

## Anti-wrinkle and Whitening Effects of Essential Oil from *Abies koreana*

Byeong-Wook Song<sup>1†</sup>, Min-Jeong Song<sup>2†</sup>, Mi-Jin Park<sup>3</sup>, Don-Ha Choi<sup>3</sup>, Sung-Suk Lee<sup>3</sup>, Myungkil Kim<sup>3</sup>, Ki-Chul Hwang<sup>2\*</sup> and Il-Kwon Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Convergence Science, College of Medicine, Catholic Kwandong University, Gangneung-si, Gangwon-do 25601, Korea

<sup>2</sup>Institute for Bio-Medical Convergence, College of Medicine, Catholic Kwandong University, Gangneung-si, Gangwon-do 25601, Korea

<sup>3</sup>Division of Wood Chemistry & Microbiology, Department of Forest Products, National Institute of Forest Science, Seoul 02455, Korea

Received January 3, 2018 / Revised February 13, 2018 / Accepted February 23, 2018

The essential oil from *Abies koreana* E.H. Wilson had been developed, however, its efficacy has not yet been studied especially in terms of skin care research. The aim of this study is to investigate the effects of *Abies koreana* extracts (AKE) on melanogenesis and wrinkle formation in B16F10 melanoma cells (B16F10) and human dermal fibroblast cell line (HDF). The essential oil was extracted by hydro-distillation method and purified by anhydrous sodium sulfate. At a concentration of 10<sup>-5</sup>-fold, viability in these cells had been defined by cytotoxicity assays. Anti-melanogenic effects on B16F10 were evaluated using tyrosinase inhibition assay, and real-time PCR for verifying gene expression of tyrosinase, tyrosinase related protein-1 and -2 (TRP-1 and -2). AKEs reduced about 5-fold of tyrosinase inhibitory activity compared to  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)-induced group and about 30% reduction compared to Arbutin induced group. The mRNA levels of three melanin-related factors were increased, separately. To investigate the effects of anti-wrinkle, procollagen type I c peptide synthesis assay (PIP) and Western blot were performed. At AKE-treated group, PIP was up-regulated and the expression of collagen type 1 and matrix metalloproteinase (MMP)-1 were improved. Furthermore, AKE presented anti-wrinkle effects by increasing UVB-inhibited collagen type 1 expression, and reducing UVB-induced MMP-1 production at 60 mJ/cm<sup>2</sup> of UVB radiation. Therefore, *Abies koreana* extracts has potentials as a safe and an effective skin ingredient for whitening and anti-wrinkle.

**Key words** : *Abies koreana* WILS, anti-wrinkle, skin, whitening

### 서론

소나무과 전나무속에 속하는 구상나무(*Abies koreana* E.H. Wilson)는 고산수종으로 약 500~1,500 m의 고지대에 자생한다. 구상나무는 희귀식물로서 세계자연보존연맹(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN)의 희귀 및 멸종위기 식물의 분류범주에 약관심종(Near threatened)으로 등재되어 있으며, 주로 수목의 생육환경, 분포, 형태적 형질과 관련된 분류학적 연구, 재배 육종에 관한 연구가 주로 이루어져 있다[18].

구상나무에 대한 화학적 성분이나 생리활성에 대한 연구 자료는 많지 않으나, 구상나무 잎에 리그난 뿐만 아니라[10],

$\alpha$ -pinene, camphene, limonene, bornyl acetate, borneol과 같은 여러 monoterpene류의 물질과 페놀성 화합물이 함유되어 있으며[20, 24], monoterpene으로 구성된 구상나무 잎 정유가 피부병원균이나 *E. coli*, MRSA (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) 등의 다양한 미생물에 활성을 가지고 있다고 알려져 있다[5, 25]. 또한 구상나무 잎 추출물은 nitric oxide의 생성이나 암세포에 대한 억제효과나[19] 민간요법에서 소화불량, 혈관 및 폐질환에 효과가 있다고 보고되어 있다[24]. 이와 같이 다양한 효능이 밝혀지고 있지만 구상나무를 이용하여 피부와 연관된 미백 또는 주름 개선 연구 등은 알려진 바 없다.

자연적 노화 또는 자외선에 의한 외부 노화는 피부 세포 활성화 기능을 저하시키고 항상성과 재생을 조절하는 단백질 생합성을 저하시킴으로 유도된다[20, 24]. 첫째, 피부에 자외선을 받으면 색소침착이 유도되는데 이는 자외선 흡수에 의한 피부 세포의 손상을 억제할 목적으로 멜라닌(Melanin) 생성이 증가된 결과이다. 멜라닌은 피부와 머리카락의 색상을 조절하는 인자이며 과도한 멜라닌의 축적은 주근깨, 기미 등의 과색소 현상을 유발하고 피부노화를 촉진시킨다[14]. 멜라닌 합성은 멜라노사이트 내부에 있는 멜라노솜에서 일어나며, tyrosine을 기질로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)에 의해 흑갈색의 협력제인 멜라닌을 생성하게 된다[22]. 멜라닌 형성 조절인자로 잘

<sup>†</sup>Authors contributed equally.

\*Corresponding authors

Tel : +82-32-290-2765, Fax : +82-32-290-2774

E-mail : [ilkwonkim@empas.com](mailto:ilkwonkim@empas.com) (Il-Kwon Kim)

Tel : +82-32-290 3883, Fax : +82-32-290-2774

E-mail : [kchwang@cku.ac.kr](mailto:kchwang@cku.ac.kr) (Ki-Chul Hwang)

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.

