Suppression of Matrix Metalloproteinase-3 Expression in Human Dermal Fibroblasts by Decursin from *Angelica gigas* Nakai Root Extracts Fermented with Jeju Lava Seawater

Jungwook Kang¹, Garam Nam², Yeahwa Yoon², Gyeongmi Kim², Sowon Bae², Hyunjeong Lee², Seunghee Bae², Youngkwon Cha³, Hyundae Cho³, Hangeui Cho^{2,3*}

¹Industry-Academic Collaboration Foundation, Seowon University, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, Korea

²Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, Seoul, Korea

³Creative Innovation Research Center, Cosmecca Korea, Co. Ltd., Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea

*Corresponding author: Hangeui Cho,
Creative Innovation Research Center,
Cosmecca Korea, Co. Ltd., 6th Floor,
ABN Tower, 331 Pangyo-ro, Bundang-gu,
Seongnam-si, Gyeonggi-do 13488, Korea
Tel.: +82 2 784 6551
Fax: +82 2 628 2290
Email: bioche1975@cosmecca.com

Jungwook Kang, Garam Nam and Yeahwa Yoon contributed equally to this work.

Received December 30, 2020

Revised January 25, 2021

Accepted February 2, 2021

Published March 30, 2021

Abstract

Purpose: This study aims to understand the role *Angelica gigas* (A. *gigas*) Nakai root extract (AGNRE) fermented with Jeju lava seawater in collagenase suppression in human dermal fibroblasts, and identify the major active compound responsible for its suppressive effect. **Methods:** AGNREs were prepared by fermentation with Jeju lava water at low temperature and analyzed for identifying the major active compound in these fermented root extracts using high-performance liquid chromatography (HPLC). Water-soluble tetrazolium salt (WST-1) assay and real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were performed to investigate the cell viability and expression level of collagenase gene. Comparative experiments were performed using AGNREs and decursin to confirm the downregulation of collagenase expression and analyze the correlation between them. **Results:** HPLC analysis revealed decursin to be the major active compound in AGNREs. Analysis of data obtained by WST-1 assays at concentration of 200 µg/mL for AGNREs and <20 µM for decursin did not show any cytotoxicity in human dermal fibroblasts. qRT-PCR analysis revealed that AGNREs as well as decursin downregulated the expression of matrix metalloproteinase-3 (MMP3) gene in human dermal fibroblasts. **Conclusion:** These analyses suggest that AGNREs fermented with Jeju lava water as well as decursin isolated from these extracts hold a great potential to be applied as functional anti-wrinkle agent in cosmetic.

Keywords: *Angelica gigas* Nakai, Decursin, Collagenase, Jeju lava seawater, Dermal fibroblasts

Introduction

한국에서 서식하는 당귀인 참당귀(*Angelica gigas* Nakai, A. *gigas*)는 산형과(Umbelliferae) 당귀속(*Angelica* L.)에 속한다(Sarker & Nahar, 2004). 당귀속에는 60종 이상이 속해 있으며 중국, 일본, 한국과 같은 아시아 국가에서 한약재나 음식 재료로 사용되었다(Sarker & Nahar, 2004). 당귀속 식물의 화학적 구성 성분은 광범위하게 연구되었다. Pyranocoumarin계 화합물은 에탄올이나 메탄올로 추출한 참당귀에서 발견되는 주요 물질이다(Zhang *et al.*, 2012). Pyranocoumarin계 화합물들 중에서 가장 많은 비율을 차지

하는 decursin은 1960년대에 바다나물(*Angelica decursiva* Fr. et Sav.)의 뿌리에서 처음으로 분획되었고(Konoshima *et al.*, 1968) 이후 참당귀에서 분리되었다(Hata & Sano, 1969). 그 외에도 참당귀는 decursinol, decursinol angelate 등을 함유하고 있다(Zhang *et al.*, 2012). 참당귀 추출물과 decursin은 항산화, 항암(Choi *et al.*, 2011), 항염증(Son *et al.*, 2009a), 혈액순환 개선(Kim & Rhyu, 2010; Kim *et al.*, 2009a), 항비만(Hwang *et al.*, 2012) 등의 분야에서 많은 연구들이 진행되어 왔다(Zhang *et al.*, 2012).

심해수(deep sea water)는 심해 지역의 500–600 m 이상 깊이에서 끌어올리는 수자원으로, 심해수를 구성하는 다양한 미네랄 성분

Figure 1. Process of isolating *Angelica gigas* Nakai root extracts and high-performance liquid chromatography.

Angelica gigas Nakai root was ground and fermented in Jeju lava water at 4 °C. After 14 days, *Angelica gigas* Nakai root was extracted with 70% ethanol at 60 °C for 5 h, concentrated on pressure reduction after adding 10% NaHCO₃ solution, and then stirred at high temperatures. The extract was filtered using a Whatman No. 2 filter paper, and the solvent was removed by decompression. This extract was frozen and stored at -20 °C.

으로 인해 심혈관 질환, 당뇨병, 비만, 암 증상에 긍정적인 영향을 끼친다는 연구 보고가 있다(Song *et al.*, 2020). 본 연구에 사용된 제주 용암해수는 심해수와 유사한 광물 성분을 가지는 한편, 약 100–200 m의 지하에서 얻어지기에 심해수에 비해 더 경제적으로 이점을 가진다(Noh *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2019). 제주 용암해수는 제주에서만 얻을 수 있는 자원으로 화산 암반층에 바닷물이 자연 여과되어 만들어진다. 그로 인해 일반적인 수자원보다 칼슘, 마그네슘, 셀레늄, 게르마늄 등의 필수 미네랄과 철, 망간, 아연 등의 유용한 미네랄을 다량으로 함유하고 있다(Bae *et al.*, 2012). 이러한 미네랄 성분을 포함하는 제주 용암해수의 식이 섭취를 통해 항산화, 항염 효능을 보고한 연구 결과도 존재한다(Kim *et al.*, 2020a). 제주 용암해수는 피부의 보습 효능 또한 가진다고 알려져 있다(Lee *et al.*, 2016). 각질 형성세포에서 제주 용암해수는 피부 내 천연보습인자 생성을 증가시키고 수분의 수송과 관련된 막 단백질의 발현 역시 증가시킨다고 보고되어 있다(Lee *et al.*, 2016). 또한, 제주 용암해수를 처리한 인간 피부 모델에서 각질층의 두께 증가로 인하여 피부장벽능이 강화된 것을 확인할 수 있다(Lee *et al.*, 2016).

