

## 으름덩굴 에탄올 추출물의 항노화 효과

김 유 진<sup>†</sup> · 권 순 현<sup>\*</sup> · 송 지 현<sup>\*</sup> · 이 소 미<sup>\*</sup> · 김 용 민<sup>\*\*†</sup>

\*세명대학교 화장품과학과, 석사 대학원생

\*\*세명대학교 화장품과학과, 교수

(2024년 1월 12일 접수, 2024년 2월 21일 수정, 2024년 3월 9일 채택)

### Anti-aging Effect of *Akebia quinata* Decaisne Ethanol Extract

Yu Jin Kim<sup>†</sup>, Soon Hyun Kwon, Ji Hyun Song, So Mi Lee, and Yong Min Kim<sup>\*\*†</sup>

Department of Cosmetic Science, Semyung University, 65 Semyung-ro,  
Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 27136, Korea

(Received January 12, 2024; Revised February 21, 2024; Accepted March 9, 2024)

**요약:** 피부는 자외선, 감염 등과 같은 외부 요인에 의해 피부 노화가 진행된다. 이러한 요인들에 의해 피부의 섬유아세포는 단백질 분해효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)를 분비한다. MMPs는 세포외기질에 위치하는 콜라겐의 분해를 유도하여 노화에 직접적인 영향을 미친다. 으름덩굴(*Akebia quinata* Decaisne) 줄기는 항산화, 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었다. 하지만 으름덩굴 줄기 에탄올 추출물(AQSEE)의 항노화 효과에 대해서는 알려지지 않았다. 따라서 인간 섬유아세포에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1 억제 효과를 연구하였다. MTT assay를 통해 AQSEE의 세포 생존율을 확인한 결과 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 독성을 나타내지 않았다. RT-qPCR과 ELISA를 통해 MMP-1 mRNA와 단백질 분비를 억제하는지 확인한 결과 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 유의하게 감소하였다. 또한, western blotting을 통해 MAPKs 신호전달경로와 전사인자의 인산화가 감소하는지 확인하였다. 그 결과 p38, c-Jun, p65의 인산화가 모든 농도에서 유의하게 감소하였다. AQSEE의 radical 소거능을 확인하기 위해 DPPH, ABTS assay를 진행한 결과 모든 농도에서 유의하게 감소하였다. 본 연구 결과를 통해 MMP-1 억제 효과와 radical 소거능을 확인하였으며, 이는 항노화 물질로 사용될 수 있음을 시사한다.

**Abstract:** Skin aging progresses due to external factors such as ultraviolet rays and infections. These factors cause skin fibroblasts to secrete proteolytic enzymes, matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs induce the degradation of collagen located in the extracellular matrix, directly influencing aging. The stems of *Akebia quinata* Decaisne have been reported to have antioxidant and anti-inflammatory effects. However, the anti-aging effect of *Akebia quinata* Decaisne stem ethanol extract (AQSEE) is not known. Therefore, we studied the TNF- $\alpha$ -induced MMP-1 inhibitory effect in human fibroblasts. When the cell viability of AQSEE was confirmed through MTT assay, it showed no toxicity up to 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The inhibition of MMP-1 mRNA and protein secretion was confirmed through RT-qPCR and ELISA, and results showed a significant decrease at concentrations of 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . We also confirmed by Western blotting that phosphorylation of MAPKs signaling pathway and transcription factors was reduced. As a result, phosphorylation of p38, c-Jun, p65 was significantly decreased at all concentrations. DPPH and ABTS assays were performed to confirm the radical scavenging ability of AQSEE, and the results showed a significant decrease at all concentrations. The results of this study confirmed the MMP-1 inhibitory effect and radical scavenging ability, which suggests that it can be used as an anti-aging substance.

**Keywords:** *akebia quinata decaisne*, collagen, MMP-1, MAPKs, anti-aging

†주 저자 (e-mail: kimyoujin55@naver.com)

call: 043-649-1616

‡교신저자 (e-mail: dragonroom@semyung.ac.kr)

call: 043-649-1616

## 1. 서론

피부 노화는 나이가 들어감에 따른 내인성 노화와 자외선, 흡연, 영양부족 등 외부 요인에 의한 외인성 노화로 나눌 수 있다. 이 중에서 자외선 노출이 피부 노화의 많은 부분을 차지하며, 자외선에 노출된 피부는 단편화되고 가용성이 높은 콜라겐 섬유를 나타낸다[1].

콜라겐은 진피 extracellular matrix (ECM)의 주요 구성성분으로 인체 내 존재하며 대부분 Type I 형태로 발현된다. ECM은 진피에 존재하는 섬유아세포에 의해 합성되며 피부의 인장 강도를 유지하여 구조적 안정성을 준다. 또한, 섬유아세포의 기능이 감소하면 피부 결합 조직의 특성에 영향을 미친다[2,3].

콜라겐의 분해는 형태 형성, 조직 리모델링 및 복구에 영향을 미치는 중요한 과정으로 이와 관련된 단백질로 matrix metalloproteinases (MMPs)가 존재한다[4]. MMPs는 아연을 포함한 세포 외 단백질을 분해하는 효소로 약 24개의 MMP가 인간에게 존재하는 것으로 알려져 있다[5]. MMPs는 collagenases, gelatinases, stromelysins 등 여러 종류가 존재하며, collagenases 중 하나인 MMP-1은 Type I 콜라겐을 분해한다고 알려져 있다[6,7].

