

Original Article / 원저

해송자 오일의 피부 항노화 및 주름 개선 효과

김형묵¹ · 김태준² · 임동빈³ · 하순봉³ · 김이화⁴ · 차병선⁵ · 허효진⁶ ·
소피아브리토⁶ · 이용문⁷ · 빈범호⁸ · 곽병문^{9*}
충북대학교 약학부 응용약학과(¹대학원생, ⁷교수)
세명대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과(²수련의)
세명대학교 한의과대학 한의학과(³학부생, ⁴교수)
아주대학교 자연과학대학 생명과학과(⁵대학원생, ⁸조교수)
아주대학교 일반대학원 응용생명공학부(⁶대학원생)
세명대학교 화장품뷰티생명공학부(^{9*}연구교수)

Skin Anti-aging and Anti-wrinkle Effects of *Pinus koreaiensis* Seed Oil

Hyung-Mook Kim¹ · Tae-Jun Kim² · Dong-bin Im³ · Sun-Bong Ha³ · Ee-Hwa Kim³ · Byung-Sun Cha⁴ ·
Hyo-Jin Heo⁵ · Sofia Brito⁵ · Yong-Moon Lee¹ · Bum-Ho Bin⁴ · Byeong-Mun Kwak^{6*}

¹Dept. of Manufacturing Pharmacy, College of pharmacy, Chungbuk National University

²Dept. of Korean Medicine, Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology,
College of Korean Medicine, Semyung University

³Dept. of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Semyung University

⁴Dept. of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Ajou University

⁵Applied Biotechnology Program, Graduate School, Ajou University

⁶Dept. of Cosmetic Science and Beauty Biotechnology, Semyung University

Abstract

Objectives : The aim of this study was to investigated the anti-aging and anti-wrinkles effects of the *pinus koreaiensis* seed(PKS) oil.

Methods : The anti-oxidant effect was performed by beta-carotene bleaching assay and the intracellular proteome was analyzed expression of each 15 proteins by 2-D electrophoresis. And fatty acid was analysed by gas chromatography. Anti-wrinkle effect was analyzing human skin by the PRIMOS system.

Results : Fatty acid analysis of PKS oil has shown oleic acid was 49.7% and linoleic acid was 34.1%. And the antioxidant effect was about 125% compared with alpha-tocopherol(0.1%) by beta carotene bleaching assay. In 2D PAGE analysis, fifteen protein changes in five mechanisms which was collagen synthesis pathway, MMPs, ECM-cell interaction, cytokine, antioxidant enzymes were analyzed. In case of anti-wrinkle effect was proved in vivo by analyzing human skin by the PRIMOS system. The analysis results of eye wrinkles for 4 weeks showed an improvement effect of over 6%.

Conclusions : In this study, the amount of protein change in the five mechanism through the cell experiment

and the skin anti wrinkle efficacy by the human in vivo test were investigated. As a result *pinus koreaiensis* seed oil by supercritical extraction could be used as a anti-aging and anti-wrinkle substance for the skin.

Key words : *Pinus koreaiensis*; Anti-oxidant; Anti-weinkle; Supercritical fluid extraction; Anti-oxidant

I. 서 론

사람의 피부노화는 크게 자연노화와 광노화 두 과정이 있다. 자연노화는 연령의 증가에 따라 나타나며, 광노화는 자외선에 대한 노출의 결과로 발생한다. 표피에서는 각종 오염물, 자외선, 화학물질 등에 의해 세포가 손상된다. 진피의 경우 엘라스틴의 파괴와 히아루론산의 감소로 콜라겐과 뮤코 다당류가 물과 결합하는 능력을 잃게 되고 그 결과 탄력이 줄어들고, 주름이 생기게 된다¹⁾.

해송자(海松子)는 소나무과(Pinaceae) 잣나무(*Pinus koraiensis* Siebold et Zuccarini)의 씨앗으로, 잣, 홍송(紅松), 송자인(松子仁)이라고도 한다²⁾. 우리나라, 만주, 흑룡강 유역, 일본 등에 분포하며, 종자는 일그러진 삼각형이나 난형으로서 암자갈색을 띠며 종피를 갖고 있다. 일반성분 조성을 보면 지방질이 70%, 단백질이 15%, 탄수화물이 5%, 회분이 3% 수준으로서 지방질을 다량 함유하고 있다³⁾.

해송자는 한의학 고전에서 치료용 사용례로 제시된 고전은 《藥集方》⁴⁾으로 “味甘, 小溫, 無毒”이라 하며 주치로서 “主骨節風, 頭眩, 去死肌, 髮白, 散水氣, 潤五臟, 不飢”로 관절염, 어지럼증을 치료하고, 죽은 살을 없애고, 머리털이 흰 것을 변하게 하고, 물기를 흘리고, 인체 장부의 기능을 활성화 하고, 허기지지 않게 한다고 하였다. 《本草綱目》⁵⁾에서도 해송자는 위의 치료효과와 더불어 “潤皮膚 肥五臟 主諸風溫腸胃 久服輕身延年不老”이라 하여 피부를 윤기나게 하며, 오장육부의 기능을 충실하게 하며, 여러 가지 풍병을 치료하고, 오래 복용하면 몸이 가벼워지고 수명이 늘어나고 늙지 않는다고

하였다. 상기된 주치 효과 중 去死肌와 潤皮膚의 경우 현대의 피부 노화에 대한 항노화 효과로 볼 수 있다.

