



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

6',7'-dihydroxybergamottin의
항염증 및 주름개선 효과

濟州大學校 大學院

化 學 科

玄 智 善

2018年 2月

6',7'-dihydroxybergamottin의 항염증 및 주름개선 효과




指導教授 玄 昌 久

玄 智 善

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2017年 12月

玄智善의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 李 南 昊 
委 員 金 德 洙 
委 員 玄 昌 久 

濟州大學校 大學院

2017年 12月

A Study on 6',7'-dihydroxybergamottin for
Anti-inflammatory and Anti-wrinkle effect

Ji-Seon Hyun
(Supervised by professor Chang-Gu Hyun)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Science

2017. 12.

This thesis has been examined and approved.

Nam Ho Lee

Duk Soo Kim

CHANG-GU HYUN

12/29
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

LIST OF TABLE	iv
LIST OF FIGURES	v
LIST OF ABBREVIATIONS	viii
ABSTRACT	ix
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	9
1. 재료	9
2. 실험방법	10
1) 항산화 활성 평가	10
(1) DPPH radical 소거능 활성	10
(2) ABTS radical 소거능 활성	12
2) 주름개선 활성 평가	14
(1) Elastase 저해 활성	14
(2) Type 1 pro-collagen 생합성	16
(3) Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 저해 활성	16
(4) Western blot 분석	16
3) 미백 활성 평가	19
(1) Tyrosinase 저해 활성	19
4) 항균 활성 평가	21
(1) 균주 배양	21
(2) Paper disc diffusion method	21
5) 항염증 활성 평가	23
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	23
(2) Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) 생성 억제 활성	23
(3) Pro-inflammatory cytokine 발현 억제 활성	23

(4) Western blot 분석	25
6) 각 세포별 배양 및 독성평가	26
(1) 세포 배양	26
(2) 세포 독성 평가 (MTT assay).....	27
III. 결과 및 고찰	29
1. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 항산화 활성	29
1) DPPH radical 소거능 활성	29
2) ABTS radical 소거능 활성	29
2. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 주름개선 활성	31
1) Elastase 저해 활성	31
2) 세포 독성 (MTT assay)	31
3) Type 1 pro-collagen 생합성 활성	33
4) Smad2 와 Smad3 인산화 활성	33
5) Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 저해 활성	36
6) MAPKs 인산화 억제 활성	36
3. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 미백 활성	39
1) Tyrosinase 저해 활성	39
4. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 항균 활성	41
1) Paper disc diffusion 항균 활성	41
5. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 항염증 활성	43
1) 세포 독성(MTT assay) 및 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	43
2) Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) 생성 억제 활성	43
3) Pro-inflammatory cytokine 발현 억제 활성	43
4) iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 활성	46
5) MAPKs 인산화 억제 활성	46
6) NF- κ B 인산화 억제 활성	48

6. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)이 HaCaT human keratinocyte 세포생존에 미치는 영향	50
1) 세포 독성 (MTT assay)	50
IV. 고찰	52
V. 참고문헌	57

LIST OF TABLE

Table 1. Antimicrobial activity of DHB on <i>P. acnes</i>	42
---	----

LIST OF FIGURES

Figure 1. Mechanism of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and (B) Smad signaling	3
Figure 2. (A) Mechanism of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and (B) nuclear transcription factor-kappa-B (NF-κB)	6
Figure 3. Chemical structures of furanocoumarin	8
Figure 4. Three kinds of the major furanocoumarins in grapefruits	8
Figure 5. Process of DPPH radical scavenging activity test	11
Figure 6. Principle of DPPH radical scavenging activity by an anti-oxi- dant	11
Figure 7. Process of ABTS radical scavenging activity test	13
Figure 8. Principle of ABTS radical scavenging activity by an anti-oxi- dant	13
Figure 9. Process of elastase inhibition activity test	15
Figure 10. Principle of Elastase inhibition activity by Elastase	15
Figure 11. Principle of ELISA assay	18
Figure 12. Principle of western blot assay	18
Figure 13. Process of tyrosinase inhibition activity test	20
Figure 14. Mechanism of melanogenesis	20
Figure 15. Process of bacterial culture	22
Figure 16. Process of the paper disc diffusion method	22
Figure 17. Process of nitric oxide (NO) assay	24
Figure 18. Principle of nitric oxide (NO) assay	24
Figure 19. Process of MTT assay.....	28
Figure 20. Principle of MTT assay.....	28
Figure 21. DPPH and ABTS radical scavenging activity of DHB	30

Figure 22. Elastase inhibition activity of DHB	32
Figure 23. Cell viability effects of DHB on human dermal fibroblasts ..	32
Figure 24. Type I pro-collagen biosynthesis Effects of DHB on human dermal fibroblast cells	34
Figure 25. Phosphorylation of Smad2 and Smad2 와 Smad3 Effects of DHB on the human dermal fibroblast cells	35
Figure 26. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) production by DHB on human dermal fibroblast cells	37
Figure 27. The effect of DHB of MAPKs protein expression in human dermal fibroblast cell	38
Figure 28. Tyrosinase inhibition activity of DHB	40
Figure 29. Antimicrobial activitiy of DHB on <i>P. acnes</i>	42
Figure 30. Cell viability and NO production Effects of DHB on LPS-in- duced RAW 264.7 cells	44
Figure 31. Effect of DHB on production of PGE ₂ and pro-inflammatory cytokines on LPS-stimulated RAW 264.7 cells	45
Figure 32. Inhibitory effects of DHB on inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression levels on LPS-induced RAW 264.7 cells	47
Figure 33. Inhibitory effects of DHB on MAPKs expression levels on LPS-induced RAW 264.7 cells	47
Figure 34. Effects of DHB on the expression levels of NF-κB and IκB- α on LPS-stimulated RAW 264.7 cells	49
Figure 35. Effects of DHB on the viability on HaCaT human keratino- cyte cells	51
Figure 36. DHB regulates the production of inflammatory mediators and cytokines by modulating the activation of the MAPK signaling pathway (ERK and JNK).....	56

Figure 37. DHB reduced MMP-1 production and increasing procollagen secretion and DHB increased the phosphorylation level of Smad2 leading to an increase in collagen synthesis..... 56

LIST OF ABBREVIATIONS

DHB	6',7'-dihydroxybergamottin
ABTS	2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
COX-2	cyclooxygenase-2
DMEM	Dulbecco modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ECM	extracellular matrix
EDA	electron donating ability
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FBS	fetal bovine serum
HDF	human dermal fibroblast
HRP	horse radish peroxidase
I κ B	inhibitor kappa B
IL-6	interleukin-6
iNOS	inducible NOS
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LPS	lipopolysaccharide
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MMP	matix metalloprotease-
NF- κ B	nuclear transcription factor-kappa-B
PBS	phosphate buffered saline
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PVDF	polyvinylidene fluoride
ROS	reactive oxygen species,
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TNF- α	tumor necrosis factor- α

ABSTRACT

In this study, in order to investigate the anti-inflammatory and anti-aging effects of 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB). First, this study was designed to elucidate the pharmacological and biological effects of DHB on the production of pro-inflammatory cytokines and inflammatory mediators by macrophages. The results obtained from the study indicate that DHB is an effective inhibitor of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) production in RAW 264.7 cells. The inhibitory effects of DHB included dose-dependent decreases in the expression of inducible NOS (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) proteins. DHB effectively inhibited LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6)) in a concentration-dependent manner. Furthermore, DHB inhibited the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (extracellular signal-regulated kinases (ERK) and c-Jun N-terminal kinases(JNK)) in LPS-induced RAW 264.7 cells. These results suggest that DHB attenuated LPS-induced release of pro-inflammatory mediators and cytokines probably via suppressing the activation of MAPK signaling. we also investigated the possibility that DHB may be an effective anti-wrinkle agent. up to 200 μ M DHB was shown to be non-toxic to human dermal fibroblasts (HDF). Then, a human type I pro-collagen production assay was performed in HDF cells treated with DHB. The results showed that DHB significantly increased type I pro-collagen production. DHB was also found to induce the phosphorylation of Smad2, an important transcription factor involved in the production of type I procollagen. In addition, DHB strongly inhibited MMP-1 production in a concentration-dependent manner. DHB inhibited the phosphorylation of MAPKs (ERK and JNK) in TNF- α induced Human

Dermal Fibroblast cells. These results suggest that DHB attenuated TNF- α induced release of MMP-1 probably via suppressing the activation of MAPK signaling. lastly, To assess the suitability of DHB for cosmetic applications, we also performed MTT assays on HaCaT human keratinocytes. DHB did not display any cytotoxicity in these assays. From these results suggest that DHB may be potential anti-wrinkle and anti-inflammatory agent for topical application in the cosmetic industry.

Key words : 6',7'-dihydroxybergamottin, Anti-inflammation, Anti-wrinkle, NF- κ B, MAPKs, Smad signaling pathway, pro-collagen, MMP-1

I. 서론

피부의 노화는 피부의 기능과 구조적 변화를 일으키는 내인성 노화와 외인성 노화에 의하여 발생하는 복잡한 생물학적 과정이다.¹ 일반적으로 내인성 노화는 세포대사과정 및 시간의 흐름에 따라 발생하는 노화라하고, 외인성 노화는 공해 및 화학물질 등의 외부자극에 의한 노화를 일컫는다. 특히 직접적인 자외선 조사에 의해 유발되는 노화를 광노화라고 한다.² 자외선에 장시간 노출되면 색소침착과 산화적 스트레스가 발생한다. 이때 생성된 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 피부에 형성되면 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM) 성분이 분해된다.³ 세포 외 기질은 콜라겐 (collagen)과 탄력섬유 (elastic fiber) 등을 포함하는 단백질 망상 구조로 진피층에 존재한다.⁴

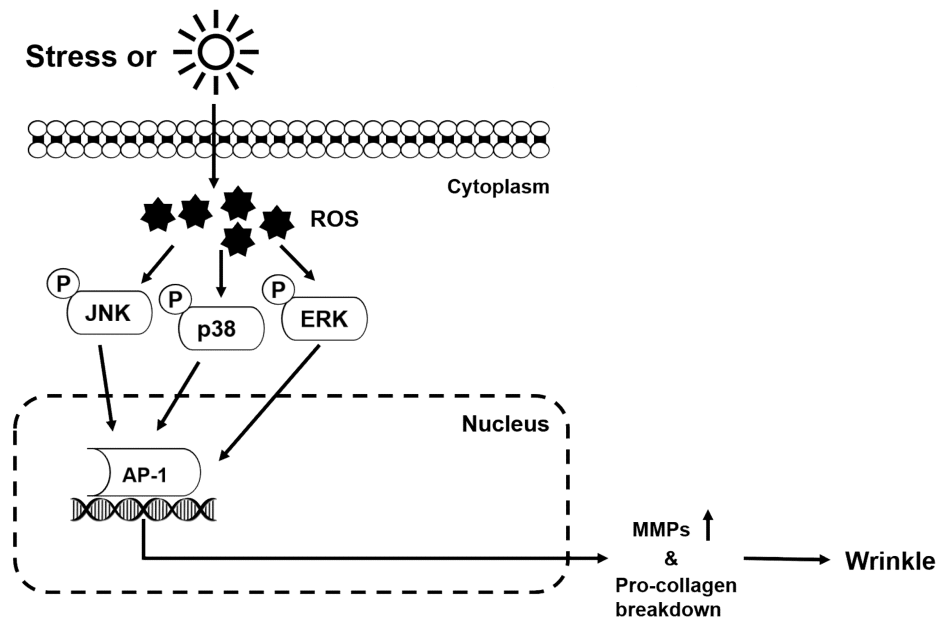
타입 I 콜라겐 (type I collagen)은 ECM을 구성하는 collagen 중에서 가장 풍부하다.⁵ 주름의 생성은 내인성, 외인성 요인으로 인하여 type I collagen의 합성이 저하되거나 그 분해효소인 matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1)의 활성이 증가하게 되어 ECM의 변성으로 주름이 발생하게 된다.⁶ MMP-1은 다른 이름으로 interstitial collagenase, type I collagenase로 불린다. 이러한 효소들의 family들은 MMPs라 불린다. MMPs는 기질에 따라 collagenases, gelatinases, 그리고 stromelysins으로 분류 할 수 있다. MMP-1과 MMP-13은 collagenase로서 천연 콜라겐을 분해하는 반면 MMP-2와 MMP-9는 gelatinases로서 기저막을 절단한다. 한편 MMP-3과 MMP-10은 stromelysin과 같은 collagenase와 gelatinases보다 더 광범위한 기질 특이성을 부여한다.⁷

다양한 MMPs의 발현을 조절하는 세포 신호전달경로로는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)가 관여한다고 보고되어 있다.⁸ 활성화된 MAPKs는 MMPs의 발현을 촉진하는 전사인자인 activator protein-1 (AP-1)을 유도하고 유도된 AP-1에 의하여 콜라겐의 분해가 증가된다.^{9,10} type I collagen의 생합성과 관련된 세포 신호전달경로로는 transforming growth factor-beta1 (TGF-β)/Smad가 관여한다고 보고되어 있다. TGF-β1은 콜라겐의 합성을 촉진하는 사이토카인 (cytokine)으로 TGF-β1이 섬유아세포의 TGF-β1 수용체에 결합하면 Smad family인 Smad2와 Smad3가 활성화가 되고 type I collagen의 생합성이 촉진된다 (Figure 1A, Figure 1B).¹¹

동양의 화장품 역사에서 공통적으로 피부미백이 미의 기준으로 추구되어왔다.¹² 미백화장품이란 피부의 미백에 도움을 주는 화장품으로써 자외선 노출 및 노화로 인한 과도한 멜라닌 (melanin) 색소의 침착을 예방하거나 침착되어있는 melanin 색소의 색을 없게하여 기미와 주근깨 및 검버섯 등이 생성되는것을 억제 시켜주는 기능을 지닌 화장품이다.^{13,14} melanin은 인체의 표피층에 있는 멜라노사이트 (melanocyte)내의 멜라노소체 (melanosome)에서 합성되어 만들어지는 적갈색 또는 흑갈색의 고분자 화합물으로써 자외선이 진피 내로 흡수되는 것을 막고 피부조직의 유전자변형 또는 피부암의 발생을 억제하여 피부를 보호하는 역할을 담당한다. 이때 발생하는 생합성과정에는 티로신 (tyrosine)을 활성화시키는 효소로 티로시나제 (tyrosinase) 효소가 관여하고 단계적(cascade)효소 반응과 자동산화 반응에 의하여 tyrosine을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)를 거쳐 DOPA quinone으로 전환하고 도파크롬 (DOPAchrome)으로 변환하여 melanin을 생합성한다.^{15,16,17}

따라서 생합성과정에서 tyrosinase의 활성을 억제하거나 melanin 생성 관련 유전자 억제를 통하여 미백효과를 나타낼 수 있다. 식품의약품안전처 고시에 따른 미백효과 소재로는 알부틴 (arbutin), 나이아신아마이드 (niacinamide), 닥나무추출물, 감초, 아스코빌글루코사이드 (ascorbyl glucoside) 등 9종이 알려져 있다.¹⁸

(A)



(B)

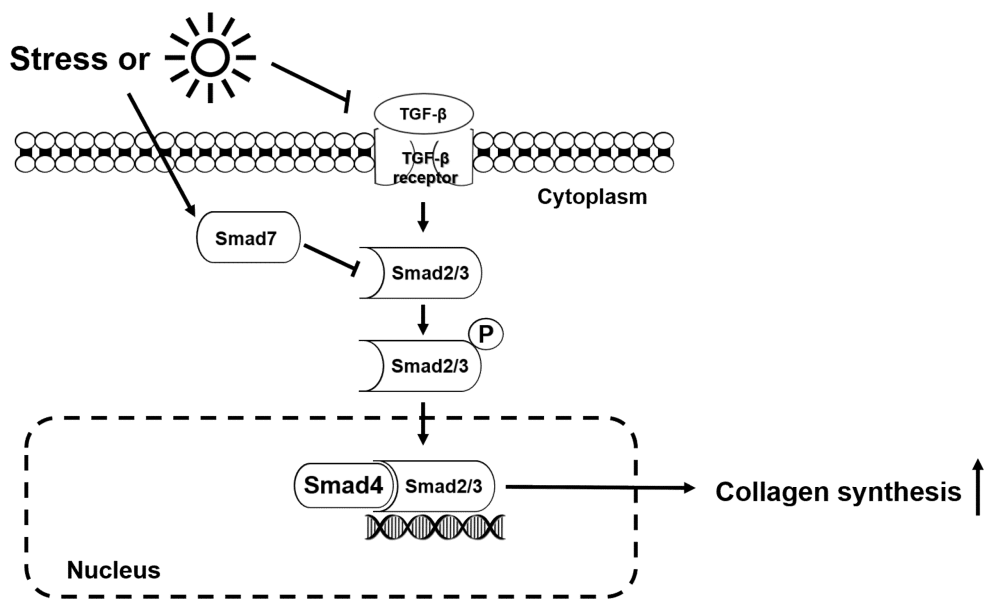


Figure 1. (A) Mechanism of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and (B) Smad signaling pathway.

