



잣나무 잎 추출물의 생리활성 및 주름개선 효능

권경철^{1#} · 오영선^{2#} · 김철중³ · 유창연⁴ · 이재근^{5†}

Biological Activities and Anti-wrinkle Effects of *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc. Leaf Extract

Kyung Cheol Kwon^{1#}, Yeong Seon Oh^{2#}, Chul Joong Kim³, Chang Yeon Yu⁴ and Jae Geun Lee^{5†}

ABSTRACT

Received: 2020 December 1

1st Revised: 2021 January 6

2nd Revised: 2021 March 30

3rd Revised: 2021 April 6

Accepted: 2021 April 6

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.

Background: This study assessed the role of *Pinus koraiensis* (*P. koraiensis*) Siebold et Zucc. leaves as an ingredient for cosmetics. The biological activities and wrinkle improvement effect of *P. koraiensis* leaves were investigated.

Methods and Results: Leaf samples were mixed with 80% ethanol (EtOH), and the ingredients were separated into fractions using different solvents in order of n-Hexane, ethyl acetate (EtOAc), n-butanol and water. The antioxidant activity based on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), scavenging of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), and total phenol and flavonoid content of 80% EtOH extracts and fractions was tested. Among the tested extracts and fractions, the EtOAc fraction displayed the greatest DPPH and ABTS scavenging activity and total phenol and flavonoid content. Wrinkle improvement was evaluated by performing collagenase and elastase assays. In addition, matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) inhibition and procollagen synthesis were measured. The 80% EtOH extract displayed the greatest anti-wrinkle effects.

Conclusions: The 80% EtOH extract and each fraction of *P. koraiensis* leaves displayed differing antioxidant and anti-wrinkle activities. This basic data will inform the utilization these *P. koraiensis* as an ingredient suitable for skin health and beauty.

Key Words: *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc., Antioxidant, Collagenase, Elastase, Matrix Metalloproteinase 1, Procollagen, Total Phenol, Total Flavonoid

서 언

노화는 신체에서 일어나는 해부학적, 생리학적, 생화학적인 면을 포함하는 것으로 두뇌, 소화계, 체형 등 모든 신체에서 일어난다. 특히 노화로 인한 신체변화 중 피부는 주름생성, 탄력의 저하, 수분 손실의 증가, 피지생성 감소, 각질세포 응집력 강화, 기미, 주근깨와 같이 대부분 시각적으로 나타난다 (Kim, 2016).

피부노화는 크게 내적 요인과 외적 요인으로 나눌 수 있

다. 내적 요인의 노화는 피부 세포의 대사과정에서 생성되는 hydroxy radical (-OH), singlet oxygen (¹O₂) 같은 reactive oxygen species (ROS) 등에 의해 생체막 지질의 과산화와 변질이 발생하여 (Lee *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016) 시간이 흘러감에 따라 자연스럽게 나타나며, 외적 요인의 노화는 외부적 환경에 의해서 발생하는 노화로 자외선의 직접적인 요인 외에 스트레스, 흡연, 음주 등의 간접적인 요인으로 보고되고 있다 (Takema *et al.*, 1994).

자외선은 피부 노화의 가장 큰 영향을 미치는 요인이다

[†]Corresponding author: (Phone) +82-33-258-6801 (E-mail) leejeakun@hanmail.net

[#]Kyung Cheol Kwon and Yeong Seon Oh are contributed equally to this paper.

¹취화진바이오코스메틱 생명공학연구소 차장 / Assistnat manager, Research Institute of Biotechnology, HwajinBioCosmetic, Chuncheon 24232, Korea.

²취화진바이오코스메틱 생명공학연구소 과장 / Manager, Research Institute of Biotechnology, HwajinBioCosmetic, Chuncheon 24232, Korea.

³취화진바이오코스메틱 생명공학연구소 과장 / Manager, Research Institute of Biotechnology, HwajinBioCosmetic, Chuncheon 24232, Korea.

⁴강원대학교 생물자원과학과 교수 / Professor, Department of Bio-Resource Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

⁵취화진바이오코스메틱 생명공학연구소 연구소장 / Head of Institute, Research Institute of Biotechnology, HwajinBioCosmetic, Chuncheon 24232, Korea.

(Yaar and Gilchrest, 2007; Won *et al.*, 2012). 자외선으로 유도된 ROS는 피부의 광산화적 손상을 유발하여 세포막을 이루고 있는 인지질 산화를 일으켜 세포를 사멸 시킬 뿐만 아니라 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현 촉진을 일으켜 collagen 및 elastin 섬유 등을 분해한다. 결국 자외선 및 ROS에 의해 collagen 및 elastin 섬유가 분해되면 물리적인 구조가 붕괴되어 피부의 탄력 감소로 결국 피부에 주름이 생기고 피부노화를 가속시키는 원인이 된다 (Rhie *et al.*, 2001; Pillai *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2013).