잣나무에 대한 기존 연구 중 해송자유(海松子油)에 대한 것은 주로 지질 대사와 관련된 것이다^{6,7)}. 그 외에 잣나무의 잎, 껍질, 송이 등 해송자유 이외의 부분의 성분, 생리활성 물질, 미백효과, 주름 개선, 항산화 활성, 항균 활성, 항염증 효과에 대한 연구가 되어져 있다⁸⁻¹⁰⁾. 이렇듯 해송자유보다는 잣나무의 잎, 껍질, 송이 등 다른 부위에 대한 연구가 활발한 것은 한의학 고전에서 해송자유의 사용례가 적었던 것에 기인한 것으로 생각된다.

초임계유체 기술은 고용해력, 빠른 물질 이동과 열 이동, 미세공속으로 빠른 침투성 등을 이용한 기술로서 기술적 환경적 단점을 보완 및 개선할 수 있는 기술로 주목받고 있다¹¹⁾. 기존 연구의 해송자 추출의 압착이나 유기용매를 활용한 추출법과 비교하여 초임계유체 추출법은 높은 효율성과 선택성 및 짧은 추출 시간 등의 이점 때문에 주목 받고 있는 방법이다. 또한 해송자유에 대한 기존 연구 중 이 방법을 채택한 연구는 없었으며 본 연구에서 항산화 및 인체 적용 시험을 통하여 유의미한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 해송자

실험에 사용된 해송자는 서울 경동시장에서 구매하여 수분 5%미만으로 건조시킨 뒤 믹서기를 이용하여 800-1000 μ m의 사이즈로 파쇄하여 사용하였다.

2. 초임계 이산화탄소 추출

초임계 이산화탄소추출은 2L 추출기를 사용하여 추출

Corresponding author : Byeong-Mun Kwak, Dept. Of Cosmetic Sciences & Beauty Biotechnology, Semyung University, Jecheon, Chungbuk 27136, South Korea.

(Tel : 043-649-7150, E-mail : bmkwak@semyung.ac.kr)

•Received 2021/10/2 •Revised 2021/11/3 •Accepted 2021/11/10

하였다(Fig. 1). 파쇄한 해송자를 추출기에 넣고 예열 장치를 지나 가열되어 추출기 안으로 들어간다. 이때 초임계 상태가 된 이산화탄소는 해송자와 접촉하여 내부의 비극성 물질인 해송자유를 추출하게 된다. 초임계 이산화탄소에 용해된 해송자유와 초임계이산화탄소는 back pressure regulator 를 통하여 압력이 낮아지고 분리기 안에서 이산화탄소가 기체가 되어 추출물은 분리기 밑으로 모아지게 된다. 기체가 된 이산화탄소는 냉각기를 통하여 액화되고 recycle tank 안으로 들어가 펌프를 통하여 다시 추출기 안으로 들어가게 되도록 이산화탄소 재

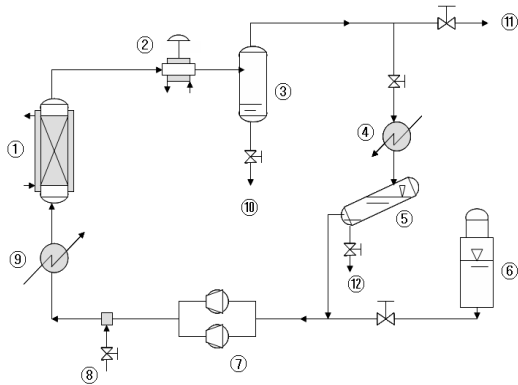


Fig. 1. The Process Flow Diagram for the Supercritical Extraction from *Pinus koreaiensis* Seed

The conditions used for the extraction from PKS were pressure of 350 bar, temperatures of 60 °C, flow of 140 ml/min, particle size of 800-1000µm.

사용 시스템을 사용하였다. 분리기 안의 해송자유는 10분마다 한 번씩 진행하여 추출물을 얻었다^{12,13}.

3. 지방산 분석

Gas chromatography(GC)를 이용하여 해송자유 지방산을 분석하였다. 분석 장비로는 Agilent GC-FID (Agilent, 7890B, CA)를 사용하였고, 지방산 표준 물질은 총 37종을 사용하였다. 사용된 표준 물질은 아래 표에 나타내었다(Table 1). 분석에 쓰인 column은 supelco SP-2560 capillary column(100m, 0.25mm (I.D), 0.25µm)을 사용하였다.

4. Beta carotene bleaching assay

Beta carotene bleaching assay(BCB)는 alpha-tocopherol 0.1%와 비교 하였다. Beta-carotene 을 chloroform 에 녹여 linoleic acid, PEG-40와 혼합한 뒤 감압증류방법으로 chloroform 을 완전히 제거하였다. 이후 물과 함께 유화시켜 해송자유와 3시간 반응하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 2D-PAGE

항노화 효능을 확인하고자 proteome 분석을 실시하였다. 분석에 사용된 cell 은 human dermal fibroblasts cell 을 사용하였으며 해송자유를 dime-

Table 2. Fatty Acid Standard for GC Analysis.

