

천연물의 피부세포에 미치는 영향 - 활성산소의 작용과 억제 -

박수남

서울산업대학교, 정밀화학과

139-743, 서울시 노원구 공릉동 172

Effects of Natural Products on Skin Cells

- Action and Suppression of Reactive Oxygen Species -

Soo Nam Park

Dept. of Fine Chemistry, Seoul National University of Technology

172, Gongneung-Dong, Nowon-Ku, Seoul, 139-743, Korea

요 약

활성 산소종은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 작용하고 있다. 피부는 자외선에 노출되어 있어 활성 산소종을 만드는 광화학적 반응들이 계속해서 일어나고 있다.

이들 활성 산소종들은 피부 세포 및 조직 손상을 주도한다. 이들은 항산화 효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 항산화 방어망을 파괴함으로써 산화제/항산화제 균형을 산화상태 쪽으로 기울게 한다. 결과적으로 계속된 산화적 스트레스는 지질 과산화, 단백질 산화, 간질 성분을 파괴시키는 단백질분해효소의 활성화, 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합, 히아루론산 사슬의 절단, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 야기시킨다. 결국에는 탄력감소, 주름살

및 기미·주근깨 등으로 특징 지워지는 피부노화가 가속화된다.

따라서 피부노화 방지를 위해서는, 과잉의 활성 산소종 생성을 억제하고 또한 생성된 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 시스템이 화장품의 처방에 반드시 포함될 필요가 있다. 즉, 산화제/항산화제 밸런스가 유지되는 피부의 항산화 방어 시스템 구축이 필요하다.

피부노화 방지에 있어서 천연물의 역할로 (1) 자외선 흡수제로서의 역할, (2) 항산화제로서의 역할, (3) 주름 개선제로서의 역할, (4) 미백제로서의 역할, (5) 항균·항염작용 및 면역 조절제로서의 역할에 대하여 살펴 보았다.

21 세기는 본격적으로 기능성 화장품 시대가 개막될 것으로 예측하고 있다. 이에 맞춰 천연물들은 피부노화를 방지하는데 주도적인 역할을 할 것으로 기대된다.

I. 노화 이론

1. 노화의 free radical 설

지금까지 노화에 대한 고찰 방향은 1) 프로그램설과 2) 에러 축적설 두 가지로 대별되고 있다. 1)에서는, 세포의 유전자에 수명을 결정하는 정보가 보존되어 있어 그 프로그램에 따라 노화가 진행된다고 생각하는 설이다. 그 예로 염색체 말단의 텔로머(telomeres)와 그 길이를 제어하는 효소인 telomerase 가 보고되고 있다. 2)에서는 free radical 설, 가교 결합설, 돌연변이 축적설, 노폐물 축적설 등이 있으며, 여기서는 노화가 여러 가지 장애나 노화 물질의 축적에 의해서 진행된다고 생각하는 설이다(Inoue, 1998).

이들 노화학설 중에서 free radical 설은 이 설이 처음 제안된 이래로 이 이론을 지지하는 수많은 연구 결과들이 나왔으며, 노화와 함께 사망 확률을 증가 시키는 원인을 설명하는데 있어서, 특히 피부노화 메커니즘을 이해하고 그 대책을 세우는데 있어서 매력적

인 가설임이 입증되고 있다(Packer, 1995 ; Park, 1997).

화학적으로 free radical 이란 홀수 전자를 갖는 원자나 원자단을 말한다. 이와 같이 free radical 은 짝을 이루지 못하고 있기 때문에 매우 불안정하며, 에너지가 높고, 반응성이 크다. 따라서 free radical 은 안정한 산물로 되기 위해서 주위에서 전자를 빼앗아 짝을 이루는 성질이 강한 산화제로서의 작용을 나타낸다. 생체 내에서 산소는 그 화학적 성질로 인하여 환원되어 free radical 인 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼($O_2^{\cdot-}$)과 히드록실 라디칼($\cdot OH$)과 같은 산소 라디칼로 될 수 있다. 일반적으로 활성 산소종(reactive oxygen species)이란 용어는 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼($O_2^{\cdot-}$)과 히드록실 라디칼($\cdot OH$)과 같은 산소 라디칼 뿐만 아니라, 과산화수소(H_2O_2)나 싱글렛 옥시전(singlet oxygen, 1O_2)과 같은 몇 종류의 비라디칼들, 그리고 그 외에 피부에서 이차적으로 생성된 것들(예, $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $NO\cdot$, $HOCl$ 등)이 있다. 이들 활성 산소종은 각종 성인병과 노화, 특히 피부노화의 원인으로 큰 관심의 대상이 되고 있다.

생체 내에서 산화제 공격과 항산화제 방어는 밀접하게 조화를 이루고 있다. 그러나 방어는 필연적으로 완벽하지 못하다. 따라서 생체 구성 성분들인 지질, 단백질, 핵산 등의 생체 분자들은 산화제인 free radicals 에 의해 지속적인 산화적 손상을 받으며 이들 산화반응 산물들은 나이와 더불어 축적된다. 산화제에 유리한 이러한 불균형이 노화 그 자체의 원인이 된다는 학설이 free radical 설이다(Harman, 1956; 1992; Brunk et al., 1992).

2. 피부노화(광노화)

피부는 항상 산소와 접촉하고 있고 또한 태양광선의 자외선에 크게 노출되어 있다. 따라서, 활성 산소종으로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험이 실질적으로 증가하고 있다.

지표에 도달하는 태양광 스펙트럼은 UV-B(290 ~ 320 nm), UV-A(320 ~ 400 nm), 가시광선 및 적외선으로 이루어진 복사선 복합 띠이다. UV-A 는 UV-B 보다 흥반 생성에 있어

서는 1000 배 약하다. 그러나 태양광선은 UV-A 를 UV-B 보다 100 배나 더 많이 함유하고 있다. UV-B 의 작용은 주로 표피에 제한되어 있으나 UV-A 는 보다 더 깊이 침투하여 단구 및 다형핵 세포의 침윤을 야기시킬 뿐만 아니라 진피 미세 혈관에서 내피세포 손상도 야기시킨다. UV-A 는 예전에 생각했던 것보다도 태양광선 노출에 의한 해로운 작용에 더 많이 참여하며, 또한 노화와 더불어 UV-B 보다도 더 위험한 존재일 수 있다고 주장되고 있다(Emerit, 1992).

Bryce(1993)가 조사한 바와 같이, 자외선의 피부 속까지의 침투 깊이는 활성산소가 생성되는 자리를 결정하며, 이는 확실히 자외선의 파장과 세기에 의존한다. 지속적인 자외선의 작용으로 피부에는 과잉의 활성산소가 생성된다. 이들 활성산소는 항산화 효소와 글루타치온, 비타민 E, 비타민 C 및 유비퀴놀과 같은 저 분자량의 항산화제를 파괴시키고 양을 감소시킨다. 이와 같이 자외선으로 생성된 활성 산소종은 실질적으로 피부의 효소적 그리고 비효소적 항산화 방어계를 위태롭게 만든다. 따라서 균형은 산화상태 쪽으로 유리하게 기울어지고(Witt et al., 1993; Sies, 1986, 1991), 결과적으로 나타나는 산화적 스트레스는 세포 성분들에 대한 손상을 야기시켜서 광노화를 촉진시킨다. 광노화 과정에서, 활성 산소종은 멜라닌 생성을 촉진시키고 주름을 생성시키는 원인 물질로 받아들여지고 있다.

광노화는, 특히 주름 생성의 원인으로 보는 진피 결합조직의 자외선으로 유도된 심각한 손상과 관련이 있다. 이러한 결합조직의 손상으로는 콜라겐 및 엘라스틴 분자의 절단 및 비정상적인 교차결합, 세포외 간질분자들의 함량변화, 세포외 간질분자들을 조직화하는 섬유아 세포의 능력 감소 등이 포함된다(Oikarinen, 1990; Yamauchi et al., 1991).

II. 세포 및 자외선에 의한 활성산소의 생성

생체 내에 있어서 활성산소의 생성은 다양한 경로를 거쳐서 생성된다. 정상적인 대

사과정에 있어서도 호흡한 산소의 2%가 수퍼옥사이드로 전환되는 것으로 추정되고 있다.

자외선에의 노출 후 피부에서의 활성산소 생성은 피부내 광증감제 분자에 의한 자외선 흡수로 시작되는 광증감 반응에 의해 좌우된다. 광증감 반응은 type I, 혹은 type II 반응 형태로 일어난다(Foote, 1976, 1991). Type I 반응으로 생성된 산물은 라디칼 혹은 라디칼 이온이고, 반면에 type II 반응은 1O_2 및 $O_2^{\cdot-}$ 을 포함하는 활성 산소종을 생성시킨다. SOD 는 $O_2^{\cdot-}$ 을 H_2O_2 로 전환시킨다. H_2O_2 는 모든 세포막들을 쉽게 통과할 수 있다. 그러나, $O_2^{\cdot-}$ 와 H_2O_2 는 반응성이 약하여 직접적으로 조직 손상에 참여하는 경우는 드물다 (Halliwell and Aruoma, 1991). 따라서, H_2O_2 와 $O_2^{\cdot-}$ 은 $\bullet OH$ 과 같은 보다 위험한 라디칼 종의 생성에 참여하는 것으로 생각되고 있다. 바꿔 말하면, $O_2^{\cdot-}$ 은 Fe(III)와 Cu(II)를 환원시킬 수 있고, 환원된 Fe(II)와 Cu(I)는 H_2O_2 를 환원시켜서 결과적으로는 $\bullet OH$ 을 생성시킨다 (Darr and Fridovich, 1994). 또한 생체 내에서, $O_2^{\cdot-}$ 은 ferritin 으로부터 Fe(II)을 방출시킬 수 있다. 이런 현상은 또한 자외선 조사 후에 나타나며 자외선으로 인해 생성된 $O_2^{\cdot-}$ 의 작용에 기인된 것으로 간주되고 있다(Boyer and McCleary, 1987; Biemond et al., 1988). 1O_2 은 수명이 짧은 특히 해로운 분자이다. 자외선 조사는 광증감제 분자로부터 바닥상태 산소의 에너지 전달에 의해 1O_2 을 발생시킨다. 생체내 증감제(예, 포르피린, 리보플라빈 등)에 첨부해서, 피부는 화장품, 약물, 약품 그리고 산업적 방출물에 포함된 수 많은 외부 광증감제에 접근되어 있다. 1O_2 을 비롯한 활성 산소종들은 약물로 유도된 광독성, 포르피린증(porphyrrias), 그리고 광노화를 포함하는 피부병 질환과 심각한 결합조직 손상으로 인한 병발생에 포함된다(Epstein et al., 1989; Oikarinen et al., 1985; Oikarinen and Kallioinen, 1989; Kligman, 1992).

자외선에 의한 활성 산소종의 생성 이외에도 피부노화에 영향을 미치는 활성산소의 출처는 다양하다. 병원성 박테리아, 바이러스, 곰팡이에 의한 피부 침투는 호중구와 마크로파지를 염증이 일어난 부위로 모이게 한다. 이들 세포들은 호흡급증을 통하여 염증부위에 활성 산소종을 방출시킨다. 또한 자외선에의 노출도 진피에 염증성 침윤을 일으키고 활성산소의 생성을 유발시켜서 계속된 손상을 야기시킨다. 염증 조건에서 세포막으

로부터 아라키돈산의 방출과 아라키돈산 캐스케이드의 개시는 또 다른 활성산소의 공급원이 된다. 그 외에 정상적인 대사과정, 질병상태, 스트레스 그리고 흡연, 공해와 같은 환경인자도 활성 산소종의 공급원이 되고 있다. 이와 같이 생성된 활성 산소종들도 피부노화에 영향을 미친다. 그러나 이러한 활성산소의 공급원은 빛과 증감제에 영구적으로 노출될 때보다도 피부노화에는 기여가 적은 것으로 간주되고 있다.

III. 활성산소에 의한 피부세포 성분의 파괴와 조직 손상

1. 자외선에 의한 피부 항산화제의 파괴

자외선으로 유도된 피부 세포 및 조직 손상에 대한 free radical 설은 자외선의 피부 작용에 대한 단일화된 모델을 제공해 주며 주 포인트는 다음과 같다 : (1) Free radical(활성 산소종)은 피부에 대한 자외선의 작용으로 생성된다; (2) 피부에는 활성 산소종을 파괴하는 항산화 방어계가 있다. 그러나 이들 방어계는 자외선량이 많으면 압도당할 수 있다; (3) 결과적으로 단백질, 지질, DNA 와 같은 세포 성분들은 활성 산소종에 의한 손상을 받게 되어, 세포 기능이 변질되어 궁극적으로 피부노화가 촉진되고 병을 유발시키게 된다.

천연 태양광의 UV-A 및 UV-B 스펙트럼과 매우 흡사한 빛을 낼 수 있는 장치(solar simulator)를 이용하면, 2.0 J/cm^2 에서 25 J/cm^2 의 범위에 해당되는 빛을 조사할 수 있으며, *in vivo* 에서의 자외선의 효과를 측정할 수 있다. 이 때 25 J/cm^2 은 경도 북위 38°N 에서 가을의 천연 태양광에 4 시간에서 5 시간 노출시킨 양과 동일한 양으로, 이 양은 쥐에 대해서 10 MED(minimum erythmal dose)에 해당된다. 2.0 J/cm^2 에서 25 J/cm^2 의 범위 자외선 양은 사람들이 자연 환경에서 흔히 받는 양이다. 태양 자외선을 피부에 조사했을 때, 피부 항산화제인 α -토코페롤과 유비퀴놀의 파괴는 2.5 J/cm^2 (약 1 MED)의 낮은 수준에서

도 뚜렷이 나타났고, 높은 수준에서는 유비퀴놀은 거의 완전히 고갈되고 α -토코페롤은 50% 감소되었다. 따라서 피부 항산화 방어는 *in vivo* 에서 낮은 수준의 자외선으로도 손상을 받으며 높은 수준에서 몇 가지 항산화제들은 완전히 파괴되었다. 결국 산화적 손상을 억제하는 피부의 능력이 크게 감소되었다. 따라서, 이들 항산화제들의 파괴는 자외선으로 유도된 활성산소의 생성을 강력히 뒷받침해주고 있다. 결론적으로 자외선 조사는 피부 항산화제를 고갈시키는 활성산소 생성을 개시 시킴을 알 수 있다(Packer, 1994).

쥐에 비타민 E를 식이 보충하고 자외선 조사하면 비타민 E를 보충 시킨 군은 대조군에 비하여 자외선으로 유도된 지질-히드로과산화물(lipid hydroperoxide)의 생성이 크게 감소된다. 결론적으로 자외선은 피부에서 활성산소의 생성을 유도하며, 생성된 활성산소는 일차적으로 피부 항산화제를 파괴한다. 이어서 피부 항산화제의 고갈로 인한 방어시스템의 붕괴 후 계속된 산화적 스트레스는 피부 세포 성분들(예, 지질, 단백질, 핵산, 등)을 손상시킨다.

2. 세포 구성 성분의 산화

2-1. 지질 산화

피부노화의 주원인인 $^1\text{O}_2$ (또는 $\bullet\text{OH}$)은 피부 세포막의 지질 또는 세포 구성 성분들의 자동산화반응을 개시 시킨다. 지질 과산화반응은 불포화 지방산 결사슬의 이중결합 사이에 있는 반응성 메틸렌기로부터 알릴자리 수소 원자를 탈취할 만큼 충분히 큰 반응성을 갖는 초기의 활성 산소종($^1\text{O}_2, \bullet\text{OH}$)에 의해 개시될 수 있다. 개시종(지질 라디칼)의 형성에는 결합 재배열이 수반되며, 결합 재배열은 디엔-켄주게이트를 생성함으로써 안정화된다. 지질 라디칼은 이어서 산소와 반응하여 과산화 라디칼을 형성한다. 과산화 라디칼이 생성되면 전과반응이 계속 일어나며(자동산화반응), 이 반응에서 수소 주개(예, α -토코페롤, 플라보노이드)가 있으면 지질 히드로과산화물이 생성되고 라디칼 반응이 종결

된다. 이 반응의 사슬길이는 약 100 으로, 이는 지질 라디칼 하나가 약 100 개의 새로운 과산화 라디칼을 생성시킬 수 있다.

지질 과산화 라디칼은 지질 과산화반응을 증폭시킬 수 있고, 단백질과 반응하여 중요한 효소나 수용체 시스템의 기능을 손상시킬 수 있다.

2-2. 단백질 산화

단백질에 있어서 구성 성분인 아미노산 곁사슬들은 산화제 즉 활성 산소종의 공격을 받기 쉽다. 그러나 이들 중 몇 종류는 다른 것들보다도 더 변하기 쉽다. 산화적 스트레스는 티올을 산화시켜 이황화 결합을 증가 시키고, 단백질을 조각 내거나 비정상적으로 교차 결합시키기도 하며, 트립토판 잔기를 파괴시키기도 한다. 따라서, 활성산소에 의해 단백질의 아미노산 곁사슬에 변형이 일어나면 단백질 고유의 삼차원 구조에 변질이 초래된다. 단백질의 기능은 단백질의 삼차원적 구조에서 기인되는데 이 구조 변형은 바로 기능 손실과 연관된다.