현대인들은 평균 수명이 늘어남에 따라 노화에 대한 관심이 높아지고 건강한 피부를 유지하기 위해 천연물을 이용한 항산화, 주름개선 등 다양한 기능성 소재 연구에 주목하고 있다 (Lee *et al.*, 2020).

잣나무 (*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.)는 소나무과에 속하는 상록교목으로 해발고도 1,000 m 이상에서도 서식하며 지름 1 m, 높이 30 m 까지 성장하고 수피는 회갈색이고 얇은 조각이 떨어진다. 잎은 가지 끝에 5 개씩 모여 달리며, 가지자리에 잔 톱니가 있다 (Hwang *et al.*, 2014).

잣나무 잎에는 (+)-catechin, gallic acid, protocatechuic acid, syringic acid, vanillic acid, ρ -coumaric acid 등 성분이 함유되어 있으며 (Bae and Kim, 2003), 목부에는 5-hydroxy-7-methoxyflavone, galangin, pinocembrin, chrysin, 3-hydroxy-5-methoxystilbene, pinosylvin 등 성분이 함유되어 있다 (Lee *et al.*, 2003). 생리활성 등 연구에서 잣나무 종자는 항암 및 항산화 효능이 확인 되었으며 (Su *et al.*, 2009), 잣나무 구과의 정유 추출물은 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*에서 모두 99.9% 이상의 항균효과를 나타낸다는 연구 결과를 보고하였다 (You, 2010).

잣은 수확 후 대부분 잣 종자만 식용으로 사용한 후, 잣 부산물인 잣 구과, 잎 등은 그대로 버려지기 때문에 (Li *et al.*, 2007), 종자 이외의 농업 부산물을 대상으로 그 활용성을 검토하여 유용한 소재로 개발할 필요가 있다. 따라서 잣나무 부산물의 활용과 산업적 비용의 절감 측면, 그리고 천연물이 가지고 있는 안전성이 부합되는 최적의 산업적 재료라고 판단될 수 있는 잣나무 잎의 기능성 원료로서의 가치를 검증하기 위해 항산화 및 주름개선의 생리적 활성 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

잣나무 (*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.) 잎은 2017년 6월 강원도 홍천 남면 (Hongcheon, Korea) 소재 잣나무 군락에서 채취하여 사용하였다. 시료는 상온에서 2 일, 45°C에서 2 일간 건조한 뒤 분쇄기 (Food Mixer, FM 909T, Hanil Electric Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 분쇄한 후 실험

에 사용하였다.

추출물 제조에 사용된 감압농축기는 Evaporator N-1000 (EYELA, Tokyo, Japan), 동결건조기는 FDTA-4508 (OPERON, Kimpo, Korea), 생리활성 측정을 위한 UV/Vis spectrophotometer는 VersaMax (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), CO₂ incubator는 MCO-18AC (Panasonic Co., Osaka, Japan)을 사용하였다.

추출 및 분획에 사용된 용매 ethanol (EtOH), n-Hexane, ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (n-BuOH)는 대정화금 (Siheung, Korea)에서, 생리활성에 사용된 시약 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] (ABTS), L-ascorbic acid ($\geq 99.0\%$, MW : 176.12 g/mol), gallic acid ($\geq 97.5 - 102.5\%$, MW : 170.12 g/mol), quercetin ($\geq 95.0\%$, MW : 302.24 g/mol), epigallocatechin gallate (EGCG), ursolic acid, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate (Na₂CO₃), potassium acetate, n-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide, collagenase from clostridium, elastase from porcine pancreas, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 구입하여 사용하였다.

효소 활성 검정을 위하여 Procollagen Type I C-Peptide (PIP) Kit (Takara, Shiga, Japan)와 Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1), Biotrak ELISA System (Amersham, Buckinghamshire, England)를 사용하였다.

2. 추출 및 분획

삼각플라스크에 건조 시료 당 10 배 (v/w)에 해당하는 80% EtOH 을 이용하여 실온에서 24 시간 침출시켰다. 2 회 반복 추출한 뒤에 filter paper (No. 20, Hyundai micro Co., Ltd., Seoul, Korea)로 여과하여 사용하였다. 잣나무 잎 80% EtOH 추출물은 감압농축기로 감압 농축한 뒤, 동결 건조하였다.

동결 건조시킨 잣나무 잎 80% EtOH 추출물을 물에 용해시킨 뒤 동량의 n-Hexane을 가하여 분획하였다. 분획은 4 회 반복하였으며, 극성 순서에 따라 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH 순으로 분획하였다. 분획이 완료된 각 분획물은 감압농축기로 감압 농축하여 잣나무 잎 분획물을 제조하였다.