Butyric acid	Caproic acid	Caprylic acid	Capric acid	Undecanoic acid
Lauric acid	Tridecanoic acid	Myristic acid	Myristoleic Acid	Pentadecanoic acid
Pentadecenoic acid	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Margaric acid	Heptadecenoic acid
Stearic acid	Elaidic acid	Oleic acid	Linolelaidic acid	Linoleic acid
Arachidic acid	γ -Linolenic acid	Eicosenoic acid	α -Linolenic acid	Heneicosanoic acid
Eicosadienoic acid	Behenic acid	Erucic Acid	Arachidonic acid	Tricosanoic acid
Docosadienoic acid	Lignoceric acid	Eicosapentaenoic acid	Nervonic acid	Docosahexaenoic Acid
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid		cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid		

thylsulfoxide 에 용해시킨 후 cells 에 2.5 μ l 씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소에서 배양하였다. 24시간 배양 후 cells pellet 을 얻고 Dulbecco's phosphate buffer saline 으로 washing 하였다. Cell pellet 에 lysis buffer 를 넣고 30 $^{\circ}$ C 에서 5시간 incubation 하여 단백질을 추출하였고 상등액을 얻은 후 단백질을 정량하였다. 일차 전기영동은 immobilized pH gradient (IPG) strip 에 rehydration solution (urea, thiourea, CHAPS, DTT, Glycerol, DDW, bromophenol blue, 2% pharmalyte)을 첨가하여 빛이 차단된 조건에서 12시간 동안 rehydration 시킨 뒤 Ettan IPGphor3(GE healthcare, USA)에 strip 을 올려놓은 후 cup loading 방식으로 100 μ g 단백질, DNase, pI marker 를 loading 한 후 미네랄 오일을 첨가하였다. 일차 전기영동은 순서대로 500V 로 750Vhr, 1,000V 로 800Vhr, 10,000V 로 18,000Vhr, 10,000V 로 110,000Vhr 하였다. 이차 전기영동은 일차 전기영동이 끝난 IPG strip 을 strip tray 에 올려놓은 후 1% DTT 가 포함된 equilibration solution 을 넣어주고 equilibration 한 뒤 DTT 용액을 제거하고 iodoacetamide solution 을 넣고 15분 기다린 후 iodoacetamide solution 을 제거하였다. Ettan DAIXsix electrophoresis unit (GE healthcare, USA)에 SDS buffer (Tris, Glycine, SDS, DDW)를 넣어 주고 4 $^{\circ}$ C 를 유지하면서 순환시켜 주고 SDS gel 위에 IPG strip 을 올려놓은 후 agarose solution 을 넣어 SDS gel 과 IPG strip 을 고정시켜준 후 전압을 걸어 전기영동을 시작하였으며 순서대로 10mA로 1시간 단백질을 정렬, 40mA 4시간 단백질을 분리하였다. 2차 전기영동까지 끝난 gel 은 silver nitrate staining 을 통해 염색하여 분석하였다.

6. 주름 개선 효과 시험

1) 인체 적용 시험 윤리에 대한 기술 및 시험 계획서의 승인

본 인체 적용시험 연구는 시험 기관의 임상시험 심사

위원회(IRB)의 승인과 헬싱키 선언, 임상시험 관리 기준 등 관련 규정을 준수하여 실시되었고, 시험의 목적 및 화장품의 특성을 인체 적용 시험 대상자에게 설명서를 통하여 설명하였으며, 시험을 통한 위험성 및 목적 등을 알고 서면으로 동의한 자원자만이 참여하였다. 시험 기간 동안 이상 반응은 발생하지 않았다.

2) 인체 적용 시험의 설계

본 인체 적용 시험은 피부 상태 진단에 따라 평균 연령 42.9 \pm 3.6세인 20명의 건강한 성인 여성 시험 대상자를 선정하여 실시하였으며 참여한 시험 대상자 20명이 중도 탈락 없이 최종 시험을 완료하였다. 인체 적용 시험 참여에 동의한 시험 대상자는 동의한 순서대로 스크리닝 번호를 부여받고, 7일 이내에 스크리닝 검사를 실시하였다. 스크리닝 결과 선정 기준과 제외 기준에 모두 적합한 경우, 대상자에게 시료를 배정 하였으며, 선정 기준과 제외 기준은 다음과 같다.

