Korean J. Microbiol. Biotechnol. (2013), 41(4), 449–455
http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1307.07004
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

KJMB
Korean Journal of Microbiology and Biotechnology

노간주나무(*Juniperus rigida* Sieb.)의 주름개선 효과

전혜지[1], 이수연[1], 김정환[1], 안봉전[2], 이진영[1]*
[1]호서대학교 한방화장품과학과
[2]대구한의대학교 화장품약리학과

Received: July 26, 2013 / Revised: November 8, 2013 / Accepted: November 28, 2013

Anti-wrinkling Effects of *Juniperus rigida* Sied. Jun, Hye-Ji[1], Soo-Yeon Lee[1], Jeung-Hoan Kim[1], Bong-Jeun An[2], and Jin-Young Lee[1]*. *[1]Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam 336-795, Korea, [2]Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Korea*

Human skin is constantly exposed to environmental conditions such as UV rays, polluted air, and chemical products. UV rays, in particular, affect skin in many ways causing wrinkles, fine wrinkles, rough skin, and xeroderma through a skin aging process. The purpose of this study was to investigate the anti-wrinkling effect of *Juniperus rigida* Sieb., derived from a common cedar tree found the world over. Measuring the elastase to investigate wrinkling efficacy, it was shown that at a concentration level of 1,000 μg/ml of the two extracts, the water extract exhibited a lower than 10% inhibition activity, while the ethanol extract exhibited a 68.5% inhibition activity. Collagenase inhibition activity in the water extract and ethanol extract were 44.9% in the former and 97.2% in the latter extract, which in the case of the ethanol extract, is similar to ascorbic acid (99.6%). Moreover, measuring the biosynthesis of collagen by fibroblast, a concentration level of 50 μg/ml of ethanol extract produced 151.52% of biosynthetic promotion, proving that the ethanol extract acts as a superb anti-wrinkling agent. The result of an investigation conducted on the influence of the ethanol extract on MMP-1 caused by UVA showed that at a concentration level of 100 μg/ml of the ethanol extract of *J. rigida* Sieb a 67.1% inhibition activity was noted. At a concentration level of 50 μg/ml of the ethanol extract of *J. rigida* Sieb a 35% and 39% inhibition ratio to MMP-1 protein and mRNA were observed respectively, thereby restraining the appearance of the collagen breakdown enzyme MMP-1 and wrinkle creation by skin photo-aging.

Keywords: *Juniperus rigida* Sieb., anti-wrinkle, procollagen, MMP-1

서 론

자외선에 의해 손상받은 피부는 collagen의 양이 감소되어 있는데, 이는 자외선에 의해 피부 내에서 matrix metalloproteinase (MMPs)의 발현이 증가하기 때문이며, 이러한 MMPs는 피부 광노화 발생에 중요한 역할을 한다[6]. MMPs는 피부의 keratinocytes, fibroblasts를 비롯한 많은 세포들로부터 분비되어 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)과 기저막(basement membrane, BM)을 구성하는 대부분의 단백질 성분을 분해함으로서 피부 탄력을 유지하는 결합조직을 파괴하여 주름과 탄력저하 및 피부 처짐의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[22]. 최근에 노화에 따른 MMPs의 증가와 관련된 세포 신호 전달 경로는 주로 stress-activated mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway가 관여한다고 보고되어 있으며[4], MAP kinase pathway에서 가장 많은 영향을 받는 activator protein-1 (AP-1) 인자는 세포의 성장과 분화에 관련되는 많은 유전자의 발현을 조절하고 몇몇 MMPs의 발현을 강력하게 조절한다[5]. MMPs는 활성중심부에 아연을 가지는 금속단백분해효소로 생체 내에서 잠재성 전효소(zymogen) 형태로 분비되고, 효소활성을 가지기 위해서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단, 활성화 되며 α2-macroglobulin이나 TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinase) 같은 저해제에 의해 활성이 조절된다[6]. 현재 노화방지 연구에 있어 자외선에 의해 생성되는 자유라디칼을 소거하고 비정상적으로 과발현되는 MMPs의 조절기작에 관한 연구가 많아지고 있다. 이에 피부노화에 관련된 다양한 기능성 소재 탐색이 진행되고 있는데, 보다 안전

*Corresponding author
Tel: +82-41-540-9552, Fax: +82-41-540-9538
E-mail: jylee@hoseo.edu
© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

하고 우수한 효능을 가진 천연물에서 추출한 천연 항산화제에 대한 개발이 이루어지고 있다[13].