피부에 염증을 유발하는 세균으로는 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnes* 등이 보고되어 있으며 그 중 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)는 피부에 분포하는 정상 상재균으로, 그람 양성균이며 대표적인 여드름 유발 원인균으로 알려져 있다. 여드름은 젊은 연령층에서 주로 발생하였으나 환경오염, 약물 남용 등이 관여하여 발생 연령층이 넓어지는 현상이 나타났다. 또한 호르몬 및 면역학적 요소 등에 의해 피지의 과다형성으로 모공이 막힌 피지선에서 여드름 형성의 초기단계인 미세면포(microcomedone)가 형성되고 식세포의 일종인 단핵구(monocyte)를 끌어들이는 cytokien을 분비하여 염증반응을 일으키게되고 이후 발생하게 되는것이 여드름이다. 염증의 일차적인 원인은 아니지만, 염증 발생부위를 더욱 확장시켜 결국 여드름을 악화시킨다.¹⁹ *P. acnes*는 염증 유발과 면역반응을 유도하고 각질형성세포를 자극하여 다량의 superoxide anion (O_2^-)을 생성한다. 이렇게 생성된 O_2^- 는 피부노화에 관여할 뿐만 아니라 nitric oxide (NO)와 함께 peroxynitrites 형태로 각질형성세포의 용해에 관여하여 여드름 생성을 증가시킨다.²⁰ 여드름 치료에 사용되는 항생제로 tetracycline, clindamycin, erythromycin 등이 알려져 있다. 하지만 이러한 항생제의 내성을 갖는 균주가 증가하는 추세로 인한 한계를 해결하고자 천연물질기반의 치료방안이 모색되고 있는 실정이다.^{21,22}

염증이란 화학적, 물리적인 외부자극 및 미생물 등에 의해 발생하는 조직손상을 정상상태로 회복시키는데 기여하는 생체조직의 정상적인 보호반응이다.²³ 하지만, 지속적이고 과도한 염증반응은 오히려 정상적인 조직을 손상시켜 후에 관절염, 다발성 경화증과 같은 염증성 질환과 더불어 암으로 진행되기도 한다.²⁴ RAW 264.7 cells (murine macrophage cell type)과 같은 대식세포는 식균 작용을 통하여 염증반응에 관여하는 주요 세포로 알려져 있다.²⁵ 초기 항염증 효과를 평가할 때 사용되는 lipopolysaccharide (LPS)는 내독소로 잘 알려져 있으며, 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 주요성분으로 다양한 염증매개인자의 생산을 자극한다.²⁶

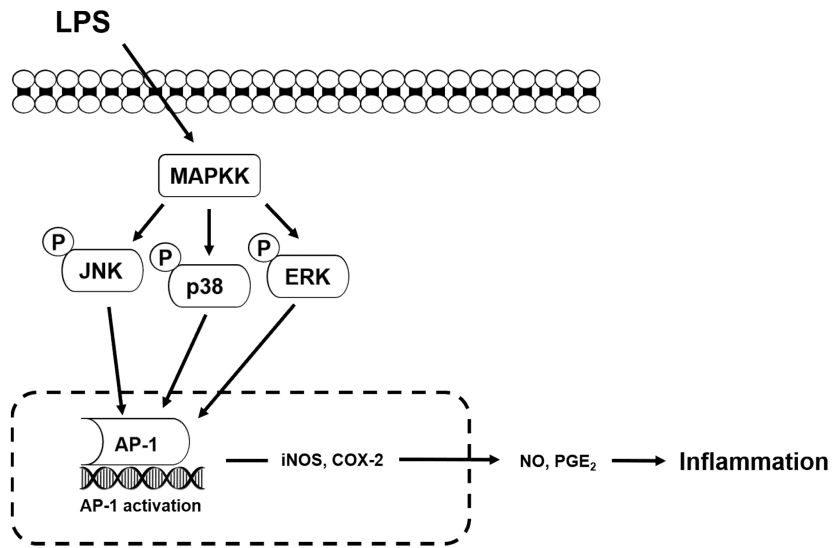
LPS에 의해 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine과 염증 매개 인자인 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 분비하며 각각 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 효소와 속도조절단계 효소인 cyclooxygenase-2 (COX-2) 의해서 만들어진다.²⁷

이러한 염증인자들의 발현에 관여되는 주요 신호전달경로로 mitogen activated protein kinases (MAPKs)와 nuclear transcription factor-kappa-B (NF- κ B)경로가 있다. 이 경로들이 활성화가 되면 외부 인자의 탐식작용이 활성화되며 염증반응이 증가하게 된다. 이에 따라 신호전달 분자인 MAPKs 와 NF- κ B의 활성조절은 염증반응을 조절하기 위한 핵심요소이다 (Figure 2A, Figure 2B).²⁸

MAPKs는 세포의 성장, 생존, 분화, 사멸에 관여하며 스트레스 및 염증조절에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.²⁹ MAPKs의 주요 구성인자로는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK), p38 MAPK kinase (p38)로 구분 된다.³⁰ MAPKs가 활성화될때, LPS를 감지하는 Toll-like receptor 4 (TLR4)를 활성화 시켜 NF- κ B의 핵 전위를 유도하고 염증반응을 일으키기도한다.³¹

NF- κ B는 염증반응 유전자들의 발현에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자이다. 일반적으로 알려져 있는 NF- κ B계열의 단백질은 p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2) 5종으로 homo 혹은 hetero 형태로 조합되어 세포질에 존재한다.³² 평소에는 저해단백질인 inhibitor kappa B (I κ B)와 복합체를 이루어 비활성화 상태로 세포질에 존재하지만 LPS와 같은 외부 자극에 의해 I κ B kinase에 의하여 I κ B가 인산화 되어 분해되고, 유리된 NF- κ B가 핵으로 이동됨으로써 다양한 염증매개 유전자의 발현을 촉진한다.³³

(A)



(B)

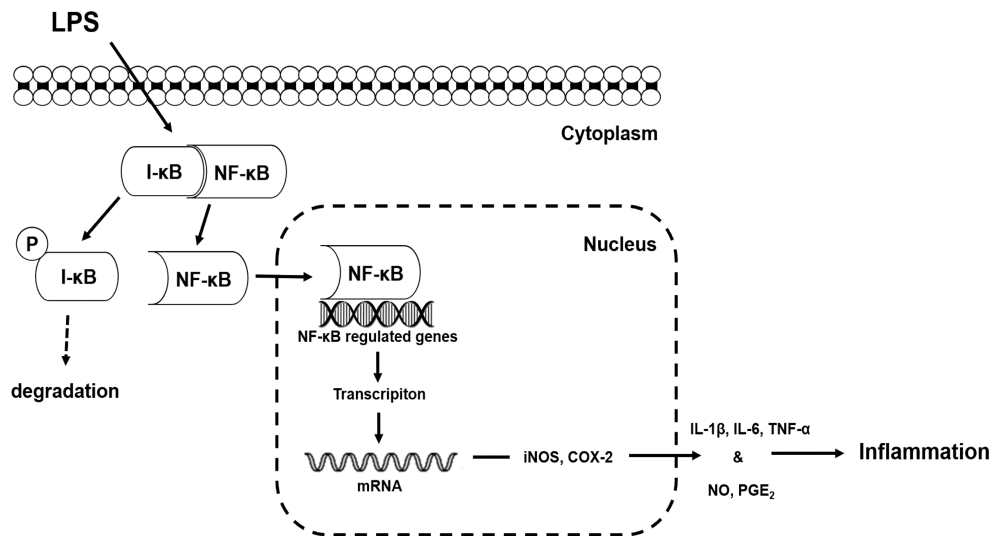


Figure 2. (A) Mechanism of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and (B) nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B).

현대인들의 경제수준과 의학수준의 발달 및 지식수준이 향상 되면서 젊음과 아름다움을 추구하는 경향 및 피부건강에 대한 관심이 높아졌다. 특히, 화장품 분야에서는 기능성 화장품 산업이 성장하는 추세이다.⁹

기능성화장품 (cosmeceutical)이란 화장품 (cosmetics)의 개념과 의약품 (pharmaceutical)의 개념을 결합한 제품으로 미백에 도움을 주는 제품과 주름개선에 도움을 주는 제품, 여드름용 화장품, 아토피용 화장품 등이 있다.³⁴ 즉, 효과가 있는 기능성 제품에 치료의 개념을 접목하여 화장품 기능 이외의 고기능성을 강조한 화장품이라 할수있다. 최근들어 소비자가 건강과 웰빙의 중요성을 높이 평가하고 자연친화적인 소비형태의 변화로 인하여, 천연유래 소재를 이용한 기능성 화장품 연구가 급증하고 있다.³⁵ 이를 바탕으로 천연유래 소재개발이 시급할것으로 사료되어 감귤류 (citrus)에 존재하는 furanocoumarin의 일종인 6',7'-dihydroxybergamottin의 항염증 효과와 주름개선 효과에 대하여 연구를 진행하였다 (Figure 3). 감귤류에는 furanocoumarin 이외에도 flavonoid, carotinoid, limonoid 등 다양한 기능성 물질들이 함유되어있다.³⁶ 이러한 생리활성 물질들이 풍부하여 항염과³⁷항산화 및 항균³⁸같은 다양한 효과를 입증하는 연구가 보고되어있다. 전 세계적으로 섭취하는 감귤류의 종류에는 오렌지, 레몬, 자몽 등이 있으며 특히, 자몽에서 발견되는 주요 furanocoumarin에는 bergamottin, epoxybergamottin 및 6',7'-dihydroxybergamottin 등이 있다 (Figure 4).³⁹ 최근, Bergamottin은 암 세포 성장억제효과를 나타내는 연구결과가 보고되었다.⁴⁰ 하지만 6',7'-dihydroxybergamottin의 항염증 및 주름개선에 관한 연구는 보고된바 없다.

본 연구에서는 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)가 천연유래성분 기반의 기능성 화장품소재로써 활용 가능성을 알아보고 그 중에서도 항염증 및 주름개선 효과에 대한 기전연구를 통하여 평가하였다.

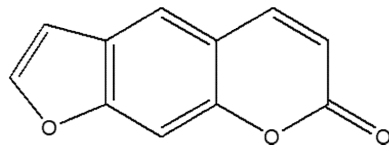


Figure 3. Chemical structures of furanocoumarin.

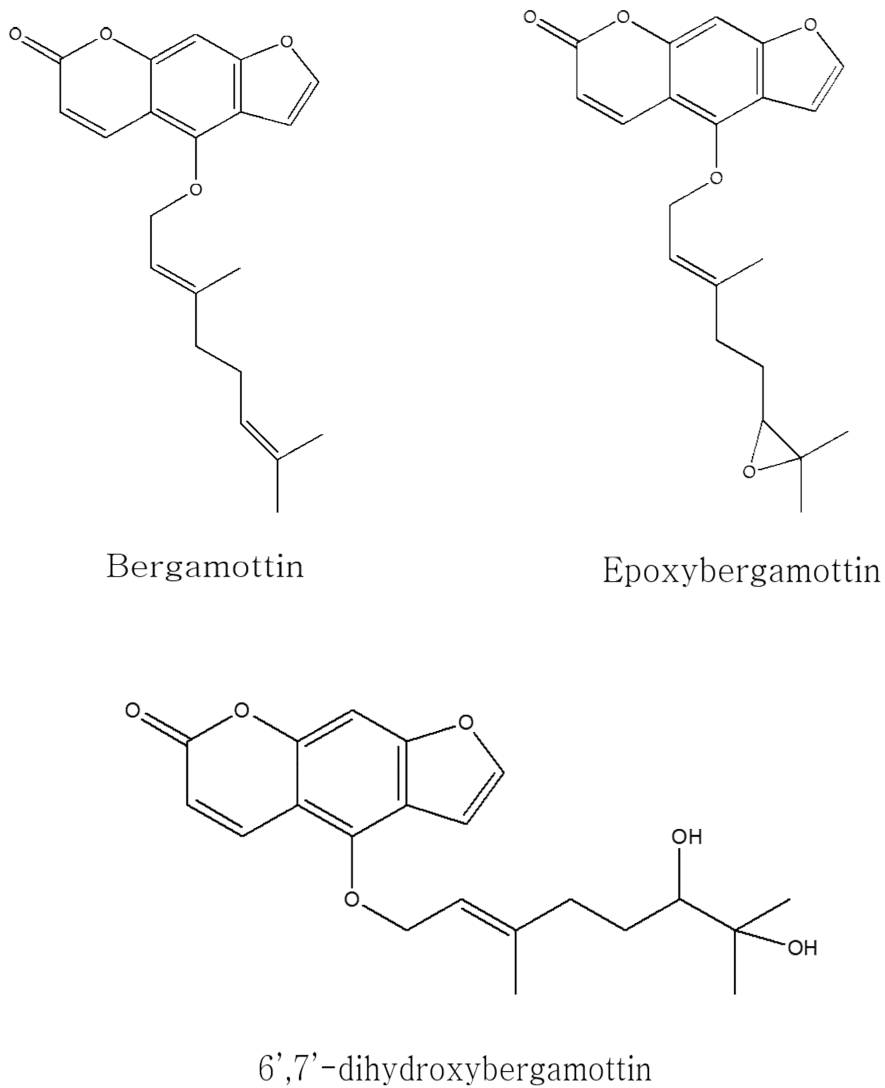


Figure 4. Three Kinds of the major furanocoumarins in grapefruits

II. 재료 및 방법

1. 재료

세포배양에 사용되는 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)배지와 항생제(penicillin/streptomycin), 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS), F-12 nutrient mixture와 단백질 정량에 사용된 Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)로부터 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약과 lipopolysaccharide (LPS)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α), 그리고 Dimethyl sulfoxide (DMSO)와 griess reagent, Radioimmunoprecipitation (RIPA) assay buffer 는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, phosphate buffered saline (PBS), Enhanced chemiluminescence (ECL)시약은 Biosesang (Sungnam, Gyeonggi-do, Korea) 으로부터 구입하였고, TNF- α , IL-6, PGE₂ 효소결합면역측정 (ELISA) kit는 Abcam (Cambridge, MA, USA)로부터 구입하였고, procollagen type-I C peptide (PIP) EIA 효소결합면역측정 (ELISA) kit는 Takara (Kusatsu, Japan)로부터 구입하였고, TGF- β 1 와 Human pro-MMP-1 효소결합면역측정 (ELISA) kit는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)으로부터 구입하였고, poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane과 Tris-buffered saline (TBS), tween 20은 Bio-rad (Hercules, CA, USA)로부터 구입하였고, 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB), 1차항체 Smad2는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)로부터 구입하였고, phospho Smad2, β -actin, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-P38, p38, I κ B- α , horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse immunoglobulin G (IgG) 2차항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였다. microplate reader는 (Sunrise™, Tecan Co.)을 사용하였고 현상기기는 Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT, Deutschland, Germany)을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 항산화 활성 평가

(1) DPPH radical 소거능 활성

항산화 활성은 변형된 Blois 등의 방법⁴¹을 이용하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical에 대한 전자공여능 (electron donating ability, EDA)을 측정하였다. 먼저 시료 20 μ L와 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L처리하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 시료처리군과 무처리군 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다. 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} : 517 nm에서 DPPH의 흡광도

A_{sample} : 517 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

A_{blank} : 517 nm에서 시료자체의 흡광도



Figure 5. Process of DPPH radical scavenging activity test.

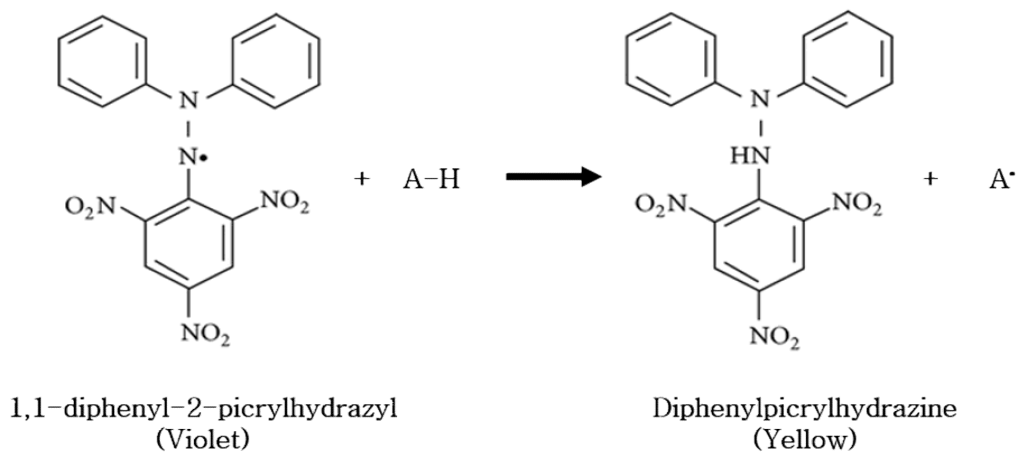


Figure 6. Principle of DPPH radical scavenging activity by an anti-oxidant.

(2) ABTS radical 소거능 활성

ABTS radical 소거 활성은 Re 등의 방법⁴²을 이용하여 측정하였다. ABTS radical 소거 활성은 7.4 mM ABTS와 potassium persulfate를 혼합 후 실온의 암실에서 15~16시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 후 이 용액을 700 nm에서 흡광도 값이 0.78 ± 0.02 가 되도록 EtOH로 희석하였다. 시료 20 μ L에 희석된 ABTS radical 용액 180 μ L를 처리하여 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거 활성은 시료처리군과 무처리군 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다. 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

A_{sample} : 700 nm에서 시료와 ABTS 반응액의 흡광도

A_{blank} : 700 nm에서 시료 자체의 흡광도

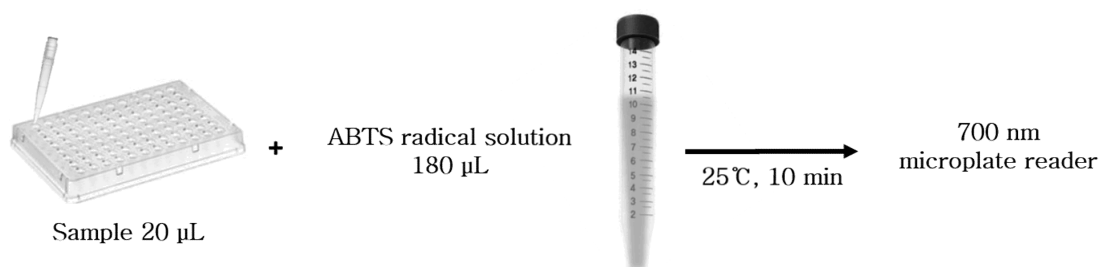


Figure 7. Process of ABTS radical scavenging activity test.