3. DPPH 자유 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 자유 라디칼 소거 활성은 Clarke 등 (2013)의 방법을 변형하여 실시하였다. Microplate에 농도별 시료 100 μ l와 1.5 mM DPPH 100 μ l를 넣어 암실에서 30 분간 반응시킨 후 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 양성대조군으로 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), ascorbic acid

를 사용하였으며 radical을 50% 소거하는데 필요한 농도 단위인 RC₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 결과를 산출하였으며 산출식은 다음과 같다.

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = [1 - (A/B)] \times 100$$

(A = control absorbance, B = sample absorbance)

4. ABTS 자유 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 자유 라디칼 소거 활성은 Ozgen 등 (2006) 방법을 변형하여 실시하였다. 2.6 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈)와 7.4 mM ABTS를 1:1 비율로 혼합하여 암조건에서 15 시간 반응하여 ABTS reagent를 제조하였다.

Microplate에 농도별 시료를 10 μl 와 ABTS 90 μl 를 넣어 상온에서 10 분간 반응하여 734 nm 흡광도 값을 측정하여 ABTS 소거율을 다음과 같이 백분율 (%)로 산출하였고 BHA, BHT, ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였다.

$$\text{ABTS scavenging activity (\%)} = [1 - (A/B)] \times 100$$

(A = control absorbance, B = sample absorbance)

5. 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin & Ciocalteu의 방법을 변형한 Singleton 등 (1999)의 방법으로 실시하였다. 1 mg/ml 농도의 시료 100 μl 에 Folin-ciocalteu's phenol 50 μl 를 첨가한 후 5 분간 상온에서 반응 후, 20% sodium carbonate (Na₂CO₃) 300 μl 를 넣고 15 분간 반응시켰다.

반응시킨 용액에 1 ml의 증류수를 넣은 후 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 740 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하였으며 0, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 검량선을 작성 후, gallic acid equivalents (mg·GAE/g)로 나타내었다.

6. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드함량은 Kim 등 (2012)의 방법을 변형하여 실시하였다. 1 M potassium acetate 100 μl 와 10% aluminum nitrate 100 μl 를 넣어 혼합하여 준 후, 1 mg/ml 시료 500 μl 를 첨가하여 40 분 동안 반응시킨 후, UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도 측정하였다. Flavonoid 함량은 quercetin를 표준물질로 하였으며, 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 검량선을 작성하고, quercetin equivalents (mg·QE/g)로 나타내었다.

7. Collagenase 저해활성

Collagenase 저해효과는 Wünsch and Heidrich (1963)의 방법을 변형하여 측정하였다. 잣나무 잎 추출물 및 분획물에 대한 collagenase 저해활성 측정은 0.1 M Tris-HCl buffer (pH

7.5)에 4 mM CaCl₂와 0.3 mg/ml 4-phenylazobenzyloxy-carbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg를 녹인 기질액 500 μl 에 시료 200 μl , 0.2 mg/ml collagenase 300 μl 를 첨가하여 상온에서 20 분간 반응시킨 후, 6% citric acid 1 ml 넣고 ethyl acetate 3 ml을 첨가한 뒤, 상등액을 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료 용액 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율 (%)로 나타내었다. 양성대조군으로 epigallocatechin gallate (EGCG)를 사용하였다.

8. Elastase 저해활성

잣나무 잎 분획물 elastase 저해활성은 Kwak 등 (2005)의 방법을 변형하여 측정하였다. Microplate에 잣나무 분획물별 시료 40 μl 넣고, 효소액 elastase 40 μl 와 기질액 n-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide 80 μl 를 첨가하였다. 20 분간 반응시킨 뒤, 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 ursolic acid를 사용하였다.

9. MTT assay

잣나무 잎 추출물 및 분획물을 HaCaT cell를 1×10^4 cells/well씩 96 well plate에 분주하여 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24 시간 배양하였다. 새로운 배지로 교체하고 100, 200, 400, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 추출물을 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 5 mg/ml의 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)를 첨가한 후 4 시간 동안 추가배양 하였으며 배양 후 형성된 formazan을 DMSO에 녹이고, 540 nm에서 흡광도를 측정하였고 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

10. Procollagen 생합성 및 MMP-1 저해 활성 측정

Procollagen 생합성 측정은 100, 200, 400, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 잣나무 잎 시료를 HaCaT 세포에 처리한 후, 24 시간 배양하여 배지를 회수하여 procollagen 생합성에 미치는 변화를 procollagen type-I C-peptide EIA kit를 사용하여 procollagen의 함량을 측정하였다.

