부터

Diffractaic Acid의 분리정제 및 함량 분석

송라속(*Usnea*) 지의류에는 다양한 생리활성을 갖는 2차 대사산물을 함유하고 있으며, 송라(*U. diffracta* Vain)의 주요 활성 성분으로는 diffractaic acid와 usnic acid로 알려져 있다[31]. 송라 추출물의 diffractaic acid와 usnic acid의 함량을 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography)를

사용하여 분석하였다. Diffractaic acid와 usnic acid 표준품은 각각 19.527 min과 20.487 min의 retention time (RT)에서 peak가 확인되었다(Figure 6A). 같은 조건으로 송라 추출물을 분석한 결과, 19.540 min의 RT에서 diffractaic acid의 peak를 확인하였고, usnic acid는 검출되지 않았으며(Figure 6B), 표준품을 통해 추출물 내 diffractaic acid의 함량이 1,250 ppm 함유되어 있음을 확인하였다.



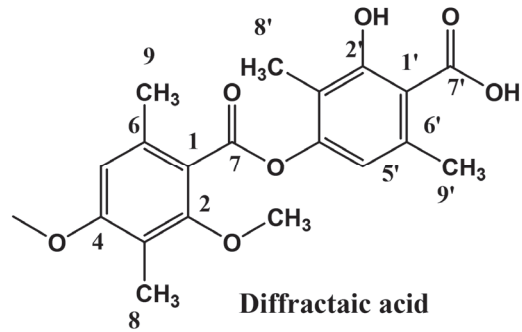
**Figure 6.** HPLC chromatogram data of diffractaic acid. (A) shows HPLC chromatogram of diffractaic acid and usnic acid and (B) shows HPLC chromatogram of *Usnea diffracta* extracts (UDE).



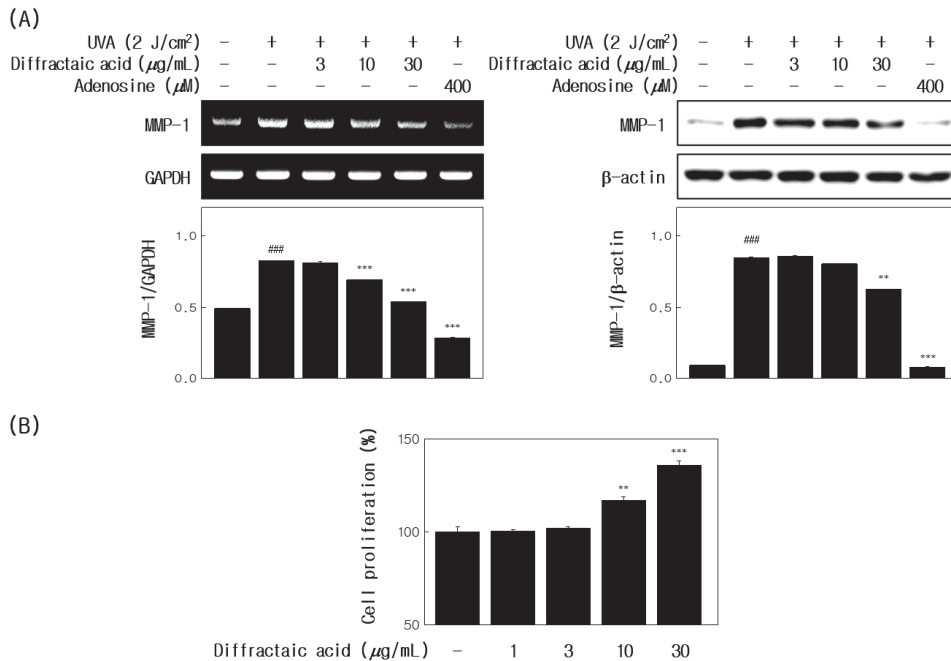
송라 추출물의 활성 성분인 diffractaic acid를 추출을 위하여 용매별 분획을 진행하였다. 송라 추출물은 70% 에탄올을 이용하여 추출하였으며, 수득한 추출물은 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 메틸렌클로라이드 분획물을 얻었다. 선택한 분획물로부터 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 화합물 1을 분리하였다(Figure 1). <sup>1</sup>H-NMR 결과, δ<sub>H</sub> 3.78, 3.82(3H, s) 두 개의 -OCH<sub>3</sub>의 피크를 확인하였으며, δ<sub>H</sub> 6.58, 6.73(1H, s)으로 aromatic proton을 확인하였다. <sup>13</sup>C-NMR 확인 결과, 1, 2, 3, 4, 5, 6번과 1', 2', 3', 4', 5', 6'의 aromatic carbon을 확인하였으며, δ<sub>C</sub> 7, 7'을 통해 두 개의 carboxyl carbon을 확인할 수 있었다. 이러한 기기분석 결과와 문헌을 비교하여 검토한 결과, 이 화합물 1을 diffractaic acid로 동정하였다(Figure 7).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6.58(1H, s, 5-H), 2.04(3H, s, 8-H), 2.37(3H, s, 9-H), 6.73(1H, s, 5'-H), 2.06(3H, s, 8'-H), 2.49(3H, s, 9'-H), 3.74(3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.82(3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 119.74(C-1), 156.82(C-2), 116.42(C-3), 159.97(C-4), 111.23(C-5), 135.22(C-6), 165.95(C-7), 8.90(C-8), 19.65(C-9), 108.68(C-1'), 161.96(C-2'), 116.88(C-3'), 152.80(C-4'), 116.12(C-5'), 139.77(C-6'), 173.50(C-7'), 9.10(C-8'), 23.20(C-9'), 56.43(2-OCH<sub>3</sub>), 61.99(4-OCH<sub>3</sub>)