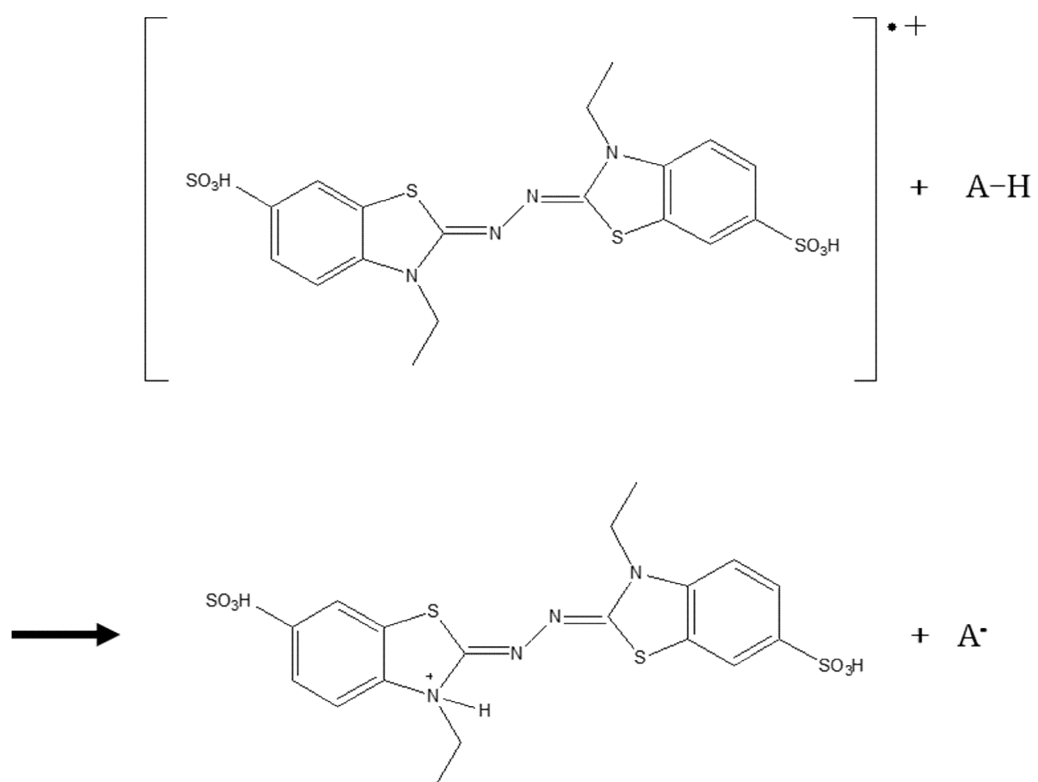


Figure 8. Principle of ABTS radical scavenging activity by an anti-oxidant.

2) 주름개선 활성 평가

(1) Elastase 저해 활성

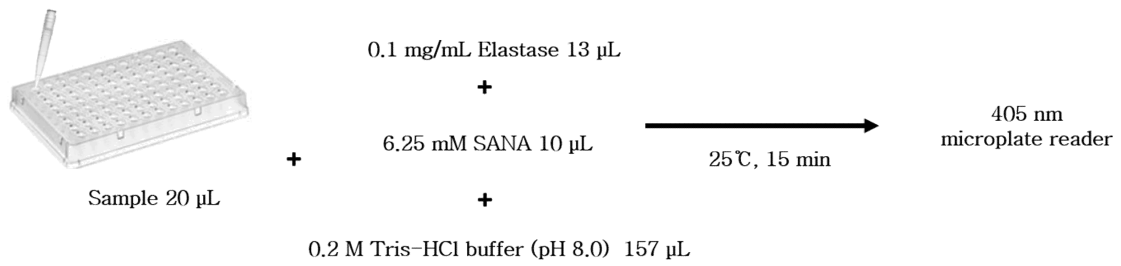
Elastase 저해 활성은 James의 방법⁴³을 응용하여 사용하였다. elastase (Porcine pancreatic elastase, PPE)를 효소로 사용하였고, N-succ(Ala)₃-*p*-nitroanilide (SANA)를 기질로 사용하여 분광광도법을 이용한 방법으로 실시하였다. 먼저 96 well plate에 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 157 μ L, 0.1 mg/mL elastase 효소 13 μ L, 6.25 mM SANA 기질을 10 μ L 와 시료용액 20 μ L를 넣어 상온에서 15분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율은 시료처리군과 무처리군 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다. 대조군으로는 oleanolic acid를 사용하였다.

$$\text{Elastase inhibition activity (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} : 405 nm에서 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

A_{sample} : 405 nm에서 시료와 반응용액의 흡광도

A_{blank} : 405 nm에서 시료자체의 흡광도



*SANA: N-Succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide

Figure 9. Process of elastase inhibition activity test.

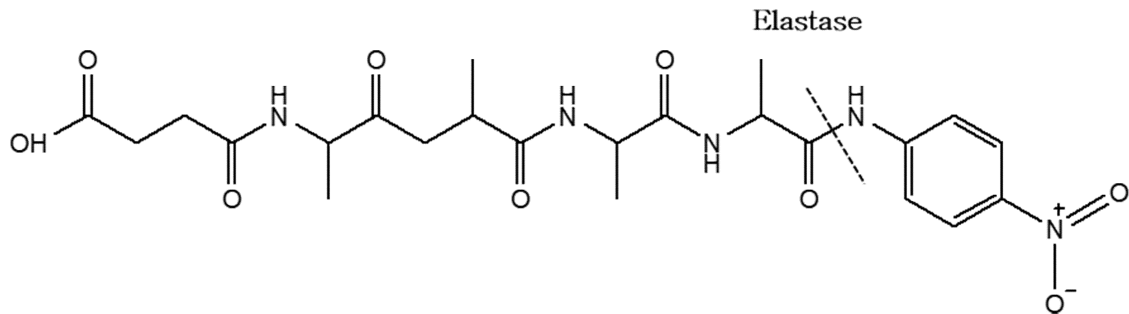


Figure 10. Principle of Elastase inhibition activity by Elastase.

(2) Type 1 pro-collagen 생합성

24 well plate에 HDF cells를 5×10^4 cells/mL로 24시간 전 배양 후, 시료를 각 농도별로 처리하고 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액을 회수하여 type 1 pro-collagen 생합성량을 측정하였다. 세포 배양액 내 Type 1 pro-collagen 생합성 정도는 pro-collagen type-I C peptide (PIP) EIA kit를 사용하여 propeptide의 양을 측정하였다. TGF- β 1 (10 ng/mL)을 양성 대조군으로 사용하였다.

(3) Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 저해 활성

24 well plate에 HDF cells를 5×10^4 cells/mL로 24시간 전 배양 후, 시료를 각 농도별 시료와 TNF- α (10 ng/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액을 회수하여 MMP-1 함량을 측정하였다. MMP-1 저해 활성 정도는 Human pro-MMP-1 immunoassay kit를 이용하여 측정하였다

(4) Western blot 분석

HDF cells을 2.5×10^5 cells/mL로 100mm 세포배양 dish에 분주하고 5일 배양한 후, 각 농도별 시료와 TNF- α (10 ng/mL)를 동시 처리하고 1시간 배양하여 MAPKs의 발현량을 측정하였고, 각 농도별 시료와 양성대조군 TGF- β 1 (10 ng/mL)을 15분 처리하여 Smad2와 Smad3의 발현량을 측정하였다. 이후 세포를 phosphate buffered saline (PBS)를 이용해 2회 세척하고 Radioimmunoprecipitation (RIPA) assay buffer를 이용해 1시간 동안 lysis후 4°C, 15,000 rpm에서 40분동안 원심분리한 단백질 상등액을 사용하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 BCA protein assay를 이용하여 정량하였다. 동일하게 정량한 단백질을 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동한후, poly-vinylidene difluoride

(PVDF) membrane으로 단백질을 전이시키고, blocking buffer 5% skim milk를 포함하는 Tween20/TBS (TTBS)를 사용하여 상온에서 3시간 blocking 시킨 후, TTBS로 10분간격으로 총 6번 세척하고, phospho-Smad2, Smad2, phospho-Smad3, Smad3, β -actin, phospho-JNK, JNK, phospho-ERK, ERK, phospho-P38, p38 1차 항체는 1:500의 비율로 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응완료 후, 다시 TTBS로 총 6번 세척하고 2차 항체는 HRP가 결합된 anti-mouse immunoglobulin (IgG) 와 HRP가 결합된 anti-rabbit IgG를 각각 1:3000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 마지막으로 TTBS 용액으로 6번 세척하였다. 단백질은 ECL과 반응시킨후 Chemidoc을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

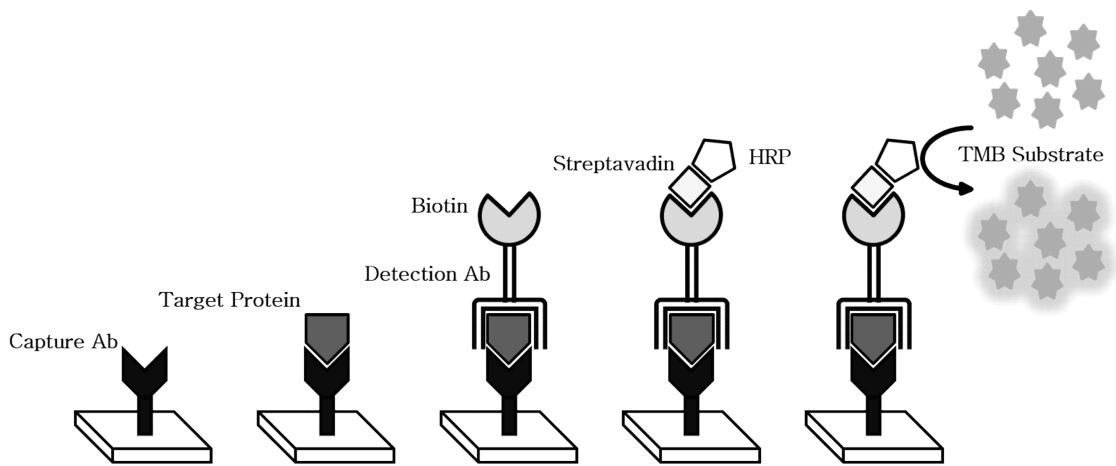


Figure 11. Principle of ELISA assay.

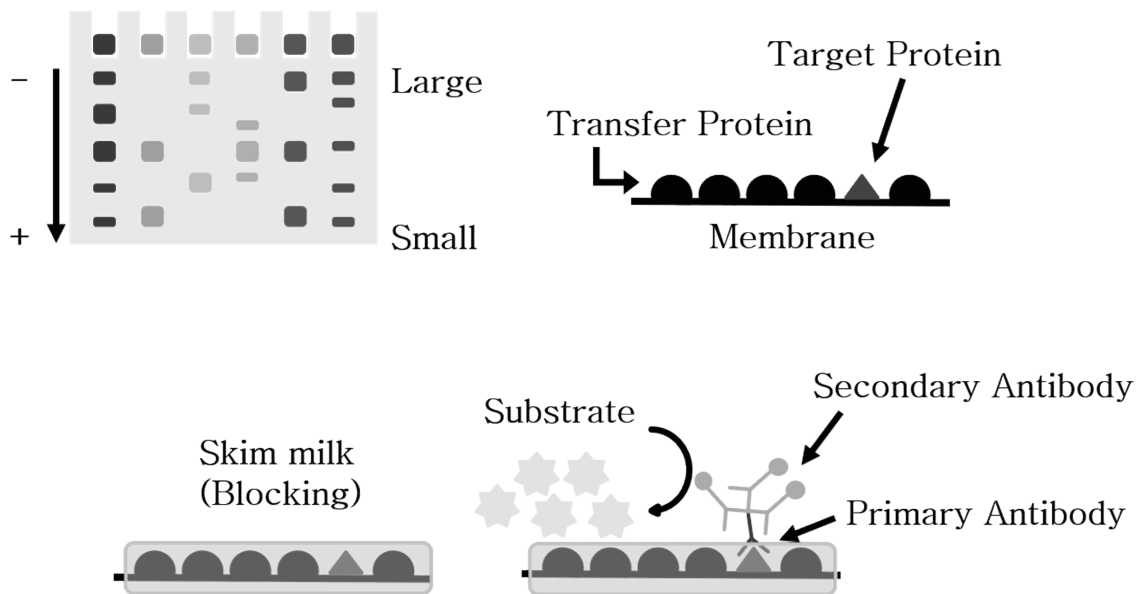


Figure 12. Principle of western blot analysis.

3) 미백 활성 평가

(1) Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 효소 저해 활성은 DOPA chrome법⁴⁴을 응용하여 사용하였다. 먼저 96well plate 안에 시료 20 μ L, 0.1M의 potassium persulfate 105 μ L, 2 mM의 L-tyrosin 70 μ L 기질과 2500unit의 Tyrosinase 효소 용액 5 μ L을 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율은 시료처리군과 무처리군 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다. 대조군으로는 arbutin을 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition activity (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} : 480 nm에서 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

A_{sample} : 480 nm에서 시료와 반응용액의 흡광도

A_{blank} : 480 nm에서 시료자체의 흡광도

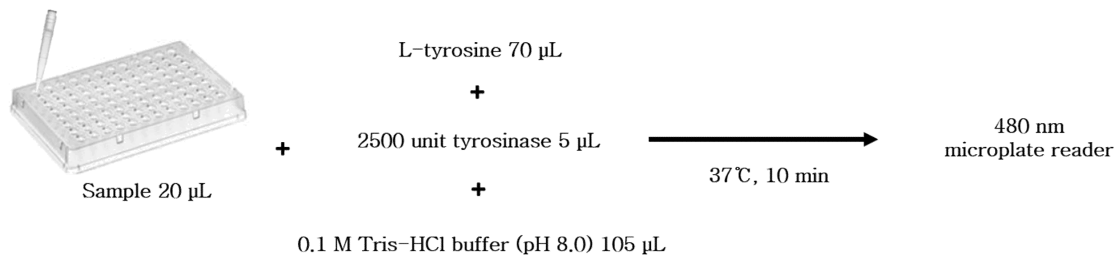
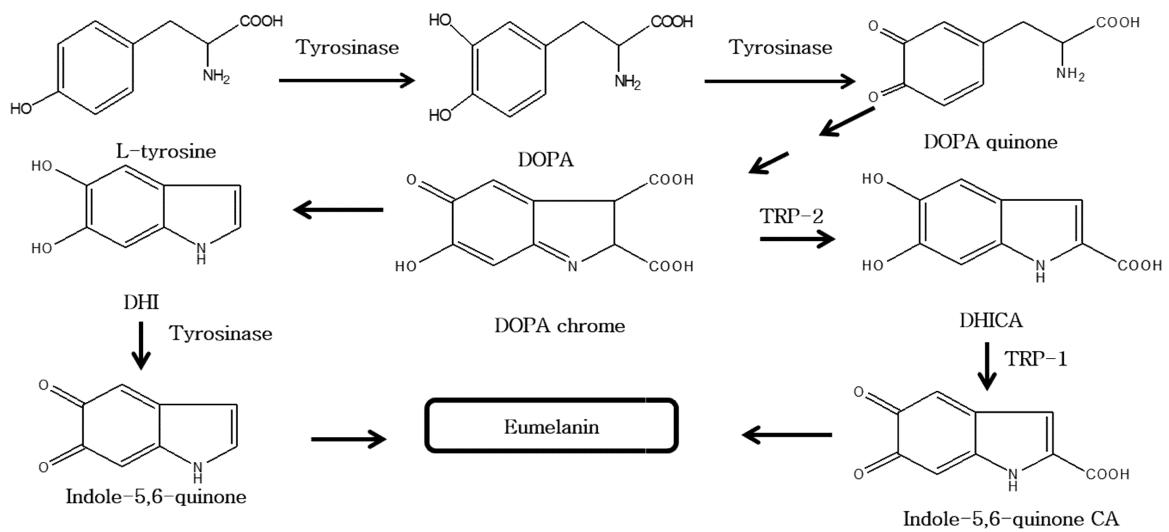


Figure 13. Process of tyrosinase inhibition activity test.



a) DOPA (Dihydroxyphenylalanine)

b) DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)

c) DHI (5,6-dihydroxyindole)

Figure 14. Mechanism of melanogenesis.

4) 항균 활성 평가

(1) 균주 배양

여드름균인 *Propionibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010) 3종을 항생제내성 균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받아 사용하였다. *P. acnes*의 배양배지를 GAM broth로 하여 37℃, 혐기성 조건에서 배양하였으며, 2일에 한 번씩 계대 배양하였다.

(2) Paper disc diffusion method

Paper disc diffusion method로 생육 저지환을 확인하여 시료의 항균 활성을 측정하였다. *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010)를 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여 1.5×10^6 CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8% agar를 포함하는 GAM 배지에 넣어 고체배지(1.5% agar) 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm의 멸균된 paper disc를 올리고 37℃에서 48시간 동안 혐기 배양한 후 형성된 생육 저지환 (inhibition zone)의 직경을 측정하였다. 대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.