MMP-1 저해 활성 측정은 HaCaT 세포를 1×10^4 cells/well 농도로 96 well plate에 분주한 후, 각 well에 잣나무 잎 분획물 시료를 첨가하여 CO₂ incubator에서 24 시간 배양했다. MMP-1의 활성을 높이기 위하여 10 ng/ml tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 첨가하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며, matrix metalloproteinase-1 biotrack activity assay kit를 이용하여 측정하였다.

11. 통계처리

모든 실험의 데이터는 통계처리를 통한 유의성 검정을 위해 Two-way ANOVA 분석을 실시하였다. 통계처리의 모든 데이터는 최소 3 반복 수행하여 평균 (means) \pm 표준편차

(standard deviation)로 나타냈었다. 통계처리는 IBM SPSS Statistics v24 (SPSS, Chicago, IL, USA) 종합 소프트웨어를 사용하여 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 유의성을 검증하고, 통계적 유의성을 5% 수준에서 분석하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 항산화 활성 비교 분석

잣나무 (*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.) 잎의 추출물 및 분획물별 활성을 검증하기 위하여, DPPH 및 ABTS 항산화 활성 분석을 실시하였다. DPPH와 ABTS 자유 라디칼 소거활성 결과 EtOAc 분획물에서 RC_{50} 값이 각 $23.83 \pm 1.15 \mu\text{g/ml}$, $6.11 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ 으로 가장 높은 활성을 확인하였다. DPPH와 ABTS의 자유 라디칼 소거활성 결과 EtOAc, n-BuOH, 80% EtOH, Water, n-Hexane의 순으로 활성이 우수하였다 (Table 1).

잣나무 잎 추출물과 대조군인 (+)- α -tocopherol의 자유 라디칼 소거활성 (FSC_{50})값을 측정한 결과 EtOAc 분획물이 50% EtOH 추출물에 비해 약 2 배의 소거활성 값 차이를 나타낸다고 보고하였으며 (Kim *et al.*, 2010), 이는 본 연구에서 EtOAc 분획물이 80% EtOH 추출물에 비해 높은 활성을 가지는 결과와 유사하였다. 이와 같은 결과를 통해 잣나무 잎 추출물에서 자유 라디칼 소거활성에 관여된 물질이 EtOH 추출물에서 EtOAc로 분획되는 과정에서 다수 함유되는 것으로 생각된다.

2. 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 비교 분석

잣나무 잎 추출물 및 분획물의 총 페놀 함량은 gallic acid

를 표준물질로 하여 측정하였다. 그 결과 EtOAc 분획물에서 $259.09 \text{ mg} \cdot \text{GAE/g}$ 으로 가장 높은 값을 보였다. 80% EtOH 추출물과 n-BuOH 분획물은 각 $109.00 \text{ mg} \cdot \text{GAE/g}$, $114.55 \text{ mg} \cdot \text{GAE/g}$ 으로 유사한 값을 보였고, water 분획물 $26.10 \text{ mg} \cdot \text{GAE/g}$, n-Hexane 분획물 $23.69 \text{ mg} \cdot \text{GAE/g}$ 순이었다 (Fig. 1).

총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 하여 측정하였고, 그 결과 80% EtOH 추출물에서 $49.48 \text{ mg} \cdot \text{QE/g}$, EtOAc 분획물에서 $49.41 \text{ mg} \cdot \text{QE/g}$, n-Hexane 분획물에서 $27.79 \text{ mg} \cdot \text{QE/g}$ 값을 보였으며, n-BuOH 분획물과 water 분획물에서는 검출되지 않았다 (Fig. 2).

Kwak과 Choi (2015)는 복숭아꽃의 EtOH 추출물과 EtOAc, butanol을 이용하여 분획한 분획층의 총 페놀과 플라보노이드 함량을 검증한 결과 총 페놀 함량은 EtOAc 분획층에서 $394.6 \text{ mg} \cdot \text{tannic acid/g}$ 으로 가장 높은 함량을 나타냈으며, butanol 분획층의 경우 $128.3 \text{ mg} \cdot \text{tannic acid/g}$, EtOH 추출물에서 $78.1 \text{ mg} \cdot \text{tannic acid/g}$ 순이었다고 하였고 총 플라보노이드의 상대적 함량은 EtOAc 분획층이 $253.7 \text{ mg} \cdot \text{rutin/g}$, butanol 분획층이 $93.1 \text{ mg} \cdot \text{rutin/g}$, EtOH 추출물이 $55.3 \text{ mg} \cdot \text{rutin/g}$ 순으로 나타났다고 보고하였다.

이상의 보고를 본 연구 결과와 비교하여보면 추출물 및 분획층의 상대적 함량 차이에 있어서 총 페놀화합물의 경우 추출물 및 분획층 시료별 차이는 유사하게 나타났다. 하지만 총 플라보노이드 함량에서는 EtOAc 분획층과 80% EtOH 추출물이 높은 함량으로 확인되었으나 n-BuOH, water 분획물에서 측정되지 않은 부분은 차이가 있었다. 이는 실험재료, 용매제의 용량 그리고 희석의 정도에 따라 나타나는 상대적 함량의 차이라고 여겨지며, 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 1. Radical scavenging activity of 80% ethanol leaf extract and different solvent fractions in *P. koraiensis*.