또한 단백질은 과산화반응에서 생성되는 지질 라디칼 중간체들(예, $RO\bullet$, $ROO\bullet$)의 공격에 특히 예민하다. 이 라디칼들은 지질은 물론 히스티딘이나 프롤린과 같은 단백질에 있는 아미노산과 반응할 수 있다. 이러한 반응의 결과로 효소 활성의 손상, 수용체 단백질들의 손상, 혹은 단백질 분해 및 분열에 의한 세포막 및 세포 기능의 변질을 초래한다. 이런 현상들은 변하기 쉬운 단백질 성분의 본질과 공격하는 라디칼 종들의 성질에 좌우된다.

또한 지질 과산화반응 및 당류 산화반응의 분해 산물인, 말론디알데히드와 같은 알데히드나 카르보닐 유도체들도 단백질의 아미노 아실 곁사슬에 있는 아미노기와 상호 작용할 수 있으며, 이어서 그들의 전하나 성질을 변화 시킬 수 있다.

2-3. DNA 산화

DNA 손상으로는 DNA 염기의 산화, DNA 사슬의 절단과 비정상적인 교차결합 등이 있다. DNA 를 이루는 성분들(아데닌, 구아닌, 시토신, 티민, 디옥시리보오스, 인산) 중에서 염기들은 활성 산소종에 더욱 민감하며 첨가반응, 산화반응 혹은 절단반응을 통하여 수많은 유도체들을 생성시킨다. 특히 구아닌은 활성산소에 대하여 가장 반응성이 큰 것으로 알려져 있다. Kasai 등(1983)은 Fenton 타입 반응에 의한 $\bullet\text{OH}$ 발생계에서 최초로 deoxyguanosine 으로부터 8-OH-dG(8-hydroxydeoxyguanosine)가 높은 수율로 생성됨을 관찰하였고, 그 외에 불포화 지방산의 자동산화반응에 의해서도 8-OH-dG 가 생성됨을 알았다(Kasai et al., 1988). 그리고 흡연자의 혈중 8-OH-dG 수준은 비흡연자에 비해 상당히 증가된 수준을 유지하고, 이는 바로 흡연자들의 높은 암 발생 확률과도 일치한다고 보고되고 있다.

DNA 는 유전자의 본체로 DNA 손상은 피부암의 원인이 될 뿐만 아니라 면역 기능의 저하와 광노화등의 중요한 인자라고 생각되고 있다. 생체 내에서 손상된 DNA 는 DNA 수복효소에 의해 복구되나 나이와 더불어 또는 계속적인 산화적 스트레스하에서는 수복능력의 저하가 나타난다. 따라서 활성산소로 유도되는 DNA 손상 연구는 돌연변이, 발암 그리고 피부노화의 기전을 이해하는데도 매우 중요하다(Kasai et al., 1991).

3. 결합조직의 손상

활성 산소종이 결합조직을 손상시킬 수 있다고 처음 제안된 이후로, 많은 연구들은 활성 산소종(특히 $\bullet\text{OH}$)에 결합조직 기질들(콜라겐, 히아루론산, 엘라스틴, 단백질글리칸, 라미닌, 피브로넥틴 등)을 노출시키면 이들 기질들의 순차적인 절단이 야기됨을 보여 주었다. 여기서는 피부노화와 관련하여 가장 중요한 결합조직 성분을 대상으로 활성산소(특히, $^1\text{O}_2$)에 의한 결합조직 분해 효소인 MMPs(matrix metalloproteinases)의 유발과 결합조직 성분 중의 하나인 콜라겐과 히아루론산의 절단과 비정상적인 교차결합 등에 관해서

논하고자 한다.

3-1. 활성 산소종(주로 1O_2)에 의한 MMPs (Matrix metalloproteinase)의 유도

활성 산소종은 앞으로도 자외선으로부터 피부를 보호하는 제품 개발에 있어서 중요한 위치를 차지할 것으로 믿어지고 있다. 특히 광노화에 있어서 결합조직을 파괴시킬 수 있는 MMPs(matrix metalloproteinases)의 생성에 활성 산소종이 관여된다는 사실로 이에 대한 관심이 증폭되고 있다.

1O_2 발생계에 배양된 사람 섬유아 세포를 노출시키면, 농도-의존적으로 collagenase (MMP-1) mRNA 가 정류상태 수준으로 유발되고(Scharffetter-Kochanek et al., 1993), 3 mM 의 NDPO₂[3,3'-(1,4-naphthylidene)dipropionate]로 발생된 1O_2 에 노출시킨 후 콜라겐분해효소의 발현 증가를 보면, 20 ~ 30 J/cm²(약 10 MED) 수준으로 UV-A 를 조사했을 때 관찰되는 양과 같다. UV-A 에 의한 콜라겐분해효소의 유도에 있어서 1O_2 의 역할에 대한 간접적인 증거는 1O_2 증강제나 소광제를 이용한 연구로 알 수 있다. 따라서, 1O_2 의 수명을 증가시키는 증강제인 D₂O 를 넣은 배양액에서 항은 반응 시키면, NDPO₂ 또는 UV-A 조사에 노출시킨 후 collagenase-mRNA 정류상태 수준에 있어서 부가된 증가를 야기시킨다. 반면에, 1O_2 의 강력한 소광제인 NaN₃ 를 처리하면 NDPO₂ 또는 UV-A 조사에 섬유아 세포를 노출시켰을 때 콜라겐 분해효소-mRNA 의 유발이 거의 일어나지 않았다. 비슷한 결과가 단백질 수준에서도 관찰되었다(Wlaschek et al., 1995).

광노화에 있어서 1O_2 의 중요성은 만발성 피부 포르피린증(porphyrin cutanea tarda)으로 고통 받는 환자에 있어서 특별히 확고하다. 이들 환자들한테서 실질적으로 가속화된 광노화 현상을 볼 수 있으며, 자외선에 노출된 사람들과 비교할 때 이 환자들은 훨씬 빈번한 그리고 심각한 수포 형성을 나타낸다. 이 포르피린증에서는 광증감 작용을 하는 포르피린의 증가, 피부에서는 주로 uroporphyrin 의 증가가 보고되고 있다(Schaefer et al., 1991). 광증감제(Uroporphyrin I)와 광조사(320 ~ 460 nm)를 조합 시켜 처리하면 광조사만 단독으로

행한 대조군에 비하여 MMP 가 훨씬 강하게 유도된다. 이는 $^1\text{O}_2$ 의 역할이 중요함을 의미한다. $^1\text{O}_2$ 에 첨부해서, UV-A 조사 후에 일부 다른 활성 산소종(예, $\bullet\text{OH}$)도 MMP-1 합성 유발에 있어서 역할을 한다고 보고되고 있다(Wlaschek et al., 1995). 자외선 조사 후 철 킬레이트제들(desferrioxamine, DFO)을 처리했을 때는 자외선만 조사된 대조군에 비하여 MMP-1 mRNA 수준의 저하가 나타났다. 이는 Fenton 반응과 이에 포함된 전이금속 그리고 여기서 생성된 $\bullet\text{OH}$ 이 광노화에 있어서 중요함을 의미한다(Bisset et al., 1991).

항산화제 전략에 의한 광노화의 지연 현상은, 세포의 간질 성분에 관여하는 MMPs의 활성화에 있어서 자외선으로 발생된 활성산소가 중요한 역할을 한다는 강력한 증거를 제공하고 있다. 첨부해서, 자외선 조사에 의한 혹은 광으로 손상된 피부에 존재하는 염증 세포들에 의해서 생성된 활성 산소종들도 직·간접적으로 세포 외 간질 단백질들을 공격하여 파괴시킬 수 있다(Monboisse and Borel, 1992; Baker, 1994).

광노화의 결과인 주름 생성은 자외선에 의한 활성산소의 생성, 활성산소(특히, $^1\text{O}_2$)에 의한 MMPs의 유도에 의한 또는 활성산소에 의한 직접적인 결합조직 성분의 분해, 절단 및 비정상적인 교차결합의 결과로서 간주되고 있다(Park, 1997).

3-2. 콜라겐 사슬의 절단 및 비정상적인 교차결합

콜라겐은 약 20 종으로 이루어진 큰 단백질 가족을 구성하며, 세포의 간질에 위치하고, 중요한 기능으로는 기계적 전고성, 결합조직의 저항력과 기관의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화(유기체의 성장 혹은 상처 치유시)의 유도 등이 있다(van der Rest et al., 1990). 콜라겐은 분자 전체 혹은 부분적으로 삼중나선으로 접혀진 3개의 폴리펩티드 사슬을 함유하는 밧줄 모양을 이루고 있어, 엘라스틴과 함께 피부의 탄력을 유지시켜 주는 작용을 하고 있다. 또한 폴리펩티드는 콜라겐에 특이한 몇 가지 아미노산 잔기를 포함하는데 이들은 4-히드록시프롤린, 3-히드록시프롤린과 히드록시리신이며, 이들은 번역 후 반응에 의해 생성된다.

세포의 간질 분자들은 활성산소의 좋은 주 공격 목표가 되며, 주로 콜라겐이 활성산소와 단백질 가수분해효소 모두의 작용에 의해 분해된다. $O_2^{\cdot-}$ 을 콜라겐에 노출시키면 콜라겐이 분해된다. 이 반응 결과 4-히드록시프롤린 함유 펩티드가 방출되는데 이는 콜라겐 분자의 나선 부분에서 절단이 일어났음을 시사한다(Monboisse et al., 1988). $O_2^{\cdot-}$ 는 반응성이 매우 작기 때문에, 혈청 알부민과 같은 단백질이나 각종 효소 단백질들은 $O_2^{\cdot-}$ 에 의해 분해되지 않는다(Davies et al., 1987). 따라서, 다른 단백질들과는 달리, 콜라겐은 $O_2^{\cdot-}$ 에 대해 민감한 것으로 알려진 유일한 단백질이다.

콜라겐에 대한 $\bullet OH$ 의 작용은 산소가 존재할 때와 산소가 없을 때의 상황이 매우 다르다. 산소 존재하에서 $\bullet OH$ 은 4-히드록시프롤린 함유 펩티드를 방출시키며, 그 양은 감마선 조사량과 콜라겐의 농도와 더불어 직선적으로 증가한다(Momboisse, 1988). 이 결과는 $\bullet OH$ 에 의해 혈청 알부민이 분해되어 분해된 알부민 중에 프롤린 함량의 감소를 관찰한 결과와도 일치하였다. 따라서, 콜라겐의 $\bullet OH$ 에 의한 분해 과정은 다른 단백질에서의 분해 과정과 매우 흡사한 결과들을 주고 있다. 그러나, 산소가 없는 조건에서는, $\bullet OH$ 에 의해 4-히드록시프롤린 함유 펩티드의 방출을 관찰할 수 없었고 오히려 비정상적인 교차결합을 시사하는 dityrosine 잔기의 생성과 더불어 분자량이 큰 화합물이 형성됨이 관찰되었다. 이와 비슷하게 콜라겐의 비정상적인 교차결합은 활성 산소종 중의 하나인 HOCl에 의해서도 일어났다.

결론적으로 콜라겐은 활성산소의 좋은 공격 목표이다. 활성 산소종은 콜라겐의 절단과 비정상적인 교차결합을 유도 시킨다. 콜라겐의 절단과 비정상적인 교차결합은 자외선에 노출된 피부에서 일어난다. 콜라겐의 산화적 손상은 주름 생성을 수반하며, 이는 바로 피부노화를 반영한다.

3-3. 히아루론산 (Hyaluronic acid, HA)의 사슬절단

결합조직 성분으로서 히아루론산과 활성산소의 반응은 피부노화와 관련하여 현재 많

은 관심이 주목되고 있다.

히아루론산은 글루쿠론산과 글루코사민이 β -1 \rightarrow 3 결합과 β -1 \rightarrow 4 결합이 반복해서 연결된 분자량이 큰 다당류이다. 히아루론산의 pKa는 2.9 이고, 생리적인 pH에서 카복시기는 이온화 되어 있다. 히아루론산의 생물학적 역할 중의 하나는 세포들 사이의 공간에서 많은 양의 물을 포함할 수 있는 능력이다. 이로 인해 점탄성을 나타내며 충격을 흡수하는 역할을 가지고 있다. 히아루론산은 망상 구조 형태로 존재하며, 따라서, 다른 분자나 세포에 대하여 필터로서 혹은 고분자체와 같은 저항성을 제공한다. 히아루론산이 활성 산소종에 계속 노출되면 사슬 절단이 일어나서, 히아루론산의 분자량은 10,000 이하로 떨어지게 되고 이와 함께 점도도 떨어져 그 고유 성질인 점탄성을 잃게 된다. 피부의 탄력은 결합조직 성분들인 콜라겐, 엘라스틴과 함께 히아루론산의 점탄성이 크게 기여하고 있다. 따라서, 히아루론산 사슬의 절단은 피부 탄력 감소와 피부 수분 감소 그리고 피부노화를 가속화 시키게 된다.

히아루론산의 사슬 절단 과정은 글리코시드 결합의 절단을 포함한다. 활성산소에 의한 글리코시드 결합의 절단은 한가지 이상의 경로에 의해 진행된다. 이들 중 가장 가능성이 큰 경로는 $^1\text{O}_2$ 이나 $\bullet\text{OH}$ 에 의한 수소탈취반응 결과 생성된 탄소(1 위치)에 형성된 라디칼로부터 비롯되는 사슬 절단 반응이다.

또 한가지 중요한 경로로 생각되는 사슬 절단반응은 C(1)에 형성된 탄소 중심의 라디칼에 분자 산소가 반응하여 히아루론산 과산화 라디칼이 형성되고 히아루론산 과산화 라디칼로부터 O_2^{\bullet} 가 제거됨으로써 일어나는 사슬 절단 반응이다. 이 반응에서는 히아루론산 과산화 라디칼은 O_2^{\bullet} 를 제거하고 1번 탄소는 카르보양이온이 된다. 이 카르보 양이온에 물이 첨가반응(O_2^{\bullet} 의 제거와 물의 첨가)을 일으킨 후 분해된다.

이상과 같이 히아루론산의 사슬 절단반응은 $^1\text{O}_2$ 이나 $\bullet\text{OH}$ 에 의한 수소탈취반응으로 탄소 중심의 라디칼이 생성되면서 개시되고, 과산화 라디칼을 경유하는 자동산화반응을 포함하여 사슬 절단이 일어나고 있다. 개시반응에 참여하는 $^1\text{O}_2$ 은 자외선(특히 UVA)의 광증감 반응으로, $\bullet\text{OH}$ 은 Fenton 반응에 의해 생성되며 이는 앞에서 자세히 언급하였다.

결론적으로, 활성산소에 의한 히아루론산의 사슬절단은 피부노화에 깊이 관여됨으로 기능성 항노화 화장품 개발시에 고려되어야 할 분야로 생각된다.

IV. 활성산소와 멜라닌 생성

피부는 자외선의 영향을 가장 받기 쉬운 기관이다. 자외선의 영향으로 피부에는 활성산소가 생성되고 이들 활성 산소종은 피부 세포를 손상시킨다. 손상 받은 세포는 식세포가 그것을 포획하고 또한 활성산소를 발생시켜서 처리한다. 자외선을 받으면 멜라닌의 증식이 시작된다. 멜라닌은 자외선을 흡수하기 때문에, 세포는 자외선의 해로운 작용을 억제할 목적으로 멜라닌 생성을 증가 시킨다(자외선에 의해 생성된 활성산소도 이들 멜라닌이 중화 시켜 세포 손상을 막아준다). 멜라닌 색소는 표피의 기저층에 있는 멜라노사이트(melanocytes)라고 하는 색소세포에서 만들어진다. 자외선에 의해 피부의 노화가 진행된다면 멜라닌 증식이 항시적으로 되고 언제나 같은 장소에 기미가 나타나게 된다.

사람의 색소세포에서 생성되는 멜라닌은 eumelanin 과 pheomelanin 으로 대별된다. Eumelanin 의 생성과정은 다음과 같다. 티로시나제에 의해 티로신이 DOPA 를 거쳐 DOPAquinone 으로 산화되고 DOPAquinone 은 자발적으로 endocycle 고리를 형성하여 leucodopachrome 으로 된다. Leucodopachrome 은 DOPAquinone 과의 환원적 호환작용으로 산화되어 DOPA 와 DOPACHROME 으로 된다. DOPA 는 다시 티로시나제에 의해 산화되어 DOPAquinone 을 형성하고, DOPA/DOPAquinone 산하환원 회로가 멜라닌 생성의 산화적 구동장치로 작용한다. 이어서 DOPACHROME 은 CO₂ 이탈반응과 dopachrome tautomerase 에 의해 5,6-dihydroxyindol(DHI)과 5,6-dihydroxyindol carboxylic acid(DHICA)로 되며, 이들은 DOPAquinone 이하의 중간 대사물이 자동 산화반응, 광화학 반응, 혹은 tyrosinase, dopachrome tautomerase, DHICA-oxidase 등에 의해 중합되어 eumelanin 으로 된다. 자동산화는 금속이온 특히 철, 구리 등의 2가 이온에 의해 촉진된다. 한편 pheomelanin 은

DOPAquinone 에 시스테인 도파 등의 부가물을 경유하여 생성된다. 이상과 같이 색소 세포 내에서의 멜라닌 생성 과정은 핵심 효소인 티로시나제 등의 효소작용과 자동산화반응으로 이루어진다. 이러한 효소반응과 자동산화반응 또한 자외선에 의해 촉진되어진다.