세포 내 신호전달경로로 작용하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 세포 성장, 분화, 염증반응 등에 관여하며 MAPKs 경로의 활성화는 MMPs 생성을 유도할 수 있다[8,9].

자외선에 노출된 피부의 표피층과 진피층 세포는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 등의 다양한 사이토카인을 생성한다. 이러한 사이토카인 중에서 TNF- $\alpha$ 는 자외선에 의한 염증 및 면역 반응에서 중요한 역할을 한다고 보고되었다[10]. 또한, 자외선 조사는 사이토카인 수용체를 유발하여 c-Jun, c-Fos로 구성된 activator protein-1 (AP-1)과 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) 등의 전사인자를 활성화하고, MMP-1의 발현을 증가시켜 콜라겐 분해로 이어진다고 알려져 있다[11].

으름덩굴(*Akebia quinata* Decaisne, *A. quinata* Decaisne)은 한국, 중국, 일본 등 동아시아에 널리 분포한다[12]. 으름덩굴의 줄기는 진통, 해열 작용과 같은 약리효과가 있으며 항염증, 항산화 활성을 가지는 것으로 보고되었고, 유효 성분으로는 akeboside, betulin, oleanolic acid, hederagenin 등이 존재한다[13]. 특히, 으름덩굴 줄기 에탄올 추출물(*A. quinata* Decaisne stem ethanol extract, AQSEE)은 DPPH 라디칼 소거능을 가지는 것으로 보고되었다[14]. 이처럼 으름덩굴의 다양한 효능이 알려져 있음에도 MMP-1 억제와

관련된 연구는 진행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 AQSEE가 인간 섬유아세포인 Hs68에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1 발현을 억제하여 항노화 물질로 작용할 수 있는지 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

본 실험에 사용한 으름덩굴의 줄기(*A. quinata* Decaisne stem, 참한약초, Korea)는 경상북도 영천군에서 재배된 것을 사용하였으며, 열풍건조기를 이용하여 50 °C에서 4 h 동안 건조하였다. 건조 무게 200 g을 칭량하여 70% 에탄올 2000 mL와 함께 4 h 씩 2 번 초음파 교반 추출하였다. 추출물은 Filter paper (Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Japan)로 여과한 뒤, evaporator (CH-9230, BUCHI, Switzerland)로 감압 농축하였다. 동결건조기에서 48 h 동안 동결건조하여 건조된 분말 17 g을 얻었다. 수율은 약 8.5%이다.

### 2.2. 세포 배양

실험에 사용한 Hs68 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 배지는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GenDEPOT, USA)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, GenDEPOT, USA)과 1% penicillin/streptomycin (Gen DEPOT, USA)을 첨가하여 사용하였으며, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 2.3. MTT Assay

AQSEE의 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. Hs68 세포를  $6 \times 10^3$  cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 상층액을 제거하고 시료를 농도별로 처리한 뒤 24 h 동안 배양하였다. 이후 5 mg/mL 농도의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT, Bio basic, Canada)를 처리하고 3 h 동안 반응시켰다. 상층액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Japan)를 처리하여 20 min 동안 반응시킨 후, spectrophotometer (Epoch, bio-TEK, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

AQSEE가 MMP-1 단백질 분비에 미치는 효과를 확인하기 위해 ELISA를 진행하였다. Hs68 세포를  $3.5 \times 10^5$

cells/well이 되도록 6 well plate에 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 시료를 농도별로 45 min 동안 전처리한 후, TNF- $\alpha$ 를 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 상층액을 이용하여 MMP-1 human ELISA kit (Thermo fisher, USA)에서 제공된 방법에 따라 단백질 분비량을 측정하였다.

2.5. Real Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

AQSEE가 MMP-1 mRNA 발현에 미치는 효과를 확인하기 위해 RT-qPCR을 진행하였다. Hs68 세포를  $6 \times 10^5$  cells/well이 되도록 60 mm plate에 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 시료를 농도별로 45 min 동안 전처리한 후, TNF- $\alpha$ 를 처리하여 24 h 동안 배양하였다. Trizol reagent (Ambion, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였고, diethylpyrocarbonate (DEPC, Bioneer, Korea)로 용해하고 정량하였다. cDNA 합성 kit (Revertra ACE-a, Toyobo, Japan)를 사용하여 RNA를 cDNA로 합성하였다. Taqman master mix (Thermo fisher, USA), primer, DEPC, cDNA를 혼합하여 RT-qPCR을 진행하였다. 실험에 사용한 probe 들은 Table 1에 나타내었다.

2.6. Western Blotting

AQSEE의 MMP-1 억제 신호전달경로 관련 유전자들의 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 western blotting을 진행하였다. Hs68 세포를  $6 \times 10^5$  cells/well이 되도록 60 mm plate에 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 시료를 농도별로 45

min 동안 전처리한 후, TNF- $\alpha$ 를 처리하여 15 min 동안 배양하였다. Halt<sup>TM</sup> Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail EDTA-free (Thermo fisher, USA)가 포함된 RIPA Lysis and extraction Buffer (Thermo fisher, USA)로 세포를 용해하고 원심분리하였다. 추출한 단백질은 BCA assay (Thermo fisher, USA)로 정량한 후 전기영동 하였다. gel을 membrane에 transfer 하고 5% skim milk로 1 h 동안 blocking 진행 후 1 차 항체를 처리하여 overnight 하였다. membrane을 Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST)로 3 회 세척하고 2 차 항체를 2 h 동안 처리한 후 TBST로 세척하고 단백질 발현을 확인하였다. 실험에 사용한 항체들은 Table 2에 나타내었다.