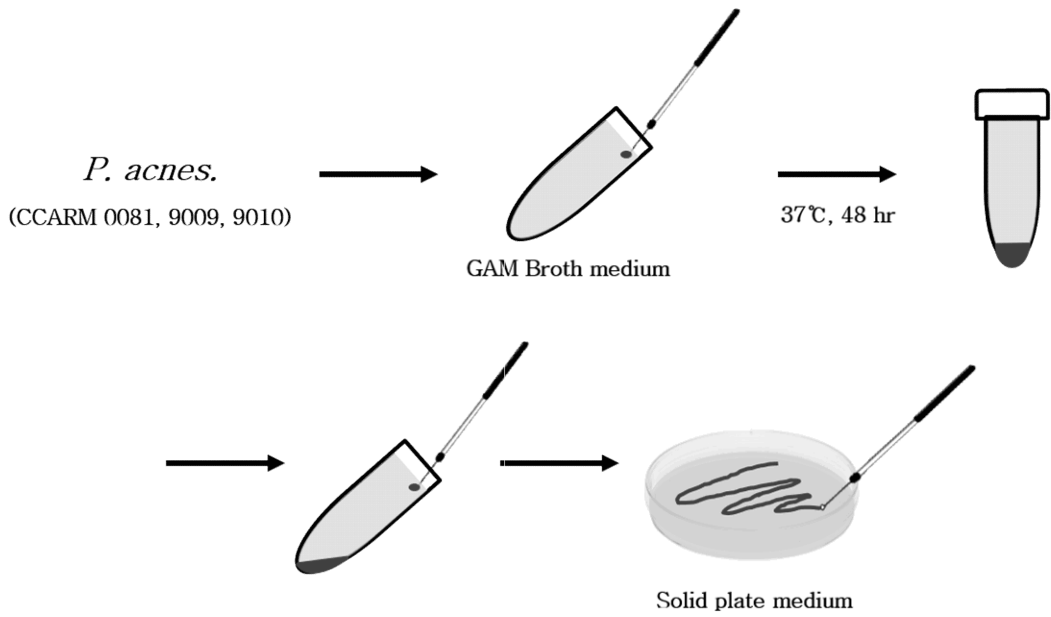


Figure 15. Process of bacterial culture.

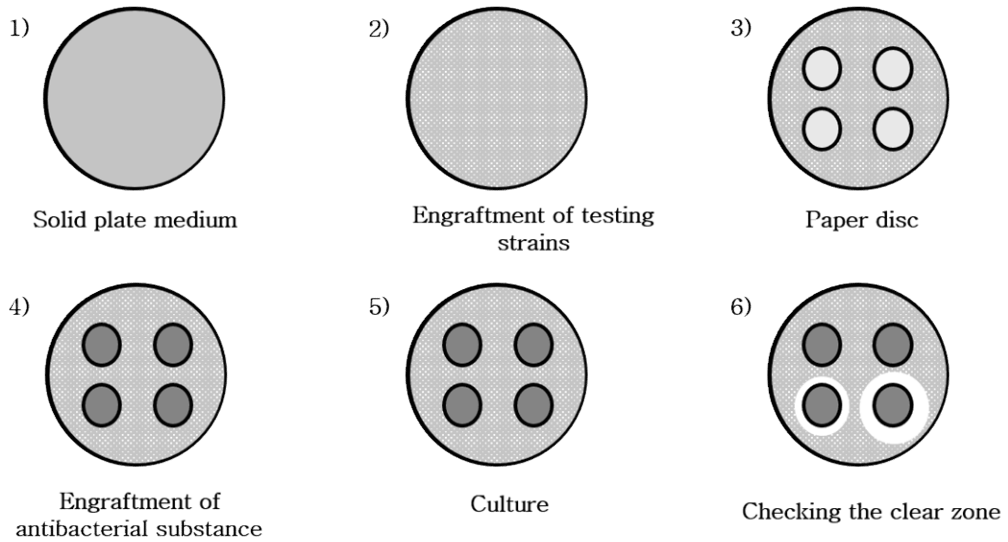


Figure 16. Process of the paper disc diffusion method.

5) 항염증 활성 평가

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

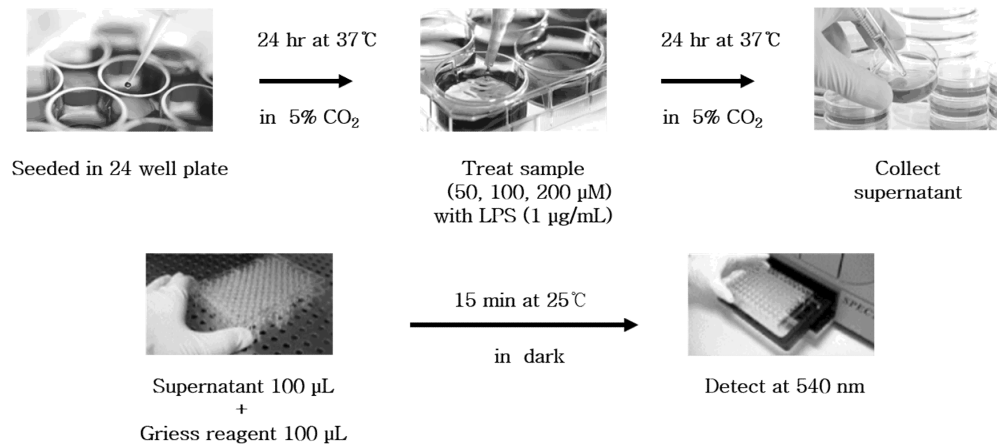
24 well plate에 RAW 264.7 cells을 1.5×10^5 cells/mL로 24시간 전 배양 후, 각 농도별 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 griess reagent를 이용하여 세포배양 상등액 중에 존재하는 NO_2^- 형태로 측정하였다. 96 well plate에 세포배양 상등액 100 μ L와 griess reagent 100 μ L를 1:1의 비율로 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 활성

RAW 264.7 cells을 1.5×10^5 cells/mL로 4시간 전 배양 후, 각 농도별 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 세포배양 상등액을 취하여, 상등액내에 존재하는 PGE₂의 함량을 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 측정하였다.

(3) Pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cells을 1.5×10^5 cells/mL로 24 well plate에 분주하고, 24시간 배양 후, 각 농도별 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양 후 세포배양 상등액을 취하여, 상등액내에 존재하는 각각의 pro-inflammatory cytokine의 함량을 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 측정하였다.



• NO : nitric oxide

Figure 17. Process of nitric oxide (NO) assay.

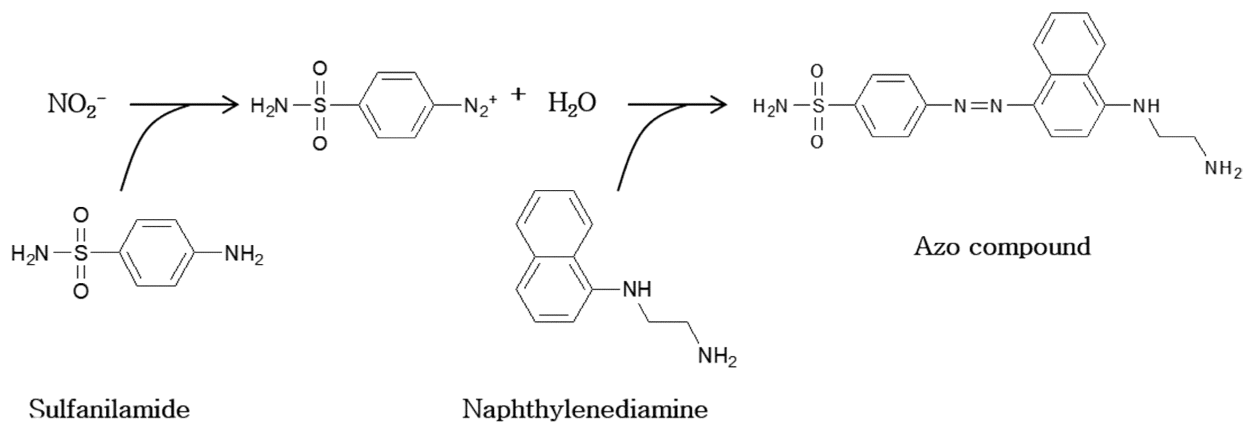


Figure 18. Principle of nitric oxide (NO) assay.

(4) Western blot 분석

RAW 264.7 cells을 2.5×10^5 cells/mL로 6 well plate에 24시간 전 배양 후, 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 세포를 PBS를 이용해 2회 세척하고 RIPA assay buffer를 이용해 1시간 동안 lysis 후 4°C, 15,000 rpm에서 40분동안 원심분리한 단백질을 상등액을 사용하였다. 단백질 농도는 BSA를 표준용액으로 하여, Bradford reagent를 이용하여 정량하였다. 동일하게 정량한 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동한후, PVDF membrane으로 단백질을 전이시키고, blocking buffer 5% skim milk를 포함하는 TTBS를 사용하여 상온에서 3시간 blocking 시킨 후, TTBS로 10분간격으로 총 6번 세척하고, iNOS, COX-2, β -actin, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-P38, p38, I κ B- α , p-p105 1차 항체는 1:1000의 비율로 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응완료 후, 다시 TTBS로 총 6번 세척하고 2차 항체는 HRP가 결합된 anti-goat IgG를 1:5000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 마지막으로 TTBS 용액으로 6번 세척하였다. 단백질은 ECL과 반응시킨후 Chemidoc을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

6) 각 세포별 배양 및 독성평가

(1) 세포 배양

항염증 활성 실험에 사용한 세포는 RAW 264.7 murine macrophage cells를 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였고, 주름개선효과 실험에 사용한 세포는 human dermal fibroblast cells (HDF)를 LG HG & CM Research Institute (Daejeon, Korea)으로부터 분양받았으며 항생제 1% penicillin/streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)와 25% F-12 nutrient mixture가 함유된 dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) 배지를 사용하였고. 각질세포에서의 독성평가실험에 사용한 세포는 HaCaT human keratinocyte cells는 ATCC에서 분양 받아 항생제 1% penicillin/streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM배지를 사용하였으며 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 각각 배양을 실시하였다.

(2) 세포 독성 평가 (MTT assay)

RAW 264.7 cells는 24 well plate에 1.5×10^5 cells/mL로 24시간 전 배양 후, 각 농도별 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시에 처리하여 24시간 배양한 후 세포 독성을 측정하였다. HDF cells는 5×10^4 cells/mL로 24 well plate에 넣고 24시간 전 배양 후, 시료를 처리하고 24시간 배양한 후 세포독성을 측정하였다. HaCaT cells는 1.5×10^5 cells/mL로 24 well plate에 24시간 전 배양하고 시료를 처리하여 24시간 배양 후 세포 독성을 측정하였다. 각각 MTT solution (2 mg/mL)을 처리하여 2시간 동안 반응 시켰다.

MTT solution이 처리된 세포배양 상등액을 제거하고 형성된 비수용성 formazan 침전물을 DMSO를 가하여 완전히 용해시킨 후, microplate reader를 사용하여 540 nm 흡광도를 측정하였다. 시료 무처리군을 기준으로 흡광도 값을 비교하여 세포독성을 측정하였다.

세포의 독성평가에 사용된 MTT assay는 살아있는 세포내 미토콘드리아의 탈 수소 효소작용에 의해 노란색인 수용성 기질 MTT tetrazolium을 보라색의 비수용성 formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하여 측정한다.

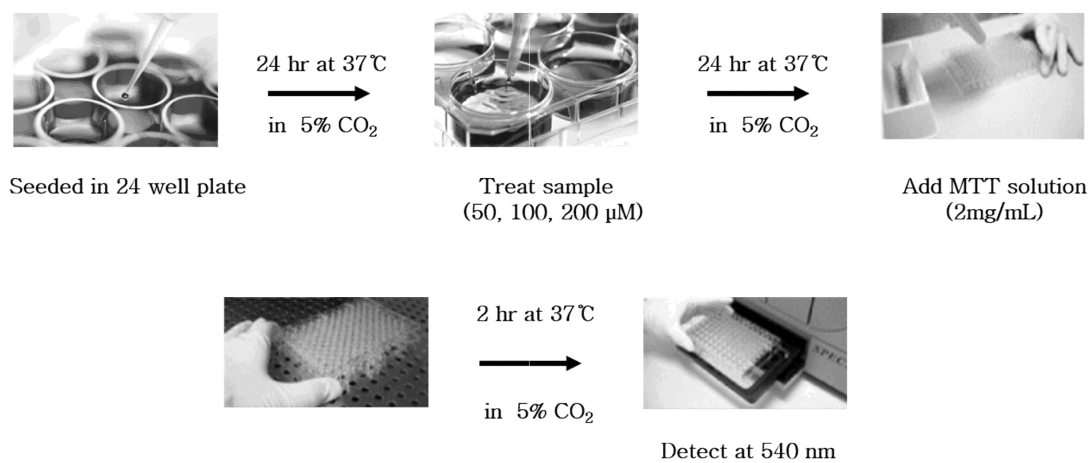


Figure 19. Process of MTT assay.

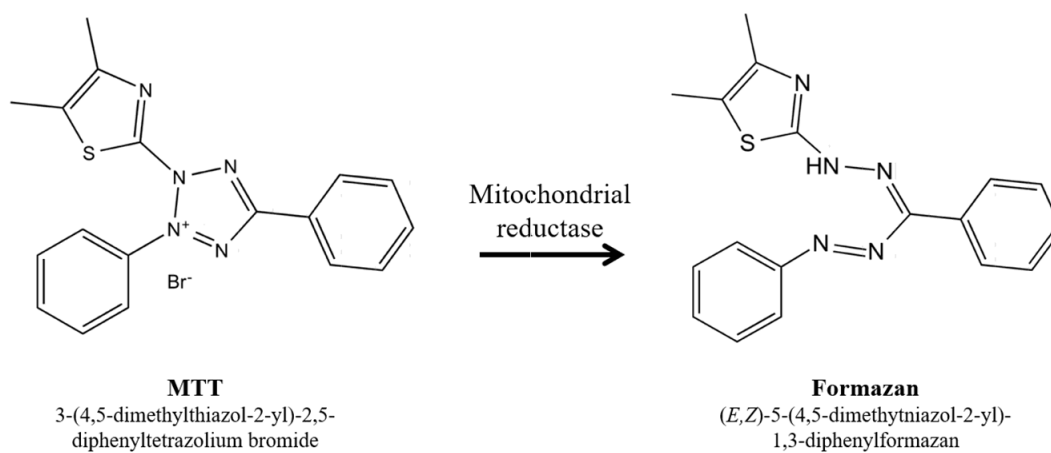


Figure 20. Principle of MTT assay.

III. 결과 및 고찰

1. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 항산화 활성

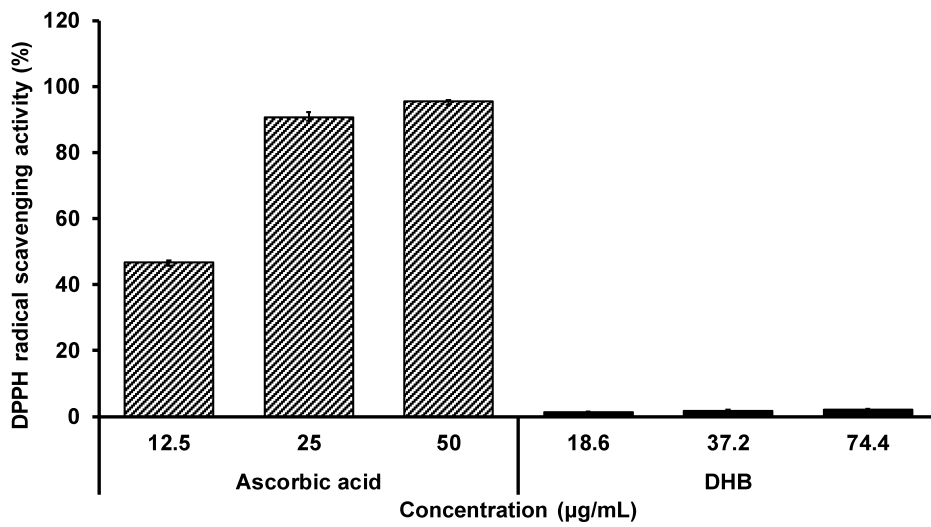
1) DPPH radical 소거능 활성

항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 DPPH 라디칼 소거활성은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 대표적인 항산화 측정법이다. DPPH는 라디칼 중 비교적 안정한 화합물로 황 함유 아미노산, ascorbic acid, 페놀성 화합물 등의 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 DPPH-H로 환원되면서 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 식물체의 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되고 있는 방법이다.³⁴ DHB의 DPPH radical 소거능 활성을 측정한 결과, 대조군 ascorbic acid와 비교해보았을 때 DPPH radical 소거능 활성을 보이지 않았다 (Figure 21A).

2) ABTS radical 소거능 활성

ABTS radical 소거능 활성법은 전체적인 free radical을 소거하는 DPPH 항산화 활성 측정 방법과 달리 cation radical을 제거하는 능력을 확인하는 방식이다. DHB의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정한 결과, 대조군은 ascorbic acid와 비교해보았을 때 ABTS⁺ radical 소거 활성을 보이지 않았다 (Figure 21B).