종래의 미백제 개발은 주로 티로시나제 저해 활성에 관심을 두었으나, 현재는 티로시나제 저해 활성뿐만 아니라 자동산화반응의 억제도 크게 부각되고 있다. 티로시나제가 효소적 작용을 나타내는 동안 수퍼옥사이드($O_2^{\cdot-}$)가 생성됨이 확인되었다(Koga, et al., 1991). 이 $O_2^{\cdot-}$ 는 SOD 의 작용과 전이금속에 의한 Fenton 반응을 거쳐 $\bullet OH$ 로 될 수 있다. 이어서 $\bullet OH$ 은 자동산화반응을 개시 시켜 멜라닌 생성을 촉진시킬 수 있다. 티로시나제의 효소 작용에 서의 활성산소 생성 외에도, 자동산화반응 과정인 도파퀴논 이후의 루코도파크롬에서 도파크롬으로 가는 과정 즉, 카테콜에서 세미퀴논으로 산화되는 동안에 $O_2^{\cdot-}$ 와 H_2O_2 가 산화 산물로서 생성되고 이는 궁극적으로 미량 금속의 존재하에서 $\bullet OH$ 의 생성을 증가 시킨다(Korotowski, et al., 1987). 또한 도파퀴논 이후에서 분기되어 생성되는 페오멜라닌도 특히 광산화 받기 쉽고, 이는 사람에게 있어서 피부암 발생과 밀접한 관계가 있다. 시스테인일도파(cysteiny DOPA)와 디히드록시인돌(dihydroxyindol)과 같은 멜라닌 대사물이 자외선에 의해 광분해 되는 동안에 라디칼들이 생성된다. 특히 이 대사 산물들은 300 nm 이상의 파장에서 매우 불안정하여 분해되면서 수화된 전자, 히드록실 라디칼, 세미퀴논 라디칼 등의 형성을 나타낸다(Koch et al., 1987).

한편 피부의 과도한 자외선 노출은 진피에 염증 침윤을 일으키고, 활성산소 생성을 유발시킨다. 세포막으로부터 아라키돈산의 방출과 아라키돈산 캐스케이드(arachidonic acid cascade)의 개시도 염증 조건에서 또 다른 활성산소의 공급원이 된다. 염증과 아라키돈산 캐스케이드에서 생성된 프로스타글란딘인 PGE_2 와 활성산소는 모두 멜라닌 생성을 가속화시켜 기미·주근깨를 과도하게 생성시키는 결과를 가져온다.

따라서, 멜라닌 생성의 억제를 목적으로 하는 미백제 개발에는 자외선의 피부 침투를 막을 수 있는 피부에 안전한 자외선 흡수제를 선택할 필요가 있고, 티로시나제 활성의 저해뿐만 아니라 자동산화반응을 차단시키는데도 초점을 맞춰야 할 것으로 생각된다.

V. 활성산소와 염증 그리고 면역

염증은 손상된 조직 혹은 독성 물질에 의해 야기되는 반응으로서 전형적인 결과는 혈관의 확장과 증가된 투과성, 상해를 받은 부위로의 백혈구의 침윤, 그리고 세포 기능의 소실과 손상이다. 피부에 있어서의 염증은 국소적인 홍반과 팽윤에 의해 특징 지워진다.

병원성 박테리아, 바이러스, 곰팡이에 의한 피부 침투는 호중구와 매크로파지를 염증이 일어난 부위로 모이게 한다. 이들 세포들은 호흡급증을 통하여 염증부위에 활성 산소종을 방출시킨다. 또한 자외선에의 노출도 진피에 염증성 침윤을 일으키고 활성산소의 생성을 유발시켜서 계속된 손상을 야기시킨다. 염증 조건에서 세포막으로부터 아라키돈산의 방출과 아라키돈산 캐스케이드의 개시는 또 다른 활성산소의 공급원이 된다. 백혈구에 첨부해서, 상피세포, 내피세포 그리고 섬유아 세포 세포들도 염증과정에서 중요한 역할을 담당하고 있다.

염증 조건하에서 활성산소를 생성시키는 효소로는 백혈구에 있는 NADPH oxidase 와 myeloperoxidase, 그리고 내피세포의 xanthine oxidase 등이 있으며, 이 때 생성되는 활성 산소종으로는 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, $HOCl$, 1O_2 , $ROO\cdot$, $RO\cdot$ 등이 있다. 이들 활성 산소종들은 비만 세포나 혈소판을 자극시켜 히스타민등을 방출시켜 혈관투과성의 상승을 가져오거나, 단백질 분해 시켜서 생성된 펩티드 혹은 지질산화로 생성된 류코트리엔 B_4 와 같은 백혈구 유인물질을 만들거나 단백질분해효소 방출을 자극하여 변질된 단백질을 빠르게 분해시킨다.

한편 생체에 있어서 자외선 양의 증가로 최대의 영향을 받는다고 생각되는 피부는 대단히 중요한 면역 장기임이 분명해지고 있다. 자외선, 특히 UV-B폭로에 의해서는 피부 면역 기능 이 억제되는 것으로 알려져 있다.

생체의 면역반응 중에서 항원에 대한 항원-항체 반응이 과도 혹은 부적당한 형태로

일어나 조직 장애를 일으키는 경우가 있다. 이것은 일반적으로 알러지(과민증)라고 불리며 이들은 Coombs and Gell에 의한 분류법에서 기본적으로 I~IV형으로 분류된다. 그 중에서 I형 알러지는 즉시형 알러지라고 말하고 아토피성 질환 등을 일으킨다. 근년에 화분이나 음식물에 의한 알러지가 주목되고 있다. 또 IV형 알러지는 과민형 반응으로 불리는데, 여기서는 접촉성 과민반응(contact hypersensitivity)이 주목되고 있다. 이것은 자외선 폭로에 의해 억제되고, 자외선에 의한 발암성이 가세하여 종양면역 개시를 통해 발암을 증가, 또는 감염증 등을 일으키는 원인 중의 하나로 간주된다. 이들 질환에 대한 치료법으로는, 현재 I형 알러지는 면역 기능의 Down regulation(면역 억제)작용, 광면역 억제에는 Up-regulation(면역 부활)작용을 갖는 물질의 투여가 검토되고 있다

특히 피부를 구성하는 세포 중에서 란겔한스 세포, Thy-1+ 수상표피세포, 각질세포나 진피 중의 혈관 내피세포, 비만세포, 마크로파지 등의 세포는 특히 복잡한 망상체계를 형성하여 면역 메카니즘을 구축하고 있으며 이들은 SALT(Skin associated lymphoid tissue)라고 불리운다. 자외선이 SALT에 미치는 영향, 즉, 면역기능의 억제 메카니즘에는 2가지가 있다. 하나는 저선량의 UV-B 조사에 의해 유도되는 국소성 면역억제이고 다른 하나는 고선량의 UV-B 조사에 의해 유도되는 전신성 면역억제로 대별된다(Fukuyasu, et al., 1995).

VI. 피부노화 방지에 있어서 천연물의 역할

1. 자외선 흡수제로서의 역할

최근에 오존 구멍이 확대됨에 따라 자외선에 의한 염증, 피부암, 활성산소에 의한 장해, 면역 억제 등의 피부 상해가 크게 주목되고 있다.

태양 자외선은 290 ~ 320nm 를 UV-B, 320 ~ 400nm 를 UV-A 라고 칭한다. UV-B 는 피부에 염증을 일으키고 피부암과 관련이 있다. UV-B 의 작용은 주로 피부의 표피에 제한되어 있다. UV-A 는 멜라닌을 생성시키고 흑화를 촉진할 뿐만 아니라 진피까지 침투하여 활성산소에 의한 각종 세포들의 산화적 손상을 야기시킨다. 최근에는 UV-A 의 차단이 피부노화 방지에 매우 중요한 것으로 인식되고 있다. 따라서 UV-A 및 UV-B 는 피부노화(주름, 탄력감소, 기미·주근깨)에 있어서 직접적인 혹은 간접적인 원인을 제공하는 것으로 알려져 있다.

최근 화장품의 자외선 흡수제로는 UV-A 및 UV-B 영역 모두를 흡수하는 물질이 이용되기 시작하였다. 많은 종류의 천연 추출물이 자외선 흡수제로서, 세포의 산화적 손상을 막아주는 활성산소 소거제 및 항산화제로서 매우 큰 관심을 일으키고 있다.

천연 추출물이 화장품에 사용되는 자외선 흡수제로서 갖추어야 할 중요한 요건은 (1) 독성이 없고 피부 장해를 일으키지 않는 안전성이 높아야 한다. (2) 자외선 흡수 능력이 크고 또한 광범위한 태양 자외선 영역을 포함해야 한다. (3) 자외선이나 열에 의해 분해로 피부에 해를 주지 않아야 한다. (4) 화장품 원료들과 상용성이 좋아야 한다 등이 있다.

천연물 중에서 자외선 흡수제로서 작용을 나타낼 수 있는 것들로는 caffeic acid 유도체들, 플라보노이드류, 알칼로이드류 등을 들 수 있다. 현재 화장품에 일부 이용되고 있는 쌀눈에서 추출한 ferulic acid 의 유도체인 γ -oryzanol 은 극대 흡수 파장이 295nm 와 330nm 로 광범위한 파장의 자외선을 흡수한다. 플라보노이드 중에서 플라보놀 부류에 속하는 galangin, quercetin, rutin, kaempferol, 3-hydroxyflavone, kuwanon, mulberrin 등과 플라본 부류에 속하는 baicalin, baicalein, apigenin, 그리고 알칼로이드인 berberine 등은 UV-A 영역을 흡수하는 자외선 흡수제로서 거론되고 있다. UV-B 영역을 흡수하는 천연물은 식물 성분 중에 많이 있으나 그 중에서 우리가 흔히 접할 수 있는 것으로는 차의 성분인 카테킨류, 즉 (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin 그리고 naringenin, hesperitin 등이 있다.

화장품에 자외선 흡수제로서 및 항산화제로서 사용될 수 있는 천연물로는 상백피 추출물, 녹차 추출물, 황금추출물, 황백추출물, 은행잎 추출물 등 그 종류가 다양하다.

현재까지는 자외선 방어법으로 선스크린제에 의존한 높은 SPF 치가 기대되는 합성 자외선 흡수제나 자외선 산란제가 많이 이용되어 왔다. 그렇지만 자외선의 피부에 대한 생물학적 영향을 고려할 때 자외선 흡수 기능과 더불어 그 기능을 보조할 수 있는 항산화제나 라디칼 소거제 등은 또한 중요한 자외선 방어물질이 된다. 이 두 가지 기능을 가지는 천연의 식물 성분들을 앞으로는 기능성 화장품 개발에 참고가 되어야 할 것으로 생각된다.

2. 항산화제로서의 역할

2-1. 항산화제의 정의 및 작용 메커니즘

항산화제란 기질의 양과 비교하여 적은 양으로 존재하면서 기질의 산화를 지연시키거나 억제할 수 있는 물질로 정의 된다. 항산화제의 작용기전은 몇 가지의 형태로 일어날 수 있다(Halliwell and Gutteridge, 1989). (1) 개시작용을 하는 라디칼을 소거함으로써 연쇄반응의 개시를 억제한다. (2) 촉매작용을 하는 전이금속과 결합함으로써 라디칼 생성의 개시반응을 억제한다. (3) 개시작용을 하는 라디칼로 전환될 수 없도록 과산화물을 분해한다. (4) 활성을 가진 라디칼에 의한 계속된 수소탈취를 할 수 없도록 연쇄반응을 차단시킨다.

생체 조직 혹은 피부에 있어서 항산화제의 보호작용은 세단계 수준으로 구성되어 있다. 첫번째 방어 단계는 주로 효소반응이며 이들 효소로는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등이 있다. 이들 효소반응 활성은 미량의 무기물에 의존한다(예, Mn, Cu, Zn 및 Se). 두번째 단계는 두 종류의 비타민 E 와 C, 플라보노이드, 카로티노이드 등을 포함하며, 이 단계는 1 차 라디칼에 의해 개시되고 유도되는 지질 과산화반응과 같은 연쇄반응에 있어서 2 차 라디칼의 급증을 억제하는데 관여하고 있다. 세번째 단계는 연쇄반응이 종결되어 생성된 유도체(예, 과산화물)로부터의 2 차 라디칼의 생성을 효소적으로 억제하는 것이다. 또한, 세번째 단계는 전이금속으로 촉매되는 반응이 계속된 산화적 손상을 일으키는 환경으로부터 금속이온의 제거(킬레이트 작용)를 포함한다.

전반적으로 볼 때 피부 보호작용은 어떤 특정한 무기물이나 비효소적 항산화제를 섭취하거나 또는 화장품에서 첨가하여 도포 함으로써 이루어질 수 있다. 항산화 작용을

갖는 이 기본 물질들을 제대로 공급하지 못하면 효율적으로 노화를 예방할 수 없다. 특히 피부는 각종의 항산화제들로 구성된 항산화 방어망을 구축하고 있기 때문에, 항노화 관련 화장품 제조사는 이 방어망이 보다 완벽한 기능을 수행할 수 있도록 제품 처방에 최대한 심혈을 기울이는 것이 바람직하다.

2-2. 식물유래의 항산화제들

식물에는 다양한 활성 산소종을 제거할 수 있는 항산화 성분들이 다량 함유되어 있다. 식물종자에는 비타민 E 인 토코페롤류가 많이 함유되어 있다. 반면에 과일이나 녹색 야채에는 비타민 C 인 아스코르브산이 많이 들어 있다. 비타민 E와 비타민 C 외에도 식물유래의 천연물에는 화장품의 원료로서 특히 중요한 플라보노이드, 유비퀴놀, 카로티노이드 등이 있다. 이들은 생체 조직 중에서 활성산소를 제거하는데 독립적으로 작용하기도 하지만, 대부분은 항산화제로서의 역할을 나타내는데 있어서 서로 상호 작용함으로써 그 효율을 극대화 시킨다. 예를 들면, 플라보노이드, 카로티노이드, 유비퀴놀 및 비타민 C는 생체 내에서 α -토코페롤이 항산화 작용을 한 후 생성된 α -토코페롤 라디칼을 α -토코페롤로 재생시켜준다. 이같은 작용으로 α -토코페롤의 기능은 배가되어 상승효과를 나타내게 된다.

여기서는 이들 항산화제들의 역할에 대해서 간단히 알아보려고 한다.

2-2-1. 비타민 E (α -Tocopherol)

비타민 E(α -토코페롤)는 세포 항산화계의 가장 중요한 성분으로서, 생화학적 항산화제로서, 자외선에 대한 광선 차단제로서, 물리화학적 안정화제로서 작용함으로써 빛으로 유도된 손상으로부터 피부를 보호한다.

비타민 E에 의한 피부조직의 광보호 작용으로는 다음과 같은 연구 결과들이 많이 나와 있다. (1) 지질 과산화반응을 억제하고 막유동성과 투과성을 안정화시키는 비타민 E의 역할은 피부조직에서 적혈구의 광용혈을 억제한다. (2) 비타민 E는 태양광선 중 UV-B 영역(290 ~ 320nm)을 강하게 흡수한다. 따라서 피부조직에서 흥반생성에 대한 광보호적 광선 차단제로서 역할을 한다. (3) 피부가 자외선에 장기간 노출되면 피부의 조로화 현상이 나타나는데 비타민 E를 사용하면 광노화와 관련된 주름이나 피부 늘어짐을 감소시킬 수 있다. 비타민 E가 결핍되면 지질과산화반응이 촉진되고 피부 조직 중에서 콜

라겐의 사슬절단이나 비정상적인 교차결합이 가속화된다. (4) 비타민 E는 자외선에 의한 피부 광발암을 억제 시키거나 피부에서의 종양 생성을 감소 시킨다. 특히 자외선에 의한 DNA의 티미딘 이합체 생성이나 멜라노마 세포의 성장을 저해한다(Fryer, 1993).

비타민 E의 활성을 나타내는 토코페롤은 8개의 광학 이성질체가 존재한다. 천연 α -토코페롤은 2R, 4'R, 8'R- α -tocopherol이다. 8종의 광학 이성질체의 쥐에 대한 흡수작용과 유기체 내에서의 비타민 E 활성의 평가에서 생물학적 활성이 가장 큰 것은 천연의 R,R,R- α -tocopherol이라고 알려져 있다. 이 α -tocopherol을 가장 효율적으로 결합시켜 운반시키는 토코페롤 운반 단백질이 간세포에서 확인되었다(Traber, 1997).

