

## Mechanisms for Anti-wrinkle Activities from Fractions of Black Chokeberries

Eun-Young Choi<sup>1</sup>, Eun-Hee Kim<sup>1</sup>, Jae-Bong Lee<sup>1</sup>, Eun-Ju Do<sup>2</sup>, Sang-Jin Kim<sup>3</sup>, Se-Hyeon Kim<sup>4</sup>, Jeong-Yeol Park<sup>5</sup> and Jin-Tae Lee<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>Korean Medicine Industry Support Center, Daegu 42158, Korea

<sup>3</sup>Department of Cosmetic Science, Daejeon Health Sciences Collage, Daejeon 34504, Korea

<sup>4</sup>KFRI Forest Genetic Research Department, Gyeonggi-do 16631, Korea

<sup>5</sup>Industry-Academic Cooperation Foundation, Hanbat National University, Daejeon 305-719, Korea

Received November 10, 2015 / Revised November 23, 2015 / Accepted November 24, 2015

Black chokeberries (scientific name *Aronia melanocarpa*) have been reported to have major effects due to anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer capabilities. In this study, we investigated the anti-wrinkle effects of *A. melanocarpa*, including collagenase inhibition effects and their molecular biological mechanisms, such as oxidative stress-induced matrix metalloproteinase (MMP), mitogen-activated protein (MAP) kinase, and activator protein (AP)-1 expression and/or phosphorylation. In collagenase inhibition activity, the ethyl acetate fraction of black chokeberry (AE) was 77.2% at a concentration of 500 µg/ml, which was a significant result compared to that of Epigallocatechin gallate (positive control, 83.9% in 500 µg/ml). In the reactive oxygen species (ROS) assay, the AE produced 78% of ROS in 10 µg/ml and 70% of ROS in 75 µg/ml, which was a much lower percentage than the ROS production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced CCRF S-180II cells. In the MTT assay, cell viability was increased dose-dependently with AE in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cells. In protein expression by western blot assay, the AE suppressed the expression and phosphorylation of MMPs (MMP-1, -3, -9), MAPK (ERK, JNK, and p38), and AP-1 (c-Fos and c-Jun), and expressed the pro-collagen type I in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cells. These results suggest that black chokeberries have anti-wrinkle and collagen-production effects, and they may be used in applications for material development in the functional food and cosmetic industries.

**Key words** : Anti-aging, black chokeberry, collagen type I, MAPKinase, matrix metallopreinases

### 서 론

인간은 나이가 들어갈수록 활성산소에 의한 조직 손상이 초래된다. 생체에 유해한 활성산소종에는 체내 효소계, 환원 대사 등에 의해 생성되는 일중항산소(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)나 superoxide(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)와 같은 free radical과 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)나 lipid peroxide(ROOH) 등으로서 이들은 분자 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 고분자의 생체 내 세포성분들을 공격하여 쉽게 산화적 스트레스의 환경을 조성하기도 하며[1], 과다하게 생성된 활성산소는 정상 세포막과 세포를 손상시키며 피부를 구성하는 콜라겐을 산화시켜 노화를 촉진하고 여러 가지 질병을 촉진시키는 것으로 알려져 있다[16]. Masaki 등[20]의 보고에 의하면, 산화적 스트레스는 피부가 자외선에 노출되었을 때,

세포가 반응하는 신호전달 체계를 작동시키고 과산화수소 등의 활성 산소종의 발생을 증가시키며, 항산화 효소의 발현을 감소시킨다.

피부에서 세포외기질(extracellular matrix)의 주요 구성 성분인 콜라겐(collagen)은 피부에 강도와 장력을 주며 진피의 90%를 차지하고 있다. 콜라겐의 주요 구성 단백질은 collagen type-I이 대부분을 차지하며 collagen-type II, fibronectin, integrin, fibrillin, 프로테로글리칸 등이 존재한다[10]. 세포외기질을 파괴하는 단백질 분해 효소는 세린 단백질 분해 효소, 시스틴 단백질 분해 효소, matrix metalloproteinase (MMP)로 나눌 수 있다[4]. MMP group은 collagease, gelatinase, stromelysin, membrane-type MMP로 나눌 수 있으며, 약 20여 종류가 알려져 있다[3]. 이 중 collagenase group에는 MMP-1, -8, -13이 포함되며, 주로 제 I형, II형, III형 콜라겐을 분해한다. Gelatinase group에는 MMP-2, -9이 포함되며, MMP-1에 의해 분해된 콜라겐 조각들을 더 잘게 분해해 피부 노화에 주요한 역할을 한다. Stromelysin group에는 MMP-3, -10, -11이 포함되며, 주로 제 IV형 콜라겐을 분해한다.[17]. MMP는 전구형으로 분비되어 세포의 활성화 과정을 거치게 된다. 이때 MMP-2가 MMP-9과 MMP-13을 활성화시킨다. 활성화된 MMP-13은

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-819-1430, Fax : +82-53-819-1430

E-mail : jtlee@dhu.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.