피부 노화는 생물학적으로 피할 수 없는 유기체의 과정이며 내인적 요인과 외인적 요인에 의해 유발된다(Im *et al.*, 2019). 연령에 따른 노화인 내인성 피부 노화는 인체 내부의 생리적 요인에 의

하여 발생하며, 외인성 노화는 자외선 조사, 흡연, 대기 오염 등 많은 외부 요인의 영향을 받아 발생한다(Im *et al.*, 2019). 이러한 요인들은 주름, 색소 침착 및 피부의 두께 감소를 일으킬 수 있다(Im *et al.*, 2019). 콜라겐은 진피 조직의 탄력과 관련되어 있고, 피부 노화의 대표적 증상인 주름은 콜라겐 양의 감소로 인해 발생한다(Kim *et al.*, 2016). 성인의 진피층은 콜라겐 타입 I이 80–85%, 콜라겐 타입 III이 10–15%의 비율로 구성되어 있으며, 이 외에도 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans, GAGs)과 엘라스틴 섬유질이 포함되어 있다(Baumann *et al.*, 2006). 콜라겐은 피부 탄력과 밀접한 연관이 있으며 외부 자극에 대항하여 장력을 제공한다. 또한, 피부의 구조적 골격을 유지하여 피부 형태 유지에 중추적인 역할을 한다(Kim *et al.*, 2016; Jang, 2018). 이러한 콜라겐 타입 I, 타입 III은 진피 섬유아세포에 의해 α-프로콜라겐으로 합성된다(Baumann *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2019). 외부적인 요인에 의한 세포의 기질의 손상은 광노화의 특징으로, 자외선으로 인한 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현 증가는 콜라겐 손상을 야기하고 이는 광노화로 이어진다(Baumann *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2018a; Kim *et al.*, 2020b). MMPs는 세포의 기질의 대부분 구성물질들을 분해할 수 있는 효소로(Brennan *et al.*, 2003), collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane-type MMPs로 구분된

다(Philips *et al.*, 2011). 콜라겐분해효소(collagenase)에 속하는 MMP1, MMP8, MMP13은 콜라겐 타입 I, 타입 III의 분해에 관여하며, MMP1이 가장 주요하게 콜라겐을 분해한다(Brennan *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2018b). Stromelysins 중 하나인 MMP3은 광범위하게 콜라겐을 포함한 세포외 기질의 단백질을(프로테오글리칸, 기저막 콜라겐, 매트릭스 당 단백질)을 분해하는 효소이다(Philips *et al.*, 2011). 따라서 피부의 주름을 개선하기 위해서는 MMP3과 같은 콜라겐분해효소의 발현 및 생합성을 조절하는 것이 중요하다(Kim *et al.*, 2016).

본 연구에서 고성능 액체 크로마토그래피를 통해 참당귀 뿌리 추출물 내의 주요 지표 성분으로서 decursin의 함유율을 확인하였다. 또한 decursin의 콜라겐분해효소 발현 감소 효과와 그에 따른 참당귀 뿌리 추출물의 콜라겐분해효소 발현 감소 효과를 실험적으로 증명하였다. 이를 통해 참당귀 뿌리 추출물에 의한 콜라겐분해효소 발현 변화를 확인하고 나아가 참당귀 뿌리 추출물 및 decursin의 새로운 주름개선용 기능성화장품 원료로서의 가능성을 제시하고자 한다.

Methods

1. 참당귀 뿌리 추출물의 제조

참당귀 뿌리 추출물 제조에 사용된 참당귀는 충북 제천에서 수집 및 가공한 참당귀를 구입((주)토종마을, Korea)하여 사용하였다. 참당귀 뿌리를 분쇄한 시료 중량의 10배의 양으로 제주 용암해수(제주테크노파크 용암해수센터, Jeju, Korea)를 넣어 침지시킨 후, 5°C에서 7일간 저온 숙성하였다. 그 후 제주 용암해수를 제거한 시료에 70% 에탄올을 넣고 60°C에서 5 h 동안 가온 추출 후, 감압 농축(EYELA; Rotary evaporator, Japan)하여 얻어진 수득물에 10% NaHCO₃ 수용액을 넣고 고온에서 교반하였다. 추출물은 여과지(Whatman No. 2; All for LAB, Korea)를 이용하여 여과한 후 감압 농축하여 용매를 제거하였다. 이후 동결 건조하여 -20°C에 보관하

여 본 실험의 시료로 사용하였다(Figure 1).