α -토코페롤은 지질과산화 라디칼의 반응을 억제할 때, 맨 처음 생성되는 산화물은 α -tocopheroxyl radical이며 이 라디칼은 수소를 받아들임으로써 α -토코페롤로 재생될 수 있다. 이 반응은 완전히 가역적이다. 계속적인 산화가 일어나면 이 라디칼은 α -tocopheryl quinone(α -TQ)으로 되며 α -TQ의 형성 반응은 비가역적이다. 이같은 이론은 α -토코페롤의 운명을 고찰하는데 있어서 매우 중요하다. 생체 내에는 α -TQ로의 비가역적인 반응이 일어나지 않도록 α -토코페롤 라디칼로부터 α -토코페롤을 재생산하는 정교한 메카니즘이 알려져 있다. 비타민 C, 일부의 플라보노이드와 카로티노이드가 α -토코페롤의 재생 메카니즘에 관여하고 있다.

α -토코페롤은 지용성이 높기 때문에 지질 과산화반응의 현상이라고 할 수 있는 세포막 또는 세포 소기관의 막에 분포되어 있는 것이 특징이다. 막에 분포한 비타민 E는 국부적으로 생긴 활성산소에 의한 지질 과산화반응의 연쇄반응을 효율적으로 차단시킨다. 특히 피부에서 자외선에의 노출로 생성된 반응성이 큰 $^1\text{O}_2$ 을 효율적으로 제거할 수 있다. α -토코페롤은 자신은 변하지 않고 $^1\text{O}_2$ 을 불활성화 시킬 수 있다($k_q=1.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). 생체막 중에서는 한 분자의 α -토코페롤이 적어도 200개의 $^1\text{O}_2$ 을 불활성화 시킬 수 있다. 뿐만 아니라 α -토코페롤은 $^1\text{O}_2$ 과의 화학반응으로 소거할 수 있다($k_r=3.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)(Clough et al., 1979). 또한 리놀산 메틸을 기질로 이용할 경우 α -토코페롤의 과산화 라디칼 소거능은 $k_{inh}=1.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 로 산출되었다고 보고되고 있다(Niki et al., 1984).

2-2-2.. 비타민 C (Ascorbic acid)

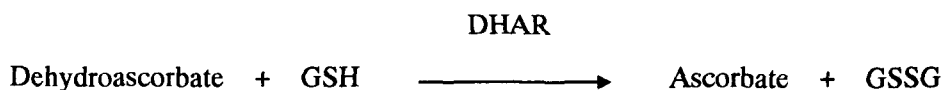
사람을 비롯한 영장류에는 글루코오스로부터 비타민 C (아스코르브산)를 합성하는 능력이 없다. 그러므로 비타민을 보충하기 위해서는 식이 등을 통한 외부의 공급에 의존

해야 한다.

아스코르브산의 역할로는 (1) 괴혈병의 예방(Ghorbani and Eichler, 1994), (2) 콜라겐, 카르니틴 그리고 노르에피네프린의 합성에 있어서 히드록실화 반응의 촉진(Sauberlich, 1994), (3) 펩티드 호르몬의 아미드화 반응(Glembotski, 1984), (4) 비타민 E 의 재생(Chan, 1993), 그리고 (5) 광산화적 손상에 대한 보호작용, (6) 활성산소 소거작용을 포함하여 매우 다양한 역할을 하고 있다(Bode, 1997). 비타민 C 는 혈장 수준과 비교해서 다양한 조직에서 높은 농도로 발견되는 매우 좋은 항산화제이다. 비타민 C 는 많은 생리 화학적 반응에 포함되고 있으며 다음에 dehydroascorbic acid 로 알려진 화합물로 산화된다.

피부에 탄력을 주는 성숙한 콜라겐의 형성은 단백질내의 프롤린이 히드록실프롤린으로의 전환을 수반하며, 이 반응은 프롤릴기 히드록실화 효소로 촉진된다. 이 효소에는 2 가 철 이온이 들어있는데 반응과 더불어 3 가 철 이온으로 되면서 불활성화 된다. 아스코르브산(비타민 C)이 불활성화된 효소의 제 2 가 철 이온을 환원함으로써 효소를 재생시킨다. 콜라겐내의 히드록시프롤린은 중간 가닥 사이에 수소결합을 형성함으로써 콜라겐의 삼중나선을 안정화한다. 불충분하게 히드록실화된 콜라겐으로 형성된 비정상적인 섬유는 괴혈병에서 보듯이 피부의 상해와 혈관의 허약성의 원인이 된다. 따라서 비타민 C 는 피부조직에 있어서 없어서는 안될 매우 중요한 존재이다.

비타민 C 가 항산화 작용을 할 때 전자 하나를 내주면 semidehydroascorbate radical 이 되고 계속된 산화반응으로 dehydroascorbate 가 된다. Dehydroascorbate 는 불안정하여 복잡한 반응을 거쳐 옥살산과 트레온산으로 분해된다. 그러나 사람에 있어서는 dehydroascorbate 가 ascorbate 로 전환되는 효율적인 재생 메카니즘이 있으며, 아래와 같은 글루타치온-의존성 dehydroascorbate reductase(DHAR)가 제안되고 있다. 이러한 재순환 과정에서 기능 이상이 생기면 세포와 조직이 계속적으로 낮은 수준의 ascorbic acid 와 상승된 수준의 dehydroascorbic acid 에 노출되어 있어서, 결과적으로 산화적 손상에 대해 세포 및 조직의 민감성이 증가한다는 것이다.



생체내에서 비타민 C 가 활성산소로 유도된 분자들을 용이하게 제거할 수 있다는 많은 메카니즘이 있다. 이 메카니즘에는 •OH, 만성 염증반응에서 중요한 HOCl 의 제거를 포함하며, 또한 비타민 C 가 자외선(특히 UV-A)과 피부 광증감제에 의해 생성되는 피부 노화의 원인이 되는 반응성이 매우 큰 ¹O₂ 의 효율적인 소거제라는 것은 잘 알려져 있다.

생체 내에서 비타민 C는 α -TQ의 비가역적인 형성을 막기 위하여 수소 주계로서 작용하여 비타민 E 라디칼로부터 비타민 E를 재생시키는데도 매우 중요한 역할을 하고 있다.

2-2-2. 카로티노이드 (Carotenoids)

동식물에 널리 분포되어 있는 카로티노이드는 황색, 등색, 적자색을 나타내는 일종의 색소로서 긴사슬의 polyene 구조를 갖는 탄소 수 대략 40여 개의 테르펜류이다. 사람에게 있어서 카로티노이드의 기능으로는 비타민 A의 전구체로서 이미 언급되어 왔고, 그 후로 자외선 및 화학 발암제에 의한 종양 발생에 있어서 항종양 작용, 동맥경화증의 발병 저해 작용 등 활성산소 장애를 방어하는데 효율적인 것으로 알려지고 있다. 현재 자연에서 확인된 카로티노이드는 600여종 이상이라고 보고되고 있다(Krinsky, 1991; Gey et al., 1987).

무엇보다도 생체에 있어서 카로티노이드의 가장 중요한 기능은 활성산소의 생성 억제 및 생성된 활성산소의 소거작용이라고 생각된다. 특히 사람에게 있어서 카로티노이드의 역할은 피부노화(광노화)의 억제에 있어서 매우 중요하다.

피부에는 포르피린이나 리보플라빈과 같은 광증감제가 존재하며 첨부해서 화장품이나 약물 등의 많은 종류의 외부 광증감제에 노출되어 있다. 피부가 태양 자외선(특히, UV-A)에 노출되면 피부에서는 광증감 반응이 일어나서 1O_2 을 비롯한 각종 활성 산소종($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) 및 라디칼들이 생성된다. $O_2^{\cdot-}$ 과 H_2O_2 은 전이금속 존재하에서 Fenton 반응을 거쳐 $\bullet OH$ 을 생성시킨다. 1O_2 은 $\bullet OH$ 과 더불어 반응성이 가장 큰 것으로 알려져 있다. 이들 두가지 활성산소는 반응성이 매우 크고, 또한 생체 내에는 이들을 제거할 수 있는 효소가 존재하지 않기 때문에, 산화적 스트레스에 의한 비효소적 항산화제들이 고갈된 상태하에서는 피부 세포 및 조직은 매우 큰 상해를 입게 된다. 특히 광증감 반응으로 피부에서 주로 생성되는 1O_2 은 세포막의 인지질을 산화시키는 자동 산화 반응을 개시시키고, 단백질, 핵산 등의 생체 구성 성분들을 직접 산화시킬 뿐만 아니라, 최근의 연구들에 의하면 진피의 탄력 콜라겐과 다른 결합조직 성분들을 분해시키는 각종의 MMPs (matrix metallo-proteinases)-mRNA를 유발시킨다고 보고되고 있어, 피부노화에 있어서 1O_2 의 중요성이 더 한층 부각되고 있다.

카로티노이드는 매우 효율적인 1O_2 소광제이다. 즉 카로티노이드는 보통 화학적인 반응 없이 들뜬 상태의 1O_2 에너지를 자신이 받아 열에너지로 분산시키면서 1O_2 을 바닥상

태의 산소로 만든다. 또한 카로티노이드는 빛을 받아 들뜬 상태가 된 광증감제를 바닥 상태로 바꿔줌으로써 $^1\text{O}_2$ 의 생성을 억제하는 작용도 있다.

카로티노이드의 $^1\text{O}_2$ 처리 능력은 컨주게이트된 이중결합의 갯수에 비례한다. 베타-카로틴을 비롯한 11개 또는 그 이상의 이중결합을 갖는 카로티노이드의 소광 속도상수 (quenching rate constant, k_q)는 $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 범위를 나타내며 이중결합 갯수가 5개인 retinol 및 retinoic acid는 $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 의 수준임이 알려져 있다(Park, 1984; Lee et al., 1987; Foote et al., 1970). 그 효율성은 카로티노이드 한 분자당 대략 1000개의 $^1\text{O}_2$ 을 제거하는 데서 나타난다. 광증감제를 이용하여 $^1\text{O}_2$ 을 발생시키고 이 $^1\text{O}_2$ 으로 적혈구 광용혈 실험을 하면서 각종 카로티노이드를 첨가할 때 카로티노이드는 $\sim 10^{-7} \text{ M}$ 의 극히 낮은 농도에서 세포막을 효과적으로 보호함을 알 수 있다(Park, 1984).

최근 Krinsky는 β -카로틴과 α -토코페롤 사이의 협동적인 상호작용이 있다고 보고했다. 즉, β -카로틴이 α -토코페롤 라디칼로부터 α -토코페롤을 재생시킬 수 있다고 제안하였다.

2-2-3. 유비퀴놀/퀴논 (Ubiquinol/quinone, Coenzyme Q)

유비퀴논(2,3-dimethoxy-5-methyl-6-multiprenyl-1,4-benzoquinone), 혹은, coenzyme Q는 지질 용해성 화합물로 산화-환원 활성을 갖는 퀴논이드 핵과 소수성 결사슬인 많은 수의 불포화 트랜스-이소프레노이드 단위로 구성되어 있다. 유비퀴놀(ubiquinol)은 유비퀴논의 환원 산물이다. 사람에게 있어서 유비퀴논-10 (10개의 이소프레노이드를 함유)이 지배적으로 많다. 생체 내에서 유비퀴논의 주요한 기능은 막 횡단 전자 전달계의 산화-환원 성분으로서의 작용이다(Frei et al., 1990). 즉, 미토콘드리아 호흡사슬에 있어서 유비퀴논은 두 가지 기능을 수행한다. (1) 유비퀴논은 미토콘드리아의 서로 다른 전자 전달 사슬에 있는 효소들 사이에서 그들 사이의 환원 당량을 분배 시키는 매개체로서 작용한다. (2) 유비퀴놀↔유비퀴논 전환은 양성자의 방출 및 결합과 짝지어져 있고 따라서 짝지어진 막을 통한 양성자의 전달에 참여한다.

미토콘드리아에 있는 호흡 사슬의 전자 전달 반응에 있어서 그들의 역할 외에, 최근 유비퀴놀은 라디칼 소거제이자 지질 과산화반응의 저해체로서 세포막의 산화적 손상을 막아주는 항산화 작용때문에, 생화학적 또는 임상적으로 많은 관심이 모아지고 있다. 특히 유비퀴논/퀴논은 호흡사슬에 있는 시토크롬 성분의 양에 비해 화학 양론적으로 수배나 더 많이 존재하며, 미토콘드리아 뿐만 아니라 다른 생체막(전자-전달 사슬이 없는)에

도 널리 분포되어 있는 특징이 있다. 또한 α -토코페롤과는 달리, 유비퀴놀은 살아있는 모든 세포들의 막에 있어서 내재성 성분이다, 예를 들면 호기성 미생물은 그들의 막에 α -토코페롤은 없으나 유비퀴놀과 유비퀴논은 가지고 있다. 그렇지만, 이들 생물들은 대기 산소압 하에서 살아 남아 있으며 그리고 산화적 스트레스에 성공적으로 대항하고 있다. 따라서 유비퀴놀은 진화에 있어서 첫번째 지용성-항산화제이고 그리고 생물체에서 항산화 방어를 위해서 절대적으로 중요한 것으로 간주되고 있다.

유비퀴놀의 실질적인 유익한 효과는 그의 산화-환원 회로에 기인될 수 있는 항산화제로서의 작용이다. 유비퀴논은 유기체에서 몇 가지 효소들에 의해 환원 상태인 유비퀴놀로 전환된다. 유비퀴놀은 미토콘드리아 내막에서 라디칼 또는 활성 산소종을 제거 시키는데 있어서 최소한 α -토코페롤과 비슷한 항산화 효율을 가지며, 유비퀴놀과 유비퀴논을 합친 농도는 α -토코페롤보다 10 배는 더 많기 때문에, 항산화 작용에 있어서 실질적으로 α -토코페롤 보다도 더 큰 역할이 기대되고 있다. 또한 유비퀴놀은 세포막에서 α -토코페롤 라디칼을 α -토코페롤로 재생시키는 작용이 있다고 보고되고 있다. 예를 들면, 25 J/cm^2 의 유사-태양자외선을 hairless mouse의 피부에 조사하고 피부 중의 항산화제의 수준을 측정한 실험 결과를 보면, 유비퀴놀은 거의 완전히 고갈되고, α -토코페롤은 광조사 전 수준에서 50% 정도 고갈되었다. 유비퀴놀이 α -토코페롤보다도 빠르게 고갈된다는 것은 주목할만하다. 이것은 유비퀴놀을 소비한 대가로 토코페롤이 재생됨을 시사한다. 이것은 또한 유비퀴놀이 직접 항산화제로 작용하고 지용성 항산화제 중에서 방어에의 최전선에 위치함을 시사한다.

따라서 피부노화를 억제하는데 있어서 유비퀴놀은 α -토코페롤보다도 더 중요한 항산화제일 가능성이 시사되고 있다(Packer, 1994).

2-2-4. 플라보노이드 (Flavonoids)

플라보노이드는 benz- γ -pyrone의 구조를 갖는 페놀성 화합물로서 식물계에 널리 분포되어 있다. 서양 사람들의 1일 플라보노이드 섭취량은 평균 1g 이상인 것으로 조사되었다. 현재 3000종 이상의 플라보노이드 구조가 결정되었으며 이론적으로는 자연에 2000만종 이상이 된다는 계산이 나왔다. 항산화제로서 플라보노이드는 다른 항산화제와는 달리 매우 용통성이 크다. 비타민 E는 지용성 항산화제로 주로 세포막에서 그 작용을 나타내고, 비타민 C는 수용성 항산화제로 수용성 부분, 특히 세포질에서 그 기능을

나타낸다. 반면에 플라보노이드는 그 종류가 다양함으로 지용성인 것, 수용성인 것 그리고 그 중간 정도의 극성을 갖는 구조를 가질 수 있다. 따라서 플라보노이드를 적절히 조합하면 기존에 알려진 항산화제들의 복합 기능을 대신할 수도 있는 가능성을 가지고 있다.