알려진 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 tyrosinase에 결합하여 관련 효소들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[17]. 둘째, 자외선 유도에 의한 콜라겐 합성의 방해는 피부 주름을 유발시킨다. 콜라겐은 섬유아세포에서 합성되어 진피의 대부분을 차지하는 세포 외 기질의 주요성분으로 금속 단백질 분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)에 의해 분해되는 주요 기질 단백질이다. MMPs는 피부의 각질형성세포, 섬유아세포를 비롯한 많은 세포들로부터 분비되며, 현재까지 약 20여종 이상의 종류가 있는 것으로 알려져 있다. 이 중 MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, 콜라겐 type I과 III를 기질로 하고 있다[19]. Brenneisen 등의 연구에 의하면 자외선 조사와 활성 산소종에 의해 피부내의 MMPs 활성이 증가되어 진피층 내의 콜라겐 등과 같은 세포 외 기질들의 붕괴에 영향을 미치며, MMPs가 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다[18]. 따라서, 피부의 노화를 완화시키기 위해서는 멜라닌 억제 또는 콜라겐 합성을 촉진 할 수 있는 핵심 요소를 발굴하고 이를 조절 할 수 있는 물질을 찾는 것이 중요하다고 볼 수 있다.

이에 본 연구에서는 천연 소재인 구상나무 추출물(*Abies koreana* extract, AKE)에 대한 미백 및 주름개선 효능을 평가하였고, 피부노화에 효과적인 새로운 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 식물정유 추출

본 실험의 공시재료인 구상나무는 광릉수목원 내에서 채취한 잎을 사용하였다. 채취한 잎은 곧바로 4°C 이하에서 냉장 보관하였고, 잎과 잔가지를 분리한 후 잎만을 잘게 자른 후 정유 추출용 시료로 사용하였다.

정유(essential oil) 추출은 hydrodistillation 법으로 추출하였고, 10 l 둥근 플라스크에 1 kg의 잎과 증류수를 첨가하고 가열용 맨틀(MS-DM608 heating mantle, MTOPS®, Yangju, Korea)을 이용하여 가열하였으며, 가열 온도는 102±1°C로 설정하였다. 열에 의해 휘발된 증기는 냉각관에서 응축시킨 후 modified dean stark trap에서 수집하였고, 물과 정유가 응축되어 있는 트랩에서 물을 제거하여 정유를 얻었다. 얻은 정유는 anhydrous sodium sulfate를 사용하여 수분을 제거하고 0.45 µm 주사 필터를 이용하여 여과한 후 시험에 사용될 때까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

### 내부표준물질 용액 및 성분분석용 시료제조

내부표준물질로 n-heptanol과 n-tetradecanoate methyl ester를 사용하였다. 내부표준물질 용액은 100 µl n-heptanol과 n-tetradecanoate methyl ester를 메탄올과 디클로로메탄의 혼합액(3:1, v/v)에 녹여 100 ppm 농도로 제조하였다.

정유의 성분분석을 위해서 각 식물정유 20 µl를 취하여 내부표준물질 용액을 넣어 최종 5 ml 부피로 맞추어 균질화 한 후 분석에 사용되었다. 정성분석을 위한 표준물질은 내부표준용액으로 희석하여 1-1,000 ppm 수준의 농도가 되도록 하였다.

### 정성 및 정량 분석

정유 성분 분석은 GC/MS 장비(Trace 1310/ISQ-LT, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)로 수행하였다. 컬럼은 DB-5MS 모세관 컬럼(길이 60 m, 내부직경 0.25 mm, 코팅필름 두께 0.25 µm; Agilent, CA, USA)을 사용하였다. 1 µl의 시료를 250°C 주입구에 20:1 분할비로 주입하였으며 운반 가스는 헬륨으로 사용하였다. 오븐 온도는 최초 50°C에서 5분간 유지하고 10°C/min로 65°C까지 승온 후 30분 유지, 5°C/min로 120°C까지 승온 후 15분 유지, 1°C/min으로 140°C까지 승온 후 11분 유지, 10°C/min로 250°C까지 승온 후 5분 유지, 20°C/min으로 325°C까지 승온 후 6분 유지하였다.

화합물의 검출은 질량분석기로 하였고 인터페이스와 이온 소스의 온도는 250°C로 하였다. 질량 스펙트럼은 EI-positive 스캔 범위 35-550 m/z로 0.2 scans·s<sup>-1</sup>의 속도로 total-ion chromatogram (TIC)를 획득하였다.

시료에 존재하는 화합물들의 정량은 각 피크의 질량스펙트럼을 표준 라이브러리 및 표준물질의 것과 비교하여 정성한다음 내부표준물질 피크의 면적과 목적 화합물 피크의 면적비율과 농도간의 직선적 상관성을 이용한 내부표준물질 정량법을 통하여 정량 하였다.

시료에 존재하는 물질들 중 표준물질이 확보되지 않은 물질들의 정성은 시료의 TIC에서 S/N 비율 100 이상의 피크들의 질량스펙트럼을 NIST 11 (National Institute of Standards and Technology, MD, USA) mass spectral library와 비교하여 수행하였다. 이 때 NIST library-search 프로그램의 match 값이 가장 높은 것을 선택하여 monoterpene류와 sesquiterpene류를 중점적으로 확인하였고 피크들의 retention time (RT)와 비교 확인된 화합물명을 목록화하였다.

### 세포주 및 세포배양

미백과 관련된 연구에 사용된 세포는 B16F10 mouse melanoma 세포로 한국세포주연구재단(Seoul, Korea)에서 구입하였다. B16F10 mouse melanoma 세포는 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지로 각각 10% Fetal Bovine Serum (FBS)와 1% 항생제(penicillin-streptomycin)를 첨가하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 세포배양기에서 배양하였다.