2. 고성능 액체 크로마토그래피를 통한 지표물질 탐색

참당귀 뿌리 추출물에서 단일물질인 decursin의 함유 여부를 확인하기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피 분석방법을 사용하였다. 표준 용액은 decursin 표준물질(SML0786; Sigma-Aldrich, USA) 1.0 mg을 정밀 측정하여 85% methanol 1 mL을 이용하여 녹인 후, PVDF 0.45 µm 필터(Whatman GmbH, Germany)로 여과하여 표준용액으로 하였다(1000 µg/mL). 시험 용액의 경우, 참당귀 뿌리 추출물 10.0 mg을 정밀하게 측정해 이를 85% methanol 10 mL을 이용하여 녹인 후 PVDF 0.45 µm 필터로 여과하여 제조하였다(1.0 mg/mL). 이후 Alliance 2695 HPLC-PDA (2996) System (Waters Corp., USA)을 이용하여 컬럼 온도 30°C, 주입량 10 µL, 이동속도 분 당 1.0 mL의 조건으로 분석하였다. 이후, 특이성, 정확성, 정밀성 시험을 통해 분석법의 유효성을 검증하였다.

3. 세포주 배양

본 연구에서 사용된 인간 진피섬유아세포(Human BJ-tert fibroblasts)는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 동결상태로 구입한 Human BJ fibroblasts를 tert-immortalized 하여 사용하였다. 인간 진피섬유아세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Biowest, France)을 포함시킨 high glucose Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Biowest)배지를 사용하였고, 그 외에 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS; Welgene, Korea)와 37°C, 5% CO₂의 조건으로 세포배양기(Thermo Fisher Scientific, USA)에서 배양하였다.

4. 세포 생존율 측정

참당귀 뿌리 추출물과 decursin의 세포 독성 측정은 water-soluble tetrazolium salt (WST-1) assay (EZ-cytox cell viability kit; ITSBio, Korea) 법을 통해 진행하였다. Human BJ-tert

Table 1. List of primers for real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Gene	Sequence (5' to 3')	
COL1A1	Forward	GAGAGCATGACCGATGGATT
	Reverse	CCTTCTTGAGGTGCCAGTC
MMP1	Forward	GGGCTTGAAGCTGCTTACGA
	Reverse	ACAGCCCAGTACTTATCCCTTTG
MMP3	Forward	ATGCCCACTTTGATGATGATGAAC
	Reverse	CCACGCCTGAAGGAAGAGATG
GAPDH	Forward	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
	Reverse	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

COL1A1, collagen type I alpha 1 chain; MMP1, matrix metalloproteinase 1; MMP3, matrix metalloproteinase 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Figure 2. HPLC analysis of *Angelica gigas* Nakai root extracts and the chemical structure of decursin.

(A) HPLC chromatogram (254 nm) of a test solution (250 µg/mL; diluted standard solution); (B) HPLC chromatogram (254 nm) of a test solution for the preparation of linearity (dimension line); (C) The chemical structure of decursin.

fibroblasts를 96 well plate에 각 well당 3.0×10^3 cells씩 분주하여 세포배양기에서 24시간 배양하였다. 이후, 참당귀 뿌리 추출물은 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 µg/mL로, decursin은 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100 µM로 각각 처리하여 세포배양기에 배양하였다. 24시간 후, WST-1 solution을 처리하여 반응시킨 후, iMark Microplate Absorbance Reader (#1681130; Bio-Rad, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference 흡광도는 650 nm에서 측정하여 결과값을 도출하였다.

5. qRT-PCR을 이용한 유전자 발현 분석

진피 섬유아세포에서 참당귀 뿌리 추출물과 decursin 처리에 따른 콜라겐 및 콜라겐분해효소의 발현 변화를 정량적으로 확인하기 위해 qRT-PCR을 이용하여 mRNA 발현 분석을 진행하였다. *COL1A1*, *MMP1*, *MMP3*의 발현을 확인하는 실험의 양성대조군으로는 transforming growth factor- β (TGF- β ; Sigma-Aldrich) 5 ng/mL를 사용하였으며, -80°C 에서 보관하였다. Human BJ-tert fibroblasts에 시료를 처리한 후, Ribo ex TM total RNA isolation solution (GeneAll Biotechnology, Korea)와 scraper를 이용하여 세포를 용해하였다. 이 용액에 클로로포름(Sigma-Aldrich)을 Ribo ex 용액의 1/5의 양만큼 넣어 원심 분리(12000 rpm, 4°C)하였다. 이후 RNA가 있는 상층액을 분리하여 아이소프로판올(Merckmillipore,

Germany)을 상층액과 동량 넣어 inverting 후 원심분리(12000 rpm, 4°C)하였다. RNA를 침전시켜 침전물을 제외한 상층액은 버리고 남아있는 침전물에 70% 에탄올(Merckmillipore)을 넣어 원심 분리(12000 rpm, 4°C)하여 세척하였다. 이후, 에탄올을 제거하고 nuclease free water (Affymetrix, USA)로 용해하여 total RNA를 추출하였다. MaestroNano Micro-volume Spectrophotometer (MN-913; Maestrogen, USA)를 이용하여 A260/A280 파장에서 RNA의 순도와 농도를 측정한 뒤, 260 nm와 280 nm의 비가 약 2.2임을 확인하였다. M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA)와 oligo dT (Bionics, Korea), dNTP (Takara, Japan)를 사용하여 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. qRT-PCR은 denaturation (95°C , 15 min) 후 denaturation (95°C , 15 s), annealing (60°C , 30 s), polymerization (72°C , 30 s) 과정을 40 cycles 반복하여 반응시켜 측정하였다. 유전자의 threshold cycle (Ct)값을 GAPDH 발현에 대한 Ct값으로 표준화한 후, Ct값의 변화량을 비교하여 상대적인 유전자의 발현 정도를 정량 분석하였다. 실험에 사용했던 유전자 primer 정보는 Table 1과 같다.

6. 통계분석

모든 실험은 독립적으로 3회 반복하여 진행하였고, 통계분석 데이터는 평균값 $\pm$ 표준편차 (Mean $\pm$ Standard Deviation, SD)로 나타내

Figure 3. The cell viability assay for analyzing the effect of *Angelica gigas* Nakai root extracts and decursin on human dermal fibroblasts.