① 선정 기준

- a. 주 시험자가 설명한 시험 대상자에게 알려주어야 할 사항에 대하여 충분히 설명 듣고 자발적으로 임상 시험 참가 동의서를 작성하고 서명한 자
- b. 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자
- c. 시험 기간 동안 추적 관찰이 가능한 자

② 제외 기준

- a. 임신 또는 수유 중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성
- b. 피부 질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 1개월 이상 사용한 자
- c. 동일한 시험에 참가한 뒤 3개월이 경과되지 않은 자
- d. 민감성, 과민성 피부를 가진 자
- e. 시험 부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관 확장 등의 피부 이상 소견이 있는 자
- f. 시험 시작 전 3개월 내에 시험 부위에 동일 또는 유사한 화장품 또는 의약품을 사용한 자
- g. 현저한 영양 장애자

h. 시험 시작 전 3개월 내에 피부 관련 시술 또는 피부 관리를 받은 자

i. 그 외 주 시험자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 자

스크리닝 시 사용 중인 기능성 화장품 포함 미용기기 및 피부 관리기 사용을 제한하였으며, 인체 적용 시험 기간 동안 주름 개선 기능성 화장품(레티노이드제, AHA 등) 등을 사용하지 않도록 가이드 하였다. 배정받은 시험 참여자는 기저 방문 이후 시험 시료를 아침, 저녁 2회 시험 부위인 눈가에 고르게 도포하였으며 순응 일지를 통하여 시험 참여자의 도포를 확인 하였다.

3) 인체 적용 시험의 피부 유효성 평가

시험 부위는 대상자의 안면(눈가) 부위에 해송자 오일을 적용하였으며 방문1(0주, 시험 시작 전), 방문2(2주 후), 방문3(4주 후) PRIMOS^{CR}(광학 3차원 피부 영상 측정기 CANFIELD, NJ)를 사용하여 기기 평가를 진행하였으며 PRIMOS^{CR}을 통하여 방문 1, 2, 3회 차의 기저 대비 눈가 주름을 측정하였으며, 주름의 평가에는 Ra, Rq, Rmax의 측정변수를 사용하여 평가 하였고, 측정 변수 설정은 식품의약품 안전처의 피부의 주름 개선에 도움을 주는 기능성 화장품 유효성 평가 가이드라인을 기준으로 설정하였고 측정 변수에 대한 통계는 기저 대비 모수적 방법인 paired t-test와 비 모수적인 방법인 wilcoxon signed rank test를 이용하였으며, 통계 결과는 유의차 5% ($p < 0.05$) 일때 통계적 유의성이 있다고 판단하였다. 눈가 주름 개선율은 아래 식에 따라 계산하였다. 본 인체 적용 시험은 안전성 유효성 평가 전문기관인 충청북도 화장품 임상 지원 센터에서 실시하였다.

눈가 주름 개선율(%) =

$$\left[\frac{|\text{해송자유사용 후 분석값} - \text{해송자유사용 전 분석값}|}{\text{해송자유사용 전 분석값}} \right] \times 100$$

7. 윤리적 승인

본 연구는 세명대학교 부속한방병원 기관생명윤리위원회의 승인을 받아 시행되었다(승인번호: GCC-072-20-001).

III. 결 과

1. 초임계이산화탄소 추출

해송자의 추출 조건은 350 bar 60°C였으며 170분간 추출하였고 총 추출량은 68% 추출되었다. 10분마다 추출한 누적 kinetic graph는 다음과 같다(Fig. 2).

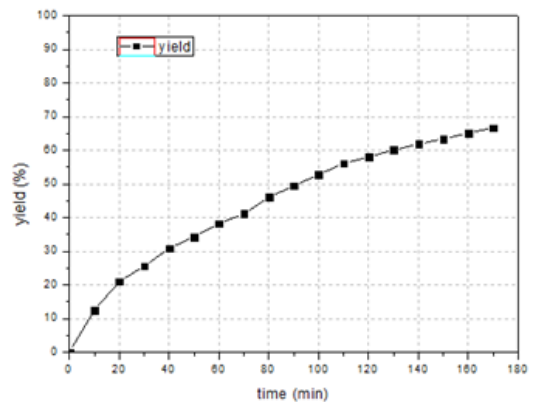


Fig. 2. The Kinetic Graph of Extraction Rate from PKS

Supercritical CO₂ flow was 145 ml/min, extraction time was 170min, temperature was at 60°C, pressure was 350 bar.

2. 기기 분석

해송자유는 GC를 이용하여 37종 중 10종의 지방산을 분석하였다. Oleic acid가 49.7%의 가장 많은 조성을 보였고 linoelic acid가 두 번째로 많은 34.1%로 분석되었다. Oleic acid를 다량으로 함유하고 있는 천연 오일은 항산화 효과가 있다는 연구는 많이 보고되어 졌다^{14,15}. Linoelic acid는 오메가-6 지방산으로 음식물로 섭취해야하는 필수 지방산 중의 하나이며, 리놀렌