MMP-3을 활성화시킨다[6]. 이들 MMPs의 발현증가는 자외선 등과 같은 산화적 스트레스에 의해 유도되며, AP-1의 구성 단백질의 발현증가와 일치하는 연구결과가 보고되었다[8]. Fanger 등[7]도 MMPs의 발현증가는 사람의 피부에 자외선을 조사한 후, 24시간 이내에 collagen의 분해도 증가한다는 결과를 보고하였다. 따라서 자외선 등과 같은 산화적 스트레스에 의한 피부 노출은 MAP (Mitogen Activated Protein) kinase 경로를 활성화시켜 AP-1의 발현을 유도하고 MMPs의 발현을 증가시켜 세포외기질을 분해하여 주름생성을 촉진시킨다고 할 수 있다. 즉 피부 주름을 예방하기 위해서는 세포외기질 분해효소인 MMPs의 작용을 억제시키고 collagen 합성을 증가시키는 것이 필요하다.

블랙초크베리로 불리는 아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 장미과(*Rosaceae*)에 속하는 베리류의 식물열매이며 원래는 북부 아메리카 지역에서 자생한다[27]. 이후 18세기에 유럽에 소개되어 재배된 블랙초크베리는 맛과 색과 향이 좋아 잼, 와인, 주스, 차로 사용하는 등 다양한 식자재로서의 이용 가치가 높다[26]. 주로 동유럽에서 재배되다가 국내에는 7~8년 전부터 블랙초크베리 씨앗을 들여와 일부 농가에서 재배 중에 있으며 토양적응성이 우수하고 재배가 간편하여 앞으로 생산량이 증가할 것으로 보고되고 있다. 블랙초크베리는 폴리페놀, 플라보노이드 등의 생리활성 물질의 함량이 우수하여[13, 25] 항산화 효과, 위보호 효과[21], 항염증 효과[23], 항당뇨 효과[15], 면역조절 기능활성[14] 등 다양한 생리적 기능이 있는 것으로 알려져 있다.

우리나라에서도 블랙초크베리에 대한 관심이 높아지면서 현재 국내 재배가 성공한 상태로, 고부가가치 작물로 생산이 증가하고 있으므로 이를 활용할 만한 기술개발이 시급한데 반해 아직까지 블랙초크베리의 주름생성 억제 효능에 관한 분자생물학적 pathway를 검증한 보고는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 재배한 블랙초크베리의 주름억제 효과에 대한 분자생물학적 활성 분석을 통하여 해외 수입에 의존하지 않고 국내에서 생산되는 과실을 원료로 한 식품 및 화장품 소재로서의 활용 가치를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

세포 배양을 위해 CCRF S-180II cell은 Korean Cell Line Bank (KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였고, Dulbecco's Modified Eagle 11 Medium (DMEM), Fetal bovine serum(FBS), Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL Co., Grand Island, NY., USA), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), acrylamide와 N,N'-bis-methylene-acrylamide는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다.

항체인 p38, p-p38, JNK, p-JNK, ERK, p-ERK, c-JUN, p-c-JUN, c-Fos, AP-1, MMP-1, MMP-3, MMP-9, Procollagen type I,  $\beta$ -actin monoclonal antibodies과 secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 기기로는 UV/vis spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), ELISA (Biotek Co., USA), Incubator (Hanbeak Co., Korea), Low incubator (Hanbeak Co., Korea), Hotplate (Young hanna Tech., Korea)를 사용하였고, CCD camera system EZ-Capture II와 CS analyzer ver. 3.00 software (ATTO & Rise Co., Japan)를 이용하여 농도계측 분석을 위한 자료를 얻었다.

### 시료의 추출

본 실험에 사용한 블랙초크베리는 대구시 동구 각산동 소재의 초례봉 아로니아 농장에서 구입하였고, 시료 중량의 10배의 70% 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상정액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 추출물은 여과, 감압농축 후 동결건조하여 분말을 얻었으며, 에탄올 추출물의 극성차를 이용하여 서로 다른 용매를 첨가하여 분획을 실시하였다. 블랙초크베리 에탄올 추출물을 중량의 10배의 증류수에 녹인 후, 동량의 n-hexane, ethyl acetate, n-butanol을 순차적으로 첨가하여 각 3반복한 후 상층액을 얻었으며, 최종 남은 용액은 water layer로 하였다. 이들 분획물을 감압 농축 후 동결건조 하였으며, 냉장보관하며 실험에 사용하였다.

### Collagenase 저해 활성

Collagenase 저해활성 측정은 Wünsch 등[28]의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 반응구는 0.1M tris-HCl buffer (pH7.5)에 4mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/ml)를 녹인 기질액 0.25 ml 및 시료용액 0.1ml의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/ml) 0.15 ml를 첨가하여 실온에서 20분간 정지한 후 6% citric acid 0.5 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 ml를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 세포의 배양

Mouse 유래 fibroblast cell line인 CCRFS-180II cell은 10% FBS와 penicillin/streptomycin 100 unit/ml이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 2-3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

### 세포내 Reactive oxygen species (ROS) 생성 측정

CCRF S-180II cell을 2×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 부유시켜

96well plate에 분주하여 24시간 동안 incubation 하였다. 배지를 제거하고 20 μM DCFH-DA를 90 μl를 처리한 후 20분간 배양하고, 블랙초크베리 분획물을 농도별로 선 처리한 후 1시간 동안 배양하였고, DCFH-DA를 제거한 후, PBS로 3번 washing 하고 나서, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM, 100 μl 씩을 처치하고 30분간 다시 배양한 후 형광도를 측정하였다. DCF 형광도는 excitation 485 nm, emission 530 nm의 파장에서 Wallac 1420 VICTOR3 multi-label counter (PerkinElmer Life Science, Turku, Finland)로 측정하였다.