플라보노이드의 항산화 작용은 여러 단계에서 이루어질 수 있다. 첫째, 플라보노이드는 직접 활성 산소종과 반응하여 이들을 제거함으로써 활성산소에 의한 조직 손상을 막아줄 수 있다. 플라보노이드가 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , 1O_2 및 $\bullet OH$ 등의 활성산소와 반응한다는 연구보고는 많이 나와있다. 특히 광노화의 원인인 1O_2 도 소광시킬 수 있으며 그 소광 속도상수는 퀘세틴(Quercetin)의 경우 $2.5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 인 것으로 보고되고 있다. 여러 플라보노이드에 있어서 1O_2 소광 속도상수는 $0.5 \times 10^6 \sim 5.8 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 범위로 보고되고 있다 (Briviba et al., 1994). 또한 피부에서 암반응을 추진 시키는 $\bullet OH$ 의 제거 능력에 대해서도 여러 종류의 플라보노이드를 대상으로 구조와 활성관계가 조사되었다(Husain et al., 1987; Bors et al., 1993). 플라보노이드는 B 고리의 카테콜 구조, 4 위치의 카르보닐기와 콘주게이트된 2,3-이중결합, 이와 함께 3,5-위치의 -OH 기로 최대의 라디칼 소거와 라디칼 흡수 능력을 갖는 구조를 만들 수 있다. 둘째로, 플라보노이드는 전이금속과 결합함으로써 전이금속으로 촉매되는 Fenton 반응에 의한 $\bullet OH$ 의 생성을 억제한다. 반응성이 큰 $\bullet OH$ 의 생체내 생성은 주로 이 반응에 의하여 생성되는 것으로 믿어지고 있다. 플라보노이드의 이러한 킬레이트 작용은 과도한 산화적 스트레스(특히, 류마티스 관절염, 심근경색, 당뇨병 그리고 암 등의 성인병과 과도한 자외선에 노출된 피부에서)를 감소시키는데 결정적으로 중요함을 알 수 있다. 셋째, 플라보노이드는 1O_2 과 $\bullet OH$ 로 개시된 세포막의 자동산화반응에서 라디칼 반응을 전파 시키는 과산화 라디칼에 수소원자 주개로 작용하여 지질의 연쇄반응을 종결 짓는 작용을 나타낸다. 넷째, 플라보노이드는 활성산소를 생성시키는 생체내 산화효소의 작용을 저해 시킴으로써 활성산소의 생성을 막아주는 작용이 있다. 플라보노이드에 의해 저해되는 산화효소로는 NADPH oxidase, lipoxygenase, cyclooxygenase, myeloperoxidase, xanthine oxidase 등이 있고 이 효소들은 질병상태나 과도한 자외선 노출시 활성화되어 활성산소의 급증을 초래하고 이들 과잉의 활성산소로 생체 세포들은 계속된 산화적 스트레스를 받게 된다(Park et al., 1990a, 1990b, 1990c; Boo et al., 1993).

이와같이 플라보노이드는 여러 단계의 산화과정에서 항산화 기능을 나타내고 있고 실제로 그 항산화 능력은 기존에 알려진 비타민 E나 C보다도 훨씬 큰 것들이 많이 보고되고 있다. 따라서 플라보노이드의 종류가 많고 그 기능도 다양함으로 앞으로 충분히

연구 해볼만한 대상이며 이런 연구 결과들의 축적은 바로 성인병과 피부노화를 억제하는데 큰 기여를 할 것으로 믿어진다.

최근에 기능성 화장품 개발전략으로 바뀌는 세계적 추세에 발 맞춰, 미백 및 항주름을 비롯한 다양한 기능성 제품을 개발하고자 할 때는 반듯이 활성산소와 항산화제 방어망의 개념을 도입하고 이에 맞는 적절한 원료 선정이 이루어져야 한다고 생각된다. 특히 이러한 다양한 욕구를 채울 수 있는 천연물 중의 한가지가 플라보노이드일 가능성은 매우 높다고 사료된다. 최근에 천연물을 이용한 다양한 제품 개발에 있어서 각각의 효능효과를 나타내는 주성분들은 바로 천연물 추출물 중에 있는 플라보노이드임을 알 수 있다.

3. 주름 개선제로서의 역할 (결합조직 손상의 항산화적 예방과 치료)

활성 산소종은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 작용하고 있다. 활성 산소종은 정상적인 대사과정에서도 생성되며, 질병상태나 스트레스를 받을 때는 과잉으로 생성된다. 특히 피부는 자외선(주로 UV-A)에 노출되어 있어 활성 산소종을 만드는 광화학적 반응들이 계속해서 일어나고 있다. 또한 흡연, 공해 및 세균 감염 등도 활성 산소종을 생성시킨다.

피부 세포 및 조직 손상을 주도하는 것은 활성 산소종 중에서 반응성이 가장 큰 1O_2 과 $\bullet OH$ 이다. 이들은 항산화 효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 항산화 방어망을 파괴함으로써 산화제/항산화제 균형을 산화상태 쪽으로 기울게 한다. 결과적으로 계속된 산화적 스트레스는 피부의 주요 성분인 지질, 단백질, DNA, 탄수화물 등을 산화시켜 변질을 초래한다. 또한 활성 산소종들은 직접적으로 혹은 단백질분해효소(MMPs)를 유발시켜서(특히 1O_2), 피부결합조직의 주요 성분들인 콜라겐, 엘라스틴, 단백질글리칸, 히아루론산, 피브로넥틴 등을 파괴시켜 기능 소실을 초래한다. 다시 말하면, 탄력 및 장력을 나타내는 섬유인 엘라스틴과 콜라겐의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합, 히아루론산 사슬의 절단 등 피부 구성 성분들의 손상을 야기시킨다. 결국에는 탄력감소, 주름살로 특징 지워지는 피부노화가 가속화된다.

따라서 자외선 및 활성산소에 의한 결합조직 손상을 예방하고, 피부세포를 보호하기 위해 서는 생체 내뿐만 아니라 피부에서 활성 산소종의 과잉 생성을 억제하고 또한 생성된 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어 시스템 구축이 필요하다. 천연 성분들 중에는 이러한 항산화 방어 시스템 구축에 자외선차단제로서, 항산화제로서 또는

킬레이트제로서 적절한 역할을 할 수 있는 물질들이 많이 있다.

효율적인 자외선 차단제, 항산화제 그리고 킬레이트제를 사용하여, 자외선 노출에 의해 생성된 과잉의 활성산소를 감소시키는 것은 피부 광노화를 예방하고 최소화 시키기 위한 촉망되는 전략임이 분명하다. 장기간의 자외선 조사를 하는 동안, 동시에 자외선 차단제를 도포하면 효율적으로 결합조직 손상을 막아 주고, 더우기 이미 광손상된 피부에 항산화제를 도포해도 더 이상의 손상을 막아주고 자연적으로 일어나는 피부의 복구능력을 촉진시켜 새로운 콜라겐 생성에 의한 복구된 층이 형성된다(Kligman et al., 1983 ; Plastow et al., 1987).

각종의 활성산소-소거작용 혹은 소광 작용이 있는 화합물들(예, α -토코페롤, 아스코르브산, 카로티노이드, 유비퀴놀/퀴논, 플라보노이드, 레티노이드 그리고 프로필 갈레이트)은 피부 광노화에 있어서 주름 생성과 조직학적 변화들의 개시반응을 효과적으로 지연시킨다. 이러한 현상은 이 화합물들을 국소적으로 적용했을 때 나타난다. 예를 들면, α -토코페롤을 국소 적용하면, UV-A 에 의한 간질성 콜라겐 type I 과 type III 의 감소를 효율적으로 막아 주었으며, 자외선으로 유도된 라디칼의 생성을 감소시킨다. 이 때 α -tocopherol sorbate 는 비타민 E 아세테이트보다도 훨씬 더 효과적임을 알 수 있다(Jurkiewicz et al., 1995).

주름 예방과 개선을 목적으로 사용되는 레티놀(비타민 A) 및 이로부터 유래된 레티노이드는 1O_2 을 효율적으로 소광시킬 수 있다($k_q \approx 10^7 M^{-1}s^{-1}$)(Foote et al., 1970). 또한 레티노이드는 대표적인 UV-A 영역의 흡수를 나타냄으로써 피부속까지 UV-A 가 침투되는 것을 차단시킨다. 더우기 레티노이드는 자외선을 흡수하여 그 에너지를 자신의 시스-트랜스 이성질화 반응에 소비하는 효율적인 소광제로서 작용하고 있다. 화장품에 첨가된 레티노이드는 피부에 흡수되어 세포 증식, 분화, 간질 콜라겐의 합성 등의 작용뿐만 아니라 항산화 작용도 중요한 것으로 예측된다. 자외선으로 생성된 활성 산소종을 소광시키거나 또는 직접 반응에 의해 제거 시키는 작용 외에도 레티놀은 미크로솜에서의 지질 과산화반응을 효율적으로 억제한다. All-trans-retinoic aci, all-trans-retinol 그리고 13-cis-retinol 의 지질 과산화반응 저해활성은 대략 $IC_{50} \approx 5 \mu M$ 로서 지질 과산화반응의 억제 활성이 매우 크다(Briviba, et al., 1994).

철은 증가된 히드록실 라디칼 생성을 통하여 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 나타난다. 1,10-Phenanthroline 과 2,2'-dipyridylamine 과 같은 특정한 철 킬레이트제를 국소 도포하면 실질적으로 주름생성 반응의 개시를 지연시켰다. 반면에, 킬레이트 작용이 없는 유사체는 어떠한 광 보호작용도 나타내지 않았다(Bisset et al., 1991).

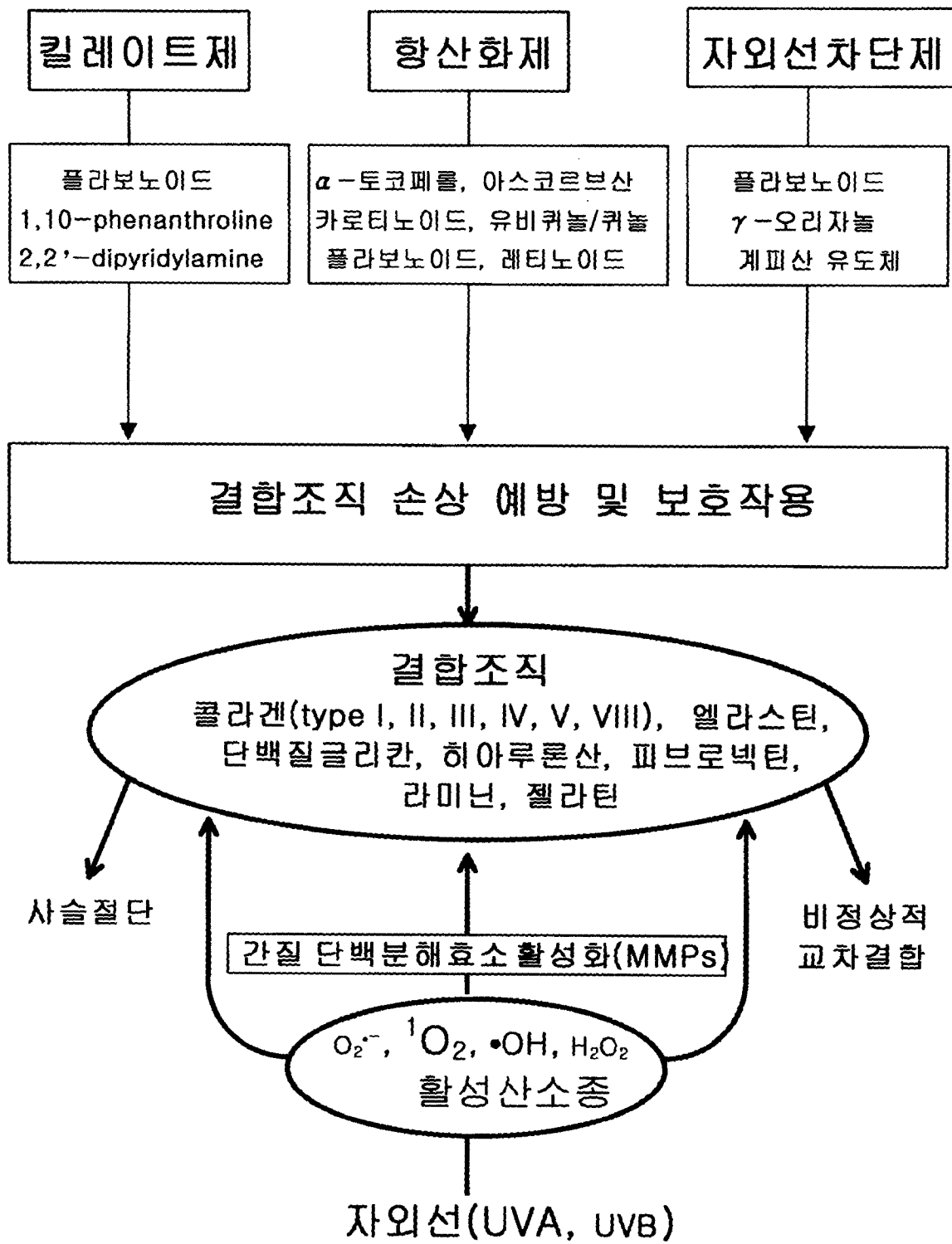


그림 1. 자외선으로 유도된 결합조직 손상의 항산화적 예방과 치료

이와 같은 킬레이트제로서 천연물은 플라보노이드를 들 수 있다. 플라보노이드의 작용 메커니즘은 이미 앞에서 자세히 다룬바 있다. 즉, 플라보노이드는 전이금속과 결합함으로써 전이금속으로 촉매되는 Fenton 반응에 의한 $\bullet\text{OH}$ 의 생성을 억제한다. 반응성이 큰 $\bullet\text{OH}$ 의 생체내 생성은 주로 이 반응에 의하여 생성되는 것으로 믿어지고 있다.

자외선을 차단시켜 피부에의 흡수를 방지하는 천연물로는 플라보노이드류, γ -오리자놀, 계피산 유도체 들을 들 수 있다. 플라보노이드 중 플라보놀(퀴세틴, 갈랑긴)은 UV-A 영역을, 녹차의 카테킨류는 UV-B 영역을 흡수한다. 오리자놀은 광범위한 태양 자외선을 흡수한다.

여하튼, 플라보노이드는 항산화제로서, 자외선흡수제로서 그리고 킬레이트제로서 다양한 기능을 갖추고 있기 때문에 기능성 화장품 원료를 개발하는데 매우 적합한 천연물이다.

광노화에 있어서 항산화제들의 예방/치료 포텐셜을 시사하는 연구들은 있어도, 자외선으로 유도된 결합조직 손상에 대한 조합된 항산화 물질들의 광보호 효과를 조사한 연구는 없다.

앞으로, 피부노화의 주 대상인 결합조직 손상을 예방하기 위해서는, 국소적 혹은 전신적 적용에 대한 타당한 항산화제 설계(피부 항산화 방어망의 구축)가 필요하다. 이러한 설계는 피부 광노화에 포함된 특정 활성 산소종들의 확인과 분자적 메커니즘에 대한 이해에 좌우될 것으로 생각된다.

4. 미백제로서의 역할 (멜라닌 생성 저해작용이 있는 생약)

화장품에서 요구되는 효능·효과 중에서 미백은 주름방지나 육모·양모와 더불어 가장 중요한 효능·효과 중의 하나이다. 피부의 색소침착은 표피의 기저층에 있는 색소세포에 의해서 생성되는 멜라닌이 그 원인으로, 멜라닌 생성을 억제하는 약제는 미백 화장품의 유효성 원료로서 옛부터 활발한 연구가 있었다. 한편, 최근에는 화장품 분야에 있어서도 자연과 화장품들이 시장에서 인기를 독차지하고 있다. 그 결과 화장품 혹은 의약품의 원료 공급원으로서 천연물이 주목되고 있다. 이와 더불어 식물 유래성분의 미백 효과에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다(Okano, 1997; Kubo, et al., 1997; Kinoshita, 1997; Kojima, et al., 1996).

최근 수년간 멜라닌 생성과 제어 메커니즘 연구의 진보는 매우 현저하였다(Mishima, et al., 1998; Maeda, 1997; Mishima, et al., 1996). 이러한 연구 성과에 의해, 색소세포내의 티

로시나제(tyrosinase) 저해뿐만 아니라 멜라닌 생성의 억제, 티로시나제 생합성 저해작용, 멜라닌 배출 촉진 등 미백 메카니즘의 문제는 다각적으로 연구되고 있다. 특히 자외선에 의한 멜라닌 생성에 관여하는 것으로는 prostaglandin E₂ 등의 아라키돈산 대사산물, 색소세포 호르몬 등의 존재가 밝혀졌다(Maeda, 1997; Mishima, et al., 1996). 또한 멜라닌 색소 세포 내에 있어서 멜라닌 모노머를 적당한 화합물로 트랩시키는 멜라닌 생성 억제법도 제창되고 있다(Mishima, Y., et al., 1998).

