

Extracts of *Chrysanthemum indicum* Linne Mediated Regulation of *MMP1* via JNK-AP1 Pathway

Young-Joo Kim

Division of Beauty Design, Osan University, Osan-si, Gyeonggi-do, Korea

Corresponding author: Young-Joo Kim,
Division of Beauty Design, Osan University, 45
Cheonghak-ro, Osan-si, Gyeonggi-do 18119,
Korea
Tel.: +82 31 370 2846
Fax: +82 31 370 2845
Email: blue@osan.ac.kr

Received August 17, 2016
Revised November 8, 2016
Accepted November 22, 2016
Published December 30, 2016



Abstract

Purpose: *Chrysanthemum morifolium* flower, *Chrysanthemum indicum* Linne (*C. indicum* Linne), contains various antioxidants which are used to care cold, headache, dizziness, and hypertension in Korea, China, and Japan. However, in dermis, effects of *C. indicum* Linne are not understood, currently. Thus, in present study, we suggest an evidence that *C. indicum* Linne decreases skin aging by regulating extracellular matrix of dermis. **Methods:** Dried *C. indicum* Linne was extracted with 70% ethanol and concentrations of this experiment were determined by cytotoxicity with MTT assay. Matrix metalloprotease 1 (*MMP1*) mRNA expression was confirmed by qRT-PCR and activity of AP1 promoter was measured with pGL-TRE luciferase reporter vector. Moreover, protein expression of JNK and p-JNK was assessed by western blot. **Results:** As shown results, we demonstrated that *C. indicum* Linne extracts decreased *MMP1* expression induced by oxidative stress. In addition, *C. indicum* Linne extracts repressed *MMP1* transcription by regulating AP1 transcriptional activity. Lastly, we demonstrated AP1 was regulated by blocking phosphorylation of JNK. Overall, *C. indicum* Linne extracts regulates *MMP1* expression using JNK-AP1 pathway. **Conclusion:** *C. indicum* Linne extracts has potential to reduce aging and formation of wrinkle and to use as a cosmetic ingredient.

Keywords: *Chrysanthemum indicum* Linne, Matrix metalloprotease 1, Extracellular matrix, Skin aging, Signal pathway

Introduction

피부는 시간에 따라 노화가 진행되는데 대표적으로 자외선과 같은 외부 자극에 의해서 일어나는 광노화와 노화가 진행됨에 따라서 일어나는 자연노화로 나눌 수 있다(Chung *et al.*, 1997; Rittié & Fisher, 2002). 광노화와 자연노화는 각각 다른 요인에 의해서 진행되기 때문에 특이한 특성을 가지며 노화가 진행되지만 공통적으로 주름이 발생한다는 특징을 가지고 있다(Fisher *et al.*, 2002). 주름의 생성은 복합적인 요인에 의해서 생성되지만 그 중 핵심적인 요인은 진피층의 extracellular matrix (ECM) 변형이다. ECM은 collagen type I이 70%이상 구성되어 있고, 그 외에 collagen type III, V, VII와 elastin, proteoglycans, fibronectin 등이 얽혀있는 구조를 하고 있다(Uitto, 1986; Bateman *et al.*, 1996). Collagen type I을 기반으로 ECM이 구성되어 있기 때문에 collagen type I의 생성과 분해의 조절불균형이 ECM 변형과 나아가서는 주름의

생성에 중요한 요인이 될 수 있다(Coulomb *et al.*, 1984; Fisher & Voorhees, 1998; Chung *et al.*, 1999). 이 중 collagen의 분해를 담당하는 matrix metalloprotease 1 (MMP1)은 자연노화 및 광노화에서 급격하게 증가되어 ECM의 변형과 주름 생성에 주요원인으로 알려져 있다(Uitto, 1986; Bateman *et al.*, 1996). 노화가 진행될 때 자외선 또는 reactive oxygen species (ROS)는 c-Jun N-terminal kinase (JNK)-activator protein 1 (AP1) 기전의 활성화를 유도하고 이를 통해서 MMP1의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(Fisher *et al.*, 1997; Westermarck *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 2002; Poulalhon *et al.*, 2006). 따라서 JNK-AP1 기전을 통한 MMP1 발현을 조절하는 활성물질에 대한 연구가 진행 중이며, 이를 통해서 ECM 변형을 막으려는 노력이 화장품 분야에서 진행 중이다(Dy *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 1999; Angel *et al.*, 2001; Varani *et al.*, 2001; Dasgupta *et al.*, 2010).