Human BJ-tert fibroblasts (3×10^3) were seeded and treated with indicated doses of the: (A) *Angelica gigas* Nakai root extracts and (B) decursin for 24 h separately. WST-1 assay was conducted to evaluate the cell viability. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. from three independent experiments. AGNRE, *Angelica gigas* Nakai root extract; TGF- β , transforming growth factor-beta. * $p < 0.05$ indicates statistical significance.

었다. 데이터 통계처리를 위해 Student's *t*-test 분석(양측분석, 등분산 조건)을 이용하였다. 이를 통해 구한 **p*-value 값이 0.05미만인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

Results and Discussion

1. 제주 용암해수 저온추출법으로 추출한 참당귀 추출물 내 지표 성분 분석

제주 용암해수는 제주 지형의 특성을 이용하여 얻어지며, 다른 지하해수에 비해 경제적이고 당뇨, 심장질환, 비만 등의 증상 완화에 도움이 되는 많은 미네랄을 함유하고 있어 이로운 천연자원으로 각광받고 있다(Noh *et al.*, 2010). 이러한 제주 용암해수로 저온에서 숙성하여 추출한 참당귀 뿌리 추출물을 본 연구에 사용하였다.

참당귀 뿌리 추출물(Sample 20190810, Sample 20190908, Sample 20190927) 내 지표물질을 분석하기 위해 고성능 액체 크로마토그래피 실험법을 사용하였다. 분석 결과, 참당귀 뿌리 추출물 내에서 주요한 peak 2개가 검출되었으며, 이는 decursin의 표준용액(250 µg/mL로 희석)의 peak와 동일함이 확인되었다(Figure 2A, 2B).

분석법의 유효성을 검증하기 위하여 특이성 시험, 정확성 시험, 정밀성 시험을 수행하였고 참당귀 뿌리 추출물의 지표성분인 decursin 정량에 대한 유효성 검증이 올바르게 수행되었음을 확인하였다. 3개의 로트의 참당귀 뿌리 추출물(Sample 20190810, Sample 20190908, Sample 20190927)의 decursin 함량을 측정된 결과 최저 함량은 441.32 mg/g, 최고 함량은 457.67 mg/g로 확인되었으며, 평균 함량은 451.22 mg/g이었다(data not shown).

Decursin은 pyranocoumarin 구조를 기본으로 한 유도체이다.

Decursin은 decursinol의 OH기 대신에 senecioylic acid가 치환되어 있는 3-methyl-but-2-enoic acid 2,2-dimethyl-8-oxo-3,4-dihydro-2H,8H-pyrano[3,2-g]chromen-3-yl ester이다. 분자식은 $C_{19}H_{20}O_5$, 분자량은 328.36 g/mol로서 decursinol angelate와 구조 이성질체이다(Figure 2C). Decursin의 규명된 약리 효과로는 종양 억제, 박테리아 성장 억제, 순환계 질환 개선, 대사 효소 억제, 항염증, 항산화, 인지 개선 효과 등이 있다(Son *et al.*, 2009b). Decursin과 같은 쿠마린 성분은 강력한 잔틴산화효소 억제 효과가 있다(Chang & Chiang, 1995)는 연구보고가 있기에, 이미 알려진 약리 효과들 외에도 보고되지 않은 다양한 효능이 존재할 것으로 생각된다.

2. 참당귀 뿌리 추출물과 decursin의 세포 독성(cytotoxicity) 평가

인간 진피섬유아세포는 세포의 기질과 콜라겐을 합성하는 세포의 일종으로, 상피세포 분화 조절, 염증 조절, 조직 손상에 대한 면역 반응 등의 기능을 한다. 추가적으로, 상처 치유에도 중요한 역할을 한다(Kalluri & Zeisberg, 2006).

참당귀 뿌리 추출물과 decursin에 대한 인간 진피섬유아세포 내 콜라겐 및 콜라겐분해효소 발현 변화를 확인하기에 앞서, 세포에 처리했을 때 나타나는 세포 독성도 및 독성 유발 농도를 확인하였다. Human BJ-tert fibroblasts를 대상으로 참당귀 뿌리 추출물과 decursin을 각각 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 µg/mL, 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100 µM의 농도로 24 h 처리한 후, WST-1 assay를 통하여 세포 생존율을 분석하였다. 참당귀 뿌리 추출물을 처리하는 경우 200 µg/mL의 농도에서 $87.2 \pm 6.1\%$ 의 세포 생존율을 보였다. 그 미만의 농도에서는 90% 이상의 생존율을 보이며 세포 독성이 나타나지 않았다(Table 2A, Figure 3A). Decursin의 경우, 20 µM의 농도에서 $89.7 \pm 2.2\%$ 의 세포 생존율을 보였다. 그 미만의 농도에서 90%

Figure 4. Effects of *Angelica gigas* Nakai root extracts and decursin on the expression of *MMP3* in human dermal fibroblasts.

Human BJ-tert fibroblasts (2×10^5) were seeded in 60 mm culture dish and treated with the indicated doses of the AGNREs and decursin for 24 hours separately. The expression levels of *COL1A1*, *MMP1*, and *MMP3* in cells treated with AGNREs and *MMP3* levels in cells treated with decursin were analyzed using qRT-PCR experiments. The expression level of (A) *COL1A1* in AGNREs-treated human BJ-tert fibroblasts and (B) *MMP1* in AGNREs-treated human BJ-tert fibroblasts, Dose-dependent downregulation of *MMP3* expression in (C) AGNREs-treated human BJ-tert fibroblasts and (D) decursin-treated human BJ-tert fibroblasts. TGF- β was used as the positive control. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. from three independent experiments. AGNREs, *Angelica gigas* Nakai root extracts; TGF- β , transforming growth factor-beta. * $p < 0.05$ indicates statistical significance. *COL1A1*, collagen type I alpha 1 chain; *MMP1*, matrix metalloproteinase 1; *MMP3*, matrix metalloproteinase 3; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

이상의 생존율로 세포 독성이 나타나지 않았다(Table 2B, Figure 3B). 본 실험 결과를 바탕으로, 이후 실험에 있어서는 세포 처리 농도를 참당귀 뿌리 추출물은 0, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$, decursin은 0, 5, 10 μM 으로 하여 진행하였다.