**MTT assay**

세포 생존율 측정은 Mosmann [22]의 방법에 따라 측정하였다. CCRF S-180II cell을 24well plate에 2×10<sup>5</sup> cells/well이 되게 1.8 ml 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.2 ml 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.2 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 상층액을 제거하고, 형성된 formazan에 각 well당 1 ml의 DMSO 용액을 가하여 실온에서 차광하여 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Western blot을 통한 단백질의 발현 측정**

단백질의 발현을 보기 위하여 CCRF S-180II cell을 96well culture plate에 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처치하고 일정시간 배양 후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척하였다. Cell lysate으로 Bradford assay 방법으로 단백질 정량하여 10 μl의 단백질을 10%의 SDS-PAGE에서 전기 영동하여 분리하여 원하는 부위의 gel을 잘라 3시간 동안 PVDF membrane에 옮긴 다음 4℃에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 incubation하였다. 1차 항체를 희석하여 4℃에서 overnight 한 다음, 다시 30분 간격으로 TBST로 3회 washing하고 각각의 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 3회 washing 한 뒤 Western imaging system 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

**통계처리**

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS software package (Version 22.0)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 ANOVA를 이용하여 유의성을 확인한 후, p<0.05 수준에서 Duncan's multiple test를 이용하여 분석하였다.

**결 과**

**Collagenase 저해 활성 결과**

Collagen은 피부에서 탄력과 결합에 중요한 역할을 하고

있는데 트립신과 같은 단백질 분해효소의 작용을 받지 않고 collagenase에 의해 분해된다[7]. 따라서 collagenase는 세포외 기질 단백질을 분해하는 효소로 피부의 주름생성을 촉진시키는 요인이 된다.

블랙초크베리의 70% 에탄올 추출물(A70)과 분획물에 대한 collagenase 저해 측정 결과는 다음과 같다(Fig. 1). 500 μg/ml의 농도에서, A70은 약 49.8%의 저해효과를 보였으며 AE의 경우는 77.2%이상의 높은 저해효능을 나타내었고, positive control인 EGCG가 500 μg/ml의 농도에서 83.9% 저해효능을 보이는 것과 비교하여 매우 유의할 만한 결과이다. 이는 Lee [19] 등의 연구에서, 청다래 에탄올추출물이 500 μg/ml에서 약 90%의 저해활성을 보인 것과 비교해서 유의할 만한 결과임을 확인할 수 있었다.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 유도된 세포의 Reactive Oxygen Species 생성 소거 결과**

DCFH-DA는 쉽게 세포막을 뚫고 세포 안으로 확산되어 세포 안의 esterase에 의해 형광을 잃은 DCFH로 가수분해 되고, 이후 ROS가 존재하는 환경에서 높은 형광을 띠는 DCF로 빠르게 산화된다. 따라서 DCF의 형광 강도는 세포 안의 ROS의 양과 비례한다.

블랙초크베리 분획물에 대한 ROS 실험결과는 다음과 같았다(Fig. 2). 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처치 후 ROS의 생성수준은 AE가 농도 의존적으로 활성산소를 감소시켰으며, 75 μg/ml의 농도에서 약 70%로 가장 낮은 활성산소가 생성되었다. Lee [18] 등의 연구에서, HaCaT cell에 UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>를 조사한 후 블랙초크베리 500 μg/ml의 농도에서 약 40%의 ROS가 생성되었다고 보고도 있으며, Hwang [12] 등의 연구에서, 300 μM

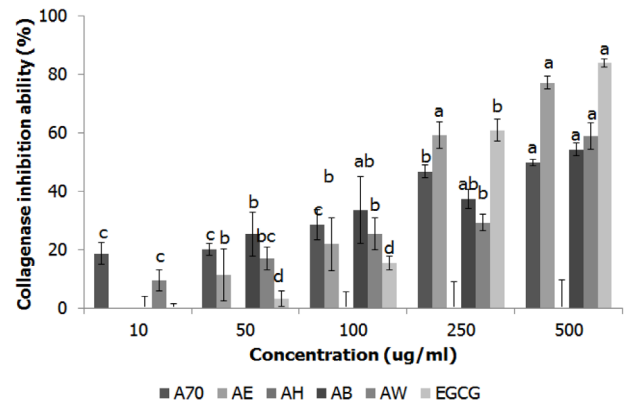


Fig. 1. Collagenase inhibition ability of *Aronia melanocarpa* extracts. A70:70% Ethanol extract of *A.melanocarpa*, AH:n-Hexane fraction of *A.melanocarpa*, AE:Ethyl acetate fraction of *A.melanocarpa*, AB:n-Butanol fraction of *A.melanocarpa*, AW:Water fraction of *A.melanocarpa*, EGCG: Epigallocatechin gallate (Positive control), Results are means ± S.D. of triplicate data.