2.7. DPPH Assay

AQSEE의 DPPH radical 소거능을 확인하기 위해 DPPH assay를 실시하였다. 99% methanol (Honey well, USA)에 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA)를 녹여 200  $\mu$ M 농도로 사용하였다. 96 well plate에 시료를 농도별로 100  $\mu$ L씩 처리하고, 200  $\mu$ M의 DPPH 용액을 100  $\mu$ L씩 첨가하여 암실에서 20 min 동안 반응시켰다. 이후, spectrophotometer (Epoch, bio-TEK, USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. ABTS Assay

AQSEE의 ABTS radical 소거능을 확인하기 위해 ABTS assay를 실시하였다. 7 mM의 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-

Table 1. Gene Name and Assay ID Number in RT-qPCR Analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1
MMP-1	Matrix metalloproteinases-1	Hs00899658_m1

Table 2. Antibody Name and Assay ID Number in Western Blotting Analysis

Symbol	Antibody name	Assay ID
p-ERK	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	4370S
ERK	p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb	4695S
p-p38	Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	4511S
p38	p38 MAPK (D13E1) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	8690S
p-JNK	Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) Rabbit mAb	4668S
JNK	SAPK/JNK Antibody	9252S
p-c-Jun	Phospho-c-Jun (Ser73) (D47G9) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	3270S
c-Jun	c-Jun (60A8) Rabbit mAb	9165S
p-p65 (p-NF- $\kappa$ B)	Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (93H1) Rabbit mAb	3033S
p65 (NF- $\kappa$ B)	NF- $\kappa$ B p65 (D14E12) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	8242S

6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma, USA)와 2.45 mM의 potassium persulfate (Roche, Germany)를 1 : 1 비율로 혼합하여 암실에서 16 h 동안 반응시켰다. 혼합한 ABTS 용액의 흡광도 값이 0.7 부근이 되도록 정제수에 희석하였다. 이후, 96 well plate에 시료를 농도별로 20  $\mu$ L씩 처리하고, ABTS 용액을 180  $\mu$ L씩 첨가하여 암실에서 10 min 동안 반응시킨 후 spectrophotometer (Epoch, bio-TEK, USA)로 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.9. 통계처리

모든 데이터는 3 회 반복하였고 student's *t*-test를 통해 분석하였다. 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었으며, 통계적 유의수준은 5%로 검정하였다.

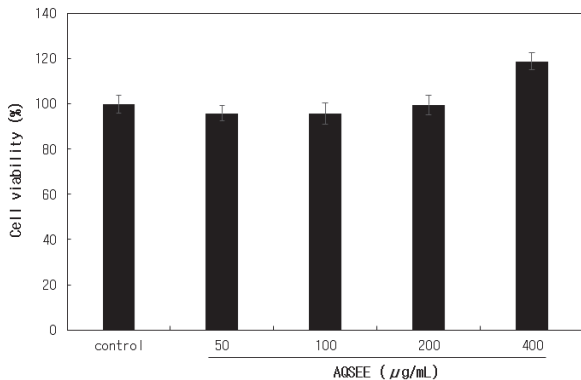
3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 독성평가

Hs68 세포에서 AQSEE를 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/mL 농도로 처리하여 세포독성을 확인한 결과, control군과 비교하여 95.88  $\pm$  3.43%, 95.58  $\pm$  4.69%, 99.52  $\pm$  4.27%, 118.87  $\pm$  3.84%로 나타났다. 이에 본 연구에서는 모든 농도에서 독성이 없음을 확인하였고, 이후 실험은 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/mL 농도로 실험을 진행하였다(Figure 1).

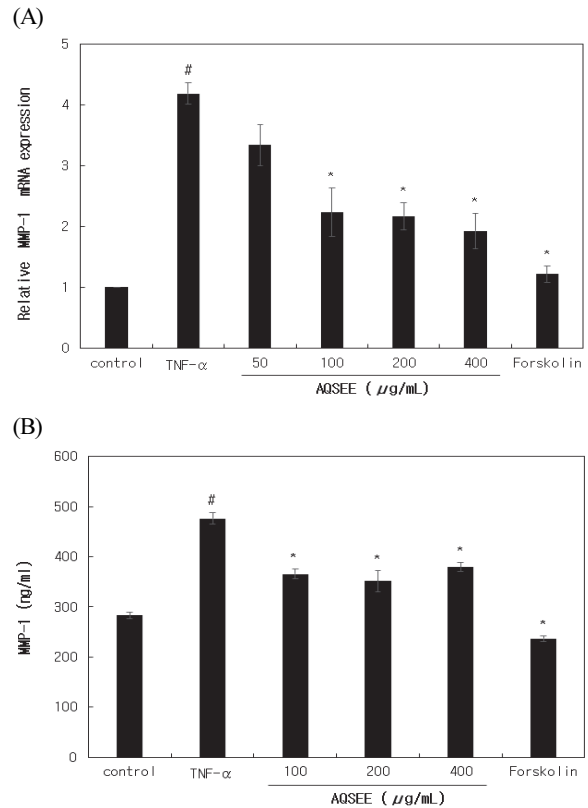
3.2. MMP-1 mRNA 발현 및 단백질 분비에 미치는 영향

자외선에 노출되면 일광 화상, 면역억제, 광노화 등 피부의 구조와 기능에 위협한 영향을 미친다. 이 중에서 광



**Figure 1.** The effects of AQSEE on cell viability in Hs68 cells. There was no cytotoxicity at 50 ~ 400  $\mu$ g/mL concentrations. Cell viability was measured by MTT assay. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