3. 참당귀 뿌리 추출물과 decursin의 collagen (*COL1A1*), collagenase (*MMP1*, *MMP3*) 발현 조절능 평가

콜라겐은 결합 조직의 주성분으로서 강한 신장력을 가져 쉽게 분해되지 않는 특징을 가지지만, 자외선 조사, 연령 증가 등의 여러 요인에 의해 분해가 촉진된다. 그리고 콜라겐분해효소는 콜라겐을 구성하는 결합을 분해하여 결론적으로 콜라겐의 합성을 저해한다(Kim *et al.*, 2009b). 이렇듯 피부의 탄력을 유지시켜주는 역할을 하는 콜라겐이 콜라겐분해효소의 발현량 증가에 따라 분해되어 노화에 의한 피부 주름 생성의 원인이 된다는 여러 보고가 있다(Sansilvestri-

Morel *et al.*, 2005). 본 연구에서는 qRT-PCR 측정법을 통해 참당귀 뿌리 추출물과 decursin에 의한 dermal fibroblasts에서의 콜라겐 및 콜라겐분해효소 발현량을 평가하였다. 본 실험의 양성대조군으로는 TGF- β 5 ng/mL를 사용하였으며, -80°C 에서 보관하였다.

참당귀 뿌리 추출물을 human BJ-tert fibroblasts에 0, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24시간 처리한 후, Table 1에서 언급한 primer를 사용하여 qRT-PCR 분석법을 통해 *COL1A1*과 *MMP1*, *MMP3*의 발현 증감 유무를 확인하였다. 참당귀 뿌리 추출물을 처리한 세포 내 *COL1A1* 및 *MMP1* 발현에서는 유의한 증감이 나타나지 않았다(Figure 4A, 4B). 반면, 참당귀 뿌리 추출물을 처리한 세포 내 *MMP3* 발현을 확인한 결과, 농도의존적으로 현저히 감소하는 경향을 보였다. 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 참당귀 뿌리 추출물이 처리된 세포에서는 *MMP3* 발현이 대조군 대비 $39.3 \pm 4.5\%$, $9.6 \pm 0.8\%$ 로 감소하였다(Table 3, Figure 4C). 본 실험을 통해 참당귀 뿌리 추출물

이 인간 진피섬유아세포 내 COL1A1과 MMP1 발현 변화에 관여하지 않음을 알 수 있었다. 하지만 MMP3 발현이 현저히 감소하였다. 당귀를 초임계 추출 시 콜라겐 합성과 연관이 있는 단백질의 발현에 의해 항노화 효능이 나타난다고 보고되었다(Yoo *et al.*, 2011). 본 연구에서는 제주 용암해수로 추출한 참당귀 뿌리 추출물이 인간 진피섬유아세포에서 MMP3 발현 억제를 통해 피부의 주름 개선 소재로서의 가능성이 있음을 확인하였다.

상기 결과를 바탕으로 참당귀 뿌리 추출물에 의한 인간 진피섬유아세포 내 MMP3 발현 억제 효과가 참당귀 뿌리 추출물 내 지표 물질인 decursin에 의한 것인지 분석하였다. Decursin을 human BJ-tert fibroblasts에 0, 5, 10 µg/mL의 농도로 24시간 처리한 후, MMP3 발현 변화를 qRT-PCR 분석법을 통해 확인하였다. 그 결과, decursin을 처리한 세포 내 MMP3 발현이 농도의존적으로 현저하게 감소하는 경향을 보였다. 5, 10 µM decursin이 처리된 세포에서 MMP3 발현이 대조군 대비 $52.3 \pm 8.7\%$, $22.1 \pm 2.5\%$ 로 감소하였다(Figure 4D). 따라서 본 실험 결과를 바탕으로, 참당귀 뿌리 추출물에 의한 인간 진피섬유아세포 내 콜라겐분해효소 발현 감소 효능은 decursin에 의해서 나타날 수 있음을 확인하였다.

다양한 세포 기질의 분해를 담당하는 MMP3의 발현 억제는 콜라겐분해효소 중 하나인 pro-MMP1를 활성화하여 주름 생성에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Yao *et al.*, 2015). 본 연구에서는 콜라겐 분해효소 중 하나인 MMP3 발현 억제를 확인함으로써 주름개선 효과의 지표물질로 가능성을 확인하였다. 인간 진피섬유아세포 내에서 참당귀 뿌리 추출물의 콜라겐 유전자의 발현 증가는 확인할 수 없었으나 콜라겐분해효소 중 한 종류인 MMP3 발현이 감소하였기 때문에, 참당귀 뿌리 추출물이 콜라겐 분해를 저해한다는 것을 알 수 있었다. 또한 decursin으로 인해 MMP3 발현이 감소되었기 때문에 참당귀 뿌리 추출물의 인간 진피섬유아세포 내 콜라겐분해효소의 발현 감소 효과가 지표물질인 decursin에 의한 것일 가능성도 확인하였다.

육안 상으로 확인할 수 있는 노화의 대표적인 현상인 주름은 콜라겐 발현 감소와 MMPs 발현 증가에 따른 콜라겐 분해 증가에 기인한 것이다(Sjerobabski-Masneć & Šitum, 2010). 따라서 참당귀 뿌리 추출물과 decursin이 주름 개선 효능이 있음을 확인하였다.