**Figure 7.** The Chemical structure of diffractaic acid isolated from *Usnea diffracta* Vain.



**Figure 8.** Effect of diffractaic acid on MMP-1 expression and hair papilla cells proliferation. (A) HDFn cells were irradiated with UVA (2 J/cm<sup>2</sup>) followed by treatment various concentrations with diffractaic acid for 6 h. mRNA and protein expressions of MMP-1 were examined using RT-PCR and western blot analysis. Band intensities relative expression levels were calculated using the ImageJ 1.47 software. (B) HFDPC cells were treated with diffractaic acid for 48 h. Cell proliferation was determined using MTT assay. All data are the mean ± SD of three independent experiments. ####p < 0.001 represent significant difference compared to control and \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 compared to UVA treated group.

### 3.6. Diffraactaic Acid의 MMP-1 발현 및 모유두세포의 증식에 대한 영향 확인

Diffraactaic acid는 테프사이드(depside)의 유도체로 송라(*Usnea diffracta*), 솔송라(*Usnea hakonensis*), 실송라(*Usnea longissima*) 등의 송라속 지의류에서 2 차 대사산물로서 분리될 수 있으며, 약리학적 효능으로는 진통, 해열, 항증식, 항암 및 간 보호 효과 등이 보고되어 있다[32-35]. 송라 추출물이 MMP-1 발현 억제 및 모유두세포 증식 효과를 나타낸 바에 따라, 송라 추출물에서 분리된 diffraactaic acid의 MMP-1 발현 및 HFDPC의 증식에 대한 영향을 확인하였다. 먼저, MMP-1의 발현에 대한 영향을 확인한 결과, Figure 8A에서 나타낸 바와 같이 diffraactaic acid는 자외선 조사군 대비 최고 농도인 30  $\mu\text{g/mL}$ 에서 MMP-1의 발현을 mRNA와 단백질 수준에서 각각 87.2%, 29.3% 억제됨을 확인하였다. 또한, diffraactaic acid의 HFDPC의 증식에 대한 영향을 확인한 결과, diffraactaic acid는 농도 의존적으로 HFDPC의 증식을 증가시켰으며, 30  $\mu\text{g/mL}$ 에서 최대 35.9%의 증식률을 보였다(Figure 8B).