노화는 자외선에 의한 산화 손상과 MMPs의 활성화에 관련이 있으며, 피부 진피의 결합 조직을 이루는 ECM의 지속적인 손상을 발생시킨다[15]. 또한, 자외선은 피부 내의 염증 과정을 자극하여 reactive oxygen species (ROS) 생성을 촉진한다. 특히, 자외선 A (UVA)는 진피층까지 침투하는 능력이 있어 DNA 손상을 유발하며 ROS 생성을 증가시킨다[16]. 생성된 ROS는 TNF- $\alpha$ 와 같은 전염증성 사이토카인을 유도하여 MMPs의 생성을 촉진한다[17]. MMPs는 세포 외 기질 단백질 분해효소로 알려져 있으며, 이들 중 MMP-1은 섬유아세포에서 생성되어 Type I 콜라겐 절단을 유도한다[3,18]. Type I 콜라겐은 피부에 존재하는 전체 콜라겐 중 약 80 - 85%를 차지하며, 진피에 존재하는 섬유아세포에서 프로콜라겐으로 합성된 후 세포 외로 분

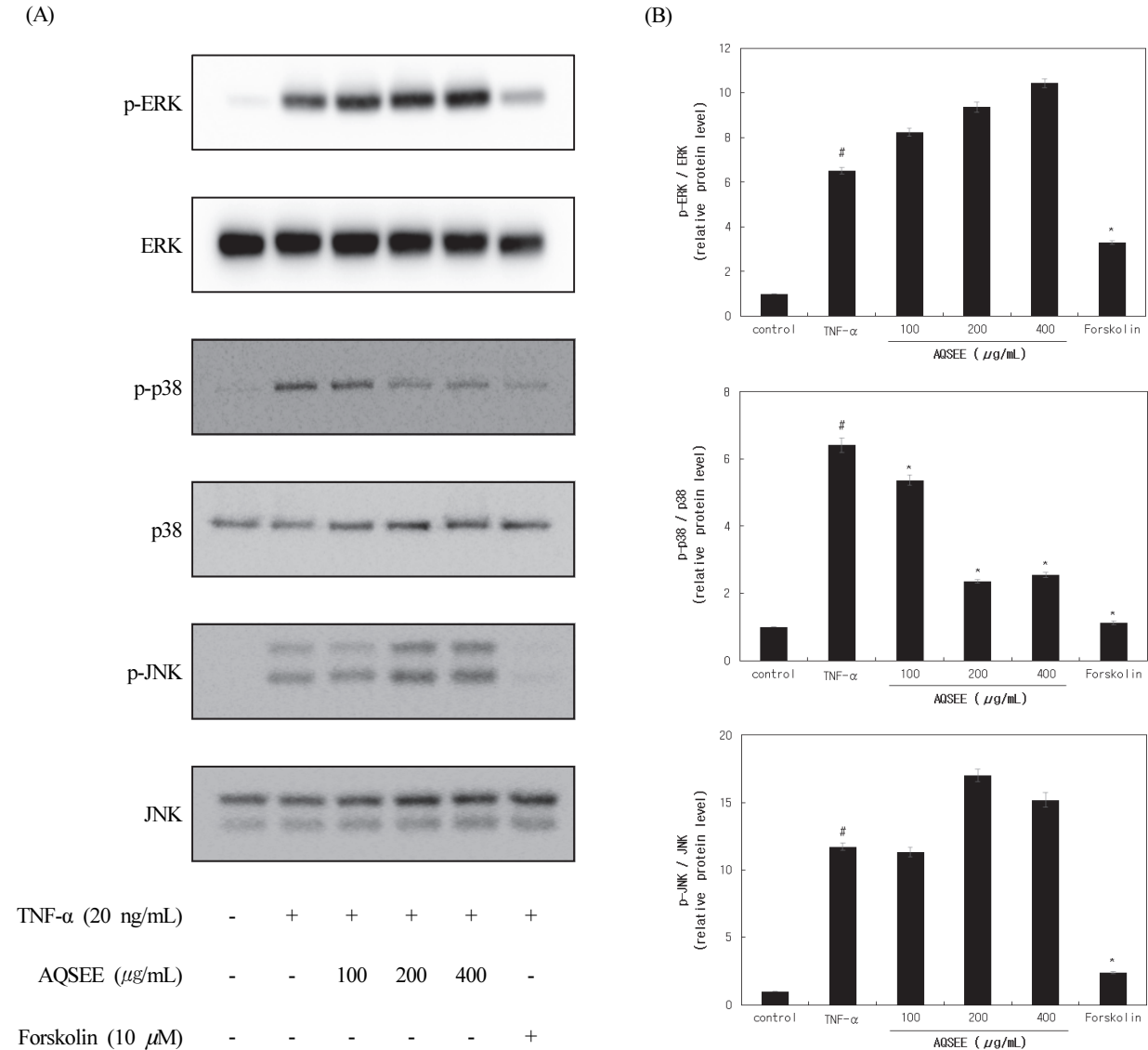


**Figure 2.** The effects of AQSEE on MMP-1 mRNA expression and protein secretion in TNF- $\alpha$  induced Hs68 cells. (A) AQSEE inhibited TNF- $\alpha$  induced MMP-1 mRNA expression. (B) AQSEE inhibited TNF- $\alpha$  induced MMP-1 protein secretion. Forskolin was positive control (10  $\mu$ M). The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. Indicates a significant difference from the control (#  $p$  < 0.05). Indicates a significant difference from the TNF- $\alpha$  treated condition (\*  $p$  < 0.05).