Conclusion

참당귀(*A. gigas* Nakai)는 오래전부터 한약재로서 사용되었던 천연물이기에 보고된 약리 효과가 많고 그에 따른 특허도 많다. 이는 많은 사람들이 참당귀에서 의약품, 화장품의 소재로의 개발 가능성을 알아봤다는 뜻으로도 해석된다. 본 연구에서는 참당귀 뿌리 추출물의 주름 개선용 화장품 기능성 소재로서의 가치를 확인하고자 인간 진피섬유아세포 내 콜라겐과 콜라겐분해효소 발현 변화를 측정하

였다. 먼저 참당귀 뿌리 추출물의 콜라겐(COL1A1) 발현 변화를 측정하여 분석하였지만 유의한 증감이 나타나지 않았다. 이어서 콜라겐분해효소인 MMP1, MMP3 발현 변화를 측정하여 분석하였다. 그 결과, MMP1에 대한 유의한 발현 변화는 없었으나 MMP3의 발현이 감소되었다. 따라서 참당귀 뿌리 추출물이 진피 섬유아세포 내에서 MMP3 발현이 감소시킨다는 것을 확인하였다.

참당귀 뿌리 추출물의 효능에 대한 지표물질을 확인하고자 고성능 액체 크로마토그래피 분석을 진행하였다. 고성능 액체 크로마토그래피를 통해 decursin이 참당귀 뿌리 추출물의 주요한 단일 물질이며, 높은 함량으로 존재함을 확인하였다. 참당귀 뿌리 추출물 처리 후 MMP3에 대한 발현 감소 효능이 decursin에 의한 것임을 확인하기 위해 human BJ-tert cell에 decursin을 처리하였다. qRT-PCR을 통한 측정 실험으로 decursin이 인간 진피섬유아세포 내 콜라겐분해효소 발현량을 감소시키는 효능이 있음을 검증하였다. 따라서 해당 결과를 바탕으로 참당귀 뿌리 추출물과 decursin은 콜라겐분해효소 발현 감소 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었으며, 참당귀 뿌리 추출물 및 decursin의 피부 주름 개선에 대한 신규 화장품 물질로서의 가능성을 확인하였다.

Acknowledgements

본 연구는 중소벤처기업부와 산업통상자원부가 지원하는 월드클래스 300 프로젝트 R&D (S2525362) 지원사업을 통해 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

Author's contribution

JK, GN, YY, GK, SWB and HL performed experiments and JK, GN, YY, GK, SWB, HL, SHB, YC and HEC analyzed the data. JK, GN, YY, HDC and HEC designed overall experiments together and JK, GN, YY and HEC wrote the manuscript. All authors read and confirmed the final version of manuscript.

Author details

Jungwook Kang (Assistant Professor), Industry-Academic Collaboration Foundation, Seowon University, 377-3 Musimseoro, Seowon-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28674, Korea; Garam Nam (Graduate Student), Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea); Yeahwa Yoon (Graduate Student), Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea); Gyeongmi Kim (Graduate Student), Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University,

120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea; Sowon Bae (Graduate Student), Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea; Hyunjeong Lee (Graduate Student), Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea; Seunghye Bae (Assistant Professor), Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea; Youngkwon Cha (Director), Creative Innovation Research Center, Cosmecca Korea, Co. Ltd., 6th Floor, ABN Tower, 331 Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13488, Korea; Hyundai Cho (Executive Director), Creative Innovation Research Center, Cosmecca Korea, Co. Ltd., 6th Floor, ABN Tower, 331 Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13488, Korea; Hangeui Cho (Research Fellow), Creative Innovation Research Center, Cosmecca Korea, Co. Ltd., 6th Floor, ABN Tower, 331 Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13488, Korea.

References

- Bae KH, Kim KJ, Kim NY, Song JM. *In vitro* culture of rare plant *Bletilla striata* using Jeju magma seawater. *Journal of Plant Biotechnology*, 39: 281-287, 2012.
- Baumann L, Kaufman J, Saghari S. Collagen fillers. *Dermatologic therapy*, 19: 134-140, 2006.
- Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 78: 43-48, 2003.
- Chang WS, Chiang HC. Structure-activity relationship of coumarins in xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Research*, 15: 1969-1973, 1995.
- Choi SR, Lee JH, Kim JY, Park KW, Jeong IY, Shim KH, Lee MK, Seo KI. Decursin from *Angelica gigas* Nakai induces apoptosis in RC-58T/h/SA# 4 primary human prostate cancer cells via a mitochondria-related caspase pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2517-2523, 2011.
- Hata K, Sano K. Studies on coumarins from the root of *Angelica decursiva* FR. et SAV. I. The structure of decursin and decursidin. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 89: 549-557, 1969.
- Hwang JT, Kim SH, Hur HJ, Kim HJ, Park JH, Sung MJ, Yang HJ, Ryu SY, Kim YS, Cha MR. Decursin, an active compound isolated from *Angelica gigas*, inhibits fat accumulation, reduces adipocytokine secretion and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. *Phytotherapy Research*, 26: 633-638, 2012.
- Im KH, Baek SA, Choi J, Lee TS. Antioxidant, anti-melanogenic and anti-wrinkle effects of *Phellinus vaninii*. *Mycobiology*, 47: 494-505, 2019.
- Jang HH. Effects of acetyl glutamine on the improvement of skin barrier and inhibition of senescence. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 16: 579-589, 2018.
- Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6: 392-401, 2006.
- Kim EY, Rhyu MR. Synergistic vasorelaxant and antihypertensive effects of *Ligusticum wallichii* and *Angelica gigas*. *Journal of Ethnopharmacology*, 130: 545-551, 2010.
- Kim CG, Lee DG, Oh J, Lee YH, Lee YJ, Song PH, Song CH, Ku SK. Effects of balneotherapy in Jeju magma-seawater on knee Osteoarthritis model. *Scientific Reports*, 10: 1-14, 2020a.
- Kim GY, Lee SJ, Jeon MJ, Kim BM, Kim GT, Kang SM, Lee KY, Shin EJ, Kim SY, Kim YM. Anti-wrinkle and skin turnover improvement effects of niacinamide-dipeptide convergence. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 16: 243-254, 2018a.
- Kim HY, Choi HM, Kim SG, Woo SO, Moon HJ, Han SM. Skin health improving effects of Korean freeze-dried royal jelly in human keratinocytes. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 18: 413-422, 2020b.
- Kim JH, Kim JH, Lee YM, Ahn EM, Kim KW, Yu YS. Decursin inhibits retinal neovascularization via suppression of VEGFR-2 activation. *Molecular Vision*, 15: 1868-1875, 2009a.
- Kim JY, Bae S, Jung J, An S, An IS, Kim YS. Effects of *Coptis chinensis* extracts on matrix metalloproteinase-1 suppression through JNK/AP-1 axis in human dermal fibroblasts. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 16: 427-435, 2018b.
- Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Sung JH. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal

- fibroblast by secretory factors. *Journal of Dermatological Science*, 53: 96-102, 2009b.
- Kim YM, Jung HJ, Choi JS, Nam TJ. Anti-wrinkle effects of a tuna heart H₂O fraction on Hs27 human fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 37: 92-98, 2016.
- Konoshima M, Chi HJ, Hata K. Coumarins from the root of *Angelica gigas* Nakai. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 16: 1139-1140, 1968.
- Lee H, Suh IS, Woo M, Kim MJ, Jung YH, Song YO. Beneficial effects of desalinated magma seawater in ameliorating thioacetamide-induced chronic hepatotoxicity. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 24: 126-134, 2019.
- Lee SH, Bae IH, Min DJ, Kim HJ, Park NH, Choi JH, Shin JS, Kim EJ, Lee HK. Skin hydration effect of Jeju lava sea water. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 42: 343-349, 2016.
- Noh JR, Gang GT, Kim YH, Yang KJ, Lee CH, Na OS, Kim GJ, Oh WK, Lee YD. Desalinated underground seawater of Jeju Island (Korea) improves lipid metabolism in mice fed diets containing high fat and increases antioxidant potential in t-BHP treated HepG2 cells. *Nutrition research and practice*, 4: 3-10, 2010.
- Philips N, Auler S, Hugo R, Gonzalez S. Beneficial regulation of matrix metalloproteinases for skin health. *Enzyme Research*, 2011: 427285, 2011.
- Ryu JY, Rhie SJ, Lim KH, Choi YE, Han HS, Yang HO, Na EJ. Inhibitory effects of prunin on photo-aging in human keratinocytes (HaCaT) damaged by UVB radiation. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 17: 139-147, 2019.
- Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jullien ND, Lembrez N, Mestries-Dubois P, Fabiani JN, Verbeuren TJ. Decreased production of collagen type III in cultured smooth muscle cells from varicose vein patients is due to a degradation by MMPs: possible implication of MMP-3. *Journal of Vascular Research*, 42: 388-398, 2005.
- Sarker S, Nahar L. Natural medicine: the genus *Angelica*. *Current Medicinal Chemistry*, 11: 1479-1500, 2004.
- Sjerobabski-Masnec I, Šitum M. Skin aging. *Acta Clinica Croatica*, 49: 515-518, 2010.
- Son CY, Baek IH, Song GY, Kang JS, Kwon KI. Pharmacological effect of decursin and decursinol angelate from *Angelica gigas* Nakai. *Yakhak Hoeji*, 53: 303-313, 2009a.
- Son SH, Kim MJ, Chung WY, Son JA, Kim YS, Kim YC, Kang SS, Lee SK, Park KK. Decursin and decursinol inhibit VEGF-induced angiogenesis by blocking the activation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Cancer Letters*, 280: 86-92, 2009b.
- Song M, Lee J, Kim YJ, Hoang DH, Choe W, Kang I, Kim SS, Ha J. Jeju magma-seawater inhibits α-MSH-induced melanogenesis via CaMKKβ-AMPK signaling pathways in B16F10 melanoma cells. *Marine Drugs*, 18: 473, 2020.
- Yao C, Lee DH, Oh JH, Kim MK, Kim KH, Park CH, Chung JH. Poly(I:C) induces expressions of MMP-1, -2, and -3 through various signaling pathways including IRF3 in human skin fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 80: 54-60, 2015.
- Yoo MA, Song YK, Jang H, Kim DM, Byun SY. Profiling of skin anti-aging proteins in human dermal fibroblasts by decursin in *Angelica gigas* Nakai. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28: 880-885, 2011.
- Zhang J, Li L, Jiang C, Xing C, Kim SH, Lü J. Anti-cancer and other bioactivities of Korean *Angelica gigas* Nakai (AGN) and its major pyranocoumarin compounds. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12: 1239-1254, 2012.