항 주름과 관련된 연구에 사용한 세포는 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast, HDF) 세포로 CEF0BIO (Seoul, Korea)에서 구입하였다. HDF는 DMEM 배지로 각각 10% FBS와 1% 항생제를 첨가하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 세포배양기에서 배양하였다.

### 자외선 B 처리

배양접시에 담긴 배지를 제거한 후 PBS로 세척하고 plate의 덮개를 개방한 상태에서 UVB를 조사하였다. 이 때 자외선 B (Ultraviolet-B)는 UV-B lamp (Vilber Lourmat UV lamp, France)를 이용하여  $60 \text{ mJ/cm}^2$ 의 강도로 30분간 조사하였다.

### 세포 생존율 측정

B16F10 mouse melanoma 세포와 HDF 세포를 이용해 CCK-8 assay (Cell Counting Kit-8, Dojindo, Japan)를 통한 추출물에 대한 세포성장 억제 활성효과를 확인하였다. 세포를 96-well plate에 well 당 세포를  $1 \times 10^4$  씩 분주하고,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고, 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 적당한 농도로 희석한 식물정유를 well 당  $200 \mu\text{l}$  처리하여 48시간 동안 배양하였다. 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 2번 세척하여 제거한 후, 10% CCK-8 solution을 well 당  $100 \mu\text{l}$  처리하고 빛을 차단하여 90분 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 반응시켰다. Microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 450 nm에서 흡광값을 측정하여 세포의 생존율을 계산하였다.

### Tyrosinase 저해활성 측정

B16F10 mouse melanoma 세포주의 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 외의 연구자들의 방법[18]을 사용하였다. 6-well plate에 well 당 세포를  $3 \times 10^5$  개 분주하고,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고, 혈청이 포함되지 않은 배지로 2번 세척하고, 다시 혈청이 포함되지 않은 배지로  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 24시간 배양하였다. 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 적정 농도로 희석한 식물정유를 well 당 2 ml 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 Phosphate-buffered saline (PBS)로 2번 세척하고 세포만 마이크로튜브에 옮겨서 lysis buffer [0.1 M sodium phosphate (pH6.8), 1% Triton X-100]를 이용하여 세포를 용해하여 13,000 rpm, 25분 동안 원심분리하였다. 상층액으로 단백질 정량을 하여 각각의 샘플에 동일한 단백질 양( $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )과 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) buffer [2 mg/ml, 0.1M sodium phosphate (pH6.8), Sigma, MO, USA]  $180 \mu\text{l}$ 를 96-well plate에 넣고, 3시간 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 반응시켰다. Microplate reader로 405 nm에서 흡광값을 측정하여 계산하였다.

### Procollagen type-1 생합성 측정

HDF를 96-well plate에 well 당 세포를  $1 \times 10^4$  개를 분주하고,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고, 혈청이 포함되지 않은 배지로 2번 세척하고, 다시 혈청이 포함되지 않은 배지를 채워  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 24시간 배양하였다. 혈청이 포함되지 않

은 배지를 이용하여 적정 농도로 희석한 식물정유를 well 당  $200 \mu\text{l}$  처리하여 48시간 동안 배양하였다(양성 대조군; Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  5 ng/ml). 배양 후 배지를 모아 3,000 rpm, 3분 동안 원심분리하여 상층액을 얻어 실험에 사용하였다. 세포 배양액 내 콜라겐 생합성 정도는 procollagen type-I C peptide (PIP) EIA kit (Takara Bio, Japan)을 사용하여 propeptide의 양을 측정하였다.

### Western blot analysis

HDF를 60-mm dish에  $4 \times 10^5$  개 분주하고,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 24시간 배양하였다. 혈청이 포함되지 않은 배지로 2번 세척하고,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 24시간 배양하였다. 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 적정 농도로 희석한 식물정유를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS로 2번 세척하고 세포를 마이크로튜브에 옮겨 cell lysis buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH7.4), 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail (Roche, IN, USA)]를 사용하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 세포를 용해시켰다.

세포 용해액을 14,000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 30분 원심분리하여 단백질만 포함하고 있는 상층액만 얻어서 BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 정량하였다. 정량된  $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 단백질을 Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel (SDS-PAGE)에 전기영동시킨 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) 막으로 옮겨 실온에서 1시간 blocking buffer [5% skin milk in Tris Buffered Saline with Tween-20 (TBST)]에서 배양하였다. 1차 항체 중일 보관 후 TBST로 3회 세척하고, 2차 항체는 2시간 배양 후 TBST로 3회 세척하여 ECL detection reagents (AbClon, Seoul, Korea)를 이용하여 단백질 발현을 현상하였다.

### 전체 RNA 분리 및 cDNA 합성

60-mm dish에 B16F10 mouse melanoma 세포를  $8 \times 10^5$  개 분주하고,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 24시간 배양하였다. 혈청이 포함되지 않은 배지로 2번 세척,  $\alpha$ -MSH 250 nM를 먼저 처리하고 4시간 후에 적정 농도로 희석한 식물정유를 처리하여 48시간 동안 배양하였다.

배지를 제거 후 PBS로 세포를 2번 세척하고 TRIzol (Invitrogen, NY, USA)를 각 dish에  $500 \mu\text{l}$  분주하여 세포를 lysis한 후 chloroform  $200 \mu\text{l}$ 를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어 주었다. 그 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액  $200 \mu\text{l}$ 를 isopropanol  $300 \mu\text{l}$ 이 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였고, 상층액을 제거한 후 75% 에탄올-diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 1 ml 분주하여 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 뒤 상층액을 제거하고 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water (NFW)

를 20 µl 분주하여 녹인 후 RNA 양을 측정하였다.