국화꽃은 다년생 초본으로 감국 또는 *Chrysanthemum indicum*

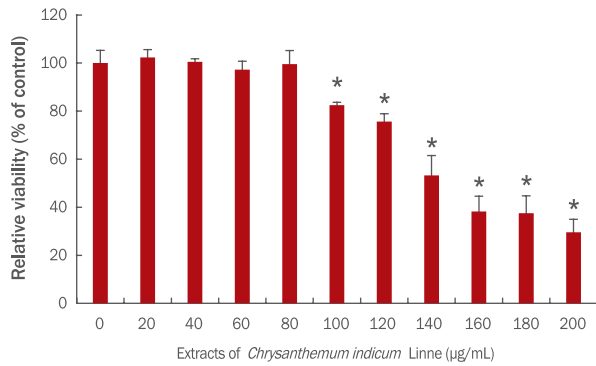


Figure 1. Cytotoxicity of extracts of *Chrysanthemum indicum* Linne in human dermal fibroblasts.

Effects of *Chrysanthemum indicum* Linne extracts on the cell viability were expressed as a percentage of control at the indicated concentrations. Values are mean±standard deviation (S.D.) from triplicate experiments. **p*<.05 compared with non-treated cells.

Linne라는 생약명으로 알려져 있으며, 한국, 일본, 중국 등 동북 아시아 지역에서 감기, 두통, 현기증, 고혈압 등에서 약재로 사용되고 있다(Park *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2011). 국화는 바이러스와 미생물 증식억제능력이 있고, 암세포의 성장을 저해할 뿐만 아니라(Nam & Yang, 1995), carbon tetrachloride 처리에 의한 간세포손상에 대해서 보호효과가 있는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2011). 또한 국화는 민간요법을 통해서 피부의 탄력과 아토피 개선에 효과적이라고 알려져 있지만 아직 관련된 효능 평가는 이뤄지지 않았다(An, 1998). 때문에 본 연구에서는 국화가 *MMP1*의 발현에 미치는 영향을 확인하고, 이에 대한 조절 기전을 규명하고자 한다.

Methods

1. 세포배양

인간진피섬유아세포(Lonza, Switzerland)는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 10% penicillin (Gibco, 100 units/mL), streptomycin (Gibco, 100 µg/mL)를 첨가하여서 세포를 배양하였고, 배양조건은 37°C, 95% 습도, 5% CO₂를 유지하는 배양기에서 배양하였다. 인간진피섬유아세포는 15세대 이하에서 collagen type I alpha 1 chain (COL1A1)과 *MMP1*의 발현이 양성대조군인 transforming growth factor beta (TGFβ; Sigma-Aldrich, USA)에 의해서 조절됨을 확인하였고, 이에 따라 3-15세대 사이의 인간진피섬유아세포를 이용하여 실험에 사용하였다.

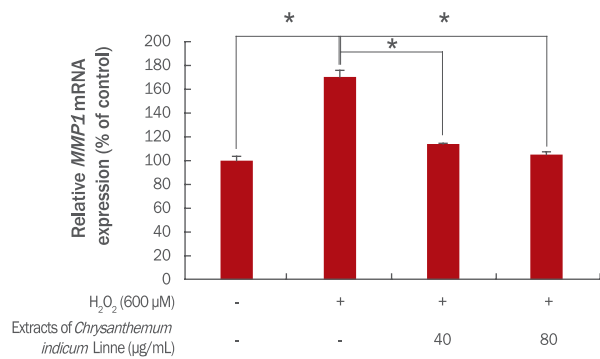


Figure 2. Effects of extracts of *Chrysanthemum indicum* Linne on *MMP1* mRNA expression in human dermal fibroblasts.

Data represents the protective effects of *Chrysanthemum indicum* Linne extracts on *MMP1* mRNA expression against H₂O₂ treatment. *MMP1* mRNA expression were normalized to β-actin. The results are expressed as the mean±S.D. from triplicate experiments. **p*<.05 compared with H₂O₂-treated cells.