Extract / Fractions	RC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
	DPPH ¹⁾	ABTS ²⁾
80% EtOH	92.77 ± 14.81^c	27.38 ± 1.36^b
n-Hexane	130.32 ± 6.35^d	132.73 ± 13.56^d
EtOAc	23.83 ± 1.15^a	6.11 ± 0.08^a
n-BuOH	47.89 ± 2.01^b	26.24 ± 1.13^b
Water	100.47 ± 17.84^d	99.63 ± 9.91^c
Ascorbic acid	7.83 ± 0.97^a	9.71 ± 0.99^a
BHA	8.22 ± 0.87^a	6.45 ± 1.00^a
BHT	48.64 ± 0.84^c	18.13 ± 0.97^{ab}

¹⁾DPPH; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging activity. ²⁾ABTS; [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] scavenging activity. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown ($n = 3$). *Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, $p < 0.05$).

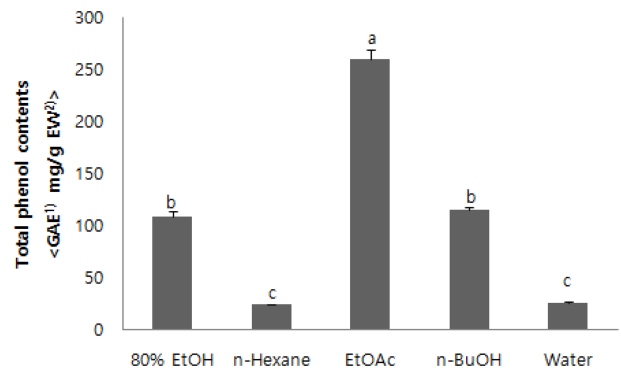


Fig. 1. Total phenolic contents of 80% ethanol leaf extract and different solvent fractions in *P. koraiensis*. ¹⁾GAE; gallic acid equivalents. ²⁾EW; amount of extract and fractions. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown ($n = 3$). *Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, $p < 0.05$).

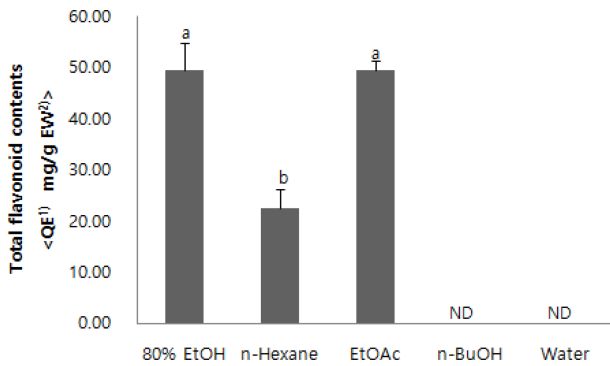


Fig. 2. Total flavonoid contents of 80% ethanol leaf extract and different solvent fractions in *P. koraiensis*. ¹QE; quercetin equivalents. ²EW; amount of extract and fractions. ND; not detected. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown ($n = 3$). *Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, $p < 0.05$).

3. Collagenase 및 Elastase 저해활성 비교 분석

잣나무 잎 추출물 및 분획물이 가지는 주름 개선 효능 평가를 위하여 collagenase와 elastase의 저해활성에 미치는 영향을 확인하였다. 모든 시험은 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 동일한 농도로 처리하여 진행하였다.

Collagenase 저해활성은 잣나무 잎의 80% EtOH 추출물에서 20.27%로 가장 높은 저해율을 나타내었는데, 대조군으로 사용된 단일물질인 EGCG의 9.58% 저해율보다 약 2.1 배 높은 저해율을 보였다. n-BuOH 분획물에서 7.45% 저해율을 보였으며, n-Hexane, EtOAc, water 분획물에서는 저해 활성을 확인하지 못하였다 (Table 2).

Elastase 저해활성은 n-Hexane 분획물에서 14.71%로 가장 높은 저해활성을 확인했으며, 80% EtOH 추출물에서 7.50%의

Table 2. Anti-wrinkle activities of 80% ethanol leaf extract and different solvent fractions in *P. koraiensis*.