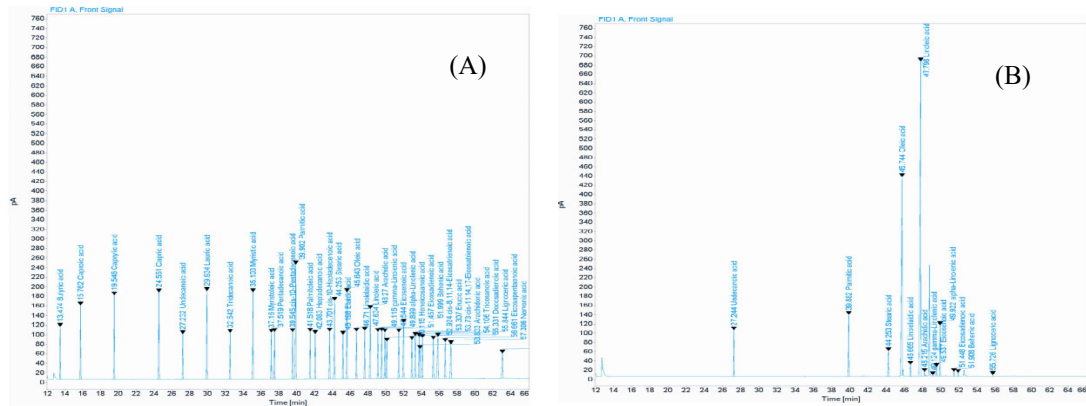


Fig. 3. Gas Chromatography of Fatty Acid Standard and PKS Oil. Chromatogram of PKS oil. GC conditions : 100°C to 240°C at 3°C/min., FID : 250°C, (A) Fatty acid standard, (B) Fatty acid from PKS oil

Table 2. Fatty Acid Composition of PKS Oil

NO.	Fatty acid	component (%)
1	Palmitic acid	13.23
2	Palmitoleic acid	0.20
3	Stearic acid	1.58
4	Oleic acid	49.67
5	Linoleic acid	34.06
6	Arachidonic acid	0.34
7	Eicosenoic acid	0.22
8	α -Linolenic acid	0.47
9	Behenic acid	0.12
10	Lignoceric acid	0.12

산 지질 라디칼을 사용하면 페놀류의 항산화 효과를 나타낼 수 있으며¹⁶⁾, 쥐에서 linoelic acid의 부족이 일어나면 피부 벗겨짐, 탈모 유발을 나타내는 것을 보였다¹⁷⁾. 지방산 분석의 chromatogram은 아래 그림에, 조성은 아래의 표에 나타냈다(Fig. 3, Table 2).

3. Beta carotene bleaching assay

해송자유의 BCB assay에서는 alpha-tocopherol 0.1% 대비 오일만 사용하였을 때 약 125%의 항산화 효과를 보여주었다(Fig. 4). 항산화의 메커니즘은 매우

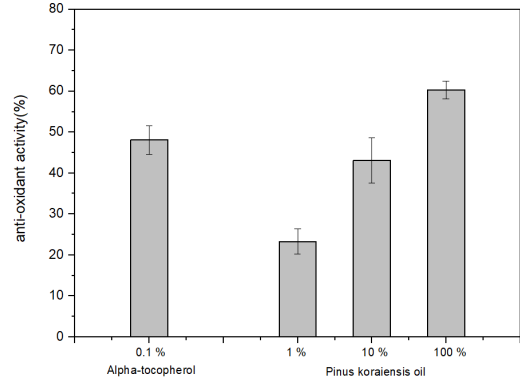


Fig. 4. Effect of Antioxidant Activity by PKS Oil. The concentrations of sample were 1, 10 and 100% of PKS. Alpha-tocopherol(0.1%) was used as a control. The data was obtained from 3 independent experiments.

다양하게 작용하기 때문에 어떠한 단백질이 작용하여 항산화 효과를 나타내었는지는 2D PAGE를 활용하여 proteom 분석을 통하여 확인하였다.

4. 해송자 오일의 2D gel 분석

Control gel에서 1,353개의 단백질 spot이 검출되었고 해송자유를 처리한 cell의 gel에서는 1,191개의 단백질 spot이 검출되었다. 두 gel에서 매칭된 단백질은 모두 413개, 증가된 것은 230개 감소된 것은 183개

로 나타내었다. 아래 그림에 두 gel의 사진을 나타내었고, 이하 표에서 매칭된 단백질의 감소 및 증가된 수치를 나타내었다(Fig. 5, Table 3). 5가지 메커니즘 상의 단백질이 모두 변화된 것을 확인하였다.

콜라겐 합성 경로에 있는 6가지 단백질이 모두 증가되었으며, P3H3에서 370% 가량 증가되는 것을 볼 수 있었다. Prolyl 3-hydroxylase3(P3H3)은 mRNA가 폴리펩타이드로 번역된 후 하이드록실화를 촉매하는 역할

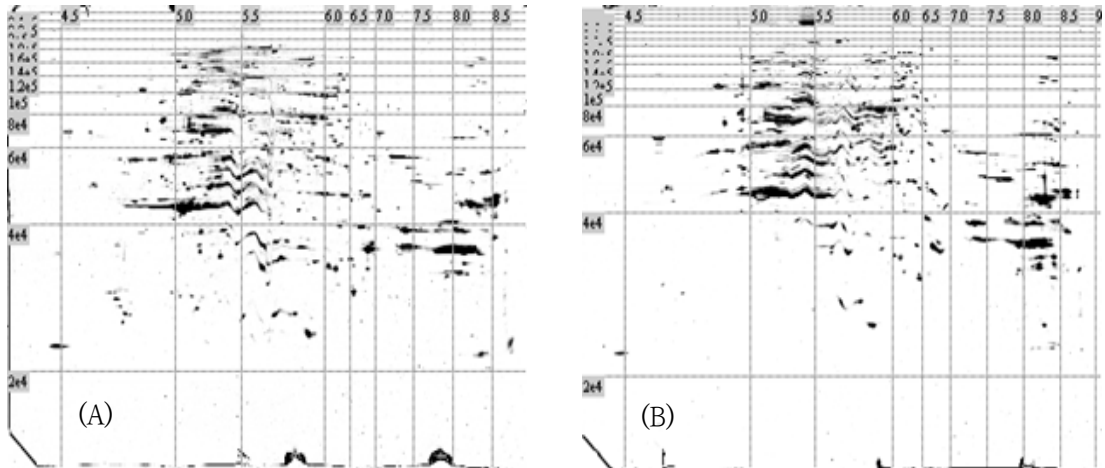


Fig. 5. 2D-PAGE Gel

Control(A), PKS oil(B). Gel image of proteins extracted from NF cell treated with 500 ppm of PKS oil