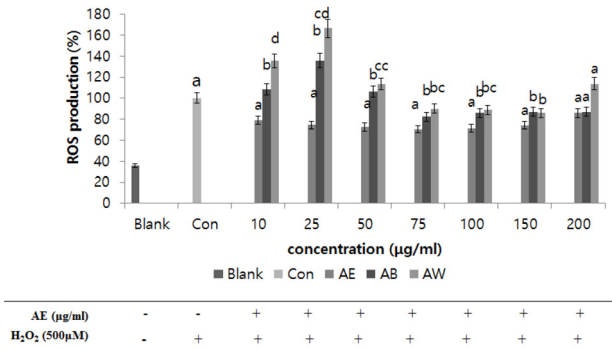


Fig. 2. Reactive oxygen species ability of *Aronia melanocarpa* extracts. The cells were treated for 24 hr with the indicated concentrations of *Aronia melanocarpa* fractions. AE:Ethyl acetate fraction of *A.melanocarpa*, AB:n-Butanol fraction of *A.melanocarpa*, AW:Water fraction of *A. melanocarpa*, Results are means ± S.D. of triplicate data.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 투여 후 천년초 추출물 처리시 열수추출물 50 μg/ml의 농도에서 ROS가 약 50% 정도 생성되었다고 보고한 것과 비교하여 유의할 만한 결과였다.

**세포 생존율 측정 결과**

Yellow tetrazolium salt MTT는 담황색 기질로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 reductase에 의해 환원되어 formazan을 생성하는데 죽어있는 세포에서는 형성되지 않고 살아있는 세포의 수가 많을수록 formazan의 생성도 많아지고 세포의 성장을 측정할 수 있다[11].

AE의 세포 생존율을 확인한 결과, Fig. 3에서 보여준 바와 같이 75 μg/ml의 농도에서 84.3%의 생존율을 확인할 수 있었고, 그 이상의 농도에서도 생존율은 80% 이하로 떨어지지 않았다. 그리고 Fig. 4의 경우, 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 농도별로 자극을 주었을 때 500 μM의 농도에서 생존율이 80% 이하로 낮아졌

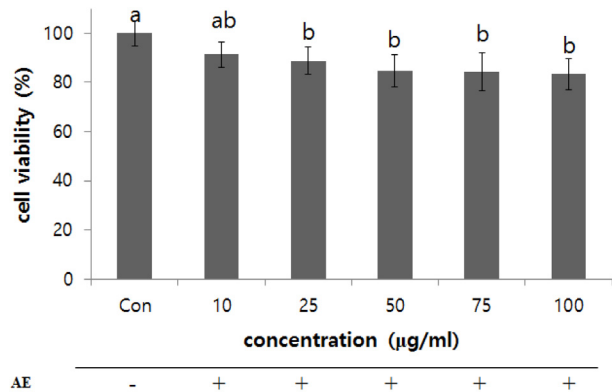


Fig. 3. Cell viability assay on CCRF S-180 II cells from ethyl acetate fraction of *A. melanocarpa*. The cells were treated for 24 hr with the indicated concentrations of *Aronia melanocarpa* ethyl acetate fraction.

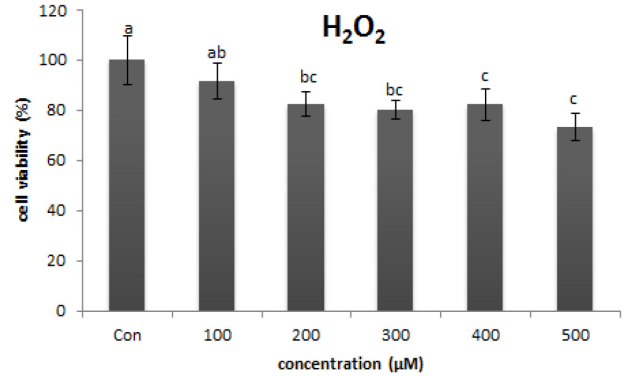


Fig. 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced-cell viability assay on CCRF S-180 II cells. The cells were treated for 24 hr before treatment with indicated concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hr.

다. 따라서 Fig. 5는 세포에 AE를 처치하고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM을 유도한 결과, 샘플의 농도의존적으로 세포 생존율이 증가하였다.

**Pro-collagen type I 생성 및 MMPs 발현 억제**

진피의 90%를 차지하고 있는 콜라겐은 collagen type I, II, III, IV 그리고 V가 있으며, 세포 내에서 pro-collagen이라는 전구물질로 합성된 후 세포 외로 분비되어 collagen 섬유로 중합된다. 이 중 주요 구조 단백질은 collagen type I이 대부분이다[10]. 세포외기질을 분해하는 단백질 분해효소인 MMP group에는 약 20여 종이 있으며, collagen group (MMP-1, -8, -13), gelatinase group (MMP-2, -9), stromelysin group (MMP-3, -10, -11)이 있다[3]. 그 중 MMP-1은 주로 type I, III형을 분해하는 collagenase이고 MMP-3은 collagen type IV를 특이적으로 분해하고 pro-MMP-1을 활성화시키며 MMP-9은 gelatinase B로 collagenase에 의해 분해된 산물을 더 작게 가수분해한다[8]. 여기서는 MMP-1, -3, -9의 발현억제와 pro-collagen type I의 생성을 확인하였고, 결과는 다음과 같다(Fig. 6). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 자극을 준 세포에 AE를 첨가하였을 때 pro-collagen type I은 농도의존적으로 발현이 증가하였고, MMP-1, -3, -9은 농도의존적으로 발현이 억제되었다. 이는 활성산소인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 자극으로 인한 주름생성을 블랙초크베리가 억제한다고 볼 수 있다.