Extract / Fractions	Collagenase inhibition activity	Elastase inhibition activity
	(%)	(%)
80% EtOH	20.27 \pm 1.15 ^a	7.50 \pm 2.24 ^c
n-Hexane	ND	14.71 \pm 1.77 ^b
EtOAc	ND	0.70 \pm 0.79 ^d
n-BuOH	7.45 \pm 0.05 ^b	1.52 \pm 2.05 ^d
Water	ND	ND
EGCG ¹⁾	9.58 \pm 0.00 ^b	-
Ursolic acid	-	24.11 \pm 2.14 ^a

¹⁾EGCG; epigallocatechin gallate. ND; not detected. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown ($n = 3$). *Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, $p < 0.05$).

저해율을 나타내었다. 반면 EtOAc, n-BuOH, water 분획물에서는 저해 활성이 낮거나 확인하지 못하였다 (Table 2).

Jeon (2018)은 HDF human dermal fibroblast 세포에 대한 잣나무 잎 추출물의 collagen 생성 촉진능 변화를 관찰하기 위해 잣나무 잎 추출물을 HDF 세포에 48 시간 처리 후 배양 상층액을 ELISA 방법으로 분비된 collagen의 함량을 측정할 결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 70% EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 7.62%의 가장 높은 collagen 생성능 증가를 보였으며, 농도 의존적으로 collagen이 촉진됨을 확인하였다고 보고한 바 있다. 이러한 보고와 본 연구에서의 collagenase와 elastase 저해활성을 동시에 만족하는 잣나무 잎 80% EtOH 추출물은 주름 개선 기능성 소재로의 사용 가능성이 있는 것으로 기대된다.

4. 세포 효능 평가 비교 분석

4-1. MTT assay

잣나무 잎 추출물 및 분획물을 100, 200, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석하여 세포독성을 확인하였다. 시료의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 감소하는 경향을 나타냈으나, 80% EtOH 추출물과 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH 분획물은 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 97% 이상의 세포 생존율을 보여 실험 농도 내에서 세포독성을 나타내지 않았으며, water 분획물의 경우 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 87% 수준의 세포 생존율을 확인하였다 (Fig. 3).

Jeon (2018)의 연구결과에 의하면 RAW264.7 대식세포를 활용한 잣나무 잎 70% EtOH 추출물을 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 세포독성을 확인한 결과 본 연구에서와 유사하게 세포 생존률이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으나, 모든 농도에서 77% 이상의 세포 생존율을

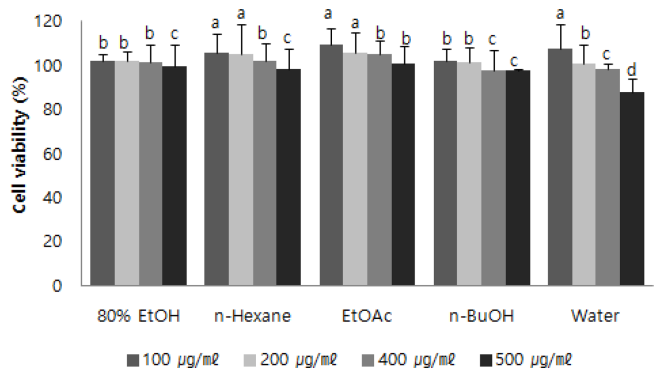


Fig. 3. Cell viability of 80% ethanol leaf extract and different solvent fractions in *P. koraiensis*. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown ($n = 3$). *Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, $p < 0.05$).

나타내었다고 보고하였다. 이러한 결과를 통하여 잣나무 잎 추출물 및 분획물은 높은 농도에서도 세포에 독성을 나타내지 않으며 안전하게 사용할 수 있는 소재임을 확인할 수 있었다.

4-2. Procollagen 생합성 및 MMP-1 저해 활성

잣나무 잎 추출물 및 분획물의 피부 세포 내의 procollagen 생합성과 MMP-1 저해활성은 ELISA 법을 이용하여 측정하였다. PIP (procollagen Type-I C-peptide)와 MMP-1 (matrix metalloprotease-1)의 함량을 ELISA법을 이용하여 측정된 결과, n-Hexane 분획물을 500 µg/ml의 수준으로 처리한 경우 procollagen 생합성 결과는 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비하여 procollagen 생성량을 약 6.6 배 증가시키는 결과를 나타내었으며, 동일한 농도에서 MMP-1의 경우 함량 측정이 되지 않을 정도로 생성이 억제되며 단백질 발현이 감소함을 확인하였다. 잣나무 잎의 80% EtOH 추출물의 경우 500 µg/ml 처리에서 procollagen 생합성은 대조군에 비하여 함량이 약 6.4 배 증가하였고, MMP-1의 경우 12.10%의 함량으로 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 4 and Fig. 5).