(A)



(B)

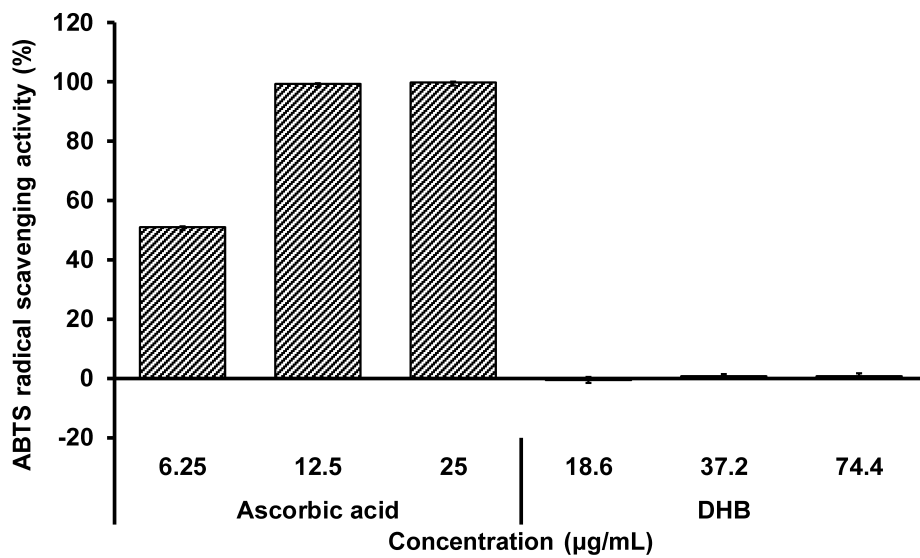


Figure 21. (A) DPPH radical scavenging activity and (B) ABTS radical scavenging activity of DHB. data are expressed as a percentage of control and are expressed as mean \pm SD (n=3).

2. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 주름개선 활성

1) Elastase 저해 활성

MMPs를 이루는 주요성분 중 하나인 elastase는 동물 결합 조직의 불용성 탄성 섬유 성분인 엘라스틴을 분해할 수 있는 유일한 효소이며, 콜라겐과 엘라스틴 같은 결합조직을 지지하고 구성하는 모든 단백질을 가수분해⁴⁵하기 때문에 elastase를 저해하는 활성을 나타내면 피부주름을 개선하는 방법 중 하나가 될수있다.

DHB의 elastase 저해 활성을 측정한 결과, 대조군 oleanolic acid과 비교해보았을 때 elastase의 저해활성을 보이지 않았다 (Figure 22).

2) 세포 독성 (MTT assay)

DHB의 세포 독성을 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay로 분석하였다. 세포독성을 측정한 결과, 시료 무처리군을 기준으로 200 μ M 농도까지 독성이 나타나지 않았음을 확인 할 수 있었다. 따라서, 이후 주름개선 효과 실험을 진행할 때 200 μ M까지 농도를 설정하여 진행하였다 (Figure 23).

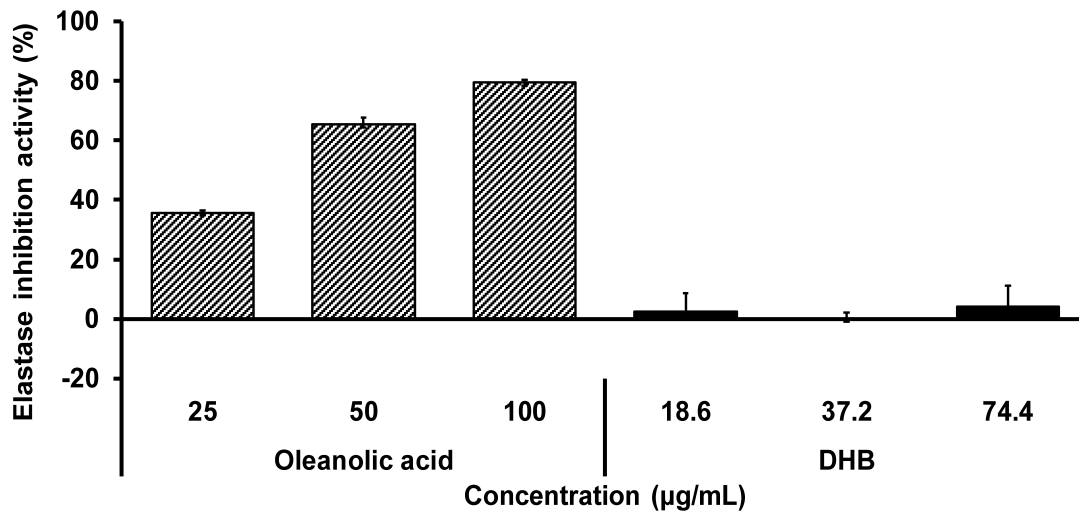


Figure 22. Elastase inhibition activity of DHB. data are expressed as a percentage of control and are expressed as mean \pm SD (n=3).

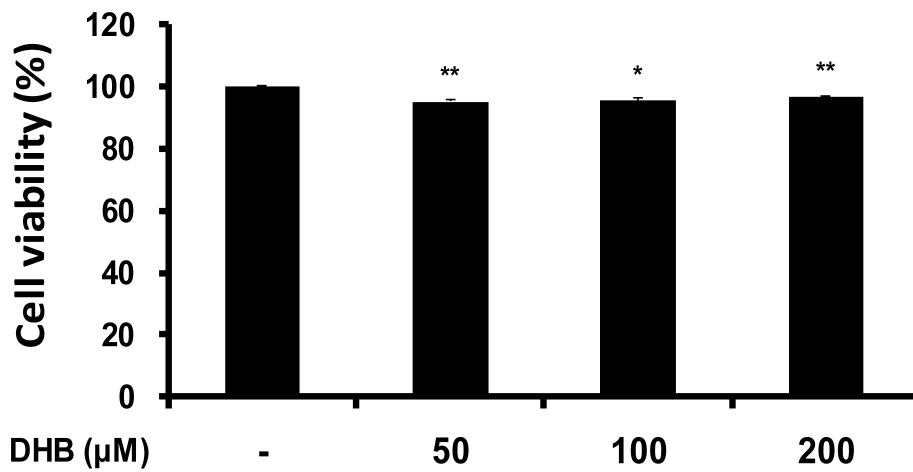


Figure 23. Cell viability effects of DHB on human dermal fibroblasts. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. *P<0.05, **P<0.01.

3) Type 1 pro-collagen 생합성 활성화

콜라겐은 피부의 탄력을 유지시켜주는 주요 구조 단백질로, 피부 진피층에 많이 분포되어있다. 콜라겐의 감소는 주름생성원인과 밀접한 관계를 가지고있기 때문에 이를 지연시키고 예방하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다.⁴⁶ DHB가 콜라겐 생합성량을 증가시킴으로써 항노화 영향을 나타내는지 알아보기 위해 콜라겐의 전구체인 pro-collagen의 c-말단을 인지하는 항체를 이용하여 pro-collagen 생합성량을 측정한 결과, DHB를 처리하지 않은 control 군보다 DHB를 처리한군에서 농도 의존적으로 pro-collagen 생합성량을 증가시키는 것으로 확인되었고 고농도에서 약 32% 증가하였다. (Figure 24).

4) Smad2 와 Smad3 인산화 활성화

인간 피부 섬유아세포에서 Smad 인산화는 collagen 합성의 초기단계와 관련되어있는 신호전달 경로이다.⁴⁷ 본 연구에서는 Smad 인자들 중에서도 Smad2와 Smad3의 인산화를 통한 collagen 합성 메커니즘을 밝히기 위하여 western blot analysis를 진행하였다. 실험결과, DHB를 처리함으로써 Smad2 와 Smad3의 인산화가 DHB를 처리하지 않은 control군과 비교하였을때 인산화가 유도된 것을 확인 할 수 있었다. TGF- β 1 (10 ng/mL)를 양성대조군으로 사용하였다 (Figure 25).

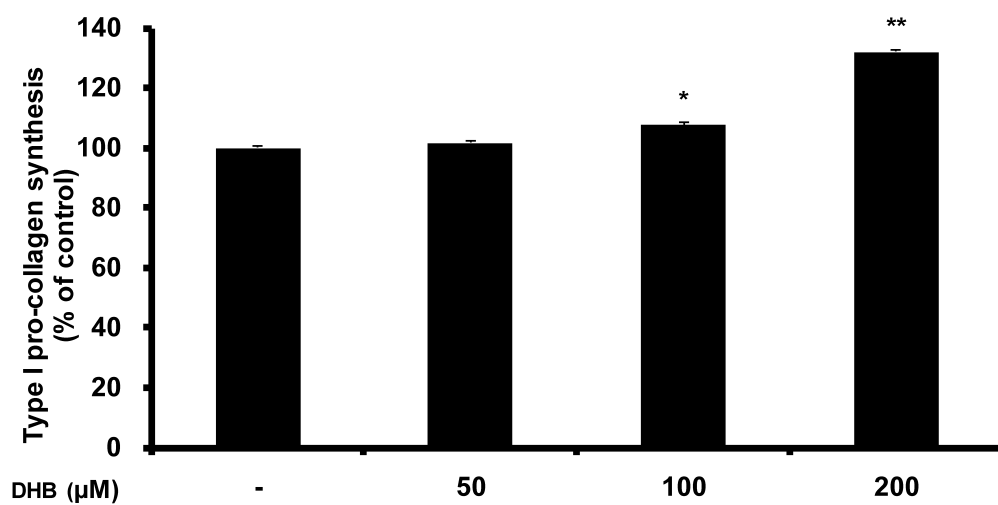


Figure 24. Type I pro-collagen biosynthesis Effects of DHB on human dermal fibroblast cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

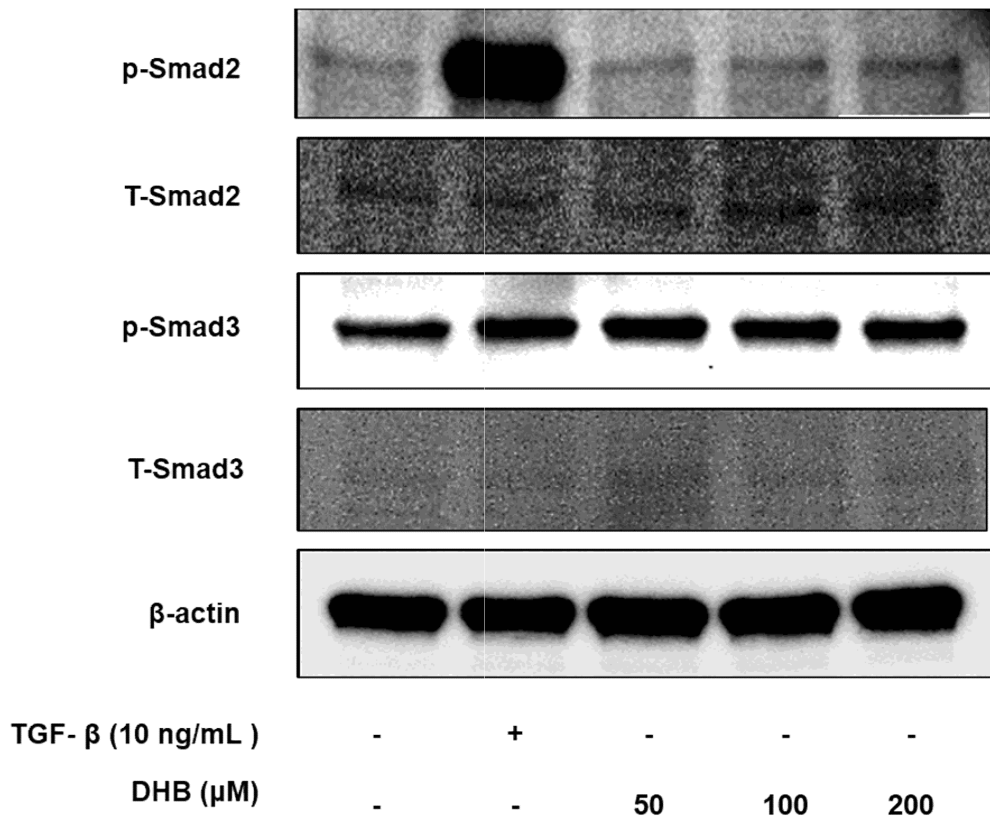


Figure 25. Phosphorylation of Smad2 and Smad2 와 Smad3 Effects of DHB on the human dermal fibroblast cells.

5) Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 생성 저해 활성

피부에 주름이 생기게 되는 원인으로 자체적인 collagen 생합성량 감소 또는, 그 분해효소인 MMP-1의 발현증가로 인한 collagen의 분해가속화 등 다양한 원인들이 알려져 있다. 그중에서도 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-1의 활성을 저해시키는 영향을 알아보려고 하였다. 먼저 TNF- α (10 ng/mL)를 처리하여 MMP-1의 발현이 증가되는 것을 확인하였고, DHB를 처리한 결과 TNF- α (10 ng/mL) 처리로 인하여 증가한 MMP-1의 발현을 200 μ M에서 43.2% 감소시켰다. 이것으로 보아 DHB가 collagen을 분해하는 MMP-1을 저해하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 26).

6) MAPKs 인산화 억제 활성

인간 피부 섬유아세포에서 MAPKs 신호전달경로는 MMP-1 인산화의 초기단계와 관련되어있는 신호전달경로이다. 본 연구에서는 TNF- α 로 활성화된 HDF cells에 DHB와 10 μ M의 ERK inhibitor (PD98059), JNK inhibitor (SP600125), p38 inhibitor (SB203580)를 각각 처리하여 단백질을 분리하였다. DHB가 MAPKs 신호전달경로를 통하여 collagen 분해효소인 MMP-1의 발현을 억제시키는지 해당 메커니즘을 확인하기 위해 HDF cells을 이용하여 Western blot analysis를 진행하였다. 실험결과, TNF- α (10 ng/mL)처리군과 비교하였을 때 DHB는 p38을 제외한 ERK, JNK의 인산화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 27A, Figure 27B).

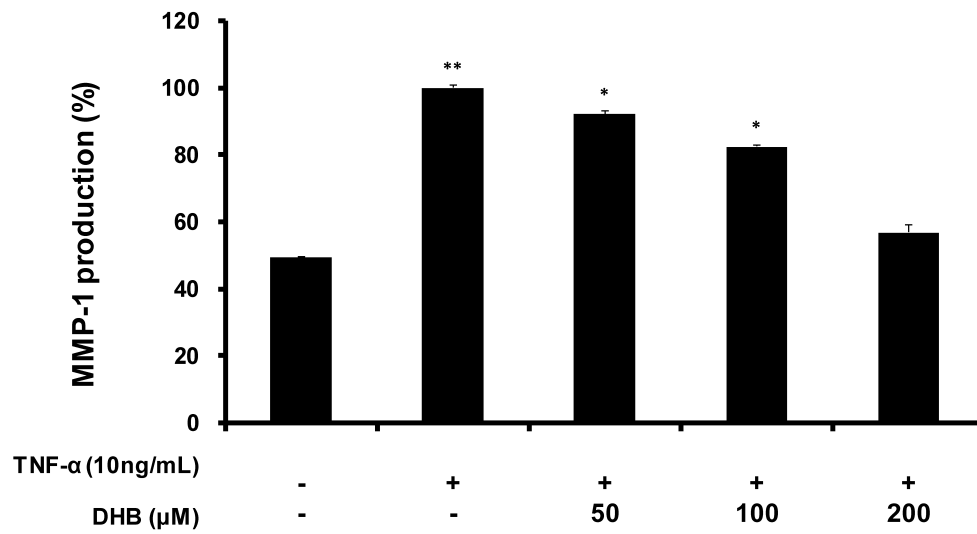
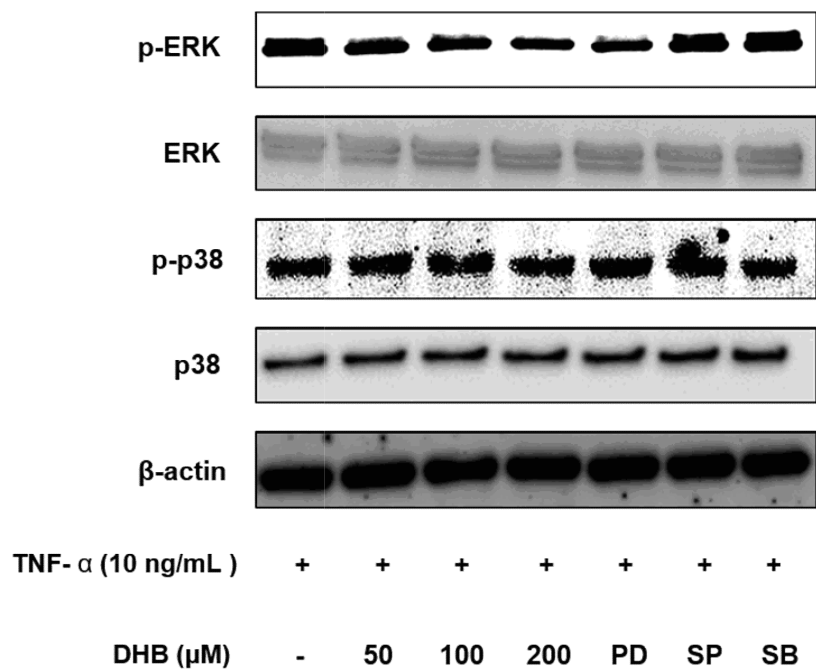


Figure 26. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) production by DHB on human dermal fibroblast cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

(A)



(B)

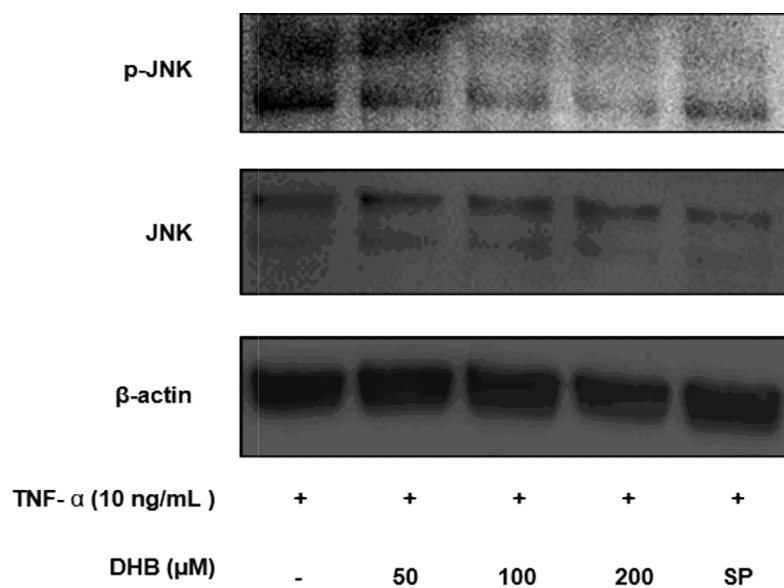


Figure 27. The effect of DHB of MAPKs protein expression in human dermal fibroblast cell.

3. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 미백 활성

1) Tyrosinase 저해활성

피부의 melanosome에서 melanin 생합성에 필요한 특이적인 효소들 중에서 tyrosinase가 가장 직접적으로 작용된다. Tyrosinase는 인체내의 tyrosine을 산화시켜 멜라닌 생합성 경로에서 멜라닌 polymer를 합성하는 효소이다. 따라서 이러한 특이적 효소들의 활성을 조절함으로써 melanin합성을 효과적으로 억제하는지를 확인 할 수 있고, 그 중 tyrosinase 저해 활성을 통하여 미백활성을 확인할 수 있다.³⁴ DHB의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과, 대조군인 arbutin과 비교하였을 때 tyrosinase의 저해활성을 보이지 않았다 (Figure 28).

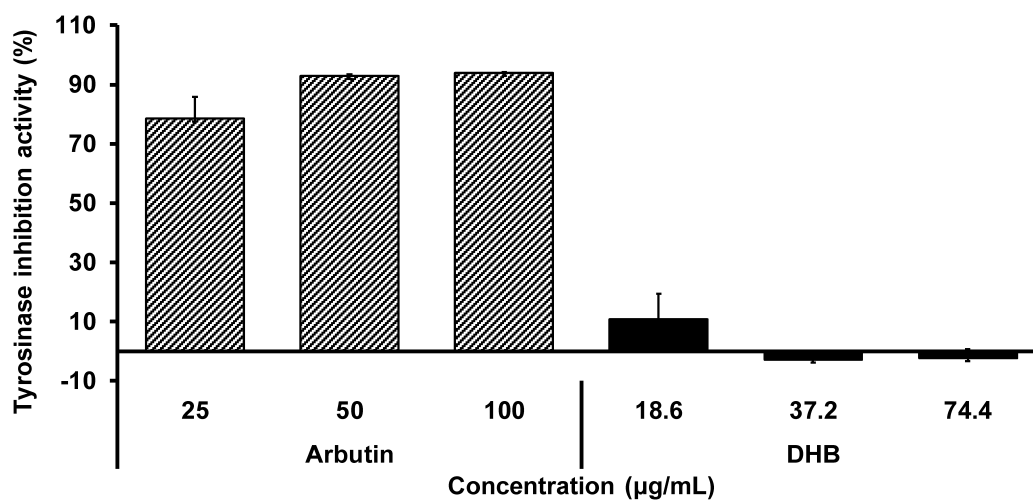


Figure 28. Tyrosinase inhibition activity of DHB. data are expressed as a percentage of control and are expressed as mean \pm SD (n=3).

4. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 항균 활성

1) Paper disc diffusion 항균 활성

여드름 발생의 원인으로는 미생물에 의한 자극과 환경적인 요인 및 호르몬 변화 등 복합적인 요인들이 있다. 특히 일반적으로 잘 알려진 여드름 유발균 중에서도 피부의 모낭내에 존재하는 *P. acnes*는 염증반응 유발 및 면역반응을 유도한다. 그 결과 여드름을 발생시키고 상태를 악화시키게 된다. 피부의 모낭내에서 성장하는 미생물의 증식을 억제하게 되면 여드름 치료 및 예방에 중요한 역할을 할 수 있다. 따라서 DHB의 항균 활성 여부를 확인하기 위하여 74.4 mg/mL의 농도로 paper disc diffusion법을 이용하여 측정한 결과, DHB의 항균 활성은 보이지 않았다 (Table 1, Figure 29).

Table 1. Antimicrobial activity of DHB on *P. acnes*.

Unit: mm, disc size: 8 mm

	<i>P. acnes</i>		
	CCARM	CCARM	CCARM
	0081	9009	9010
	N.D.	N.D.	N.D.
Erythromycin (+)	36	33	33
EtOH	N.D.	N.D.	N.D.
Sample solvent	N.D.	N.D.	N.D.
DHB	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: Not Detected

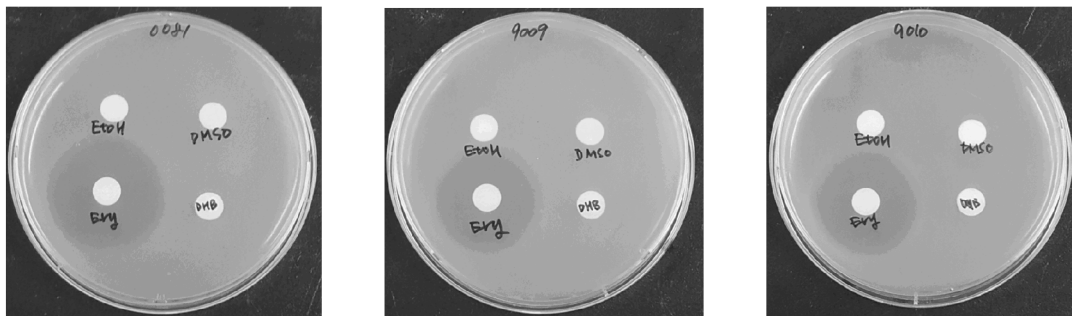


Figure 29. Antimicrobial activity of DHB on *P. acnes*.

5. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 항염증 활성

1) 세포 독성 (MTT assay) 및 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

DHB의 세포 독성을 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay로 분석하였다. 세포독성을 측정한 결과, 시료 무처리군을 기준으로 200 μ M 농도까지 독성이 나타나지 않았음을 확인 할 수 있었다 (Figure 30A). 따라서, 이후 NO 생성 억제 활성 평가는 먼저 LPS를 처리하여 NO의 생성을 유도하였고, LPS 단독 처리군과 비하였을 때 DHB가 농도 의존적으로 NO생성을 억제하였으며 고농도에서 NO의 생성을 45% 억제하는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 30B).

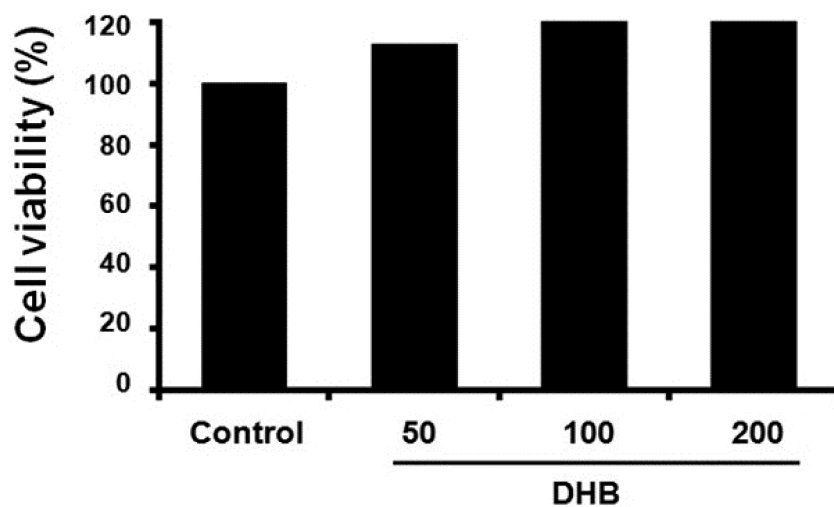
2) Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 활성

LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells은 염증매개인자의 발현이 활발해지게 된다. 이때 DHB가 PGE₂의 발현을 얼마나 억제하는지 측정한 결과, LPS 단독 처리군과 비교했을 때 농도 의존적으로 억제하였으며 고농도에서 PGE₂의 생성을 76.9% 억제하는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 31A).

3) Pro-inflammatory cytokine 발현 억제 활성

LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells은 Pro-inflammatory cytokine의 발현이 활발해지고, 이러한 Pro-inflammatory cytokine의 발현을 얼마나 억제 할 수 있는지를 통하여 항염증효과를 평가할 수 있다. DHB가 pro-inflammatory cytokine인 TNF- α 와 IL-6의 발현에 미치는 영향을 측정한 결과, LPS 단독 처리군과 비교했을 때 농도 의존적으로 억제하였으며 고농도에서 각각 TNF- α 의 생성을 45.1%, IL-6의 생성을 37.2% 억제하는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 31B, Figure 31C).

(A)



(B)

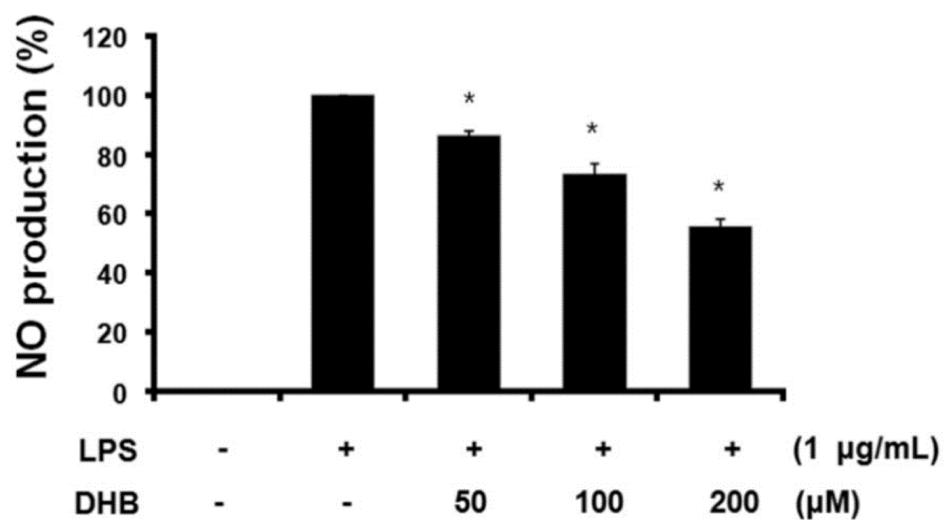


Figure 30. Cell viability and NO production Effects of DHB on LPS-induced RAW 264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

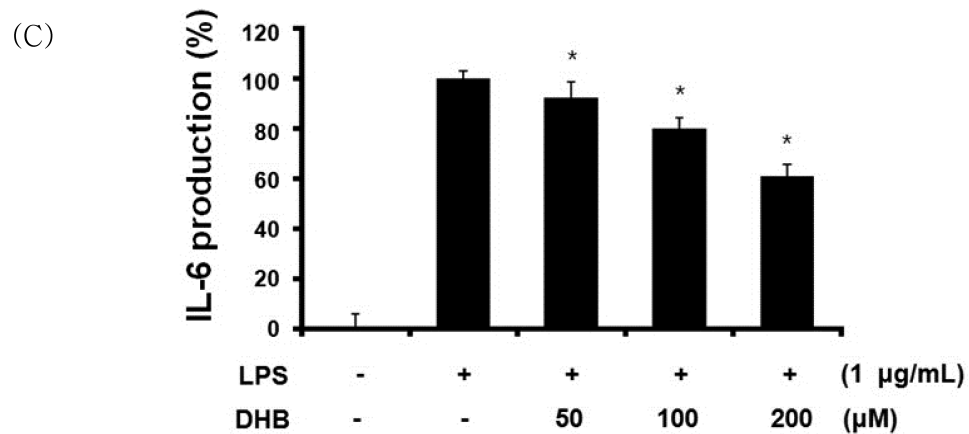
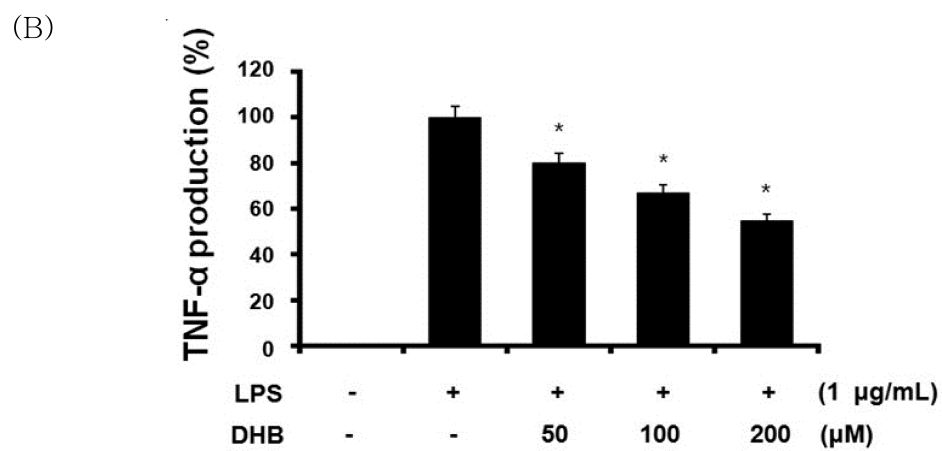
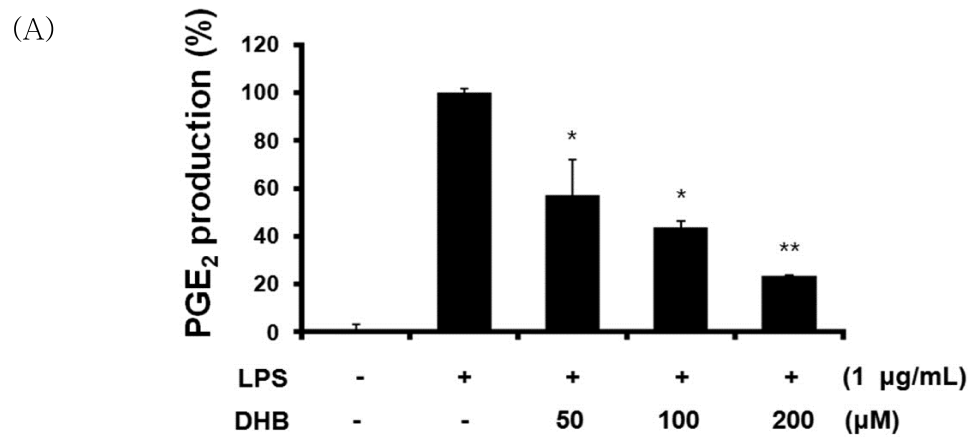


Figure 31. Effect of DHB on production of PGE₂ and pro-inflammatory cytokines on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. *P<0.05, **P<0.01.

4) iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 활성화

염증인자 NO, PGE₂의 생성 억제 활성화와 관련있다고 알려져있는 inducible NO (iNOS)와 cyclooxygenase (COX-2) 발현 억제로 인한 것 인지 확인하기 위하여 이들 단백질 수준을 Western blot analysis로 확인하였다. LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells에 DHB를 동시 처리하여 DHB에 의한 iNOS, COX-2 발현 억제 활성을 확인한 결과 LPS 단독 처리군에서는 iNOS, COX-2 단백질의 발현이 증가한것을 확인할 수 있었고, DHB에 의해 iNOS, COX-2 단백질의 발현이 억제된 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 32).

5) MAPKs 인산화 억제 활성화

DHB가 LPS에 의해 유도되는 MAPKs (ERK, JNK, p38) 신호전달경로에 미치는 영향을 확인하기 위해 LPS로 유도된 RAW 264.7 cells에 DHB와 10 μM의 ERK inhibitor (PD98059), JNK inhibitor (SP600125), p38 inhibitor (SB203580)를 각각 처리하여 단백질을 분리하였다. DHB가 MAPKs 신호전달경로를 통하여 염증인자들의 발현을 억제시키는지 phospho-p38, p38, phospho-ERK, ERK, phospho-JNK, 및 JNK의 단백질 발현 변화를 확인한 결과, LPS 단독처리군에서는 ERK, JNK, 및 p38 각각의 인산화를 확인할 수 있었으며 각각의 inhibitor는 LPS에 의해 유도되는 인산화를 억제하였다. DHB는 p38을 제외한 ERK와 JNK의 인산화를 억제시켰다. 이것으로 보아 MAPKs 신호전달경로 중에서도 ERK, JNK 인산화 경로가 관여하는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 33).

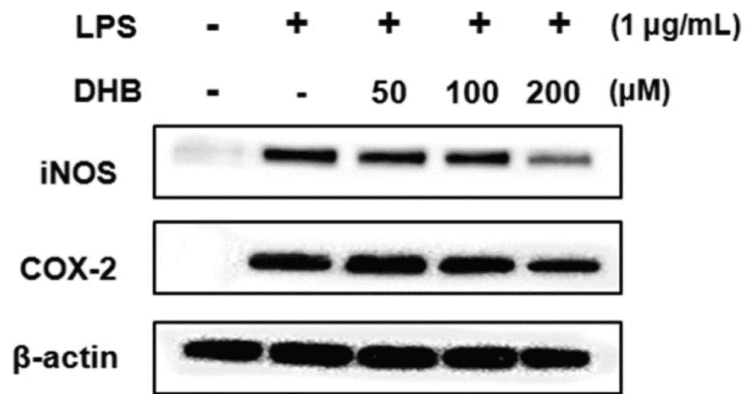


Figure 32. Inhibitory effects of DHB on inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression levels on LPS-induced RAW 264.7 cells.