Oligo (dT) 15 primer (500 µg/ml) 1 µl, 추출한 0.5 µg RNA 와 NFW 를 75°C에서 5 분간 반응시킨 후 5× reaction buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR nucleotide mix, ribonuclease inhibitor, reverse transcriptase (Reverse Transcription System, Promega, WI, USA)를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15 분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

**Real-time PCR**

합성한 cDNA 와 2× SYBR green mix (TaKaRa, Japan), primer (Bioneer, Daejeon, Korea), ROX (TaKaRa) 를 각각 넣어 ABI step one plus (Thermo Fisher Scientific) 기기를 이용하여 95°C 10분, 95°C 3초, 60°C 30초, 95°C 15초, 60°C 1분, 95°C 15초(45 cycles)로 실시간 정량 분석을 한 뒤 분석 프로그램을 이용하여 결과를 분석하였다.

Primer 정보는 다음과 같다. Tyrosinase forward 5'-GATG GGAATGCTCTGCCTAATA-3'; Tyrosinase reverse 5'-ACA GGTGTGAAGGTCTCAAAG-3'; TRP-1 forward 5'-GCCTTC TTTCTCCCTTCCTTAC-3'; TRP-1 reverse 5'-CTGCTGGTCT CCCTACATTTC-3'; TRP-2 forward 5'-GGCTGGAGCACTC TGTAAT-3'; TRP-2 reverse 5'-TGGGTTTAGTTCTAGCCC TTTC-3'; GAPDH forward 5'- AAGTCATCCCAGAGCT GAA- 3'; GAPDH reverse 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'.

**통계처리**

모든 실험은 3 회 반복하여 측정하였고, 결과의 유의성을 검정하기 위해 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 *p*<0.05 수준에서 Bonferroni correction을 실시하였으며, 그 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 이는 Prism (ver. 5.0, GraphPad Software, Inc., CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**B16F10 melanoma 및 HDF 생존에 미치는 구상나무 추출물의 영향**

구상나무 추출물이 피부 관련세포, 즉 미백과 연관된 B16F10 melanoma 및 주름과 연관된 HDF, 에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 농도에 따른 생존을 측정을 하였다. 이를 위하여 구상나무 추출물의 농도는 10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup>까지 10배수의 범위에서 처리하였다. 구상나무 추출물 10<sup>-5</sup>-10<sup>-6</sup>의 농도에서는 두 세포주 모두 약 90% 이상 세포생존율을 보이며 통계적 유의성을 나타냈다. Fig. 1A에서 나타내는데 B16F10 melanoma 의 경우 10<sup>-4</sup> 이상의 농도에서는 급격한 세포 독성을 나타내는 것을 알 수 있었으며, HDF 의 경우 10<sup>-4</sup> 이후의 농도에서 20% 이상의 세포 독성 유도를 나타내었다. 따라서 이 후의 실험은 구상나무 추출물 10<sup>-5</sup> 농도에서 진행하였다.

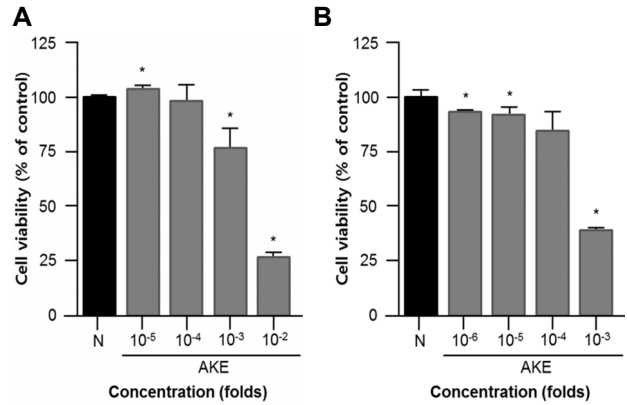


Fig. 1. Effect of *Abies koreana* extracts on cell viability. B16F10 melanoma (A) and HDF (B) were incubated with the indicated concentrations of *Abies koreana* extracts for 48 hr. The cell viability was assessed by the CCK-8 assay, and the results are represented as the percentage of surviving cells. Values represent the means ± SD of three independent experiments (\**p*<0.05 compared to the Normal (N)). HDF, human dermal fibroblast; CCK, cell counting kit; AKE, *Abies koreana* extracts.

**구상나무 추출물에 의한 B16F10 melanoma에서의 tyrosinase 저해 활성**

Tyrosinase는 흑갈색의 멜라닌 색소 생성에 관여하는 효소로써 tyrosinase 활성 억제제는 피부 내에서 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해한다고 알려져 있다[22]. 이러한 방법으로 구상나무 추출물의 tyrosinase 저해효과를 측정하여 Fig. 2A와 같이 분석하였다. 본 실험에는 음성대조군 Arbutin 1 mg/ml과 양성대조군 α-MSH 250 nM을 사용하였으며 처리 후 48시간 이후 tyrosinase inhibition 측정을 실시하였다. 정상군을 100%로 기준하였을 때 음성대조군은 약 2.1 배의 저해효과 억제를 보였으며, 양성대조군은 약 2.4 배의 저해효과 개선을 보였다. 이를 비교하였을 때 구상나무 추출물은 음성대조군 수준 이상인 약 2.8 배의 저해효과 억제를 보였고, 양성대조군과 비교하였을 경우에도 약 9.3배의 저해효과 억제를 보였다.