노화에 따라 생기는 주름은 진피의 섬유아세포의 기능 저하로 기인한다. UV 조사나 외부 스트레스를 받게 되면 ERK와 c-JUN kinase의 활성이 증가하게 된다. 이로 인해 collagen을 분해하는 효소인 collagenase의 활성이 증가되고 procollagen 합성량이 저하되어 피부의 노화가 진행되며 주름이 생기게 된다 (Zague *et al.*, 2011). 세포외기질을 분해하는 효소로 알려진 MMPs는 자외선에 의해 활성화되는 단백질인 activating protein-1 (AP-1)에 의해 유도되며, 정상 표피와 인체 진피 섬유아세포에 자외선에 의해 MMP-1, MMP-3의 발현이 증가된다 (Lee *et al.*, 2018).

Lee 등 (2009)에 의하면 MMP-1이 광노화로 인한 세포외기질 분해에 중요한 역할을 하며, 피부 주름을 예방하기 위해서는 세포외기질 분해효소인 MMPs의 작용을 억제시키고, collagen 합성을 증가시키는 것이 필요하다고 보고하였다.

이러한 보고와 연구 결과를 통하여 procollagen Type-I의 합성을 증가시키고 MMP-1 발현을 억제시키는 것이 피부노화를 방지하는 중요한 요인이 됨을 알 수 있었으며, 잣나무 잎 소재는 피부 주름의 예방과 개선에 효과적일 것으로 사료된다.

이상의 결과를 보면 잣나무 잎은 80% EtOH 추출물과 각 분획물에 따라 생리활성 및 주름개선 효능의 차이가 있었다. 항산화 활성을 확인하는 DPPH 및 ABTS 자유 라디칼 소거 활성과 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 EtOAc 분획물에서 높은 수준의 생리활성을 확인하였다. 주름개선 효능을 확인하는 collagenase 및 elastase 저해 활성과 procollagen 생합성 및 MMP-1 저해 활성 실험 결과를 종합하여 보면, 80% EtOH 추출물이 수행한 모든 실험에서 높은 활성을 나

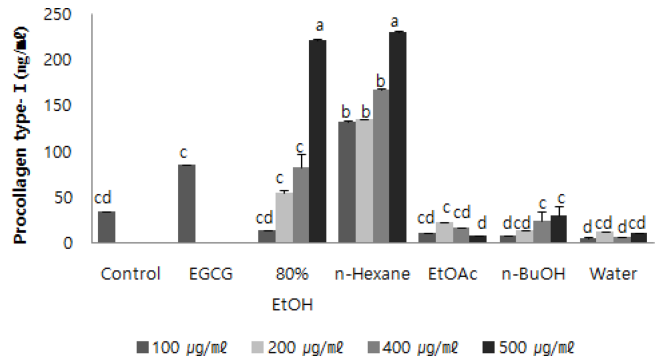


Fig. 4. Procollagen type-I synthesis of 80% ethanol leaf extract and different solvent fractions in *P. koraiensis*. EGCG; epigallocatechin gallate. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown (n = 3). *Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, p < 0.05).

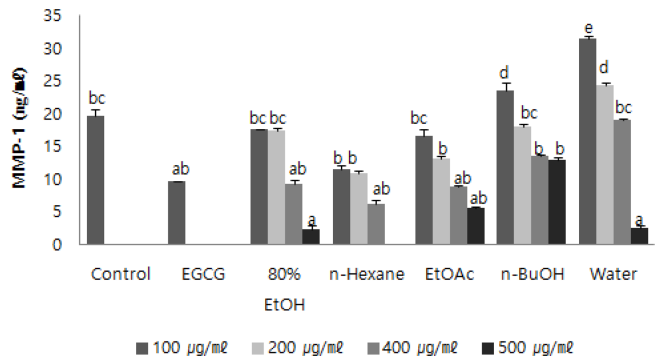


Fig. 5. Matrix metalloproteinase-1 of 80% ethanol leaf extract and different solvent fractions in *P. koraiensis*. EGCG; epigallocatechin gallate. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown (n = 3). *Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, p < 0.05).

타내었다.

잣나무 잎의 80% EtOH 추출물과 EtOAc 분획물은 낮은 세포독성을 나타내어 안전하며, 피부 손상 및 노화 지연과 피부 건강에 도움을 주기 위한 소재로 활용하기에 적합하다. 이러한 결과는 잣나무 잎 추출물과 분획물이 피부건강 및 미용 목적에 맞는 기능성 소재로 개발할 수 있는 기초 자료로서 활용 가치가 높을 것으로 기대된다.

REFERENCES

Bae BH and Kim YO. (2003). Effect of leaf aqueous extracts from some gymnosperm plant on the seed germination, seedling growth and transplant of *Hibiscus syriacus* varieties. *The Korean Journal of Ecology*. 26:37-47.