전 세계적으로 향나무과의 일종인 다년생 수목인 노간주나무속은 노가지나무, needle juniper로도 불리며, 측백나무과에 속하는 늘푸른큰키나무로 한국, 중국, 시베리아 전역에 분포되어 있다. 노간주나무(*Juniperus rigida* Sieb.)는 한국에서 석회암 지대에서 자라며, 원대가 옆으로 뻗으며 그 중간에서 뿌리가 나오는 갯노간주(*J. conferta*), 높이 15 m의 소교목이지만 대개 줄기가 여러 갈래로 나오는 높이 3-5 m의 관목상으로 자라며 수피는 회갈색인 두송(*J. communis*), 기본종에 비해 잎의 길이가 4-8 mm로 짧고 열매가 6-7 mm로 잎보다 긴 곱향나무(*J. communis var. montana*) 그리고 바닷가에서 자라는 해변노간주(*Juniperus rigida* Sieb. et Zucc var.) 등이 있다[11]. 노간주나무는 껍질이 붉은 갈색이고 4월에 꽃이 피며 열매는 흑갈색의 공 모양으로 맛은 좀 달며, 건조한 곳에서 잘 자랄 수 있을 뿐만 아니라 종자가 새들에 의하여 잘 전파될 수 있는 특성이 있으며, 어릴 때에서는 맹아력이 강하고 또 잎이 뾰족하여 동물의 침해가 어려워 능히 살아남을 수 있다고 한다[14]. 이러한 노간주나무의 종자에서 채취한 기름은 이뇨제 등의 약리적 효과가 있다고 알려져 있어 부종, 통풍, 요로 생식기 질환에 사용하며, insect repellent로 이용하기도 하며, 서양에서는 노간주나무의 열매인 두송실(juniper berry)을 열매량의 3-4배가 되게 독한 술을 넣고 밀봉하여 6개월 정도 보관 후 건더기는 건져 버리고 술만 따로 보관해서 마시거나 향으로 이용하였다[11]. 중국 본초도감에 따르면 과실에는 α-pinine, mycene, limonene 등이 들어 있으며 거풍, 제습, 이뇨에 효능이 있고, 수종, 통풍, 요로질환 등을 치유시킨다고 하였다[8].

본 연구에서는 피부에 안전한 소재인 천연물에 대한 연구가 활발하게 진행됨에 따라 한국 전역에 자생하고 있는 노간주나무 추출물을 이용하여 주름개선 관련 실험을 통하여 그 효능을 검증하고 새로운 기능성 화장품소재로서의 가능성을 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험에 사용된 노간주나무는 충북 괴산에서 2012년 봄에 생산된 건채를 ㈜청명약초에서 구입하여 실험재료로 사용하였다. 시료의 에탄올 추출물은 70% 에탄올 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였고, 열수 추출물은 증류수 10배의 양을 가하여 80°C에서 3시간 가량 환류냉각 추출해 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 시료 추출물은 여과지(Whatman No. 2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 완전히 제거한 후 동결건조하여 −20°C에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였으며, 효소 실험 후 활성이 우수한 에탄올 추출물을 이용하여 세포실험을 실시하였다.