Table 3. Effect of PKS Oil to Expression of Proteins

Investigated protein		Looking forward efficiency	Efficiency (% of control)
			PKS oil
Collagen synthesis pathway	P4H2	Up regulation	123.8
	P4H3		159.2
	P3H2		101.7
	P3H3		368.1
	LH1		224.8
	LOX		160.3
MMPs	MMP-1	Down regulation	74.6
	MMP-12		94.2
ECM-cell interaction	Integrin B5	Up regulation	109.7
	Integrin B7		149.0
Cytokines	TGF-b3	Down regulation	82.1
	IL-1b		79.7
	IL-6		76.4
Antioxidant enzymes	catalase	Up regulation	321.1
	GRM		103.8

The expression of protein from the human dermal fibroblast cells, which was treated with PKS, was compared with control.

로 콜라겐 합성에 도움이 된다¹⁸⁾. MMP-1과 12 모두 감소하였고 세포외 매트릭스 및 생체 역학적 리모델링에 중요한 역할을 하는 Integrin B5,7 이 증가됨을 볼 수 있었다. Cytikines 에 속하는 세 가지 단백질이 감소되는 것을 확인하였으며 항산화 효소인 catalase, GRM 또한 증가됨을 확인하였다. Superoxide dismutase 에 의해 분해된 과산화수소를 산소와 물로 분해시키는 효소인 catalase 도 300% 이상 증가됨을 확인하였다.

5. 주름 개선 효과 시험

눈가 주름을 분석한 결과 해송자유를 사용하기 전과 비교하여 사용 2주 후에는 변수 Rmax 에서만 통계적으로 유의차 있게 나타났으나, 4주 후에는 변수 Ra, Rq, Rmax 모두 통계적으로 유의차 있게 나타났다 ($p < 0.05$). 또한, 해송자유를 사용하기 전과 비교하여 변

수 Ra 에서 사용 2주 후 1.4%, 사용 4주 후 4.4%의 눈가 주름 개선 효과를 나타내었고, 변수 Rq 에서 사용 2주 후 1.2%, 사용 4주 후 4.4%의 주름 개선 효과를 나타내었으며 변수 Rmax 에서 사용 2주 후 1.8%, 사용 4주 후 6.4%의 주름 개선 효과를 나타내었다. 평가 기간 동안 시험 제품에 의한 피부 유해 사례는 발생하지 않았으며, 분석 결과는 아래의 표에 나타내었다(Table 4). 또한 PRIMOS 사진을 통하여 눈가 주름이 변화된 모습을 확인할 수 있었다(Table 5).

IV. 고 찰

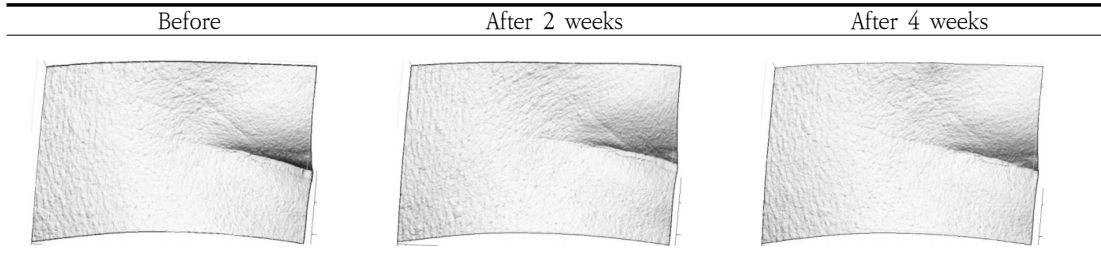
크게 두 가지로 나뉘지는 피부 노화 중 자연 노화와 광 노화에 대한 대안책으로 본 연구를 실시하였다. 해송자는 학명에서조차 국내 원산지라는 표현의 *koreaiensis*를 사용하고 한국 사람들에게 친근하고 사

Table 4. Analysis for Anti-wrinkle Effects

Parameter	After 2 weeks	After 4 weeks
Ra value (μm)	17.0 \pm 2.6	17.5 \pm 2.7
Improvement rate (%)	1.4	4.4
<i>p</i> -value	0.313	0.015
Rq value (μm)	21.8 \pm 3.6	21.1 \pm 3.1
Improvement rate (%)	1.2	4.4
<i>p</i> -value	0.327	0.009
Rmax (μm)	122.2 \pm 17.6	116.4 \pm 15.4
Improvement rate (%)	1.8	6.4
<i>p</i> -value	0.001	0.001