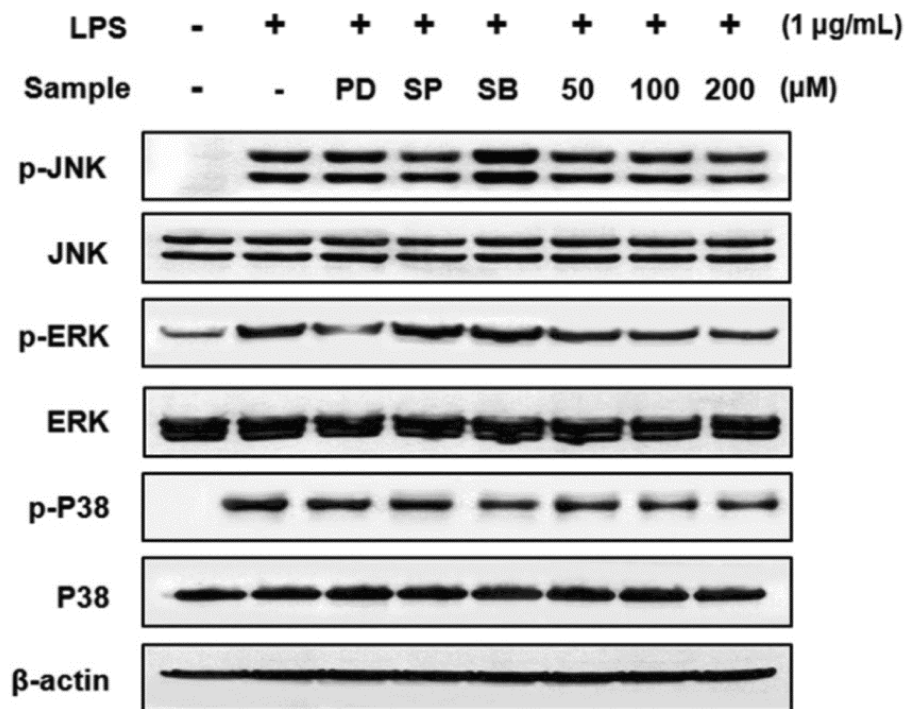


Figure 33. Inhibitory effects of DHB on MAPKs expression levels on LPS-induced RAW 264.7 cells.

6) NF- κ B 인산화 억제 활성

염증반응은 NF- κ B신호전달 경로가 관여함으로써 활성화 된다고 알려져 있다. 본 연구에서는 DHB가 NF- κ B 신호전달경로에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells에 DHB를 처리하여 NF- κ B (p-p105) 와 I κ B- α 의 단백질 변화를 확인하였다. 그 결과 LPS 처리 후 NF- κ B (p-p105)의 인산화와 I κ B- α 가 degradation 되었음을 확인 할 수 있었으며, DHB는 LPS 단독 처리군에 의해 증가된 NF- κ B (p 105)의 인산화와 I κ B- α 의 degradation을 억제 하지 않았다. 따라서 DHB는 NF- κ B경로가 관여하지 않음을 확인 할 수 있었다. (Figure 34).

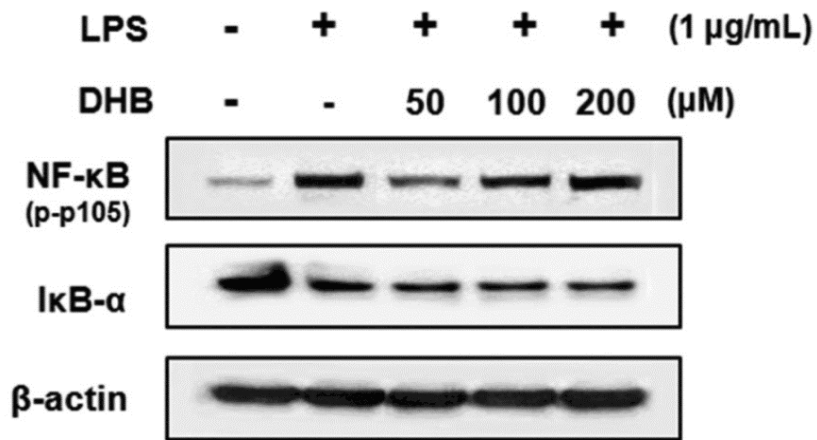


Figure 34. Effects of DHB on the expression levels of NF- κB and I $\kappa\text{B-}\alpha$ on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

6. 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)가 HaCaT human keratinocyte 세포생존에 미치는 영향

1) 세포 독성 (MTT assay)

화장품은 인체의 최외각에 위치해있는 각질에 도포되기 때문에, 실험결과를 토대로 화장품소재로 사용시 독성이 없는 적용범위를 판별하기 위하여 HaCaT human keratinocyte에서 6',7'-dihydroxy bergamottin (DHB)의 세포 독성을 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다. 세포독성을 측정된 결과, 시료 무처리군을 기준으로 200 μ M 농도까지 독성이 나타나지 않았음을 확인 할 수 있었다 (Figure 35).

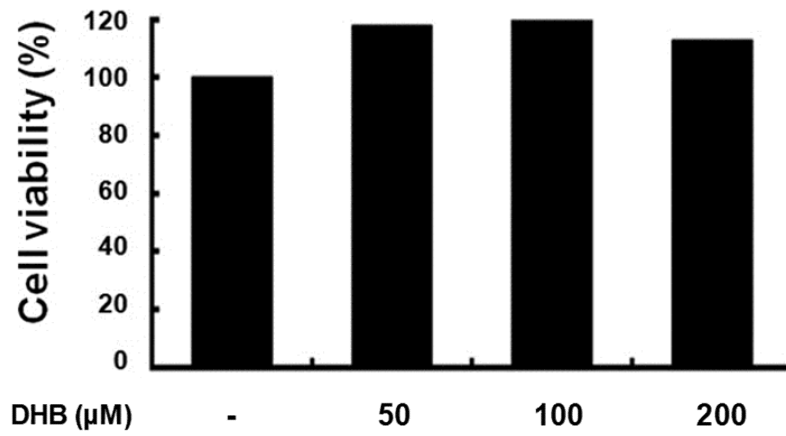


Figure 35. Effects of DHB on the viability on HaCaT human keratinocyte cells. data are expressed as a percentage of control and are expressed as mean \pm SD (n=3).

IV. 고찰

감귤류(citrus)에는 레몬(lemon)과 오렌지(orange) 및 자몽(grapefruit) 등이 속해있으며 vitamin C와 식이섬유, 미네랄과 같은 영양소가 풍부할 뿐만 아니라 flavonoid, carotinoid, limonoid 및 furanocoumarin 등 다양한 기능성 물질들이 함유되어있다.⁴⁸ 특히, furanocoumarin은 감귤류에서 생산되는 2차 대사산물이며, 항산화와 항염증 및 항암 등 여러 가지 생리활성을 나타낸다고 보고^{36,37,38}되었지만, 주요 furanocoumarin 중에서도 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 항염증 효과와 주름개선 효과에 대한 연구가 보고되지 않았다. 따라서 이를 평가하고자 본 연구를 진행하였다.

염증반응 과정에서 NO는 iNOS와 pro-inflammatory cytokine들에 의해 생성되며 염증 발생의 거의 모든 단계를 조절하며 중추적 역할을 하고 있다.⁴⁹ 특히, NO는 염증 부위로 염증 세포를 이동시키는 초기 단계를 조절한다.⁵⁰ 이러한 결과를 바탕으로 대식세포에서 NO 생성의 억제 정도를 확인하여 잠재적인 항염증 활성을 평가하는 기초가 될 수 있음을 시사한다. PGs는 활성화된 대식세포를 포함한 다양한 세포 유형에서 생산된다. cyclooxygenase는 PGs의 합성단계에서 속도 제한 효소로,⁵¹ COX-1과 COX-2의 두 가지 주요 isoform이 알려져 있다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성과 위벽보호 및 신장기능의 유지 등 정상적인 생체 기능에 작용하고, COX-2는 활성화 되면 다양한 만성 염증성 질환 발병 기전에 중요한 역할을 한다고 알려져있다.^{52,53}

염증반응은 MAPKs와 NF- κ B 신호 전달 경로의 활성화에 의해 진행된다. MAPKs는 pro-inflammatory cytokine 및 염증 매개인자의 생성을 조절하며, 근본적인 생물학적 과정에서 외부 스트레스 신호에 의해 세포막에서 활성화된 성장인자 수용체가 보내는 생체 신호를 핵내로 전달하는 역할을 담당하는 serine/threonine protein kinases 계열이다.⁵⁴ NF- κ B는 p50, p65 및 I κ B- α 의 조절에 관여하는 주요 전사 인자이다.^{55,56} NF- κ B 활성화는 p65 단백질의 인산화뿐만 아니라 억제 단백질 I κ B- α 의 분해를 일으키고 NF- κ B 이합체가 핵으로 전위되면서 전염증성 사이토카인을 분비하는 결과를 나타낸다.

먼저 RAW 264.7 cells에서 세포 독성 실험 결과, 200 μ M까지 독성이 나타나지 않았고 이후 염증 실험에서도 독성을 나타내지 않는 200 μ M까지 처리하여 실험을 진행하였다. LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells에서 DHB가 주요 염증 매개체인 NO의 생성을 억제하는지 조사 하였고 그 결과 DHB 처리에 의해서 증가된 NO 생성을 45% 억제했다. 또한 HaCaT human keratinocyte에서 세포독성실험을 실시하여 DHB가 각질세포에서도 큰 독성을 나타내지 않음을 확인하였다. NO와 마찬가지로 염증성 질환의 염증매개인자 PGE₂와 TNF- α 와 IL-6와 같은 pro-inflammatory 의 발현에 영향을 미치는지 조사하였고 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 고농도 200 μ M에서 PGE₂ 생성을 76.9%로 유의하게 억제 하였으며 급성 염증성 질환의 원인으로 알려진 TNF- α 의 생성을 45.1 %, IL-6의 생성을 37.2 % 억제하였다.⁵⁷

DHB가 NO와 PGE₂ 생성을 억제하는 결과를 바탕으로, iNOS와 COX-2 단백질 발현을 Western blot analysis를 통하여 각각의 억제 효과를 조사하였다. LPS 단독 처리군은 iNOS 및 COX-2 발현의 현저한 증가를 보였고, DHB의 처리에 의해 iNOS와 COX-2 발현이 농도 의존적으로 억제 하는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는, DHB가 iNOS 및 COX-2 발현을 억제함으로써 NO 및 PGE₂의 생성을 억제 하는것을 나타낸다.

LPS로 활성화된 대식세포 RAW 264.7 cells을 이용하여 DHB에 의한 pro-inflammatory cytokine의 발현억제를 앞서 확인하였고 이러한 결과를 분자 생물학적으로 밝히기 위해 NF- κ B와 MAPKs 신호전달경로의 인산화 억제 활성을 조사하였다. NF- κ B 및 MAPKs 신호 전달 경로는 염증 매개인자의 생산 및 조절에 중요한 역할을 하기 때문에 우리는 p-ERK, p-JNK, p-p38, p-NF- κ B p105 및 I κ B- α 분해의 활성화에 DHB가 미치는 영향을 조사 하였다. MAPKs와 NF- κ B의 인산화 및 I κ B- α 의 분해는 LPS에 의하여 활성화 되었고, DHB는 LPS에 의한 p38의 인산화는 억제하지 못한 반면, JNK, ERK의 인산화를 억제하였다. 또한 DHB는 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells에서 I κ B- α 의 분해 또는 NF- κ B p105의 인산화에 영향을 미치지 않는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 DHB가 LPS로 활성화된 MAPKs의 (JNK 및 ERK) 인산화를 억제함으로써 pro-inflammatory 및 염증 매개인자의 발현을 억제하는 것을 나타낸다. 따라서

DHB는 잠재적인 다양한 염증질환에 대하여 효과적인 항염증제로써 적용 가능하다고 판단된다 (Figure 36).

또한, DHB의 주름개선 효과를 통하여 천연소재기반의 주름개선 기능성화장품으로써 적합한지 추가적인 연구를 진행하였다. 콜라겐은 진피층의 70~80%를 차지하고 있고 피부의 탄력성과 피부조직의 결합력을 유지시켜주는 피부 주요 구조 단백질이다.⁵⁸ 스트레스 및 다양한 외부 환경 요인에 의한 콜라겐의 생합성이 감소하고, 콜라겐을 분해하여 생합성을 방해하는 MMPs의 발현이 증가됨으로써 주름이 형성된다. 궁극적으로 콜라겐 분해는 피부 노화 과정에서 섬유의 구조적 유지력을 약화시키기 때문에 이러한 피부내의 변화를 지연시키고 예방하기 위하여 많은 연구가 보고되었다.⁵⁹ 따라서 자체적인 콜라겐 생합성 증가와, 콜라겐 분해억제는 피부 노화를 예방하는 유용한 전략이 될 수 있다. HDF cells을 이용하여 세포 독성 실험을 진행하였고, 세포독성이 없는 200 μ M까지 처리하여 이후 주름개선실험을 진행하였다. 콜라겐의 감소는 피부의 탄력성 저하를 초래하여 주름 형성의 원인이 되기 때문에 HDF cells에 DHB를 처리하고 type 1 pro-collagen 생합성 수준을 측정하였다. 실험 결과 type 1 pro-collagen의 생합성량은 용량 의존적으로 증가 하였고, 이후 type 1 pro-collagen 생산을 촉진하는 Smad 신호전달 기전의 활성화를 분석하였다. Smad2와 Smad3의 인산화 수준을 측정한 결과, DHB가 Smad2와 Smad3의 인산화를 증가시킴으로써 콜라겐 생합성을 향상 시킨다는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 DHB가 Smad2와 Smad3의 상향 조절을 통해 콜라겐 생합성을 효과적으로 활성화시킴으로써 새로운 주름 개선제로써 유용하게 적용 될 수 있음을 시사한다.

MMPs는 피부의 keratinocyte, fibroblasts를 비롯한 많은 세포들로부터 분비되고 ECM과 기저막 (basement membrane, BM)을 구성하는 대부분의 단백질 성분을 분해함으로써 피부 및 다양한 결합조직의 재구성과 재생과정에 관여하는 단백질로 알려져있다.⁶⁰ 평상시 피부에서 type 1 pro-collagen의 생합성과 그 분해효소인 MMP-1의 활성이 균형을 이루고 있다. 하지만 이 균형이 무너졌을 때 주름이 발생하게 된다. 이때 콜라겐 분해효소인 MMP-1의 과도한 생성을 억제할 경우 주름생성을 예방 할 수 있기 때문에 DHB가 MMP-1 생성에 영향을 미치는지 조사했다. HDF cells에 TNF- α 를 단독으로 처리하여 MMP-1 발현을

증가시켰고 DHB가 TNF- α 단독 처리군에 비해 MMP-1 생성을 43.2% 감소시켰다.

이러한 결과를 분자 생물학적으로 밝히기 위해 MAPKs 신호전달경로의 인산화 억제 활성을 조사하였다. TNF- α 로 활성화된 MAPKs는 DHB에 의하여 ERK, JNK의 인산화를 억제함으로써 콜라겐 분해효소인 MMP-1의 생성을 억제하는 것을 나타낸다. 따라서 DHB는 잠재적인 주름 개선제로서 적용이 가능하다 (Figure 37).⁶¹

모든 실험 결과들을 종합해본 결과, DHB는 항산화능력과 elastase 효소 저해 능력과, tyrosinase 효소 저해능력 및 항균력이 떨어지지만, LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells에서 MAPKs (ERK 및 JNK)을 신호전달기전을 억제함으로써 다양한 염증 매개인자의 발현을 억제하는 것을 확인하였고 TNF- α 로 활성화된 HDF cells에서는 MAPKs (ERK 및 JNK)를 억제하여 콜라겐 분해효소인 MMP-1의 활성을 억제시켰으며, Smad 신호전달기전을 통하여 콜라겐의 생합성을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서, 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB)의 항염증 효과와 주름개선 효과를 바탕으로 천연유래성분 기반의 기능성 화장품 소재로서의 활용이 가능할 것으로 판단된다.^{62,63}

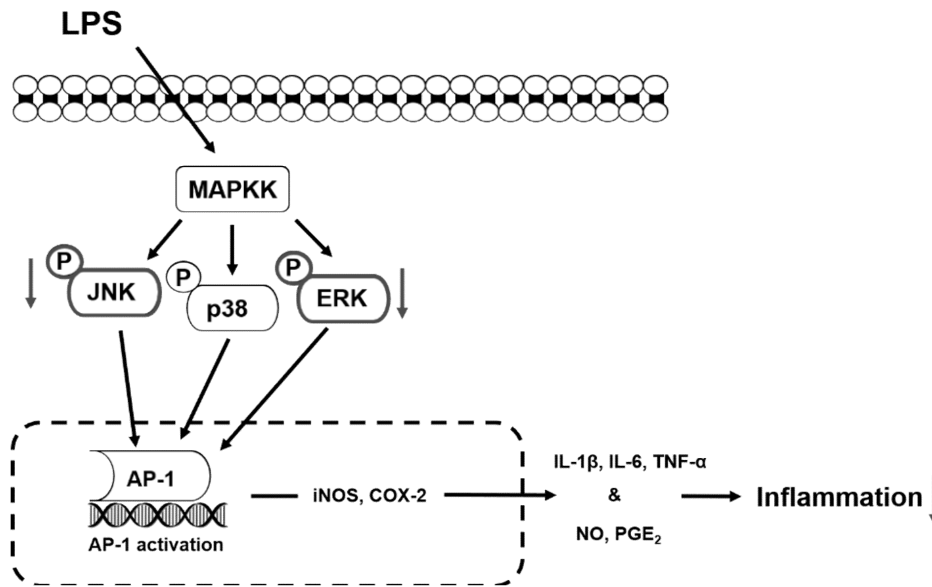


Figure 36. DHB regulates the production of inflammatory mediators and cytokines by modulating the activation of the MAPK signaling pathway (ERK and JNK).