**MAPK의 발현 및 인산화 저해효과**

세포 내 신호전달계 중, MAPKs는 세포 활성물질의 생성 및 다양한 생물학적 기능을 조절한다. Pawson 등[24]은 일련의 MAPK의 활성화 과정은 AP-1의 연속적인 인산화로 이루어진다고 보고하였다. ERK의 인산화는 AP-1 단백질 중 c-Fos의 발현을 증가시키는데[9], Fig. 7에서 이러한 ERK, JNK 및 p-38의 인산화 결과를 나타내었다. AE는 ERK의 인산화를 농도의존적으로 억제하고 있으며, 이는 c-Fos의 발현을 억제해

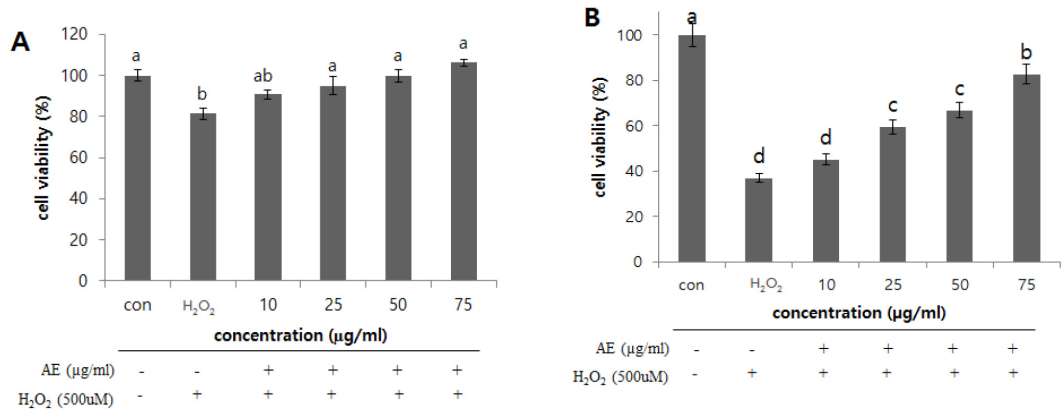


Fig. 5. Cell viability assay on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced CCRF S-180II cells from ethyl acetate fraction of *A.melanocarpa*. The cells were treated for 24 hr with the indicated concentrations of *A.melanocarpa* ethyl acetate fraction before treatment with 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for (A) 24 hr and (B) 48 hr.

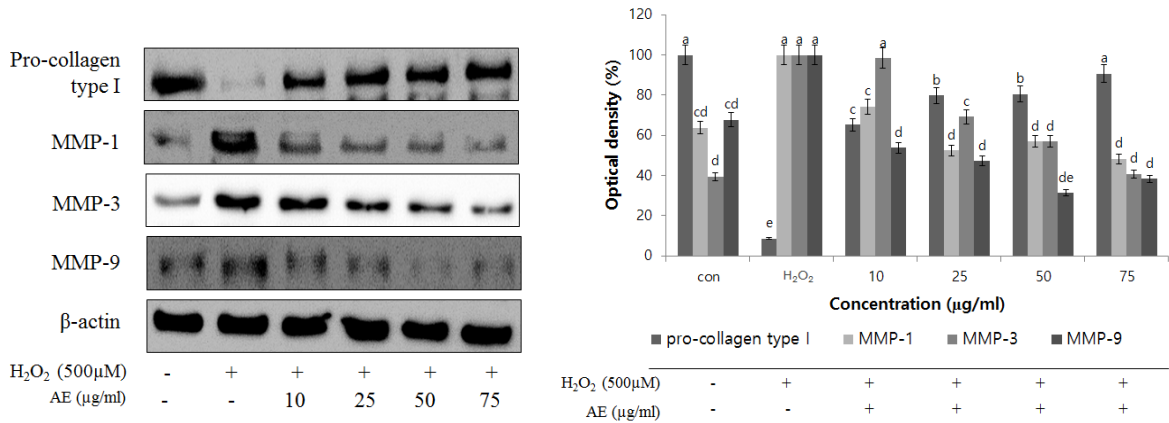


Fig. 6. Expression levels of pro-collagen type I and MMPs on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced CCRF S-180II cells from ethyl acetate fraction of *A.melanocarpa*. The cells were treated for 24 hr with the indicated concentrations of *Aronia melanocarpa* ethyl acetate fraction before treatment with 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hr and subjected to Western blot analysis using phospho-specific antibodies to MMP-1, -3, -9, and pro-collagen type I. Bands are representative of three or four experiments. The percentage indicated the MMP-1, -3, -9 ratios relative to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and the pro-collagen type I ratio relative to the control condition.

줄 것으로 기대할 수 있다. 또한 JNK의 발현과 인산화를 농도의존적으로 억제하고 있음을 알 수 있다. 그리고 p38의 인산화를 농도의존적으로 억제하고 있으며, 이는 c-Jun의 활성화로 이어지므로 p-c-Jun의 감소를 예상할 수 있다.

**AP-1의 발현 및 인산화 저해효과**

AP-1은 Jun과 Fos family 단백질로 이루어진 전사인자로 c-Jun과 c-Fos의 heterodimer 형태로 존재할 때 전사활성이 가장 높다[5]. 자극을 받지 않은 상태에서는 c-Fos와 JunD의 이합체로 존재하나, 자외선이나 여러 자극 등에 의하여 c-Jun과 c-Fos 단백질의 발현이 증가하게 되고 c-Jun은 JNK와 p38에 의한 인산화에 의하여 활성화된다[9]. 이렇게 증가한 c-Jun은 최소 24시간 동안 지속되며 c-Fos와 이합체를 형성한다[2].

AP-1은 세포의 성장과 분화에 관련되는 많은 유전자의 발현을 조절하고 몇몇 MMPs의 발현을 강력히 조절한다.