실험에 사용된 시약

주름억제 효과 측정에 사용된 시약인 porcine pancreas elastase, N-succinyl-L-ala-ala-ala-p-nitroanilide, collagenase, 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg 등은 Sigma Chemical Co. (USA)서 구입하였다. 그 외 collagen 생합성 측정에 사용된 시약인 pro-collagen type I C-peptide EIA kit는 Takara bio (Japan)에서 구입하여 사용하였고, MMP-1 활성을 측정하기 위하여 MMP-1 kit는 Amersham Bioscience (USA), tumor necrosis factor-α (TNF-α)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등의 방법[1]에 따라 측정하였다. 기질로서 N-succinyl-$(L\text{-}Ala)_3$-p-nitroanilide (Sigma, USA)를 사용하여 37°C에서 30분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 40 µl씩 96-well plate에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 2.5 U/ml porcine pancreas elastase (Sigma, USA) 용액 40 µl을 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-$(L\text{-}Ala)_3$-p-nitroanilide (0.5 mg/ml)을 80 µl 첨가하여 30분간 반응시켜 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Collagenase 저해활성 측정

Collagenase 저해활성 측정은 Wünsch E와 Heindrich HG의 방법[23]에 따라 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM $CaCl_2$를 첨가하여, 0.3 mg/ml의 4-phenyl azobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Sigma, USA)를 녹인 기질액 125 µl 및 시료용액 50 µl의 혼합액에 0.2 mg/ml의 collagenase (Sigma, USA) 75 µl를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 250 µl을 넣어 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 1.5 ml을 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1307.07004

나타내었다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Procollagen type-1 생합성 측정

세포를 1×10^4 cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 첨가하여 CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다. 이렇게 실험한 세포의 배양액을 모아 실험에 사용하였다. 세포 배양액 내 collagen 생합성 정도는 procollagen type-I C peptide (PIP) EIA (Takara Bio, Japan)을 사용하여 propeptide의 양을 측정하였다.

Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 저해활성 측정

세포를 1×10^4 cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 첨가하여 CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다. 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF-α를 10 ng/ml의 농도로 첨가하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며 Gross 등의 방법[7]에 따라 MMP-1 biotrack activity assay을 이용하여 측정하였다.

세포 배양

본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO_2 incubator에 적응시켜 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[2]에 따라 측정하였다. 섬유아세포(CCD-986sk)을 96 well plate에 5×10^4 cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시표용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

주름개선인자인 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 활성을 보기 위하여 세포주 CCD-986sk을 100 mm tissue culture dish에 분주한 후 24시간 동안 배양하여 세포을 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24-48시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척해 주었다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 complete mini 1 tab를 가한 100 μl로 용해해서 4°C 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하여 20 μl의 단백질을 10% SDS-PAGE상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semi dry transfer cell (Hofer, USA)를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 하룻밤 반응시킨 뒤, 다시 10분 간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하고 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 3회 세척한 후 LAS 4,000를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 100 mm culture dish에 cell seeding한 뒤 24시간 동안 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상등액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 각 well에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 chloroform 200 ml를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어주었다. 그 후 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 ml이 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거 한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 13,200 rpm에서 5분간 원심 분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. DEPC를 50 μl씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 μl와 멸균수 195 μl를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA 양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 μg/ml) 1 μl, 추출한 RNA (2 μg)와 nuclease free water로 10 μl를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, $MgCl_2$, PCR necleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, ruclease free water를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 5×green GoTaq Flexi buffer, $MgCl_2$, PCR Nucleotide Mix (10 mM), primer, GoTaq DNA Polymerase, nuclease free water, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후

Table 1. Sequence of the primers used for PCR.

Gene	Primer	Sequence(5' → 3')
MMP-1	Forward	AGCGTGTGACAGTAAGCTAA
	Reverse	GTTTTCCTCAGAAAGAGCAGCAT
β-actin	Forward	ATTGTTGCCATCAATGACCC
	Reverse	AGTAGAGGCAGGGATGAT

PCR을 실행하였다. MMP-1은 94°C 30초, 56°C 60초, 72°C 1분(35 cycles)를 하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 40분간 전기영동 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS10.0 (Evanston, IL, USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(analysis of variance ANOVA)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Turkey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