2. 국화꽃 추출물 제조

국화꽃 추출물은 국화꽃을 세척하여 잘 건조하고, 건조 국화꽃을 분쇄기에 분쇄하여 사용하였다. 분쇄된 파우더 형태의 국화꽃 100 g을 1 L의 70% ethanol에 넣고 30 min 동안 침출 후 추출하였고, 추출 조건은 60°C의 온도 조건에서 1 h 초음파를 가하여 추출하였다. 추출 후 여과지(Whatman No.2; GE Healthcare Life Sciences, USA)를 통해서 고형분과 분리하였으며, 걸러진 추출액은 감압농축기(EYELA, Japan)와 동결건조기(Ilshin, Korea)을 통해서 용매를 제거하고 분말형태로 만들었다. 분말 국화꽃 추출물은 세포에 처리하기 위해서 100 mg/mL로 dimethyl sulfoxide (DMSO; Biopure, Canada)에 녹여서 실험에 사용하였다.

3. 세포독성실험

세포독성실험은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) assay를 통해서 수행하였다. 인간진피섬유아세포를 96 well에 각각 5×10³개씩 접종하여 24 h 동안 배양하였다. 배양된 인간진피섬유아세포에 국화꽃 추출물을 각각 0-200 µg/mL 처리하였다. 국화꽃 추출물을 처리하고 24 h 배양 후 0.5 mg/mL의 농도로 MTT를 처리해준다. 빛을 차단한 상태에서 37°C에서 4 h 동안 MTT가 환원되어 formazan을 생성하도록 반응시켜주고, 상층액을 제거해준다. 이후 MTT formazan을 DMSO로 녹여, 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. *MMP1* mRNA의 발현변화 확인

MMP1 mRNA의 발현변화는 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 이용해서 측정하였다. 인간진피섬유아세포

를 60 mm 배양접시에 5×10^5 개 접종하여 24 h 배양 후, H_2O_2 와 국화꽃 추출물을 각 조건 별로 처리하고, 다시 24 h 배양하였다. qRT-PCR을 하기 위해서 먼저 trizol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하고, 추출된 RNA 1 μ g을 $2 \times$ reverse transcriptase mix (Enzymomics, Korea)를 이용하여 complementary DNA (cDNA)로 합성하였다. 각각의 샘플에서 합성된 cDNA를 qRT-PCR premix와 혼합하여 LineGene K (Bioer, China)에서 qRT-PCR을 수행하였다. MMP1을 증폭하기 위해서 MMP1 forward primer (5'-CTTTCTGGAAGGGCAAGGAC-3')와 MMP1 reverse primer (5'-TTGCCTCCCATCATCTTCA-3')를 사용하였으며, normalization을 위해서 β -actin forward primer (5'-CGACAGGATGCAGAAGGAG-3')와 β -actin reverse primer (5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGA-3')를 이용하여 β -actin 증폭하였고, 이를 통해서 normalization을 하였다.

5. AP1 promoter 활성 측정

AP1의 활성은 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) responsive element (TRE)가 promoter에 삽입된 luciferase reporter vector를 이용하여서 수행하였다. 우선 luciferase reporter plasmid (pGL-TRE, 1 μ g)와 normalization plasmid (pCMV- β -gal, 0.2 μ g)을 동시에 Hilymix (Dojindo, Japan)로 인간진피섬유아세포에 형질전환을 하였고, 형질전환 후 국화꽃 추출물을 처리하고 24 h 뒤에 AP1 promoter의 활성을 측정하였다. 각각의 샘플을 $1 \times$ luciferase lysis buffer (Promega, USA)에 파쇄하고, 원심분리 후 상층액을 분리하여 AP1의 활성을 보기 위해서 reporter gene으로 사용된 luciferase의 활성을 보았다. Luciferase 활성은 luciferase reagent (Promega)을 이용하였고, luciferase에 의한 luminescence의 발광정도는 Luminometer (Veritas; Turner BioSystems, USA)를 이용하여 측정하였다. Normalization은 동일한 샘플에 β -galactosidase의 활성을 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) 처리하여 변색여부를 흡광도로 측정하여서 luciferase assay값을 보정하였다.