## 4. 결 론

본 연구에서는 섬유아세포와 모유두세포에서 송라 추출물의 세포내 항노화 및 모유두세포 활성화 효과에 대해 평가하였다. 송라 추출물은 자외선 조사군 대비 MMP-1 발현을 mRNA와 단백질 수준에서 모두 유의적으로 감소시켰으며, MMP-1의 상위 기전인 MAPKs/AP-1 활성화도 억제시키는 것을 확인하였다. 다음으로는 인간 모유두세포에서 송라 추출물은 세포의 증식 및 성장인자인 VEGF와 KGF의 발현을 유의적으로 증가시켰으며, ERK/CREB의 인산화를 농도 의존적으로 증가시켰다. 송라 추출물에서 활성성분으로 diffraactaic acid를 분리 정제하였으며, diffraactaic acid의 MMP-1 발현 억제 및 모유두세포 증식 효과를 평가하였다. Diffraactaic acid는 UVA에 의해 증가된 MMP-1의 발현을 유의적으로 억제하였으며 모유두세포의 증식을 농도 의존적으로 증가시켰다. 이를 통해 송라 추출물의 항노화 및 모유두세포 활성화 증가 효능을 갖는 화장품 소재로서 활용 가능성을 보았으며, 추후 관련 인자들의 기전연구를 통해 구체적인 효능 확립이 필요할 것으로 사료된다.

## Acknowledgement

본 연구는 2023년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다(과제번호: 2021RIS-001).

## References

1. M. Yaar and B. A. Gilchrist, Photoageing: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 874 (2007).
2. S. Jeon and M. Choi, Anti-inflammatory and anti-aging effects of hydroxytyrosol on human dermal fibroblasts (HDFs), *Biomedical Dermatology*, **2**(1), 1 (2018).
3. S. Tang, R. Lucius, H. Wenck, S. Gallinat, and J. M. Weise, UV-mediated downregulation of the endocytic collagen receptor, Endo180, contributes to accumulation of extracellular collagen fragments in photoaged skin, *J. Dermatol. Sci.*, **70**(1), 42 (2013).
4. G. L. Johnson and R. Lapadat, Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases, *Science*, **298**(5600), 1911 (2002).
5. E. Martinez, Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription, *Plant. Mol. Biol.*, **50**, 925 (2002).
6. P. Huang, J. Han, and L. Hui, MAPK signaling in inflammation-associated cancer development, *Protein Cell.*, **1**(3), 218 (2010).
7. M. R. Schneider, R. Schmidt-Ullrich, and R. Paus, The hair follicle as a dynamic miniorgan, *Curr. Biol.*, **19**(3), R132 (2009).
8. H. Y. Park, S. N. Kim, B. H. Kang, and J. H. Lee, Experimental studies of *Glycine max* Merr. (black bean), *Triticum aestivum* L. (wheat) and *Oryza sativa* L. (rice bran) extracts on the effects of hair growth activity and physical properties, *Korean J. Oriental Med.*, **16**(3), 167 (2010).
9. G. Cotsarelis and S. E. Millar, Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment, *Trends. Mol. Med.*, **7**(7), 293 (2001).
10. Y. Zhang, C. Ni, Y. Huang, Y. Tang, K. Yang, X. Shi, and W. Wu, Hair growth-promoting effect of resveratrol