비되어 피부의 구조적 안정성을 담당한다[19].

본 연구에서는 AQSEE가 Hs68 세포에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1 mRNA 발현과 단백질 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-qPCR과 ELISA를 진행하였다. MMP-1 mRNA의 발현은 AQSEE를 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하였고, 양성 대조군으로 forskolin을 사용하였다. 이는 섬유아세포에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1 발현을 억

제한다고 보고되었다[20]. TNF- $\alpha$  처리 군과 비교하였을 때 AQSEE 처리 군의 MMP-1 mRNA 감소율은 각각 20.21, 46.72, 48.17, 53.97%로 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서만 유의하게 감소하였다. 따라서 이후 실험은 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 진행하였으며, 단백질 분비 감소율은 각각 23.30, 26.29, 20.39%로 유의한 결과를 나타내었다(Figure 2). 이를 통해 AQSEE가 MMP-1 mRNA 발현 및 단백질 분



**Figure 3.** The effects of AQSEE on MAPKs protein expression in Hs68 cells. (A) AQSEE inhibited the phosphorylation of p38. (B) p-ERK, p-38, p-JNK protein levels were compared to ERK, p38, JNK, respectively, and analyzed using Image J. Forskolin was positive control (10  $\mu\text{M}$ ). The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. Indicates a significant difference from the control (<sup>#</sup> $p < 0.05$ ). Indicates a significant difference from the TNF- $\alpha$  treated condition (<sup>\*</sup> $p < 0.05$ ).

비를 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다. 또한, AQSEE를 처리하였을 때 MMP-1 발현이 감소하였으므로, 피부에 존재하는 콜라겐의 대부분을 차지하는 Type I 콜라겐 분해를 감소시킴으로써 피부에 구조적 안정성을 주어 피부 항노화 효과를 나타낼 것으로 예상된다.

3.3. MAPKs 신호전달경로 단백질 발현 확인

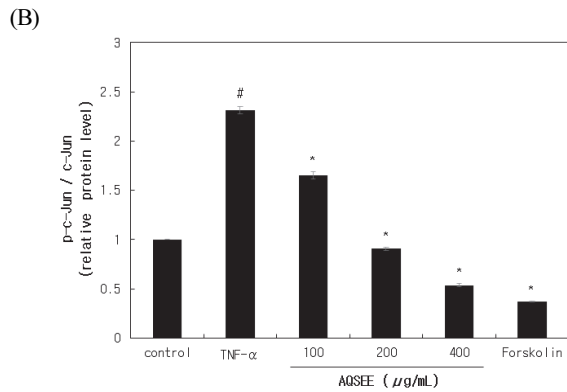
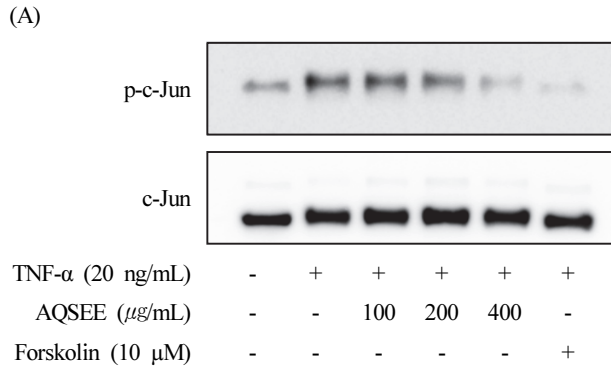
MAPKs는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK)로 나눌 수 있고, 피부 섬유아 세포에 TNF-α를 처리하면 MAPKs가 활성화되어 MMP-1 발현에 영향을 미친다고 알려져 있다[21].

본 연구에서는 AQSEE가 Hs68 세포에서 MAPKs의 인산화를 억제하는지 확인하기 위해 western blotting을 진행하였다. AQSEE를 농도별로 처리하여 TNF-α 처리 군과 비

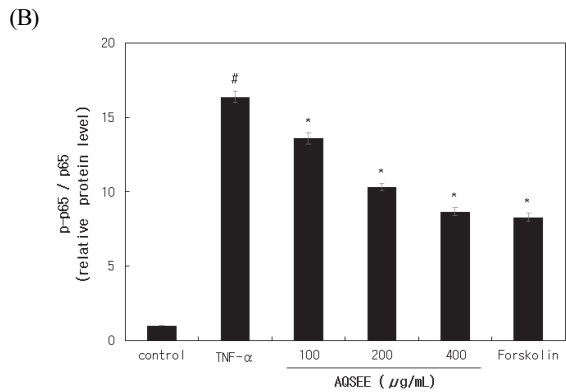
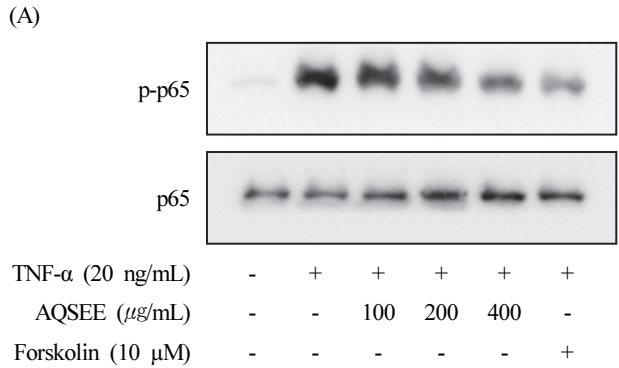
교하였을 때 p-p38의 억제율은 각각 16.33, 63.30, 60.21%로 유의하게 감소하였다. 반면, ERK와 JNK의 인산화는 억제하지 못한 것을 확인하였다(Figure 3). Oliveira의 연구에서는 p38과 JNK의 인산화를 억제하여 MMP-1 발현을 감소시키는 것으로 보고되었으며, 특히 p-p38의 억제가 유의한 수준으로 나타났[22]. 또한, TNF-α로 유도된 MMP-1 발현은 p38 경로에 의해 조절된다고 보고되었다[23]. 이와 본 연구 결과를 비교하였을 때 AQSEE의 처리는 p38의 인산화를 억제한 것으로 생각된다.