6. JNK 활성 측정

JNK의 활성변화를 보기 위해서 JNK와 인산화된 JNK를 western blot으로 측정하였다. 인간진피섬유아세포를 60 mm 배양접시에 5×10^5 개 접종하여 24 h 배양 후, H_2O_2 와 국화꽃 추출물을 각 조건 별로 처리하고, 다시 24 h 배양하였다. 각 샘플을 RIPA buffer [50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), protease inhibitor]로 단백질을 추출한 후, 동량의 단백질을 SDS-gel을 이용하여 분리하였다. 이 후 nitrocellulose membrane (Whatman)으로 옮겨 anti-JNK, anti-p-JNK (Cell Signaling

Technology, USA)와 β -actin (Sigma-Aldrich)를 이용하여 각각의 단백질을 검출하였다.

7. 통계처리

본 실험의 모든 실험은 3회 반복하여 진행하였고, 조건 간의 차이에 대한 유의성을 입증하는 방법으로 Student's t-test을 이용하였다. Student's t-test 결과 $p < .05$ 의 값을 유의성 있다고 판단하고, 유의적인 값에는 별표(*)를 하였다.

Results and Discussion

1. 인간진피섬유아세포에서 국화꽃 추출물의 세포독성 확인

인간진피섬유아세포에 국화꽃 추출물에 의한 세포독성을 확인하기 위해서, 국화꽃 추출물을 0-200 μ g/mL로 인간진피섬유아세포에 24 h 처리 후 세포 생존율을 측정하였다. 100 μ g/mL 이상의 농도에서 세포의 성장 억제가 농도의존적으로 일어나는 것을 확인하였고, 이에 따라 국화꽃 추출물의 독성이 없는 농도인 80 μ g/mL 이하에서 MMP1 발현 변화에 대한 효능 실험을 진행하였다(Figure 1).

2. 인간진피섬유아세포에서 국화꽃 추출물의 산화적 스트레스에 의해 유도된 MMP1 발현 조절 확인

인간진피섬유아세포에서 국화꽃 추출물에 의한 MMP1의 발현 조절을 확인하기 위해서, H_2O_2 로 산화적 스트레스를 유발시켜서 MMP1의 발현을 증가시키고, 동일 조건에서 국화꽃 추출물을 처리하였을 때 추출물에 의해서 MMP1의 발현이 감소되는지 확인하였다. Figure 2를 보면 인간진피섬유아세포에 600 μ M H_2O_2 를 처리하였을 때 MMP1의 발현이 170.28%로 증가하였고, 동일한 조건에서 국화꽃 추출물을 농도별로 처리한 결과 40 μ g/mL 국화꽃 추출물에서 114.06%, 80 μ g/mL 국화꽃 추출물에서 105.08%로 감소하였다.

3. 인간진피섬유아세포에서 국화꽃 추출물에 의한 TRE의 활성 변화

인간진피섬유아세포에서 산화적 스트레스에 의해서 MMP1의 발현이 조절될 때 JNK-AP1 pathway를 통해서 MMP1의 발현을 조절하는 것이 가장 대표적인 기전이다(Park *et al.*, 2003). 때문에 본 논문에서도 AP1의 target promoter인 TRE의 활성 변화를 확인함으로써 AP1의 전사 활성이 국화꽃 추출물에 의해서 조절되는지 확인하였다(Risse *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2003). 인간진피섬유아세포에 TRE-luciferase를 형질전환 후 600 μ M H_2O_2 처리하여 산화적 스트레스가 유발됨에 따라 TRE 활성이 증가됨을 확인하였다. 동일한 조건에서 국화꽃 추출물을 농도별로 처리한 결과 대조군인 H_2O_2 처리군(293.54%)에 비해서 40 μ g/mL 국화꽃 추출물에서 152.34%, 80 μ g/mL 국화꽃 추출물에서 109.54%로 감소하였다(Figure 3).

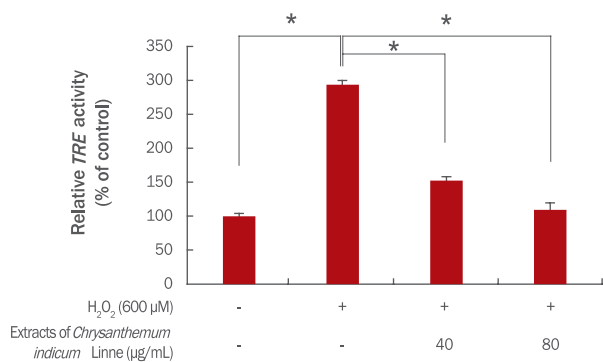


Figure 3. Effects of extracts of *Chrysanthemum indicum* Linne on promoter activity of *TRE* in human dermal fibroblasts. *TRE* activity was estimated by using *TRE*-luciferase reporter assay. *TRE* activity were normalized to β -galactosidase. The graphs are expressed as the mean \pm S.D. from triplicate experiments. * p <.05 compared with H₂O₂-treated cells.