종래의 미백제로서는, 비타민 C 및 그 유도체(Egawa, et al., 1997), 알부틴 및 코직산(Maeda, et al., 1991)이 유효 성분으로 허가되어 있다. 비타민 C는 이상색소침착을 억제하는 작용이 있으며 그 자신이 생체 내에 존재하기 때문에 안전성이 높다는 인식이 있고, 미백효과에 대해서도 소비자들은 신앙과 유사한 신뢰감을 가지고 있어서 화장품의 배합 성분으로 적합한 것으로 간주되고 있다. 그러나 다른 비타민류와는 달리 열이나 산화에 매우 약하기 때문에 분해되기 쉽다는 결점이 있다. 따라서 최근 그 유도체 개발연구에 활기를 띄고 있다. 현재 화장품에 많이 사용되고 있는 미백 화장품 원료인 알부틴의 효능은 티로시나제의 기질로서 작용하는 능력과 관련이 있다. 또 다른 미백제인 코직산은 티로시나제의 활성자리에 있는 구리를 킬레이트화함으로써 티로시나제 활성을 저해한다고 보고되고 있다. 천연물 유래의 성분과 관련된 최근에 미백제 연구로는, DL-alpha-tocopheryl ferulate(Funasaka, et al., 1997), 안정형 비타민 C 유도체들(예, L-ascorbic acid-2-glucoside; Egawa, et al., 1997), ellagic acid (Tachibana, et al., 1997), 3,5-dicaffeoylquinic acid (Shinmoto, 1997), alpha-hydroxy acids(AHAs)(Sinomiya, 1997), 등이 있으며, 그 외에 코직산과 유용성감초 추출물인 glabridin의 병용에 의한 상승적 미백작용에 관한 연구보고도 있다(Koide, et al., 1997). 상기에서 연구된 이들 성분들은 tyrosinase, DOPAchrome tautomerase 및 DHICA-oxidase의 저해활성, 티로시나제 생합성 저해활성, 멜라닌 생성 억제작용, 자동산화반응 억제작용, 자외선 차단작용 등에 초점을 맞춰 연구되었다.

5. 기타 (항균·항염 그리고 면역조절 작용이 있는 천연물)

5-1. 항균·항염 활성이 있는 천연물

피부가 자외선에 노출되면 염증성 침윤이 일어난다. 또한 병원성 세균에 의한 피부 침투는 호중구와 마크로파지를 염증부위로 동원시킨다. 이러한 염증 과정은 활성산소 생성이 수반되고 이들 활성 산소종은 조직손상을 일으킨다. 또한 자외선 폭로도 피부

면역을 억제 시켜 세균 감염증 등을 일으킨다. 이와 같이 피부에서의 염증 반응과 세균 감염은 활성 산소종이 관여하는 피부노화를 촉진시킬 수 있다.

따라서 생약으로부터 새로운 항균·항염 활성이 있는 천연물을 찾는 연구가 활발하다. 항균 작용을 나타내는 생약으로는 황백, 황련 등의 알칼로이드인 berberine, 이 물질은 광범위한 항균 스펙트럼을 가지며 여드름 원인균인 *Propionibacterium acnes* 에 대해서도 강한 용균 작용을 나타낸다. 자근의 shikonin 류는 항균 활성과 화상, 동상, 습진, 수포 등에 외용되는 연고의 주 생약이다. 민간약으로 습진, 백선, 사마귀 등의 피부질환에 이용된 백굴채는 주성분이 coptisine 으로 피부 화농균인 황색 포도상구균에 강한 항균 활성이 있다. 감초의 glabrene, licochalcone, 녹차 및 상백피의 플라보노이드, 고삼의 알칼로이드 등도 항균 활성이 보고되었다. 한편 생약의 사포닌 성분에는 항진균 활성이 보고되고 있고, 연명피, 해삼, 목근피 등의 사포닌 활성이 확인되었다.

한편 항염증 작용이 있는 천연물로 화장품 등에 사용되는 것으로는 페놀성 화합물, 알칼로이드, 터페노이드를 들 수 있다. 페놀성 화합물에는 사철쑥의 esculetin 6,7-dimethylether, 황금의 baicalin, baicalein, 자소의 rosmarinic acid, 자근의 shikonin, 후박의 magnolol, honokiol, 승마의 isoferulic acid, 울금의 curcumin 등이 있고, 알칼로이드는 황백, 황련의 berberine, 마황의 pseudoephedrine, ephedroxane 등이 있고, 터페노이드류에는 작약의 paeoniflorin, 감초의 glycyrrhizin 등이 알려져 있다(Takeya, 1995).

5-2. 면역조절 작용이 있는 천연물

과도한 면역 응답 반응인 알러지 질환(예, I 형 알러지, 아토피성 질환)은 피부에 다양한 손상을 일으킨다. 한편 접촉성 과민반응(IV 형 알러지)은 자외선 폭로에 의해 억제(광면역 억제)되어 피부에 감염증을 일으키는 원인이 되고 있다. 따라서 I 형 알러지에 대해서는 면역기능의 Down-regulation(면역 억제)작용, 광면역 억제에는 Up-regulation(면역 부활)작용을 갖는 물질의 투여가 검토되고 있다. 이 2 가지 면역 기능에 대한 장애에 주목하여 면역기능의 정상화를 목적으로 한 면역 조절작용이 있는 천연물을 찾는 연구가 활발하다. 아토피성 질환에 대한 치료효과(면역 억제작용)가 있는 생약으로는 시호, 황금, 대추, 인삼, 감초, 녹차, 우롱차 등이 알려져 있고, 최근의 연구결과로는 녹차와 우롱차 성분인 (-)-epigallocatechin gallate(EGCG), (-)-gallocatechin gallate(GCG)에서 강한 활성이 보였다. 광면역 억제에 대한 면역 부활작용이 있는 생약으로는 마늘과 알로에 추출물에서 효과가 좋은 것으로 최근 보고되고 있다(Fukuyasu, et al., 1995).

VII. 활성산소 관련 실험법 소개

지금까지 살펴본 바와 같이, 피부노화에 있어서 가장 중요한 원인 물질은 바로 활성산소종이라는 것을 알게 되었다. 노화의 free radical 설에서 언급한 바와 같이 산화제/항산화제 밸런스가 산화제(free radicals 즉, 활성 산소종) 쪽으로 기울 때 생체조직은 산화적 스트레스를 받게 된다. 이러한 산화적 스트레스하에서는 과잉의 활성산소가 생성되고, 이 활성 산소들이 조직을 산화 시켜서 생체 내에 산화산물이 축적된다. 이러한 과정을 노화라고 한다.

여기서는 우선 천연물과 피부노화 연구에 적합한 활성산소 관련 실험법 3 가지를 소개하고, 이어서 일반적인 산화적 스트레스의 발생을 설명할 수 있는 실험법을 두 분야로 나누어 소개하고자 한다. (1) 직접 활성 산소종의 측정. (2) 생체 손상의 측정.

1. 천연물 연구에 적합한 활성산소 관련 실험법

1-1. 백혈구에 의한 화학 발광법

자외선에 피부를 노출시키면 활성 산소종이 생성되고 이들은 피부 구성 성분들을 손상시킨다. 손상된 생체 고분자들은 백혈구가 활성산소를 발생시켜 처리한다. 병원성 박테리아, 바이러스, 곰팡이에 의한 피부 침투는 호중구와 매크로파지를 염증이 일어난 부위로 동원시킨다. 이들 세포들은 호흡급증을 통하여 염증부위에 활성 산소종을 방출시킨다. 이와 같이 백혈구는 피부노화에 깊숙이 관여되어 있다.

생체 외부로부터 침입한 세균이나 이 물질에 대한 방어기구로 작용하는 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocyte : PMN)는 식작용을 나타낼 때 산소소비의 급증을 수반하는 호흡급증(respiratory burst)을 일으킨다. 이러한 호흡급증은 phorbol myristate acetate (PMA), Ca^{2+} -ionophore 등의 가용성 물질에 의해서도 유발되며, 식작용이 일어나는 즉시 hexosemonophosphate(HMP) shunt 를 통한 대사증가와 더불어 반응성이 큰 활성산소가 생성되는 과정이다. 이때 생성되는 산소 라디칼로는 superoxide anion radical(O_2^\bullet), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical($\bullet OH$), singlet oxygen(1O_2), hypochlorous acid(HOCl), nitric oxide(NO^\bullet)등이 있으며(Ward and Mulligan, 1992), 이들 산소 라디칼은 잡아 먹힌 세균에 대한 살균작용이 주 기능이지만 세포 밖으로 유출되어 주위의 세포나 조직에 독성을 나타

낸다(Ward and Mulligan, 1992). 이들에 의한 유해효과는 각종 질병유발 및 피부노화의 원인이 되고 있는데 세균성 염증, 류마티스 관절염과 같은 자가면역 및 소화기관의 궤양은 그 대표적인 예이다.

사람 혈액으로부터 백혈구(호중구)분리 : 사람 혈액 약 30ml 을 600U heparin (5,000 unit/ml)과 혼합한 후 혈장과 혈구를 분리하였다. 분리된 혈구에 2% dextran 용액(혈액의 2/3 양)을 넣어서 적혈구와 백혈구를 분리한다. 상층(백혈구층)을 새로운 시험관에 옮기고 ficoll-paque(histopaque) 8ml 와 섞은 후 400g 로 30 분간 원심 분리하여 호중구를 얻는다. 남아있는 적혈구를 용혈 시켜 제거하기 위해 이 호중구에 0.2% NaCl 용액 50ml 을 가하고 60 초 후에 1.6% NaCl 용액 50ml 을 가한 후 150g 로 5 분간 원심분리하여 상층의 용혈을 제거한 후 침전되어 있는 호중구를 KRP 완충액(Krebs Ringer Phosphate 완충액)에 현탁시키고 세포수를 측정 한 후 실험에 사용한다.

화학 발광(chemiluminescence: CL)측정 : 천연물의 활성산소 제거작용은 사람의 백혈구를 phorbol myristate acetate 와 반응 시켰을 때 생성되는 산소 라디칼이 반응액 내에 존재하는 luminol(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione) 과 반응하여 발생하는 화학발광의 억제 효과로 판정한다. Ca²⁺-free Krebs Ringer Phosphate(KRP) buffer 1.9ml 를 화학발광 측정용 튜브에 넣고 여기에 여러 농도의 천연물 용액을 10 μL 를 가한다. 이어 백혈구 현탁액 (2x10⁶cells/mL, Ca²⁺-free KRP buffer soln)을 0.1ml 가한 후 luminol 용액 5 μL (luminol 10mg 을 1mL DMSO 에 녹인 후 100mL saline 을 가하여 만든다)을 가하고 조용히 두 번 섞어준다. 이 튜브를 화학발광 측정장치에 넣고 37℃에서 5 분간 항온배양한 후 PMA (0.1mg/1ml DMSO) 5 μL 혹은 H. pylori (2x10⁸cells/ml)을 가하고 섞어준 다음 20 분간 화학발광을 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 에탄올 10 μL 를 가한 것으로 하고 blank 는 대조군과 조건이 같으나 PMA 만 들어있지 않은 것으로 한다.

화학발광의 억제 정도는 다음식에 의하여 산출하였다.

$$\text{저해 \%} = \frac{\text{Control 의 cpm} - \text{sample 의 cpm}}{\text{Control 의 cpm} - \text{blank 의 cpm}} \times 100$$

1-2. 적혈구의 광용혈 실험

적혈구 광용혈 실험은 바로 광노화의 모델로 적합한 점이 많다. 이 실험에서는 광증

감 물질로서 로즈-벵갈 또는 생체 내 증감물질로 작용하는 포르피린을 사용하여 자외선 조사로 1O_2 을 발생시킨다. 매우 약한 빛으로도 1O_2 을 발생시킬 수 있으며, 이 때 광조사 시간은 적혈구 세포에 있어서 자동산화반응을 개시 시킬 정도면 충분하다. 광조사로 생성된 1O_2 은 세포의 여러 성분들에 대하여 자동산화반응을 개시 시킨다. 이들 반응으로는 적혈구 세포막의 지질 과산화반응을 일으키고, 막단백질의 산화, 구조 단백질의 절단, 불포화 지방산의 손실, 막 투과성의 변질, 막과 관련된 효소에 대한 영향, 이온 전달의 변화, 지질 히드로 과산화물로부터의 세포 독성 대사 산물의 생성 등을 포함한다. 이러한 반응들에는 $\bullet OH$ 도 참여한다. 광증감 반응으로 또는 자동산화반응 과정 중에 생성된 $O_2^{\bullet -}$ 은 SOD에 의해 H_2O_2 로 된다. 특히 적혈구는 SOD 등의 항산화 효소 수준이 다른 조직의 세포에 비해 높다. H_2O_2 는 수명이 길고 또한 막을 가로질러 세포 안으로 들어갈 수 있다. 이 과산화 수소는 헤모글로빈의 산화반응으로부터 방출된 철 이온과의 Fenton 반응으로 $\bullet OH$ 을 생성시킨다. 또한 지질 과산화반응의 산물인 히드로 과산화물은 헴철과 반응하여 반응성이 큰 2차 라디칼인 알콕실 라디칼, 과산화 라디칼 혹은 히드록실 라디칼을 생성시킨다. 이 라디칼들은 적혈구 또 다른 구성 성분들의 자동산화반응을 개시 시킨다.

우리는 적혈구의 광용혈 실험을 통하여 여러 가지 정보를 얻을 수 있다. 활성산소에 의한 지질 과산화반응, 단백질 산화(막 단백질의 산화에 의한 기능 손실, 구조 단백질의 절단, 헤모글로빈의 파괴와 철의 유출 등) 그리고 활성산소에 의한 세포 항산화제의 파괴 및 궁극적으로 일어나는 세포의 파괴 등을 조사할 수 있다. 또한 이 실험법을 이용하여, 천연물을 대상으로 활성산소에 의한 세포 손상(또는 파괴)에 대한 보호효과를 측정할 수 있다. 천연물뿐만 아니라 의약품, 화장품 원료 등의 세포에 대한 영향을 평가하는 수단도 제공해 준다. 무엇보다도 특히 태양광(자외선)에 의한 피부노화를 방어할 수 있는 자외선으로부터의 피부 보호물질을 검색하는데 있어서 유익할 것으로 생각된다.

실험방법 : 적혈구는 사람 또는 토끼로부터 얻는다. 채혈 즉시 헤파린이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3000rpm에서 5분간 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer(pH 7.4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 9.6 mM, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.6 mM)로 세척하여 원심 분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거한다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구를 4°C의 냉장고에 보관하면서 사용하고, 모든 실험은 채혈 후 12시간 이내에 행하였다. 실험에 사용되는 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6 이고 이 때 적혈구의 수는 1.5×10^7 cells/ml 이다.

실험 과정은 1.5×10^7 cells/ml 적혈구 현탁액 3.5 ml 를 파이렉스 시험관에 넣은 후, 시료를 첨가한다. 여러 농도의 시료 에탄올 용액을 50 μ l 씩 첨가한다. 암소에서 30 분간 미리 항온 배양시킨 후, 광증감제(로즈-벵갈인 경우 12 μ M) 0.5 ml 를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 뒤 15 분간 광조사 한다.

광조사는 내부를 검게 칠한 $50 \times 20 \times 25$ cm 크기의 상자 안에 20W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 분간 광을 조사하였다. 시험관을 암실에 위치시키고 광조사가 끝난 후 15 분 간격으로 적혈구의 파괴 정도를 700 nm 에서 투광도로부터 구한다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 파괴 정도에 비례한다. 모든 실험은 27°C 항온실에서 실시한다. 여러 가지 다른 시료들과 세포보호 작용을 비교하기 위하여 τ_{50} 을 구한다. 이 값은 적혈구가 50% 용혈 되는데 걸린 시간이다(Park, 1989; Park et al., 1997).

적혈구 광용혈 실험법은 시간과 비용을 대폭 절약할 수 있고, 실험 재료(적혈구 세포 등)의 구입이 용이하고 정량적인 정확한 실험을 할 수 있다는 장점이 있다. 어쨌든 이 실험법보다도 피부노화 연구에 더 적합한 실험 방법들은 많으며, 보다 많은 사람들이 피부노화와 관련하여 다양한 연구를 하면, 실제로 효능이 있는 기능성 노화억제 화장품을 만들 수 있다고 생각된다.

1-3. DPPH 법

활성산소에 의한 피부노화 과정은 지질 과산화, 단백질 산화, DNA 산화, 멜라닌 생성, 결합조직의 절단 및 비정상적인 교차결합 등을 포함한다. 이들 반응들은 거의 대부분 라디칼 반응으로서, 자동산화반응 과정이 포함된다. 자동산화반응이 진행되는 동안 많은 생체 구성 성분들이 산화적 손상을 받게 된다. 따라서, 자동산화반응을 되도록이면 빨리 차단시켜야 한다. 생체 내에서 자동산화반응을 차단시키는 역할은 바로 항산화제가 담당하고 있다.

자동산화반응의 종결은 토코페롤과 같은 항산화제가 수소원자를 과산화 라디칼에 줌으로써 달성된다. 수소 원자(전자)를 주는 능력, 바로 환원력이며 환원력이 클수록 강력한 항산화제가 된다. 이러한 환원력을 측정할 수 있는 시약으로 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)이 있다. DPPH 는 화합물 내 질소 중심의 라디칼로 라디칼 전자의 비편재화에 의해 안정화된 구조의 라디칼로 존재한다. DPPH 는 517 nm 에서 최

대 흡수를 나타내며 환원되면 517 nm 에서 흡수가 없어진다. 따라서 DPPH 의 환원 정도는 환원제(예, α -토코페롤 또는 플라보노이드 등의 페놀성 화합물)의 환원력에 달려 있다.