**구상나무 추출물 처리에 의한 멜라닌 합성에 관여하는 주요 mRNA 발현 조절**

피부에서 멜라닌은 효소반응을 통해 tyrosinase, TRP-1, 그리고 TRP-2로부터 합성된다. 이는 피부세포로부터 멜라닌 합성 정도를 확인 할 수 있는 세포 신호인자이다[17]. 구상나무 추출물이 멜라닌 합성 관련 유전자인 tyrosinase, TRP1, TRP2의 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해 Real-time PCR로 유전자 발현을 확인하였다. Fig. 3에서와 같이 구상나무 추출물은 α-MSH에 의해 증가된 Tyrosinase, TRP1, TRP2의 mRNA level을 확연히 감소시키는 것을 알 수 있다. 자세히 살펴보면, tyrosine의 경우 양성대조군 단독 처리에 비해 약 58% 정도

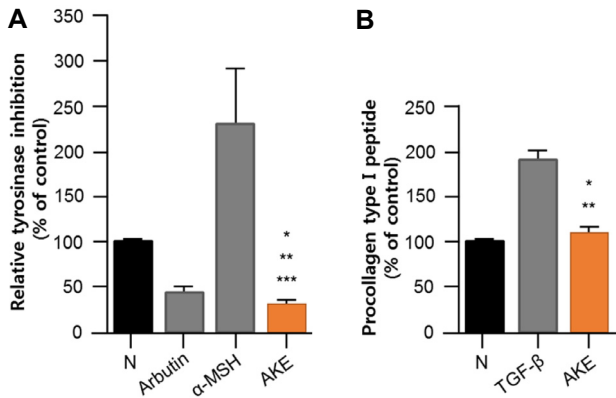


Fig. 2. Effects of *Abies koreana* extracts on whitening and anti-wrinkle process. AKE concentration was  $10^5$ . (A) Tyrosinase inhibition in B16F10 cells was analyzed using L-DOPA buffer. Negative control was 1 mg/ml arbutin, and positive control was 250 nM  $\alpha$ -MSH ( $*p < 0.05$  compared to the Normal (N),  $**p < 0.05$  compared to Arbutin,  $***p < 0.05$  compared to  $\alpha$ -MSH). (B) Detection of collagen biosynthesis in HDF cells was performed by PIP EIA kit. Positive control was 5 ng/ml TGF- $\beta$ . Values represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments ( $*p < 0.05$  compared to the Normal (N),  $**p < 0.05$  compared to TGF- $\beta$ ). AKE, *Abies koreana* extracts; L-DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine; MSH; melanocyte-stimulating hormone; TGF, Transforming growth factor.

발현이 감소하였고 음성대조군과 비슷한 수준으로 감소됨을 알 수 있다(Fig. 3A). TRP-1의 경우 양성대조군 단독 처리 대비 약 64% 감소를 보였고 음성대조군과 마찬가지로 비슷한 수준으로 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 3B). TRP-2의 경우 양성대조군 대비 발현을 60% 감소 및 음성대조군 보다는 1.4 배 발현 증가를 보였다(Fig. 3C). 따라서, 구상나무 추출물이 B16F10

melanoma 세포 내 신호를 조절하여 멜라닌 생성 억제에 효과를 보이는 것으로 사료된다.

**구상나무 추출물에 의한 HDF 세포에서의 콜라겐 관련 단백질 조절**

피부 주요성분인 콜라겐은 섬유아세포에서 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 구성하고 있다. 콜라겐의 농도에 따라 피부 세포간의 견고성, 지탱 능력, 세포 증식 및 분화에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[10]. 콜라겐의 부족 또는 결핍은 피부 주름을 유발하며 이는 propeptide의 감소로부터 야기된다[22]. 본 연구에서는 HDF 에서 콜라겐 생합성 증가를 확인할 수 있는 pro-collagen type I C-peptide (PIP) enzyme immunoassay를 실시하였다. 구상나무 추출물의 콜라겐 생합성량 결과 양성대조군인 TGF- $\beta$  처리에 의한 생합성 보다는 낮지만 정상군 보다는 약 12% 개선된 PICP 생합성량을 보였다(Fig. 2B). 또한, 구상나무 추출물 처리에 의해 HDF 에서 collagen type 1 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 구상나무 추출물을 HDF 세포에 처리하고 48시간 뒤 면역 분석을 시행하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 collagen type 1의 단백질 발현이 정상군에 비해 약 2.3 배 증가함을 알 수 있었다.

콜라겐은 collagenase에 의해 분해가 되는데 이는 전사인자인 AP-1에 의해 유도되는 MMP-1에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다. MMP-1은 collagenase type 1으로 알려져 있으며 이의 감소는 collagen type 1이 분해되지 않음을 시사하는 것이다[16, 25]. Fig. 4B에서 보는 바와 같이, MMP-1의 발현이 정상군 대비 약 15% 정도 감소한 것으로 보아 구상나무가 피부 섬유아세포의 콜라겐을 증가시키는 과정을 개선시키는 것을 알 수 있다.