국문초록

제주 용암해수로 숙성된 참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 뿌리 추출물과 지표물질 데커신(Decursin)의 인간 진피섬유아세포 내 MMP3 발현 억제 효과

강정욱¹, 남가람², 윤예화², 김정미², 배소원², 이현정², 배승희², 차영권³, 조현대³, 조항의^{2,3*}

¹서원대학교 산학협력단, 충청북도 청주시, 한국

²진국대학교 화장품공학과, 서울, 한국

³(주)코스메카코리아 CIR연구센터, 경기도 성남시, 한국

목적: 최본 연구는 제주 용암해수로 숙성된 참당귀 추출물의 인간 진피섬유아세포 내 콜라겐분해효소 발현 감소 효과를 분석하고 그 효과에 대한 지표물질을 파악하는 것을 목적으로 진행되었다. **방법:** 제주 용암해수를 이용해 저온숙성하여 추출한 참당귀 추출물의 지표물질 확인을 위해 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석을 진행하였다. 참당귀 뿌리 추출물 및 decursin의 인간 진피섬유아세포 내 세포생존율을 측정하고 실시간 유전자증폭 정량(qRT-PCR) 분석을 통한 콜라겐분해효소 발현 변화를 분석하였다. Decursin으로 진행한 결과와 참당귀 뿌리 추출물의 콜라겐분해효소 발현 감소 효과를 비교하여 그 상관관계를 파악하였다. **결과:** HPLC 분석 결과, 참당귀 추출물 내 주요한 지표물질로 decursin이 확인되었다. 인간 진피섬유아세포에서 참당귀 뿌리 추출물과 decursin은 각각 200 µg/mL, 20 µM 미만의 농도에서 세포 생존율에 낮은 영향을 보였다. 또한, MMP3 발현에 대한 참당귀 뿌리 추출물과 decursin의 감소 효과를 qRT-PCR을 통해 확인하였다. **결론:** 본 연구결과를 통해 제주 용암해수로 숙성된 참당귀 뿌리 추출물과 이 추출물로부터 순수분리된 지표물질 decursin의 콜라겐분해효소인 MMP3 발현 감소 효능을 확인하였으며, 이를 통해 참당귀 뿌리 추출물 및 decursin은 주름개선용 기능성화장품 소재로 활용 가능성을 과학적으로 증명하였다.

핵심어: 참당귀 뿌리, Decursin, 콜라겐분해효소, 제주 용암해수, 인간 진피섬유아세포

본 연구는 중소벤처기업부와 산업통상자원부가 지원하는 월드클래스 300 프로젝트 R&D (S2525362) 지원사업을 통해 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김가연, 이승재, 전미지, 김보민, 김근태, 강상문, 이기영, 신은진, 김상용, 김영민, 나이아신 펩타이드 용합체의 항주름 및 피부 턴오버 개선 효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 16: 243-254, 2018.
- 김지예, 배승희, 정진혁, 안성관, 안인숙, 김영삼. *Coptis chinensis* 추출물의 JNK/AP1 Axis을 통한 인간진피섬유아세포 내 MMP1. *아시아뷰티화장품학술지*, 16: 427-435, 2018.
- 김효영, 최홍민, 김세진, 우순옥, 문효정, 한상미. 인간 각질형성세포에서 국산 동결건조 로열젤리의 피부 건강 개선 효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 18: 413-422, 2020.
- 류지영, 이승자, 임계화, 최영은, 한효선, 양현옥, 나은주. Prunin의 자외선 B에 의해 손상된 인간 각질형성세포 (HaCaT)에 대한 광노화 억제 효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 17: 139-147, 2019.
- 배기화, 김기주, 김남영, 송재모. 제주 용암해수를 이용한 희귀식물 자란(*Bletilla striata*)의 기내배양. *식물생명공학회지*, 39: 281-287, 2012.
- 손추영, 백인환, 송규용, 강재선, 권광일. 신약 개발을 위한 참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 추출 decursin과 decursinol angelate의 약리 작용. *약학회지*, 53: 303-313, 2009.
- 이성훈, 배일홍, 민대진, 김형준, 박녹현, 최지예, 신진섭, 김은주, 이해광. 제주용암해수의 피부 보습 효과 연구. *대한화장*

품학회지, 42: 343-349, 2016.

장현희. 아세틸글루타민의 피부세포 노화억제 및 피부장벽 기능 강화효과. *아시안뷰티화장품학술지*, 16: 579-589, 2018.

中文摘要

济州熔岩水熟成的当归提取物和指标物质（Decursin）对人皮肤成纤维细胞中 *MMP3* 表达的抑制作用

姜政旭¹, 南가람², 尹睿花², 金慶美², 裴少苑², 李顯正², 裴承熙², 車永權³, 趙顯垚³, 趙恒儀^{2,3*}

¹西原大学产学合作基金会, 忠清北道清州市, 韩国

²建国大学化妆品工学科, 首尔, 韩国

³Cosmecca Korea CIR研究中心, 京畿道城南市, 韩国

目的: 本研究旨在了解用济州熔岩水发酵的当归中草药根提取物在抑制人皮肤成纤维细胞中的胶原酶中的作用, 并确定引起其抑制作用的主要活性化合物。**方法:** 通过在济州熔岩水中低温发酵制备归中草药根提取物, 并使用高效液相色谱 (HPLC) 分析以鉴定这些发酵根提取物中的主要活性成分。进行水溶性四唑盐 (WST-1) 测定和实时聚合酶链反应 (qRT-PCR), 以研究细胞活力和胶原酶基因的表达水平。使用归中草药根提取物和decursin进行了比较实验, 以确认胶原酶表达的下调并分析它们之间的相关性。**结果:** HPLC分析表明, decursin是归中草药根提取中的主要活性化合物。通过WST-1分析获得的数据显示, 对归中草药根提取的浓度为200μg/ mL, 对decursin的浓度为<20μM时, 对人皮肤成纤维细胞没有任何细胞毒性。qRT-PCR分析显示, 归中草药根提取和decursin下调了人类皮肤成纤维细胞中基质金属蛋白酶3 (*MMP3*) 基因的表达。**结论:** 这些分析表明, 用济州熔岩水发酵的当归中草药根提取物以及从这些提取物中分离出的decursin具有很大的潜力, 可在化妆品中用作功能性抗皱剂。

关键词: 当归根, Decursin, 胶原酶, 济州熔岩水, 皮肤成纤维细胞