결과 및 고찰

Elastase 저해활성 측정 결과

Elastase 저해제로는 ursolic acid가 이용되고 있는데, ursolic acid는 물이나 오일 등의 용매에는 잘 녹지 않는 성질을 가지고 있기 때문에 제제화하기 어려워 일반적으로 사용하기 어려운 문제점이 있다[15]. 이러한 주름 생성과 관련한 elastase의 활성 억제 효과를 확인하기 위해 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 노간주나무 열수 추출물에서는 10% 이하의 낮은 저해활성을 나타낸 반면에 노간주나무 에탄올 추출물의 1,000 μg/ml에서 68.5%의 저해활성을 나타내었다. 이는 Jung 등[9]이 보고한 자료에서 1,000 μg/ml에서 황기, 자초, 지실의 elastase 활성저해능이 각각 3.73%, 8.73%, 15.59%를 나타낸 결과와 Kwak 등[12]이 보고한 노화억제와 관련된 각종 약용식물인 모과나무, 계피차, 마, 조각자, 저령의 열수 추출물의 elastase 저해 활성능이 1,000 μg/ml에서 각각 54%, 52%, 51%, 45%, 57%의 저해능을 나타낸 결과와 비교하여 노간주나무 에탄올 추출물이 유의한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

Collagenase 저해활성 측정 결과

Collagen을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 콜라겐 type I을 분해하는 matrix metalloproteinase I (MMP-1, collagenase)으로 피부노화에 있어 MMP-1의 저해는 중요한 요인으로 평가되어 지고 있다[3]. 이러한 collagenase의 저해활성을 노간주나무 추출물을 사용하여 측정한 결과 Fig. 2와 같이 나타났다. 노간주나무 열수 추출물의 저해활성은 1,000 μg/ml에서 44.9%의 저해활성을 나타내었으며, 노간주나무 에탄올 추출물의 경우 1,000 μg/ml에서 97.2%로 ascorbic acid (99.6%)와 유사한 효과로 높은 저해활성을 나타내었다. 이는 Seo [20]의 녹두 에탄올 추출물의 1,000 μg/ml에서 55.5%의 저해활성을 나

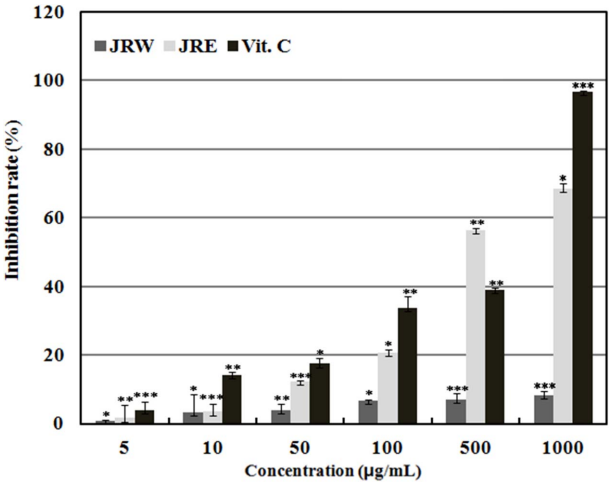

Fig. 1. Inhibition rate of *Juniperus rigida* Sieb. extracts on elastase.
JRW : *Juniperus rigida* Sieb. extracted with water, JRE : *Juniperus rigida* Sieb. extracted with ethanol, Vit. C : L-ascorbic acid. Results are means ± S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

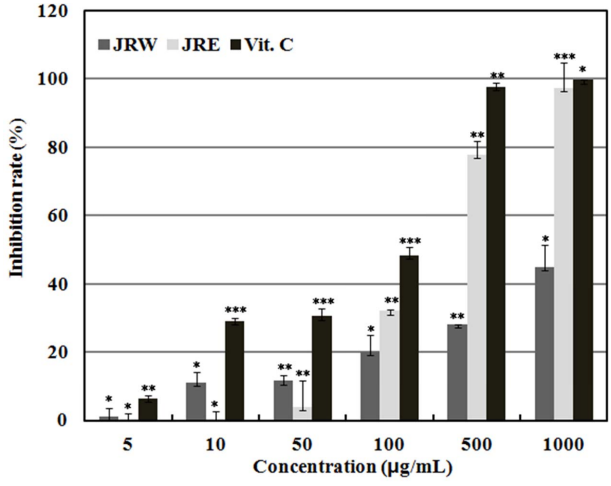

Fig. 2. Inhibition rate of *Juniperus rigida* Sieb. extracts on collagenase.
JRW : *Juniperus rigida* Sieb. extracted with water, JRE : *Juniperus rigida* Sieb. extracted with ethanol, Vit. C : L-ascorbic acid. Results are means ± S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1307.07004