AE는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 유도된 CCRF S-180II cell에서 c-Fos의 발현을 유의하게 감소시켰으며, 특히 50 µg/ml의 농도에서 약 41.2%의 저해효과를 보였다. 또한 c-Jun의 인산화 및 AP-1의 발현도 10, 25 µg/ml의 농도에서는 증가하였으나, 50 µg/ml 농도부터는 유의한 감소효과를 보였다. 이상의 결과를 통하여, AE는 AP-1 family의 발현 및 인산화를 억제시켰으며, 이러한 결과는 MMPs의 발현을 억제시키는 작용을 한 것으로 보인다(Fig. 8).

**결론 및 고찰**

생체내 ROS의 형성이 증가된 상태인 산화적 스트레스에

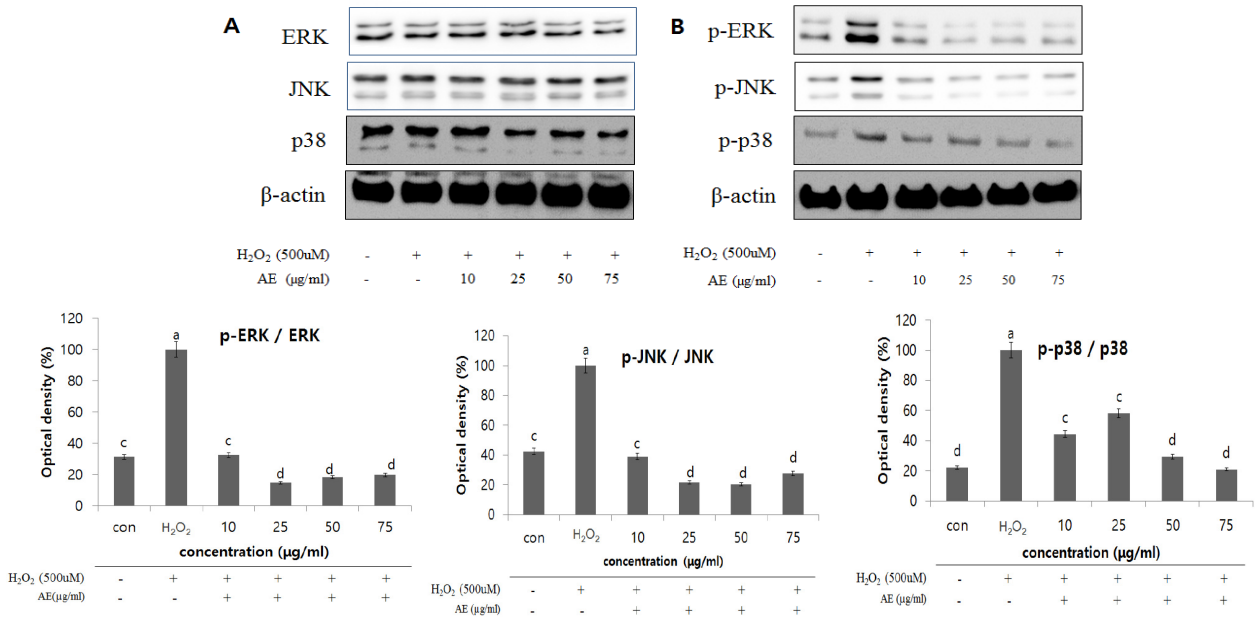


Fig. 7. Effects of MAPK expression on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated CCRF S-180 II cells from ethyl acetate fraction of *A.melanocarpa*. The cells were treated for 24 hr with the indicated concentrations of *Aronia melanocarpa* ethyl acetate fraction before treatment with 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 hr and subjected to Western blot analysis using (B) phospho-specific antibodies to (A) ERK, JNK, and p38. Bands are representative of three or four experiments. The percentage indicated the p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, and p-p38/p38 ratios relative to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.