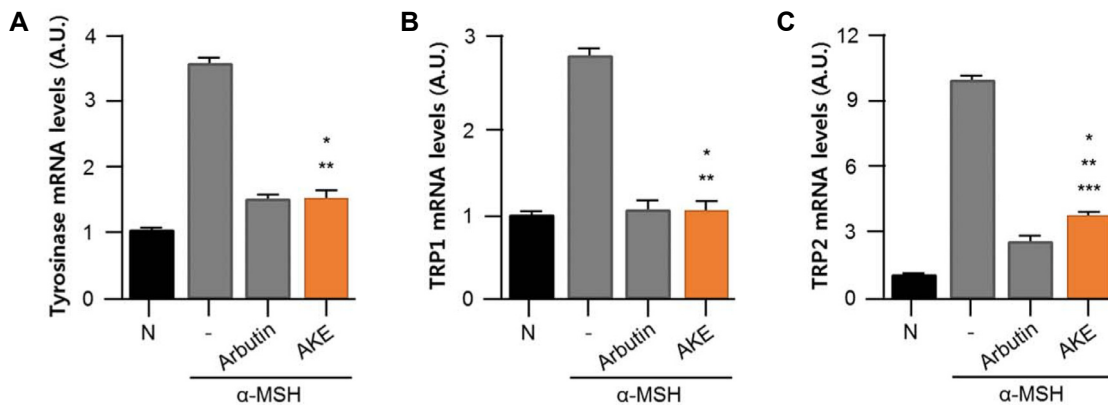


Fig. 3. Change of melanin-related factors in B16F10 melanoma treated with *Abies koreana* extracts. AKE concentration was  $10^5$ . Negative control was 1 mg/ml arbutin, and positive control was 250 nM  $\alpha$ -MSH. The mRNA levels of Tyrosinase (A), TRP-1 (B), and TRP-2 (C) were analyzed by Real-time PCR. Values represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments ( $*p < 0.05$  compared to the Normal (N),  $**p < 0.05$  compared to Arbutin,  $***p < 0.05$  compared to  $\alpha$ -MSH). AKE, *Abies koreana* extracts; MSH; melanocyte-stimulating hormone.

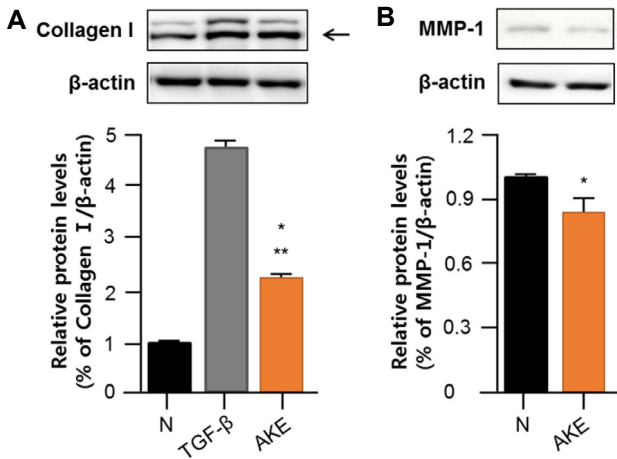


Fig. 4. Change of collagen and MMP-1 in HDFs treated with *Abies koreana* extracts. AKE concentration was  $10^5$ . Positive control was 5 ng/ml TGF- $\beta$ . The protein levels of Collagen type 1 (A) and MMP-1 (B) were analyzed by Western blot. Values represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments (\* $p$ <0.05 compared to the Normal (N), \*\* $p$ <0.05 compared to TGF- $\beta$ ). AKE, *Abies koreana* extracts; MMP, Matrix metalloproteinase; TGF, Transforming growth factor.

**자외선 조건하에 있는 HDF 세포에서 구상나무 처리에 의한 콜라겐 합성 개선**

자외선은 외부스트레스, 즉 활성 산소종의 증가를 통해 노화를 유발하는 것으로 알려져 있으며[9], 인공적인 자외선 처

리 조건은 노화 상태를 조절하는 피부 관련 연구를 진행하는데 중요한 수단이다. HDF에 적절한 자외선 유도를 확인하기 위해 조사 세기별 collagen type 1을 확인 한 결과 60 mJ/cm<sup>2</sup>까지는 발현을 유지하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5A). Zeng 외의 연구자들에 따르면, 본 연구 결과와 마찬가지로 60 mJ/cm<sup>2</sup>에서 자외선 유도된 활성 산소종을 유도 할 수 있다고 보고했다[25]. 따라서, 60 mJ/cm<sup>2</sup> 자외선 조사 상태에서 구상나무를 처리하였을 때 collagen type 1의 발현이 조절되는 지 확인해 보았다(Fig. 5B). 자외선 조사를 하지 않은 위의 연구에서는 10<sup>5</sup> 농도에서 의미 있는 결과를 도출한 반면, 자외선 조건하에서는 10배 희석된 10<sup>6</sup> 농도에서 발현이 개선된 것을 알 수 있었다(정상군 대비 약 50% 회복). 이는 자외선에 영향을 받아 환경이 나빠진 HDF에 의한 것으로 유추된다. 하지만 자외선 조건하에서도 구상나무가 collagen type 1을 증가 시킬 수 있음을 보여준다.

**피부개선을 유도하는 구상나무 추출물**

구상나무 추출물의 특징 및 피부관련 추가 연구를 위해 구성요소 및 함량을 분석하였고(Table 1), Limonene, Camphene, alpha-Pinene, Borneyl acetate이 주요 구성물질임을 알 수 있었다. 특히 Limonene 의 경우 함량 연구가 많았으나 최근 항염증 및 항생제활성을 유도하여 피부 콜라겐 합성 증가와 염증세포 감소 등의 효과를 보인 연구가 보고되었다[19]. 또한 Alpha-Pinene의 경우 Ferula oil에 21.36% 함유 되어 있으며 항산화 및 항생제활성을 나타냄이 보고되었다[25]. 따라서, 구