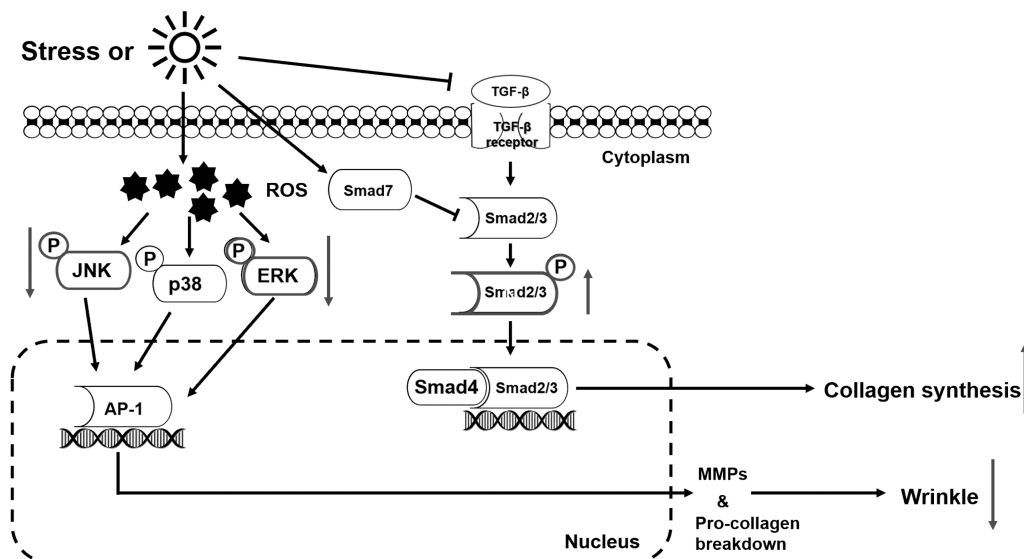


Figure 37. DHB reduced MMP-1 production and increasing procollagen secretion and DHB increased the phosphorylation level of Smad2 leading to an increase in collagen synthesis.

V. 참고문헌

1. Kim, C. R.; Kim, Y. M.; Lee, M. K.; Kim, I. H.; Choi, Y. H.; Nam, T. J. Pyropia yezoensis peptide promotes collagen synthesis by activating the TGF- β /Smad signaling pathway in the human dermal fibroblast cell line Hs27, *Internantional Journal of Molecular Medicine* 2017, 39, 31-38.
2. Sim, G. S.; Cho, Y. H. Effect of Medicinal Plant Extracts on the Expression of Collagen and Matrix Metalloproteinase-1 in Human Skin Fibroblasts , *Konyang Medical Journal* 2007, 7, 79-83.
3. Kim, J. W.; Kim, M. B.; Yun, J. G.; Hwang, J. K. Protective Effects of Standardized Siegesbeckia glabrescens Extract and Its Active Compound Kirenol against UVB-Induced Photoaging through Inhibition of MAPK/NF- κ B Pathways, *J. Microbiol. Biotechnol* 2017, 27, 242-250.
4. Bae, S. H.; Jung, Y. J.; Choi, Y. M.; Li, S. H. Effects of Er-Miao-San extracts on TNF- α -induced MMP-1 expression in human dermal fibroblasts, *Biological Research* 2015, 48, 1-8.
5. Lee, H. J.; Hwang, E. S.; Park, B.; Zhang, M. G.; Sun, Z. W.; Lee, D. G.; Park, S. Y.; Yi, T. H. Methanol Extract of Bitter Melon Alleviates UVB-Induced MMPs Expression via MAP Kinase and AP-1 Signaling in Human Dermal Fibroblasts in vitro, *Phytother. Res* 2016. 30, 1519-1526.

6. Lee, S. Y.; Lee, J. Y. Inhibitory Efficacy of Smilax china L. on Pro-collagen Type-1 Activity and MMP-1 Gene Expression in Fibroblasts (CCD-986sk), *Journal of Life Science* 2013, 23, 1239-1245.
7. Pavida, P; Jitlada, M; Ornicla, P; Mayumi, K; Mamitaro, O. Role of MatrixMetalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis, *Int. J. Mol. Sci* 2016, 17, 868.
8. Jun, H. J.; Lee, S. Y.; Kim, J. H.; An, B. J.; Lee, J. Y. Anti-wrinkling Effects of Juniperus rigida Sied, *Korean J. Microbiol. Biotechnol* 2013, 41, 449-455.
9. Lee, H. J. Inhibitory Effects of Hesperidin on the Ultraviolet B-Induced Photo-Aging, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol* 2015, 13, 631-636.
10. Hwang, E. S.; Park, S. Y.; Sun, Z. W.; Shin, H. S.; Lee, D. G.; Yi, T. H. The Protective Effects of Fucosterol Against Skin Damage in UVB-Irradiated Human Dermal Fibroblasts, *Mar Biotechnol* 2014, 16, 361-370.
11. Cho, S. M.; Kim, J. H.; Kim, J. K.; Park, K. M.; Cho, H. C.; Kim, I. S.; Kim, B. J.; Chun, Y. J.; and Cho, J. W. Increased Expression of Type I Collagen in AF-343 Treated Human Skin Fibroblasts, *Yakhak Hoeji* 2012, 56, 9-13.
12. Yoon, M. Y. A Study on Peanut Spouts Extract as the Anti-oxidant Activity and the Skin Whitening Cosmetic Ingredients, *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 2016, 31, 14-19.

13. Kim, E. H. Study of Whitening Cosmetics from natural products, *Korean journal of Aesthetic society* 2006, 4, 195-203.
14. Hwang, Y. S.; Kim, D. S.; Jo, D. J.; Kim, D. E.; Chang, B. Y.; Ryu, J. H.; Kim, H. S.; Cho, H. K.; Kim, S. Y. A clinical evaluation about whitening effect and safety of cosmetic containing aerial part of *Pueraria lobata* extract, *Yakhak Hoeji* 2017, 61, 233-239.
15. Kim, S. H.; Jung, Hee.; Shin, Y. C.; Ko, S. G. Research of Traditional Herbal Medicines for Anti-aging, Inhibition Effect of Wrinkle and Whitening Effect in the Skin, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 2008, 22, 691-698.
16. Jee, S. O. Antioxidant Activities and Whitening Effect of the Mulberry (*Morus alba* L.) Root Bark Extracts, *Korean J. Plant Res* 2009, 22, 145-151.
17. Lee, G. W.; Lee, J. Y.; Cho, Y. H. Whitening Effect of the Extracts from *Juglans mandshurica*, *KSBB Journal* 2010, 25, 18-24.
18. Shin, H. J.; Jeong, H. I.; Hwang, D. B.; Kim, D. U. *Cudrania tricuspidata* Root Extract as Whitening and Antiwrinkle Cosmetic Agent, *Korean Chem. Eng. Res.* 2014, 52, 701-705.
19. 이선숙; 임지영; 한영숙. 연잎 추출물의 여드름 피부 개선 효과. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol* 2012, 10, 405-413.

20. Bowe W. P.; Shalite A. R. Effective over the counter acne treatments. *Semin. Cutan. Med. Surg* 2008, 27, 170-176.
21. Sohn, H. Y.; Kim, Y. S.; Kum, E. J.; Kwon, Y. S.; Son, K. H. Screening of Anti-acne Activity of Natural Products against *Propionibacterium acnes*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol* 2006, 34, 265-272.
22. Lee, S. J.; Kim, K. H.; Lee, W. R.; Kim, J. Y.; An, H. J.; Park, K. K. Anti-bacterial and Anti-inflammatory Effect of Melittin on *Propionibacterium acnes*-induced Inflammatory Skin Disease in vivo, *J. Apic.* 2015, 30, 95-101.
23. Park, Y. D.; Jin, C. H.; Choi, D. S.; Byun, M. W.; Jeong, I. Y. Biological Evaluation of Isoegomaketone Isolated from *Perilla frutescens* and its Synthetic Derivatives as Anti-inflammatory Agents, *Arch Pharm Res* 2011, 34, 1277-1282.
24. Kim, K. N.; Heo, S. J.; Yoon, W. J.; Kang, S. M.; Ahn, G. N.; Yi, T. H.; d, Jeon, Y. J. Immunopharmacology and Inflammation Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages, *European Journal of Pharmacology* 2010, 649, 369-375.
25. Park, C. M.; Park, J. Y.; Noh, K. H.; Shin, J. H.; Song, Y. S. *Taraxacum officinale* Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF-B modulation in RAW 264.7 cells, *Journal of Ethnopharmacology* 2011, 133, 834-842.

26. Guo, W.; Sun, J.; Jiang, L.; Duan, L.; Huo, M.; Chen, N.; Zhong, W.; Wassy, L.; Yang, Z.; Feng, H. Imperatorin Attenuates LPS-Induced Inflammation by Suppressing NF- κ B and MAPKs Activation in RAW 264.7 Macrophages, *Inflammation* 2012, 35, 1764-1772.
27. Zhang, X.; Xiong, H.; Li, H.; Yu, L.; Deng, X. Effects of florfenicol on LPS-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in RAW 264.7 macrophages, *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2011, 25, 591-598.
28. Lee, C. W.; Kim, S. C.; Kwak, T. W.; Lee, J. R.; Jo, M. J.; Ahn, Y. T.; Kim, J. M.; An, W. G. Anti-Inflammatory Effects of Bangpungtongsung-San, a Traditional Herbal Prescription, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 2012, 1-12.
29. Búfalo, M. C.; Ferreira, I.; Costa, G.; Francisco, V.; Liberal, J.; Cruz, M. T.; Lopes, M. C.; Batista, M. T.; Sforcin J. M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages, *Journal of Ethnopharmacology* 2013, 149, 84-92.
30. Sae-Wong, C.; Matsuda, H.; Tewtrakul, S.; Tansakul, P.; Nakamura S.; Nomura Y.; Yoshikawa, M. Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells, *Journal of Ethnopharmacology* 2011, 136, 488- 495.

31. Yuan, F.; Chen, J.; Sun, P. P.; Guan, S.; Xu, J. Wedelolactone inhibits LPS-induced pro-inflammation via NF-kappaB Pathway in RAW 264.7 cells, *Journal of Biomedical Science* 2013, 20, 84-94.
32. Chen, T. Y.; Sun, H. L.; Yao, H. T.; Lii, C. K.; Chen, H. W.; Chen, P. Y.; Li, C. C.; Liu, K. L. Suppressive effects of *Indigofera suffruticosa* Mill extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages, *Food and Chemical Toxicology* 2013, 55, 257-264.
33. Shao, J.; Li, Y.; Wang, Z.; Xiao, M.; Yin, P.; Lu, Y.; Qian, X.; Xu, Y.; Liu, J. 7b, a novel naphthalimide derivative, exhibited anti-inflammatory effects via targeted-inhibiting TAK1 following down-regulation of ERK1/2- and p38 MAPK-mediated activation of NF-κB in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages, *International Immunopharmacology* 2013, 17, 216-228.
34. 강종석. 제주 자생 뱀딸기 추출물의 기능성 화장품 소재화 연구, *제주대학교 석사학위논문* 2017, 1-58.
35. Shin, D. H.; Choe, T. B. Study on the Bioactive Characteristics of Aronia Extract as a Cosmetic Raw Material, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol* 2015, 13, 275-283.
36. 현주미. 제주 재래굴·부지화 미숙과 추출물 및 감굴 정유 성분의 기능성 화장품 소재화 연구, *제주대학교 박사학위논문* 2016, 1-109.

37. Kim, B. S.; Jung, E. G.; Youn, H. S.; Hwang, K. A.; Han, M. D.; Yu, Y. H.; Nam, K. W. Inhibitory effects of coumarins from the fruit of *Citrus aurantium* against iNOS activity, *Yakhak Hoeji* 2017, 61, 267-273.
38. Lee, S. H.; Lee, M. S. The Study of Antioxidant and Antimicrobial Effects on the Skin Extracts of *Citrus junos*, *Poncirus trifoliata*, *Jeju citrus*, *J. Korea Soc. Beauty Art* 2017, 18, 127-140.
39. Hung, W. L.; Suh, J. H.; Wang, Yu. Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit, *journal of food and drug analysis* 2017, 25, 71-83.
40. Kim, S. M.; Lee, J. H.; Sethi, G.; Kim, C.; Baek, S. H.; Nam, D.; Chung, W. S.; Kim, S. H.; Shim, B. S.; Ahn, K. S. Bergamottin, a natural furanocoumarin obtained from grapefruit juice induces chemosensitization and apoptosis through the inhibition of STAT3 signaling pathway in tumor cells, *Cancer Lett* 2014, 354, 153-163.
41. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* 1958, 181, 1199-1200.
42. Re, R.; Pellegrini N.; Proteggente A.; Pannala A.; Yang, M.; Rice-Evans. C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med* 1999, 26, 1231-1237.

43. James, A. E. K.; Timothy, D. W.; Gordon, L. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* 1996, 35, 9090-9096.
44. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils, *J. Am. Oil chem. Soc.* 1981, 58, 966-968.
45. Balo J.; Banga I. The elastolytic activity of pancreatic extracts. *J Biochem* 1950, 46, 380-387.
46. Bae, J. S; Han, M. R.; Shin, H. S.; Kim, M. K.; Shin, C. Y.; Lee, D. H.; Chung, J. H. Perilla frutescens leaves extract ameliorates ultraviolet radiation-induced extracellular matrix damage in human dermal fibroblasts and hairless mice skin, *Journal of Ethnopharmacology* 2017, 195, 334-342.
47. Trupta, P.; Tianyuan, H.; Zhaoping, Q.; Ting, L.; Gary, J. F.; Yan, Y.; John, J. V.; Taihao, Q. Smad3-dependent regulation of type I collagen in human dermal fibroblasts: Impact on human skin connective tissue aging, *Journal of Dermatological Science* 2016, 83, 70-83.
48. Hwang, J. H; Park, K. Y; Oh Y. S; Lim, S. B. Phenolic Compound Content and Antioxidant Activity of Citrus Peels, *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2013, 42, 153-160.
49. Laskin, D.L.; Pendino, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol* 1995, 35, 655-77.

50. G, W. U.; Morris Jr, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond, *Biochemical Journal* 1998, 336, 1-17.
51. Herschman, H. R. Prostaglandin synthase 2, *Biochimica et Biophysica Acta* 1996, 1299, 125-140.
52. Harris, S.G.; J. Padilla, J.; Koumas, L.; Ray, D.; Phipps, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity, *TRENDS in Immunology* 2002, 23, 144-150.
53. Smith, W. L.; Meade, E. A.; DeWitt, D. L. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and-2a, *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1994, 714, 136-142.
54. B, Kaminska. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits, *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1754, 253-262.
55. Sanderson, C. J.; Interleukin-5, Eosinophils, and Disease, *The Journal of The American Society of Hematology* 1992, 79, 3101-3109.
56. Tak, P. P.; Firestein, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases, *J Clin Invest* 2001, 107, 7-11.
57. Simsek, I. TNF Inhibitors New and Old Agents for Rheumatoid Arthritis, *Bull. Hosp. Jt. Dis* 2010, 68, 204-210.

58. Ha, B. G.; Park, M. A.; Lee, C. M.; Kim, Y. C. Antioxidant Activity and Anti-wrinkle Effects of *Aceriphyllum rossii* Leaf Ethanol Extract, *Toxicol. Res* 2015, 31, 363-369.
59. Jeon, S. H.; Yi, . H. Effects of Alliin on Cellular Protection, Up-regulation of Collagen and Down-regulation of MMP1 in Human Dermal Fibroblasts, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 2014, 12, 249-258.
60. Kim, D. H.; Park, T. S.; Son, J. H. Potential prevention effects of *Rubus occidentalis* seed on UVB-induced MMP-1 production and procollagen degradation in CCD-986sk cells, *J Appl Biol Chem* 2016, 59, 317-322.
61. Yoo, J. M.; Kang, Y. J.; Pyo, H. B.; Choung, E. S.; Park, S. Y.; Choi, J. H.; Han, G. J.; Lee, C. H.; Kim, T. J. Anti-Wrinkle Effects of Korean Rice Wine Cake on Human Fibroblast, *Journal of Life Science* 2010, 20, 1838-1843.
62. Kim, M. J.; Hyun, J. S.; Kim, N. K.; Kim, S. S.; Park, K. J.; An, H. J.; Choi, Y. H.; Lee, N. H.; Hyun, C. G. Anti-inflammatory Effect of 6',7'-Dihydroxybergamottin on Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells. *Lat. Am. J. Pharm* 2017, 36, 340-345.
63. Hyun, J. S.; Kim, S. S.; Park, K. J.; An, H. J.; Choi, Y. H.; Lee, N. H.; Hyun, C. G. 6',7'-Dihydroxybergamottin Promotes Collagen Synthesis by Activating the Smad Signaling Pathway in Human Dermal Fibroblasts, *Der Pharma Chemica* 2018, 10, 134-138.