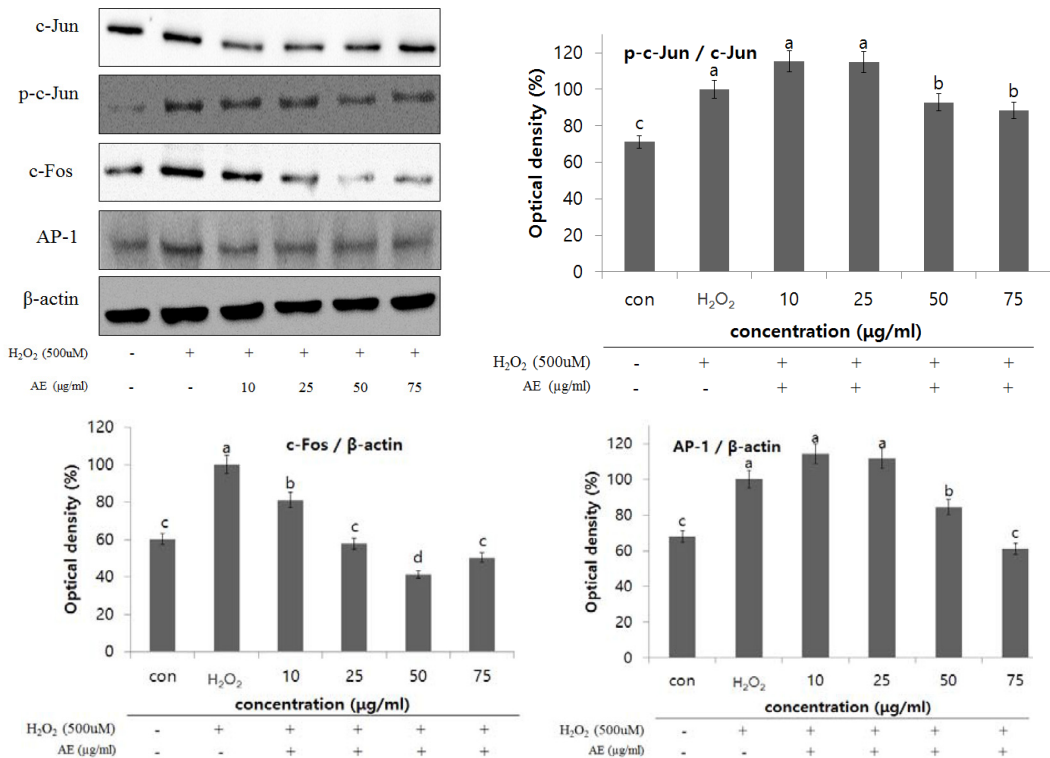


Fig. 8. Effects of AP-1 expression on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated CCRF S-180 II cells from ethyl acetate fraction of *A.melanocarpa*. The cells were treated for 24 hr with the indicated concentrations of *Aronia melanocarpa* ethyl acetate fraction before treatment with 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1hr and subjected to Western blot analysis using primary antibodies raised against c-Jun, p-c-Jun, c-Fos, and AP-1. β-actin was used as an intrnal control. Bands are representative of three or four experiments. The percentage indicated the p-c-Jun/c-Jun, c-Fos/β-actin, AP-1/β-actin ratios relative to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.

의해 세포내 구성성분이 단백질, 지질 및 DNA 성분이 기능적으로 손상되어 생체기능을 저하시키며, 다양한 질환의 원인으로 보고되고 있다[26]. 활성산소는 세포 내 MAPK family를 자극하여 발현 및 인산화를 유도하게 되고 이들은 다시 AP-1을 활성화시켜 결국 MMPs가 발현되도록 자극하게 된다[2]. 그 결과 피부는 주름 형성 및 처짐 등의 노화가 촉진되게 된다. 산화적 스트레스를 유발하는 여러 활성산소들 가운데 하나인 과산화수소를 세포에 유도하여 블랙초크베리 에틸아세테이트 분획물이 주름형성을 유발하는 효소인 MMPs와 그 up-stream pathway인 ERK, JNK 및 p38의 인산화, 그리고 AP-1 family의 인산화 및 발현을 얼마나 저해하는지를 확인하여 그 분자생물학적 메카니즘을 알아보고자 하였다.

국내산 블랙초크베리 추출물 및 분획물을 이용하여 collagenase 저해활성 실험과 ROS assay를 한 결과, AE가 500 µg/ml의 농도에서 약 77.2%의 collagenase를 저해하였으며, 이는 positive control인 EGCG가 같은 농도에서 약 83.9%의 저해효과를 보인 것과 비교해서 유의할만한 결과였다. 그리고 ROS assay 결과, AE가 75 µg/ml의 농도에서 70.4%의 ROS 생성을 보였으며 농도의존적으로 ROS의 생성을 감소시켰다. 따라서 주름억제 분자생물학적 검증을 위해 AE를 10, 25, 50, 75 µg/ml의 농도로 mouse 유래 fibroblast cell인 CCRF S-180II cell에 처치하였고, 여기에 활성산소인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM을 유도하여 발현되는 단백질 양을 분석하였다. 그 결과 농도의존적으로 p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, p-p38/p38의 인산화를 억제하였으며, 또한 p-c-Fos/c-Fos의 인산화를 저해하였고 c-Jun 및 AP-1의 발현 또한 유의적으로 억제하였다.

이상의 결과를 바탕으로 블랙초크베리 에틸아세테이트 분획물을 주름억제 효과가 있는 기능성 화장품 및 식품의 원료로서의 개발 가능성을 기대할 수 있다.

### 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부에서 지원하는 2014년도 지역특화산업육성사업(과제번호 : R0002972)과 환경부에서 지원하는 2015년도 환경산업선진화기술개발사업(과제번호 : 2015-000150005)의 연구수행으로 진행되었습니다.

### References

1. Ahmad, S. 1995. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology, pp. 211-214, Chapman & Hall, New York. USA.
2. Angel, P. and Karin, M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1072**, 129-157.
3. Brinckerhoff, C. E., Rutter, J. L. and Benbow, U. 2000. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **6**, 4823-4830.
4. Charous, S. J., Stricklin, G. P., Nanney, L. B. and Burkey,