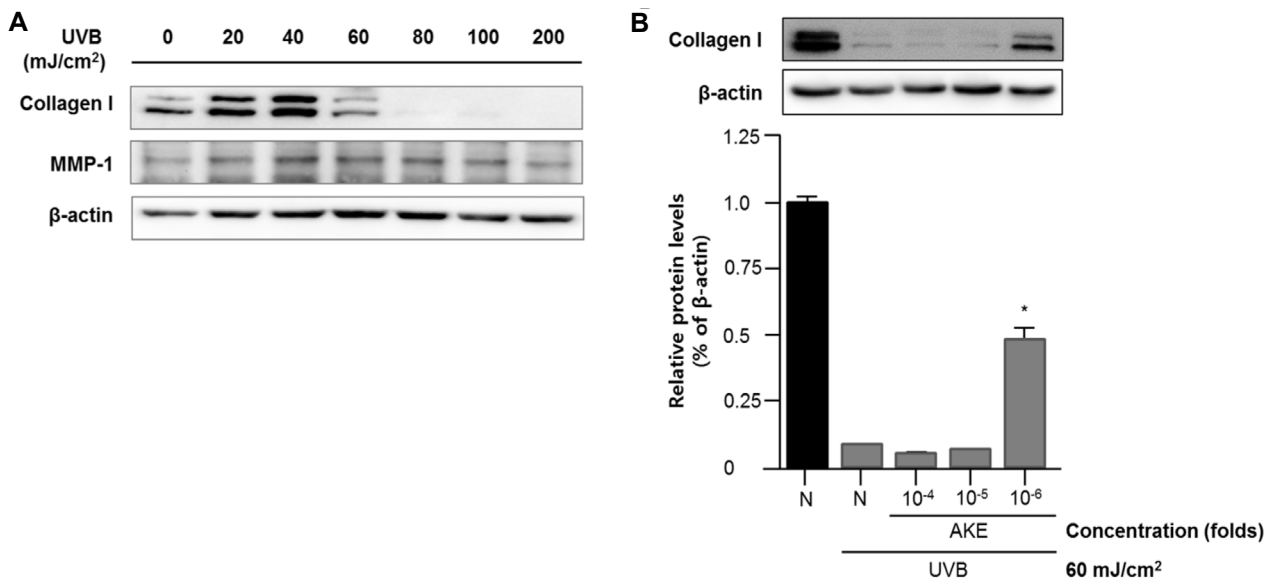


Fig. 5. Change of collagen type 1 expression in HDFs with UVB treatment. (A) UVB was dose-dependently treated onto HDF for 30 min. (B) 60 mJ/cm<sup>2</sup> UVB was treated onto HDF for 30 min. AKE concentration was  $10^5$ . The protein levels of Collagen type 1 and MMP-1 were analyzed by Western blot. Values represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments (\* $p$ <0.05 compared to the Normal (N)). HDF, human dermal fibroblast; UVB, ultraviolet B; AKE, *Abies koreana* extracts; MMP, Matrix metalloproteinase; TGF, Transforming growth factor.

Table 1. Component and content of *Abies koreana* extracts (ppm/total 2,000 ppm)

Component name	ppm	Component name	ppm
1,8-cineole	0	Isopulegol	0
3-carene	20	Limonene	470
Alpha-phellandrene	2	Linalool	4
Alpha-pinene	296	Myrcene	20
Alpha-pinene oxide	1	Sabinene	0
Alpha-terpinene	1	Terpinen-4-ol	0
Alpha-terpineol	7	Alpha-fenchene	155
Alpha-terpinolene	10	Alpha-thujene	0
Alpha-terpinyl acetate	11	Carvenone	29
Beta-phellandrene	12	Cis-ocimene	0
Beta-pinene	31	Tricyclene	19
Borneol	20	Alpha-cedrol	0
Bornyl acetate	268	Alpha-humulene	12
Camphene	346	Beta-elemene	0
Camphor	1	Beta-eudesmol	0
Gamma-terpinene	2	Caryophyllene oxide	0

상나무 추출물 또는 구별된 이의 추출물은 항산화에 의한 피부 노화 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 구상나무 추출물의 피부개선 효과를 확인하기 위해 미백 및 항주름 기능 관점에서 살펴보았다. 미백 효과를 측정하기 위해 tyrosinase 저해활성 억제 및 관련 세포신호인자들의 발현을 확인하였고, 항주름 기능을 알아보기 위해 collagen 및 연관 단백질 분석을 실시하였다. 이러한 결과는 구상나무 추출물이 피부 개선 더 나아가 피부 노화억제에 효과적일 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발사업(2017026B10-1719-BA01)과 국립산림과학원 산림과학기술개발사업(FP0900-2016-01)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

### References

- Brenneisen, P., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. 2002. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Am. N. Y. Acad. Sci.* **973**, 31-43.
- Cheon, S. J., Jang, M. J., Jang, Y. A., Choi, E. Y., Jun, D. H., Kim, Y. H., Cho, W. A., Jeong, Y. S., Kwon, H. B., Kim, T. H., Choi, K. I., Do, J. R., Lee, C. E. and Lee, J. T. 2008. Anti-wrinkle effect of cambodian phellinus linteus extracts. *J. Life Sci.* **18**, 1718-1722.
- Delalle-Lozica, N. 2010. Local therapy as basic anti-aging prevention. *Acta. Clin. Croat.* **49**, 529-536.
- Gilchrest, B. A. 1990. Skin aging and photoaging. *Dermatol. Nurs.* **2**, 79-82.
- Jeong, S. I., Lim, J. P. and Jeon, H. 2007. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oil from *Abies koreana*. *Phytother. Res.* **21**, 1246-1250.
- Kavoosi, G., Tafsiry, A., Ebdam, A. A. and Rowshan, V. 2013. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from *Carum copticum* seed and *Ferula assafoetida* latex. *J. Food Sci.* **78**, T356-T361.
- Keskin, I., Gunal, Y., Ayla, S., Kolbasi, B., Sakul, A., Kilic, U., Gok, O., Koroglu, K. and Ozbek, H. 2017. Effects of *Foeniculum vulgare* essential oil compounds, fenchone and limonene, on experimental wound healing. *Biotech. Histochem.* **92**, 274-282.
- Kim, H. J., Choi, E. H. and Lee, I. K. 2004. Two lanostane triterpenoids from *Abies koreana*. *Phytochemistry* **65**, 2545-2549.
- Kim, M. J., Kim, J. Y., Jung, T. K., Choi, S. W. and Yoon, K. S. 2006. Skin antiaging effect of *Forsythia viridissima* L. extract. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 444-450.
- Kim, Y. G., Jo, J. S. and Moon, C. K. 1999. Antimicrobial activities of the lignan from *Abies koreana*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 260-262.
- Kim, Y. H., Chung, C. B., Kim, J. G., Ko, K. I., Park, S. H., Kim, J. H., Eom, S. Y., Kim, Y. S., Hwang, Y. I. and Kim, K. H. 2008. Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 303-311.
- Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D. C. and Hearing, V. J. 1998. Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown Locus Protein). *J. Biol. Chem.* **273**, 31801-31805.