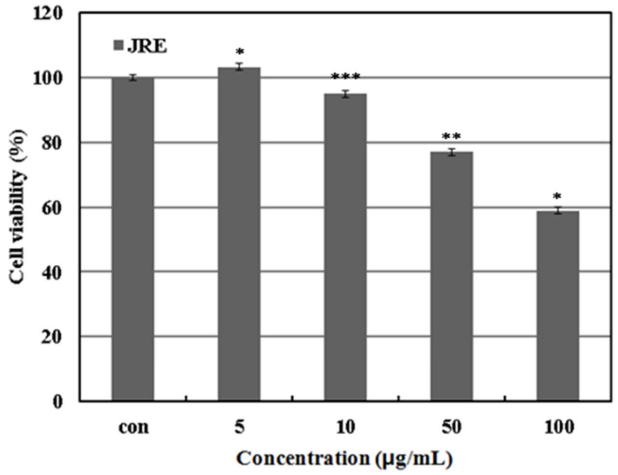

Fig. 3. Cell viability of *Juniperus rigida* Sieb. ethanol extracts on fibroblast cell (CCD-986sk).
JRE : *Juniperus rigida* Sieb. extracted with ethanol.
Results are means ± S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

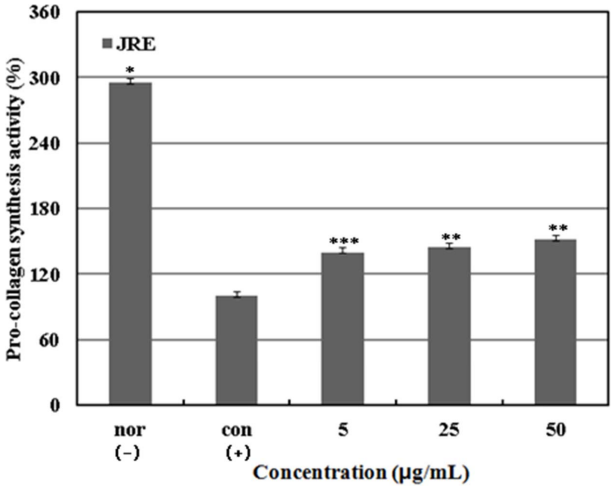

Fig. 4. Pro-collagen synthesis of *Juniperus rigida* Sieb. ethanol extracts on fibroblast cell (CCD-986sk).
JRE : *Juniperus rigida* Sieb. extracted with ethanol.
Results are means ± S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

타내었으며, Lee 등[17]의 진범 열수 추출물이 1,000 μg/ml에서 37.4%의 저해율을 나타낸 결과와 비교하였을 때 노간주나무 추출물의 collagenase 저해활성의 우수함을 확인할 수 있었다.

섬유아세포(CCD-986sk)의 생존율 확인

노간주나무 에탄올 추출물이 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 5, 10, 50, 100 μg/ml의 농도로 처리하고, 24시간 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. 섬유아세포에 대한 노간주나무 에탄올 추출물의 세포 생존율을 측정한 결과, 100 μg/ml에서 58.8%의 세포 생존율을 나타내어, 이하 모든 실험은 50 μg/ml 이하에서 실험을 실시하였다(Fig. 3).

섬유아세포(CCD-986sk)에서의 pro-collagen type I 생합성량 확인

Pro-collagen은 아미노 말단과 카르복시 말단에 propeptide라는 peptide 염기서열을 포함하며, propeptide는 소포체에서 pro-collagen 분자의 folding을 도와줌과 동시에 collagen의 중합반응이 일어날 때 collagen 분자로부터 절단, 분리된다고 알려져 있다. 그래서 분리된 propeptide의 양을 측정함으로서, 세포 내에서의 collagen 생합성 정도를 파악할 수 있다[18, 21]. 본 연구에서는 정상 섬유아세포(CCD-986sk)에 collagen 생합성 증가를 확인할 수 있는 pro-collagen type I C-peptide (PICP) enzyme immunoassay를 이용하여 노간주나무 에탄올 추출물의 collagen 생합성량을 Fig. 4와 같이 나타내었다. 노간주나무 에탄올 추출물의 collagen 생합성량