3.4. AP-1 전사인자 단백질 발현 확인

AP-1은 c-Fos와 c-Jun으로 구성된 전사인자로 MAPKs 경로에 의해 활성화되어 MMPs를 증가시킨다[24]. 자외선 노출로 활성화된 AP-1 발현은 콜라겐 유전자를 감소시키



**Figure 4.** The effects of AQSEE on p-c-jun protein expression in Hs68 cells. (A) AQSEE inhibited the phosphorylation of c-jun. (B) p-c-Jun protein levels were compared to c-Jun and analyzed using Image J. Forskolin was positive control (10 μM). The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. Indicates a significant difference from the control (# *p* < 0.05). Indicates a significant difference from the TNF-α treated condition (\* *p* < 0.05).



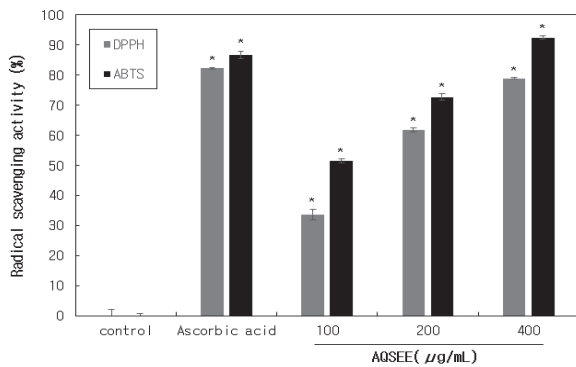
**Figure 5.** The effects of AQSEE on p-p65 protein expression in Hs68 cells. (A) AQSEE inhibited the phosphorylation of p65. (B) p-p65 protein levels were compared to p65 and analyzed using Image J. Forskolin was positive control (10 μM). The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. Indicates a significant difference from the control (# *p* < 0.05). Indicates a significant difference from the TNF-α treated condition (\* *p* < 0.05).

며, 인간 피부에서 c-Fos는 항상 발현되기 때문에 c-Jun의 발현 증가로 AP-1이 활성화된다고 보고되었다[25].

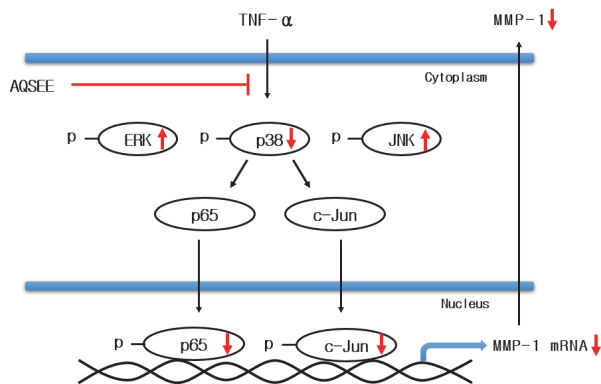
AQSEE가 Hs68 세포에서 c-Jun의 인산화를 억제하는지 확인하기 위해 western blotting을 진행하였다. AQSEE를 농도별로 처리하여 TNF- $\alpha$  처리 군과 비교하였을 때 p-c-Jun 억제율은 각각 28.51, 60.78, 76.79%로 단백질 발현이 감소하였다(Figure 4). MAPKs 중에서 JNK와 p38은 c-Jun 프로모터에 결합하여 c-Jun을 활성화한다는 보고가 있다[26]. 이와 본 연구를 비교하였을 때 AQSEE의 처리는 p38에 의해 c-Jun의 인산화를 억제하는 것으로 생각된다.

### 3.5. p65 (NF- $\kappa$ B) 전사인자 단백질 발현 확인

NF- $\kappa$ B는 염증반응에 관여하는 전사인자로 p65, p50, Rel B 등으로 이루어진 복합체이다. 섬유아세포에서 NF- $\kappa$ B는 inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B)와 결합하여 활성이 억제된 상태로 세



**Figure 6.** The effects of AQSEE on DPPH/ABTS radical scavenging test. Ascorbic acid was positive control (200  $\mu$ M). The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. Indicates a significant difference from the control ( $p < 0.05$ ).



**Figure 7.** AQSEE can suppress MMP-1 mRNA and protein secretion by inhibiting the p38 pathway.

포질에 존재하다가 자외선이 조사되면 핵으로 이동하여 전사인자로서 작용한다[27]. Limtrakul의 연구에서 p38과 JNK의 활성화가 광노화 과정에서 NF- $\kappa$ B의 활성화에 영향을 주며 MMP-1 발현을 조절한다고 보고하였다[28].