- B. B. 1997. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oto Rhino.* **106**, 271-278
5. Chen, C. C., Mo, F. E. and Lau, L. F. 2001. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**, 47329-47337.
6. Curran, S. and Murray, G. 1999. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *J. Pathol.* **189**, 300-308.
7. Fanger, G. R., Johnson, N. L. and Johnson, G. L. 1997. MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with ac/Cdc42. *EMBO J.* **16**, 4961-4972.
8. Fisher, G. J., Datta, S., Talwar, H. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J. J. 1996. Molecular basis of sun-induced premature ageing and retinoid antagonism. *Nature* **379**, 335-339.
9. Fisher, G. J., Talwar, H. S., Lin, J. Y., Lin, P. P., McPhillips, F., Wang, Z. Q., Li, X. Y., Wan, Y. S., Kang, S. and Voorhees, J. J. 1998. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **101**, 1432-1440.
10. Fisher, G. J., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J. J. 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1419-1428.
11. Gross, J. and Lapiere, C. M. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 1197-1204.
12. Hwang, H. J., Jung, B. M. and Kim, M. H. 2011. ROS scavenging effect and cell viability of *Opuntia humifusa* extract on Osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Life Sci.* **21**, 1752-1760.
13. Jakobek, L., Drenjan, evi. M., Juki, V. and Šeruga, M. 2012. Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of "Nero", "Viking", "Galicianka" and wild chokeberries. *Scientia Horticulturae.* **147**, 56-63.
14. Jayaprakasha, G. K., Jaganmohan, Rao. L. and Sakariak, K. K. 2004. Antioxidant activities of flavidin in different *in vitro* moder system. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 5141-5146.
15. Jankowski, A., Niedworok, J. and Jankowska, B. 1999. The influence of aronia melanocarpa elliot on experimental diabetes in the rats. *Herba Polonica.* **45**, 345-353.
16. Jeppsson, N. and Johansson, R. 2000. Changes in fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) during maturation. *J. Hort. Sci. Biotech.* **75**, 340-345.
17. Kusakawa, J., Harada, H., Shima, I., Sasaguri, Y., Kameyama, T. and Morimatsu, M. 1996. The significance of epithelial growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer* **32B**, 217-221.
18. Lee, S. J., Choi, H. R., Lee, J. C., Park, H. j., Lee, H. K., Jeong, J. T. and Lee, T. B. 2014. The anti-aging effects of various berries in the human skin keratinocyte (HaCaT) cells. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **46**, 198-204.
19. Lee, S. Y. and Lee, J. Y. 2013. Inhibitory efficacy of *Smilax china* L. on pro-collagen type-1 activity and MMP-1 gene expression in fibroblasts (CCD-986sk). *J. Life Sci.* **23**,

- 1239-1245.
20. Masaki, H., Atsumi, T. and Sakurai, H. 1995. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**, 474-479.
  21. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. and Remacle, J. 1994. Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **17**, 235-248.
  22. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
  23. Niedworok, J., Jankowska, B., Kowalczyk, E., Charyk, K. and Kubat, Z. 1997. Antiulcer activity of anthocyanin from *Aronia melanocarpa* Elliot. *Herba Polonica.* **43**, 222-227.
  24. Pawson, T. and Scott, J. D. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**, 2075-2080.
  25. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Review article. *Free Rad. Biol. Med.* **20**, 933-956.
  26. Steinberg, D. 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* **272**, 2963-2966.
  27. Sueiro, L., Yousef, G. G., Seigler, D., De, Mejia. E. G., Grace, M. H. and Lila, M. A. 2006. Chemopreventive potential of flavonoid extracts from plantation-bred and wild *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) fruits. *J. Food Sci.* **71**, C480-C488.
  28. Wünsch, E. and Heindrich, H. G. Zur. 1963. Quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* **333**, 149-151.

#### 초록 : 블랙초크베리 분획물로부터의 주름억제 효과에 대한 작용기전

최은영<sup>1</sup> · 김은희<sup>1</sup> · 이재봉<sup>1</sup> · 도은주<sup>2</sup> · 김상진<sup>3</sup> · 김세현<sup>4</sup> · 박정열<sup>5</sup> · 이진태<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>대구한대학교 화장품약리학과, <sup>2</sup>(재)대구테크노파크 한방산업지원센터, <sup>3</sup>대전보건대학교 화장품과학과, <sup>4</sup>국립산림과학원 산림유전자원부, <sup>5</sup>한밭대학교 산학협력단)

학명이 *Aronia melanocarpa*인 블랙초크베리는 항산화, 항염증, 항암 효능이 뛰어난 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 블랙초크베리에 대한 collagenase inhibition effects와 산화적 스트레스에 유도된 matrix metalloproteinase (MMP), MAPkinase 그리고 AP-1의 발현 그리고/또는 인산화와 같은 분자생물학적 메커니즘을 조사하였다. Collagenase inhibition 효과는 블랙초크베리 에틸아세테이트 분획물(AE)이 500 µg/ml의 농도에서 77.2% 이상의 저해효능을 나타내었고 이는 대조군인 Epigallocatechin gallate의 결과(500 µg/ml에서 83.9%)와 비교해서 유의할 만한 결과였다. Reactive oxygen species (ROS) assay는 AE에서 가장 농도의존적으로 ROS 생성이 감소되었고, 75 µg/ml의 농도에서 약 70%로 가장 낮은 활성산소가 생성되었다. MTT assay 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 유도된 CCRF 세포에 AE를 처리하였을 때 농도의존적으로 세포 생존율이 증가하였다. 그리고 특히, AE는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 유도된 CCRF 세포에서의 MMPs (MMP-1, -3 그리고 -9), MAPK (ERK, JNK 그리고 p38) 그리고 AP-1 (c-Fos와 c-Jun)의 발현과 인산화를 억제하였고, pro-collagen type I의 발현은 증가시켰다. 따라서 블랙초크베리 에틸아세테이트 분획물은 주름억제 및 콜라겐 생성의 효능이 있으며 기능성 식품 및 화장품 소재 개발 산업에서의 응용이 가능할 것으로 기대된다.