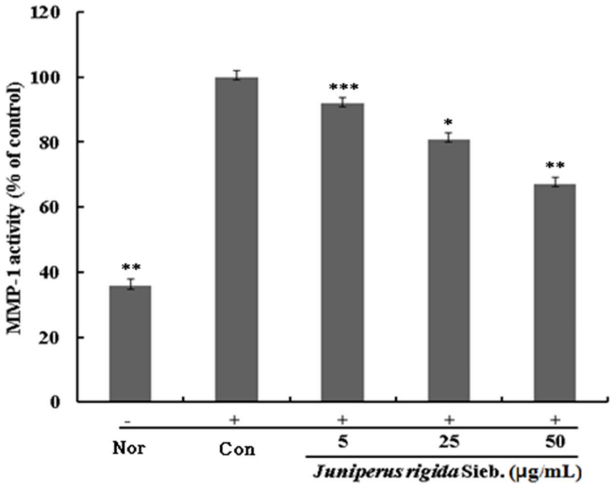

Fig. 5. Inhibitory effect of extract from *Juniperus rigida* Sieb. The expression of MMP-1 in the UVB irradiated human dermal fibroblasts.
The cells were treated with various concentration of *Juniperus rigida* Sieb. for 24 h. Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

은 50 μg/ml에서 151.52%의 생합성 촉진 효과를 나타내었다. Lee [16]의 도화 열수 및 에탄올, 아세톤 추출물의 collagen 생합성량은 100 μg/ml에서 27.7%, 37.7%, 41.0%의 효과와 Kim [10]의 들쭉 추출물의 collagen의 생합성량을 측정한 결과 50 μg/ml에서 121.4%의 효과를 나타내어 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

MMP-1 저해활성 kit 측정 결과

본 연구에서는 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 노간주나무 에탄올 추출물이 미치는 영향을 알아보고자 섬유아세포에 UVA를 조사하고 노간주나무 에탄올 추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 MMP-1 발현 저해효과를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 통해 알아보았다. 그 결과 Fig. 5와 같이 노간주나무 에탄올 추출물 100 μg/ml에서 67.1%의 MMP-1의 발현 저해효과를 나타내었다. 본 연구 결과를 통해 노간주나무 에탄올 추출물을 활용하여 주름개선 소재로 이용이 가능할 것으로 판단된다.

MMP-1 단백질 발현 및 mRNA 발현 억제 효과 확인

본 연구에서는 MMP family 중 MMP-1의 단백질 발현을 측정하였다. MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, type I과 III collagen을 기질로 하며, stromelysin 1라고도 불리는 MMP-3은 기저막의 type IV collagne을 분해하며 zymogen인 pro MMP-1을 활성화시키는데, 이러한 MMPs의 발현증가는 자외선에 의해 유도된다[5]. 이러한 주름과 관계되어 진 MMP-1의 단백질 및 mRNA의 발현을 측정해 본 결과, Fig. 6, 7과 같이 나타났다. 노간주나무 에탄올 추출물의 MMP-1의 단백질 및 mRNA의 발현은 50 μg/ml의 농도에서 각각 35%, 39%의 저해율을 나타내었다. 이러한 결과로 인해 노간주나무 에탄올 추출물은 collagen을 분해하는 효소인