AQSEE가 Hs68 세포에서 p65의 인산화를 억제하는지 확인하기 위해 western blotting을 진행하였다. AQSEE를 농도별로 처리하여 TNF- $\alpha$  처리 군과 비교하였을 때 p-p65의 억제율은 16.93, 36.9, 47.13%로 단백질 발현이 감소하였다(Figure 5). 이는 p38이 p65의 인산화를 억제하여 MMP-1 발현을 감소시킨 것으로 생각된다.

### 3.6. DPPH/ABTS Radical 소거능 확인

AQSEE의 항산화 효과를 DPPH/ABTS assay를 통해 radical 소거능을 확인하였다. 대조군은 200  $\mu$ M의 ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였으며, AQSEE를 농도별로 처리하였을 때 DPPH radical 소거능은 각각 33.72, 61.83, 78.90%로 나타났고, ABTS radical 소거능은 51.54, 72.78, 92.51%로 모든 농도에서 유의하게 증가하였다(Figure 6).

## 4. 결 론

본 연구에서는 AQSEE가 Hs68에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 세포독성을 확인하여 400  $\mu$ g/mL를 최고농도로 설정하여 실험을 진행하였다. RT-qPCR과 ELISA를 통해 AQSEE가 MMP-1 mRNA 발현과 단백질 분비를 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다. 이후 신호전달경로를 확인하였으며, AQSEE는 ERK와 JNK의 인산화는 억제하지 못했으나 p38과 전사인자 c-Jun, p65의 인산화를 억제하여 MMP-1 단백질 분비를 감소시켰다. 이는 AQSEE가 항노화 물질로 사용될 수 있음을 나타내었으며, 추후 MAPKs 상위경로에 대한 추가 실험을 진행할 필요가 있다.

으름덩굴은 akeboside, betulin, oleanolic acid, hederagenin 등과 같은 유효 성분이 존재하며 항산화, 항염 효과를 나타낸다고 보고되었다[13]. 여러 유효 성분 중 betulin은 인간 윤활막 섬유아세포에서 전염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하는 것으로 보고되었으며[29], oleanolic acid는 진피 섬유아세포에서 MMP-1 단백질 발현을 감소시키는 것으로 보고되었다[30]. 이러한 연구 결과를 통해 AQSEE의 MMP-1 발현억제는 betulin과 oleanolic acid가 관여하는 것으로 추측할 수 있다.

또한, Kim과 Hong의 연구에 따르면 자외선 조사가 인간 진피 섬유아세포에서 MMP-1 발현을 유도하여 콜라겐을 감소시키는 것으로 나타났으며, 자외선 조사가 산화적 손상을 일으키는 ROS의 생성을 증가시키는 것으로 보고되었다 [31,32]. Rittié의 연구에서는 자외선에 노출된 피부는 ROS와 염증성 사이토카인이 생성되고, 이것은 세포 내 신호전달 경로에 관여하여 MMP-1을 생성한다고 보고되었다[33]. 이를 통해 피부는 자외선, ROS와 같은 산화적 손상으로 인해 MMP-1 발현이 유도될 수 있음을 알 수 있다. 본 실험에서는 DPPH, ABTS assay를 통해 AQSEE가 항산화 효과를 나타냄으로써 MMP-1 발현을 억제하는 것으로 추측된다.

### Acknowledgement

본 과제(결과물)는 2023년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역 혁신 사업의 결과입니다(2021RIS-001(1345370811)).

### References

1. L. Baumann, Skin ageing and its treatment, *J. Pathol.*, **211**(2), 241 (2007).
2. T. Quan and G. J. Fisher, Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a mini-review, *Gerontology*, **61**(5), 427 (2015).
3. Y. H. Lee, E. K. Seo, and S. T. Lee, Skullcapflavone II inhibits degradation of type I collagen by suppressing MMP-1 transcription in human skin fibroblasts, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(11), 2734 (2019).
4. A. Jabłońska-Trypuć, M. Matejczyk, and S. Rosochacki, Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **31**(sup1), 177 (2016).
5. M. Fanjul-Fernández, A. R. Folgueras, S. Cabrera, and C. López-Otín, Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1803**(1), 3 (2010).
6. H. Nagase, R. Visse, and G. Murphy, Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs, *Cardiovasc. Res.*, **69**(3), 562 (2006).
7. J. Jian, E. Pelle, Q. Yang, N. Pernodet, D. Maes, and X. Huang, Iron sensitizes keratinocytes and fibroblasts to UVA-mediated matrix metalloproteinase-1 through TNF- $\alpha$  and ERK activation, *Exp. Dermatol.*, **20**(3), 249 (2011).
8. J. Y. Sung and Y. M. Kim, Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Rumex acetosa* L. in RAW 264.7, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **48**(3), 213 (2022).
9. C. E. Hong and S. Y. Lyu, Identification of anti-oxidant, anti-aging, and whitening effects of *Diospyros kaki* extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **48**(3), 275 (2022).
10. V. Muthusamy and T. J. Piva, The UV response of the skin: a review of the MAPK, NF $\kappa$ B and TNF $\alpha$  signal transduction pathways, *Arch. Dermatol. Res.*, **302**, 5 (2010).
11. C. Garg, P. Khurana, and M. Garg, Molecular mechanisms of skin photoaging and plant inhibitors, *Int. J. Green Pharm.*, **11**(02), (2017).
12. S. H. Park, S. Jang, S. W. Lee, S. D. Park, Y. Y. Sung, and H. K. Kim, *Akebia quinata* Decaisne aqueous extract acts as a novel anti-fatigue agent in mice exposed to chronic restraint stress, *J. Ethnopharmacol.*, **222**, 270 (2018).
13. E. H. Jung, S. C. Kim, I. J. Cho, and Y. W. Kim, *Akebiae caulis* inhibits oxidative stress through AMPK activation, *J. Physiol & Pathol Korean Med*, **29**(1), 18 (2015).
14. I. M. Chung, K. H. Kim, and J. K. Ahn, Screening of Korean medicinal and food plants with antioxidant activity, *KJMCS*, **6**(4), 311 (1998).
15. H. M. Chiang, H. C. Chen, H. H. Chiu, C. W. Chen, S. M. Wang, and K. C. Wen, *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after UVB exposure via ROS scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway, *Evid. Based Complementary Altern. Med.*, (2013).
16. T. L. De Jager, A. E. Cockrell, and S. S. Du Plessis, Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 15 (2017).
17. K. S. Kim, R. H. Kim, S. R. Son, K. S. Kang, D. S. Jang, and S. L. Lee, Oddioside A, a New phenolic glycoside isolated from the fruits of *Morus alba* (Mulberry),