Skin analysis by PRIMOS software. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 5. Analysis for Anti-wrinkle Effects by Pictures



용에 있어 부담이 없는 한방 천연물이며 《本草綱目》⁵⁾에서는 “新羅松子 有斑極香;新羅者肉甚香美”라고 하여 해송자의 주산지가 한국이며, 한국산 해송자를 매우 향기롭고 맛있다고 표현하였다. 해송자는 뛰어난 식감으로 식재료로 주로 사용되었기에 韓醫學에서는 그 사용례가 많지 않았다. 해송자를 치료용으로 사용한 대표적인 사례는 《本草綱目》⁵⁾으로 “骨節風, 頭眩, 去死肌, 變白, 散水氣, 潤五臟, 不飢 開寶 逐風痺寒氣, 虛羸少氣, 補不足, 潤皮膚, 肥五臟. 別錄 主諸風, 溫腸胃. 久服, 李珣, 潤肺, 治燥結欬嗽. 時珍 同栝子仁, 治虛秘. 宗爽”라고 제시되어 있다. 이중 潤皮膚에 중점을 두고 본 연구를 실시한 결과 해송자 문헌을 찾아보면 일반 성분 중 지방이 60-70%로 들어 있어 지방의 효과를 확인 하였으며 이 지방은 불포화 지방산인 올레산이 약 50%를 차지하고 있는 것을 확인하였다. 올레산을 다량으로 함유하고 있는 지방들은 이미 항산화 효과가 있다는 사실은 연구를 통하여 많이 보고되어지고 있다^{3,14)}. 또한 다음으로 분석된 리놀레산은 오메가-6 지방산으로 체내에서 식이로서 우리 몸에 공급해 주어야 하는 필수 지방산 중에 하나이다.

또한 proteom 분석을 통하여 확인한 결과에서 총 15가지 단백질 변화는 큰 의미가 있다. 콜라겐 합성 경로의 6가지 단백질 중 iso 형인 P4HA2, P4HA3들이 만들어 내는 효소인 P4H2, P4H3는 증가될수록 콜라겐 합성에 도움을 준다는 연구가 되어있으며^{19,20)}, P3H2, P3H3 역시 하이드록실화를 촉매시키면서 콜라겐 합성에 도움을 준다. 또한 증가됨으로 분석되어진 catalase 는 superoxide dismutase(SOD)에 의해 분해된 과산화수소를 산소와 물로 분해시키면서 콜라겐 합성을 촉진해준다.

Interleukin-1(IL-1) 역시 type I, III 의 pro-collagen mRNA 의 정상 상태 수준을 감소시키고 조직의 리모델링, 염증, 면역, 재생 과정 등의 생물학적 과정에 관여하고 있다²¹⁾. 위의 단백질 모두 해송자오일을 처리하지 않은 control 에 비하여 매우 증가되고 감소되는 것을 확인하여 피부 내 어떠한 노화메커니즘에 효과가 있는 것을 확인한 것뿐만 아니라 실제 인체 적

용 시험에서도 충분한 효과가 있을 것이란 기대감을 갖고 in vitro 실험의 결과를 얻게 되었다.

인체 적용 시험 결과 또한 6% 이상 효과가 있는 것을 확인 할 수 있어 해송자오일은 피부의 항노화, 항주름 효과가 있음을 증명하였다.

V. 결 론

본 연구는 해송자오일의 지방산 조성을 분석하고 항산화 효능과 proteom 분석을 통하여 항노화 메커니즘에 작용하는 단백질의 변화를 확인하였다. 이후 인체 적용 시험을 통하여 눈가 주름의 개선율을 확인하여 해송자오일의 주름 개선 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 해송자를 사용하여 초임계이산화탄소로 오일을 추출하였다. 약 68%의 추출수율을 확인하였으며 이 추출된 오일은 37종의 지방산 표준물질로 분석한 결과 10가지 지방산이 분석되어졌고 그 중 불포화 지방산인 Oleic acid 이 49.7%의 가장 많은 조성을 보였고 Linoelic acid 이 두 번째로 많은 34.1%로 분석되었다.
2. Beta-carotene 을 이용한 항산화 평가에서 모두 농도 의존적으로 효과가 있는 경향을 보였다. 최고 농도에서 항산화제인 0.1% alpha-tocopherol 보다 약 25% 더 효과를 보이는 것을 볼 수 있었다.
3. 인간섬유아세포에 해송자오일을 처리하여 proteom 분석을 통하여 각 메커니즘에 작용하는 단백질들을 살펴본 결과 콜라겐 합성경로에 있는 6가지 단백질, interukin, 항산화 효소들은 증가되는 것을 확인 할 수 있었으며, cytokines, MMPs 는 감소되는 것을 확인하여 항산화 효과를 확인하였다.
4. 승인된 연구기관을 통하여 4주간의 인체 적용 시험을 한 결과, 눈가의 주름이 약 6% 이상 개선되는 것을 확인 할 수 있어 주름 개선에도 효과가 있는 것을 확인 할 수 있었다.

VI. 감사의 글

본 연구는 2021학년도 세명대학교 대학혁신지원사업에 의한 연구임.