4. 인간진피섬유아세포에서 국화꽃 추출물에 의한 JNK의 활성변화

국화꽃 추출물이 AP1의 활성 저해를 통해서 *TRE* 활성을 조절함을 확인하고, 이에 따라 AP1활성을 조절하는 상위의 분자신호기전인 JNK의 활성을 확인하였다(Karin, 1995; Leppä *et al.*, 1998). 인간진피섬유아세포에 국화꽃 추출물 처리시에 600 µM H₂O₂를 처리하여 JNK의 활성을 인산화를 통해서 확인해본 결과, 산화적 스트레스에 의해 JNK의 인산화가 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 국화꽃 추출물에 의해서 JNK의 인산화가 감소됨을 확인할 수 있었다. 따라서 본 논문을 통하여 산화적 스트레스 상황에서 국화꽃 추출물의 *MMP1* 조절 작용을 확인하였고, 이러한 조절기전이 JNK-AP1 기전에 의해서 유발됨을 확인할 수 있었다. 또한 이를 통해서 산화적 스트레스가 유발되는 다양한 노화에서 국화꽃 추출물이 항주름 또는 항노화 화장품으로서 사용될 수 있는 가능성을 제시해 주었다(Figure 4).

Conclusion

국화꽃 추출물은 각종 항산화 물질과 항염증, 항암, 항균, 아토피 개선 등 다양한 작용이 밝혀져 있고, 향이 뛰어나기 때문에 차로도 즐겨 마신다. 하지만 피부노화에 대해서는 아직 명확하게 밝혀진 것이 없다. 때문에 본 논문에서는 국화꽃 추출물의 항노화 기전에 대해서 확인하고자 하였다. 본 논문의 결과에서 보는 것과 같이 국화꽃 추출물은 80 µg/mL 이하에서 세포의 독성이 없는 것으로 확인하였으며, 80 µg/mL 이하의 농도에서 산화적 스트레스에 의한 *MMP1* 발현 증가를 다시 원상태로 회복하는 것을 확인하였다. 또한 AP1의 binding site인 *TRE*을 이용하여 산화적 스트레스에 의한 *MMP1* 발현 조절의 전사인자로 작용하는 AP1의 활성을 측

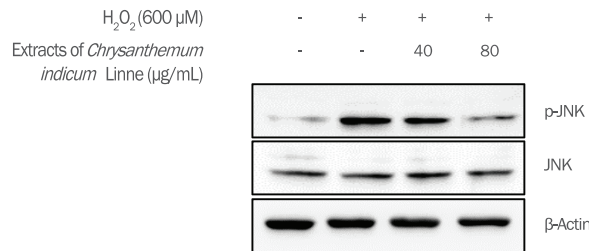


Figure 4. Effects of extracts of *Chrysanthemum indicum* Linne on JNK phosphorylation in human dermal fibroblasts.

JNK and p-JNK protein expression were assessed by using western blot assay. β -Actin served as an internal control, and different concentrations of *Chrysanthemum indicum* Linne extracts (0, 40, and 80 µg/mL) were treated in human dermal fibroblasts.

정하였다. 측정결과 산화적 스트레스에 의해서 증가하였던 전사활성이 국화꽃 추출물에 의해서 감소하는 것을 확인하였다. 또한 산화적 스트레스 상황에서 AP1에 c-Jun을 조절하여 AP1의 전사활성을 조절하는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)인 JNK의 활성을 인산화를 확인하여 측정하였다. 그 결과 국화꽃 추출물은 산화적 스트레스에 의해 증가된 JNK의 인산화가 감소됨을 확인할 수 있었다. 종합적으로 보았을 때 국화꽃 추출물은 산화적 스트레스에 의한 JNK 인산화를 감소시켜 AP1의 활성을 감소시키고, 이를 통해서 *MMP1*의 발현을 조절함을 알 수 있다. 광노화, 자연노화 같은 피부노화에서 피부세포 내부에서는 산화적 스트레스가 유발되고 지속적인 산화적 스트레스에 의해서 *MMP1*의 발현은 증가되어 있다. 때문에 본 논문을 통해서 광노화 또는 자연노화에서 국화꽃 추출물은 JNK-AP1 pathway를 억제하여 *MMP1*을 조절함으로써 피부의 노화억제를 유도할 수 있는 새로운 화장품 원료임을 알 수 있다.