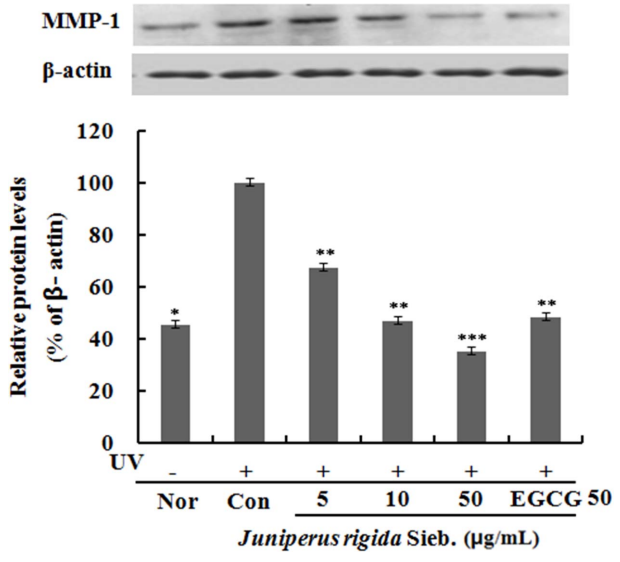

Fig. 6. MMP-1 protein expression rate of ethanol from *Juniperus rigida* Sieb. extracts on fibroblast cell (CCD-986sk).
After CCD-986sk cells were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25, 50 μg/ml of ethanol extracted of *Juniperus rigida* Sieb. for 48 h. Histogram show the densitometric of MMP-1 protein normalized to β-actin. Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

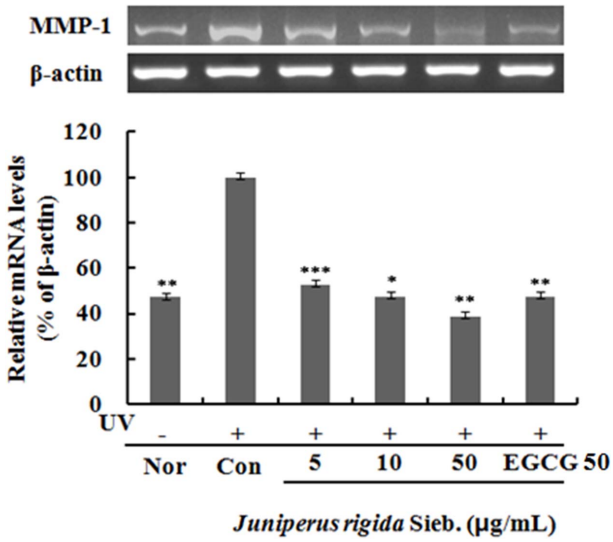

Fig. 7. MMP-1 mRNA expression rate of ethanol from *Juniperus rigida* Sieb. extracts on fibroblast cell (CCD-986sk).
After CCD-986sk cells were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25, 50 μg/ml of ethanol extracted of *Juniperus rigida* Sieb. for 48 h. Histogram show the densitometric of MMP-1 protein normalized to β-actin. Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

MMP-1의 발현을 억제하고 광노화에 의한 주름생성 억제 활성을 보이는 것으로 판단된다. Park 등[19]의 대황 추출물 5, 10, 20 μg/ml의 농도에서 MMP-1을 40%, 50%, 70% 억제하는 결과와 비교하였을 때 노간주나무 에탄올 추출물이 더 우수한 주름 억제 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

요 약

사람의 피부는 자외선, 오염된 공기, 화학제품 등 환경에 끊임없이 노출된다. 특히 자외선은 피부에 다양한 형태로 영향을 주어 주름, 잔주름, 피부거침, 피부건조와 같은 현상을 발생시켜 피부노화를 유발시킨다. 본 연구에서는 전 세계적으로 향나무과의 일종인 다년생 수목인 노간주나무(*Juniperus rigida* Sieb.) 추출물의 주름개선 효과에 대하여 검증하였다. 주름개선 효과 측정으로 elastase 저해활성을 측정한 결과 노간주나무 열수 추출물 1,000 μg/ml에서 10% 이하의 낮은 저해활성을 나타낸 반면에 노간주나무 에탄올 추출물의 1,000 μg/ml에서 68.5%의 저해활성을 나타내었으며, collagenase 저해활성을 측정한 결과 1,000 μg/ml에서 열수 및 에탄올 추출물은 44.9%, 97.2%로 에탄올 추출물의 경우 ascorbic acid (99.6%)와 유사한 효과로 높은 저해활성을 나타내었다. 또한 섬유아 세포를 이용한 collagen 생합성량을 측정한 결과 노