실험방법: 0.2 mM DPPH 메탄올 용액 0.5 ml 에 여러 농도의 시료 에탄올 용액 1.0 ml 를 첨가하고 섞은 다음 실온에서 10 분간 방치 후 517 nm 에서 흡광도의 감소를 측정한다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성(scavenging activity, SC_{50})으로 표시하며, SC_{50} 은 DPPH 의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 나타낸다.

이 실험법은 매우 간편하고 짧은 시간에 결과를 알 수 있기 때문에, 천연물 중의 항산화 물질을 검색하는 경우나 항노화 화장품 원료들의 비교 평가시에 이용하면 좋다.

2. 활성 산소종의 직접적인 측정법

2-1. 색도법 혹은 형광법

색도법으로는 환원된 cytochrome c 혹은 MTT 의 흡수 스펙트럼을 사용하여 수퍼옥사이드를 측정할 수 있다. 그러나 과산화수소는 orange xylenol 과의 반응을 이용한다. Nitric oxide 는 헤모글로빈과의 반응산물이 나타내는 578nm 에서의 흡수에 의해 측정될 수 있다.

형광 기술로 과산화수소를 측정하기 위해서는 dichlorofluorescein diacetate 를 사용하거나, peroxidase 로 촉매되는 p-hydroxyphenyl acetate 와의 효소적 반응을 이용한다.

2-2. Electron spin resonance(ESR)

ESR(혹은 EPR)로, 짝을 이루지 못한 라디칼의 전자적 성질에 의해 유도되는 자기장으로부터 라디칼을 검출할 수 있다. ESR 은 라디칼의 화학적 본질을 확인할 수 있게 해주며 라디칼의 생성과 분해에 대한 반응속도를 측정할 수 있도록 해준다. 이 기술은 종종 이차 라디칼을 안정화 시키는 spin-trap agent 를 사용한다.

아스코르브산 라디칼 또한 산화적 스트레스의 마커(marker)가 될 수 있다. 아스코르브산의 일전자 산화는 아스코르브산 라디칼을 만들며 이 라디칼은 히드록실 라디칼이나 퍼옥시 라디칼보다 수명이 길다. 이 라디칼은 ESR 에서 특징적인 이중선을 나타낸다 ($aH4 = 1.8G$). 사람 혈장에서는 약 0.1 에서 0.003mM 의 값을 나타낸다. 이 라디칼은 라

디칼 반응이 진행되는 동안뿐만 아니라 아스코르브산이 관여되는 모든 산화적 과정(효소적, 촉매적, 광산화적)에서 생성된다.

2-3. 화학발광

이미 앞에서 설명한 바와 같이 화학발광은 산화적 스트레스를 평가하는 매우 매력적인 방법이다. 1O_2 에서 방출되는 극히 약한 빛을 액체 질소로 냉각된 게르마늄 광 검출기를 사용해서 직접 측정할 수 있다. 산소 라디칼과 반응함으로써 빛을 내게 하는 화학발광 탐침을 사용하면 이 기술의 감도를 증가시킬 수 있다. Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalzinedione)은 480nm 에서 빛을 내며, PMN, H_2O_2 , 1O_2 , $\bullet OH$, HOCl 에 의해 생성된 각종 산소 유도체에 민감하다. Lucigenine(10,10'-dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate)는 수퍼옥사이드에 보다 더 특이적이다. Luminol 은 분리된 PMN 을 자극한 후 생성되는 활성 산소종을 측정하는데 널리 사용된다. 또 이 방법은 백혈구의 활성산소 생성을 억제하는 또는 백혈구에 의해 생성된 활성산소를 소거하는 천연물의 능력을 검색하는데 이용될 수 있다.

화학발광은 인지질의 ROOH 를 측정하는 검출계로써 사용될 수 있다. 주로 HPLC-화학발광을 이용하며 이때 매우 높은 감도를 얻을 수 있다.

3. 생체 손상의 측정

활성 산소종은 생체 물질과 반응함으로써 산화된 유도체를 만들며 그 수준은 산화적 스트레스의 특징적인 지표로서 사용된다.

3-1. 생체 구성 성분의 산화반응

3-1-1. 지질 과산화반응

지질의 산화반응은 측정하기 쉽기 때문에, 지질과산화 반응의 유도체들은 산화적 스트레스에서 가장 널리 사용되는 진단용 마커로서 계속 이용되고 있다(Slater, 1984).

3-1-2. 컨주게이트된 디엔

디엔 배열을 갖는 분자들은 215-250nm 에서 강한 흡수를 나타낸다. 그들은 생체의 액체로부터 용매 추출에 의해 쉽게 측정될 수 있다(Lunec, et al., 1981).

3-1-3. 히드로과산화물

히드로과산화물은 비록 금속이온 존재하에서는 변하기 쉬우나 보통은 안정하다. 히드로-과산화물은 glutathione peroxidase 와 glutathione reductase 를 사용한 그리고 NADPH 의 감소를 추적하는 효소적 분석법으로 측정할 수 있다(Heath, et al., 1976)

3-1-4. 알데히드

지질과산화 반응의 결과로서 다양한 종류의 알데히드가 생성되며, 이들의 종류로는 hexanal, malondialdehyde(MDA), 5-hydroxynonenal 등이 있다. MDA 는 산화적 스트레스에서 가장 널리 사용되는 지표 물질이다. 이 분석법은 TBA (thiobarbituric acid)를 이용한다. 또한 TBA 반응물질(TBARs)과 같은 다른 알데히드도 측정할 수 있다(Janero, 1990).

3-1-5. Alkanes 과 alkenes

환자로부터 나오는 배출 공기 중에서 371 종류 이상의 휘발성 유도체가 검출될 수 있다. 에탄이나 펜탄과 같은 탄화수소는 생체 내에서 지질과산화 반응의 0.1 에서 10%를 반영한다. 보통은 호흡에서 나오는 기체들은 기체 크로마토그래피에서 칼럼에 포착된다. 이 기술을 이용하면 과산화 반응에 대하여 첨가된 지질이나 토크페롤 함량을 변화 시켰을 때의 효과를 조사할 수 있다(Sobotka, et al., 1993).

3-1-6. 산화된 lipoprotein

Lipoprotein 의 산화는 동맥경화에 포함된 중요한 독성 기작일 뿐만 아니라 산화적 스트레스의 지표로서 사용되고 있다(Esterbauer, et al., 1990).

3-1-7. 단백질 산화

산화적 스트레스는 단백질에 대하여 광범위한 작용을 나타낸다. 산화적 스트레스를 받은 단백질은 전기이동도에, 형광 스펙트럼상에 변화가 나타나기 때문에 이를 이용하여 산화적 스트레스 정도를 측정할 수 있다. MDA 와 같은 여러 가지 알데히드들은 리신 잔기를 포함하는 단백질의 아미노기와 반응한다. 단백질에 결합된 알데히드 분자 수는 단백질의 카르보닐기를 검출함으로써 측정할 수 있다(Ward, et al., 1994).

3-1-8. DNA 산화

DNA 의 염기들은 특히 활성산소에 민감하며 첨가 반응, 산화 반응 혹은 절단 반응을 통하여 수많은 유도체들을 생성시킨다(예, 8-hydroxydesoxyguanine). 이들 변형체들은 DNA 에서 직접 측정될 수 있으며, glycosylase 에 의해 산화 유도체들을 방출시킨 후 표지법, GC-MS, HPLC, HPLC-MS 등으로 확인할 수도 있다. 우리는 후 표지법(post labelling)을 이용해서 H₂O₂ 로 스트레스를 가한 섬유아세포에서 adenine N1-oxide 가 생성됨을 관찰할 수 있다(Cadet, et al., 1992; Kasai, et al., 1991).

3-2. 천연 항산화제의 산화반응

생체내 항산화제의 산화 반응은 산화적 스트레스를 반영한다. 이 산화적 스트레스는 항산화제 전체 수준에서의 감소를 측정하거나 혹은 산화된 형의 증가를 측정함으로써 평가될 수 있다. 또는 항산화제의 산화형과 환원형의 비율을 측정한다.

3-2-1. 비타민

조직에 있는 토코페롤과 아스코르브산의 수준은 산화적 스트레스 후에 감소된다. 동시에 ECD 검출기를 부착시킨 HPLC 로 측정해 보면 토코페릴퀴논(뿐만 아니라 토코페릴퀴논과 토코페롤 사이의 비율도)이 증가한다. 이 방법으로 만성 스트레스하에서 매우 쉽게 고갈되는 항산화제에 베타 카로틴이 있음을 관찰할 수 있다(Murphy, et al., 1992 ; Favier, et al., 1994).

3-2-2. 글루타치온

글루타치온을 측정하는 데는 많은 기법들이 있다: nitroprussiate, 색도법, 분광법, 이온교환 크로마토그래피, HPLC.

산화적 스트레스의 평가는 산화된 혹은 환원된 글루타치온 사이의 비율을 측정함으로써 보다 더 잘 이루어질 수 있다. 환원된 글루타치온은 매우 불안정하기 때문에 생체 시료는 단백질을 제거 시키고 낮은 온도에서 동결시키거나, 혹은 시료 튜브에 티올 시약을 직접 가해서 환원형 글루타치온을 안정화 시켜야 한다. 환원형 글루타치온은 산화적 스트레스하에서 매우 빠르게 사라지며, 재회로 반응에 의해 기본 수준까지 되돌아온다. 이러한 현상은 환원형 글루타치온을 빠르고 순간적인 스트레스에 대한 좋은 지표로 사용할 수 있게 해준다(Poot, 1991; Roderer, et al., 1993).

3-2-3. 기타(살리실산)

특정한 라디칼의 공격을 받은 후 몇 가지 화합물들은 생체 유동액 중에 특이한 대사 산물로 된다. 이러한 화합물들은 세포 배양에 첨가하거나, 실험 동물에 섭취 시킴으로써 산화적 스트레스의 존재를 조사할 수 있다. 그러나 이들을 사람에게 적용할 때는 안전성이 확보되어야 한다. 즉 생체 성분과 반응하는 등의 독성이 없어야 한다. 다행스럽게도 salicylate 혹은 acetyl salicylate 는 이 같은 방법에 사용될 수 있다. Salicylate 는 $\bullet\text{OH}$ 과 반응하면 3 가지 유도체가 만들어진다: catechol(11%), 2,3-dihydrobenzoate(49%) 그리고 2,5-dihydro-benzoate(40%). 2,3-Salicylate 는 2,5-salicylate 보다도 $\bullet\text{OH}$ 생성에 더 특이적이며, 이것은 cytochrome P450 에 의해 효소적으로도 만들어질 수 있다. 경구 투여로 1g 의 아스피린을 복용한 후 3 시간 후에 혈액을 채취해 보면, 당뇨 환자의 혈액에서는 2,3-salicylate 가 비정상적으로 증가되어 있음을 알 수 있다(Dhalla, et al., 1989; Arshad, et al., 1991).

VIII. 결론

오존층의 파괴로 인한 환경 변화에 의해서, 지표에 도달하는 자외선의 양은 점점 증가되고 있다. 피부는 자외선의 영향을 가장 받기 쉬운 기관이다. 따라서, 활성 산소종으로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험이 실질적으로 증가하고 있다. 활성 산소종이

란 수퍼옥사이드와 히드록실 라디칼과 같은 산소 중심의 라디칼들, 과산화수소나 싱글렛 옥시젠과 같은 비라디칼들, 그리고 활성산소와 생체 성분과의 반응에서 유래된 과산화 라디칼, 알콕실 라디칼, 히드로과산화물 등을 포함한다. 이들 활성 산소종들은 정상적인 대사과정에서도 생성되며, 질병상태나 스트레스를 받을 때, 세균 감염이나 염증 상태에서 과잉으로 생성된다. 특히 피부는 자외선에 노출되어 있어 활성 산소종을 만드는 광화학적 반응들이 계속해서 일어나고 있다. 활성 산소종은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 작용하고 있다.

활성 산소종은 피부 세포 및 조직 손상을 주도한다. 이들은 항산화효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 피부 항산화 방어망을 파괴함으로써 산화제/항산화제 균형을 산화 상태 쪽으로 기울게 한다. 결과적으로 계속된 산화적 스트레스는 지질 과산화, 단백질 산화, 간질 성분을 파괴시키는 단백질분해효소의 활성화, 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합, 히아루론산 사슬의 절단, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 야기시킨다. 그 외에도 피부에 염증을 유발시키고, 피부 면역 기능을 억제시켜 세균 감염증 또는 발암물의 증가를 가져온다. 결국에는 탄력감소, 주름살 및 기미·주근깨 등으로 특징 지워지는 피부노화가 가속화된 다.

따라서 피부노화를 지연시키고 억제하기 위해서는, 생체 내뿐만 아니라 피부에서 과잉의 활성 산소종 생성을 억제하고 또한 생성된 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 시스템이 화장품의 처방에 반드시 포함되어야 한다. 다시 말하면 산화제(활성 산소종)/항산화제 밸런스가 유지되는 피부의 항산화 방어 시스템 구축이 필요하다.

피부노화 방지에 있어서 천연물의 역할은 매우 중요하다. (1) 자외선 흡수제로서의 역할 ; 즉 UV-B 및 UV-A 차단. (2) 항산화제로서의 역할 ; 활성산소 제거, 활성산소에 의한 손상 방지, 활성산소의 생성 억제: 비타민 E, C, 카로티노이드, 유비퀴논/퀴놀, 플라보노이드. (3) 주름 개선제로서의 역할 ; 결합조직 손상 예방 및 치료 : 킬레이트제, 항산화제, 자외선 차단제, 콜라겐 생합성 유도. (4) 미백제로서의 역할 ; 티로시나제 등의 효소 저해작용, 자동산화반응 억제작용, 멜라닌 합성 저해작용. (5) 항균·항염작용 및 면역 조절제로서의 역할.

마지막으로 활성산소 관련 실험법으로 (1) 백혈구의 화학발광법, (2) 적혈구의 광용혈법, (3) DPPH 법 을 소개하였다.

21 세기는 본격적으로 기능성 화장품 시대가 개막될 것으로 예측하고 있다. 이는 화

장품의자연지향성 경향과 더불어 식물유래 천연물들이 피부노화를 방지하는데 주도적인 역할을 할 것으로 기대된다.

“ 이 논문은 1999 학년도 서울산업대학교 교내학술연구비에 의해 연구되었음”

노화 이론

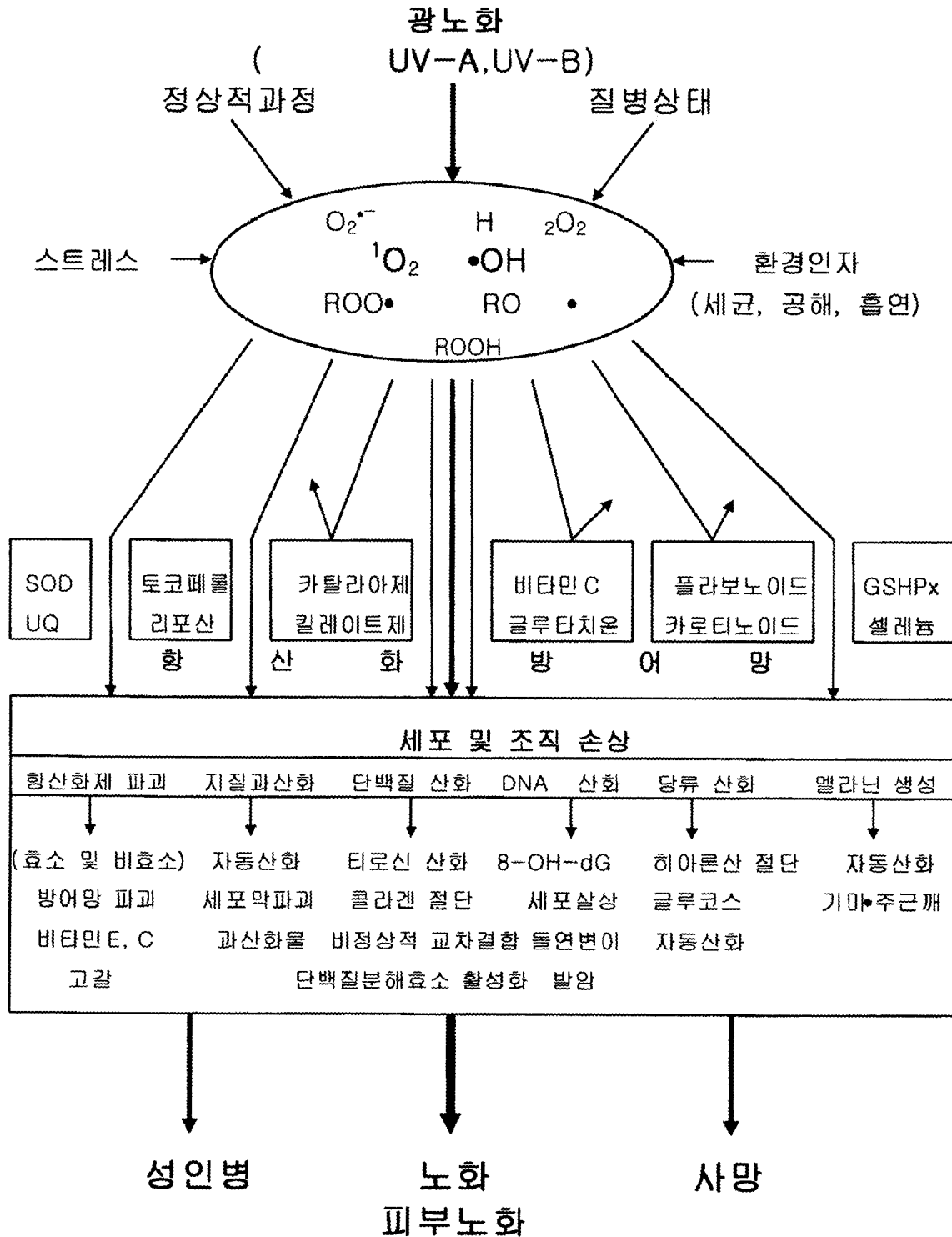


그림 2. 피부노화 메커니즘(Park, 1997)