- in mice, human hair follicles and dermal papilla cells, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, **14**, 1805 (2021).
11. O. S. Kwon, J. H. Han, H. G. Yoo, J. H. Chung, K. H. Cho, H. C. Eun, and K. H. Kim, Human hair growth enhancement *in vitro* by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG), *Phytomedicine*, **14**(7), 551 (2007).
  12. D. M. Danilenko, B. D. Ring, D. Yanagihara, W. Benson, B. Wiemann, C. O. Stames, and G. F. Pierce, Keratinocyte growth factor is an important endogenous mediator of hair follicle growth, development, and differentiation. Normalization of the nu/nu follicular differentiation defect and amelioration of chemotherapy-induced alopecia, *Am. J. Pathol.*, **147**(1), 145 (1995).
  13. J. Kim, S. R. Kim, Y. H. Choi, J. Y. Shin, C. D. Kim, N. G. Kang, and S. Lee, Quercitrin stimulates hair growth with enhanced expression of growth factors via activation of MAPK/CREB signaling pathway, *Molecules*, **25**(17), 4004 (2020).
  14. A. Steven and B. Seliger, Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target, *Oncotarget*, **7**(23), 35454 (2016).
  15. Y. B. Kwon and Y. H. Choi, Isolation of antimicrobial active substance from *Usnea longissima* against sclerotial rot (*Sclerotinia sclerotiorum*), *Korean J. Org. Agric.*, **23**(4), 887 (2015).
  16. X. Zhao, J. Zhu, L. Wang, Y. Li, T. Zhao, X. Chen, and Z. Yan, U. diffracta extract mitigates high fat diet and VD3-induced atherosclerosis and biochemical changes in the serum liver and aorta of rats, *Biomed. Pharmacother.*, **120**, 109446 (2019).
  17. B. C. Behera, N. Mahadik, and M. Morey, Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation, *Pharm. Biol.*, **50**(8), 968 (2012).
  18. S. Ceker, F. Orhan, H. E. Kizil, L. Alpsoy, M. Gulluce, A. Aslan, and G. Agar, Genotoxic and antigenotoxic potentials of two *Usnea* species, *Toxicol. Ind. Health.*, **31**(11), 990 (2015).
  19. S. Singh, S. Khatoon, Y. Joshi, S. Prgyadeep, D. K. Upreti, and A. K. S. Rawat, A validated HPTLC densitometric method for simultaneous determination of evermic and usnic acids in four *Usnea* species and comparison of their antioxidant potential, *J. Chromatogr. Sci.*, **54**(9), 1670 (2016).
  20. N. R. Vanga, A. Kota, R. Sistla, and M. Uppuluri, Synthesis and anti-inflammatory activity of novel triazole hybrids of (+)-usnic acid, the major dibenzofuran metabolite of the lichen *Usnea longissima*, *Mol. Divers.*, **21**(2), 273 (2017).
  21. A. Page-McCaw, A. J. Ewald, and Z. Werb, Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **8**(3), 221 (2007).
  22. N. Xue, Y. Liu, J. Jin, M. Ji, and X. Chen, Chlorogenic acid prevents UVA-induced skin photoaging through regulating collagen metabolism and apoptosis in human dermal fibroblasts, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(13), 6941 (2022).
  23. K. S. Kim, Analysis of cell protective effects and mechanisms of ellagic acid against UVA-induced damages in human dermal papilla cells, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **13**(6), 833 (2015).
  24. G. M. Halliday, Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis, *Mutat. Res.*, **571**(1-2), 107 (2005).
  25. G. J. Fisher, H. C. Choi, Z. Bata-Csorgo, Y. Shao, S. Datta, Z. Q. Wang, S. Kang, and J. J. Voorhees, Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **117**(2), 219 (2001).
  26. M. R. Schneider, R. Schmidt-Ullrich, and R. Paus, The hair follicle as a dynamic miniorgan, *Curr. Biol.*, **19**(3), R132 (2009).
  27. V. A. Randall, N. A. Hibberts, M. J. Thornton, A. E. Merrick, K. Hamada, S. Kato, T. J. Jenner, I. De Oliveira, and A. G. Messenger, Do androgens influence hair growth by altering the paracrine factors secreted by dermal papilla cells?, *Eur. J. Dermatol.*, **11**(4), 315 (2001).
  28. L. S. Wood, New therapeutic strategies for renal cell carcinoma, *Urol. Nurs.*, **30**(1), 40 (2010)

29. H. Wang, J. Xu, P. Lazarovici, R. Quirion, and W. Zheng, cAMP response element-binding protein (CREB): a possible signaling molecule link in the pathophysiology of schizophrenia, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 255 (2018).
30. M. Iino, R. Ehama, Y. Nakazawa, T. Iwabuchi, M. Ogo, M. Tajima, and S. Arase, Adenosine stimulates fibroblast growth factor-7 gene expression via adenosine A2b receptor signaling in dermal papilla cells, *J. Invest. Dermatol.*, **127**(6), 1318 (2007).
31. Y. Ohmura, A synopsis of the lichen genus *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) in Taiwan, *Mem. Natl. Mus. Nat. Sci., Tokyo*, **48**, 91 (2012).
32. E. Okuyama, K. Umeyama, M. Yamazaki, Y. Kinoshita, and Y. Yamamoto, Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*, *Planta. Med.*, **61**(2), 113 (1995).
33. K. C. Kumar and K. Müller, Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth, *J. Nat. Prod.*, **62**(6) 821 (1999).
34. S. Günaydın, E. K. Sulukoğlu, S. N. Kalın, A. Altay, and H. Budak, Diffractaic acid exhibits thioredoxin reductase 1 inhibition in lung cancer A549 cells, *J. Appl. Toxicol.*, **43**(11), 1676 (2023).
35. I. D. Karagoz, M. Ozaslan, I. H. Kilic, I. Guler, C. Uyar, D. Tuter, U. Kazanci, A. Aslan, A. Cakir, and S. Gezici, Hepatoprotective effect of diffractaic acid on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **29**(5), 1011 (2015).