Acknowledgements

이 논문은 2016년도 오산대학교 교내 학술비지원에 의해서 수행됨.

References

An DG. Illustrated book of Korean medicinal herbs. Kyohak Publishing, Seoul, pp1-115, 1998.

Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*, 20: 2413-2423, 2001.

Bateman JF, Lamandé SR, Ramshaw JA. Collagen superfamily. In: Extracellular matrix. Comper WD (ed.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp22-67, 1996.

- Chung HY, Kim HJ, Shim KH, Kim KW. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process: role of cyclooxygenase-2. *Mechanisms of Ageing and Development*, 111: 97-106, 1999.
- Chung JH, Youn SH, Kwon OS, Cho KH, Youn JI, Eun HC. Regulations of collagen synthesis by ascorbic acid, transforming growth factor-beta and interferon-gamma in human dermal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel are photoaging- and aging-independent. *Journal of Dermatological Science*, 15: 188-200, 1997.
- Coulomb B, Dubertet L, Merrill C, Touraine R, Bell E. The collagen lattice: a model for studying the physiology, biosynthetic function and pharmacology of the skin. *British Journal of Dermatology*, 111: 83-87, 1984.
- Dasgupta J, Kar S, Liu R, Joseph J, Kalyanaraman B, Remington SJ, Chen C, Melendez JA. Reactive oxygen species control senescence-associated matrix metalloproteinase-1 through c-Jun-N-terminal kinase. *Journal of Cellular Physiology*, 225: 52-62, 2010.
- Dy LC, Pei Y, Travers JB. Augmentation of ultraviolet B radiation-induced tumor necrosis factor production by the epidermal platelet-activating factor receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 26917-26921, 1999.
- Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of Dermatology*, 138: 1462-1470, 2002.
- Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin *in vivo*. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 3: 61-68, 1998.
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *The New England Journal of Medicine*, 337: 1419-1428, 1997.
- Gross S, Knebel A, Tenev T, Neininger A, Gaestel M, Herrlich P, Böhmer FD. Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 26378-26386, 1999.
- Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 16483-16486, 1995.
- Lee HJ, Hwang YI, Park E, Choi SU. Antihepatotoxic and antigenotoxic effects of herb tea composed of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 40: 78-83, 2011.
- Leppä S, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *The EMBO Journal*, 17: 4404-4413, 1998.
- Nam SH, Yang MS. Antibacterial activities of extracts from *Chrysanthemum boreale* M. *Applied Biological Chemistry*, 38: 269-272, 1995.
- Park KK, Jung E, Chon SK, Seo M, Kim HW, Park T. Finding of TRE (TPA responsive element) in the sequence of human taurine transporter promoter. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 526: 159-166, 2003.
- Park NY, Kwon JH, Kim HK. Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Chrysanthemum morifolium* by response surface methodology. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 30: 1189-1196, 1998.
- Poulalhon N, Farge D, Roos N, Tacheau C, Neuzillet C, Michel L, Mauviel A, Verrecchia F. Modulation of collagen and MMP-1 gene expression in fibroblasts by the immunosuppressive drug rapamycin. a direct role as an antifibrotic agent? *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 33045-33052, 2006.
- Risse G, Jooss K, Neuberger M, Brüller HJ, Müller R. Asymmetrical recognition of the palindromic AP1 binding site (TRE) by fos protein complexes. *The EMBO Journal*, 8: 3825-3832, 1989.
- Rittié L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews*, 1: 705-720, 2002.
- Uitto J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis. age-related alterations in collagen and elastin. *Dermatologic Clinics*, 4: 433-446, 1986.
- Varani J, Spearman D, Perone P, Fligiel SE, Datta SC, Wang ZQ, Shao Y, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen *in vitro*. *The American Journal of Pathology*, 158: 931-942, 2001.
- Westermarck J, Holmström T, Ahonen M, Eriksson JE, Kähäri VM. Enhancement of fibroblast collagenase-1 (MMP-1) gene expression by tumor promoter okadaic acid is mediated by stress-activated protein kinases Jun N-terminal kinase and p38. *Matrix Biology*, 17: 547-557, 1998.