IX. 참고 문헌

- Arshad, M., Bhadra, S. Cohen, R. and Subbiah, M., "Plasma lipoprotein peroxidation potential: a test to evaluate individual susceptibility to peroxidation", *Clin. Chem.* 37: 1756-1758(1992)
- Baker, M.S., "Free radicals and connective tissue damage", In: *Free radical damage and its Control* (C.A. Rice-Evance and R.H. Burdon, eds.), Elsevier, Amsterdam (1994)
- Biamond, P., Swaak, A.J.G., van Eijk, H.G. and Koster, J.F., *Free Radical Biol. Med.* 6: 587-591(1988)
- Bissett, D.L., Chatterjee, R. and Hannon, D.P., "Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators", *Photochem. Photobiol.* 54: 215-223(1991)
- Bode, A.M., "Metabolism of vitamin C in health and disease", *Antioxidants in disease mechanisms and therapy in advanced Pharmacology* 39: 21-47(1997)
- Boo, Y.C., Jeon, C.O., Kim, J.S. and Park, S.N., "Effects of tea catechins on the hydroxyl radical-induced degradation of DNA components", Preprint, 1st Scientific Conference of the Asian Soc. Cosm. Sci., Kobe, Japan, pp. 143-149 (1993)
- Boyer, R.F. and Cleary, C.J., "Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate-mediated ferritin iron release", *Free Rad. Biol. Med.* 3: 389-395(1987)
- Bryce, G.F., "The effects of UV radiation on skin connective tissue", In: *Oxidative Stress in Dermatology*, (J. Fuchs and L. Packer, eds), pp. 105-125, Marcel Dekker, Inc., N.Y.(1993)
- Cadet, J., Odin, F., Mouret, J.F., Polverelli, M., Audic, A., Giacomoni, P., Favier, A. and Richard, M.J., "Chemical and biochemical postlabelling methods for singling out specific oxidative DNA lesions", *Mut. Res.* 275: 343-354(1992)
- Chan, A.C. "Partners in defense, vitamin E and vitamin C", *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71(9): 725-731(1993)
- Clough, R.L., Yee, B.G. and Foote, C.S., *J. Am. Chem. Soc.* 101: 683-686(1979)
- Darr, D. and Fridovich, I., "Free radicals in cutaneous biology", *J. Invest. Dermatol.* 102: 671-675(1994)
- Davies, K.J.A. and Goldberg, A.L., "Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes", *J. Biol. Chem.*

- 262: 8220-8226(1987)
- Dhalla, K., Ganguly, P., Rupp, H., Beamish, R. and Dhalla, N., "Measurement of adrenolutin as an oxidation product of catechoamines in plasma" *Mol. Cell. Biochem* 87: 85-92(1989)
- Egawa, M., Sakamoto, T., Kumano, Y., "Whitening effect of vitamin C and its derivatives." *Fragrance Journal* Vol. 25(9); 28-36 (1997)
- Emerit, I., "Free radicals and aging of skin", In: *Free Radicals and Aging*, (I. Emerit and B. Chance, eds), Birkahuser Verlag, pp. 328-341(1992)
- Epstein, J.H., "Photomedicine", In *The Science of Photobiology*,(K.C. Smith, ed), pp. 155-192., Plenum Press, New York(1989)
- Esterbauer, H., Rotheneder, M., Waeg, G., Striedl, G. and Juergens, G., "Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein", *Chem. Res Toxicol.* 3: 77-92(1990)
- Favier, A., Sappey, C., Leclerc, P., Faure, P. and Micoud, M. "Antioxidant status and lipid peroxidation in patients infected with HIV", *Chemico. Biol. Interact.* 91: 165-180 (1994)
- Foote, C.S., "Photosensitized Oxidation and Singlet Oxygen: Conquences in Biological Systems", *Free radicals in Biology*, (W.A. Pryor, ed.), Academic Press, N.Y., Vol 2, 85-133(1976)
- Foote, C.S., "Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation", *Photochem. Photobiol.* 54: 659-(1991)
- Foote, C.S., Denny, R.W., Weaver, L., Chang, Y., and Peters, J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 171, 139-(1970)
- Frei, B., Kim, M.C. and Ames, B.N., "Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4879-4883(1990)
- Fryer, M.J., "Evidence for the photoprotective effects of vitamin E", (1990)
- Fukuyasu, K., Ito, M., Ohmori, Y., "Immunological regulating function of crude medicine" 8: 82-88(1995)
- Sporn and A.B. Roberts, eds.), Vol. 1, pp. 8-45. Academic Press, (1984)
- Funasaka, Y., Ichihashi, M., Inoue, K., "Inhibitory effect of DL- alpha-tocopheryl ferulate on melanogenesis." *Fragrance Journal* Vol. 25(9); 19-27 (1997)
- Gey, K.F., Brubacher, G.M. and Stahelin, H.B., *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 1368-1377 (1987)
- Ghorbani, A.J., and Eichler, C. "Scurvy", *J. Am. Acad. Dermatol.* 30:881-883(1994)

- Glembotski, C.C., "The α -amidation of α -melanocyte stimulating hormone in intermediate pituitary requires ascorbic acid", J. Biol. Chem. 259:13041-3048 (1984)
- Halliwell, B. and Aruoma, O.I., "DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanism and measurement in mammalian systems", FEBS Lett. 281: 9-19(1991)
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., In; Free Radicals in Biology and Medicine 2nd Edition, Oxford University Press (clarendon), Oxford(1989)
- Harman, D., "Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry", J. Gerontol. 11:298-300(1956)
- Harman, D., "Role of free radicals in aging and disease", Ann. N.Y. Acade. Sci. 673: 126-141(1992)
- Heath, R.L. and Tapel, A.L., "A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides", Anal. Biochem.. 76: 184-191(1976)
- Inoue, S., "Prospect of dermatological science in cosmetics for regulating skin aging", Fragrance Journal, 1: 45-50(1998)
- Janero, D., "Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury", Free Rad. Biol. Med. 9: 515-540 (1990).
- Jurkiewicz, B.A., Bissett, D.L. and Buettner, G.R., "Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin", J. Invest. Dermatol. 104: 484-488(1995)
- Kasai, H. and Nishimura, S., "Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen", Nucleic Acids Symp. Ser. No. 12, 165-167(1983)
- Kasai, H. and Nishimura, S., "Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by auto-oxidized unsaturated fatty acids", In; Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals, (O. Hayaishi, E. Niki, M. Kondo and T. Yoshikawa, eds), pp. 1021-1023, Elsevier Science Publishers(1988)
- Kasai, H. and Nishimura, S., "Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance", In: Oxidative Stress, Oxidants and antioxidants, (H. Sies ed.), Academic Press, pp.99-116(1991)
- Kinoshita, Y., "Inhibitors of melanin synthesis derived from lichens." Fragrance Journal Vol. 25(9); 69-73 (1997)
- Kligman, L.H., "UVA induced biochemical changes in hairless mouse skin collagen: A

- contrast to UVB effects”, In *Biological Responses to Ultraviolet A Radiation*, (F. Urbach, ed.), pp. 209-216, Valdemar, Overland Park (1992)
- Kligman, L.H., Akin, F.J. and Kligman, A.M., “Sunscreens promote the repair of ultraviolet radiation-induced dermal damage”, *J. Invest. Dermatol.* 81: 98-102 (1983)
- Koch, W.H. and Chedekel, M.R., “Photochemistry and photobiology of melanogenic metabolites: Formation of free radicals”, *Photochem. Photobiol.* 46: 229-238 (1987)
- Koga, S., Nakano, M. and Tero-Kubota, S., “Generation of superoxide during the enzymatic action of tyrosinase”, *Arch. Biochem. Biophys.* 292: 570-575 (1991)
- Koide, C., Senoo, M., Hoshino, T., “Melanogenesis-inhibitory effect of kojic acid-glabridin (oil-soluble licorice extract) composite.” *Fragrance Journal*, Vol. 25(9); 43-48 (1997)
- Korotowski, W., Pilas, B., Sarna, T. and Kalyanaraman, B., “Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins”, *Photochem. Photobiol.* 45: 185-190 (1987)
- Krinsky, N., *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 238S-246S (1991)
- Kubo, M. and Matsuda, H., “Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis”, *Fragrance J.* 8: 48-55 (1995)
- Lee, T.Y., Lee, D.H. and Park, S.N., “Pronounced protective activities of the ketocarotenoids against singlet oxygen induced photohemolysis”, *The 15th Am. Soc. Photobiol., Photochem. Photobiol.* 45: 10S (1987)
- Lunec, J., Halloran, S.P., White, A.G. and Dormandy, T.L., “Free radical oxidation (peroxidation) products in serum and synovial fluid”, *J. Rheum.* 8: 233-245 (1981)
- Maeda K., “Recent studies of melanogenesis and its control.” *Fragrance Journal* Vol. 25(9); 10-18 (1997)
- Mishima, Y., Hatae, S., Kondoh, H., Kadota, M., “Overview of research and development for new third-generation skin-lightening agents.” *Fragrance Journal* Vol. 26(1); 34-44 (1998)
- Monboisse, J.C. and Borel, J.P., “Oxidative damage to collagen”, In: *Free radicals and Aging* (Emerit et al., eds) pp. 323-327. Birkhauser Verlag, Basel (1992),
- Monboisse, J.C., Gardes-Albert, M., Randoux, A., Borel, J.P. and Ferrandini, C., “Collagen degradation by superoxide anion in pulse and gamma radiolysis”, *Biochim. Biophys. Acta* 965: 29-35 (1988)
- Murphy, M., Kolvenbach, R., Aleksis, M., Hansen, R. and Sies, H., “Antioxidant depletion in aortic cross clamping ischemia: increase of the plasma A tocopheryl quinone/ A

- tocopherol ratio", *Free Rad. Biol. Med.* 13: 95-100(1992)
- Niki, E., Saito, T., Kawakami, A. and Kamiya, Y., *J. Biol. Chem.* 259: 4117-4182(1984)
- Oikarinen, A., "The aging of skin: Chronoaging versus photoaging", *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 7: 3-4(1990)
- Oikarinen, A. and Kallioinen, M., "A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin", *Photodermatology* 6: 24-31(1989)
- Oikarinen, A., Karvonen, J., Uitto, J. and Hannuksela, M., "Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation", *Photodermatology* 2: 15-26(1985)
- Okano, Y., "Evaluation of plant extracts as active agents for skin whitening." *Fragrance Journal* Vol. 25(9); 56-62 (1997)
- Packer, L., "Oxidative stress, antioxidants, aging and disease", In: *Oxidative Stress and Aging*, (R.G. Culter, L. Packer, J. Bertram & A. Mori, eds), Birkhauser Verlag (1995)
- Packer, L., "Ultraviolet radiation (UVA,UVB) and skin antioxidants", In: *Free Radical Damage and its Control*, (C.A. Rice-Evans and R.H. Burdon, eds), Elsevier Science B.V., pp 239-255(1994)
- Park, S.N., "Quenching effects of carotenoids on singlet oxygen", Master Thesis, Seoul National University(1984)
- Park, S.N., "Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen-mediated biochemical reactions", Ph.D. Thesis, Seoul National University(1989)
- Park, S.N., "Skin aging and Antioxidants", *Proceeding of Symposium on Cosmeceuticals* 23(1): 75-132(1997)
- Park, S.N., Boo, Y.C. and Lee, T.Y., "Cell protection of the curcuminoids against the active oxygen species", The 28th SCCJ Scientific Meeting, Preprints oral presentation, 146-154, June, Kobe, Japan(1990a)
- Park, S.N., Choi, S.W., Boo, Y.C., Kim, C.K. and Lee, T.Y., "Effects of flavonoids of Ginseng leaves on erythrocyte membranes against singlet oxygen caused damage", *Korean J. Ginseng Sci.* 14(2): 191-199(1990b)
- Park, S.N., Boo, Y.C. Choi, S.W., Kim, C.K. and Lee, T.Y., "Cellular membrane protective effects of plant flavonoids against active oxygen species", The 16th IFSCC congress, Preprints poster Presentations, N.Y., U.S.A. vol. 2: 364-378 (1990c)
- Plastow, S.R., Lovell, C.R. and Young, A.R., "UVB-induced collagen changes in the skin of the hairless albino mouse", *J. Invest. Dermatol.* 88: 145-148(1987)

- Poot, M., "Flow cytometric analysis of cell cycle dependent changes in cellthiol level by combining a new laser dye with Hoeschst 3342", *Cytometry* 12: 1184(1991)
- Roderer, M., Anderson, M., Rabin, R. Herzenberg, L. and Herzenberg, L., "Redox plays a central role in T-cell signalling regulation of HIV and possibly the progression of AIDS", Conference on oxidative stress in HIV(Bethesda).(1993)
- Sauberlich, H.E., "Pharmacology of vitamin C", *Annu. Rev. Nutr.* 14: 371-391(1994)
- Scharffetter, K., Wlaschek, M., Hogg, A., Schothorst, A., Goerz, G, Krieg, T. and Plewig, G., "UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo", *Arch. Dermatol. Res.* 283: 506-511(1991)
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Briviba, K. and Sies, H., "Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts", *FEBS Lett.* 331: 304-306(1993),
- Shinmoto, H., "Regulation of melanogenesis with foodstuffs." *Fragrance Journal* ,Vol.25(9) : 63-68 (1997)
- Sinomiya, T., Hikima, T., Sakamaki, T. "Application of alpha -hydroxy acids for lightening and whitening cosmetics." *Fragrance Journal*, Vol. 25(9); 49-55 (1997)
- Sies, H., "Biochemistry of oxidative stress", *Angewandte Chem.* 25: 1058-1071(1986)
- Sies, H., "Oxidative stress: Oxidants and antioxidants", Academic Press, N.Y.(1991)
- Slater, T.F., "Overview of methods used for detecting lipid peroxidation", *Methods in Enzymology* 105: 283-305(1984)
- Sobotka, P., Brottman, M., Weitz, Z., Birnbaum, A., Skosey, J. and Zarling, E., "Elevated breath pentane in heart failure reduced by free radical scavenger", *Free Rad. Biol. Med.*, 14: 643-647(1993)
- Tachibana, S., Tanaka, Y., "Inhibitory effect of ellagic acid on melanogenesis." *Fragrance Journal* Vol. 25(9); 37-42 (1997)
- Takeya, K., "Antimicrobial and anti-inflammatory activities of crude drugs" *Fragrance Journal*, 8: 56-64 (1995)
- Traber, M.G., "Regulation of Human Plasma Vitamin E", *Antioxidants in disease mechanisms and therapy in advanced Pharmacology* 39: 49-63(1997)
- Ward, A. and Mc Burney, A. and Lunec, J., "Evidence for the involvement of oxygen derived free radicals in ischemia-reperfusion injury", *Free Rad. Res.* 20: 21-28(1994)
- Ward P.A. and Mulligan M.S., "Leukocyte oxygen products and tissue damage", *The Molecular bases of oxidative damage by leukocytes*: Ed. Jesaitis A.J., Dratz E.A. CRC Press. 139-147 (1992)
- Witt, E.H., Motchnik, P., and Packer, L., "Evidence for UV light as an oxidative stressor

in skin” Oxidative stress in dermatology(J. Fuchs and L. Packer, eds), pp. 29-47,
Marcel Dekker, Inc., N.Y.(1993)

Wlaschek, M., Briviba, K., Stricklin, G.P., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K.,
“Singlet oxygen may mediated the ultraviolet A induced synthesis of interstitial
collagenase?”, J. Invest. Dermatol. 104:194-198(1995)

Yamauchi, M., Prisanh, P., Haque, Z. and Woodley, D.T., “Collagen cross-linking
in sun-exposed and unexposed sites of aged human skin”, J. Invest. Dermatol.
97: 938-941(1991)