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1307.07004

간주나무 에탄올 추출물 50 μg/ml에서 151.52%의 생합성 촉진 효과를 나타내어 노간주나무 에탄올 추출물의 주름개선 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 노간주나무 에탄올 추출물이 미치는 영향을 알아본 결과 노간주나무 에탄올 추출물은 100 μg/ml에서 67.1%의 MMP-1 발현 저해효과를 나타내었다. 노간주나무 에탄올 추출물의 MMP-1의 단백질 및 mRNA의 발현은 50 μg/ml의 농도에서 각각 35%, 39%의 저해율을 나타냄에 따라 노간주나무 에탄올 추출물은 collagen을 분해하는 효소인 MMP-1의 발현을 억제하고 광노화에 의한 주름생성 억제 활성을 보이는 것을 확인하였다.

Acknowledgments

This study was supported by a grant of the Korea Healthcare technology R & D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (Grant No. : A103017).

References

1. Cannell RJ, Kellam SJ, Owsianka AM, Walker JM. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* **54**: 10-14.
2. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*. **47**: 936-942.
3. Chung JH, Kang S, Varani J, Lin J, Fisher GJ, Voorhees JJ. 2000. Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 117-182.
4. Davis RJ. 1994. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 470-473.
5. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, *et al.* 1996. Molecular basis of sun-induced premature ageing and retinoid antagonism. *Nature* **379**: 335-339.
6. Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Voorhees JJ. 1999. Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem. Photobiol.* **69**: 154-157.
7. Gross J, Lapiere CM. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **54**: 1197-1204.
8. Jo JO, Kim SM, Kim KS. 1999. Analysis of asarone, coumarin and thujone in medicinal plants used in brewing a Korean traditional folk Wine. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**: 210-217.
9. Jung JH, Kim KJ. 2009. Experimental studies about the inhibitory effect on tyrosinase and elastase activities by various herb medicines. *The Journal of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology* **22**: 82-91.
10. Kim YH. 2009. Skin whitening and anti-wrinkle activities of *vaccinium uliginosm* L. and its action mechanism. Ph. D. dissertation, Kyung Hee University, Seoul, Korea.
11. Kim TW. 1996. Woody plant of Korea, pp. 49. Kyohak Publishing, Seoul.
12. Kwak YJ, Lee DH, Kim NM, Lee JS. 2005. Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **13**: 213-216.
13. Lim AK, Jung YJ, Kim KS, Kim YH, Kwak JH, Hong JH, *et al.* 2010. Skin UVB photo aging effect from extract of fermented *Reynoutri elliptica*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 369-375.
14. Lee CB. 1990. Dendrology, pp. 110-112. Hyangmoon Publishing, Seoul.
15. Lee GW, Lee JY. 2008. The effect on skin deposition and moisturizing of ursolic acid in hydrogel system containing Wood vinegar. *J. Korean Pharm. Sci.* **38**: 87-92.
16. Lee JY. 2007. Anti-wrinkle, whitening constituents of *Prunus persica* Flos and an application for functional cosmetics. Ph. D. dissertation, Daegu Haany University, Gyeongbuk, Korea.
17. Lee JY, Choi YH, Lee SM, Lee SY, Jun HJ. 2012. Physiological activity of *Aconitum pseudolaeve var erectum* Nakai and its effect on perfume on an electroencephalogram (EEG). *J. Life Sci.* **22**: 1214-1223.
18. Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR, Krane SM. 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.
19. Park SM, Lee GW, Cho YG. 2008. Effect of *Rheum undulatum* extract on antioxidant activity and activity of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *J. Life Sci.* **18**: 1700-1704.
20. Seo IA. 2010. Studies on cosmeceutical of *Phaseolus radiatus*. M. S. dissertation, Daegu Haany University, Gyeongbuk, Korea.
21. Talwar HS, Griffiths CE, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ. 1999. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J. Invest. Dermatol.* **105**: 285-290.
22. Wang Y, Johnson AR, Ye QZ, Dyer RD. 1999. Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J. Biol. Chem*. **274**: 33043-33049.
23. Wünsch E, Heidrich HC. 1963. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Z. Physiol. Chem.* **333**: 149-151.