국문초록

JNK-AP1 기전을 통한 국화꽃 추출물의 *MMP1* 발현 변화 조절

김영주

오산대학교 뷰티디자인계열, 경기도 오산시, 한국

목적: 국화꽃은 다양한 항산화 물질을 내포하고 있어 한국, 중국 일본 등지에서 예로부터 감기, 두통, 어지러움, 고혈압 등에 사용되어 왔다. 그러나 지금까지 피부 진피에 국화꽃이 미치는 영향에 대해서는 잘 알려지지 않았다. 따라서 본 연구진은 실험을 통해, 국화꽃이 진피층의 세포외기질을 조절하여 피부노화를 경감시킬 수 있음을 제시하였다. **방법:** 실험에 사용한 국화꽃 추출물은 건조한 국화꽃을 분쇄하여 70% ethanol을 사용하여 침출하였고, MTT assay를 통해 세포독성실험과 이후 실험에 사용할 농도를 정하였다. qRT-PCR을 이용하여 *MMP1*의 mRNA 발현 변화를 확인하였으며, pGL-TRE luciferase reporter vector를 활용하여 AP1의 promoter 활성을 측정하였다. JNK와 p-JNK의 단백질 발현은 western blot을 통해 확인하였다. **결과:** 실험을 통해 국화꽃 추출물이 산화적 스트레스가 유도하는 *MMP1* 발현을 감소시키는 것을 증명하였으며 더불어, 이러한 현상이 국화꽃 추출물이 *MMP1*의 상위조절인자인 AP1의 전사활성을 조절하는 것으로부터 야기됨을 밝혔다. 마지막으로 AP1이 JNK의 인산화를 저해하는 기작으로부터 조절되는 것을 증명하여 종합적으로 국화꽃 추출물이 JNK-AP1 경로를 통해 *MMP1*의 발현을 조절하는 것을 입증하였다. **결론:** 본 연구를 통해 국화꽃 추출물이 노화와 주름생성을 경감시킬 수 있는 잠재적인 화장품 원료로서의 가능성을 확인하였다.

핵심어: 국화꽃, Matrix metalloprotease 1, 세포외기질, 피부노화, 신호전달기전

이 논문은 2016년도 오산대학교 교내 학술비지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

- 박난영, 권중호, 김현규. 반응표면분석에 의한 소국(小菊) 에탄올 추출물의 추출조건 최적화. *한국식품과학회지*, 30: 1189-1196, 1998.
- 안덕균. (원색)한국본초도감. 교학사, 서울, pp1-115, 1998.
- 이현정, 황용일, 박은주, 최선옥. 국화차를 포함하는 허브차의 CCl_4 로 유도된 간세포손상 보호 및 항유전독성 효과. *한국식품영양과학회지*, 40: 78-83, 2011.

中文摘要

研究JNK-AP1 信号通路探索菊花提取物的MMP1 表达调节

金英珠

烏山大學校 美容设计系列, 京畿道 烏山市, 韩国

目的: 菊花含有多种抗氧化物质, 在韩国、中国、日本等国家, 从以前开始用于治疗感冒, 头痛, 头晕, 高血压。但直到现在, 还未查清菊花对皮肤真皮的影响。因此通过研究, 提出菊花具有调节真皮层的细胞外基质, 减少皮肤老化的功效。

方法: 实验中使用的菊花提取物是通过粉碎干燥的菊花, 然后利用 70% 乙醇对其进行提取。通过MTT assay 测定细胞毒性, 决定了菊花提取物的使用浓度。利用 qRT-PCR 确认 *MMP1* 的表达变化, 利用 pGL-TRE luciferase reporter vector 测定 AP1 的 promoter 活性, 利用 western blot 确认 JNK 和 p-JNK 的蛋白质表达。**结果:** 通过实验菊花提取物降低氧化应激诱导的 *MMP1* 表达, 产生这种现象的原因是菊花提取物调节 *MMP1* 上位调节因子 AP1 的转录。而 AP1 阻断 JNK 的磷酸化, 因此菊花提取物通过 JNK-AP1 途径调节 *MMP1* 的表达。**结论:** 通过研究菊花提取物作为潜在的化妆品原料时, 具有降低老化和皱纹产生的功效。

关键词: 菊花, Matrix metalloprotease 1, 细胞外基质, 皮肤老化, 信号通路