13. Kudryavtseva, A., Krasnov, G., Lipatova, A., Alekseev, B., Maganova, F., Shaposhnikov, M., Fedorova, M., Snezhkina, A. and Moskalev, A. 2016. Effects of *Abies sibirica* terpenes on cancer- and aging-associated pathways in human cells. *Oncotarget* **7**, 83744-83754.
14. Lee, S. Y., Jun, H. J., Lee, I. C. and Lee, J. Y. 2013. Down-regulation of Tyrosinase, MITF, TRP-1, and TRP-2 expressions by *Juniperus rigida* Sieb. in murine B16F10 melanoma. *J. Life Sci.* **23**, 1445-1453.
15. Lee, T. B. 1996. Illustrated Flora of Korea, pp. 50, Hyangmoon-sa: Seoul, Korea.
16. 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.
17. Levy, C., Khaled, M. and Fisher, D. E. 2006. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* **12**, 406-414.
18. Martínez-Esparza, M., Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J. A. and García-Borrón, J. C. 1998. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- $\alpha$  in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **255**, 139-146.
19. Millis, A. J., Hoyle, T. M., McCue, H. M. and Martini, H. 1992. Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **201**, 373-379.
20. Raldugin, V. A., Shakirov, M. M., Roshchin, V. I., Leibyuk, T. V. and Shevtsov, S. A. 1991. Triterpenoids of *Abies* species. XII. (24Z)- and (24E)-8(14 $\rightarrow$ 13)-abeo-17,13-friedolanosta-8,14(30),24-triene-3,23-dione-26-oic acids, novel triterpenoids from the needles of *Siberian fr. Khim. Prir. Soedin.* **27**, 511-517.
21. Singh, R. K., Nath, G., Goel, R. K. and Bhattacharya, S. K. 1998. Pharmacological actions of *Abies pindrow* Royle leaf. *Indian J. Exp. Biol.* **36**, 187-191.
22. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. and Wortsman, J. 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* **84**, 1155-1228.
23. 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.
24. Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. and Takaishi, Y. 1995. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *J. Ethnopharmacol.* **46**, 133-152.
25. Zeng, Q., Zhou, F., Lei, L., Chen, J., Lu, J., Zhou, J., Cao, K., Gao, L., Xia, F., Ding, S., Huang, L., Xiang, H., Wang, J., Xiao, Y., Xiao, R. and Huang, J. 2017. Ganoderma lucidum polysaccharides protect fibroblasts against UVB-induced photoaging. *Mol. Med. Rep.* **15**, 111-116.

### 초록 : *Abies koreana* 유래 정유의 항주름 및 미백 효과

송병욱<sup>1\*</sup> · 송민정<sup>2\*</sup> · 박미진<sup>3</sup> · 최돈하<sup>3</sup> · 이성숙<sup>3</sup> · 김명길<sup>3</sup> · 황기철<sup>2\*</sup> · 김일권<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>가톨릭관동대학교 의과대학 융합과학교실, <sup>2</sup>가톨릭관동대학교 의과대학 바이오융합연구원, <sup>3</sup>국립산림과학원 임산공학부 화학미생물과)

구상나무로부터 추출된 정유가 개발되어 있지만, 피부와 연관된 연구 관점에서 효능이 아직까지 밝혀지지 않았다. 본 연구의 목적은 B16F10 흑색종 세포(B16F10)와 인간 피부아세포주(HDF)에서 멜라닌과 주름 형성 상의 구상나무 추출물 효과를 알아보는 데 있다. 정유는 수침 증류법으로 추출하였고 무수 황산나트륨으로 정제 하였다. 10<sup>-5</sup> 배의 정유농도에서, 두 세포의 생존능은 세포독성 평가에 의해 확인 되었다. B16F10의 항멜라닌 효과는 티로시나아제 억제 분석과 티로시나아제, 티로시나아제 연관 단백질 -1과 -2(TRP-1, TRP-2)의 유전자 발현 검증을 통해 이루어졌다. 정유는 알파-멜라닌세포 자극 호르몬 유도 그룹과 비교하여 티로시나아제 억제 활성이 5배, 아르부틴 유도 그룹과 비교하였을 때 30% 정도 감소되었다. 3가지 멜라닌 유래 인자들의 mRNA 수준도 각각 증가하였다. 항주름 효과를 분석하기 위해, 프로콜라겐 타입 I c 펩티드 합성(PIP) 분석과 웨스턴 블롯을 수행하였다. 정유를 처리한 그룹에서 PIP가 증가되었고 콜라겐 타입 1과 기질 금속 단백질 분해 효소가 개선 되었다. 또한 정유는 60 mJ/cm<sup>2</sup>의 자외선 조건에서, 자외선-억제 콜라겐 타입 1의 증가와 기질 금속 단백질 분해 효소 생성 억제를 통해 항주름 효과를 보여줬다. 따라서 구상나무 추출물은 미백과 항주름을 위한 안전하고 효과적인 피부 제제로서 가능성을 가지고 있음을 암시한다.