- Clarke G, Ting KN, Wiart C and Fry J.** (2013). High correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian rainforest. *Antioxidants*. 2:1-10. <https://www.mdpi.com/2076-3921/2/1/1> (cited by 2020 Nov 23).
- Han SB, Gu HA, Kim SJ, Kim HJ, Kwon SS, Kim HS, Jeon SH, Hwang JP and Park SN.** (2013). Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 39:1-8.
- Hwang HJ, Yu JS, Lee HY, Kwon DJ, Han W, Heo SI and Kim SY.** (2014). Evaluations on deodorization effect and anti-oral microbial activity of essential oil from *Pinus koraiensis*. *Korean Journal of Plant Resources*. 27:1-10.
- Jeon MY.** (2018). Anti-oxidative and cellular physiological effects of *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. leaf extracts. Ph.D. Thesis. Konkuk University. p.1-103.
- Kim CJ, Seong ES, Yoo JH, Lee JG, Kim NJ, Choi SK, Lim JD and Yu CY.** (2016). Biological activity of *Panax ginseng* C. A. Meyer culture roots fermented with microorganisms. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 24:191-197.
- Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH and Lee BH.** (2012). Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean Journal of Food Science Technology*. 44:337-342.
- Kim MJ.** (2016). The development of cosmetic ingredient from *Saururus chinensis* & *Cinnamomum camphora*(L.) extract. Master Thesis. Nambu University. p.1-57.
- Kim YJ, Cho BJ, Ko MS, Jung JM, Kim HR, Song HS, Lee JY, Sim SS and Kim CJ.** (2010). Anti-oxidant and anti-aging activities of essential oils of *Pinus densiflora* needles and twigs. *Yakhak Hoeji*. 54:215-225.
- Kwak CS and Choi HL.** (2015). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract and sequential fractions of flowers of *Prunus persica* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 44:1439-1449.
- Kwak YJ, Lee DH, Kim NM and Lee JS.** (2005). Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 13:213-216.
- Lee HA, Lee JM, Hong SM, Kim NY, Jeong YJ, Lee HS and Lee JS.** (2018). Protective effects of ethanol extracts from selected food materials against UVB-Induced damage in human skin fibroblast(Hs68) Cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 47:664-668.
- Lee HJ, Choi YJ, Choi DH and Hong IP.** (2003). Extractives of *Pinus koraiensis* wood. *Mokchae Konghak*. 31:49-56.
- Lee TB, So YK, Kim SY and Hwang JY.** (2020). Biological activities of cosmetic material from ten kinds of flower ethanol extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 28:260-275.
- Lee YR, Noh EM, Han JH, Kim JM, Hwang JK, Hwang BM, Chung EY, Kim BS, Lee SH, Lee SJ and Kim JS.** (2012). Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts. *European Journal of Pharmacology*. 674:80-86.
- Lee YR, Noh EM, Jeong EY, Yun SK, Jeong YJ, Kim JH, Kwon KB, Kim BS, Lee SH, Park CS and Kim JS.** (2009). Cordycepin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase expression by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts. *Experimental and Molecular Medicine*. 41:548-554.
- Li K, Li Q, Li J, Zhang T, Han Z, Gao D and Zheng F.** (2007). Antitumor activity of the procyanidins from *Pinus koraiensis* bark on mice bearing U14 cervical cancer. *Yakugaku Zasshi*. 127:1145-1151.
- Ozgen M, Reese RN, Tulio Jr. AZ, Scheerens JC and Miller AR.** (2006). Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power(FRAP) and 2, 2 ϕ -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54:1151-1157.
- Pillai S, Oresajo C and Hayward J.** (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation-A review. *International Journal of Cosmetic Science*. 27:17-34.
- Rhie GE, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC and Chung JH.** (2001). Aging-and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*. *Journal of Investigative Dermatology*. 117:1212-1217.
- Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventós RM.** (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299:152-178.
- Su X, Wang Z and Liu J.** (2009). *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 117:681-686.
- Takema Y, Yorimoto Y, Kawai M and Imokawa G.** (1994). Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. *British Journal of Dermatology*. 131:641-8.
- Won DH, Han SB, Hwang JP, Kim SJ, Park JN and Park SN.** (2012). Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of *Lindera obtusiloba* Blume extracts. *Journal of Society Cosmetic Scientists Korea*. 38:297-304.
- Wünsch E and Heidrich HG.** (1963). Zur quantitativen bestimmung der kollagenase. *Biological Chemistry*. 333:149-151.
- Yaar M and Gilchrist BA.** (2007). Photoaging: Mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology*. 157:874-887.
- You DY.** (2010). A study of anti-oxidation effect and anti-bacterial activation of *Pinus koraiensis* extract. Master Thesis. Kyonggi University. p.1-33.
- Zague V, de Freitas V, da Costa Rosa M, de Castro GÁ, Jaeger RG and Machado-Santelli GM.** (2011). Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses matrix metalloproteinase 2 activity. *Journal of Medicinal Food*. 14:618-624.