- protects TNF- $\alpha$ -induced human dermal fibroblast damage, *Antioxidants*, **11**(10), 1894 (2022).
18. Y. S. Jeong, J. Y. Lee, and J. Y. Ko, Inhibitory effect of *Lonicera japonica* extract on MMP-1 production in human dermal fibroblast, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **46**(1), 67 (2020).
  19. J. H. Yim, M. S. Jang, U. S. Jung, M. Y. Moon, H. Y. Lee, Y. H. Kim, G. Y. Lee, and N. H. Lee, Constituents of collagen synthesis activation from the extracts of *Gynostemma pentaphyllum* leaves, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **40**(3), 289 (2014).
  20. C. H. Park, Y. J. Moon, C. M. Shin, and J. H. Chung, Cyclic AMP suppresses matrix metalloproteinase-1 expression through inhibition of MAPK and GSK-3 $\beta$ , *J. Invest. Dermatol.*, **130**(8), 2049 (2010).
  21. B. H. Jeon, Y. C. Song, H. T. Kim, and Y. M. Kim, Studies on skin anti-aging effect of Chungpyesagan-tang(CPSGT), *JKOOD*, **36**(1), 40 (2023).
  22. M. M. Oliveira, B. A. Ratti, R. G. Daré, S. O. Silva, M. D. C. T. Truiti, T. Ueda-Nakamura, R. Auzély-Velty, and C. V. Nakamura, Dihydrocaffeic acid prevents UVB-induced oxidative stress leading to the inhibition of apoptosis and MMP-1 expression via p38 signaling pathway, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, (2019).
  23. C. H. Park and J. H. Chung, Epidermal growth factor-induced matrix metalloproteinase-1 expression is negatively regulated by p38 MAPK in human skin fibroblasts, *J. Dermatol. Sci.*, **64**(2), 134 (2011).
  24. K. R. Kwon, M. B. Alam, J. H. Park, T. H. Kim, and S. H. Lee, Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *Spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes, *Nutrients*, **11**(6), 1341 (2019).
  25. G. J. Fisher, S. Datta, Z. Q. Wang, X. Y. Li, T. Quan, J. H. Chung, S. W. Kang, and J. J. Voorhees, c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid, *J. Clin. Investig.*, **106**(5), 663 (2000).
  26. J. H. Chung, S. W. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **115**(2), 177 (2000).
  27. Y. M. Yoon, S. H. Bae, S. K. An, Y. B. Choe, K. J. Ahn, and I. S. An, Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **11**(3), 417 (2013).
  28. P. Limtrakul, S. Yodkeeree, W. Punfa, and J. Srisomboon, Inhibition of the MAPK signaling pathway by red rice extract in UVB-irradiated human skin fibroblasts, *Nat. Prod. Commun.*, **11**(12), 1877 (2016).
  29. C. H. Su, C. Y. Lin, C. H. Tsai, H. P. Lee, L. C. Lo, W. C. Huang, Y. C. Wu, C. L. Hsieh, and C. H. Tang, Betulin suppresses TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production in osteoarthritis synovial fibroblasts by inhibiting the MEK/ERK/NF- $\kappa$ B pathway, *J. Funct. Foods*, **86**, 104729 (2021).
  30. Y. J. Kim, J. E. Lee, H. S. Jang, S. Y. Hong, J. B. Lee, S. Y. Park, and J. S. Hwang, Oleanolic acid protects the skin from particulate matter-induced aging, *Biomol. Ther.*, **29**(2), 220 (2021).
  31. H. H. Kim, C. M. Shin, C. H. Park, K. H. Kim, K. H. Cho, H. C. Eun, and J. H. Chung, Eicosapentaenoic acid inhibits UV-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblasts, *J. Lipid Res.*, **46**(8), 1712 (2005).
  32. Y. F. Hong, H. Y. Lee, B. J. Jung, S. J. Jang, D. K. Chung, and H. G. Kim, Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* down-regulates UV-induced MMP-1 expression and up-regulates type I procollagen through the inhibition of reactive oxygen species generation, *Mol. Immunol.*, **67**(2), 248 (2015).
  33. L. Rittié and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **1**(4), 705 (2002).