ORCID

- Hyung-Mook Kim
(<https://orcid.org/0000-0002-8685-4589>)
- Tae-Jun Kim
(<https://orcid.org/0000-0001-8976-1399>)
- Dong-bin Im
(<https://orcid.org/0000-0001-7981-3845>)
- Sun-Bong Ha
(<https://orcid.org/0000-0002-7009-7165>)
- Ee-Hwa Kim
(<https://orcid.org/0000-0003-0400-9056>)
- Byung-Sun Cha
(<https://orcid.org/0000-0001-7224-2058>)
- Hyo-Jin Heo
(<https://orcid.org/0000-0001-7862-3572>)
- Sofia Brito
(<https://orcid.org/0000-0003-3530-1885>)
- Yong-Moon Lee
(<https://orcid.org/0000-0002-1551-9206>)
- Bum-Ho Bin
(<https://orcid.org/0000-0002-3314-4938>)
- Byeong-Mun Kwak
(<https://orcid.org/0000-0002-9375-9029>)

References

1. LEE SE, Son DW, Yoon YP, Lim TY, Cho JW, Kim HS. Screening of Traditional Herbal Medicines to Develop New Materials for Anti-aging and Anti-wrinkle in the Skin. *J. Soc. Cosmet. Scientists*. 2005;31(2):147-52.
2. CM Kim. Coloured illustrations for discrimination of herbal medicine. *Acadepia*. 2014:436.
3. TH Yoon. Fatty acid composition of total lipids from seeds of *Pinus koraiensis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 1987;16(2):93-7.
4. Yoo HT, Noh JR, Park YD. *Hangukeui-hakdaegye No.7 Hyangyakjipseongbang Younginbon*. Seoul:Yeokangprint. 1994:439-45.
5. Lee SJ. *Dohae Bonchogangmok*. Seoul: Komoonsa. 1975:450-6.
6. Kim KK, Kang YH, Kim DJ, Kim TW, Choe M. Analysis of Pine Nut Oil Composition and Its Effects on Obesity. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL*. 2014;46(5):630-5.
7. Yoon TH, Lee SM. Effect on Fatty Acid Composition of Red Blood Cell Membranes of Supplement of Korean Pinenut Oil, rich in 5-Olefinic acids, in Normocholesterolemic and Atherosclerotic New Zealand White Rabbits. *Journal of the East Asian Society of Dietary Life*. 1994;4(1):57-70
8. Jo JB, Park HJ, Lee EH, Lee JE, Lim SB, Hong SH, et al. Whitening and anti-wrinkle effect of *Pinus koraiensis* leaves extracts according to the drying technique. *J Appl Biol Chem*. 2017;60(1):73-8.
9. Kim HS, Jung BO, Lee SB, Jung SJ. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Pinus Koraiensis* Extracts with Chitosan. *J. Chitin Chitosan*. 2012;17(4):221-8.
10. Jang KH, Surh JH. Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of

- High-Sugar Fermented *Pinus koraiensis* Cone Extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2017;46(1):140-5.
11. Yoon SD, Byun HS. Application of Separation Technology and Supercritical Fluids Process. *CLEAN TECHNOLOGY.* 2012;18(2):123-43.
 12. Oh JH, Kim YK, Jung HY, Shin JE. Intrinsicaging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *Journal of Dermatological Science.* 2011;192-201.
 13. Jung BS, Shin MK. Dohae hyangyagdaesajeon. Seoul:Young Rim Sa. 2003:402,403.
 14. Ahn SK, Jang KH, Jung J, Kim TH, Kang YC, Cheon SH, et al. *Common Skin Disease.* Seoul:JN Medbook. 2015:311-521.
 15. Kim JY, Park SN. Anti-oxidative Activities of *Castanea crenata* Leaf Extract/Fractions and Application on Cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* 2008;34(4):259-68.
 16. M. N. Peyrat-Maillard, M. E. Cuvelier, C. Berset. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *J Am Oil Chem Soc.* 2003;80(10):1007-12.
 17. S. C. Cunnane, M. J. Anderson. Pure linoleate deficiency in the rat: influence on growth, accumulation of n-6 polyunsaturates, and (1-14C) linoleate oxidation. *J Lipid Res.* 1997;38(4):805-12.
 18. Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM. Antifungal and Antioxidant Activities of Extracts from Leaves and Flowers of *Camellia japonica* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2005;13(3):93-100.
 19. A Role for Prolyl 3-Hydroxylase 2 in Post-translational Modification of Fibril-forming Collagens. *J Biol Chem.* 2011;286(35):30662-9.
 20. Daniele M. Gilkes, Pallavi Chaturvedi, Saumendra Bajpai, Carmen C. Wong, Hong Wei, Stephen Pitcairn, et al. Collagen Prolyl Hydroxylases Are Essential for Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 2013;73(11):3285-96.
 21. Alain Mauviel, Jyrki Heino, Veli-Matti Kähäri, Daniel-Jean Hartmann, Gérard Loyau, Jean-Pierre Pujol, et al. Comparative Effects of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- α on Collagen Production and Corresponding Procollagen mRNA Levels in Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology.* 1991;96(2):243-49.